مقاله پژوهشی

ارتباط پلی‌مورفیسم ژن Beta fibrinogen-455 G/A(rs1800790) با سقط مکرر در زنان ایرانی

نویسندگان:

محمد شکرزاده[۱]، عباس محمدپور [۲]، زینب حیدری[۳]*

۱- استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی،گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲- دکترا سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات علوم دارویی،گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، موسسه آموزش عالی سنا، ساری، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.17, No.1, Spring 2019

چکیده:

مقدمه: سقط مکرر یک اختلال ژنتیکی با علل مختلف است که طبق تعریف سازمان بهداشت جهانی، به سه بار یا بیشتر از دست دادن متوالی حاملگی گفته می شود. ناهنجاری‌های ژنتیکی یکی از علل اصلی سقط مکرر است. هدف پژوهش حاضر بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم ژن Beta fibrinogen (rs1800790) و سقط مکرر در زنان ایرانی بود.

روش کار: در این مطالعه مورد– شاهدی ۱۰۱ زن دچار سقط مکرر (۱۹–۴۱سال) و ۵۰ زن بدون سابقه سقط (۲۳–۵۷سال) (کنترل) شرکت داشتند. پنج میلی لیتر از خون این افراد در لوله‌های حاوی EDTA در بیمارستان امام خمینی شهر ساری طی سال‌های ۱۳۹۷–۱۳۹۶جمع‌آوری شد. DNA ژنومی با روش salting out استخراج و به روش PCR-RFLP بررسی ژنوتیپی پلی مورفیسم انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Medcalc نسخه ۱۵ تحلیل آماری شدند.

یافته‌ها : فراوانی نسبی ژنوتیپ‌های AA، GA و GG ژن FGB به‌ترتیب در گروه بیمار ۵/۹۴٪، ۲۹/۷٪ و ۶۴/۳۶٪ و در گروه کنترل ۲٪، ۵۰٪ و ۴۸٪ بود(p= ۰/۰۴۰). درصد فراوانی اللی G و A به ترتیب در گروه بیمار ۷۹٪ و ۲۱٪ و در گروه کنترل ۷۳٪ و ۲۷٪ بود (p= ۰/۳۲۱). شواهد نشان داد ژن موتانت AA، خطر سقط مکرر را افزایش نمی دهد و ارتباط معناداری وجود ندارد (p= ۰/۴۷۲)، اما هتروزیگوت GA نسبت به ژنوتیپ مرجع GG خطر سقط مکرر را کاهش می دهد (OR= 0.44, 95%CI: 0.22-0.90) (P= ۰/۰۲۴).

نتیجه‌گیری : نتایج نشان داد که پلی‌مورفیسم rs1800790 ژن FGB، خطر بروز سقط مکرر را افزایش نمی‌دهد.

واژگان کلیدی: پلی مورفیسم rs1800790 ، سقط مکرر ، Beta fibrinogen-455 G/A

Pars J Med Sci 2019;17(1):56-63

مقدمه:

سقط مکرر خودبه خودی ، یکی از عوارض شایع بارداری است که حدود ۵–۱ درصد زوج‌ها را درگیر می‌کند[۱]. طبق تعریف سازمان بهداشت جهانی، سقط مکرر به معنای سه بار یا بیشتر سقط متوالی خودبه خودی در هفته بیستم بارداری یا قبل از آن، یا تولد جنینی با وزن کمتر از ۵۰۰ گرم است[۲]. علاوه بر این تعریف، در برخی از مطالعات از آستانه دو سقط متوالی به‌جای سه سقط برای قرار گرفتن بیماران در تعریف سقط مکرر استفاده می‌کنند. عقیده بر این است که ارزیابی‌ها را باید بعد از دو بار سقط متوالی در نظر گرفت[۱،۳،۴]. طبق مطالعات انجام شده، حدود ۱۵درصد از بارداری‌های تشخیص داده شده، منجر به سقط خود به خودی می‌شوند. سقط خود به خودی، به‌ویژه سقط مکرر خودبه خودی از نظر فیزیکی و عاطفی هزینه‌های بسیاری بر زوجین تحمیل می‌کند[۵]. علاوه بر این، بر اساس مطالعات گذشته، بروز یک سقط با افزایش خطر سقط در بارداری‌های بعدی مرتبط

* نویسنده مسئول، نشانی: دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، موسسه آموزش عالی سنا، ساری، ایران.
تلفن تماس: ۰۹۳۵۶۱۲۳۰۵۶ پست الکترونیک:z.heidari214@yahoo.com
دریافت: ۱۳۹۸/۵/۶ اصلاح:۱۳۹۸/۰۶/۲۰ پذیرش:۱۳۹۸/۷/۸

