

Original Article

Study of common chromosomal abnormalities and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene polymorphism (5G/4G) and prothrombin (F2) gene mutation (G20210A) in women with recurrent abortions in North West of Iran

Roya Bagheri¹, Seyyed Ali Rahmani^{2*}, Leila Khorramifar², Solmaz Ilkhchoui²¹Faculty of Basic Sciences, Rabe-e Rashid Higher Education Institute, Tabriz, Iran²Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 31 Aug 2020

Accepted: 23 Dec 2020

ePublished: 3 Nov 2021

Keywords:

Chromosomal
abnormalities,
Plasminogen activator
inhibitor gene,
Recurrent abortions,
Factor 2 gene

Abstract

Background. Parental chromosomal abnormalities as well as changes in genes encoding thrombophilic factors are common causes of recurrent abortions. One of the causes of thrombophilia is Factor II (F2) gene mutation (G20210A) and plasminogen activator inhibitor gene (PAI-1) polymorphism (4G/5G). Therefore, the present study aimed to investigate the frequency of chromosomal abnormalities and the association of thrombophilic gene polymorphisms in patients with abortion in northwestern Iran.

Methods. In the present case-control study, cytogenetic analysis of 60 couples with a history of recurrent abortions was performed by the standard 72-hour culture of lymphocytes and G-banding. The polymorphism (5G/4G) of PAI-1 gene and the mutation (G20210A) of F2 genes were evaluated using RFLP-PCR and ARMS-PCR molecular methods, respectively. The obtained data were analyzed using statistical software.

Results. No significant abnormalities affecting abortion were observed in cytogenetic studies; in the molecular study, the frequency of the 4G allele in patients and control groups were 54.2% and 33.3%, respectively; the frequency of 5G allele in the patients and control groups were 45.8% and 66.8%, respectively. The frequency of 5G/5G and 4G/5G genotypes is 25.0% and 41.6% in the patient group, and 55.0% and 23.3% in the control group, respectively. Also, the frequency of 4G/4G genotype in patients and controls were 33.3% and 21.6%, respectively.

Conclusion. The results of this study show that there is a significant relationship between the frequency of the 4G allele of the PAI-1 gene with susceptibility to recurrent abortions in northwestern women, while no was relationship between F2 gene mutation and recurrent abortions was observed.

How to cite this article: Bagheri R, Rahmani S.A, Khorramifar L, Ilkhchoui S. Study of common chromosomal abnormalities and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene polymorphism (5G/4G) and prothrombin (F2) gene mutation (G20210A) in women with recurrent abortions in North West of Iran. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2021;43(5):400-409. doi: 10.34172/mj.2021.066. Persian.

*Corresponding author; Email: rahmaniseyedali@yahoo.com

© 2021 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

Extended Abstract

Background

Recurrent pregnancy loss (RPL) occurs when a woman experiences two or more consecutive abortions before her 20th week of pregnancy. RPL is a serious reproductive problem affecting more than 5% of reproductive-age women. Despite extensive research efforts on the causes of RPL, between 50 and 60% remain idiopathic. Chromosome abnormalities, as well as changes in genes encoding thrombophilic factors, are common causes of miscarriage in pregnant women. Previous studies showed that genetic factors associated with thrombophilia may contribute to recent miscarriages. This relationship is controversial, due to contradictory studies that confirm or reject it. Factor II gene mutation (G20210A) and plasminogen activator inhibitor gene (PAI-1) polymorphism (4G/5G) are two causes of thrombophilia. Hence, the objective of the present study was to investigate the frequency of chromosomal abnormalities and the association between thrombophilic gene polymorphisms and abortion in northwest Iran.

Methods

As part of this case-control study, we selected 60 couples that have recurrent miscarriages and 60 women without previous miscarriage history from those referred to Dr. Rahmani's medical genetics Laboratory. The studied subjects were women aged 20-45 years old with at least two consecutive miscarriages. Women with anatomical abnormalities, autoimmune diseases, and genital infections were excluded from this study. Cytogenetic testing was done on both female and male participants in the study;

molecular analyses were performed only on women with recurrent miscarriages and on those without. Cytogenetic analysis of 60 couples with a history of recurrent miscarriage was performed by standard 72-hour lymphocyte culture and G-banding. The genomic DNA was extracted from 5 ml peripheral blood samples using the proteinase K method. The extracted DNA samples were amplified using polymerase chain reaction (PCR) methods. 5G/4G polymorphisms of the PAI-1 gene and G20210A mutation of the F2 gene were performed by PCR-ARMS and PCR-RFLP molecular methods, respectively. We analysed the collected data using statistical software (SPSS). The ethics committee of Tabriz University of Medical Sciences approved this study protocol (Ethical code: IR.TBZMED.REC.1398.636).

Result

Women in the study were an average age of 20-45 years and the highest rate of recurrent miscarriage (32%) was observed among patients aged 31-35. The lowest and highest numbers of abortions were 2 and 4, respectively.

Cytogenetic examination

On a Cytogenetically studied cohort of 60 couples, 17 had chromosomal variants, including 9 males and 8 females with karyotype variants. Chromosomes 15 and 21 had the highest frequency of variants, and Chromosomes 14 and 16 had the lowest frequency of variants.

