



Original Paper

Relationship between Coagulation Factors and Polymorphism of Effective Thrombophilic Genes with Recurrent Abortions

Masoomeh Rezanezhadi (M.Sc)¹ , Hamid Reza Joshagani (Ph.D)^{*2}

¹ M.Sc in Microbiology, Kavosh Medical Laboratory, Research and Development Unit, Gorgan, Iran.

² Professor of Biochemistry, Laboratory Sciences Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

Abstract

Background and Objective: Gene mutations leading to thrombophilic disorders and changes in blood coagulation factors during pregnancy play an important role in the occurrence of recurrent abortions. This study was conducted to determine the relationship between polymorphism of thrombophilic genes and coagulation factors in women with recurrent miscarriage.

Methods: In this descriptive-analytical study, 29 women with a history of recurrent abortions (at least three times) were investigated. Demographic data were collected. Total genomic DNA was isolated from peripheral blood. The presence or absence of mutation in factor II (G20210A), factor V Leiden (G1691A), factor V HR2 (H1299R), MTHFR C677T, and MTHFR A1298C polymorphisms were assessed by PCR.

Results: Coagulation factors and thrombophilic mutations had no significant association with recurrent miscarriage.

Conclusion: The results obtained in this study showed that none of the studied polymorphisms could justify frequent abortions in women. Therefore, it is suggested to evaluate genetic factors in normal individuals or immediate and extended family of the study population with no miscarriage history.

Keywords: Recurrent Miscarriage, Blood Coagulation Factors, Factor V, Factor II

***Corresponding Author:** Hamid Reza Joshagani (Ph.D), E-mail: joshaghani@goums.ac.ir, hr_joshaghani@yahoo.com

Received 16 Dec 2020

Final Revised 31 Dec 2022

Accepted 1 Jan 2023

Published Online 5 Apr 2023

Cite this article as: Rezanezhadi M, Joshagani HR. [Relationship between Coagulation Factors and Polymorphism of Effective Thrombophilic Genes with Recurrent Abortions]. J Gorgan Univ Med Sci. 2023; 24(4): 111-117. [Article in Persian]





تحقیقی

ارتباط فعالیت پلاسمایی فاکتورهای انعقادی و پلی مورفیسم ژن‌های موثر ترومبوفیلیک با سقط مکرر

معصومه رضانژادی^۱، دکتر حمیدرضا جوشقانی^{۲*}^۱ کارشناس ارشد میکروبیولوژی، آزمایشگاه کاوش، واحد تحقیق و توسعه، گرگان، ایران. ^۲ استاد بیوشیمی، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: جهش‌های ژنی ناشی از اختلالات ترومبوفیلیک و تغییر در فاکتورهای انعقادی خون در طول بارداری، نقش مهمی در بروز سقط مکرر دارند. این مطالعه به منظور تعیین ارتباط فعالیت پلاسمایی فاکتورهای انعقادی و پلی مورفیسم ژن‌های موثر ترومبوفیلیک با سقط مکرر انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی - تحلیلی روی ۲۹ زن با سابقه سقط مکرر (حداقل سه بار) مراجعه کننده به آزمایشگاه پاتوبیولوژی کاوش گرگان طی سال‌های ۹۷-۱۳۹۶ انجام شد. از PCR برای تکثیر DNA و از Post PCR برای تعیین جهش‌های ژنی *Factor II (G20210A)*، *Factor V Leiden (G1691A)*، *Factor V HR2 (H1299R)*، *MTHFR C677T* و *MTHFR A1298C* استفاده گردید و نتایج به دست آمده از تعیین ژنوتایپ هر پلی مورفیسم ارزیابی گردید.

یافته‌ها: بین فاکتورهای انعقادی و جهش‌های ترومبوفیلیک با سقط مکرر ارتباط آماری معنی‌داری وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: هیچکدام از پلی مورفیسم‌های مورد بررسی توجیه کننده سقط مکرر در زنان مورد مطالعه نبودند. پیشنهاد می‌شود در جامعه مورد بررسی از افراد نرمال یا بستگان درجه یک که دارای سابقه سقط نیستند؛ فاکتورهای ژنتیکی مورد ارزیابی قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: سقط مکرر، فاکتورهای انعقادی خون، فاکتور V، فاکتور II

* نویسنده مسؤول: دکتر حمیدرضا جوشقانی، پست الکترونیکی joshaghani@goums.ac.ir و hr_joshaghani@yahoo.com

نشانی: گرگان، اول جاده قدیم گرگان به کردکوی، مجموعه آموزش عالی (شادروان فلسفی) دانشگاه علوم پزشکی گلستان، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، تلفن ۰۱۷-۳۲۳۵۲۸۹۴

