بررسی ارتباط سه پلی‌مورفیسم فاکتور ۵ انعقادی و سندرم سقط مکرر

راحله ترابی (.M.Sc)[۱]، مهیار استاد کرم‌پور (.M.Sc)[۲]، افسانه محمدزاده (.M.D)[۳]، سهیلا عارفی (.M.D)[۳]، محمد کرامتی‌پور (.M.D., Ph.D)[۴]، سعید زارعی (.M.D)[۲]، حجت زراعتی (.Ph.D)[۵]، محمود جدی‌تهرانی (.Ph.D)[۲]

۱- دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- پژوهشکده آنتی‌بادی مونوکلونال، پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن‌سینا، تهران، ایران

۳- پژوهشکده بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن‌سینا، تهران، ایران

٤- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تهران، تهران، ایران

۵- گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تهران، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: یکی از مهمترین فاکتورهای مطرح در ایجاد ترومبوفیلی در زنان مبتلا به سقط مکرر، پلی‌مورفیسم‌های فاکتور ۵ انعقادی است. ارتباط بین پلی‌مورفیسم FV Leiden و ترومبوفیلی در زنان مبتلا به سقط مکرر، تاکنون در مطالعات بسیاری بررسی و نتایج متفاوت و گاه متناقضی بدست آمده است. دو پلی‌مورفیسم جدید FV A4070G و FV A5279G، که باعث نقص فاکتور۵ انعقادی می‌شوند، کمتر مورد توجه و مطالعه بوده‌اند. این مطالعه به منظور بررسی اثر این سه پلی‌مورفیسم بر میزان افزایش خطر ابتلا به سندرم سقط مکرر در زنان ایرانی انجام شد.

روش بررسی: ۱۰۰ بیمار با حداقل سابقه دو بار سقط، به عنوان گروه بیمار و ۱۰۰ خانم بدون سابقه سقط و با حداقل سابقه دو زایمان موفق، به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. برای بررسی سه پلی‌مورفیسم FV Leiden، FV A4070G و FV A5279G، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) همراه با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده (PCR-RFLP) طراحی شد. به منظور تجزیه و تحلیل آماری از آزمون‌های من- ویتنی، آزمون همبستگی اسپیرمن، مدل رگرسیون لجستیک یک متغیره و چندگانه به روش پس رو استفاده شد.

نتایج: با توجه به نسبت افراد واجد موتاسیون FV Leiden در دو گروه (۱۳٪ در گروه بیماران و ٤٪ در گروه کنترل)، احتمال سقط مکرر در بیماران واجد این پلی‌مورفیسم بیشتر بود (نسبت خطر: ۳/۵۸٦ و ۱/۱۲۷-۱۱/٤۱۲ :CI ۹۵٪). برای پلی‌مورفیسم‌های FV A4070G و FV A5279G به ترتیب ۱٤ نفر (۱٤٪) و ۳۷ نفر (۳۷٪) از افراد گروه بیمار واجد این دو پلی‌مورفیسم بودند. در مقابل از ۱۰۰ فرد گروه کنترل، به ترتیب تنها ٤ نفر (٤٪) پلی‌مورفیسم FV A4070G و ۷ نفر (۷٪) پلی‌مورفیسم A5279G را داشتند. احتمال سقط مکرر در بیماران واجد این دو پلی‌مورفیسم نیز در مقایسه با گروه کنترل بیشتر بود، به ترتیب (نسبت خطر: ۳/۲۷۳ و ۱/۰۱۸-۱۰/۵۲۳ :CI ۹۵٪) و (نسبت خطر: ۷/۸۰۳ و ۳/۲۷۳-۱۸/٦۰۳ : CI ۹۵٪). نسبت افراد دارای دو یا سه موتاسیون در دو گروه بیمار و کنترل نشان داد که بین دو پلی‌مورفیسم FV Leiden و FV A4070G، ارتباط متقابل دیده می‌شود. با بررسی اثر همزمان سه پلی‌مورفیسم بر شانس وقوع سقط مکرر، به کمک آزمون رگرسیون لجستیک چندگانه به روش پس‌رو مشخص شد که با بررسی دو پلی‌مورفیسم FV A4070G و FV A5279G، می‌توان اثر همزمان هر سه موتاسیون را روی شانس وقوع سقط مکرر ارزیابی کرد.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج این مطالعه هر سه پلی‌مورفیسم ژن فاکتور۵ انعقادی با افزایش خطر سقط مکرر همراه است. بین دو پلی‌مورفیسم FV Leiden و FV A4070G، ارتباط متقابل وجود دارد. با بررسی دو پلی‌مورفیسم FV A4070G و FV A5279G، می‌توان اثر همزمان هر سه موتاسیون را روی شانس وقوع سقط مکرر ارزیابی کرد و لذا بررسی وجود این پلی‌مورفیسمها در زنان مبتلا به سقط مکرر توصیه می‌گردد.

کلید واژگان: پلی‌مورفیسم ژنی، ترومبوفیلی، سندرم سقط مکرر خودبخودی، فاکتور ۵ انعقادی، FV A4070G، FV A5279G، FV Leiden.

مسئول مکاتبه: دکتر محمود جدی‌تهرانی، پژوهشکده آنتی‌بادی مونوکلونال، پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا، انتهای بلوار داخل دانشگاه، دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۱۷۷-۱۹٦۱۵.

پست الکترونیک: mahjed@avicenna.ac.ir

دریافت: ۸۷/۸/۵ **پذیرش:** ۸۷/۱۰/۱۹

Downloaded from http://www.jri.ir

زمینه و هدف

سندرم سقط مکرر خودبخودی (RPL)[1] اغلب به صورت دو یا بیش از دو سقط متوالی پیش از هفته ۲۰ بارداری تعریف می‌شود (۱،۲). سقط مکرر بر دو نوع اولیه ثانویه است. در نوع اولیه، بلافاصله چند سقط متوالی رخ می‌دهد ولی در نوع ثانویه، پس از یک بارداری موفق، سقط‌های متوالی آغاز می‌شوند (٤-۱). اغلب از سقط مکرر به عنوان بیماری چند عاملی نام برده می‌شود که یکی از این عوامل، ترومبوز است. به نظر می‌رسد ترومبوز می‌تواند در مویرگ‌های جفت باعث اختلال در روند گردش خون بین مادر و جنین شده و نهایتاً منجر به سقط جنین گردد. از طرف دیگر در طول بارداری، در نتیجه افزایش پیش فاکتورهای انعقادی و کاهش سطح عوامل ضد انعقادی به طور طبیعی حالت پیش انعقادی ایجاد می‌شود (۳،٤). اخیراً با مطالعات صورت گرفته مشخص شده که وجود زمینه ژنتیکی ترومبوفیلی با سقط مکرر ارتباط دارد. ارتباط بین سقط مکرر و ترومبوفیلی، موضوع بسیار بحث برانگیزی است که مطالعات بسیاری روی آن صورت گرفته و نتایج متناقضی در تأیید و رد آن بدست آمده است (۳).

