

ارتباط بین پلی مورفیسم های ژنی $GPIIa(pLA_1/pLA_2)$ و $GPIa(807C/T)$ در زنان مبتلا به سقط مکرر خودبه خودی در استان تهران

پریسا مزیری^۱، گلناز اسعدی تهرانی^۲، سینا میرزا احمدی^۳

چکیده

سابقه و هدف

سقط مکرر خودبه خودی، به ختم بارداری قبل از هفته ۲۰ حاملگی اطلاق می شود. در برخی از زنان با سابقه سقط مکرر، جهش های ژن ترومبوفیلیک منجر به ایجاد لخته های خونی در عروق جفت، کاهش اکسیژن رسانی و مرگ جنین می شود. هدف از این مطالعه، بررسی ارتباط پلی مورفیسم های $807C/T$ (ژن $GPIa$) و pLA_1/pLA_2 (ژن $GPIIa$) با سقط مکرر خودبه خودی بود.

مواد و روش ها

در این مطالعه مورد - شاهده، ۵۰ خانم با سابقه حداقل دو سقط مکرر با علت نامشخص و ۵۰ خانم بدون سابقه سقط مکرر و دارای حداقل دو بارداری موفق در استان تهران انتخاب شدند و در مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی زنجان در سال ۱۳۹۳ مورد بررسی قرار گرفتند. پلی مورفیسم های $807C/T$ و pLA_1/pLA_2 به ترتیب از طریق روش های Tetra-Primer ARMS-PCR و PCR-RFLP ارزیابی شدند. نتایج به دست آمده از تعیین ژنوتیپ این پلی مورفیسم ها توسط نرم افزار SPSS ۱۶ و آزمون کای دو تجزیه و تحلیل گردیدند.

یافته ها

افراد واجد ژنوتیپ $807TT$ در جمعیت بیمار بیشتر از افراد شاهد بود ($p=0/045$). در مقابل شیوع ژنوتیپ pLA_2/pLA_2 در جمعیت بیمار و شاهد بسیار کم بود. در این تحقیق فراوانی ژنوتیپ های $807TT$ و pLA_2/pLA_2 به ترتیب در گروه بیمار و شاهد ($0/34$ ، $0/16$) و ($0/06$ ، $0/02$) گزارش شد.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پلی مورفیسم $807C/T$ با سقط مکرر خودبه خودی، رابطه معناداری دارد. در مقابل اختلاف معناداری بین افراد بیمار و شاهد در پلی مورفیسم pLA_1/pLA_2 وجود ندارد.

کلمات کلیدی: سقط خودبه خودی، $GPIIa$ ، $GPIa$

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۳

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۸

۱- کارشناس ارشد زیست شناسی ژنتیک - گروه ژنتیک دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان - زنجان - ایران
۲- مؤلف مسئول: PhD ژنتیک مولکولی - استادیار گروه ژنتیک دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان - زنجان - اعمتاده - ایران - کدپستی: ۴۵۱۵۶۸۱۴۵
۳- PhD ژنتیک مولکولی - استادیار گروه ژنتیک دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان - زنجان - ایران

مقدمه

سقط مکرر خودبه‌خودی اغلب به صورت دو یا بیش از دو سقط متوالی پیش از هفته ۲۰ بارداری تعریف می‌شود که تقریباً در ۱٪ کل بارداری‌ها اتفاق می‌افتد (۱-۳). از مهم‌ترین علل آن می‌توان به فاکتورهای آناتومیک، ایمونولوژیک، ژنتیک، آندوکراین، ترومبوفیلیک، فاکتورهای محیطی و عوامل ناشناخته اشاره نمود (۴). در ۵۵٪ بیماران دچار سقط مکرر خودبه‌خودی، اختلال در فاکتورهای ترومبوفیلی گزارش شده است (۵). وقوع ترومبوز در مویرگ‌های جفت باعث اختلال در روند گردش خون بین مادر و جنین شده و در نهایت با کاهش اکسیژن‌رسانی منجر به سقط جنین می‌گردد (۶). گیرنده‌های پلاکتی، به دلیل اهمیتشان در برهمکنش با کلاژن موجود در سطوح اندوتلیال عروق، فاکتورهای مناسبی جهت مطالعه بیماری‌های ناشی از ترومبوز نابه‌جا هستند. اینتگرین پلاکتی $\alpha_2\beta_1$ (GPII/IIIa) ، گیرنده اصلی کلاژن می‌باشد و از طریق اتصال به کلاژن تحتانی سلول‌های اندوتلیال با واسطه فاکتور ون‌ویلبِراند، به تشکیل لخته توسط پلاکت‌ها کمک می‌کند (۷-۱۰). ژن $GPIa$ بر روی کروموزوم ۵ (در موقعیت q23.31) به طول ۱۱۰ Kb قرار دارد و شامل ۳۰ اگزون است (۱۱). پلی‌مورفیسم 807C/T در این ژن در انتهای ۳ اگزون ۷ (در نوکلئوتید ۸۰۷) واقع شده و اسید آمینه فنیل آلانین را رمزگردانی می‌نماید. جهش تک نوکلئوتیدی در ناحیه مذکور باعث تبدیل نوکلئوتید سیتوزین به تیمین می‌گردد، که علی‌رغم عدم تغییر در بیان فنیل آلانین، در سطح بیان اینتگرین $\alpha_2\beta_1$ بر روی پلاکت تأثیرگذار می‌باشد (۱۲).

