

ارزیابی فراوانی آنتی ژن پلاکتی نوع ۱ در زوجین ایرانی با سابقه سقط مکرر

غزال احمدزاده شاد^۱، مریم زادسر^۲، مژگان شایگان^۳، شهرام سمیعی^۴، احد زارع^۵

چکیده

سابقه و هدف

سقط مکرر بیانگر وضعیتی است که فرد ۲ یا ۳ سقط پشت سر هم قبل از هفته ۲۰ بارداری را تجربه کند، که در ۲ تا ۵ درصد بانوان احتمال بروز دارد. پلی مورفیسم ژن *HPA-1* به عنوان عامل اصلی آلوایمونیزاسیون در مادران باردار و ایجاد FNAIT و عوارض وابسته به آن و همین طور به عنوان یکی از فاکتورهای ترومبوفیلی مرتبط با سقط مکرر، مطرح می‌باشد. هدف این مطالعه، بررسی میزان ناسازگاری و پلی مورفیسم ژن *HPA-1* در زوجین ایرانی با سابقه سقط مکرر بود.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه توصیفی - مقطعی، ۷۵ زوج با سابقه حداقل دو سقط مکرر ایدیوپاتیک (طبق پرونده پزشکی) که در سال ۱۳۹۵ به بیمارستان تخصصی زنان و زایمان صارم مراجعه کردند، مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه خون در لوله EDTA جمع‌آوری شد و فراوانی آلل‌های *HPA-1 a, b* به روش مولکولی PCR-SSP تعیین شد. فراوانی ژنی با استفاده از معادله هاردی وینبرگ محاسبه گردید. سطح اطمینان $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین سنی بانوان بررسی شده 32 ± 7 سال و میانگین تعداد سقط $2/5 \pm 0/9$ مورد بود. در این جمعیت، وفور ژن *HPA-1a* ۱۰۰٪ به دست آمد و ژن *HPA-1b* مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر بیانگر آن است که پلی مورفیسم ژن *HPA-1* و آلوایمونیزاسیون احتمالی بر علیه *HPA-1a* در بروز سقط نقشی ندارد و برای مشخص شدن علت سقط مکرر ایدیوپاتیک نیاز به بررسی سایر عوامل می‌باشد.

کلمات کلیدی: پلاکت‌ها، سقط مکرر، ترومبوسیتوپنی

تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۶

تاریخ پذیرش: ۹۷/۵/۲۹

۱- کارشناس ارشد خون‌شناسی و بانک خون - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۲- مؤلف مسئول: متخصص بیماری‌های عفونی - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

۳- PhD ایمنی‌شناسی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۴- کارشناس ارشد بیوشیمی - مربی مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۵- دکترای ایمونولوژی - مرکز تحقیقات باروری و ناباروری صارم - پژوهشکده سلولی مولکولی و سلول‌های بنیادی صارم - بیمارستان فوق تخصصی صارم - تهران - ایران

مقدمه

سقط مکرر یا عادت‌ی، وضعیتی می‌باشد که فرد ۲ یا ۳ سقط پشت سر هم قبل از هفته ۲۰ بارداری را تجربه کند. طبق آمار در ۵-۲ درصد بانوان این عارضه محتمل است. تقریباً ۲۵٪-۱۵٪ کل بارداری‌هایی که توسط سیستم پزشکی شناسایی می‌شوند، به طور ناگهانی سقط می‌شوند ولی تعداد بسیار بیشتری قبل از تشخیص پزشکی در مراحل لقاح و لانه‌گزینی از بین می‌روند (۱، ۲). دلایل اتیولوژیک متعددی نظیر عوامل ژنتیکی، آناتومیک، بیماری‌های اتوایمیون، عفونت‌ها و اختلالات غدد اندوکرین برای بروز سقط مکرر ذکر شده است. ولی تقریباً در ۵۰٪ موارد علت آن نامشخص می‌باشد (۳).