وصول ۱۳۹۹/۹/۲۶ اصلاح نهایی ۱۴۰۱/۱۰/۱۰ پذیرش ۱۴۰۱/۱۰/۱۱ انتشار ۱۴۰۲/۱/۱۶

مقدمه

ترومبوز وریدی است که با سقط مکرر ارتباط دارد^۱ و مطالعات متعدد پیش از این وجود ارتباط بین این دو را به اثبات رسانده است. فاکتورهای موثر در این زمینه شامل شرایط ارثی ناشی از کمبود مهارکننده‌های انعقاد طبیعی (آنتی‌ترومبین III، پروتئین C، پروتئین S، یا چهار نوع از رایج‌ترین فاکتورهای ژنتیکی برای ترومبوفیلی شامل فاکتور V لیدن (Factor V Leiden, G1691A)، جهش‌های تتر ا هیدروفولات ردوکتاز (MTHFR C677T و MTHFR A1298C)، جهش ژن پروترومبین (FII, G20210) و نیز عواملی مانند آنتی‌فسفولیپید آنتی‌بادی و لوپوس آنتی‌کواگولانت هستند.^{۲-۵} به نظر می‌رسد که وجود جهش Factor V و Factor II Leiden خطر سقط مکرر را افزایش می‌دهد. در حالی که هموزیگوسیتی MTHFR C677T به‌طور قابل توجهی افزایش این خطر را به همراه نمی‌آورد.^۶ نقش ترومبوفیلی جهش‌های MTHFR کمتر از Factor V Leiden و جایگزینی Factor II است و به این معنی است که جهش‌های ژن MTHFR می‌تواند اندکی، خطر

طبق تعریف سازمان بهداشت جهانی سقط مکرر (Recurrent Pregnancy Loss: RPL) به سه سقط یا بیشتر، قبل از هفته ۲۰ بارداری گفته می‌شود. سقط مکرر یک عارضه رایج در دوران بارداری، به خصوص برای زایمان زود هنگام است که حدود ۵-۱ درصد از بارداری را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در واقع سقط مکرر یک بیماری چند عاملی است که دلایلی مانند اختلالات ژنتیکی، اختلالات غدد درون ریز، آسیب شناسی رحم، مشکلات ایمنولوژیکی، ترومبوفیلی اکتسابی و وراثتی دارد.^{۲،۷}

عوامل ترومبوفیلیک به عنوان یکی از دلایل سقط مکرر هستند. در حقیقت برخی از پلی مورفیسم‌های ژنتیکی با سقط مکرر همراه هستند. عوامل ترومبوفیلی ارثی باعث اختلال در حالت طبیعی عروق و تشکیل جفت شده و منجر به محدودیت‌هایی در رشد جنین و شکست در بارداری، جدا شدن جفت و بنابراین سقط جنین یا مرده‌زایی می‌شود.^۲ ترومبوفیلی بیماری مرتبط با افزایش تمایل به

پرایمرهای بیوتینیل به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تکثیر (GQ_ABTHROMBO TYPE PLUS Kit) شدند. در این روش برای هر نمونه، ۲/۵ μl از Oligomix و ۲ μl از DNA استخراج شده را با مخلوط اصلی واکنش (Master Mix) به حجم ۲۵ μl رسانده و تکثیر ناحیه مورد نظر از DNA را طبق دستورالعمل کیت طی ۳۰ سیکل و با دستگاه ترموسایکلر انجام دادیم. هر سیکل شامل دناتوراسیون DNA در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ ثانیه، جفت شدن پرایمرها با ناحیه مورد نظر در ۶۱ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه و سنتز رشته DNA در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. سپس از روش Post PCR طبق دستورالعمل کیت، به منظور بررسی نوع جهش‌ها استفاده شد. در این مرحله DNA تکثیر شده با دناتوراسیون و هیبریداسیون، به الیگونوکلوئیدهای خاص (پروب) موجود بر روی استریپ‌های نیتروسلولزی، متصل می‌شود. جهش‌های / فاکتورهای پانل ترومبوفیلیک که می‌توان با این روش تعیین و شناسایی کرد شامل موارد زیر است.

Factor II (G20210A)
Factor V Leiden (G1691A)
Factor V HR2 (H1299R)
MTHFR C677T
MTHFR A1298C

همچنین وضعیت آللی (هموزیگوس، هتروزیگوس و ژنوتیپ ترکیبی) و نوع وحشی و جهش یافته فاکتورهای پانل ترومبوفیلیک نیز مشخص شد.

نتایج به‌دست آمده از تعیین ژنوتایپ هر پلی مورفیسم برای هر سه حالت نرمال، هتروزیگوس و هموزیگوس با فاکتورهای انعقادی با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-16 و آزمون کای اسکور در سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

میانگین سنی بیماران مورد مطالعه ۳۰/۷±۹/۰۵ سال در دامنه سنی ۱۷ تا ۵۵ سال بود. رابطه بین گروه‌های سنی با فاکتورهای انعقادی در **جدول یک** آمده است. با توجه به نتایج، فاکتورهای انعقادی کاردیولپین و آنتی‌ترومبین III در بیمارانی با گروه سنی هم کمتر و هم بیشتر از ۳۰ سال در محدوده مرجع به‌دست آمد. همچنین هموسیستئین در گروه سنی کمتر از ۳۰ سال و لوپوس در گروه سنی بیشتر از ۳۰ سال در محدوده مرجع مشاهده شد.