است [۶]. از طرفی، پاتوفیزیولوژی سقط مکرر بسیار پیچیده است و شناخت کمی در این زمینه وجود دارد[۷]. به‌همین دلایل، بررسی علل بروز سقط مکرر از اهمیت بالایی برخوردار است. از جمله عوامل موثر در بروز سقط مکرر می‌توان به عوامل جنینی، آنومالی‌های کروموزومی، مشکلات اندوکرینی، ناهنجاری‌های آناتومیک و عوامل متابولیکی، مشکلات ساختاری رحم و عفونت‌ها، عوامل ایمونولوژیکی و سندرم آنتی‌بادی آنتی فسفولیپید و همچنین عوامل ژنتیکی اشاره کرد. با این وجود، تقریباً در ۵۰ درصد از موارد، علل سقط مکرر ناشناخته باقی می‌ماند. همچنین در بیشتر از دو دهه پژوهشگران روی فاکتورهای ترومبوفیلی ارثی موثر بر ایجاد ترومبوزهای وریدی و سرخرگی و همچنین عوامل مرتبط با عوارض باروری مانند سقط زودهنگام، مطالعات بسیاری انجام دادند و دریافتند که ترومبوفیلی یکی از دلایل رایج سقط مکرر است و در ۵۰-۴۰ درصد از موارد سقط مکرر دیده می‌شود[۸]. ترومبوفیلی ارثی در نتیجه تغییر در مقدار یا عملکرد پروتئین‌های خاصی که در فرایند انعقاد خون موثر هستند اتفاق می‌افتد. به‌علاوه، جهش در ژن‌های موثر بر ترومبوفیلی ممکن است باعث انعقاد خون در مویرگ‌های جفتی و کاهش اکسیژن‌رسانی به جنین و درنتیجه مرگ جنین شود [۴،۹].

فیبرینوژن یا فاکتور یک انعقادی یکی از پروتئین‌های موثر بر سقط مکرر و یک گلیکوپروتئین محلول در پلاسما است که در آبشار انعقاد خون توسط ترومبین به رشته‌های نامحلول فیبرین تبدیل می‌شود[۱۰]. فیبرینوژن یک پروتئین هگزامر است که از دو سری زنجیره سه‌تایی آلفا و بتا و گاما تشکیل می‌شود. این زنجیره‌ها با ژن‌های پارالوگ FGA , FGB , FGG کد می‌شوند که در یک ناحیه ۵۰ کیلودالتونی بر روی کروموزوم ۴ قرار می‌گیرند (4q31.3) [۱۱]. یکی از ژن‌های موثر بر ترومبوفیلی و بروز سقط مکرر بر اساس مطالعات قبلی، ژن beta fibrinogen-455 G/A(FGB) است[۱و۴]. این ژن در ساختار خود دارای ۸ اگزون و ۷ اینترون است و محصول پروتئینی آن دارای ۴۹۱ اسید آمینه می‌باشد. تنوع‌های بسیاری از ژن FGB شناسایی شده است که برخی از آن‌ها در بروز سقط جنین نقش دارند. SNP مهم و شایع این ژن، rs1800790 است که در ناحیه بالادست پروموتر ژن قرار داشته و با سقط مکرر مرتبط است. این پلی‌مورفیسم شامل جایگزینی G به A در موقعیت ۴۵۵ (G455A) است. SNPهای دیگر ژن FGB شامل rs1800791, rs1800788, rs4220, rs2227385, rs2227388, rs1800789 هستند که پلی‌مورفیسم آن‌ها اثرات متفاوتی در بروز بیماری‌ها دارد. همچنین rs4220 باعث افزایش میانگین غلظت فیبرینوژن در پلاسما می‌شود[۱۲و۱۳].

با توجه به شیوع بالای سقط مکرر در جوامع مختلف و همچنین در ایران و با توجه به نقش مهم و کلیدی عوامل ژنتیکی در بروز سقط مکرر، بررسی ژن‌های مرتبط با سقط مکرر ضروری به نظر می‌رسد. هدف از پژوهش حاضر، بررسی ارتباط پلی مورفیسم ژن FGB (rs1800790) و بروز سقط مکرر در زنان ایرانی است.

روش کار:

این پژوهش از نوع مورد- شاهدی و جامعه مورد پژوهش، ۱۵۱ نفر شامل ۱۰۱ زن دچار سقط مکرر مراجعه‌کننده به کلینیک دانشگاه علوم پزشکی مازندران- بیمارستان امام خمینی ساری (گروه مورد) و ۵۰ نفر زن سالم بدون سابقه سقط و مراجعه‌کننده به همان کلینیک (گروه کنترل) بود. محدوده سنی افراد گروه مورد، ۴۱- ۱۹ سال و گروه کنترل ۵۷-۲۳ سال بود. نمونه‌ها از تاریخ ۹۶/۲/۱۵ لغایت ۹۷/۲/۱۰ جمع‌آوری شدند. از معیارهای ورود به مطالعه، داشتن حداقل سه بار سقط خود به خودی متوالی تا هفته بیستم بارداری بود که توسط پزشک متخصص تشخیص داده می‌شد. معیارهای ورود افراد کنترل به مطالعه، نداشتن سابقه سقط و دارا بودن حداقل دو فرزند سالم (دو باروری موفق) در نظر گرفته شد. در ضمن افراد هر دو گروه از نژاد مازندرانی انتخاب شدند. از جمله معیارهای خروج از مطالعه، داشتن بیماری‌هایی که علل بروز سقط محسوب می‌شوند شامل مصرف دخانیات، بیماری‌هایی همچون ناهنجاری‌های آناتومیک، دیابت، اختلالات تیروئید و عفونت واژینال بود. از هر یک از افراد مورد مطالعه، ۵ میلی‌لیتر نمونه خون وریدی گرفته شد و در لوله‌های حاوی ماده ضدانعقاد EDTA تا زمان استخراج DNA ذخیره شد. همچنین تمامی افراد شرکت‌کننده، فرم پرسشنامه مربوط به پژوهش را تکمیل و امضا کرده و آگاهانه در این طرح شرکت کردند. این مطالعه بر اساس کد ۱۵۳/س/پ ثبت شده در موسسه آموزش عالی سنا- ساری انجام گرفته است.