فاکتور ۵ انعقادی، نقشی اساسی در تنظیم هموستاز مسیرهای انعقادی بر عهده دارد. جهش نقطه‌ای G1691A در ژن فاکتور۵ انعقادی که فاکتور ترومبوفیلیک لیدن (FVL)[2] نامیده می‌شود و باعث حذف یک جایگاه شکست در فاکتور ۵ انعقادی شده و در نتیجه با اثر بر عملکرد کمپلکس ترومبیناز، باعث مقاومت فاکتور ۵ انعقادی به پروتئین C فعال شده (APCR)[3] می‌شود (۲۹)، با سقط مکرر ارتباط دارد (۳،۵). پلی‌مورفیسم FV Leiden منجر به افزایش خطر سقط جنین در افراد ناقل این پلی‌مورفیسم تا سه برابر (از ٦ تا ١٦٪) افراد سالم می‌شود (۳). گرچه مطالعات بسیاری افزایش خطر سقط مکرر را در زنان دارای این پلی‌مورفیسم تأیید کرده‌اند (١٦-۵، ۳)، ولی در برخی مطالعات ارتباط این پلی‌مورفیسم با سقط مکرر رد شده است (۲۵-۱۷).

پلی‌مورفیسم His1299Arg فاکتور ۵ انعقادی، که با نام هاپلوتیپ HR2 (R2) نیز شناخته می‌شود، در نتیجه جهش A4070G در ژن فاکتور ۵ انعقادی ایجاد می‌شود. این پلی‌مورفیسم با اثر بر روی کمپلکس ترومبیناز به واسطه افزایش فرمی از فاکتور ۵ انعقادی (FVa1) که به شکل محدودی به فسفولیپید متصل می‌شود، باعث کاهش فعالیت فاکتور ۵ و کاهش غلظت آنتی‌ژن فاکتور ۵ فعال می‌گردد (۳۱-۲٦، ۱۱،۲۳). افراد حامل پلی‌مورفیسم FV A4070G فاکتور ۵ انعقادی دارای APCR و افزایش خطر ترومبوز وریدی هستند. بنابراین، اثر کلی این پلی‌مورفیسم به صورت فاکتور خطر ترومبوتیک است (۳۲،۳۰-۲٦). بین پلی‌مورفیسم FV A4070G با دیگر پلی‌مورفیسم‌های فاکتور ۵ انعقادی، از نظر آماری پیوستگی قابل قبول وجود دارد. در مطالعه‌ای روی بیماران مبتلا به ترومبوز وریدی، مشاهده شد که حاملان پلی‌مورفیسم FV A4070G، از سطح فاکتور ۵ انعقادی در حال گردش کمتری برخوردار هستند (۳۳). افزایش خطر ابتلا به ترومبوز وریدی در افراد حامل این پلی‌مورفیسم، تا ۱/۸ برابر خواهد بود (١٦). با این حال، به طور کلی ارتباط پلی‌مورفیسم FV A4070G با افزایش خطر ابتلا به ترومبوز وریدی و کاهش سطح فاکتور ۵ انعقادی، تأیید نشده است. داشتن پلی‌مورفیسم FV A4070G با APCR و افزایش سطح ایزوفرم ترومبوژنیک فاکتور ۵ انعقادی (FV1) (فاکتور ۵ انعقادی دارای دو ایزوفرم FV1 و FV2 است که متناسب با شرایط، نسبت یکی به دیگری در پلاسما تغییر می‌کند) در پلاسما نیز ارتباط دارد (٢٦). گزارش شده که این پلی‌مورفیسم خطر

1- Recurrent Pregnancy Loss
2- Factor V Leiden
3- Activated protein C resistance

Downloaded from http://www.jri.ir

ترومبوز وریدی را در ناقلان آلل FV Leiden افزایش می‌دهد. در برخی مطالعات دیگر، ارتباطی بین پلی‌مورفیسم FV A4070G و سقط مکرر دیده نشده، ولی مشاهده شده که توارث همزمان پلی‌مورفیسم FV A4070G و FV Leiden می‌تواند باعث افزایش خطر سقط مکرر گردد (۲۳). در تحقیقات دیگری نیز نشان داده شده که هموزیگوت بودن برای پلی‌مورفیسم FV A4070G می‌تواند خطر سقط مکرر را افزایش دهد (۵).

پلی‌مورفیسم جدیدی نیز در دومین A3 در ژن فاکتور۵ انعقادی به نام FV A5279G گزارش شده که باعث جایگزینی اسیدآمینه تیروزین با سیتوزین در جایگاه اسیدآمینه‌ای ۱۷۰۲ می‌شود (۲۹،۳٤). در ناقلان این پلی‌مورفیسم تغییری در بیان mRNA ژن فاکتور v ایجاد نمی‌شود ولی به دلیل این جایگزینی اسید آمینه‌ای، باعث کاهش پایداری پروتئین می‌شود و لذا دارای سطح فاکتور ۵ انعقادی کاهش یافته‌اند (۲۹). کمبود فاکتور ۵ انعقادی به علت این پلی‌مورفیسم، می‌تواند منجر به ایجاد خطر ترومبوتیک در خانواده‌ها گردد (۳۵-۳۳، ۲۹). مطالعاتی وجود دارند که ارتباط این پلی‌مورفیسم را با افزایش خطر ترومبوز و نقص فاکتور ۵ انعقادی و سندرم سقط مکرر تأیید می‌کنند (۲۳،۳۲). ولی به طور کلی، مطالعات بسیار اندکی روی ارتباط دو پلی‌مورفیسم FV A4070G و FV A5279G و سقط مکرر انجام شده است. لذا با توجه به اهمیت و نقش فاکتور ۵ در هموستاز انعقاد خون، اثرات پلی‌مورفیسم‌های آن در افزایش خطر ترومبوز و نیز ارتباط ترمبوز با افزایش احتمال سقط مکرر، در مطالعه حاضر ما ارتباط سه پلی‌مورفیسم فاکتور ۵ انعقادی (FV Leiden، FV A4070G و FV A5279G) را با سقط مکرر بررسی و مورد مطالعه قرار می‌دهیم.

روش بررسی

۱- انتخاب گروه بیماران و گروه کنترل: ۱۰۰ نفر از بین زنان مبتلا به سندرم سقط مکرر خودبخودی (داشتن سابقه حداقل دو یا بیش از دو سقط مکرر) مراجعه‌کننده در سال ۱۳۸۵ به مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری و سقط مکرر ابن‌سینا انتخاب شدند. معیار خروج از مطالعه، وجود ناهنجاری‌های آناتومیک، اختلالات هورمونی، بیماری‌های خودایمنی و عفونت تایید شده دستگاه تناسلی بود. ۱۰۰ خانم بدون سابقه سقط و دارای حداقل دو باروری موفق، به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. سن گروه بیماران بین ٤۵-۲۵ (به طور متوسط ۳۳ سال) و تعداد سقط‌های مکرر بین ٦-۳ (به طور متوسط ٤) بود. در انتخاب گروه کنترل سعی شده است که از نظر مشخصات دموگرافیک با گروه بیمار تفاوت چندانی نداشته باشند. تعداد بارداری‌های موفق افراد این گروه بین ٤-۲ (به طور متوسط ۲) عدد بود. به منظور نمونه‌گیری خون و انجام طرح، از کمیته اخلاق در پژوهش‌های پزشکی پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن‌سینا، مجوز لازم اخذ و از تمام افراد مورد مطالعه، رضایت‌نامه آگاهانه دریافت شد.