غشاء پلاسمایی پلاکت‌ها از تعداد زیادی گلیکوپروتئین و فسفولیپید تشکیل شده است، بیشترین شمار آنتی‌ژن‌های پلاکتی شناخته شده و همین طور HPA-1 روی گلیکوپروتئین IIb/IIIa قرار دارند (۴). پلی‌مورفیسم آنتی‌ژن پلاکتی نوع ۱، HPA-1a/1b ناشی از یک جهش نقطه‌ای در نوکلئوتید ۱۵۶۵ در اگزون شماره ۲ ژن *GPIIIa* می‌باشد که منجر به جایگزینی تیمین با سیتوزین می‌گردد و در نتیجه اسید آمینه شماره ۳۳ زیر واحد β تغییر می‌کند و لوسین به پرولین تبدیل می‌شود (۶، ۵). در بسیاری از مطالعه‌ها پلی‌مورفیسم HPA-1 به عنوان فاکتور ترومبوفیلی در زنان یا زوجین با سابقه سقط مکرر بررسی شده است و ارتباط این فاکتور با مسأله سقط در برخی از این مطالعه‌ها مشاهده شده است (۷-۱۰). در برخی دیگر تاثیر حضور این فاکتور به عنوان عامل ترومبوفیلی دخیل در سقط مشاهده نگردیده است (۱۲، ۱۱، ۳). در مطالعه‌ای که مزیری در سال ۱۳۸۵ به بررسی تاثیر پلی‌مورفیسم HPA-1 در زنان با سابقه سقط مکرر و گروه کنترل پرداخت، تاثیر پلی‌مورفیسم این آنتی‌ژن بر سقط مکرر مشاهده نشد (۱۳). در بین آنتی‌ژن‌های پلاکتی متعددی که بر سطح پلاکت‌ها حضور دارد، HPA-1 به عنوان عامل اصلی در آلوایمیونیزاسیون مادری-جنینی در جمعیت سفید پوست مطرح می‌باشد و عامل ۸۵٪-۷۵٪ موارد FNAIT (Fetal/Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia) است (۱۳).

امروزه FNAIT اصلی‌ترین عامل ترومبوسیتوپنی شدید در نوزادان زنده، شناخته شده است و تقریباً دلیل ۴۰٪ از مراجعات نوزادان به بخش مراقبت ویژه محسوب می‌شود. FNAIT در حال حاضر به عنوان عارضه‌ای پیچیده در بارداری مطرح است که عوارضی شدید و متناقض دارد. FNAIT رایج‌ترین علت خونریزی مغزی ICH (Intra Cerebral Hemorrhage) در جنین قبل از هفته ۲۰ بارداری و هم‌چنین در نوزادان کامل و سالم می‌باشد که می‌تواند منجر به عوارض دائمی عصبی و یا مرگ شود (۱۳). در مطالعه‌ای که در سوئد در سال ۲۰۱۷ با هدف بررسی اثر FNAIT بر میزان مرگ و میر انجام شد، به بررسی آلوانتی‌بادی‌های مادر در نوزادانی که با عارضه ICH متولد شدند، پرداخته شد و بیان شد که نقش ترومبوسیتوپنی در بروز ICH کمتر از میزانی است که مطالعه‌های قبل گزارش کرده‌اند و عوامل دیگری غیر از ترومبوسیتوپنی در بروز ICH دخیلند (۱۴). برخی مطالعه‌ها احتمال بروز سقط قبل از هفته ۲۰ جنینی با مکانیسم مشابه FNAIT را پیشنهاد کرده‌اند؛ مکانیسم‌هایی هم چون خونریزی در نتیجه ترومبوسیتوپنی، ایجاد ترومبوز در جفت، به علاوه سیتوتوکسیسیته سلولی با واسطه NK Cell بر علیه $\beta 3$ اینتگرین‌های سطح تروفوبلاست‌های جفت نیز در اثر پلی‌مورفیسم ژنی HPAs مطرح شده‌اند (۱۵).