جدول ۲، درصد فاکتورهای انعقادی بیماران مبتلا به سقط مکرر را نشان می‌دهد. بیماران مورد مطالعه از نظر پروتئین C، پروتئین S، آنتی‌ترومبین III، هموسیستئین، لوپوس و کاردیولپین مورد بررسی قرار گرفتند. در بین فاکتورهای انعقادی تنها کاردیولپین و آنتی‌ترومبین III در بیماران مبتلا به سقط مکرر به‌صورت طبیعی مشاهده شد.

ترومبوز شریانی یا وریدی را افزایش دهد.^۸ براساس مطالعات سال‌های اخیر، تغییر در فاکتورهای انعقادی خون در طول بارداری و ایجاد اختلالات ترومبوفیلیک در اثر جهش‌های ژنی، در بروز سقط‌های مکرر دخالت دارند و از آنجایی که بیش از نیمی از سقط‌های مکرر با اختلالات ترومبوفیلی همراه است؛ این مطالعه به منظور تعیین ارتباط فعالیت پلاسمایی فاکتورهای انعقادی و پلی‌مورفیسم ژن‌های موثر ترومبوفیلیک با سقط مکرر انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی - تحلیلی روی ۲۹ زن با سابقه سقط مکرر (حداقل سه بار) مراجعه کننده به آزمایشگاه پاتوبیولوژی کاوش گرگان طی سال‌های ۹۷-۱۳۹۶ انجام شد.

پس از اخذ رضایت‌نامه و تکمیل فرم اطلاعات فردی و بالینی، از تمام بیماران نمونه خون گرفته شد.

مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی گلستان (IR.GOUMS.REC.1400.275) قرار گرفت.

معیارهای عدم ورود به مطالعه شامل ابتلا به عفونت‌های هپاتیت B، هپاتیت C، ایدز و سایر بیماری‌های عفونی بودند.

از نمونه سرم بیماران برای انجام تست کاردیولپین و هموسیستئین، همچنین از پلاسمای سیراته نیز برای بررسی پروتئین C، پروتئین S، آنتی‌ترومبین III و لوپوس استفاده شد. سطح پلازما آنتی‌ترومبین III و ضدانعقاد لوپوس (LAC) با استفاده از آزمون رنگ‌سنجی (Hyphen BioMed, France) مورد ارزیابی قرار گرفت. پروتئین C، پروتئین S با دستگاه الیزا و با استفاده از (Corgenix, USA) مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین کاردیولپین با دستگاه آلگرا و به روش EIA (Orgentec, EnglandAlegria) و هموسیستئین با دستگاه Mindray BS480 و با استفاده از روش EIA (Axis shield, England) مورد آزمایش قرار گرفتند. محدوده مرجع برای پروتئین C ۷۰-۱۴۰ درصد، پروتئین S ۵۵-۱۶۰ درصد، آنتی‌ترومبین III ۸۰-۱۲۰ درصد، کاردیولپین <۱۰ U/ml، لوپوس <۴۳ Sec و هموسیستئین برای بزرگسال ۵-۱۵ μmol/L، بیشتر از ۶۰ سال ۵-۲۰ و کمتر از ۱۵ سال <۱۰ بودند. حساسیت کیت‌های استفاده شده برای کاردیولپین G <۱ U/mL، کاردیولپین M <۰/۵U/mL، پروتئین C، پروتئین S و آنتی‌ترومبین III <۵ بودند.

به منظور تعیین جهش در پانل ترومبوفیلی، نمونه‌های خون حاوی ماده ضد انعقاد EDTA مورد بررسی قرار گرفتند.

برای استخراج DNA از کیت Roche (High Pure PCR Template prepration kit) و بر اساس دستورالعمل استفاده شد. غلظت و خلوص DNA با OD 260nm/280nm مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تعیین جهش، قطعات ژنی خاصی از هر ژن/آلل مورد نظر با استفاده از

جدول ۱: درصد فاکتورهای انعقادی با گروه های سنی در بیماران مبتلا به سقط مکرر					
گروه ها	درصد پروتئین C	درصد پروتئین S	درصد هوموسیستتین	درصد لوپوس	
گروه سنی کمتر از ۳۰ سال	۹۰/۹	۹۱/۷	۱۰۰	۸۵/۷	۱۴/۳
گروه سنی بیشتر از ۳۰ سال	۸۱/۸	۹۰/۹	۸۵/۷	۱۰۰	۰
p-value	۰/۵۵۴	۰/۹۵۰	۰/۳۱۷	۰/۳۱۷	