۲- بررسی ژنوتیپ: از هر فرد *۵ml* خون در حضور ضد انعقاد EDTA دریافت و استخراج DNA به روش Salting Out با استفاده از پروتئیناز K انجام شد. ابتدا واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) برای هر جفت پرایمر بهینه‌سازی شد (جدول ۱). مواد مؤثره در هر واکنش PCR شامل *۲/۵μl* بافر PCR (10X) (pH=۸/۳)، *۱μl* از هر دو جفت پرایمر (*۱۰μM*)، Taq DNA *۰/۲μl* پلی‌مراز (*۵U/μl*) (Roche, Germany)، dNTP *۱μl* (*۱۰mM*) و DNA *۱μl* بود. برای هر ست پرایمر FV Leiden، FV A4070G و FV A5279G، به ترتیب *٤μl*،*۲μl* و *۱μl*، $MgCl_2$ (*۲۵mM*) در حجم نهایی *۲۵μl*

Downloaded from http://www.jri.ir

استفاده شد. سپس PCR برای هر سه جفت پرایمر برای بررسی سه پلی‌مورفیسم فاکتور ۵، به ترتیب ذیل بر روی نمونه‌های DNA دو گروه بیمار و شاهد انجام شد. پس از دناتوره کردن در ℃ ۹٤ به مدت ۵ دقیقه، قطعات DNA به ترتیب ذیل تکثیر یافتند: برای پلی‌مورفیسم FV Leiden، تعداد ٤۰ سیکل (℃ ۹٤ به مدت ۳۰ ثانیه، ℃ ۵۰/۷ به مدت ۳۰ ثانیه و ℃ ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه)، برای پلی‌مورفیسم FV A4070G، تعداد ۳۵ سیکل (℃ ۹۱ به مدت ۱ دقیقه، ℃ ٦۰ به مدت ۱ دقیقه و ℃ ۷۱ به مدت ۲ دقیقه) و برای پلی‌مورفیسم FV A5279G، تعداد ۳۵ سیکل (℃ ۹٤ به مدت ۳۰ ثانیه، ℃ ٦٤ به مدت ۳۰ ثانیه و ℃ ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه) و به دنبال آنها مرحله طویل‌سازی نهایی، ℃ ۷۲ به مدت ۷ دقیقه انجام شد.

صحت انجام PCR با انجام الکتروفورز برای محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ پس از رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید، زیر نور UV تأیید شد. RFLP بر روی محصولات PCR پرایمرهای سه پلی‌مورفیسم FV G1691A (FV Leiden)، FV A4070G و FV A5279G به ترتیب توسط آنزیم‌های محدودکننده Mnl1، Rsa1 و Acc1 (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) انجام شد. محصول PCR برای پرایمرهای FV Leiden، باندی ۱٤۰bp است که برای آلل نرمال، دو جایگاه شکست و برای آلل جهش یافته، یک جایگاه دارد. پس از RFLP توسط آنزیم Mnl1 (New England Biolabs)، آلل نرمال سه قطعه ٦۹bp، ۳٦bp و ۳۵bp و آلل جهش یافته دو قطعه ٦۹bp و ۷۱bp را ایجاد می‌کنند. در مورد FV A4070G، محصول PCR باندی ۱۵٦۸bp است که پس از RFLP با آنزیم Rsa1 (New England Biolabs)، آلل 4070A، دو باند ۱٤۳۸bp و ۱۳۰bp و آلل 4070G، سه باند ۸٦۲bp، ۵۷٦bp و ۱۳۰bp را ایجاد می‌کند. باند محصول PCR برای FV A5279G نیز ۱۲۰bp بوده که در آلل جهش یافته، جایگاه شکست برای آنزیم Acc1 (New England Biolabs) از بین رفته و بدون شکست باقی می‌ماند؛ در حالی که در آلل طبیعی با ایجاد شکست، دو قطعه ۱۵bp و ۱۰۵bp ایجاد می‌شود. برای بررسی محصولات PCR پس از RFLP، از الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریلامید با رنگ‌آمیزی نیترات نقره برای مقایسه دقیق طول باندها استفاده شد. با توجه به نتایج مشاهده شده بر روی ژل پلی‌آکریلامید، ژنوتیپ هر فرد برای هر پلی‌مورفیسم مشخص شد.

۳- ***بررسی‌های آماری:*** اطلاعات حاصل توسط نرم‌افزار SPSS (Ver.13.0) بررسی شد. چگونگی وقوع این پلی‌مورفیسم به سه حالت نرمال، هتروزیگوت و هموزیگوت در دو گروه بیمار و شاهد با استفاده از آزمون من ــ ویتنی بررسی شد. آزمون همبستگی اسپیرمن نیز برای بررسی امکان وجود ارتباط متقابل بین این سه پلی‌مورفیسم انجام شد. نتایج برای این دو آزمون با $p<۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی گردیدند. جهت بررسی اثر هر پلی‌مورفیسم بر وقوع سقط مکرر، از مدل رگرسیون لجستیک یک متغیره استفاده شد. سپس جهت بررسی اثر همزمان موتاسیونها بر شانس وقوع سقط مکرر، از مدل رگرسیون لجستیک چندگانه به روش پس رو بکار رفت.

نتایج

با توجه به نتایج مشاهده شده بر روی ژل پلی‌آکریلامید، افراد به سه دسته سالم، هتروزیگوت و هموزیگوت برای هر پلی‌مورفیسم تقسیم‌بندی شدند (تصاویر ۳-۱). در گروه بیماران برای سه پلی‌مورفیسم FV Leiden ، FV A4070G و FV A5279G به ترتیب ۱۲، ۱۲ و ۳٦ نفر فرد هتروزیگوت و ۱، ۲ و ۱ فرد هموزیگوت دیده شد. در مقابل در گروه کنترل تنها ٤، ٤ و ۷ فرد هتروزیگوت مشاهده و هیچ فرد هموزیگوتی تشخیص داده نشد. فراوانی افراد واجد هر یک از سه

Downloaded from http://www.jri.ir

جدول۱- بررسی ژنوتیپ برای سه پلی‌مورفیسم فاکتور ٥ انعقادی

پلی‌مورفیسم	توالی پرایمرها	محصول PCR	آنزیم محدودکننده	محصول RFLP
FV Leiden	F-5'-CTT CAA GGACAA AAT ACC TG-3' R-5'-TGC CCA GTG CTT AACAAG ACC A-3'	140bp	Mnl1	(69,36,35) * (71,69) **
FV A4070G	F-5'-TGCTCCTTTATCTCCGAGGACC-3' R-5'-CTCTGGAGGAGTTGATGTTTGTCC-3'	1568bp	Rsal	(1438,130) * (862,576,130)**
FV A5279G	F-5'-CTGTCGGGCTTGGGTCT-3' R-5'-GAAATAACCCCGACTCTTC-3'	120bp	Acc1	(105,15)* (120)**

* آلل نرمال، ** آلل موتانت.