افراد واجد ژنوتیپ TT، بیشترین تعداد گیرنده و افراد با ژنوتیپ CC کمترین تعداد گیرنده را دارا هستند، درحالی که فراوانی گیرنده در افراد هتروزیگوت (CT) حدواسط افراد هموزیگوت نرمال و هموزیگوت بیمار است (۱۳).

اینتگرین $\alpha IIb\beta_3$ (GPIIb/IIIa) ، گیرنده اصلی گلیکوپروتئینی فیبرینوژن و فراوان‌ترین اینتگرین پلاکت است. این گیرنده چسبندگی پلاکت و تشکیل لخته را وساطت می‌کند (۱۴، ۱۵). ژن $GPIIIa$ با ۹ اگزون و طول

۶۰ کیلو باز بر روی کروموزوم ۱۷ در ناحیه q21.32 قرار دارد (۱۶، ۱۷). پلی‌مورفیسم pLA₁/pLA₂ یا پلی‌مورفیسم آنتی‌ژن اختصاصی پلاکتی HPA-1a/1b (Human Platelet Antigen-1a/1b) در انتهای ۳ اگزون ۲ ژن $GPIIIa$ بر روی میزان بیان گیرنده $\alpha IIb\beta_3$ مؤثر می‌باشد. تبدیل تیمین به سیتوزین در نتیجه یک جهش نقطه‌ای در نوکلئوتید ۱۵۶۵ در اگزون شماره ۲ ژن $GPIIIa$ ، منجر به جایگزینی لوسین به پرولین در اسید آمینه ۳۳ زیر واحد β گیرنده پلاکتی $\alpha IIb\beta_3$ می‌گردد (۱۸، ۱۷). آلل جهش یافته HPA-1b)، با افزایش در تعداد گیرنده $\alpha IIb\beta_3$ و افزایش تجمع پلاکتی همراه می‌باشد (۲۰، ۱۹). HPA-1a به عنوان ایمنی‌زاترین آلوانتی‌ژن شناخته شده است. اگر مادر فاقد HPA-1a و جنین وی دارای این آنتی‌ژن باشد، ممکن است پلاکت‌های جنین وارد گردش خون مادر شده و علیه آن‌ها آنتی‌بادی ضد HPA-1a ساخته شود. در این حالت احتمال ترومبوسیتوپنی آلوایمیون نوزادان (Neonatal Alloimmunized Thrombocytopenia) و سقط جنین وجود دارد (۲۲، ۲۱). مطالعه‌های بسیار محدودی به بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم‌های 807C/T و pLA₁/pLA₂ با سقط مکرر خودبه‌خودی پرداخته است، لذا در تحقیق حاضر ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های مذکور با سقط مکرر خودبه‌خودی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه:

در یک مطالعه مورد - شاهدی، ۵۰ خانم با سابقه حداقل دو سقط مکرر خودبه‌خودی به عنوان گروه بیماران و ۵۰ خانم دارای حداقل دو بارداری موفق و بدون سابقه سقط به عنوان گروه شاهد از میان مراجعه‌کنندگان به بیمارستان فوق تخصصی زنان و زایمان صارم تهران با توجه به پرونده پزشکی بیماران و نظر متخصص زنان، انتخاب شدند. عوامل مؤثر در سقط مکرر خودبه‌خودی مانند کاریوتیپ، عوامل آناتومی، عوامل هورمونی، عوامل عفونی و عوامل ایمونولوژیک در بیماران مورد ارزیابی قرار گرفتند و در تمامی موارد طبیعی بودند. به منظور رعایت اخلاق پزشکی از بیماران رضایت‌نامه دریافت گردید (۲۳).