در ابتدای پژوهش، تعداد کل نمونه‌ها ۱۸۰ نفر بود که در مراحل مختلف کار آزمایشگاهی مانند بررسی پرسشنامه‌ها، استخراج DNA، انجام PCR و هضم آنزیمی برخی از نمونه‌ها شرایط ورود به مطالعه را نداشتند و از فرایند عملی حذف شدند. از سوی دیگر، بعضی از افراد سالم با گرفتن خون برای کارهای پژوهشی (به عنوان گروه کنترل) به لحاظ مسائل اخلاقی مشکل داشتند. درحالی که خون گیری از بیماران دچار سقط مکرر آسان تر بود و اکثر افراد زمانی که از هدف مطالعه که بررسی ژنتیکی علت سقط بود آگاه می‌شدند برای نمونه گیری با رضایت کامل همکاری می کردند. به همین دلیل، با صرف وقت فقط گرفتن ۶۰ نمونه از زنان گروه کنترل ممکن شد که از این تعداد نیز ۴ نفر به علت نداشتن معیارهای ورود به مطالعه، ۲ نفر در مرحله استخراج DNA

به علت پایین بودن کیفیت و ۴ نمونه در مراحل PCR و هضم آنزیمی به علت ندادن باند از مطالعه حذف شدند. همچنین از ۱۲۰ نمونه سقط مکرر گرفته شده، ۴ نفر به علت مشکلات آناتومیک، ۵ نفر به علت کم‌کاری تیروئید، ۲ نفر به علت داشتن دیابت، ۲ نفر به خاطر مصرف سیگار و دخانیات و ۱ نفر به علت عفونت واژینال از مطالعه خارج شدند و ۳ نمونه در مرحله استخراج و ۲ نمونه در مرحله PCR و هضم آنزیمی از مطالعه کنار گذاشته شدند. حذف نمونه‌ها در مراحل عملی می‌تواند به دلیل تعداد بالای نمونه‌ها، خطای انسانی، پایین بودن کیفیت نمونه یا موارد دیگر باشد. در نهایت پس از بررسی‌های انجام گرفته، ۱۵۱ نفر در مطالعه باقی ماندند که ۱۰۱ نفر بیمار و ۵۰ نفر کنترل بودند. در بحث پلی‌مورفیسم ژنی، در مقالات مشابه منتشر شده در ژورنال‌های داخلی و خارجی نیز تفاوت در تعداد نمونه‌های مورد و شاهد مشاهده شده است [۲۲،۱۵،۱۴،۴].

استخراج DNA :

استخراج DNA از نمونه‌های خون با روش salting-out انجام گرفت و پس از استخراج، کیفیت و کمیت DNA نمونه‌ها توسط دستگاه‌های الکتروفورز افقی و اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌های DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام PCR نگهداری شدند[۱۶].

تعیین ژنوتیپ :

تعیین ژنوتیپ با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به روش هضم آنزیمی PCR-RFLP (polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism) انجام شد. در واکنش PCR مربوط به ژن مورد نظر، از دو جهت آغازگر اختصاصی مناسب برای تکثیر محدوده ژنی محتوی قطعه پلی‌مورفیک طراحی شده است که برای این کار ابتدا توالی ژن دربانک ژنی NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) تعیین و سپس توالی پرایمرها، با استفاده از نرم افزار Gene Runner ردیف و سرانجام پرایمرهای طراحی شده BLAST شد. توالی پرایمرها و مشخصات آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل ۱ میکرولیتر DNA ژنومی (100ng/µl) ، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (master mix PCR) و ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (جدول ۱) که در نهایت با آب مقطر به حجم ۲۵ میکرولیتر رسیده است، انجام شد. برنامه زمانی واکنش PCR در جدول ۲ شرح داده شده است. سپس برای بررسی کیفیت محصول PCR، هر کدام از نمونه‌ها از طریق الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ که با رنگ safe stain رنگ‌آمیزی شده مورد ارزیابی قرار گرفتند. در اثر الکتروفورز محصولات PCR، باندهایی به طول ۳۴۹ جفت‌باز تولید شد. روش PCR-RFLP با استفاده از آنزیم محدود کننده BsuRI (HaeIII) برای بررسی قطعات ایجاد شده به کمک آنزیم و شناسایی ژنوتیپ و سپس فنوتیپ نمونه ها انجام گرفت. انتخاب آنزیم محدودالاثر BsuRI (HaeIII) با استفاده از نرم‌افزار NEB cutter انجام گرفت که در صورت برش توسط آنزیم مورد نظر، دو قطعه با اندازه‌های 225bp و 124bp ایجاد می شود. همچنین مرحله هضم آنزیمی طبق دستورالعمل ذکر شده برای آنزیم، در دمای 37°c و به مدت ۱۶ ساعت انجام شد. سپس محصولات PCR-RFLP به وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ تجزیه و تحلیل شدند (تصویر۱) [۱۶].

