

بررسی ارتباط میان پلی مورفیسم $497A>G$ در ژن $FCGR2A$ با سقط مکرر در زنان نابارور

چکیده

دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۱۹ ویرایش: ۱۳۹۵/۱۱/۲۱ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۲۹ آنلاین: ۱۳۹۵/۱۱/۳۰

زمینه و هدف: یکی از عوامل خطرآفرین در بروز سقط، ایجاد التهاب و کاهش ایمنی جنین در نتیجه جهش در پلی مورفیسم ژن $FCGR2A$ می‌باشد. این گیرنده تنها گیرنده‌ای است که قادر به میان‌کنش با آنتی‌بادی‌های $IgG2$ می‌باشد و تنها راه انتقال این ایمونوگلوبولین از مادر به گردش خون جنین اتصال آن به کلاس‌های $Fc\gamma R$ (Fcgamma receptor) می‌باشد که توسط ژن $FCGR2A$ کد می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم $R/H131$ در ژن $FCGR2A$ با خطر ابتلا به سقط مکرر در زنان نابارور می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه مورد-شاهدی، فراوانی پلی مورفیسم $R/H131$ در ژن $Fc\gamma R1A$ (Fcgamma receptor) در ۱۵۰ زن با سابقه سقط مکرر با داشتن کاریوتاپ نرمال و مقایسه آن‌ها با ۱۵۰ زن سالم بدون سابقه سقط و داشتن فرزند مراجعه‌کننده به مرکز ناباروری پژوهشگاه رویان در شهر تهران در اسفند ۱۳۹۳ تا شهریور ۱۳۹۴ صورت گرفت. پس از استخراج DNA ژنومی از لکوسیت‌های خون محیطی، بررسی پلی مورفیسم به روش Amplification refractory mutation system-polymerase chain (ARMS-PCR) صورت گرفت.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AG و GG پلی مورفیسم $R/H131$ در ژن $FCGR2A$ در بیماران به ترتیب ۳/۳۱، ۷/۵۴ و ۱۴٪ و در گروه کنترل به ترتیب ۳/۲۷، ۲/۴۹ و ۵/۲۳٪ بود. ارتباط معناداری بین پلی مورفیسم این ژن و خطر ابتلا به سقط در این جمعیت مورد مطالعه وجود نداشت ($P=0/11$)، همچنین تفاوتی میان سن زنان شرکت‌کننده در هر دو گروه بیمار و کنترل مشاهده نشد ($P=0/083$).

نتیجه‌گیری: ارتباط معناداری بین پلی مورفیسم $R/H131$ با سقط مکرر در زنان نابارور در جمعیت مورد مطالعه مشاهده نشد.

کلمات کلیدی: سقط مکرر، ژن $FCGR2A$ ، پلی مورفیسم $R/H131$ ، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.

زهرا مفیدی منش^۱

خدیجه عنصری^{۱*}

آناهیتا محسنی میبیدی^۲

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران.

۲- گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تلفن: ۰۲۱-۵۶۳۳۰۵۳

E-mail: onsoy@gmail.com

مقدمه

که منجر به بروز مشکلات جسمی، روحی و تحمیل هزینه‌های اقتصادی بر فرد مبتلا و جامعه می‌شود.^۱

با توجه به شیوع سقط مکرر در سطح جهانی، مطالعات گوناگونی به منظور شناسایی عوامل مستعدکننده ابتلا به این بیماری انجام یافته است. اگرچه تاکنون علت مشخصی برای این بیماری یافت نشده است، با این حال نتایج به‌دست‌آمده نشان از تأثیر غیرقابل انکار مجموعه‌ای از عوامل محیطی همچون سن، مصرف دخانیات، الکل، عوامل ایمونولوژیک و اندوکراین مانند اختلالات انعقادی، نقص‌های

شایع‌ترین عارضه در سه ماهه اول و دوم حاملگی، سقط جنین است که بر اساس تعریف رایج شده توسط سازمان بهداشت جهانی به از دست دادن جنین یا رویان تا وزن g ۱۵۰، پیش از هفته ۲۲ بارداری گفته می‌شود. در این میان، زنانی که بیش از دو بار سقط جنین پی‌درپی را تجربه می‌کنند، دچار سقط مکرر هستند.^۱ این بیماری، یکی از مهمترین بیماری‌های ناتوان‌کننده در زنان به‌شمار می‌رود