پلی‌مورفیسم با گروه سالم، دارای تفاوت معنی‌داری بوده و هر سه پلی‌مورفیسم با افزایش خطر سندرم سقط مکرر ارتباط دارند: ($p\text{-value}_{FV\ Leiden}$=۰/۰۲۲)، ($p\text{-value}_{FV\ A5279G}$<۰/۰۰۱) و ($p\text{-value}_{FV\ A4070G}$=۰/۰۳٦) (جدول۲).

همچنین با ادغام دو گروه هتروزیگوت و هموزیگوت، گروهی تحت عنوان گروه واجد موتاسیون بدون توجه به نوع موتاسیون، ایجاد شده و با استفاده از مدل لجستیک رگرسیون تک متغیره، به تفکیک هر سه موتاسیون ملاحظه شد که p-value برای هر سه معنی‌دار بوده و شانس وقوع سقط مکرر به علت حضور هر پلی‌مورفیسم محاسبه شد (جدول ۳). محاسبات نشان داد شانس وقوع سقط مکرر در صورت وجود پلی‌مورفیسم FV Leiden، ۳/٥٦ برابر (OR FV Leiden:۳/٥٦, 95% CI: ۱/۱۲۷–۱۱/٤۱۲)، پلی‌مورفیسم FV 4070G ۳/۲۷۳ برابر (OR FV A4070G:۳/۲۷۳,95% CI: ۱/۰۱۸–۱۰/٥۲۳) و پلی‌مورفیسم FV A5279G، ۷/۸۰۳ برابر (۱۸/٦۰۳– ۳/۲۷۳) (OR FV A5279G:۷/۷۸۰۳,95% CI: می‌شود.

از ۱۰۰ فرد بیمار، ۱۰ نفر واجد هر دو موتاسیون FV Leiden و FV A4070G، ٤ نفر دارای دو پلی‌مورفیسم FV Leiden و FV A5279G، ۳ نفر دارای دو پلی‌مورفیسم FV A4070G و FV A5279G و ۳ نفر واجد هر سه موتاسیون بودند. در گروه کنترل تنها ۱ فرد دارای FV Leiden و FV A5279G مشاهده شد. با استفاده از مدل لجستیک چندگانه به روش پس‌رو مشخص شد که در صورت وجود همزمان این سه پلی‌مورفیسم در یک فرد، دو پلی‌مورفیسم FV A4070G (OR:۳/۹۲۸,95% CI:۱/۱۷۷–۱۳/۱۱۱) و FV A5279G (OR:۸/۲٤٦ ،95% CI: ۳/٤۳٦–۱۹/۷۹٤) هر کدام با اثری مجزا باعث افزایش ریسک وقوع سقط مکرر می‌شوند و FV Leiden (به علت ایجاد اثر همراه با FV A4070G) از مدل خارج می‌شود. بدین معنا که شانس وقوع سقط مکرر را می‌توان با ارزیابی دو پلی‌مورفیسم FV A4070G و FV A5279G مشخص کرد.

براساس آزمون همبستگی اسپیرمن، تنها بین دو پلی‌مورفیسم FV Leiden و FV A4070G ارتباط متقابل دیده شد (p< ۰/۰۰۱)

جدول ۲- مقایسه فراوانی سه پلی‌مورفیسم فاکتور٥ انعقادی و ارتباط آنها با سقط مکرر در افراد مبتلا به سقط مکرر (n=۱۰۰) و افراد بدون سقط مکرر (n=۱۰۰)

پلی‌مورفیسم	نرمال		هتروزیگوت		هموزیگوت		p-value*
	نمونه	شاهد	نمونه	شاهد	نمونه	شاهد	
FV Leiden	٪۸۷	٪۹٦	٪۱۲	٪٤	٪۱	۰	۰/۰۲۲
FV A4070G	٪۸٦	٪۹٦	٪۱۲	٪٤	٪۲	۰	۰/۰۳٦
FV A5279G	٪٦۳	٪۹۳	٪۳٦	٪۷	٪۱	۰	< ۰/۰۰۱

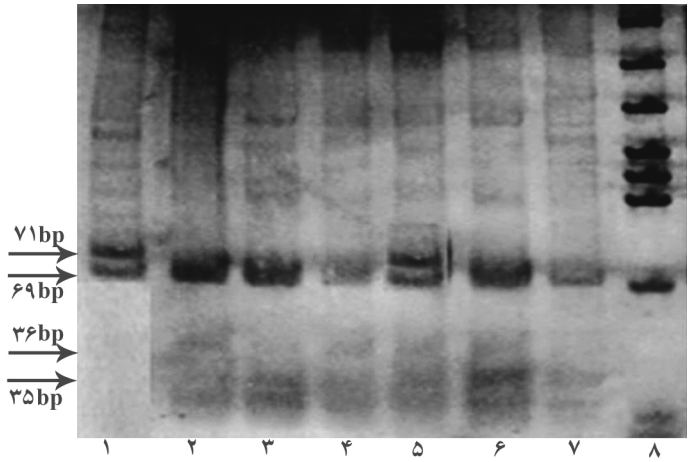
* نتایج حاصل از بررسی داده‌ها به روش من- ویتنی p<۰/۰٥ معنی‌دار تلقی می‌گردد.

جدول۳- شیوع سه پلی‌مورفیسم فاکتور ٥ انعقادی در بیماران مبتلا به سندرم سقط مکرر خودبخودی و گروه شاهد و میزان افزایش شانس وقوع سقط مکرر به واسطه وجود هر یک از پلی‌مورفیسمها در یک فرد و حدود اعتماد آن

پلی‌مورفیسم	مورد		شاهد		p-value*	OR (CI 95%)* (شانس وقوع سقط مکرر)
	تعداد	درصد	تعداد	درصد		
FV Leiden	۱۳	۱۳	٤	٤	<۰/۰٥	۳/٥٦(۱/۱۲۷–۱۱/٤۱۲)
FV A4070G	۱٤	۱٤	٤	٤	<۰/۰٥	۳/۲۷۳(۱/۰۱۸–۱۰/٥۲۳)
FV A5279G	۳۷	۳۷	۷	۷	<۰/۰۰۱	۷/۸۰۳(۳/۲۷۳–۱۸/٦۰۳)

* نتایج حاصل از بررسی داده‌ها به روش مدل رگرسیون لجستیک یک متغیره /۰/۰٥ >p-value معنادار تلقی می‌گردد.