جدول ۱: توالی آغازگرها و میزان محصول PCR پلی مورفیسیم 807C/T در ژن *GPIa*
(آغازگرها با استفاده از نرم افزار Oligo 5 و Gene Runner طراحی شده و در سایت NCBI با توالی ژن هدف Blast گردیدند)

پلی مورفیسیم	توالی آغازگرها	نوع اولیگو آغازگر	محصول PCR (bp)
۸۰۷ C/T	Outer Reverse Primer (rop)	5'-CCA GCT GCC TTCT CAA AGT ATT CAA GAC -3'	۳۵۰
	Outer Forward Primer (fop)	5'-GTC TCC TCT GTTG AAG GTG GGG TTA ATT -3'	
	Inner Reverse Primer (IPC)	5'-AAA ACT TAC CTT GCA TAT TGA ATT GCTACG -3'	۱۷۴
	Inner Forward Primer (IPT)	5'-ATA TGG TGG GGAC CTC ACA AAC ACA GTT -3'	۲۳۴

جدول ۲: توالی آغازگرها، آنزیم محدودالانتر، محصول PCR و RFLP پلی مورفیسیم pLA₁/pLA₂ در ژن *GPIIIa*.
(آغازگرها با استفاده از نرم افزار Oligo 5 و Gene Runner طراحی شده و در سایت NCBI با توالی ژن هدف Blast گردیدند)

پلی مورفیسیم	توالی آغازگرها	محصول PCR (bp)	آنزیم محدودالانتر	محصول RFLP (bp)
pLA ₁ /pLA ₂	R:5'-ACT GAC TTG AGT GAC CTG GGA -3'	۲۵۶	MspI	۲۵۶
	F:5'-CTT AGC TAT TGG GAA GTG GTA -3'			۱۵۴، ۲۵۶
				۱۰۲
				۱۰۲، ۱۵۴

تعیین ژنوتیپ:

با استفاده از کیت استخراج DNA اختصاصی شرکت سیناکلون، DNA ژنومیک از خون محیطی استخراج شد. سپس واکنش زنجیره پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *GPIa* به روش Tetra-Primer ARMS-PCR و آغازگرهای ژن *GPIIIa* به روش PCR-RFLP انجام گرفت (جدول ۱ و ۲).

واکنش Tetra-Primer ARMS-PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر حاوی ۲۰۰ نانوگرم DNA ژنومیک، ۱۰ میکرولیتر (Master Mix) ۲X Taq Premix (پارس توس، ایران)، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر (ژن فناوران، ایران) و ۶ میکرولیتر آب دیونیزه، صورت گرفت. واکنش PCR-RFLP در حجم ۵۰ میکرولیتر حاوی ۲۰۰ نانوگرم DNA ژنومیک، ۲۵ میکرولیتر (Master Mix) ۲X Taq Premix (پارس توس، ایران)، ۲۰ پیکومول از هر آغازگر (ژن فناوران، ایران) و ۲۱ میکرولیتر آب دیونیزه، انجام شد. در هر دو ژن، تکثیر در ۳۲ چرخه، دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به

مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال ۵۵/۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه در ژن *GPIa*، دمای اتصال ۵۶/۱ درجه سانتی گراد در ژن *GPIIIa* و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه انجام شد. دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد و طولی سازی نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد صورت گرفت. روش PCR – Tetra-Primer ARMS یک روش تکثیری قدرتمند برای مشخص کردن جهش‌های نقطه‌ای است. در این روش از دو آغازگر خارجی (Outer primer) به نام‌های fop و rop که به نواحی اطراف نوکلئوتید ۸۰۷ در اگزون ۷ ژن *GPIa* متصل می‌شوند، استفاده گردید. اتصال آغازگرهای خارجی به نواحی اطراف جهش نقطه‌ای موجب اطمینان از PCR صحیح در محل SNP مد نظر می‌گردد. وجود باند ۳۵۰ bp بر روی ژل آگاروز حاکی از اتصال آغازگرهای خارجی می‌باشد. دو آغازگر داخلی (Inner primer) نیز در این روش استفاده شد. آغازگر داخلی IPT در حضور جهش تک نوکلئوتیدی سیتوزین به تیمین متصل می‌گردد. آغازگر

به منظور تایید نتایج PCR، نمونه‌ها در شرکت ژن فناوری‌ها در یک جهت مستقیم تعیین توالی شدند. جهت شناسایی پلی‌مورفیسم pLA₁/pLA₂، محصول PCR مربوطه با استفاده از آنزیم MspI مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. طول محصول PCR معادل ۲۵۶ جفت باز بود. در افراد دارای ژنوتیپ pLA₂/pLA₂، محصول PCR در مجاورت آنزیم MspI، دو قطعه ۱۵۴ و ۱۰۲ جفت بازی ایجاد نمود، ولی در ژنوتیپ pLA₁/pLA₂، سه قطعه ۲۵۶، ۱۵۴، ۱۰۲ جفت بازی حاصل گردید. محصولات PCR، قبل و پس از هضم آنزیمی، با الکتروفورز روی ژل آگاروز ۳٪ از هم تفکیک شده و طول دقیق آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲).