اندومتریال و یا اختلالات غدد درون‌ریز و در نهایت عوامل ژنتیکی در بروز سقط مکرر می‌باشند.^۳

از میان عوامل بالا، تاکنون مطالعات گوناگونی در زمینه شناسایی عوامل ژنتیکی موثر بر بروز این بیماری انجام گرفته است. یافته‌ها حاکی از آن است که سقط مکرر یک بیماری پلی‌ژنیک بوده و خطر ابتلا به آن با انواع لوکوس‌های متعدد ژنی با اندازه اثر کم تعیین می‌شود. این امر بدان معناست که هر یک از لوکوس‌های ژنی شناخته‌شده مرتبط با این بیماری تنها می‌تواند دارای یک اثر کوچک جمع‌شونده بر روی خطر کلی ابتلا به بیماری داشته باشند و به‌تنهایی نمی‌توانند به‌طور مستقیم منجر به بروز بیماری شوند.^۵

از این‌رو، در سالیان اخیر مطالعات گوناگونی به‌منظور شناسایی ژن‌ها و تغییرات ژنتیکی مرتبط با بروز این بیماری در جمعیت‌های گوناگون انجام یافته است. نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش‌ها نمایان‌گر نقش کلیدی ژن‌های مرتبط با التهاب، ژن‌های سیستم آنتی‌ژن‌های لوکوسیت انسانی، ژن‌های آنزیم‌های متابولیک، ژن‌های آنزیم‌های سم‌زدایی فاز ۱ و ۲، ژن‌های مولکول‌های چسبندگی، ژن‌های ماتریکس متالوپروتیناز، ژن‌های فاکتورهای رشد، مسیرهای سیگنالینگ سایتوکین‌ها، ژن‌های درگیر در آپوپتوزیس، تنظیم چرخه سلولی و انکوژن‌ها، ژن‌های گیرنده‌های هورمونی و نیز ژن‌های تنظیم‌کننده سیستم ایمنی به‌عنوان مهمترین ژن‌های کاندید شناخته‌شده مرتبط با بروز این بیماری می‌باشند.^{۶-۸}

از جمله مهمترین ژن‌های تنظیم‌کننده سیستم ایمنی، می‌توان به ژن *FCGR2A* اشاره نمود که به‌عنوان یکی از ژن‌های کاندید مرتبط با طیف وسیعی از سرطان‌ها و از جمله سقط مکرر به‌شمار آورد. یافته‌های انتشاریافته نشان می‌دهند که برخلاف بسیاری از ژن‌ها که جهش‌های ژنتیکی هیچ اثر عملکردی بر روی بروز بیماری ندارند، ژن *FCGR2A* تفاوت‌های عملکردی مشخصی را بین آلوتایپ‌های مختلف همچون H131 و R131 از خود نشان داده و با برخی از بیماری‌های عفونی و خودایمنی مرتبط می‌باشد.^۹

بر اساس مطالعات انجام‌یافته، *FCGR2A* (Fc Fragment of IgG Receptor IIa) تنها گیرنده‌ای است که توانمند به میان‌کنش با آنتی‌بادی‌های IgG2 به‌عنوان ایزوتایپ اصلی ایمونوگلوبولین می‌باشد.^{۱۰} این آنتی‌بادی به‌وسیله سیستم ایمنی انسان در پاسخ به آنتی‌ژن‌های پلی‌ساکاریدی باکتری‌ها تولید می‌شود. آنتی‌بادی‌های IgG برای فعال