در زمینه غربالگری FNAIT در کشورهای مختلف مانند لهستان و نروژ، مطالعه‌های کوهورت صورت گرفته است و مطالعه‌های مشابهی نیز در هلند و چین در حال انجام است ولی تاکنون هیچ کشوری روش غربالگری روتین جهت شناسایی موارد FNAIT را به کار نبرده است (۱۷، ۱۶، ۱۴، ۱۳). بیشتر مطالعه‌های صورت گرفته مربوط به جمعیت سفید پوست می‌باشد و آلوایمیونیزاسیون بر علیه HPA-1a موجب اکثر موارد آلوایمیونیزاسیون علیه HPAs شناخته شده است. تفاوت در فراوانی HPAs در جوامع و قومیت‌های مختلف، نشان‌دهنده تنوع در الگوی فراوانی HPAs می‌باشد و این مسأله لزوم مطالعه فراوانی این آنتی‌ژن‌ها در جوامع مختلف را مشخص می‌سازد، لذا در این مطالعه فراوانی آلی و ژنی HPA-1 و میزان ناسازگاری آن در زوجین

گلوبول‌های سفید موجود در بافی‌کوت و کیت کیاژن که دارای ستون مخصوص می‌باشد استفاده شد.

برای آمپلیفیکاسیون از روش Touch down استفاده شد و هدف از استفاده از این روش، کاستن از واکنش‌های غیر اختصاصی در روند PCR بود (جدول ۱). دو لوله واکنش جداگانه برای تعیین ژنوتیپ ۲ آلل مورد نظر (HPA-1a, 1b) استفاده شد (جدول ۲). حجم کلی محتوای واکنش ۲۰ میکرولیتر بود (جدول ۳). پس از انجام مراحل تکثیر، محصولات PCR روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد و با استفاده از رنگ‌آمیزی سایبرگرین و ترانس لومیناتور UV مشاهده و بررسی گردید. اندازه مورد انتظار برای هر آلل مشخص شد (جدول ۴).

تعیین ژنوتیپ HPAs با استفاده از نتایج PCR صورت گرفت و وفور مشاهده شده شمارش گردید. فراوانی حاصله برای مطابقت با معادله هاردی وینبرگ به وسیله آزمون کای‌دو بررسی شد. سپس از نرم‌افزار معادله مذکور، وفور ژنی (که اساس آن مبتنی بر $a^2 + b^2 + 2ab = 1$ است) محاسبه گردید، در این فرمول a و b نشان‌دهنده وفور اشکال آللی هر یک از ژن‌های مورد بحث می‌باشند. جهت مقایسه وفور آللی در جمعیت مورد مطالعه با سایر جمعیت‌ها از آزمون آماری مقایسه نسبت (آزمون Z)

ایرانی با سابقه سقط مکرر به روش PCR-SSP (Sequence Specific Primed-PCR) بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع توصیفی-مقطعی بود که در آن ۷۵ زوج با سابقه حداقل دو سقط مکرر خود به خودی ایدیوپاتیک از میان مراجعه‌کنندگان به بیمارستان فوق تخصصی زنان و زایمان صارم تهران، وارد مطالعه شدند. انتخاب این افراد با نظر متخصص زنان و زایمان بر اساس پرونده پزشکی و به صورت تصادفی در روزهای مختلف مراجعه صورت گرفت، این افراد از نظر عوامل مؤثر در سقط مکرر مانند کاریوتیپ، عوامل آناتومیک، اختلالات هورمونی، عوامل عفونی و ایمونولوژیک بررسی شده و فاقد عامل اتیولوژیک سقط بودند که این اطلاعات از پرونده پزشکی ایشان منتج گردید. از افرادی که در مطالعه شرکت کردند جهت رعایت اخلاق پزشکی رضایت‌نامه دریافت گردید. این مطالعه، مصوبه کمیته اخلاق در پژوهش مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ایران را به شماره IR.TMI.REC.1395.002 دریافت کرد. نمونه‌های خون (۴ میلی‌لیتر خون کامل) در لوله‌های حاوی EDTA جمع‌آوری گردید. برای استخراج DNA از

جدول ۱: برنامه Touch down دستگاه ترمال سایکلر

مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان	چرخه (n= ۴۰)
فعال‌سازی	۹۵	۱۰ دقیقه	۱ x
مرحله اول تکثیر ۱	۹۶	۲۵ ثانیه	۵ x
	۶۸	۴۵ ثانیه	
	۷۲	۳۰ ثانیه	
مرحله اول تکثیر ۲	۹۶	۲۵ ثانیه	۲۰ x
	۶۱	۴۵ ثانیه	
	۷۲	۳۰ ثانیه	
مرحله اول تکثیر ۳	۹۶	۲۵ ثانیه	۱۵ x
	۵۱	۱ دقیقه	
	۷۲	۲ دقیقه	
سرد کردن	۴	۳ دقیقه	۱ x