تحلیل آماری:

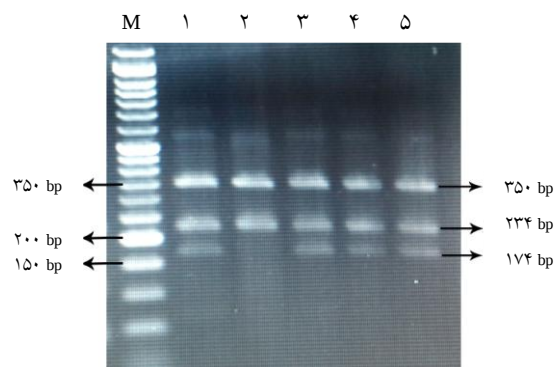
مشاهده‌ها، توسط نرم‌افزار SPSS (نگارش ۱۶) مورد تحلیل قرار گرفت. توزیع ژنوتیپ‌های هر موتاسیون، فرکانس هموزیگوت و هتروزیگوت در دو گروه بیمار و شاهد با استفاده از مربع کای و پی‌رسون مورد سنجش قرار گرفت. p-value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنادار، در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

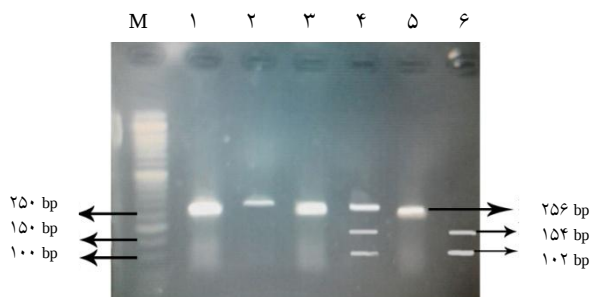
در این تحقیق، پلی‌مورفیسم‌های 807C/T و pLA₁/pLA₂ در ۵۰ خانم با سابقه سقط مکرر خودبه‌خودی که از نظر کاریوتیپ، عوامل آناتومی، عوامل هورمونی، عوامل عفونی و عوامل ایمنولوژیک طبیعی بودند، مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۳).

فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده در گروه بیمار و شاهد به ترتیب ۰/۲۴ در مقابل ۰/۴۴ برای ژنوتیپ CC، ۰/۴۲ در مقابل ۰/۴ برای ژنوتیپ CT و ۰/۳۴ در مقابل ۰/۱۶ برای ژنوتیپ TT بود. فراوانی ژنوتیپی در گروه بیمار و شاهد، ارتباط معناداری را نشان داد (p=۰/۰۴۵). فراوانی آلل C و T در خانم‌های مبتلا به سقط مکرر به ترتیب عبارت بود از ۰/۵۵ و ۰/۴۵ و در گروه کنترل این فراوانی برابر با ۰/۳۶ و ۰/۶۴ بود. دو گروه از نظر فراوانی آللی اختلاف معناداری نشان دادند (p=۰/۰۰۷).

داخلی IPC هنگامی که جهش مذکور در نوکلئوتید ۸۰۷ صورت نگرفته باشد، به این ناحیه متصل می‌شود. محصول PCR با الکتروفورز در ژل آگاروز ۲٪ تفکیک گردید، که در فرد هموزیگوت سالم با ژنوتیپ CC دو باند ۱۷۴ و ۳۵۰ جفت بازی، در فرد هموزیگوت بیمار با ژنوتیپ TT دو باند ۲۳۴ و ۳۵۰ جفت بازی و در فرد هتروزیگوت با ژنوتیپ CT هر سه باند ۱۷۴، ۲۳۴ و ۳۵۰ جفت بازی رؤیت گردید (شکل ۱).



شکل ۱: محصول PCR پلی‌مورفیسم 807C/T ژن *GPIIa* روی ژل آگاروز ۲٪. چاهک M: مارکر ۵۰ bp؛ چاهک‌های ۱، ۳، ۴، ۵: 807C/T، هتروزیگوت (۱۷۴، ۲۳۴، ۳۵۰ bp)؛ چاهک ۲: 807T/T، هموزیگوت بیمار (۲۳۴ bp، ۳۵۰ bp).



شکل ۲: نتایج الکتروفورز محصول PCR پس از RFLP برای پلی‌مورفیسم pLA₁/pLA₂ روی ژل آگاروز ۳٪. چاهک M: مارکر ۵۰ bp؛ چاهک‌های ۱، ۳، ۵: محصول PCR قبل از RFLP؛ چاهک ۲: pLA₁/pLA₁، هموزیگوت سالم (۲۵۶ bp)؛ چاهک ۴: pLA₁/pLA₂، هتروزیگوت (۱۵۴، ۲۵۶ bp)؛ چاهک ۶: pLA₂/pLA₂، هموزیگوت بیمار (۱۵۴، ۱۰۲ bp).