شدن و انتقال به گردش خون جنینی نیاز به اتصال با Fc gamma receptors (FCGRs) دارند. بدین‌ترتیب گیرنده *FCGR2A* در کنار IgG2 نقشی اساسی در بیگانه‌خواری باکتری‌های اسپونیزه ایفا می‌کند.^{۱۱} از این‌رو بروز هر گونه تغییر در ساختار ژن بیان‌کننده گیرنده *FCGR2A* همچون پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی، می‌تواند منجر به تغییر در میل ترکیبی این گیرنده با آنتی‌بادی‌های IgG2 شود. به‌عبارت دیگر ایجاد شکل‌های گوناگون در ژن‌های گیرنده FC موجب عدم انتقال IgG2 به خون جنین شده و در نهایت موجب پایین آمدن سطح ایمنی جنین در مقابل عوامل خارجی می‌گردد. این امر علاوه بر آن‌که موجب افزایش غیریکخوانی در این گیرنده‌ها می‌شود، در عین حال می‌تواند مولکول‌هایی را پدید آورد که عملکرد آن‌ها با مولکول‌های اصلی متفاوت بوده، و بدین‌ترتیب منجر به افزایش استعداد ابتلا به برخی بیماری‌های عفونی در افراد دارای آن شکل آلی خاص شود.^{۱۲}

نتایج به‌دست‌آمده در این زمینه نشان می‌دهند که جایگزینی اسید آمینه آرژنین با اسید آمینه هیستیدین در جایگاه ۱۳۱ زنجیره پلی‌پپتیدی، سبب ایجاد دو فرم متفاوت آلی از این گیرنده با نام‌های H131 و R131 می‌شود. یافته‌ها حاکی از آن نکته است که آلل H131 در مقایسه با آلل R131 دارای میل ترکیبی بیشتری با IgG2 بوده و به نحوی موثرتر به آن متصل می‌شود. از سوی دیگر آلل هیستیدین در موقعیت ۱۳۱ به‌واسطه میل ترکیبی زیاد با IgG2 می‌تواند موجب تسهیل بیگانه‌خواری و در نهایت پاکسازی موثر عوامل عفونی گردد.^{۱۳}

با توجه به مطالب گفته‌شده و با تاکید بر نقش و اهمیت گیرنده *FCGR2A* در تنظیم سیستم ایمنی بدن در برابر بسیاری از بیماری‌ها به‌ویژه بیماری‌های دارای منشای باکتریایی، مطالعه کنونی با هدف بررسی ارتباط میان پلی‌مورفیسم R/H131 ژن *FCGR2A* با سقط مکرر در جمعیت زنان ایرانی انجام شد.^{۱۴}

روش بررسی

پژوهش کنونی در قالب یک مطالعه مورد-شاهدی متشکل از ۱۵۰ زن با سابقه حداقل دو بار سقط مکرر و یا بیشتر به‌عنوان گروه مورد و گروه کنترل شامل ۱۵۰ زن سالم بدون هر گونه سابقه سقط و

به‌عنوان کنترل داخلی در حجم نهایی $15 \mu\text{l}$ تهیه شد. شرایط انجام واکنش تکثیر شامل مرحله واسرشت اولیه در دمای 95°C به مدت پنج دقیقه مرحله واسرشت در دمای 95°C به مدت 30 ثانیه مرحله اتصال در دمای 58°C به مدت 30 ثانیه مرحله تکثیر در دمای 72°C به مدت 30 ثانیه و مرحله تکثیر نهایی در دمای 72°C به مدت 10 دقیقه بود. در نهایت محصولات PCR بر روی ژل آگارز $1/10\%$ استفاده شد.

به‌منظور بررسی برقراری Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) برای فراوانی ژنوتیپ‌ها و نیز مقایسه فراوانی آلی و ژنوتیپی در دو گروه مورد و شاهد، از Chi-square test استفاده شد. همچنین برای بررسی توزیع سنی در دو گروه از آزمون One-sample Kolmogorov-Smirnov، از Independent sample t-test به‌منظور بررسی اختلاف توزیع سنی در دو گروه مورد و شاهد و از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) جهت بررسی سن بر مبنای تعداد سقط استفاده شد. داده‌ها توسط SPSS software, version 18 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) مورد آنالیز قرار گرفت و سطح معناداری برای تمامی آزمون‌ها $0/05$ در نظر گرفته شد. محصولات PCR که بر روی ژل Single-strand conformation polymorphism (SSCP) باند نرمال نشان دادند و یا دچار تغییر الگو بودند به‌طور مستقیم توسط QIAquick PCR purification kit (Qiagen GmbH, Hamburg, Germany) خالص شدند. سپس توالی‌یابی آن‌ها با استفاده از BigDye Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, CA) انجام شد.