Molecular Genetics Results

Investigation of PAI-1 Gene Polymorphism

The results showed that the frequency of genotypes 5G/5G and 4G/5G among patients and controls, were 25% and 41.6%, respectively. Also, the frequency of 4G/4G genotype in the case and control groups was 33.3% and 21.6%, respectively. The frequency of allele 4G in case and control groups were 54.2 % and 33.3%, respectively. And the frequency of allele 5G in the case and control groups was 45.8% and 66.6%, respectively. According to the results of statistical analysis, there is a significant difference between the case and control groups regarding genotypic and allelic frequency. Therefore, 5G/4G gene polymorphism can be a risk factor for recurrent miscarriages.

Investigation of F2 Gene mutation

In our study, the genotypes of 59 cases were wild homozygous (GG) (98.3%), and 1 case (1.7%) was heterozygous (GA). None of the patients carried homozygous mutants (AA). The results of statistical analysis showed that there

was no significant difference between case and control groups in terms of genotypic and allelic frequency. So (G20210A) mutation cannot be a risk factor for recurrent miscarriages.

Conclusion

This study describes the frequency of chromosomal abnormalities, the frequency of targeted alleles, and the distribution of genotypes in the population of northwest Iran. An analysis of these genes can help identify individuals at risk. The results of this study suggested that there is a significant relationship between polymorphism of the 4G/5G gene and the risk of recurrent miscarriage, while no significant association was observed between prothrombin gene mutation (G20210A) and recurrent miscarriage. In the case of chromosomal variants, there is a need for further studies to determine if chromosomal variants are linked to recurrent miscarriages.

مطالعه ناهنجاری‌های شایع کروموزومی و پلی‌مورفیسم (۴G/۵G) ژن مهارگر فعال‌کننده پلاسمینوژن (PAI-1) و جهش (G20210A) ژن پروترومبین (F2) در زنان با سقط مکرر جنین در شمالغرب کشور

رویا باقری^۱، سید علی رحمانی^{۲*}، لیلا خرمی‌فر^۲، سولماز ایلیچوی^۲

^۱دانشکده علوم پایه، موسسه آموزش عالی ربع رشید، تبریز، ایران
^۲دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

چکیده

زمینه. ناهنجاری‌های کروموزومی والدین و همچنین تغییر در ژن‌های کدکننده فاکتورهای ترومبوفیلی مادران باردار از عوامل سقط مکرر هستند. یکی از علل ترومبوفیلی، جهش (G20210A) ژن فاکتور ۲ (F2) و پلی‌مورفیسم (۴G/۵G) ژن مهارگر فعال‌کننده پلاسمینوژن (PAI-1) هستند. بنابراین هدف از مطالعه حاضر، بررسی فراوانی ناهنجاری‌های کروموزومی و ارتباط پلی‌مورفیسم ۴G/۵G ژن PAI-1 و جهش G20210A ژن F2 در زنان مبتلا به سقط مکرر جنین در شمالغرب ایران بود.

روش کار. در مطالعه مورد-شاهدی حاضر، آنالیز سیتوژنتیکی ۶۰ زوج با سابقه سقط مکرر با روش استاندارد کشت ۷۲ ساعته لنفوسیت و G-بندینگ انجام گرفت. بررسی پلی‌مورفیسم ۴G/۵G ژن PAI-1 و جهش G20210A ژن F2 به ترتیب با روش‌های مولکولی ARMS-PCR و RFLP-PCR انجام گرفت. در نهایت داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزارهای آماری تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها. اختلالات سیتوژنتیکی چشمگیری که در سقط مکرر جنین تاثیرگذار باشند، مشاهده نشد. در مطالعه مولکولی، فراوانی آلل ۴G در گروه مورد و شاهد به ترتیب ۵۴/۲ و ۳۳/۳ درصد بود. فراوانی آلل ۵G در گروه مورد و شاهد به ترتیب ۴۵/۸ و ۶۶/۶ درصد است. فراوانی ژنوتیپ‌های ۵G/۵G و ۴G/۵G به ترتیب در گروه مورد معادل ۲۵ و ۴۱/۶ درصد و در گروه شاهد معادل ۵۵ و ۲۳/۳ درصد بود. همچنین فراوانی ژنوتیپ ۴G/۴G در گروه مورد و شاهد به ترتیب ۳۳/۳ و ۲۱/۶ درصد مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری. نتایج این مطالعه نشان دهنده ارتباط معنی‌دار بین فراوانی آلل ۴G ژن PAI-1 و استعداد ابتلا به سقط مکرر در زنان شمالغرب کشور بود. در حالی که ارتباطی بین جهش ژن F2 و سقط مکرر مشاهده نشد.

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۳۹۹/۶/۱۰
پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۰۳
انتشار برخط: ۱۴۰۰/۸/۱۲

کلید واژه‌ها:

سقط مکرر،
ناهنجاری‌های کروموزومی،
ژن مهارگر فعال‌کننده
پلاسمینوژن، ژن فاکتور ۲

مقدمه

به عنوان مهمترین عوامل دخیل در سقط مکرر در نظر گرفته می‌شوند.^{۳-۷} شواهد نشان می‌دهد که میان ناهنجاری‌های کروموزومی در جنین و افزایش خطر سقط جنین همبستگی مثبت وجود دارد.^۸ زوج‌هایی که حامل آنومالی‌های کروموزومی هستند در معرض خطر سقط جنین مکرر بوده و شانس کمتری برای تولد نوزاد زنده دارند.^{۹-۱۳} اخیراً با مطالعات صورت گرفته، مشخص شده است که وجود زمینه ژنتیکی ترومبوفیلی با سقط مکرر ارتباط دارد. این ارتباط موضوع بسیار بحث برانگیزی است، زیرا مطالعات و نتایج متناقضی در تایید و رد آن بدست آمده است.^{۱۴}