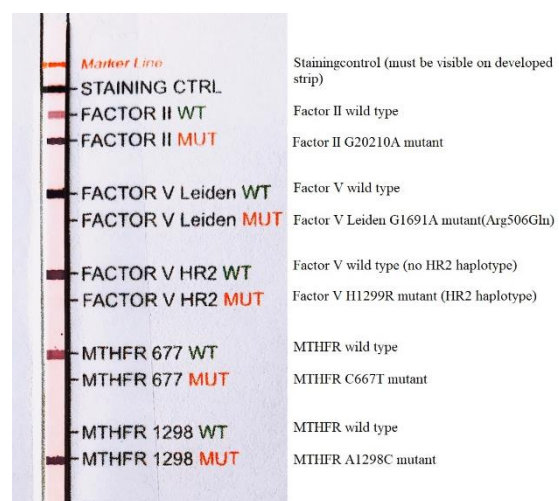
جدول ۲: درصد فاکتورهای انعقادی بیماران مبتلا به سقط مکرر		
فاکتورهای انعقادی	درصد طبیعی	درصد غیرطبیعی
پروتئین C	۸۷	۱۳
پروتئین S	۹۱/۷	۸/۳
هوموسیستتین	۹۲/۹	۷/۱
لوپوس	۹۲/۹	۷/۱

جدول ۳: درصد شیوع پلی مورفیسم ژن های موثر ترومبوفیلیک در بیماران مبتلا به سقط مکرر			
جهش ها			
Heterozygous	Homozygous Mutation	Homozygous Wild Type	
۵۸/۳	۸/۳	۳۳/۳	MTHFR A1298C
۳۳/۳	۱۲/۵	۵۴/۲	MTHFR C677T
۲۷/۸	۰	۷۲/۲	Factor V HR2 H1299R
۱۲/۵	۰	۸۷/۵	Factor V Leiden G1691A
۱۷/۲	۳/۴	۷۹/۳	Factor II G20210A

پلی مورفیسم هموزیگوس جهش یافته تنها در MTHFR و Factor II مشاهده شد و هیچ بیماری این موتاسیون را در Factor V نداشت. ارتباط معنی داری بین فاکتورهای انعقادی و جهش های ترومبوفیلیک در بیماران مورد مطالعه با سقط مکرر مشاهده نشد. وضعیت آللی فاکتورهای پانل ترومبوفیلیک یک بیمار بر روی استریپ ترومبوفیلیک در شکل یک آمده است.

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه، تفاوت معنی داری بین پلی مورفیسم ژن های موثر ترومبوفیلیک با سقط مکرر یافت نشد. براساس نتایج به دست آمده MTHFR A1298C و MTHFR C677T در بیماران مبتلا به سقط مکرر بیشترین شیوع را داشت. فراوانی پلی مورفیسم هموزیگوس و هتروزیگوس MTHFR C677T به ترتیب ۱۲/۵ درصد و ۳۳/۳ درصد و فراوانی هموزیگوس و هتروزیگوس MTHFR A1298C به ترتیب ۸/۳ درصد و ۵۸/۳ درصد بود که میزان هموزیگوس موتانت نسبت به هتروزیگوس در MTHFR کم است. با وجود این که شیوع پلی مورفیسم های MTHFR C677T و MTHFR A1298C در زنان دچار سقط مکرر، نسبت به دیگر پلی مورفیسم های بررسی شده در این مطالعه بیشتر است؛ اما این اختلاف به لحاظ آماری معنی دار نبود. عدم ارتباط میان پلی مورفیسم MTHFR و سقط مکرر در مطالعه بهجتی و همکاران^۹ نیز دیده شده است. در حالی که مطالعه ترابی و همکاران^{۱۰} و مطالعه پازوکی و



شکل ۱: وضعیت آللی فاکتورهای پانل ترومبوفیلیک یک بیمار بر روی استریپ ترومبوفیلیک

Factor II (G20210A) = Heterozygous
Factor V Leiden = Homozygous Wild type
Factor V HR2 (haplotype HR2) = Homozygous Wild type
MTHFR C677T = Homozygous Wild type
MTHFR A1298C = Homozygous Mutant

جدول ۳، درصد شیوع جهش های هموزیگوس و هتروزیگوس در ژن ترومبوفیلیک بیماران با سقط مکرر را نشان می دهد. وضعیت آللی هر یک از جهش های Factor II، Factor V Leiden، Factor V HR2 و MTHFR به صورت هموزیگوس (نوع وحشی و جهش یافته) و هتروزیگوس مشخص شده است. در میان بیماران ترومبوفیلیک،