یافته‌ها

محدوده سنی در بیماران از 21 تا 39 سال با میانگین سنی $29/89 \pm 4$ (سال و محدوده سنی در گروه کنترل از 21 تا 40 سال با میانگین سنی $29/48 \pm 5$) سال می‌باشد. نتایج به‌دست‌آمده نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنادار در میانگین سنی دو گروه مورد و شاهد بود ($P=0/46$).

در ادامه آنالیزهای انجام‌یافته، توزیع سن به تفکیک تعداد سقط مورد بررسی قرار گرفت. بر این اساس شرکت‌کنندگان در گروه مورد بر اساس تعداد سقط به چهار گروه طبقه‌بندی شدند. در نخستین

داشتن حداقل یک فرزند به‌عنوان گروه شاهد انجام پذیرفت. حجم نمونه مورد نیاز با استفاده از فرمول برآورد نسبت‌ها محاسبه گردید که در آن شیوع بیماری 3% ، ضریب اطمینان 95% و بیشترین میزان خطا 5% در نظر گرفته شد.

شرکت‌کنندگان گروه مورد از میان افراد مراجعه‌کننده به مرکز ناباروری پژوهشگاه رویان در شهر تهران در اسفند 1393 تا شهریور 1394 انتخاب شدند. معیارهای ورود به مطالعه عبارت بودند از داشتن حداقل سن 20 سال و حداکثر سن 40 سال، سابقه‌ی حداقل دو بار سقط مکرر و یا بیشتر، کاریوتایپ نرمال و بدون نقص در نقشه کروموزومی، آناتومی رحم نرمال، میزان LH، FSH و هورمون‌های تیرویدی نرمال. از سوی دیگر شرکت‌کنندگان گروه شاهد نیز از میان مراجعه‌کنندگان به سایر بخش‌های پژوهشگاه رویان با شرط دارا بودن سن بین 20 تا 40 سال، نداشتن سابقه سقط، عدم سابقه خانوادگی سقط در خویشاوندان و نیز دارا بودن حداقل یک فرزند سالم انتخاب شدند. از همه شرکت‌کنندگان در این پژوهش رضایت‌نامه کتبی دریافت شد. خون محیطی در لوله‌های حاوی EDTA گردآوری شد و پس از استخراج DNA از لکوسیت‌ها به‌روش نمک اشباع شده، استخراج و کیفیت‌سنجی DNA با استفاده از NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) انجام پذیرفت. سپس از روش Amplification refractory mutation system-polymerase chain (ARMS-PCR) به‌منظور تعیین ژنوتیپی مورفیسم rs1801274 استفاده شد.

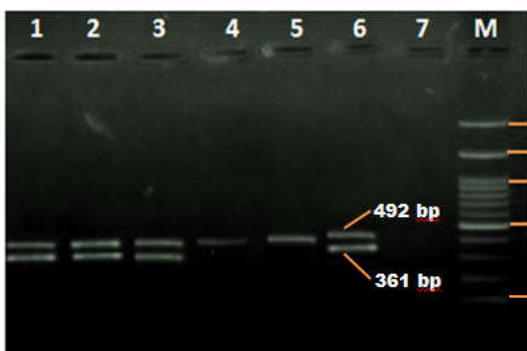
جهت طراحی پرایمرهای مورد نیاز، ابتدا توالی ژنی ناحیه مورد نظر از سایت NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) به‌دست آمد. پس از آن پرایمرهای مناسب توسط NCBI Primer-Blast Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) طراحی شدند. سپس ساختار هر یک از پرایمرهای طراحی‌شده به‌منظور اطمینان از اختصاصی بودن آن‌ها توسط Gene Runner Software, version 6.0.28 (Hasting Software Inc., Las Vegas, NV, USA) مورد بررسی دوباره قرار گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است.