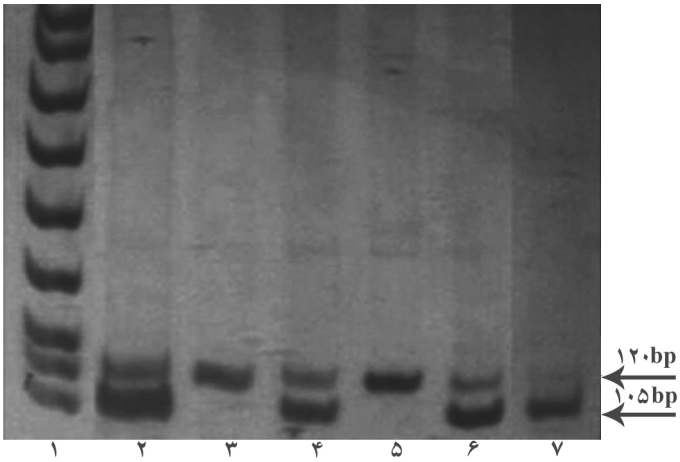
Downloaded from http://www.jri.ir



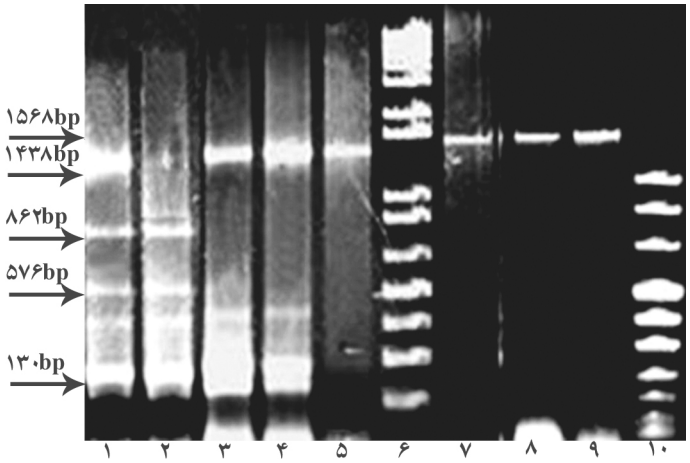
شکل ۱- نتایج الکتروفورز محصولات PCR پس از RFLP برای پلی‌مورفیسم FV Leiden بر روی ژل پلی‌آکریلامید؛ ۱: هموزیگوت (باندهای ۷۱bp و ۶۹)، ۵: هتروزیگوت (باندهای ۷۱bp، ۶۹، ۳۶ و ۳۵)، ٤-۲ و ٦ و۷: سالم (باندهای ۶۹bp، ۳۶ و ۳۵)، ۸: مارکر وزن مولکولی VIII.

بحث

در این مطالعه فراوانی سه پلی‌مورفیسم ژن فاکتور ۵ انعقادی شامل FV G1691A (FV Leiden)، FV A4070G و FV A5279G در زنان ایرانی مبتلا به سندرم سقط مکرر خودبخودی، مورد مطالعه قرار گرفت. این سه پلی‌مورفیسم را عامل نقص در فاکتور ۵ انعقادی و ایجادکننده ترومبوفیلی می‌دانند؛ اما تنها در مورد FV Leiden نتایج مطالعات وسیعی در دسترس است. مطالعات بسیاری وجود دارند که این پلی‌مورفیسم را عامل افزایش خطر سقط مکرر معرفی



شکل۳- نتایج الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی‌مورفیسم FVA4079G بر روی ژل پلی‌آکریلامید؛ ۱: مارکر وزن مولکولی VIII. ۲، ٤ و ٦: هتروزیگوت (باندهای ۱۲۰bp و ۱۰۵)، ۳ و ۵: هموزیگوت (باند ۱۲۰bp)، ۷: سالم (باند ۱۰۵ bp).



شکل ۲- نتایج الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی‌مورفیسم FV A4070G؛ ۱: هتروزیگوت (باندهای bp ۱٤۳۸، ۸٦۲ ، ۵۷٦ و ۱۳۰)، ۲: هموزیگوت (باندهای ۸٦۲bp، ۵۷٦ و ۱۳۰)، ۵-۳: سالم (باندهای ۱٤۳۸bp و ۱۳۰)، ۹-۷: محصول PCR بدون برش آنزیمی (باند ۱۵٦۸bp)، ٦: مارکر وزن مولکولی 1Kb، ۱۰: مارکر وزن مولکولی VIII.

کرده‌اند در حالی که گزارشات دیگری وجود دارند که ارتباط بین این پلی‌مورفیسم و سقط مکرر را نفی کرده‌اند. این اختلاف می‌تواند به علت تفاوتها در معیار انتخاب بیماران و گروه شاهد باشد. Rai و همکاران و نیز Nowak-Gottl و همکاران، با مطالعه روی زنان مبتلا به سقط مکرر، هیچ افزایش فراوانی موتاسیون فاکتور ۵ انعقادی را نسبت به گروه کنترل مشاهده نکردند (۱۹،۲۲). به علاوه، Yamada و همکاران در یافتند که هیچ کدام از ۳۵ زن مبتلا به سقط مکرر مورد مطالعه ناقل موتاسیون FV Leiden نیستند. اخیراً Wramsby و همکاران فراوانی ۱۵/۵٪ موتاسیون FV Leiden را در بین زنان با سه یا بیش از سه سقط قبل از هفته ۲۲ را گزارش کرده‌اند (۷). پس از ارزیابی مقایسه‌ای با خارج کردن دیگر عوامل سقط مکرر، فراوانی آن به ۲۷/۸٪ رسید. قابل ذکر است که Rai و همکاران، فراوانی FV Leiden را با انتخاب ۱۰۰۰ زن مبتلا به سقط مکرر، که تاکنون بزرگترین گروه بیمار مورد مطالعه است، ۳/۳٪ در بین زنان با سقط مکرر در سه ماهه اول و ۳/۹٪ در بین زنان با سقط مکرر در سه ماهه دوم در مقایسه با فراوانی ٤٪ در گروه کنترل را مشاهده کردند. از سوی دیگر، Rai و همکاران با

Downloaded from http://www.jri.ir

ارزیابی نتایج آینده‌نگرانه بارداری‌های درمان نشده ۲۵ زن هتروزیگوت برای آلل FV Leiden و مبتلا به سقط مکرر، در مقایسه با زنانی با همان سابقه بارداری ولی فاقد موتاسیون FV Leiden، مشاهده کرد که نرخ تولد زنده در گروه اول کمتر از گروه دوم است (۳۷/۵٪ در مقابل ۶۹/۳٪). این نتایج نشان می‌دهد که توارث آلل FV Leiden می‌تواند منجر به سقط مکرر شود، به خصوص اگر با ترومبوز جفت همراه باشد (۱۹). Glueck و همکاران نیز فراوانی بالاتر آلل FV Leiden را در بین زنان مبتلا به سقط مکرر گزارش کرد (۱۱/۱٪) (۱۳). همین گروه در مطالعه‌ای از بین ۱۶ بیمار مبتلا به سقط مکرر، در ۱۹٪ آنها پلی‌مورفیسم FV Leiden را مشاهده کردند، در حالی که تنها در ۶٪ از گروه کنترل این پلی‌مورفیسم دیده شد (۱۲). در گزارش دیگری، از ٤٤ زن با سابقه بیش از سه سقط مکرر خودبخودی، ۹ نفر (۲۱/۵٪) دارای پلی‌مورفیسم FV Leiden بودند، در مقابل تنها ۷/٤٪ از افراد گروه کنترل واجد این پلی‌مورفیسم بودند (۳). در مطالعه‌ای دیگر بر روی ٤۹ زن مبتلا به سقط مکرر، مشاهده شد که خطر حداقل دو سقط یا مشکلات باروری دیگر، تا ۲/۲ برابر افزایش می‌یابد (۱۰). در مقابل، در مطالعه‌ای بر روی ۷۱٤ بیمار دارای حداقل دو سقط مکرر، افزایش فراوانی پلی‌مورفیسم FV Leiden در سقط مکرر مشاهده نشد (۳٦). ژن فاکتور ۵ انعقادی به صورت هم غالبی بیان می‌شود. ۹۵-۹۰٪ افراد دارای موتاسیون FV Leiden، هتروزیگوت و باقی هموزیگوت بودند. در مطالعه‌ای در سوئد روی ۳۰٦ فرد دارای این موتاسیون، نشان داده شد که تا سن ۳۳ سالگی ٤۰٪ افراد هموزیگوت دچار عوارض ترومبوتیک شدند، در حالی که این مورد تنها در ۲۰٪ افراد هتروزیگوت دیده شده است. اطلاعات بدست آمده از مطالعات ترومبوفیلی لیدن نشان داده که بیماران FV Leiden، ٦/٦ برابر افراد عادی در معرض خطر ترومبوز بوده و این افزایش خطر، در افراد هموزیگوت به طور محسوسی بیش از افراد هتروزیگوت دیده می‌شود (۳۷،۳۸).