سقط جنین خودبخودی خاتمه غیر ارادی بارداری پیش از هفته بیستم است.^۱ در این میان، زنانی که بیش از ۲ بار سقط جنین پی در پی را تجربه کنند، دچار سقط مکرر هستند.^۲ در سقط مکرر به عنوان یک مشکل چند علتی، مسایل متعددی مانند سن مادر، آنومالی‌های ساختمانی رحم، اختلال در جفت، مشکلات هورمونی، اختلالات کروموزومی و ژنتیکی والدین یا خود جنین، اختلالات ایمنی و یا عدم تعادل در عملکرد غدد درون‌ریز مطرح است. در این میان سه عامل ناهنجاری ساختاری و عددی کروموزوم، اختلالات التهابی و خود ایمنی و پلی‌مورفیسم آللی برخی ژن‌های ترومبوفیلیک

* نویسنده مسؤول: ایمیل: rahmaniseyedali@yahoo.com

حق تالیف برای مولفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

نکات کاربردی

ارتقاء دقت تشخیص فاکتورهای خطر سقط مکرر و شناسایی ناهنجاری‌های کروموزومی در بیماران. محاسبه خطر ابتلا به سقط مکرر در افراد دارای تغییرات ژن‌های PAI-1 و F2 در جمعیت شمالغرب کشور.

این مطالعه توسط کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی تبریز با کد مصوبه اخلاقی IR.TBZMED.REC.1398.636 تایید و رضایت آگاهانه از همه افراد کسب گردید.

آنالیز سیتوژنتیکی

ابتدا ۵ میلی‌لیتر خون محیطی از ۶۰ زوج دچار عارضه سقط مکرر با استفاده از سرنگ هیپارینه گرفته شد. سپس لنفوسیت‌های خون محیطی در محیط کشت RPMI-1640 کشت داده شدند. دو ماده سرم جنین گاوی (FBS, Fetal PHA, bovine serum) و فیتوهاگلوتینین (Phytohaemagglutinin) به محیط کشت به منظور رشد سلول‌ها و تحریک تقسیم سلولی افزوده شد و به مدت ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. در ادامه از روش GTG بندینگ توسط پیش تیمار کروموزوم‌ها با تریپسین و به دنبال آن از رنگ آمیزی گیمسا استفاده شد. برای هر بیمار ۲۵ متافاز به منظور آنالیز کاریوتایپ بررسی شد.

بررسی مولکولی فاکتورهای ژنتیکی

در مطالعه حاضر، از روش مولکولی RFLP-PCR جهت بررسی جهش (G20210A) ژن F2 و از روش مولکولی ARMS-PCR جهت بررسی پلی‌مورفیسم (۵G/۴G) ژن PAI-1 استفاده شد. در روش PCR-RFLP، به دنبال استخراج DNA با روش نمک زدن (Salting out)، آزمون PCR مبتنی بر Taq-پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (که توالی آن‌ها در زیر آورده شده است) برای ژن F2 انجام شد. سپس محصول PCR با استفاده از آنزیم محدود کننده اختصاصی به منظور هدف قرار دادن جهش هضم شد. سپس قطعات DNA روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شده و برای مشاهده و تشخیص قطعات از دستگاه ژل داکيومنت استفاده شد.

جهش ژن پروترومبین یا فاکتور ۲ (F2) و پلی‌مورفیسم ژن مهارگر فعال‌کننده پلازمینوژن (Plasminogen activator inhibitor-1 PAI-1) در ایجاد سقط مکرر خودبخودی از مسیر ترومبوفیلی تاثیرگذار هستند. مقادیر بالای PAI-1 اندوتلیالی باعث کاهش فیبرینولیز و ترومبوز می‌شود.^{۱۵،۱۶} به‌طور طبیعی ژن PAI-1 توسط آلل ۵G/۵G بیان می‌شود. پلی‌مورفیسم شایع ۴G/۵G در ناحیه پروموتور این ژن و ۶۷۵ جفت باز قبل از ناحیه رونویسی قرار گرفته است. در صورت وجود آلل ۴G در این ژن، فاکتورهای تنظیم‌کننده ترجمه به ۴G متصل می‌شوند و پروتئین بیشتری نسبت به آلل ۵G تولید می‌شود. این امر موجب اختلال در سیستم فیبرینولیز و انعقاد و در نتیجه ترومبوز مکرر و پیر شدن زودرس جفت می‌شود.^{۱۶-۱۸} از سوی دیگر، جهش شایع G20210A در ژن F2 در ناحیه ترجمه نشده 3' رخ می‌دهد. در این جهش گوانین با آدنین جایگزین می‌شود و سبب افزایش سطح پلاسمایی پروترومبین شده و زمینه را برای ترومبوز وریدی فراهم می‌کند.^{۱۹،۲۰} بنابراین در مطالعه حاضر، ناهنجاری‌های شایع کروموزومی در زوج‌های مبتلا به سقط مکرر خودبخودی بررسی خواهد شد. همچنین جهش G20210A ژن F2 و پلی‌مورفیسم ۵G/۵G ژن PAI-1 در زنان مبتلا به سقط مکرر خودبخودی و زنان سالم با بارداری موفق در جمعیت شمالغرب ایران بررسی خواهد شد.