جدول ۳: مقایسه فراوانی آللی و ژنوتیپی حاصل از پلی مورفیسم 807C/T ژن GPIa در خانم‌های دچار سقط مکرر و نرمال

p-value	نرمال (n= ۵۰)	بیمار (n= ۵۰)	
ژنوتیپ			
۰/۰۴۵	۲۲ (۰/۴۴)	۱۲ (۰/۲۴)	CC
	۲۰ (۰/۴)	۲۱ (۰/۴۲)	CT
	۸ (۰/۱۶)	۱۷ (۰/۳۴)	TT
آلل			
۰/۰۰۷	۶۴ (۰/۶۴)	۴۵ (۰/۴۵)	C
	۳۶ (۰/۳۶)	۵۵ (۰/۵۵)	T

جدول ۴: مقایسه فراوانی آللی و ژنوتیپی پلی مورفیسم pLA₁/pLA₂ ژن GPIIb در خانم‌های دچار سقط مکرر و نرمال

p-value	نرمال (n= ۵۰)	بیمار (n= ۵۰)	
ژنوتیپ			
۰/۴۶۷	۱ (۰/۰۲)	۳ (۰/۰۶)	PLA ₂ /PLA ₂
	۵ (۰/۱)	۷ (۰/۱۴)	pLA ₁ /pLA ₂
	۴۴ (۰/۸۸)	۴۰ (۰/۸)	PLA ₁ /PLA ₁
آلل			
۰/۱۵۷	۷ (۰/۰۷)	۱۳ (۰/۱۳)	PLA ₂
	۹۳ (۰/۹۳)	۸۷ (۰/۸۷)	PLA ₁

بیمار به‌طور معناداری بیشتر از افراد شاهد نمی‌باشد. هم چنین، فراوانی آلل PLA₂ در جمعیت بیمار به‌طور معناداری بیشتر از افراد شاهد نبود.

بحث

آنالیز پلی مورفیسم ژن‌های مؤثر در عملکرد گیرنده‌های پلاکتی، به دلیل نقش مهمی که تشکیل لخته‌های نابه‌جا دارند، می‌تواند در موارد مختلفی در زنان دچار سقط مکرر مورد مطالعه قرار گیرد. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، پلی مورفیسم 807C/T در بیماران شیوع بیشتری را نشان داد. با این حال نقش پلی مورفیسم pLA₁/pLA₂ در سقط مکرر افراد مورد مطالعه تایید نشد و اختلاف معناداری بین گروه بیمار و شاهد مشاهده نگردید. پلی مورفیسم 807C/T، یکی از چند شکلی‌های شایع در ژن GPIa است که ارتباط آن با برخی بیماری‌های قلبی-عروقی، انسداد ورید شبکه چشم و سکنه‌های مغزی بررسی شده است (۲۷-۲۵). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پلی مورفیسم 807C/T با سقط مکرر خودبه‌خودی مرتبط است و فراوانی ژنوتیپ جهش یافته TT در جمعیت بیمار به‌طور معناداری بیشتر از گروه شاهد می‌باشد. در سال ۲۰۱۳، اولین بار توسط زنوزی در تبریز، ارتباط پلی مورفیسم 807C/T با سقط مکرر از طریق روش ARMS-PCR بررسی گردید و ارتباطی میان این چند شکلی و سقط مکرر خودبه‌خودی مشاهده نشد. فراوانی ژنوتیپ جهش یافته در مطالعه حاضر در تهران، ۰/۳۴ در جمعیت بیمار و در مطالعه زنوزی به میزان ۰/۱۲ گزارش شده است (۲۸). تفاوت در نتایج فوق که می‌تواند به دلیل الگوی‌های ژنتیکی متفاوت در قومیت‌های متنوع ایرانی باشد، غیر قابل انتظار نبود با این وجود جهت دستیابی به یافته‌های قطعی، تحقیقات بیشتر در سایر قومیت‌های ایرانی و در جمعیت‌های مورد مطالعه بیشتر پیشنهاد می‌گردد. مطالعه‌های متعددی در مورد اثر پلی مورفیسم pLA₁/pLA₂ در شکل‌گیری ترومبوز نابه‌جا، بیماری‌های قلبی-عروقی و سکنه‌های مغزی وجود دارد (۳۱-۲۹). اخیراً به نقش این پلی مورفیسم به عنوان یک عامل خطر در سقط مکرر توجه زیادی شده است. در مطالعه حاضر، فراوانی ژنوتیپی

در مورد پلی مورفیسم pLA₁/pLA₂، فراوانی ژنوتیپی در زنان دارای سقط مکرر و زنان گروه شاهد، به ترتیب ۰/۸ در مقابل ۰/۸۸ برای ژنوتیپ PLA₁/PLA₁، ۰/۱۴ در مقابل ۰/۱ برای ژنوتیپ pLA₁/pLA₂ و ۰/۰۶ در مقابل ۰/۰۲ برای ژنوتیپ PLA₂/PLA₂ بود (جدول ۴). به منظور محاسبه فراوانی آللی، همواره می‌توان از فراوانی ژنوتیپی استفاده نمود، در صورتی که جهت محاسبه فراوانی ژنوتیپی از فراوانی آللی، می‌بایست شرایط تعادل هاردی-واینبرگ که بر مبنای آمیزش تصادفی است، برقرار گردد (۲۴). بر این اساس، فراوانی آلل‌های PLA₁ و PLA₂ در خانم‌های طبیعی به ترتیب ۰/۰۷ و ۰/۹۳ و در خانم‌های واجد شرایط سقط مکرر، به ترتیب ۰/۱۳ و ۰/۸۷ محاسبه گردید (جدول ۴).