پس از این مرحله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، برای آغازگرها بهینه‌سازی شد. در پایان برای هر نمونه، دو تیوپ حاوی پرایمرهای نرمال و موتانت به‌صورت مجزا به‌همراه یک جفت پرایمر

به ترتیب ۳/۲۷٪، ۲/۴۹٪ و ۵/۲۳٪ می باشد. نتایج به دست آمده نشان از آن نکته بود که ژنوتیپ AG دارای بیشترین فراوانی در هر دو گروه مورد و شاهد می باشد (به ترتیب ۷/۵۴٪ و ۲/۴۹٪). از سوی دیگر یافته ها حاکی از عدم وجود اختلاف معنادار میان فراوانی ژنوتیپی پلی مورفیسم R/H131 در دو گروه مورد و شاهد بود ($P=0/11$).

یافته های به دست آمده نشان می داد که شانس ابتلا به سقط مکرر در افراد دارای ژنوتیپ AG که تنها حامل یک آلل ریسک می باشند به میزان ۱/۸۴ برابر، در مقایسه با افراد هموزیگوت نرمال (GG) افزایش می یابد ($OR=1/84$ ، $95\% CI: 0/98-3/45$ ، $P=0/054$).

از سوی دیگر نتایج آنالیز انجام شده نشان می داد که شانس ابتلا به سقط مکرر در زنان دارای ژنوتیپ هموزیگوت موتانت (ژنوتیپ AA) در مقایسه با افراد هموزیگوت نرمال (GG) به میزان ۹۱٪ افزایش می یابد ($OR=1/91$ ، $95\% CI: 0/96-3/78$ ، $P=0/06$). با این حال نتایج به دست آمده نشان می داد که این میزان افزایش شانس ابتلا به سقط مکرر در هیچ یک از دو گروه افراد دارای ژنوتیپ هتروزیگوت (AG) و یا هموزیگوت موتانت (AA) در مقایسه با زنان ژنوتیپ GG معنادار نبوده و تنها به نمونه آماری مورد بررسی در این پژوهش قابل استناد می باشد.



شکل ۱: الکتروفورز محصولات ARMS-PCR با طول قطعه ۳۶۱ جفت باز حاصل تکثیر اختصاصی پلی مورفیسم R/H131 بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ ردیف ۱ و ۲: فرد هتروزیگوس (AG)، ردیف ۳ و ۴: فرد هموزیگوس نرمال (GG)، ردیف ۵ و ۶: فرد هموزیگوس موتانت (AA)، ردیف ۷: کنترل منفی و M: مارکر ۱۰۰ bp

گروه که کمترین میزان سقط (دو بار) در مقایسه با سایر گروه های تحت مطالعه را به خود اختصاص می داد، میانگین سنی ۳۰ سال با انحراف معیار ۴/۷۹ مشاهده شد. این در حالی بود که با افزایش تعداد سقط به چهار و پنج تکرار، میانگین سنی به تدریج افزایش یافت (به ترتیب ۳۱/۱۶ و ۳۲/۱۶ سال).

سپس به منظور بررسی وجود ارتباط معنادار میان سن و تعداد سقط در گروه های چهارگانه تعریف شده، از آزمون One-way ANOVA استفاده شد. یافته های به دست آمده نشان از نبود اختلاف معنادار میان تعداد سقط و سن شرکت کنندگان در این پژوهش بود. این نتایج بدان معنا است که کاهش و یا افزایش سن تاثیری در کاهش و یا افزایش تعداد سقط نخواهد داشت ($P=0/142$).

در ادامه، پس از انجام PCR به روش ARMS-PCR، مشاهده قطعه ای به طول ۳۶۱ جفت باز بیانگر حضور آلل A و G بود که بر مبنای آن ژنوتیپ هر فرد تعیین شد. از سوی دیگر مشاهده قطعه ای به طول ۴۹۲ جفت باز به عنوان قطعه کنترل نشان دهنده انجام واکنش PCR و نشان دهنده درستی نتایج به دست آمده بود (شکل ۱).

پس از تعیین ژنوتیپ و با توجه به یافته های به دست آمده، توزیع ژنوتیپی پلی مورفیسم R/H131 در هر دو گروه بیمار و کنترل به تعیین تبعیت از HWE مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان می داد که توزیع ژنوتیپی در هر دو گروه بیمار ($P=0/11$) و کنترل ($P=0/89$) از HWE پیروی می کند.