جدول ۲: توالی آغازگرها، اندازه هر آغازگر و غلظت نهایی و دمای هر کدام

سیستم	آنتی ژن	سایز (bp)	دما (°C)	غلظت نهایی (میکرومول)	سکانس‌ها
HPA-1	a ۱	۱۹	۶۲	۰/۵	5`TCACAGCGAGGTGAGGCCA 3`
	b ۱	۱۹	۶۴		5`TCACAGCGAGGTGAGGCCG 3`
	مشترک	۲۱	۶۶		5`GGAGGTAGAGAGTCGCCATAG 3`
β -Actin	جلوبرنده	۲۰	۶۰	۰/۴	5`-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3`
	معکوس	۲۰	۶۰		5`-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3`

یافته‌ها

در این مطالعه از ۷۵ زوج نمونه‌گیری شد. نتایج PCR یک زوج به علت مناسب نبودن کیفیت DNA استخراج شده قابل اطمینان نبود و لذا از مطالعه حذف شدند. در ۷۴ زوج مورد مطالعه، میانگین سنی خانم‌ها 32 ± 7 سال با طیف سنی ۲۲ تا ۴۶ سال، تعداد سقط‌ها در تاریخچه پزشکی ایشان به طور میانگین $2/5 \pm 0/9$ و میانگین سن حاملگی در زمان آخرین سقط $7/5 \pm 0/7$ هفته بود. قومیت زوج‌های فوق مورد نظر نبود و پرسش نگردید. همه زوجین دارای ژنوتیپ به صورت هموزیگوت HPA-1a/1a بودند و HPA-1b مشاهده نشد (شکل ۱). فراوانی ژن HPA-1a در این جمعیت ۱۰۰٪ یا ۱ برآورد شد. بررسی ژن بتا‌اکتین برای همه نمونه‌ها به صورت جداگانه انجام شد (شکل ۲).

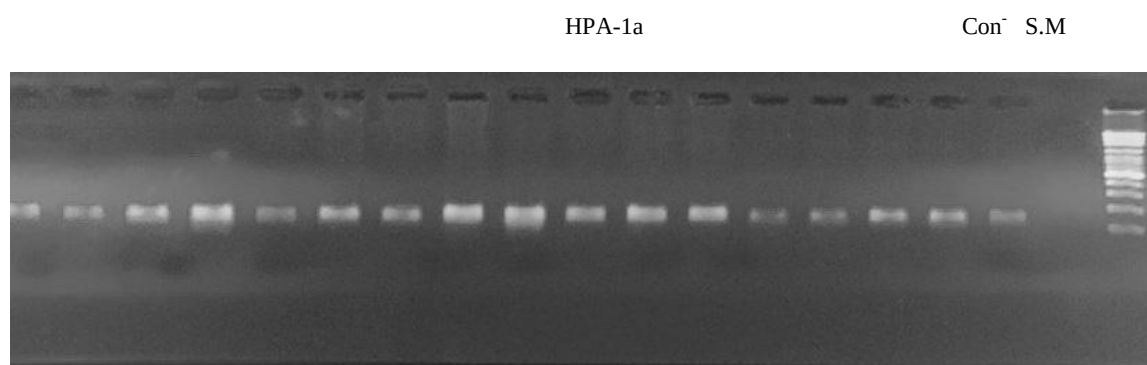
جدول ۳: غلظت مواد اولیه برای مراحل PCR

غلظت نهایی	$\mu\text{L}/\text{rxn}$	مواد مورد نیاز
۱ x	۱۰	2X Master Mix (GentBio)
۰/۵ μM	۱	HPA Primer (10 μM)
۰/۵ μM	۱	Common Primer (10 μM)
-	۴	Distilledwater (DNAase & RNAase free)
-	۴	DNA (30 ng/ μL)