در مطالعه حاضر، فراوانی موتاسیون FV Leiden در بین گروه بیماران ۱۳٪ و در گروه کنترل ٤٪ بود (جدول۲). فراوانی این موتاسیون در مطالعه زینعلی و همکاران در جمعیت ایرانی، ۵/۵٪ گزارش شده است (۳۹) که کمتر از فراوانی این موتاسیون در بین گروه بیماران مطالعه حاضر است. فراوانی ۷/۱٪ و ۱۷٪ برای بیماران مبتلا به سقط مکرر به ترتیب در زنان برزیلی و امریکایی گزارش شده است (۱٦). نتایج مطالعه حاضر که فراوانی ۱۳٪ برای این موتاسیون را نشان داده است، نسبت به مطالعه دیگری که در بین ٦۵ زن مبتلا به سقط مکرر در جمعیت ایرانی انجام شده و نتیجه ۲۰٪ (۱۳ نفر از ٦۵) را مشاهده کرده، کمتر است (۱٦). این تفاوت می‌تواند مربوط به اختلاف در تعداد افراد گروه بیمار مورد مطالعه و نیز تفاوت در معیارهای ورود به مطالعه باشد. با این حال، نتایج حاضر نیز ارتباط بین موتاسیون FV Leiden و سقط مکرر را تأیید می‌کند و نشان می‌دهد در حضور این موتاسیون، خطر ابتلا به سقط مکرر تا ۳/۵٦ برابر بیشتر خواهد شد. تعداد بسیار اندک افراد هموزیگوت مشاهده شده برای این پلی‌مورفیسم در این مطالعه (در گروه بیمار، تنها ۱ نفر بوده و موردی نیز در گروه کنترل دیده نشد) و نیز مطالعات دیگر روی جمعیت ایرانی و بسیاری دیگر از مطالعات در سایر جمعیتها می‌تواند ناشی از عوارض شدید ترومبوتیک حاصل از هموزیگوسیتی برای این پلی‌مورفیسم در مادران و نیز جنین‌های آنان باشد. بدین معنا که به نظر می‌رسد هموزیگوسیتی برای FV Leiden می‌تواند مانع رگزایی صحیح برای جفت شده و لذا باعث سقط زودرس جنین دو یا سه هفته پس از لقاح شود (٤۱،٤۰،۱۳،۹،۵). همچنین گزارشاتی وجود

Downloaded from http://www.jri.ir

دارند که عدم موفقیت IVF را با هموزیگوسیتی برای این پلی‌مورفیسم مرتبط دانسته‌اند (٤٢).

فراوانی پلی‌مورفیسم FV A4070G در بین اقوام مختلف ۱۵/۲-۹/۵٪ گزارش شده است (٤٣). فراوانی این آلل در جمعیت ایتالیایی، ۸٪ ذکر شده است (۲۸). در مطالعه‌ای در لبنان در سال ۲۰۰۵، از ۱۲۵ نفر، ۱۳ نفر (۱۰/٤٪) دارای این آلل بودند که در بین آنها ۱۱ نفر (۸/۸٪) هتروزیگوت و ۲ نفر (۱/٦٪) هموزیگوت بودند. در این مطالعه، فراوانی بالای این موتاسیون در این جمعیت گزارش شد (٢٦). در مطالعه‌ای در بین جمعیت عرب در کشور کویت، درصد فراوانی این آلل در بین بیماران مبتلا، ۱٦/٥٪ بوده و خطر ابتلا به ترومبوز وریدی، ۲/٦۲ برابر نرخ جهانی گزارش شده است. در این مطالعه از ۱۸۸ بیمار، ۳۱ نفر (۱٦/٥٪) و از ۱۰۰ فرد گروه کنترل، ۷ نفر (۷٪) حامل این آلل بودند (٢٦).

Goodman و همکاران و Zammiti و همکاران، در دو مطالعه جداگانه، ارتباط این پلی‌مورفیسم را با سقط مکرر بررسی کردند (p<۰/۰۰۰۱ و p=۰/۸۳) (٥،۱۱). Zammiti و همکاران، گرچه ارتباط وجود این پلی‌مورفیسم را با سقط مکرر رد کرده‌اند؛ ولی ارتباط هموزیگوسیتی آن را با افزایش خطر سقط مکرر پس از ۸ هفته از بارداری را تأیید می‌کنند (p=۰/۰۰۰۲). در مطالعه حاضر، فراوانی ١٤٪ برای پلی‌مورفیسم FV A4070G در بین بیماران و ٤٪ برای گروه شاهد مشاهده شد، که به نتایج مطالعات بالا نزدیک است. براساس نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر، این پلی‌مورفیسم با سقط مکرر ارتباط داشته (p=۰/۰٤۷) و خطر ابتلا به سقط مکرر در حضور این موتاسیون، ۳/۲۷۳ برابر خواهد شد؛ که با نتایج مطالعه Goodman و همکاران همخوانی دارد.

از آن جا که پلی‌مورفیسم FV A5279G، اخیراً گزارش شده است، لذا مطالعات محدودی در مورد ارتباط و نحوه عملکرد و اثر آن بر نقص فاکتور ٥ انعقادی و ترومبوز انجام گرفته است. تحقیقات انگشت‌شماری نیز در مورد ارتباط آن با سقط مکرر وجود دارد؛ بنابراین امکان کمتری برای مقایسه نتایج وجود دارد. به هرحال، در مطالعه‌ای در جمعیت ایتالیایی، ارتباط FV A5279G با افزایش خطر ترومبوز و نقص فاکتور ٥ انعقادی تأیید شده است (٣٤). در این مطالعه، ناقل بودن برای FV A5279G در ۸ بیمار مبتلا به نقص فاکتور ٥، در ١٦ فرد مبتلا به نقص جزئی فاکتور ٥ انعقادی بدون علامت و در ۹ بیمار مبتلا به APCR شبه هموزیگوت بررسی شد. نتیجه بدست آمده نشان داد که FV A5279G یکی از عوامل مهم نقص فاکتور ٥ انعقادی و ترومبوز است (٣٤). در دو مطالعه‌ای که اخیراً انجام شده، ارتباط بین این موتاسیون و سقط مکرر را تأیید نکرده‌اند (٥،۱۱)؛ در حالی که در مطالعه حاضر، فراوانی این موتاسیون ۳۷٪ و افزایش خطر ۷/۸۰۳ برابری بدست آمد که در مقایسه با دو موتاسیون دیگر، بسیار بیشتر بود. این تفاوت می‌تواند ناشی از تفاوت ژنتیکی جمعیت ایرانی با دو جمعیت مورد مطالعه در این دو تحقیق باشد.