روش کار

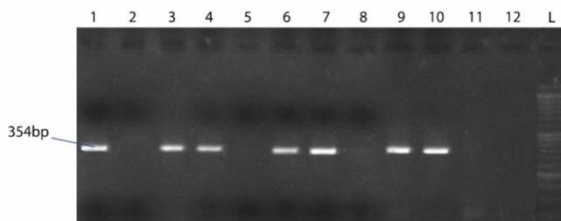
در این مطالعه مورد-شاهدی ۶۰ زوج با سابقه سقط مکرر خودبخودی و ۶۰ خانم دارای حداقل یک فرزند و بدون هیچ سابقه سقط به عنوان گروه شاهد از بین مراجعین به آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر رحمانی انتخاب شدند. برای گروه بیمار از خانم‌هایی نمونه‌گیری شد که سابقه حداقل دو سقط خودبخودی پشت سر هم قبل از هفته ۲۰ بارداری داشته و خانم‌هایی که ناهنجاری‌های آناتومی و بیماری‌های خودایمنی و عفونت‌های ناحیه تناسلی داشتند از مطالعه خارج شدند. بررسی سیتوژنتیکی روی زوج‌های مورد مطالعه (زن و مرد) انجام گرفت، در حالی‌که بررسی مولکولی فقط روی زنان با سابقه سقط مکرر (مورد) و زنان با بارداری‌های موفق (شاهد) انجام شد. حجم نمونه با استفاده از فرمول $N = z^2 p(1-p)/d^2$ به دست آمد.

جدول ۱. نتایج کاربوتایپ مشاهده شده از بررسی ۶۰ زوج مبتلا به سقط مکرر

تعداد	کاربوتایپ
۴۴	۴۶, XX۴۶, XY
۶	۱۵p ⁺
۲	۱۵ps ⁺
۲	۲۲ps ⁺
۱	۱۶qh ⁺
۱	۱۴ps ⁺
۳	۲۱ps ⁺
۱	۱۵Ps ⁺ و ۲۱Ps ⁺

بررسی پلی مورفیسم ژن PAI-1

بر اساس نتایج بدست آمده، فراوانی ژنوتیپ‌های ۴G/۵G و ۵G/۵G به ترتیب در گروه بیماران ۲۵ و ۴۱/۶ درصد و در گروه شاهد ۵۵ و ۲۳/۳ درصد بود. همچنین فراوانی ژنوتیپ ۴G/۴G در گروه مورد و شاهد به ترتیب ۳۳/۳ و ۲۱/۶ درصد مشاهده گردید. فراوانی آلل ۴G در گروه مورد و شاهد به ترتیب ۵۴/۲ و ۳۳/۳ درصد بوده و فراوانی آلل ۵G در گروه مورد و شاهد به ترتیب ۴۵/۸ و ۶۶/۶ درصد است. فراوانی ژنوتیپی و آللی پلی مورفیسم ۴G/۵G ژن PAI-1 در زنان دچار سقط مکرر و زنان سالم در جدول ۲ نشان داده شده است. اندازه محصولات تکثیر شده و تعیین ژنوتیپ و آلل افراد مورد مطالعه با استفاده از روش مولکولی ARMS-PCR در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد که میان دو گروه مورد و شاهد از لحاظ فراوانی ژنوتیپی و آللی اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.05$). بنابراین پلی مورفیسم ۵G/۴G ژن PAI-1 می‌تواند به عنوان یک عامل خطر در بروز سقط‌های مکرر خودبخودی باشد (جدول ۲).



شکل ۱. الکتروفورز محصول ARMS-PCR جهت بررسی پلی مورفیسم ژن PAI-1 روی ژل آگارز ۱ درصد. از سمت چپ به راست: (۱) کنترل منفی، (۲) کنترل هتروزیگوت، (۳) کنترل مثبت، (۴) نمونه منفی، (۵) نمونه هتروزیگوت، (L) مارکر (۵۰ bp).

'Forward: 5'-GCACAGACGGCTGTTCTCTT-3

'Reverse: 5'-ATAGCACTGGGAGCATTGAAGC-3

در روش ARMS-PCR، آزمون PCR مبتنی بر Taq-پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (با توالی ذکر شده در زیر) برای ژن PAI-1 انجام شد. سپس قطعات DNA روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شده و برای مشاهده و تشخیص قطعات از دستگاه ژل داکيومنت استفاده شد.

'Forward N: 5'-GTCTGGACACGTGGGGG-3

'Forward M: 5'-GTCTGGACACGTGGGGA-3

'Reverse: 5'-CACTGCTCCACAGAATCTATCGG-3

آنالیز آماری

تفاوت‌های آماری و تعادل هاردی-واینبرگ (HWE) میان گروه مورد و شاهد با استفاده از آنالیز آماری X^2 و آزمون فیشر انجام گرفت. همچنین تفاوت‌های پارامتری با استفاده از آزمون T مقایسه شدند. تمامی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS آنالیز شده و $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری آماری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