تجزیه و تحلیل آماری:

به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده ها از نرم‌افزار Medcalc (version.15) استفاده شد که برنامه کاربردی در علوم زیستی است. ورودی این نرم‌افزار، فایل‌های SPSS و Exel و غیره می‌باشد. همچنین از آزمون آماری Chi-square (X2) برای بررسی تفاوت در فراوانی ژنوتیپی بین دو گروه مورد و شاهد و برای نشان دادن ارتباط بین پلی مورفیسم ها از آزمون آنالیز لجستیک استفاده شد. نسبت شانس (OR, Odds Ratio) میزان تاثیر یک فاکتور خطر احتمالی در بروز یک بیماری خاص را نشان می‌دهد. برای بررسی معناداری آماری نتایج از p-value و فاصله اطمینان ۹۵٪ استفاده شد. سطح معناداری آزمون‌های به‌کار رفته در مطالعه کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

جدول ۱ : مشخصات پرایمر و آنزیم محدودالاثر مورد استفاده در پژوهش

ژن	پلی مورفیسم	توالی پرایمر	Tm	آنزیم محدودالاثر	قطعات حاصل از برش آنزیمی
FGB 455 G/A	Rs1800790	F :5- AAGGGTCTTTCTGATGTGTA-3 R :5-CAAAATGATGGGAAGTTAGGG-3	55	BsuRI (HaeIII)	AA= 349bp GG= 225bp,124bp GA= 349bp, 225bp , 124bp

جدول ۲ : شرایط زمانی و دمای واکنش PCR جهت تکثیر ژن FGB

تعداد چرخه ها	زمان	دما	مراحل
P_1	5 min	95˚c	واسرشت سازی اولیه
P_2 : 35 Cycle	30 sec	95˚c	واسرشت سازی
	30 sec	55˚c	اتصال آغازگر
	30 sec	72˚c	تکثیر قطعه
P_3	10 min	72˚c	تکثیر نهایی

یافته‌ها:

در این مطالعه مورد– شاهدی، در نهایت ۱۵۱ نفر (۱۰۱ زن دچار سقط مکرر به‌عنوان مورد و ۵۰ زن سالم بدون سابقه سقط و دارای دو باروری موفق به عنوان شاهد) مورد بررسی قرار گرفتند.

تکثیر قطعات و ژنوتایپینگ:

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از پرایمرهای ویژه‌ای برای تکثیر قطعات در ژن FGB انجام شد. درضمن تمام DNA های استخراج شده از هر دو گروه مورد و شاهد، یک محصول PCR تک باند اختصاصی بدون هیچ باند غیراختصاصی دیگری تولید کردند.

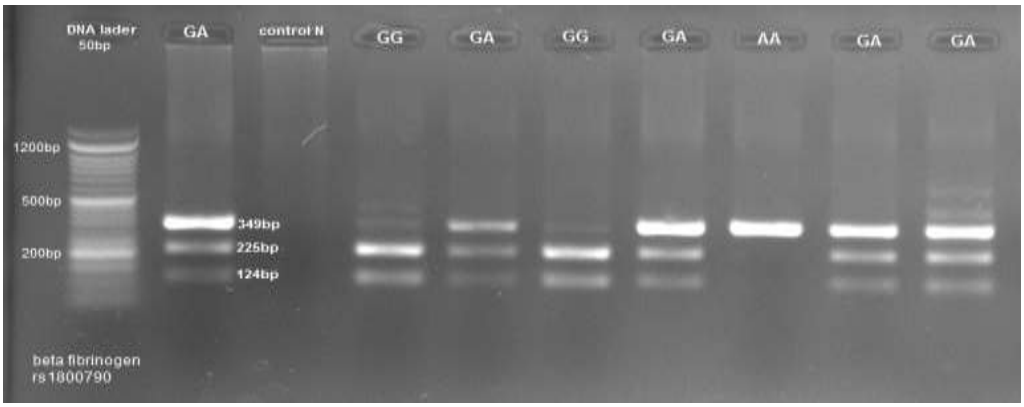
تصویر ۱: نتایج RFLP مربوط به پلی‌مورفیسم rs1800790 ژن FGB . حضور دو باند ۲۲۵ و ۱۲۴ جفت بازی نشانه ژنوتیپ GG، وجود باند سه‌گانه ۳۴۹، ۲۲۵ ، ۱۲۴ جفت بازی نشانه ژنوتیپ GA و حضور یک باند ۳۴۹ جفت بازی نشانه ژنوتیپ AA می‌باشد که به‌ترتیب نماینده فنوتیپ‌های هموزیگوت وحشی، هتروزیگوت و هموزیگوت موتانت هستند.

فراوانی ژنوتیپی :

نتایج آزمایش ها نشان داد که در میان ۱۰۱ زن بیمار، ۶۵ نفر (۶۴٪/۳۶) دارای ژنوتیپ GG، ۳۰ نفر (۲۹٪/۷) دارای ژنوتیپ GA و ۶ نفر (۵٪/۹۴) دارای ژنوتیپ AA هستند. در میان ۵۰ زن سالم (گروه کنترل)، ۲۴ نفر (۴۸٪) دارای ژنوتیپ GG، ۲۵ نفر (۵۰٪) دارای ژنوتیپ GA و ۱ نفر (۲٪) دارای ژنوتیپ AA بودند (جدول ۳). تفاوت مشاهده شده در فراوانی ژنوتیپی دو گروه سالم و بیمار با توجه به نتیجه آزمون آماری معنادار بود (p= ۰/۰۴۰). همچنین یافته ها نشان داد که شانس ابتلا به سقط مکرر در افراد دارای ژنوتیپ GA که تنها حامل یک الل ریسک هستند به میزان ۰/۴۴ برابر در مقایسه با افراد هموزیگوت نرمال (GG) کاهش می یابد (OR= 0.44, CI 95%: 0.22-0.90, p= 0.024). از سوی دیگر نتایج حاصل نشان داد شانس ابتلا به سقط مکرر در زنان دارای ژنوتیپ هموزیگوت موتانت (AA)، ۲/۲۲ برابر در مقایسه با افراد هموزیگوت نرمال (GG) افزایش می یابد، اما این میزان افزایش از نظر آماری معنادار نبود (OR= 2.22, CI 95%: 0.25-19.27, p= 0.472).