نتایج نشان داد فراوانی ژنوتیپ PLA₂/PLA₂ در افراد

هتروزیگوت در مطالعه حاضر، در ایران فراوانی بیشتری دیده می‌شود (۳۴-۳۶). این نتایج مختلف به دلیل تفاوت در الگوهای ژنتیکی و نژادی در جمعیت‌های مورد مطالعه، تعداد افراد مورد مطالعه، رانش ژنتیکی، مهاجرت و انتخاب طبیعی است. به همین منظور، جهت بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم‌های 807C/T و pLA₁/pLA₂ با سقط مکرر خودبه‌خودی، باید مطالعه‌های بیشتری در آینده انجام گیرد. در صورت شیوع بالای هر کدام از پلی‌مورفیسم‌های مذکور در زنان مبتلا به سقط مکرر، استفاده از داروهای ضد انعقاد و مهارکننده‌های گیرنده پلاکتی در طی بارداری برای پیشگیری از سقط نتیجه بخش خواهد بود.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه، پلی‌مورفیسم pLA₁/pLA₂ در بروز سقط مکرر خود به‌خودی نقشی ندارد. در مقابل، افراد حامل آلل موتانت 807T مستعد به سقط مکرر می‌باشند. جهت بررسی دقیق‌تر این فاکتورها، انجام تحقیقات بیشتر پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از کارکنان مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی زنجان به دلیل همکاری صمیمانه در انجام این پروژه، کمال تشکر و امتنان را دارند.

PLA₂/PLA₂ و pLA₁/pLA₂ در زنان دچار سقط مکرر به ترتیب ۰/۰۶ و ۰/۱۴ بود که نشان می‌دهد فراوانی پلی‌مورفیسم pLA₁/pLA₂ در جمعیت بیمار نسبت به گروه کنترل، افزایش معناداری ندارد و پلی‌مورفیسم مذکور در مستعد شدن افراد به سقط مکرر مؤثر نیست. هم‌چنین بر طبق مطالعه‌هایی که توسط جدی-تهرانی و همکاران در سال ۲۰۱۱ در ایران انجام شده است، ارتباط معناداری بین پلی‌مورفیسم pLA₁/pLA₂ ژن GP11a و سقط مکرر مشاهده نشده است (۶). این عدم ارتباط معنادار در مطالعه پی‌هوج و همکاران (آلمان، ۲۰۰۱) نیز مشاهده شده است (۳۲). در مقابل، مطالعه‌های دیگری از جمله مطالعه‌های انجام شده توسط روزی و همکاران (۲۰۰۵)، ایتالیا، لامبرینوداکی (۲۰۱۰، ایتالیا) و دو مطالعه انجام گرفته توسط ایوانو و همکاران در سال‌های ۲۰۰۸ و ۲۰۱۰ در بلغارستان، ارتباط معناداری بین پلی‌مورفیسم pLA₁/pLA₂ با سقط مکرر خودبه‌خودی نشان می‌دهند (۳۲-۳۵). فراوانی ژنوتیپ جهش یافته در مطالعه روزی در ایتالیا، ۰/۴۴ برآورد شده که تقریباً ۷ برابر فراوانی ژنوتیپ PLA₂/PLA₂ در مطالعه حاضر است (۳۵). در مطالعه‌های ایوانو در بلغارستان و لامبرینوداکی در یونان، فراوانی افراد ناقل این پلی‌مورفیسم به ترتیب ۰/۲۹ و ۰/۵۶ گزارش شده است که در مقایسه با فراوانی افراد

References :