در ادامه، بررسی توزیع فراوانی آللی در هر دو گروه بیمار و کنترل نشان می دهد که آلل A دارای بیشترین فراوانی در هر دو گروه بیمار (۵۸/۷٪) و گروه کنترل (۵۲٪) می باشد. از سوی دیگر نتایج به دست آمده نشان می داد که فراوانی آللی در دو گروه مورد و شاهد دارای تفاوت معنادار نمی باشد ($P=0/10$).

افزون بر این نتایج به دست آمده حاکی از آن نکته بود که بودن آلل A به عنوان آلل ریسک می تواند شانس ابتلا به سقط را در افراد حامل این آلل به میزان ۱/۳۱ برابر در مقایسه با افراد فاقد این آلل افزایش دهد ($OR= 1/31$). اگرچه نتیجه به دست آمده در این زمینه معنادار نبوده و تنها منحصر به نمونه مورد بررسی در این پژوهش می باشد ($P=0/10$ ، $95\% CI: 0/94-1/80$) (جدول ۲).

بر مبنای یافته های به دست آمده فراوانی ژنوتیپ های AA، AG و GG در گروه مورد به ترتیب ۳/۳۱٪، ۷/۵۴٪ و ۱۴٪ و در گروه شاهد

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر پلی مورفیسم $R/H131$ ژن $FCGR2A$

نام پرایمر	توالی (۵'–۳')	Tm	تعداد باز (bp)
Common Forward	ACAACAGCCTGACTACCTATTACCTT	۵۹/۸	۲۶
Common Reverse	CATATTTGTGTCTTTCAGAATGGC	۵۸/۳	۲۴
Normal	GGAACATCCCAGAAATTCTCAC	۵۸/۶	۲۳
Mutant	GAACATCCCAGAAATTCTCACG	۵۸/۱	۲۲

جدول ۲: مقایسه فراوانی آللی در دو گروه مورد و شاهد و شانس ابتلا به سقط مکرر

آلل	گروه تحت مطالعه			کل	شاهد	مورد
	P	95% CI	OR*			
G		رفرنس		۲۶۴	۱۴۴ (%۴۸)	۱۲۴ (%۴۱/۳)
A	۰/۱۰	۰/۹۴–۱/۸۰	۳۱/۱	۳۳۶	۱۵۶ (%۵۲)	۱۷۶ (%۵۸/۷)
مجموع				۶۰۰	۳۰۰	۳۰۰

Logistic regression, $P<0/05$ OR: Odds Ratio .CI: Confidence Interval. در نظر گرفته شد.

جدول ۳: مقایسه فراوانی ژنوتیپی در دو گروه مورد و شاهد و شانس ابتلا به سقط مکرر

ژنوتیپ	گروه تحت مطالعه			کل	شاهد	مورد
	P	95% CI	OR*			
GG		رفرنس		۵۶	۳۵ (%۲۲/۳)	۲۱ (%۱۴)
AG	۰/۰۵	۰/۹۸–۳/۴۵	۱/۸۴	۱۵۶	۷۴ (%۴۹/۳)	۸۲ (%۵۴/۷)
AA	۰/۰۶	۰/۹۶–۳/۷۸	۱/۹۱	۸۸	۴۱ (%۲۷/۳)	۴۷ (%۳۱/۳)
مجموع			۳۰	۳۰۰	۱۵۰	۱۵۰

داده‌های جدول بر اساس تعداد (درصد) گزارش شده‌اند. آزمون آماری مورد استفاده: Chi-square test

بحث

در دوران سیکل قاعدگی و در هنگام حاملگی دچار تغییرات چشمگیری می‌شوند که این امر به نوبه خود نشان‌دهنده نقش آن‌ها در سیکل باروری می‌باشد.^{۱۵}

با توجه به نقش اختلالات ایمنی در بروز سقط مکرر، در یک دهه گذشته ایمونولوژیست‌ها سعی بر شناخت هر چه بیشتر ارتباط