فراوانی آللی :

نتایج مطالعه نشان داد که در بین افراد بیمار، فراوانی الل‌های G و A به ترتیب برابر با ۷۹٪ و ۲۱٪ و در افراد سالم (گروه کنترل)، به ترتیب برابر با ۷۳٪ و ۲۷٪ می باشد (جدول ۳)، بنابر این الل G دارای بیشترین فراوانی در هر دو گروه بیمار و سالم است. با توجه به نتیجه آزمون آماری، تفاوت معناداری در توزیع اللی پلی‌مورفیسم rs1800790 ژن FGB، بین دو گروه بیمار و کنترل وجود ندارد (p= ۰/۳۲۱)



تصویر ۱ : نتایج RFLP پلی مورفیسم rs1800790 ژن Beta fibrinogen بر روی ژل آگارز ۱٫۵٪

جدول ۳ : فراوانی ژنوتیپی و اللی پلی مورفیسم rs1800790 ژن FGB در زنان بیمار دچار سقط مکرر و زنان سالم (کنترل)

ژنوتیپ	بیمار ۱۰۱ نفر تعداد (٪)	سالم ۵۰ نفر تعداد (٪)	OR (CI95%)	سطح معنی داری (p-value)
GG	۶۵ (۶۴٫۳۶)	۲۴ (۴۸)	رفرانس	–
GA	۳۰ (۲۹٫۷)	۲۵ (۵۰)	۰٫۴۴ (۰٫۲۲ –۰٫۹۰)	۰٫۰۲۴
AA	۶ (۵٫۹۴)	۱ (۲)	۲٫۲۱ (۰٫۲۵ –۱۹٫۲۶)	۰٫۴۷۲
G	۷۹	۷۳	رفرانس	–
A	۲۱	۲۷	۰٫۷۲ (۰٫۳۷ –۱٫۳۸)	۰٫۳۲۲

بحث:

سقط مکرر، یکی از مشکلات جدی بارداری است که هزینه‌های مالی و روانی بسیاری را به خانواده‌ها تحمیل می‌کند. سقط مکرر به عنوان یک بیماری چند عاملی شناخته می‌شود و با پلی‌مورفیسم ژن‌های مرتبط با ترومبوفیلی مرتبط است[۱۷]. ترومبوفیلی ارثی در نتیجه تغییرات در مقدار یا عملکرد پروتئین‌های خاصی که در فرایند انعقاد خون موثر هستند اتفاق می‌افتد. به‌علاوه، جهش در ژن‌های موثر بر ترومبوفیلی ممکن است باعث انعقاد خون در مویرگ‌های جفتی و کاهش اکسیژن‌رسانی به جنین و درنتیجه مرگ جنین شود [۴و۹]. براساس مطالعات گذشته، پلی‌مورفیسم rs1800790 ژن FGB باعث افزایش ۱۰–۷ درصدی سطح فیبرینوژن پلاسما می‌شود و به دنبال آن برهم‌کنش های آنزیم– سوبسترا بین ترومبین و فیبرینوژن و پلاکت‌ها افزایش می‌یابد. این عمل منجر به افزایش رسوب فیبرین در دیواره داخلی رگ‌ها و نهایتاً ترومبوز جفتی و کاهش اکسیژن رسانی به جنین می‌شود که خطر بروز سقط مکرر را افزایش می‌دهد [۹،۱۸،۱۹]. برای بررسی مشکل ترومبوفیلی در زنان باردار و ارتباط آن با سقط مکرر، آنالیز پلی‌مورفیسم ژن‌های مرتبط با ترومبوفیلی در جمعیت‌های مختلف و با نژادهای متفاوت برای تشخیص زودهنگام و درمان بیماری ضروری به نظر می‌رسد. در مطالعه حاضر، پراکندگی پلی‌مورفیسم ژن FGB (rs1800790) در زنان دچار سقط مکرر مراجعه‌کننده به کلینیک دانشگاه علوم پزشکی مازندران با روش PCR-RFLP با استفاده از آنزیم محدودالاثر برای اولین بار در شمال ایران مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد فراوانی هموزیگوت موتانت (AA) در گروه بیمار بیشتر از گروه کنترل است. توزیع ژنوتیپی پلی‌مورفیسم ژن FGB (rs1800790) بین دو گروه بیمار و کنترل بطور معناداری متفاوت است. براساس نتایج مطالعه حاضر، شانس ابتلا به سقط مکرر در زنان دارای ژنوتیپ هموزیگوت موتانت (AA) در مقایسه با افراد هموزیگوت نرمال (GG) افزایش نمی یابد. از طرفی وجود هتروزیگوت GA نسبت به هموزیگوت مرجع GG خطر سقط مکرر را کاهش می‌دهد. در این مطالعه فراوانی الل جهش‌یافته A در گروه کنترل بیشتر از گروه بیمار بود. با این حال بررسی‌های بیشتر در جمعیت‌های بزرگتر و با شرایط مشابه دو گروه کنترل و بیمار(مانند تعداد افراد دو گروه) می‌تواند به تایید ارتباط اللی پلی‌مورفیسم ژن FGB و بروز سقط مکرر کمک کند.