جدول ۴: اندازه مورد انتظار برای هر آنتی ژن

آنتی ژن	Allele specific size (bp)
HPA-1	۹۰
β Actin	۵۰۰

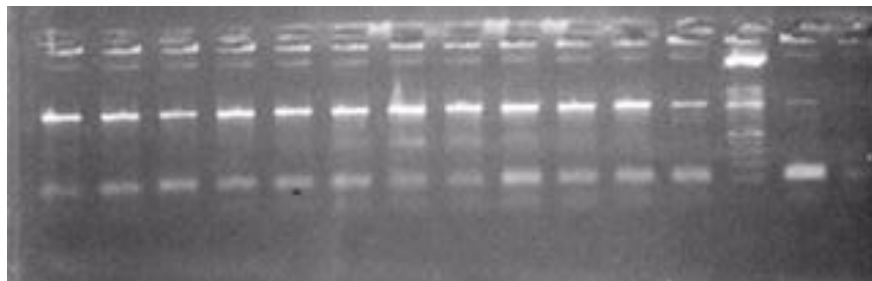
استفاده شده است و $p < 0/05$ بیانگر تفاوت معنادار می‌باشد.



شکل ۱: نتایج الکتروفورز محصول PCR-SSP مربوط به ژن HPA-1a: ستون اول سمت راست سایز مارکر ۵۰ bp و ستون دوم سمت راست کنترل منفی بدون DNA می‌باشد. باند ۹۰ bp مربوط به HPA-1a می‌باشد که در تمام ستون‌های مربوط به زوجین مشاهده می‌شود.

β -Actin

S.M Con⁺ Con⁻



شکل ۲: نتایج الکتروفورز محصول PCR-SSP مربوط به ژن β -Actin: ستون اول سمت راست، نمونه کنترل منفی بدون DNA ستون دوم کنترل مثبت، ستون سوم سایز مارکر ۵۰ bp DNA می باشد. باند ۵۰۰ bp مربوط به β -Actin در نمونه های آزمایش شده قابل مشاهده می باشد. برای تمام نمونه های مورد آزمایش PCR-SSP برای ژن β -Actin صورت گرفت.

بحث

زنان با سقط مکرر در مقایسه با وفور آلی همین ژن در اهداکنندگان ایرانی تفاوت معنادار دارد ($p=0/015$) (۲۰). ولی تفاوت وفور ژنی در دو جمعیت فوق در دو مطالعه، معنادار به دست نیامد.

مطالعه های متعددی به بررسی عوارض ناشی از آلوایمیونیزاسیون بر علیه HPA-1a در بارداری های دچار عوارضی مانند سقط، ICH، FNAIT پرداخته است که در ادامه چند مورد ذکر می شوند. مورفی و همکاران با بررسی خانمی که سابقه سه جنین مبتلا به ICH داشته است، آلوایمیونیزاسیون علیه HPA-1a را عامل این عارضه برشمردند. همین طور لوکاس خانمی را که در چهار بارداری اول عوارضی مانند سقط و جنین هیدروسفال را تجربه کرده بود، بررسی کرد و ژنوتایپ او به صورت HPA-1b/1b گزارش شد. عامل این عوارض آلوایمیونیزاسیون علیه HPA-1a برشمرده شد و در بارداری پنجم و ششم با استفاده از IVIG و داروهای استروئیدی، نوزاد سالم متولد شد (۲۲، ۲۱). در مطالعه ای که در ایتالیا در سال ۲۰۰۵ انجام شد به بررسی ژنوتیپی HPA1-6 در ۱۲ والد که نوزاد مبتلا به NAIT (Neonated Alluimmune Thrombocytopenia) شدید داشتند پرداخته شد و با بررسی آنتی بادی نتیجه گیری شد که HPA-1 عامل اصلی آلوایمیونیزاسیون و بروز NAIT شدید بوده است (۲۳). به علاوه در بسیاری از مطالعه ها پلی مورفیسم HPA-1 به عنوان فاکتور ترومبوفیلی در زنان یا زوجین با سابقه سقط مکرر بررسی شده است و ارتباط

همه زوجین در مطالعه حاضر به صورت هموزیگوت HPA-1a/1a بودند و از این نظر ناسازگاری بین آنها مشاهده نشد، لذا احتمال وقوع آلوایمیونیزاسیون علیه HPA-1a در حین بارداری در زنان مورد مطالعه مطرح نمی باشد.