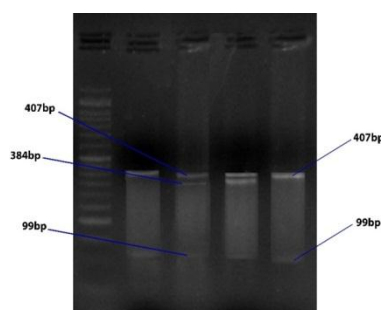
فراوانی سن زنان مطالعه بین ۲۰-۴۵ سال بود که بیشترین میزان سقط مکرر خودبخودی (۳۲ درصد) در بیماران با محدوده سنی ۳۱-۳۵ مشاهده شد. کمترین و بیشترین تعداد سقط به ترتیب ۲ و ۴ مرتبه بود. از بین ۶۰ بیمار، ۳۲ نفر (۵۳/۳۳ درصد) هیچ رابطه خویشاوندی با زوج خود نداشتند، ۱۹ نفر (۳۱/۶۶ درصد) با درجه خویشاوندی ۵ و همچنین ۹ نفر (۱۵ درصد) با درجه خویشاوندی ۳ بودند.

بررسی سیتوژنتیکی

از بین ۶۰ زوج مورد بررسی سیتوژنتیکی، در ۱۷ مورد واریانت کروموزومی مشاهده شد، که از این ۱۷ فرد، ۸ زن و ۹ مرد واریانت کاربوتایپ داشتند. نتیجه کاربوتایپ زوجین مورد مطالعه در جدول شماره ۱ به صورت کامل آورده شده است.

جدول ۲. فراوانی ژنوتیپی و آلی پلی مورفیسم ۴G/۵G ژن PAI-1 و جهش G20210A ژن F2 در زنان دچار سقط مکرر و زنان سالم.

%۹۵ Confidence Interval		OR	P<value	گروه شاهد		گروه مورد		ژنوتیپ و آل (ژن پروترومبین)
بالا	پایین			تعداد	درصد	تعداد	درصد	
-	-	-	-	۵۵	۳۳	۲۵	۱۵	۵G/5G
۸/۵۵۶	۱/۳۳۹	۳/۳۸۵	۰/۰۰۹	۲۱/۶	۱۳	۳۳/۳	۲۰	۴G/4G
۹/۶۱۲	۱/۶۰۶	۳/۹۲۹	۰/۰۰۲	۲۳/۳	۱۴	۴۱/۶	۲۵	4G/5G
-	-	-	-	۳۳/۳	۴۰	۵۴/۲	۶۵	۴G
۳/۹۸۶	۱/۴۰۲	۲/۳۶۴	۰/۰۰۱	۶۶/۶	۸۰	۴۵/۸	۵۵	۵G
% ۹۵ Confidence Interval		OR	P<value	گروه شاهد		گروه مورد		ژنوتیپ و آل (ژن پروترومبین)
بالا	پایین			تعداد	درصد	تعداد	درصد	
۰/۵۹۴	۰/۴۱۴	۰/۴۹۶	۰/۳۱۵	۱۰۰	۶۰	۹۸/۳	۵۹	GG
-	-	-	-	۰	۰	۱/۷	۱	GA
-	-	-	-	۰	۰	۰	۰	AA
-	-	-	-	۰	۰	۰/۰۸	۱	A
۲/۲۸۱	۱/۷۶۸	۲/۰۰۸	۰/۳۱۶	۱۰۰	۱۲۰	۹۹/۲	۱۱۹	G



شکل ۲. الکتروفورس محصول RFLP-PCR جهت بررسی جهش ژن F2 روی ژل آگارز ۲ درصد. از سمت چپ به راست: (L) مارکر (۵۰bp)، (۱) کنترل هموزیگوت وحشی، (۲) کنترل هتروزیگوت، (۳) نمونه هتروزیگوت، (۴) نمونه هموزیگوت وحشی.

بحث

سقط مکرر خودبخودی یکی از مشکلات مهم زوجین است که بیش از ۵ درصد از زنان را درگیر می‌کند.^{۶،۷} حدود ۳۰ درصد از موارد سقط‌های مکرر به علت تنوع و جهش در ژن‌های عوامل ترومبوفیلی بوجود می‌آیند. ترومبوفیلی یک ناهنجاری چند ژنی است که جهش‌ها و پلی مورفیسم‌های بسیاری روی ژن‌هایی همچون فاکتور انعقادی ۲ (F2)، فاکتور انعقادی ۵ (F5)، فاکتور انعقادی ۱۳ (F13) و آنزیم متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز (MTHFR) از عوامل آن هستند.^{۵-۷} در مطالعه حاضر نیز پلی مورفیسم ۴G/۵G ژن PAI-1 و جهش G20210A ژن F2 در جمعیت شمالغرب ایران در دو گروه مورد و شاهد بررسی شد. فراوانی آل‌های ۴G یا ۵G و توزیع ژنوتایپ‌های ژن PAI-1 در موقعیت ۶۷۵ در هر دو گروه با یکدیگر مقایسه گردید. آنالیز آماری نشان داد که بین اختلاف معنی‌داری وجود دارد. طبق نتایج مطالعه حاضر، ارتباط معنی‌دار بین پلی مورفیسم ۴G/۴G ژن PAI-1 و سقط