مطالعات بسیاری، ارتباط بین فاکتورهای ترومبوفیلی و بروز سقط مکرر را بررسی کردند و نتایج متفاوتی بدست آوردند. در مطالعه پورصادق زنوزی و همکاران، جهش در ۱۰ ژن موثر در ترومبوفیلی، از جمله ژن FGB 455 G/A را در ۸۹ زن دچار سقط مکرر و ۵۰ زن سالم دارای حداقل دو فرزند به عنوان گروه شاهد، در شهر تبریز و به روش ARMS-PCR ارزیابی کردند و دریافتند میزان فراوانی ژنوتیپی جهش‌های ژنی مورد مطالعه از جمله ژن FGB بین دو گروه مورد و شاهد تفاوت معناداری ندارد. همچنین فراوانی آلل جهش‌یافته ی ۶ مورد از ژن‌های مورد مطالعه از جمله ژن FGB، در زنان دچار سقط مکرر در مقایسه با گروه کنترل بیشتر است. هرچند تفاوت فراوانی الل‌ها بین دو گروه بیمار و شاهد معنادار نیست[۴]. همچنین در مطالعه مزیری و همکاران که ارتباط پلی‌مورفیسم ژن‌های مرتبط با ترومبوفیلی از جمله ژن FGB 455 G/A و سقط مکرر در جمعیت زنان ایرانی را بررسی کردند، ۵۰ زن دچار سقط مکرر(حداقل دو سقط متوالی) و ۵۰ زن سالم و بدون سابقه سقط (دارای حداقل دو فرزند سالم) در محدوده سنی ۴۸–۱۷ سال شرکت کردند. بررسی ژنوتایپینگ به‌روش PCR-RFLP انجام شد. در این مطالعه فراوانی هموزیگوت موتانت در گروه کنترل بیشتر از گروه بیمار است. درنهایت ارتباط معناداری بین پلی‌مورفیسم ژن FGB و افزایش خطر سقط مکرر یافت نشد[۱۷]. بر اساس نتایج پورصادق زنوزی و همکاران و مزیری و همکاران، به نظر می‌رسد به مطالعات بیشتر با جمعیت‌های مورد مطالعه بزرگتر برای تایید ارتباط جهش‌های ژنی موردنظر و سقط مکرر نیاز است. همچنین معیارهای ورود و خروج گروه بیمار و کنترل به‌درستی مشخص شود و افرادی که شرایط ورود به مطالعه را ندارد حذف شوند. در مطالعه‌ی بیگدلی و همکاران که به بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم ۷ ژن موثر در ترومبوفیلی، از جمله ژن FGB و ریسک سقط مکرر به‌روش

ARMS-PCR در ۲۰۰ زن دچار سقط مکرر(حداقل دو بار سقط) و ۲۰۰ زن دارای حداقل یک بارداری موفق و بدون هرگونه سابقه ترومبوفیلی ارثی (کنترل) پرداختند و در نهایت دریافتند پلی‌مورفیسم ژن FGB 455G/A و تعدادی از ژن‌های دیگر با خطر سقط مکرر ارتباط دارد و بر لزوم بررسی پلی‌مورفیسم ژن‌های موثر بر افزایش خطر سقط، در زنان دچار سقط مکرر تاکید کردند. همچنین مطالعات بیشتر در جمعیت‌های بزرگتر ممکن است به شناسایی واریانت‌های جدید ژنتیکی در رابطه با بروز سقط مکرر شود[۲۰]. لی و همکاران بر روی ارتباط ژنتیکی فاکتور۱۳ (val 34 Leu) و ژن FGB (455G/A) با زنان دچار سقط مکرر در جمعیت چینی مطالعه‌ای از نوع متا آنالیز انجام دادند و دریافتند ارتباطی بین پلی مورفیسم FGB و ریسک سقط مکرر بر اساس این پژوهش وجود ندارد اما با وجود موارد مثبت از ارتباط ژن فیبرینوژن بتا و سقط مکرر در قاره آسیا، این ژن اهمیت بیشتری در این منطقه جغرافیایی دارد[۱]. در مطالعه‌ی وفا و همکاران که رابطه‌ی پلی مورفیسم دو ژن PAI-1 و FGB با سقط مکرر خود به خودی را در مصر در ۱۸۵ زن دچار سقط مکرر (حداقل ۳ سقط متوالی) و ۱۲۵ زن بدون سابقه سقط (کنترل) در محدوده سنی ۴۰-۱۸ سال بررسی کردند و در نهایت تفاوت چشمگیری در فراوانی ژنوتیپی و اللی پلی‌مورفیسم ژن FGB، در دو گروه بیمار و کنترل مشاهده کردند و دریافتند ارتباط چشمگیری بین پلی‌مورفیسم ژن FGB 455 G/A و سقط مکرر وجود دارد[۱۴]. در مطالعه کازیدیمیتریو و همکاران که پلی‌مورفیسم ۱۲ ژن مرتبط با ترومبوفیلی را در ۴۸ زن دچار سقط مکرر و ۲۷ زن سالم و فاقد سابقه سقط در جمعیت یونانی را بررسی کردند، ارتباطی به عنوان فاکتور خطر برای سقط مکرر یافتند. هرچند که از نظر آماری، تفاوت چشمگیری بین دو گروه مورد مطالعه وجود نداشت[۱۵]. در مطالعه اردم و همکاران در ترکیه، ارتباط مثبت بین پارامترهای پلاکتی و مارکرهای ژنتیکی مرتبط با ترومبوفیلی از جمله ژن FGB را در ۲۲۹ زن دچار سقط مکرر و ۲۰۰ زن سالم و بدون سابقه سقط (کنترل) بررسی کردند و هر دو گروه در محدوده سنی ۴۰-۱۸سال بودند و سرانجام دریافتند پلی‌مورفیسم ژن FGB ارتباط معناداری با سقط مکرر دارد. همچنین دریافتند پلی‌مورفیسم ژن‌های مرتبط با ترومبوفیلی تاثیر معناداری بر روی پارامترهای پلاکتی دارد[۱۹]. اما بر خلاف مطالعه اردم، در مطالعه دیگری در ترکیه (ازدمیر و همکاران)، ارتباط سقط مکرر با جهش در ۱۲ ژن مرتبط با ترومبوفیلی والدین، از جمله ژن FGB 455 G/A در ۵۴۳ زن ترک دچار سقط مکرر و ۳۲۷ نفر از همسران آن‌ها (به عنوان نمونه‌های بیمار)، همچنین ۱۰۶ زوج سالم و باردار بدون سابقه سقط (کنترل) و دارای حداقل یک بارداری موفق، برای بررسی جهش در ۱۲ ژن مورد نظر تحلیل شدند و در نهایت، بر اساس بررسی‌های انجام گرفته، ارتباط معناداری بین سقط مکرر و جهش در ژن FGB یافت نشد. همچنین این پژوهش نشان داد سقط مکرر، با جهش در ژن های ترومبوفیلی و نه فقط ژن‌های مادری والدین مرتبط است[۲۱].