بررسی پلی مورفیسم HPA-1 به دلیل مطرح بودن به عنوان فاکتور ترومبوفیلی و همین طور به عنوان اصلی ترین آنتی ژن پلاکتی در ایجاد عوارض ناشی از آلوایمیونیزاسیون در افراد با سابقه سقط مکرر حائز اهمیت است. جنین آنتی ژن های پدری و مادری را به ارث می برد و به ذات وضعیت Semi Allograft را دارا می باشد، آنتی ژن های پدری ممکن است توسط سیستم ایمنی مادر به عنوان بیگانه شناخته شود. سیستم ایمنی مادر باید ویژگی های منحصر به فردی داشته باشد تا بتواند به جنین Semi Allograft اجازه رشد دهد، این در حالی است که سیستم ایمنی مادر باید از مادر و جنین در برابر پاتوژن ها به طور مؤثر محافظت کند. اکثر این ویژگی های خاص ناشناخته می باشند (۱۸، ۱۴). در مطالعه حاضر با توجه به حضور ۱۰۰٪ HPA-1a در جمعیت مطالعه شده، مشخص شد که اگر HPA-1a را به عنوان فاکتور ترومبوفیلی در نظر بگیریم عدم تجانس آلل های HPA-1 و در نتیجه آلوایمیونیزاسیون مادران در بروز سقط مکرر ایدیوپاتیک در زوج های ایرانی احتمالاً نقشی ندارد (۱۹، ۷-۹). در بررسی مشخص شد که وفور آلی این ژن در جمعیت

نقشی در بروز سقط مکرر ندارد و تأثیر سایر عوامل در بروز این مسأله باید بررسی شود. عدم دسترسی به اطلاعات قومیت و نژاد افراد شرکت کننده در مطالعه حاضر از محدودیت های این مطالعه بود. نتیجه گیری در این زمینه نیازمند بررسی های گسترده تر است. از دیگر محدودیت های این مطالعه، عدم بررسی ژنوتیپ جنینی و بررسی آنتی بادی در مادر با احتمال آلوایمونیواسیون و همین طور بررسی افراد مورد مطالعه از نظر HLA Typing می باشد که پیشنهاد می شود در ادامه مطالعه های بعدی لحاظ گردند.

تشکر و قدردانی

نتایج این مطالعه از پایان نامه دانشجویی مصوب در مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ایران با کد اخلاق IR.TMI.REC.1395.002 در مقطع کارشناسی ارشد حاصل شده است. بدین وسیله از مرکز درمانی صارم که در امر تهیه نمونه مورد نیاز این پژوهش همکاری صمیمانه ای داشتند، تشکر و قدردانی می گردد.

این فاکتور با مسأله سقط در برخی از این مطالعه ها مشاهده شده است (۷-۱۰). در برخی دیگر تأثیر حضور این فاکتور به عنوان عامل ترومبوفیلی دخیل در سقط مشاهده نگردیده است (۱۲، ۱۱، ۳).

در مطالعه ای که مزیری در سال ۱۳۸۵ به بررسی HPA-1 در زنان با سابقه سقط مکرر و زنان بدون سابقه سقط پرداخت، تأثیر حضور این آنتی ژن بر سقط مکرر مشاهده نشد (۲۴).

با توجه به حضور HPA-1a در ۱۰۰٪ جمعیت مطالعه شده، این فاکتور نمی تواند به عنوان فاکتور آلوایمونیواسیون مؤثر در سقط و همین طور به عنوان یک فاکتور ترومبوفیلی مؤثر در سقط در جمعیت مطالعه شده مطرح باشد. مقایسه وفور آلی و ژنتیکی HPAs در اهداکنندگان اقوام مختلف بیانگر تنوع در فراوانی HPAs در کشورهای مختلف است (۲۵-۲۸). به نظر می رسد در جمعیت ایرانی نیز مطالعه های جداگانه ای بر اساس اقوام ضرورت دارد و با توجه به گستردگی قومیت های مختلف در ایران، فراوانی آنتی ژن های پلاکتی در این اقوام می تواند متفاوت باشد.