که سقط مکرر یک بیماری چند عاملی است؛ می‌تواند تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله عوامل موثر در تولید مثل قرار گیرد. در مطالعه انجام شده Ozgu Erdinc و همکاران در ترکیه،^{۱۷} بیان شد که جهش هتروزیگوس FV HR2 در زنان مبتلا به سقط مکرر بیشتر از گروه کنترل است و ارتباط بین سقط مکرر و این فاکتور تایید شد. همچنین در مطالعاتی^{۱۸،۱۳،۱۹} بیان شد که بین سقط مکرر و فاکتور FV Liden ارتباط معنی‌داری وجود دارد. با این حال عدم ارتباط میان این فاکتور و سقط مکرر در مطالعات مختلف نیز مشاهده شده است. مثلاً در مطالعه Yildiz و همکاران،^{۱۵} Reddy و همکاران^{۱۹} و Hwang و همکاران^{۲۰} گزارش شد که غربالگری ژن FV Liden در زنان با سقط مکرر توصیه نمی‌شود. در مطالعات انجام شده بین پلی‌مورفیسم ژن‌های ترومبوفیلیک با سقط مکرر، حتی در یک کشور نیز تناقضاتی وجود دارد. مثالی از این تناقضات در ایران، مطالعه ترابی و همکاران^{۱۱} است که اختلاف معنی‌داری بین این جهش‌ها با سقط مکرر یافت نشد. در حالی که باقری و همکاران^{۲۱} و پورصادق و همکاران^{۲۲} بیان کردند که این فاکتورها نمی‌تواند خطر سقط مکرر را افزایش دهند. با توجه به عدم مشاهده جهش هموزیگوس FV در این مطالعه، می‌توان بیان کرد که تایید یا رد ارتباط این پلی‌مورفیسم با سقط مکرر شاید به دلیل شیوع متفاوت آلل FV Leiden باشد. در واقع یکی از دلایل سقط مکرر وجود جهش در ژن FV است که به صورت هموزیگوس باعث عوارض شدید ترومبوفیلیک در مادران و جنین‌های آنها می‌شود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بررسی جهش‌های FV Leiden و FV HR2 عامل خطری برای سقط مکرر در بیماران مورد مطالعه نیست. یافته‌های ما با مطالعات صورت گرفته^{۱۵،۱۹،۲۳-۲۲} همخوانی دارد.

براساس نتایج حاصل از این مطالعه، پلی‌مورفیسم موتانت و هتروزیگوس Factor II (G20210A) به ترتیب ۳/۴ درصد و ۱۷/۲ درصد بود و تفاوت معنی‌داری میان این فاکتور و سقط مکرر وجود نداشت که نشان می‌دهد پلی‌مورفیسم Factor II عامل خطری برای سقط مکرر در زنان محسوب نمی‌گردد. در مطالعه انجام شده Slezak و همکاران^{۱۴} با روش PCR-RFLP، پلی‌مورفیسم ژن‌های FV Leiden، Factor II و MTHFR C677T بررسی شد و میزان موتاسیون Factor II ۳/۵ درصد در گروه بیمار در برابر ۰/۵ درصد در گروه کنترل تعیین گردید که نشان‌دهنده ارتباط معنی‌داری بین موتاسیون Factor II با پیامدهای نامطلوب حاملگی است. در حالی که در بیماران جهش ژن‌های FV Leiden و MTHFR C677T در مقایسه با گروه کنترل شیوع کمتری داشت. این ارتباط در دیگر مطالعات^{۱۳،۲۱} نیز تایید شده است. در مطالعاتی^{۱۸،۱۵،۲۲} بیان شد که ارتباط معنی‌داری بین Factor II و سقط مکرر وجود ندارد. نتایج متضاد در جمعیت‌های مختلف نشان می‌دهد که احتمالاً نقش

ناصری،^{۱۱} تفاوت معنی‌داری را برای این پلی‌مورفیسم نشان دادند. این تفاوت نه تنها در ایران بلکه در سایر نقاط دیگر جهان نیز مشاهده شده است. در مطالعه موردی که بر روی زن ۴۰ ساله توسط Kalife و Bissar-Tadmouri در لبنان در سال ۲۰۲۰ انجام شد؛^{۱۲} جهش‌های ژنی FV Leiden، Factor II و MTHFR C677T مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که فرد از نظر این جهش‌ها هتروزیگوس است. این تحقیق که بر روی خانواده‌ای با ترومبوفیلی ارثی صورت گرفته بود؛ مشخص کرد که هر یک از اعضا حداقل دو تا از سه جهش مورد بررسی را دارا هستند و بیان شد همه افراد درجه اول خانواده برای این جهش‌ها بایستی مورد آزمایش قرار گیرند. در مقابل در مطالعاتی^{۱۳،۱۵،۲۲} بیان شده MTHFR فاکتور موثر در سقط مکرر نیست. نتایج متفاوتی که در این مطالعات به دست آمده می‌تواند به این دلیل باشد که اثرات فنوتیپی پلی‌مورفیسم‌های ژنی تحت تاثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد و قرار گرفتن طولانی مدت در معرض عوامل محیطی موجب سقط مکرر جنین می‌شود. برای درک بهتر آسیب‌شناسی سقط مکرر شناسایی عوامل ژنتیکی جدید و برهمکنش این واریانت‌ها با یکدیگر و محیط، لازم است. لذا این احتمال وجود دارد که این پلی‌مورفیسم‌ها در ارتباط با سابقه ژنتیکی و عوامل محیطی می‌توانند منجر به بروز اختلال شوند. بنابراین غربالگری این پلی‌مورفیسم در ارزیابی بیماران مبتلا به سقط مکرر توصیه نمی‌شود. یافته ما با بسیاری از مطالعات صورت گرفته^{۱۳،۱۵،۲۳،۲۲} همخوانی دارد.