نتیجه‌گیری:

اگر چه نتایج این مطالعه نشان داد که توزیع ژنوتیپی پلی‌مورفیسم ژن FGB (rs1800790) بین دو گروه بیمار و کنترل بطور معناداری متفاوت است، اما پلی‌مورفیسم rs1800790 ژن beta fibrinogen از نظر ژنوتیپی خطر بروز سقط مکرر را افزایش نمی‌دهد. قابل ذکر است این نتایج، محدود به جمعیت مورد مطالعه‌ی حاضر می‌باشد و به مطالعات بیشتر و بر روی تعداد بیشتری از افراد و نژادهای متفاوت برای تعیین ارتباط پلی‌مورفیسم ژن FGB با سقط مکرر نیاز می باشد.

تشکر و قدردانی:

این مقاله حاصل بخشی ار پایان نامه در مقطع کارشناسی ارشد خانم زینب حیدری دانشجوی ارشد رشته ژنتیک مصوب در موسسه آموزش عالی سنا- ساری در سال ۱۳۹۶ است، بدین وسیله از تمام کسانی که نویسندگان را در انجام این پژوهش یاری رسانیده اند تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

تعارض منافع :

بدین وسیله نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در خصوص مطالعه حاضر وجود ندارد.

References:

1. Li J, Wu H, Chen Y, Wu H, Xu H, Li L. Genetic association between FXIII and β-fibrinogen genes and women with recurrent spontaneous abortion: a meta-analysis. J Assist Reprod Genet 2015; 32:(5):817-25.
2. Singh N, Gandhi M. Altered Levels of Fibrinogen in Relation to the Pathophysiology of Recurrent Spontaneous Abortions. WebmedCentral Obstetrics and Gynaecology 2011; 2(6):WMC001964.
3. Laskin CA, Spitzer KA, Clark CA, Crowther MR, Ginsberg JS, Hawker GA, et al. Low molecular weight heparin and aspirin for recurrent pregnancy loss: results from the randomized, controlled HepASA Trial. J Rheumatol. 2009;36(2) :279–287.