- Mishell DR Jr. Recurrent abortion. J Reprod Med 1993; 38(4): 250-9.
- Tulppala M, Ylikorkala O. Recurrent spontaneous abortion: Where do we stand now? Ann Med 1991; 23(6): 603-4.
- Tulppala M, Palosuo T, Ramsay T, Miettinen A, Salonen R, Ylikorkala O. A prospective study of 63 couples with a history of recurrent spontaneous abortion: contributing factors and outcome of subsequent pregnancies. Hum Reprod 1993; 8(5): 764-70.
- Franssen MT, Korevaar JC, Leschot NJ, Bossuyt PM, Knecht AC, Gerssen-Schoorl KB, et al. Selective chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: case-control study. BMJ 2005; 331(7509): 137-41.
- Bick RL. Recurrent miscarriage syndrome due to blood coagulation protein/platelet defects: prevalence, treatment and outcome results. DRW Metroplex Recurrent Miscarriage Syndrome cooperative Group. Clin Appl Thromb Hemost 2000; 6(3): 115-25.
- Jeddi-Tehrani M, Torabi R, Zarnani AH, Mohammadzadeh A, Arefi S, Zeraati H, et al. Analysis of plasminogen activator inhibitor-1, integrin beta3, beta fibrinogen, and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in Iranian women with recurrent pregnancy loss. Am J Reprod Immunol 2011; 66(2): 149-56.
- Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet collagen receptors. Thromb Haemost 2001; 86(1): 189-97.
- Kunicki TJ. The influence of platelet collagen receptor polymorphisms in hemostasis and thrombotic disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002; 22(1): 14-20.
- Santoro SA. Platelet surface collagen receptor polymorphisms: variable receptor expression and thrombotic/hemorrhagic risk. Blood 1999; 93(11): 3575-7.
- Santoro SA, Zutter MM. The $\alpha 2 \beta 1$ integrin: a collagen

- receptor on platelets and other cells. *Thromb Haemost* 1995; 74(3): 813-21.
- 11- Matarin M, Brown WM, Hardy JA, Rich SS, Singleton AB, Brown RD, Jr, *et al.* Association of integrin alpha2 gene variants with ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 28(1): 81-9.
 - 12- Croft SA, Hampton kk, Sorrell JA, Steeds RP, Channer KS, Samani NJ, *et al.* The *GPIa* C807T dimorphism associated with platelet collagen receptor density is not a risk factor for myocardial infarction. *Br J Haematol* 1999; 106(3): 771-6.
 - 13- Kunicki TJ, Kritzik M, Annis DS, Nugent DJ. Hereditary variation in platelet integrin alpha 2 beta1 density is associated with two silent polymorphisms in the alpha2 gene coding sequence. *Blood* 1997; 89(6): 1939-43.
 - 14- Rahgozar S, Pakravan G, Ghaedi K. Cellular adhesions and signaling pathways in platelets. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2011; 8(1): 60-73. [Article In Farsi]
 - 15- Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med* 1995; 332(23): 1553-9.
 - 16- Weiss LA, Ober C, Cook EH, Jr. ITGB3 shows genetic and expression interaction with SLC6A4. *Hum Genet* 2006; 120(1): 93-100.
 - 17- Newman PJ, Derbes RS, Aster RH. The human platelet alloantigens, PLA_1 and PLA_2 , are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest* 1989; 83(5): 1778-81.
 - 18- Reuner KH, Elgas M, Kaps M, Ruf A, Patscheke H. The human platelet antigen HPA-1a/1b (PLA_1/PLA_2) polymorphism and cerebral ischaemia. *Thromb Haemost* 1997; 78(2): 964-5.
 - 19- Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, O'Donnell CJ, Lipinska I, *et al.* Increased platelet aggregability associated with platelet *GPIIIa* PLA_2 polymorphism: the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(4): 1142-7.
 - 20- Schwippert-Houtermans B, Strapatsakis S, Roesen P, Tschoepe D. Evaluation of an antibody-based genotype classification of the platelet fibrinogen receptor ($GPIIb/IIIa$). *Cytometry* 2001; 46(4): 238-42.
 - 21- Shaiegan M. Platelet Immunology. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2012; 9(1): 72-93. [Article In Farsi]
 - 22- Kamphuis MM, Paridaans NP, Porcelijn L, Lopriore E, Oepkes D. Incidence and consequences of neonatal alloimmune thrombocytopenia: a systematic review. *Pediatrics* 2014; 133(4): 715-21.
 - 23- Khaleghparast A, Morovvati S, Noormohammadi Z. Evaluation of the association between the C677T and A1298C polymorphisms of MTHFR gene and recurrent miscarriage. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2011; 8(2): 88-95. [Article In Farsi]
 - 24- Gillespie, John H. Population Genetics: A Concise Guide. 2nd ed. Baltimore, Md.: The Johns Hopkins University Press; 2004. p. 17-22.
 - 25- Carlsson LE, Santoso S, Spitzer C, Kessler C, Greinacher A. The $\alpha 2$ gene coding sequence T807/A873 of the platelet collagen receptor integrin $\alpha 2\beta 1$ might be a genetic risk factor for the development of stroke in younger patients. *Blood* 1999; 93(11): 3583-6.
 - 26- Moshfegh K, Wuillemin WA, Redondo M, Lammle B, Beer JH, Liechti-Gallati S, *et al.* Association of two silent polymorphisms of platelet glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction: a case-control study. *Lancet* 1999; 353(9150): 351-4.
 - 27- Dodson PM, Haynes J, Starczynski J, Farmer J, Shigdar S, Fegan G, *et al.* The platelet glycoprotein Ia/IIa gene polymorphism C807T/G873A: a novel risk factor for retinal vein occlusion. *Eye* 2003; 17(6): 772-7.
 - 28- Poursadegh Zonouzi A, Chaparzadeh N, Ghorbian S, Sadaghiani MM, Farzadi L, Ghasemzadeh A, *et al.* The association between thrombophilic gene mutations and recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30(10): 1353-9.
 - 29- Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, *et al.* A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med* 1996; 334(17): 1090-4.
 - 30- Reiner AP, Kumar PN, Schwartz SM, Longstreth WT, Jr, Pearce RM, Rosendaal FR, *et al.* Genetic variants of platelet glycoprotein receptors and risk of stroke in young women. *Stroke* 2000; 31(7): 1628-33.
 - 31- Carter AM, Catto AJ, Bamford JM, Grant PJ. Platelet *GPIIIa* PLA and $GPIb$ variable number tandem repeat polymorphisms and markers of platelet activation in acute stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18(7): 1124-31.
 - 32- Pihusch R, Buchholz T, Lohse P, Rubsamen H, Rogenhofer N, Hasbargen U, *et al.* Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation increases the risk in the first trimester. *Am J Reprod Immunol* 2001; 46(2): 124-31.
 - 33- Ruzzi L, Ciarafoni I, Silvestri L, Semeraro ML, Abeni D. Association of PLA_2 polymorphism of the ITGB3 gene with early fetal loss. *Fertil Steril* 2005; 83(2): 511-2.
 - 34- Lambrinoudaki I, Armeni E, Kaparos GJ, Christodoulakos GE, Sergeantanis TN, Alexandrou A, *et al.* The frequency of early, spontaneous miscarriage associated with the leu33pro polymorphism of Glycoprotein IIIa: a pilot study. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2010; 50(5): 485-90.
 - 35- Ivanov P, Komsa-Penkova R, Ivanov I, Konova E, Kovacheva K, Stoikov S, *et al.* High risk of recurrent spontaneous abortion during second trimester in women carriers of polymorphism A2 in platelet glycoprotein IIb/IIIa. *Akush Ginekolo (Sofia)* 2008; 47(4): 3-9.
 - 36- Ivanov PD, Komsa-Penkova RS, Konova EI, Tsvyatkovska TM, Kovacheva KS, Simeonova MN, *et al.* Polymorphism A1/A2 in the cell surface integrin subunit $\beta 3$ and disturbance of implantation and placentation in women with recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2010; 94(7): 2843-5.