بررسی جهش ژن F2

بر اساس نتایج بدست آمده، ۵۹ مورد (۹۸/۳ درصد) از بیماران مورد مطالعه ژنوتیپ GG (هموزیگوت وحشی) و ۱ مورد (۱/۷ درصد) ژنوتیپ GA (هتروزیگوت) داشتند. با این حال ژنوتیپ AA (هموزیگوت موتانت) در هیچ یک از بیماران مورد مطالعه مشاهده نگردید. همچنین فراوانی آل‌های G وحشی ۹۹/۲ درصد و فراوانی آل‌های A ۰/۰۸ درصد بود. این در حالی است که در افراد گروه شاهد، فراوانی ژنوتیپ GG و آل‌های G ۱۰۰ درصد بوده و ژنوتیپ‌های GA و AA و همچنین آل‌های A در هیچ یک از افراد گروه شاهد مشاهده نگردید. فراوانی ژنوتیپی و آلی جهش G20210A ژن F2 در زنان دچار سقط مکرر و زنان سالم در جدول ۲ نشان داده شده است. اندازه محصولات تکثیر شده و تعیین ژنوتیپ و آل افراد مورد مطالعه با استفاده از روش مولکولی RFLP-PCR در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد که میان دو گروه مورد و شاهد از لحاظ فراوانی ژنوتیپی و آلی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($P > ۰/۰۵$).

مبتلا به سقط مکرر مشاهده گردید. برای بیان این که وجود این واریان‌های طبیعی باعث ایجاد سقط مکرر شده است یا خیر، مطالعات بیشتر ضروری است. در مجموع نتایج مطالعات پیشین نشان می‌دهد که سقط مکرر یک بیماری چند عاملی و پیچیده بوده و به دلیل پلی‌مورفیسم‌ها، جهش‌ها و ناهنجاری‌های کوموزومی بوجود می‌آید. با این حال مطالعات بیشتر روی مکانیسم‌های مولکولی تروموفیلی، در جمعیت‌ها و نژادهای مختلف با حجم نمونه بزرگتر، جهت تعیین مکانیسم مولکولی این بیماری بسیار اهمیت دارد.^{۲۷-۲۹}

نتیجه‌گیری

این مطالعه فراوانی ناهنجاری‌های کروموزومی و فراوانی آلل‌ها و توزیع ژنوتایپ ژن‌های F2 و PAI-1 را در جمعیت شمالغرب ایران گزارش می‌دهد. غربالگری مولکولی این ژن‌ها می‌تواند در شناسایی افراد در معرض خطر کمک کند. یافته‌های مطالعه نشان می‌دهد بین پلی‌مورفیسم ۴G/۵G ژن PAI-1 و خطر سقط مکرر ارتباط معنی‌داری وجود دارد. در حالی که ارتباط معنی‌داری بین جهش G20210A ژن F2 و سقط مکرر مشاهده نگردید.

قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد رویا باقری با راهنمایی جناب آقای دکتر سید علی رحمانی و با مشاوره خانم دکتر لیلا خرمی‌فر و خانم دکتر سولماز ایلیخچویی است. از تمامی کارکنان آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر رحمانی جهت کمک‌های بی‌دریغ در انجام این مطالعه، تشکر می‌کنیم.

ملاحظات اخلاقی

پروتکل این مطالعه در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی تبریز در تاریخ ۱۳۹۸/۶/۲۵ با کد پژوهشی ۳۰۸۲ به تصویب رسیده است. (IR.TBZMED.REC.1398.636).

منابع مالی

این مقاله منابع مالی ندارد.

مکرر، تاییدکننده دو مطالعه قبلی انجام شده در ایران است.^{۲۱،۲۲} در مطالعه انجام شده توسط اعرابی و همکاران روی جمعیت ایرانی، ارتباط معنی‌داری میان پلی‌مورفیسم ۴G/۴G ژن PAI-1 و سقط مکرر گزارش گردید.^{۲۱} در مطالعه دیگری توسط بیگدلی و همکاران روی جمعیت ایرانی نشان داده شد که پلی‌مورفیسم ۴G/۴G ژن PAI-1 می‌تواند به عنوان یک عامل خطر برای سقط مکرر در نظر گرفته شود.^{۲۲} در مطالعه‌ای که توسط بوبالو و همکاران روی جمعیت کرواسی انجام گرفت، ارتباط معنی‌داری میان پلی‌مورفیسم ۴G/۴G ژن PAI-1 و سقط مکرر گزارش گردید.^{۲۳} در یک مطالعه متاآنالیز توسط هانگ و همکاران نقش پلی‌مورفیسم ۴G/۴G ژن PAI-1 در زنان مبتلا به سقط مکرر در مناطق آسیایی، آفریقایی، اروپایی و آمریکایی بررسی شد. نتایج آن‌ها نشان دهنده ارتباط پلی‌مورفیسم ۴G/۴G ژن PAI-1 در زنان مبتلا به سقط مکرر در تمامی مناطق جغرافیایی بود.^{۲۴} نتایج مطالعات یادشده هم‌راستا با مطالعه حاضر بوده و نشان‌دهنده نقش مهم پلی‌مورفیسم ۴G/۴G ژن PAI-1 در سقط مکرر است. از سوی دیگر، جهش G20210A ژن F2 و مقایسه آماری میان دو گروه مورد و شاهد ارتباط معنی‌داری از لحاظ فراوانی ژنوتیپی و آللی مشاهده نگردید. نتایج مطالعه حاضر هم‌راستا با نتایج مطالعه انجام شده توسط عیسی‌زاده و همکاران در جمعیت آذربایجان ایران بود.^{۱۹} در یک مطالعه توسط موسونی و همکاران نقش جهش G20210A ژن F2 روی سقط مکرر خودبخودی در جمعیت الجزایر بررسی شد. آن‌ها نشان دادند که در فراوانی جهش G20210A ژن F2 اختلاف معنی‌داری میان گروه مورد و شاهد وجود ندارد.^{۲۵} در مطالعه دیگری توسط آلتینتاش و همکاران روی جمعیت ترکیه نشان داده شد که جهش G20210A ژن F2 نقش مهمی در پاتوژنز سقط مکرر خودبخودی ندارد.^{۲۶} در بررسی‌های سینوژنتیکی در مطالعه حاضر، ۷۳/۳۲ درصد از زوج‌های مورد مطالعه کاربوتایپ طبیعی داشتند و در ۲۶/۶۷ درصد از آن‌ها پلی‌مورفیسم‌های رایج کروموزومی مشاهده گردید. کروموزوم‌های ۱۵ و ۲۱ به ترتیب با ۵۶/۲۵ و ۲۵ درصد بیشترین فراوانی واریانت داشته و کروموزوم‌های ۱۴ و ۱۶ کمترین فراوانی واریانت را داشتند (۶/۲۵ درصد). مردان و زنان تقریباً نسبت برابری از شیوع واریانت را نشان دادند. با وجود این که واریان‌های مشاهده شده در مطالعه حاضر جزو تغییرات طبیعی کروموزوم محسوب می‌گردد، این تغییرات در ۲۶/۶۷ درصد از زوج‌های