فاکتورهای دیگر مورد بررسی در مطالعه حاضر FV Leiden (G1691A) و FV HR2 (H1299R) بودند. نتایج نشان داد که هیچ بیماری جهش هموزیگوس در ژن FV Leiden و FV HR2 را ندارد و فراوانی پلی‌مورفیسم هتروزیگوس FV Leiden و FVHR2 به ترتیب ۱۲/۵ درصد و ۲۷/۸ درصد تعیین شد. با توجه به نتایج این مطالعه، پلی‌مورفیسم‌های FV Leiden و FVHR2 نمی‌توانند خطر سقط مکرر را در جمعیت مورد مطالعه افزایش دهند. مطالعات گسترده‌ای در این زمینه وجود دارد که این پلی‌مورفیسم را عامل افزایش خطر سقط مکرر بیان کرده‌اند. در حالی که گزارشات دیگری این ارتباط را نفی نموده‌اند. در مطالعه انجام شده Ulaş Barut و همکاران در ترکیه^{۱۶} با استفاده از روش PCR-RFLP، جهش ژن‌های FV Leiden، Factor II، MTHFR C677T و MTHFR A1298C مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که رابطه معنی‌داری بین سقط مکرر با هتروزیگوس FV Leiden و Factor II وجود دارد. در حالی که هیچ رابطه‌ای بین MTHFR C677T و MTHFR A1298C با سقط مکرر وجود نداشت. آنها بیان کردند که تشخیص پلی‌مورفیسم ژن‌های ترومبوفیلیک برای تشخیص سقط مکرر لازم است و با توجه به این

فاکتور Factor II در سندرم سقط مکرر جنین به دلیل عواملی همچون نژاد، قومیت و پراکنش جغرافیایی است و فنوتیپ نهایی حاصل برهمکنش این عوامل است. نتایج حاصل از این مطالعه با مطالعات دیگر^{۲۹،۳۰،۳۱،۳۲} همخوانی دارد.

در مورد ارتباط کمبود فاکتورهای انعقادی و ایجاد عوارض نامطلوب در دوران بارداری در مطالعات مختلف نتایج مشابه و متضادی با مطالعه حاضر به دست آمده است. در مطالعه Laghoeff-Ross و همکاران^{۳۳} گزارش شد که پروتئین S و آنتی ترومبین III با سقط مکرر در سه ماهه اول بارداری هیچ ارتباط معنی داری ندارند. در حالی که Mekaj و همکاران در کوزوو^{۳۴} گزارش کردند که کمبود پروتئین C، پروتئین S و آنتی ترومبین III در بیماران دارای سقط مکرر بیشتر از گروه کنترل است و ترومبوفیلی عامل سقط در سه ماهه اول بارداری است. همچنین در مطالعه انجام شده توسط پرند و همکاران در ایران^{۳۵} بیان شد که کمبود پروتئین C با سقط مکرر ارتباط معنی داری ندارد؛ اما کمبود پروتئین S در بیماران به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود. در مطالعه انجام شده Klai و همکاران در شهر تونس^{۳۶} روی ۲۰۳ بیمار با پیامد نامطلوب حاملگی مانند پره کلامپسی، سقط مکرر، تاخیر در رشد جنین و جاشدگی جفت مشخص گردید که جهش FV Leiden و کمبود پروتئین C بیشترین شیوع را در بین بیماران دارد. جهش Factor II، پروتئین S و آنتی ترومبین III از نظر آماری معنی دار نبود. با این حال، در مطالعه دیگری که توسط بشارت و همکاران در ایران^{۳۷} بر روی ۸۲ زن با سقط مکرر انجام شد؛ کمبود پروتئین C به میزان ۳۰/۵ درصد شیوع داشت. آنتی ترومبین III در ۱۷/۱ درصد و لوپوس در ۸/۵ درصد غیرطبیعی گزارش شدند و کمبود پروتئین S تنها در یک مورد مشاهده شد و FV Leiden در همه موارد طبیعی بود. با توجه به نتایج این مطالعه، سطح پروتئین C و پروتئین S به ترتیب بالاتر و پایین تر یافته های مطالعه حاضر بودند. همچنین آنتی ترومبین III در مطالعه ما برخلاف این مطالعه نرمال بود؛