4-. Poursadegh Zonouzi A, Chaparzadeh N, Ghorbanian S, Farzadi L, Ghasemzadeh A, Kafshdooz T, et al. The association between thrombophilic gene mutations and recurrent pregnancy loss. J Assist Reprod Genet. 2013; 30:1353-1359.
5. Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. Rev Obstet Gynecol. 2009;2:76–83.
6. Kiwi R. Recurrent pregnancy loss: evaluation and discussion of the causes and their management. Cleve Clin J Med 2006;73(10):913-21.
7. Yenicesu I, Cetin M, Ozdemir O, Cetin A, Ozen F, Yenicesu C, et al. A prospective case–control study analyzes 12 thrombophilic gene mutations in Turkish couples with recurrent pregnancy loss. Am J Reprod Immunol. 2010;63:126–36.
8. Kamali M, Hantoushzadeh S, Borna S, Neamatzadeh H, Mazaheri M, Noori-Shadkam M et al. Association between Thrombophilic Genes Polymorphisms and Recurrent Pregnancy Loss Susceptibility in the Iranian Population: a Systematic Review and Meta-Analysis. Iranian Biomedical Journal.2018; 22(2): 78-89.
9. 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.
10. Mashayekhi A, Shahbazi SH. Evaluation of the association between FGBrs1800790 and plasma fibrinogen levels. Sci J Iran Blood Transfus Organ 2014; 11(1): 48-55.
11. Bin Q, Liang F, Ou DY, et al.Two symptomatic cases of dysfibrinogenemia in China: one with gamma-chain Arg275Cys mutation and another without detectable mutation in fibrinogen genes. Blood Coagul Fibrinolysis.2015;26:564–571.
12. Ken Dror G, Humphries S E, Kumari M, Kivimaki M, Drenos F. A genetic instrument for Mendelian randomization of fibrinogen. Eur J Epidemiol 2012; 27:267–279.
13. Kotzé RC, Nienaber-Rousseau C, De Lange Z, De Maat MP, Hoekstra T, Pieters M. Genetic polymorphisms influencing total and γ′ fibrinogen levels and fibrin clot properties in Africans.British Journal Of Haematology.2015; 168(1) :102-112.
14. Wafa Y, Oaf T, Hassanein R, Farahat M. Relationship between Plasminogen Activator Inhibitor-1 (Pai-1) and Beta Fibrinogen Polymorphisms with Unexplained Recurrent Pregnancy Loss. Med J Cairo Univ.2016; 84(3):89-95.
15. Chatzidimitriou M, Chatzidimitriou D, Mavridou M, Anetakis C, Chatzopoulou F, Lialiaris T, Mitka S. Thrombophilic gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss in Greek women. Int J Lab Hematol.2017; 39(6) :590-596.
16-. Mohammadpour A. Evaluation of a modified salt-out method for DNA extraction from whole blood lymphocytes: A simple and economical method for gene polymorphism. Pharmaceutical and Biomedical Research. 2018 Nov 15;4(2):8-9.
17. Maziri P, Asaadi Tehrani G, Bahrami Hidagi F, Nejatollahi M, Asadi S. Association between Thrombophilic Gene Polymorphisms and Recurrent Pregnancy Loss in Iranian Women. Iranian Journal of Neonatology. 2017; 8(4):13-19.
18. Torabi R, Zarei S, Zeraati H, Zarnani AH, Akhondi MA, Hadavi R, et al. Combination of Thrombophilic Gene Polymorphisms as a Cause of Increased the Risk of Recurrent Pregnancy Loss. J Reprod Infertil. 2012;13(2):89-94.
19. Erdem HB, Ceylan A C, Kaya A, Bahsi A, Erdem Z S, Sahin I, et al. positive correlation between Platelet Parameters and Genetic Markers of thrombophilia panel in Recurrent Pregnancy Loss. Euras J Fam Med.2018;7(1):19-28.
20. Bigdeli R, Younesi M, Panahnejad E, Asgary V, Heidarzadeh S, Mazaheri H, et al. Association between thrombophilia gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss risk in the Iranian population. Systems Biology in Reproductive Medicine.2018; DOI: 10.1080/19396368.2018.1456576.
21. Ozdemir O, Yenicesu G I, Salin F, Koksal B, Atik S, Ozen F, et al. Recurrent pregnancy loss and its relation to combined parental thrombophilic gene mutations. Genetic Testing and Molecular Biomarkers.2012; 16 (4).
22.Golmohammadzadeh G, Mohammadpour A, Ahangar N, Shokrzadeh M. Polymorphisms in Phase I (CYP450) Genes CYP1A1 (rs4646421), CYP1B1 (rs1056836), CYP19A1 (rs749292) and CYP2C8 (rs1058930) and Their Relation to Risk of Breast Cancer: A Case-Control Study in Mazandaran Province in North of Iran. Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences. 2019 Aug 10;7(15).

Original Article

The association of beta fibrinogen-455 G/A (rs1800790) gene polymorphism with recurrent abortion in Iranian women

Mohammad Shokrzadeh[1], Abbas Mohammadpour[2], Zeinab Heidari[*3]

Received:2019.07.28 Revised:2019.01.11 Accepted:2019.09.30

1. Professor, pharmaceutical research center, department of Toxicology and pharmacology, faculty of pharmacy, mazandaran university of medical sciences, sari, Iran
2. Ph.D cell &molecular biology, pharmaceutical research center, department of toxicology and pharmacology, faculty of pharmacy, mazandaran university of medical sciences, sari, Iran
3. Graduate student of genetics, Sana Institute of Higher Education, Sari, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.17, No.1, Spring 2019

Pars J Med Sci 2019;17(1):56-63

Abstract:

Introduction:
Recurrent Abortion is a genetic disorder with different etiologies, as defined by the World Health Organization (WHO), three or more times consecutive pregnancy losses. Genetic anomalies are one of the main etiologies of recurrent abortion. The purpose of the study was to investigate the association between beta fibrinogen (rs1800790) gene polymorphism and recurrent abortion in Iranian women.

Materials and Methods:
In this case-control study, 101 women with recurrent abortion (19-41 years) and 50 women with no history of abortion (23-57 years) (controls) were present. Five milliliters of their blood was collected in EDTA tubes in Imam Khomeini hospital, Sari, Iran, during 2017-2018. Genomic DNA was extracted using salting-out method and genotypic study of polymorphism was performed using PCR-RFLP method. Statistical analysis was performed using Medcalc software version 15.

Results:
Relative frequency of AA, GA, GG genotypes for FGB in patient group were 5.94%, 29.7% and 64.36% and in control group were 2%, 50%, 48% respectively (p= 0.040). The percentage of G and A alleles was 79% and 21% in patient and 73% and 27% in control groups, respectively (p= 0.322). Evidence indicated the AA mutant gene does not increase the risk of recurrent abortion and there is no significant association (p= 0.472). But GA heterozygote relative to GG reference genotype decrease the risk of recurrent abortion (OR= 0.44, 95%CI: 0.22-1.90, P= 0.024).

Conclusion:
The results showed that rs1800790 FGB gene polymorphism did not increase the risk of recurrent abortion.

Keywords: Rs1800790, Recurrent abortion, Beta Fibrinogen- 455 G/A

* Corresponding author Email: z.heidari214@yahoo.com