منافع متقابل

مؤلفان اظهار می‌دارند که منافع متقابلی از تألیف و یا انتشار این مقاله ندارند.

مشارکت مؤلفان

سید علی رحمانی طراحی و راهنمای مطالعه، رویا باقری به عنوان همکار طرح در انتخاب موضوع، اجرا، تحلیل نتایج

و تألیف مقاله، لیلا خرمی‌فر و سولماز ایلخچویی به عنوان راهنما و مشاور در طرح و همکاری در جمع‌آوری نمونه نقش داشته و نسخه نهایی مقاله را خوانده و تایید کرده‌اند.

References

- Meka A, Reddy BM. Recurrent spontaneous abortions: an overview of genetic and non-genetic backgrounds. *International Journal of Human Genetics*. 2006 Jun 1;6(2):109-17. doi: 10.1080/09723757.2006.11885950
- McNamee K, Dawood F, Farquharson R. Recurrent miscarriage and thrombophilia: an update. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2012;24(4):229-34. doi: 10.1097/gco.0b013e32835585dc
- Nasirpour H, Azari Key Y, Kazemipur N, Majidpour M, Mahdavi S, Hajazimian S, et al. Association of Rubella, Cytomegalovirus, and Toxoplasma Infections with Recurrent Miscarriages in Bonab-Iran: A Case-Control Study. *Gene Cell Tissue* 2017;4(3):e60891. doi: 10.5812/gct.60891
- Shiralizadeh J, Barmaki H, Haiaty S, Faridvand Y, Mostafazadeh M, Mokarizadeh N, et al. The effects of high and low doses of folic acid on oxidation of protein levels during pregnancy: a randomized double-blind clinical trial. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2017;30:20170039. doi: 10.1515/hmbci-2017-0039
- Isazadeh A, Hajazimian S, Rahmani SA, Mohammadoo-Khorasani M, Moghtaran N, Fathi Maroufi N. The Effect of Factor-XI (rs3756008) Polymorphism on Recurrent Pregnancy Loss in Iranian Azeri Women. *Gene Cell Tissue* 2017;4(1): e43717. doi: 10.17795/gct-43717
- Isazadeh A, Hajazimian S, Tariverdi N, Rahmani SA, Esmaeili M, Karimkhanilouei S, et al. Effects of coagulation factor XIII (Val34Leu) polymorphism on recurrent pregnancy loss in Iranian Azeri women. *J Lab Med* 2017;41(2):89-92. doi: 10.1515/labmed-2017-0012
- Sayed Hajizadeh Y, Emami E, Nottagh M, Amini Z, Fathi Maroufi N, Hajazimian S, et al. Effects of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene 86 bp VNTR polymorphism on recurrent pregnancy loss: a case-control study. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2017;30:20170010. doi: 10.1515/hmbci-2017-0010
- Pylyp LY, Spinenko LO, Verhoglyad NV, Kashevarova OO, Zukin VD. Chromosomal Abnormalities in Patients with Infertility. *Cytol Genet* 2015;49(3):173-7. doi: 10.3103/s009545271503010x
- Mathur N, Triplett L, Stephenson MD. Miscarriage chromosome testing: utility of comparative genomic hybridization with reflex microsatellite analysis in preserved miscarriage tissue. *Fertil Steril* 2014;101(5): 1349-52. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.02.004
- Franssen MT, Korevaar JC, Tjoa WM, Leschot NJ, Bossuyt PM, Knegt AC, et al. Inherited unbalanced structural chromosome abnormalities at prenatal chromosome analysis are rarely ascertained through recurrent miscarriage. *Prenat Diagn* 2008;28(5):408-11. doi: 10.1002/pd.1960
- Dul EC, Groen H, van Ravenswaaij-Arts CMA, Dijkhuizen T, van Echten-Arends J, Land JA. The prevalence of chromosomal abnormalities in subgroups of infertile men. *Hum Reprod* 2012;27(1): 36-43. doi: 10.1093/humrep/der374
- Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, Ampe M, Konings P, Melotte C, et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 2009;15(5):577. doi: 10.1038/nm.1924
- Rubio C, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohi J, et al. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod* 2003;18(1):182-8. doi: 10.1093/humrep/deg015
- Bennett SA, Bagot CN, Arya R. Pregnancy loss and thrombophilia: the elusive link. *Br J Haematol* 2012; 157(5):529-42. doi: 10.1111/j.1365-2141.2012.09112.x
- Isaoglu U, Ulug P, Delibas IB, Yilmaz M, Kumtepe Y, Dogan H, et al. The association between inherited thrombophilia and recurrent pregnancy loss in Turkish women. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2014;41(2): 177-81. doi: 10.12891/ceog16142014