اما مقدار لوپوس غیرنرمال در هر دو مطالعه تقریباً برابر مشاهده شد. یافته های ما نشان می دهد که کمبود پروتئین C ۱۳ درصد، کمبود پروتئین S ۸/۳ درصد، کمبود هموسیستئین و لوپوس هر کدام ۷/۱ درصد هستند. این در حالی است که کاردیولپین و آنتی ترومبین III غیرطبیعی در جمعیت مورد مطالعه ما مشاهده نشده است. D'Uva و همکاران^{۳۸} از ایتالیا ترومبوفیلی را در ۷۸ درصد موارد با سابقه سقط مکرر و ۱۶ درصد از کنترل ها گزارش کردند و بیان کردند که آنتی ترومبین III غیرطبیعی در جمعیت آنها مشاهده نشده است. این کاملاً با نتایج یافته های مطالعه حاضر سازگار است. تفاوت در نتایج مطالعه ما با مطالعات دیگر می تواند به علت تفاوت در معیارهای جمعیت مورد مطالعه و تعداد گروه ها، زمینه های ژنتیکی و تعریف متفاوت از سقط باشد. به همین منظور برای بررسی دقیق تر این فاکتورها و ارتباط آنها با سقط مکرر جنین و بررسی عوارض نامطلوب بارداری، پیشنهاد می شود تعداد بیشتری بیمار از مناطق مشابه انتخاب و از دیگر فاکتورهای انعقادی، تست های ژنتیک مولکولی، مطالعات کروموزومی و روش هایی همچون تعیین توالی در این زمینه استفاده شود.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که هیچکدام از پلی مورفیسم های مورد بررسی نمی توانند توجیه کننده سقط مکرر در زنان مورد بررسی باشند. بنابراین پیشنهاد می شود در جامعه مورد بررسی از افراد نرمال یا بستگان درجه یک که دارای سابقه سقط نیستند؛ فاکتورهای ژنتیکی مورد ارزیابی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب (کد ۱۱۰۶۷۳) مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی گلستان بود و با حمایت مالی آزمایشگاه کاوش گرگان انجام شد. بین نویسندگان تضاد منافی وجود ندارد.

References

1. Erdem HB, Ceylan AC, Kaya A, Bahsi T, Sever Erdem Z, Sahin İ, 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.
2. Sah AK, Shrestha N, Joshi P, Lakha R, Shrestha S, Sharma L, et al. Association of parental methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T gene polymorphism in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *BMC Res Notes*. 2018 Apr; 11(1): 233. doi: 10.1186/s13104-018-3321-x
3. Turki RF, Assidi M, Banni HA, Zahed HA, Karim S, Schulten HJ, et al. Associations of recurrent miscarriages with chromosomal abnormalities, thrombophilia allelic polymorphisms and/or consanguinity in Saudi Arabia. *BMC Med Genet*. 2016 Oct; 17(Suppl 1): 69. doi: 10.1186/s12881-016-0331-1
4. de Jong PG, Goddijn M, Middeldorp S. Testing for inherited thrombophilia in recurrent miscarriage. *Semin Reprod Med*. 2011 Nov; 29(6): 540-47. doi: 10.1055/s-0031-1293207
5. D'Uva M, Di Micco P, Strina I, De Placido G. Recurrent Pregnancy Loss and Thrombophilia. *J Clin Med Res*. 2010 Feb; 2(1): 18-22. doi: 10.4021/jocmr2010.02.260w
6. Kovalevsky G, Gracia CR, Berlin JA, Sammel MD, Barnhart KT. Evaluation of the association between hereditary thrombophilias and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2004 Mar; 164(5): 558-63. doi: 10.1001/archinte.164.5.558
7. Robertson L, Wu O, Langhorne P, Twaddle S, Clark P, Lowe GDO, et al. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *Br J Haematol*. 2006 Jan; 132(2): 171-96. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05847.x
8. Bauduer F, Lacombe D. Factor V Leiden, prothrombin 20210A, methylenetetrahydrofolate reductase 677T, and population genetics. *Mol Genet Metab*. 2005 Sep-Oct; 86(1-2): 91-99. doi: 10.1016/j.ymgme.2005.04.002