Original Article

Relationship between *GPIa*(807C/T) and *GPIIIa*(*PLA*₁/*PLA*₂) gene polymorphisms and recurrent spontaneous abortion in women in Tehran Province

Maziri P.¹, Asaadi Tehrani G.¹, Mirzaahmadi S.¹

¹Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Zanzan Branch, Zanzan, Iran

Abstract

Background and Objectives

Recurrent spontaneous abortion is defined as pregnancy loss before the 20th week of gestation. In some women with history of consecutive miscarriage, thrombophilic gene mutations lead to blood clots in vessels in placenta, decrease oxygen delivery, and end to fetal loss. This study aimed to determine the association of 807C/T (*GPIa* gene) and *PLA*₁/*PLA*₂ (*GPIIIa* gene) polymorphisms in RSA.

Materials and Methods

In this case-control study, 50 women with the background of two or more consecutive unexplained abortions and 50 women with at least two live births without a miscarriage were selected in Tehran province and they were examined in Biology Research Center of Islamic Azad University, Zanzan (Iran) in 2014. The 807C/T and *PLA*₁/*PLA*₂ polymorphisms were analyzed by Tetra-Primer ARMS-PCR and PCR-RFLP methods, respectively. The results achieved from estimating the genotype of these polymorphisms were analyzed by the SPSS16 and Chi Square.

Results

Compared to the control population, there was an increase in the prevalence of the homozygous 807TT genotype in the case group ($p = 0.045$), but the prevalence of homozygous *PLA*₂/*PLA*₂ genotype decreased in two groups ($p = 0.467$). We reported the prevalence of 807T/T and *PLA*₂/*PLA*₂ genotypes as (0.34 , 0.16) and (0.06 , 0.02) for patients and controls, respectively.

Conclusions

The results of the present study showed that 807C/T polymorphism has a correlation with RPA but there is no significant difference between patient and normal groups in *PLA*₁/*PLA*₂.

Key words: Spontaneous Abortion, *GPIa*, *GPIIIa*

Received: 24 May 2015

Accepted: 27 Feb 2016

Correspondence: Asaadi Tehrani G., PhD of Molecular Genetics. Assistant Professor of Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Zanzan Branch.
Postal Code: 45156145, Zanzan, Iran. Tel: (+9824) 33420030; Fax: (+9824) 33420030
E-mail: golnaz_asaadi@yahoo.com