با توجه به مطالعات مختلف که روی جمعیت‌های متفاوتی انجام گرفته است و نتایج متفاوتی را در تأیید یا رد ارتباط این سه پلی‌مورفیسم فاکتور ٥ انعقادی با سقط مکرر را گزارش کرده‌اند، ترکیب ژنی زنان ایرانی (ژنوتیپ) هم ممکن است با زنان برخی ملل متفاوت باشد، ولی این مطالعه نشان می‌دهد که ارتباط موتاسیون ژن‌های فاکتور ٥ انعقادی با سقط مکرر در زنان ایرانی نیز مثل برخی از ملل دیگر است (٥،۱۱).

در این دو مطالعه، به طور همزمان این سه پلی‌مورفیسم مورد بررسی قرار گرفته‌اند. Goodman و همکاران، ارتباط دو پلی‌مورفیسم FV Leiden و FV A4070G را با سقط مکرر تأیید کرده‌اند (۱۱)؛ در حالی که Coulam و همکاران، ارتباط هر سه پلی‌مورفیسم را با سقط مکرر رد می‌کنند (۲۳)؛ ولی در عین حال، وجود هر سه

Downloaded from http://www.jri.ir

پلی‌مورفیسم به طور همزمان در یک فرد را بر افزایش خطر سقط مکرر مؤثر نشان داده‌اند (۲۳).

در مطالعه حاضر مشخص شد که احتمالاً به علت وجود همراهی بین دو پلی‌مورفیسم FV Leiden و FV A4070G که در بخش نتایج به آن اشاره شد، این دو پلی‌مورفیسم با هم یک اثر همزمان را بر شانس وقوع سقط مکرر ایجاد می‌کنند. بدین معنا که در صورت وجود همزمان این دو پلی‌مورفیسم در یک فرد، تنها با بررسی پلی‌مورفیسم FV A4070G می‌توان به اثر هر دو پلی‌مورفیسم پی برد. بنابراین وجود هر سه موتاسیون با افزایش خطر وقوع سقط مکرر ارتباط دارد و لذا با بررسی دو موتاسیون FV A4070G و FV A5279G هنوز می‌توان اثر همزمان هر سه موتاسیون فاکتور ۵ انعقادی را بر شانس وقوع سقط مکرر ارزیابی کرد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر، می‌توان گفت که موتاسیون‌های فاکتور۵ انعقادی می‌توانند نقشی مؤثر در افزایش خطر ابتلا به سقط مکرر در زنان ایرانی داشته باشند. بنابراین می‌توان با تأیید حضور این موتاسیونها در زنان ایرانی، احتمال خطر برای سقط مکرر را مشخص کرد. لذا، بررسی این موتاسیونها در زنان ایرانی مبتلا به سندرم سقط مکرر، می‌تواند راهگشا باشد.

تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت مالی پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا براساس مصوبه شماره ۴۳۹۰۱۳ مورخ ۱۳۸٤/۱۰/۱۷ انجام گرفته است. نویسندگان این طرح، از تمامی همکاران پژوهشکده آنتی‌بادی مونوکلونال و مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری و سقط مکرر ابن‌سینا که در اجرای این پروژه و پیشبرد اهداف طرح نقش مؤثر داشته‌اند، کمال تشکر را دارد.

References

1- Tulppala M, Ylikorkala O. Recurrent spontaneous abortion: where do we stand now? Ann Med. 1991; 23(6): 603-4.

2- 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.

3- Glueck CJ, Gogenini S, Munjal J, Tracy T, Pranikoff J, Wang P. Factor V Leiden mutation: a treatable etiology for sporadic and recurrent pregnancy loss. Fertil Steril. 2008; 89(2): 410-6.

4- Baek KH, Lee EJ, Kim YS. Recurrent pregnancy loss: the key potential mechanisms. Trends Mol Med. 2007; 13(7): 310-7.

5- Zammiti W, Mtiraoui N, Mercier E, Abboud N, Saidi S, Mahjoub T, et al. Association of factor V gene polymorphisms (Leiden; Cambridge; Hong Kong and HR2 haplotype) with recurrent idiopathic pregnancy loss in Tunisia. A case-control study. Thromb Haemost. 2006; 95(4): 612-7.

6- Younis JS, Brenner B, Ohel G, Tal J, Lanir N, Ben-Ami M. Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation can be associated with first-as well as second-trimester recurrent pregnancy loss. Am J Reprod Immunol. 2000; 43(1): 31-5.

7- Wramsby ML, Sten-Linder M, Bremme K. Primary habitual abortions are associated with high frequency of factor V Leiden mutation. Fertil Steril. 2000; 74(5): 987-91.

8- Wolf CE, Haubelt H, Pauer HU, Hinney B, Krome-Cesar C, Legler TJ, et al. Recurrent pregnancy loss and its relation to FV Leiden, FII G20210A and polymorphisms of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor. Pathophysiol Haemost Thromb. 2003; 33(3): 134-7.

9- Pauer HU, Voigt-Tschirschwitz T, Hinney B, Burfeind P, Wolf C, Emons G, et al. Analyzes of three common thrombophilic gene mutations in German women with recurrent abortions. Acta Obstet Gynecol Scand. 2003; 82(10): 942-7.

10- Hopmeier P, Puehringer H, van Trotsenburg M,

Downloaded from http://www.jri.ir

recurrent losses. Obstet Gynecol. 2001; 97(4 Suppl 1): S31.

22- Nowak-Göttl U, Sonntag B, Junker R, Cirkel U, von Eckardstein A. Evaluation of lipoprotein(a) and genetic prothrombotic risk factors in patients with recurrent foetal loss. Thromb Haemost. 2000; 83(2): 350-1.

23- Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. Multiple thrombophilic gene mutations rather than specific gene mutations are risk factors for recurrent miscarriage. Am J Reprod Immunol. 2006; 55(5): 360-8.

24-Carp H, Salomon O, Seidman D, Dardik R, Rosenberg N, Inbal A. Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss. Hum Reprod. 2002; 17(6): 1633-7.

25- Alonso A, Soto I, Urgellés MF, Corte JR, Rodríguez MJ, Pinto CR. Acquired and inherited thrombophilia in women with unexplained fetal losses. Am J Obstet Gynecol. 2002; 187(5): 1337-42.

26- Strey RF, Siegemund A, Siegemund T, Schubert C, Schuster G, Wulff K, et al. Influence of factor V HR2 on thrombin generation and clinical manifestation in rare bleeding disorders. Pathophysiol Haemost Thromb. 2005; 34(6): 279-83.