9. Behjati R, Modarressi MH, Jeddi-Tehrani M, Dokoohaki P, Ghasemi J, Zamani AH, et al. Thrombophilic mutations in Iranian patients with infertility and recurrent spontaneous abortion. *Ann Hematol*. 2006 Apr; 85(4): 268-71. doi: 10.1007/s00277-005-0021-0
10. Torabi R, Zarei S, Zeraati H, Zamani AH, Akhondi MM, Hadavi R, et al. Combination of thrombophilic gene polymorphisms as a cause of increased the risk of recurrent pregnancy loss. *J Reprod Infertil*. 2012 Apr; 13(2): 89-94.
11. Pazoki N, Naseri F. The Prevalence of Common Mutations in Thrombophilic Patients in Iranian Population with Recurrent Miscarriage. *International Journal of Medical Laboratory*. 2019; 6(2): 115-23.
12. Khalife S, Bissar-Tadmouri N. Inherited Thrombophilia in a Lebanese Family of Four Generations: A Case Report of Recurrent Miscarriage. *Vasc Health Risk Manag*. 2020 Jan; 16: 53-56. doi: 10.2147/VHRM.S235784
13. Djurovic J, Stojkovic O, Todorovic J, Brajic A, Stankovic S, Obradovic S, et al. Genetics of suspected thrombophilia in Serbian females with infertility, including three cases, homozygous for FII 20210A or FV 1691A mutations. *Hum Fertil (Camb)*. 2017 Jun; 20(2): 132-39. doi: 10.1080/14647273.2016.1255785
14. Slezak R, Łaczmański Ł, Karpiński P, Reszczyńska-Slezak D. [The role of 1691G>A (Leiden) mutation in Factor V gene, 20210G>A in prothrombin gene and 677C>T in MTHFR gene in etiology of early pregnancy loss]. *Ginekol Pol*. 2011 Jun; 82(6): 446-50. [Article in Polish]
15. Yildiz G, Yavuzcan A, Yildiz P, Süer N, Tandoğan N. Inherited thrombophilia with recurrent pregnancy loss in Turkish women--a real phenomenon? *Ginekol Pol*. 2012 Aug; 83(8): 598-603.
16. Ulaş Barut M, Bozkurt M, Kahraman M, Yıldırım E, İmirzalioğlu N, Kubar A, et al. Thrombophilia and Recurrent Pregnancy Loss: The Enigma Continues. *Med Sci Monit*. 2018 Jun; 24: 4288-94. doi: 10.12659/MSM.908832
17. Ozgu Erdinc AS, Yilmaz N, Candemir Z, Yilmaz S, Erkaya S. Factor V H1299R (HR2) heterozygosity: a risk factor for recurrent implantation failure. *Fertility and Sterility*. 2013; 100(3 Supplement): S192. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.07.1395
18. Villani M, Tiscia GL, Margaglione M, Colaizzo D, Fischetti L, Vergura P, Grandone E. Risk of obstetric and thromboembolic complications in family members of women with previous adverse obstetric outcomes carrying common inherited thrombophilias. *J Thromb Haemost*. 2012 Feb; 10(2): 223-28. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04583.x
19. Reddy RRN, Mutreja D, Moorchung N, Mukhopadhyay I. Recurrent pregnancy loss: can factor V Leiden mutations be a cause. *Obstet Gynecol Sci*. 2019 May; 62(3): 179-82. doi: 10.5468/ogs.2019.62.3.179
20. Hwang KR, Choi YM, Kim JJ, Lee SK, Yang KM, Paik EC, et al. Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Risk of Recurrent Pregnancy Loss: a Case-Control Study. *J Korean Med Sci*. 2017 Dec; 32(12): 2029-34. doi: 10.3346/jkms.2017.32.12.2029
21. Bagheri M, Abdi Rad I, Nanbakhsh F. Factor V Leiden G1691A and factor II G20210A point mutations and pregnancy in North-West of Iran. *Arch Gynecol Obstet*. 2011 Nov; 284(5): 1311-15. doi: 10.1007/s00404-011-2008-5
22. Poursadegh Zonouzi A, Chaparzadeh N, Ghorbani S, Mehrzad Sadaghiani M, Farzadi L, Ghasemzadeh A, et al. The association between thrombophilic gene mutations and recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet*. 2013 Oct; 30(10): 1353-59. doi: 10.1007/s10815-013-0071-5
23. Laghaff-Ross J, Paidas MJ, Ku DH, Arkel YS, Lockwood CJ. Inherited thrombophilias and early pregnancy loss. In: Mor G, editor. *Immunology of Pregnancy*. New York: Medical Intelligence Unit. Springer. 2006; pp: 229-343. doi: 10.1007/0-387-34944-8_20
24. Mekaj Y, Lulaj S, Daci F, Rafuna N, Miftari E, Hoxha H, et al. Prevalence and role of antithrombin III, protein C and protein S deficiencies and activated protein C resistance in Kosovo women with recurrent pregnancy loss during the first trimester of pregnancy. *J Hum Reprod Sci*. Oct-Dec 2015; 8(4): 224-29. doi: 10.4103/0974-1208.170407
25. Parand A, Zolghadri J, Nezam M, Afrasiabi A, Haghpanah S, Karimi M. Inherited Thrombophilia and Recurrent Pregnancy Loss. *Iran Red Crescent Med J*. 2013 Dec; 15(12): e13708. doi: 10.5812/ircmj.13708
26. Klai S, Fekih-Mrissa N, Rachdi R, Gritli N. The status of thrombophilic defects and non-O blood group as risk factors for gestational vascular complications among Tunisian women. *Acta Haematol*. 2011; 125(3): 115-20. doi: 10.1159/000321934
27. Besharat M, Tabandeh A, Keshtkar AA, Mobasheri E, Besharat S, Joshaghani HR. Evaluation of Some Plasma Coagulation Factors in Women with Spontaneous Miscarriage. *Int J Fertil Steril*. 2015 Oct-Dec; 9(3): 309-12. doi: 10.22074/ijfs.2015.4545