نتیجه گیری

در جمعیت مطالعه شده پلی مورفیسم ژن HPA-1

References:

- 1- Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol* 2009; 2(2): 76-83.
- 2- El Hachem H, Crepau V, May-Panloup P, Descamps P, Legendre G, Bouet P-E. Recurrent pregnancy loss: current perspectives. *Int J Womens Health* 2017; 9: 331-45.
- 3- Hohlagschwandtner M, Unfried G, Heinze G, Huber JC, Nagele F, Tempfer C. Combined thrombophilic polymorphisms in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2003; 79(5): 1141-8.
- 4- Curtis B, McFarland JG. Human platelet antigens-2013. *Vox Sang* 2014; 106(2): 93-102.
- 5- Newman PJ, Derbes RS, Aster RH. The human platelet alloantigens, PlA1 and PlA2, 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.
- 6- Reuner K, Elgas M, Kaps M, Ruf A, Patscheke H. The human platelet antigen HPA-1a/1b (PI (A1)/PI (A2)) polymorphism and cerebral ischaemia. *Thromb Haemost* 1997; 78(2): 964-5.
- 7- Goodman CS, Coulam CB, Jeyendran RS, Acosta VA, Roussev R. Which thrombophilic gene mutations are risk factors for recurrent pregnancy loss? *Am J Reprod Immunol* 2006; 56(4): 230-6.
- 8- 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.
- 9- Ruzzi L, Ciarafoni I, Silvestri L, Semeraro ML, Abeni D. Association of PLA2 polymorphism of the ITGB3 gene with early fetal loss. *Fertil Steril* 2005; 83(2): 511-2.
- 10- 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 Ginekol (Sofia)* 2008; 47(4): 3-9. [Article in Bulgarian]
- 11- Ozdemir O, Yenicesu GI, Silan F, Köksal B, Atik S, Ozen F, *et al.* Recurrent pregnancy loss and its relation to combined parental thrombophilic gene mutations. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012; 16(4): 279-86.
 - 12- Pihusch R, Hiller E, Buchholz T, Rogenhofer N, Hasbargen U, Thaler CJ, *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.
 - 13- Tiller H, Husebekk A, Ahlen MT, Stuge TB, Skogen B. Current perspectives on fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia—increasing clinical concerns and new treatment opportunities. *Int J Womens Health* 2017; 9: 223-34.
 - 14- Refsum E. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: immunological mechanisms and clinical consequences; 2017. Available from: https://openarchive.ki.se/xmlui/bitstream/handle/10616/46057/Thesis_Erle_Refsum.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
 - 15- Schmaier AH. Are maternal antiplatelet antibodies a prothrombotic condition leading to miscarriage? *J Clin Invest* 2011; 121(11): 4241-3.
 - 16- Tiller H, Killie M, Skogen B, Øian P, Husebekk A. Neonatal alloimmune thrombocytopenia in Norway: poor detection rate with nonscreening versus a general screening programme. *BJOG* 2009; 116(4): 594-8.
 - 17- Chen L, Liu Z, Liu T, Ma X, Rao M, Wang Y, *et al.* Neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by anti-HPA antibodies in pregnant Chinese women: a study protocol for a multicentre, prospective cohort trial. *BMC Pregnancy Childbirth* 2017; 17(1): 281.
 - 18- Eksteen M. Anti-human platelet antigen (HPA)-1a antibodies: For better or for worse; 2015. Available from: <https://munin.uit.no/bitstream/handle/10037/8568/thesis.pdf?sequence=2&isAllowed=y>.
 - 19- Hopkins M, Lucas G, Calvert A, Bendukidze N, Green F, Kotecha K, *et al.* Human platelet antigen (HPA)-specific immunoglobulin M antibodies in neonatal alloimmune thrombocytopenia can inhibit the binding of HPA-specific immunoglobulin G antibodies. *Transfusion* 2017; 57(5): 1267-71.
 - 20- Madani T, Samiee S, Attai Z, Kavari M, Babaei GR, Mostakhdemin M, *et al.* Platelet antigens frequency in blood donors: comparison of molecular detection with ELISA method (for HPA-1a). *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2007; 4(3): 165-74. [Article in Farsi]
 - 21- Murphy M, Metcalfe P, Waters A, Ord J, Hambley H, Nicolaides K. Antenatal management of severe feto-maternal alloimmune thrombocytopenia: HLA incompatibility may affect responses to fetal platelet transfusions. *Blood* 1993; 81(8): 2174-9.
 - 22- Lucas G, Hamon M, Carroll S, Soothill P. Effect of IVIgG treatment on fetal platelet count, HPA-1a titre and clinical outcome in a case of feto-maternal alloimmune thrombocytopenia. *BJOG* 2002; 109(10): 1195-8.
 - 23- Fratellanza G, Scarpato N, D'Agostino E, D'Onofrio M, Misso S, Fratellanza A, *et al.* Genomic restriction fragment length polymorphism typing of human platelet-specific antigens in blood donors from southern Italy and in alloimmunised pregnancies. *Blood Transfus* 2005; 3: 222-30.
 - 24- Maziri P, Asaadi Tehrani G, Bahrami Hidagi F, Nejatollahi M, Asadi S. Association between Thrombophilic Gene Polymorphisms and Recurrent Pregnancy Loss in Iranian Women. *Iran J Neonatol* 2017; 8(4): 13-9.
 - 25- Cardone J, Chiba A, Boturão-Neto E, Vieira-Filho J, Bordin J. Gene frequencies of the HPA-15 (Gov) platelet alloantigen system in Brazilians. *Transfus Med* 2004; 14(6): 433-7.
 - 26- Yang W-H, Cheng CS, Chang JB, Liu KT, Chang JL. Antibody formation in pregnant women with maternal-neonatal human platelet antigen mismatch from a hospital in northern Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci* 2014; 30(1): 25-8.
 - 27- Simsek S, Faber N, Bleeker P, Vlekke A, Huiskes E, Goldschmeding R, *et al.* Determination of human platelet antigen frequencies in the Dutch population by immunophenotyping and DNA (allele-specific restriction enzyme) analysis. *Blood* 1993; 81(3): 835-40.
 - 28- Al-Ouda S, Al-Banyan A, Abdel Gader A, Bayoumy N, Al-Gahtani F. Gene frequency of human platelet alloantigens-1 to-6 and-15 in Saudi blood donors. *Transfus Med* 2016; 26(3): 220-4.