27- Soria JM, Blangero J, Souto JC, Martínez-Sánchez E, Martínez-Marchán E, Coll I, et al. Identification of a large deletion and three novel mutations in exon 13 of the factor V gene in a Spanish family with normal factor V coagulant and anticoagulant properties. Hum Genet. 2002; 111(1): 59-65.

28- Otrock ZK, Taher AT, Shamseddeen WA, Zaatari G, Bazarbachi A, Mahfouz RA. Factor V HR2 haplotype: a risk factor for venous thromboembolism in individuals with absence of Factor V Leiden. Ann Hematol. 2008; 87(12): 1013-6.

29- Castoldi E, Simioni P, Kalafatis M, Lunghi B, Tormene D, Girelli D, et al. Combinations of 4 mutations (FV R506Q, FV H1299R, FV Y1702C, PT 20210G/A) affecting the prothrombinase complex in a thrombophilic family. Blood. 2000; 96(4): 1443-8.

30- Castoldi E, Lunghi B, Mingozzi F, Simioni P, Girolami A, Bernardi F. A highly polymorphic microsatellite in the factor V gene is an informative tool for the study of factor V-related disorders. Br J Haematol. 2001; 114(4): 868-70.

31- Castoldi E, Brugge JM, Nicolaes GA, Girelli D, Tans G, Rosing J. Impaired APC cofactor activity of factor V plays a major role in the APC resistance associated with the factor V Leiden (R506Q) and R2 (H1299R) mutations. Blood. 2004; 103(11): 4173-9.

32- Zammiti W, Mtiraoui N, Mercier E, Abboud N, Saidi S, Mahjoub T, et al. Association of factor V gene polymorphisms (Leiden; Cambridge; Hong Kong and

Atamaniuk J, Oberkanins C, Dossenbach-Glaninger A. Association of endothelial protein C receptor haplotypes, factor V Leiden and recurrent first trimester pregnancy loss. Clin Biochem. 2008; 41(12): 1022-4.

11- 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.

12- Glueck CJ, Wang P, Bornovali S, Goldenberg N, Sieve L. Polycystic ovary syndrome, the G1691A factor V Leiden mutation, and plasminogen activator inhibitor activity: associations with recurrent pregnancy loss. Metabolism. 2003; 52(12): 1627-32.

13- Glueck CJ, Pranikoff J, Aregawi D, Haque M, Zhu B, Tracy T, et al. The factor V Leiden mutation, high factor VIII, and high plasminogen activator inhibitor activity: etiologies for sporadic miscarriage. Metabolism. 2005; 54(10): 1345-9.

14- Foka ZJ, Lambropoulos AF, Saravelos H, Karas GB, Karavida A, Agorastos T, et al. Factor V leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. Hum Reprod. 2000; 15(2): 458-62.

15- Foka ZJ, Lambropoulos AF, Makris PE, Constantinidis TC, Kotsis A. High frequency of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in Greek hemophiliacs. J Thromb Haemost. 2003; 1(5): 1116-7.

16- Behjati R, Modarressi MH, Jeddi-Tehrani M, Dokoohaki P, Ghasemi J, Zarnani AH, et al. Thrombophilic mutations in Iranian patients with infertility and recurrent spontaneous abortion. Ann Hematol. 2006; 85(4): 268-71.

17- Yamada H, Sata F, Saijo Y, Kishi R, Minakami H. Genetic factors in fetal growth restriction and miscarriage. Semin Thromb Hemost. 2005; 31(3): 334-45. Review.

18- Raziel A, Kornberg Y, Friedler S, Schachter M, Sela BA, Ron-El R. Hypercoagulable thrombophilic defects and hyperhomocysteinemia in patients with recurrent pregnancy loss. Am J Reprod Immunol. 2001; 45(2): 65-71.

19- Rai R, Shlebak A, Cohen H, Backos M, Holmes Z, Marriott K, et al. Factor V Leiden and acquired activated protein C resistance among 1000 women with recurrent miscarriage. Hum Reprod. 2001; 16(5):961-5.

20- Pihusch R, Buchholz T, Lohse P, Rübsamen 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.

21- Ozcan T, Rinder HM, Murphy J. Genetic thrombophilia mutations are not increased in patients with

Downloaded from http://www.jri.ir

HR2 haplotype) with recurrent idiopathic pregnancy loss in Tunisia. A case-control study. Thromb Haemost. 2006; 95(4): 612-7.

33- van Wijk R, Nieuwenhuis K, van den Berg M, Huizinga EG, van der Meijden BB, Kraaijenhagen RJ, et al. Five novel mutations in the gene for human blood coagulation factor V associated with type I factor V deficiency. Blood. 2001; 98(2): 358-67.

34- Castoldi E, Lunghi B, Mingozzi F, Muleo G, Redaelli R, Mariani G, et al. A missense mutation (Y1702C) in the coagulation factor V gene is a frequent cause of factor V deficiency in the Italian population. Haematologica. 2001; 86(6): 629-33.

35- Yamakage N, Ikejiri M, Okumura K, Takagi A, Murate T, Matushita T, et al. A case of coagulation factor V deficiency caused by compound heterozygous mutations in the factor V gene. Haemophilia. 2006; 12(2): 172-8.

36- Jivraj S, Rai R, Underwood J, Regan L. Genetic thrombophilic mutations among couples with recurrent miscarriage. Hum Reprod. 2006; 21(5): 1161-5.

37- Zöller B, Svensson PJ, He X, Dahlbäck B. Identification of the same factor V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis-prone families with inherited resistance to activated protein C. J Clin Invest. 1994; 94(6): 2521-4.

38- Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briët E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. Lancet. 1993; 342 (8886-8887): 1503-6.

39- Zeinali S, Duca F, Zarbakhsh B, Tagliabue L, Mannucci PM. Thrombophilic mutations in Iran. Thromb Haemost. 2000; 83(2): 351-2.

40- Zahed LF, Rayes RF, Mahfouz RA, Taher AT, Maarouf HH, Nassar AH. Prevalence of factor V Leiden, prothrombin and methylene tetrahydrofolate reductase mutations in women with adverse pregnancy outcomes in Lebanon. Am J Obstet Gynecol. 2006; 195(4): 1114-8.

41- Murphy RP, Donoghue C, Nallen RJ, D'Mello M, Regan C, Whitehead AS, et al. Prospective evaluation of the risk conferred by factor V Leiden and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in pregnancy. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000; 20(1): 266-70.

42- Azem F, Many A, Ben Ami I, Yovel I, Amit A, Lessing JB, et al. Increased rates of thrombophilia in women with repeated IVF failures. Hum Reprod. 2004; 19(2): 368-70.

43- Castaman G, Faioni EM, Tosetto A, Bernardi F. The factor V HR2 haplotype and the risk of venous thrombosis: a meta-analysis. Haematologica. 2003; 88(10): 1182-9.

44- Yamada H, Kato EH, Kobashi G, Ebina Y, Shimada S, Morikawa M, et al. Recurrent pregnancy loss: etiology of thrombophilia. Semin Thromb Hemost. 2001; 27(2): 121-9. Review.

Downloaded from http://www.jri.ir