16. Su MT, Lin SH, Chen YC, Kuo PL. Genetic association studies of ACE and PAI-1 genes in women with recurrent pregnancy loss. *J Thromb Haemost.* 2013;109(1):8-15. doi: 10.1160/TH12-08-0584
17. Festa A, D'Agostino Jr R, Rich SS, Jenny NS, Tracy RP, Haffner SM. Promoter (4G/5G) plasminogen activator inhibitor-1 genotype and plasminogen activator inhibitor-1 levels in blacks, Hispanics, and non-Hispanic whites: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Circulation* 2003;107(19):2422-7. doi: 10.1161/01.cir.0000066908.82782.3a
18. Li X, Liu Y, Zhang R, Tan J, Chen L, Liu Y. Meta-analysis of the association between plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and recurrent pregnancy loss. *Med Sci Monit* 2015;21: 1051. doi: 10.12659/msm.892898.
19. Isazadeh A, Hajazimian S, Rahmani SA, Mohammadoo-Khorasani M, Samanmanesh S, Karimkhanlouei S. The effects of Factor II (rs1799963) polymorphism on recurrent pregnancy loss in Iranian Azeri women. *Riv Ital Med Lab* 2017;13:37-40. doi: 10.1007/s13631-017-0145-y
20. Cooper P, Rezende S. An overview of methods for detection of factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutations. *Int J Lab Hematol* 2007;29(3): 153-62. doi: 10.1111/j.1751-553x.2007.00892.x
21. Aarabi M, Memariani T, Arefi S, Aarabi M, Hantoosh Zadeh S, Akhondi MA, et al. Polymorphisms of plasminogen activator inhibitor-1, angiotensin converting enzyme and coagulation factor XIII genes in patients with recurrent spontaneous abortion. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011;24(3):545-8. doi: 10.3109/14767058.2010.511331
22. Bigdeli R, Younesi MR, Panahnejad E, Asgary V, Heidarzadeh S, Mazaheri H, et al. Association between thrombophilia gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss risk in the Iranian population. *Syst Biol Reprod Med* 2018;64(4):274-82. doi: 10.1080/19396368.2018.1456576.
23. Bubalo P, Buterin I, Šalek Z, Đogić V, Zupančić-Šalek S. Association of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene Polymorphisms and Methylene Tetrahydrofolate Reductase Polymorphisms with Spontaneous Miscarriages. *Acta haematologica* 2017;138(2):111-5. doi: 10.1159/000478084
24. Huang Z, Tang W, Liang Z, Chen Q, Li M, Li Y, et al. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Polymorphism Confers a Genetic Contribution to the Risk of Recurrent Spontaneous Abortion: An Updated Meta-Analysis. *Reprod Sci* 2017;24(11):1551-60. doi: 10.1177/1933719117702013
25. Nassour-Mokhtari I, Loukidi B, Moussouni A, Bettioui R, Benhabib R, Merzouk H, et al. Inherited thrombophilia and recurrent pregnancy loss: a single-center case-control study in North-Western Algeria. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics.* 2020 Dec;21(1):1-7. doi: 10.1186/s43042-020-00077-1
26. Altintas A, Pasa S, Akdeniz N, Cil T, Yurt M, Ayyildiz O, et al. Factor V Leiden and G20210A prothrombin mutations in patients with recurrent pregnancy loss: data from the southeast of Turkey. *Annals of hematology.* 2007 Oct 1;86(10):727-31. doi: 10.1007/s00277-007-0327-1
27. Soheilyfar S, Nikyar T, Fathi Maroufi N, Mohebi Chamkhorami F, Amini Z, Ahmadi M, et al. Association of IL-10, IL-18, and IL-33 genetic polymorphisms with recurrent pregnancy loss risk in Iranian women. *Gynecol Endocrinol* 2019;35(4):342-5. doi: 10.1080/09513590.2018.1528220
28. Fathi Maroufi N, Aghayi E, Garshasbi H, Gholampour Matin M, Babazadeh Bedoustani A, Firouzi Amoudizaj F, et al. Association of rs1946518 C/A Polymorphism in Promoter Region of Interleukin 18 Gene and Breast Cancer Risk in Iranian Women: A Case-control Study. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2019;18(6):671-8. doi: 10.18502/ijaa.v18i6.2180
29. Fathi Maroufi N, Matin M, Ghanbari N, Khorrami A, Amini Z, Hajazimian S, et al. Influence of single nucleotide polymorphism in IL-27 and IL-33 genes on breast cancer. *Br J Biomed Sci* 2018;76(2):1-3. doi: 10.1080/09674845.2018.1545554