Original Article

HPA-1 gene polymorphism in Iranian couples with history of recurrent abortion

Ahmadzadeh Shad Gh.¹, Zadsar M.¹, Shaiegan M.¹, Samiee Sh.¹, Zare A.²

¹Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

²Sarem Fertility and Infertility Research Center, Sarem Cell Research Center, Sarem Hospital, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Recurrent abortion is referred to a condition that 2 or 3 consecutive pregnancies are affected by abortions before the 20th week of gestation, which is likely to occur in 2-5% of pregnancies. There are some etiologic factors such as anatomical, infectious and immunological elements. One of these immunological factors is the polymorphism of the HPA-1 gene as a factor able to cause FNAIT and its related complications; besides it contributes to abortion as a thrombophilic gene. This study was conducted to evaluate the prevalence of HPA-1 incompatibility in Iranian couples with a history of recurrent abortions.

Materials and Methods

In this cross-sectional descriptive study, totally 75 couples with at least two recurrent pregnancy losses without any specified causes (according to the medical records obtained from the infertility center) were entered to the study. Four-ml blood samples were collected in EDTA tubes and the allelic frequency of HPA-1 was determined by PCR-SSP. Gene frequency was calculated using the Hardy Weinberg equation. The $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Totally 75 couples were included with the average age of women being 32 ± 7 years and the mean number of abortions 2.5 ± 0.9 . HPA-1a was found in 100% of the under study population, and HPA-1b was absent in this population.

Conclusions

This study revealed that HPA-1a gene polymorphism does not have the likelihood of being involved in the recurrent abortion in Iranian couples, and other factors need to be investigated to determine the possible causes of recurrent abortion.

Key words: Platelets, Abortion, Recurrent, Thrombocytopenia

Received: 27 Jun 2018

Accepted: 20 Aug 2018

Correspondence: Zadsar M., MD. Pathologist. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052234; Fax: (+9821) 88628741
E-mail: maryam.zad@gmail.com