اختلالات ایمنی به‌عنوان مهمترین عامل از دست دادن جنین در سقط مکرر به‌شمار می‌روند. بر این اساس گزارشات جدید نشان می‌دهند، سلول‌های ایمنی اندومتریم رحمی به‌ویژه سلول‌های NK

در جمعیت ایرانی انجام می‌پذیرد بلکه بررسی مستندات موجود نشان می‌دهد که در سایر جمعیت‌ها و نژادها نیز پژوهشی در این زمینه انجام نگرفته است. اگرچه بررسی ارتباط میان این پلی‌مورفیسم و برخی دیگر از بیماری‌ها همچون سرطان معده، سندروم شوگرن، کوازاکی و گریوز نشان می‌دهند که حضور آلل خطر این پلی‌مورفیسم می‌تواند خطر ابتلا به بیماری‌های بالا را در افراد حامل این آلل در مقایسه با افراد بدون آن به طرز معناداری افزایش دهد.

به‌عنوان نمونه، نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش، یافته‌های به‌دست‌آمده از پژوهش انجام‌یافته توسط Castellano و همکارانش را مورد تایید قرار می‌داد.^{۱۹} در این پژوهش، آن‌ها به بررسی شکل‌های گوناگون FCGR2A در دفاع بر ضد سایر باکتری‌های کپسول‌دار همچون استرپتوکوک گروه B پرداختند. نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌داد که ژنوتیپ H/H131 ممکن است نقش حفاظتی در عفونت‌های مننگوکوکی داشته باشد.^{۲۱} نتایج این پژوهش نشان می‌داد که در حضور ژنوتیپ H/H131، ایمونوگلوبولین‌های IgG1، IgG2 و IgG3 قادر به فعال کردن پاسخ‌های ایمنی از طریق مولکول FCGR2A می‌باشند که در این فرآیند بودن آلل H131 برای فعال‌سازی موثر ایمنی سلولی از طریق این مکانیسم ضروری می‌باشد.

نکته با اهمیت در این میان وجود تفاوت چشمگیر در فراوانی آلل شایع این پلی‌مورفیسم در جمعیت آسیایی در مقایسه با سایر جمعیت‌ها است به‌نحوی که این فراوانی در جمعیت آسیایی در حدود ۷۲٪ بوده که در مقایسه با فراوانی ۵۵٪ آن در جمعیت آمریکایی قابل ملاحظه می‌باشد به‌نحوی که فراوانی آن در نژاد ژاپنی در حدود ۸۱٪ و در نژاد چینی ۶۷٪ می‌باشد.^{۲۰}

در مطالعه‌ای مشابه نتایج به‌دست‌آمده توسط Kuwano و همکارانش نشان از میل ترکیبی بالای IgG2 با سلول‌های دارای FCGR2A-H/H131 داشت که این امر خود بیانگر نقش حفاظتی آلل می‌باشد. شواهد به‌دست‌آمده نشان می‌داد که حضور آلل H131 برای عملکرد موثر IgG2 به‌منظور حفاظت از عفونت باکتری‌های کپسول‌دار مانند *نایسریا منترتیبیدیس*، *استرپتوکوکوس نومونیا* و *هموفیلوس آنفولانزا* ضروری می‌باشد.^{۲۱}

در مطالعه‌ای دیگر Yuan و همکارانش به بررسی عملکرد و سطح بیان گیرنده FCG‌های سطح مونوسیت‌ها در طول بارداری پرداختند. نتایج نشان داد که سطح بیان FCGR1 (CD64) و FCGR2 (CD32) در طول بارداری به‌شکل پیش‌رونده‌ای افزایش پیدا می‌کند،

میان شکست تولیدمثل و از جمله سقط مکرر و نازایی با زمینه‌های ایمونولوژیکی داشته‌اند. این پژوهش‌ها با هدف تعیین خطر فاکتورهای مرتبط با سقط و به‌منظور اتخاذ روش‌های درمانی کارآمدتر برای گروه‌های دارای خطر بالا انجام پذیرفته است.^{۱۶} در این میان مطالعه نقش عوامل ژنتیکی و چندشکلی‌های گوناگون ژنی در بروز سقط، به‌ویژه چگونگی اثر این عوامل در استعداد ابتلا به سقط مکرر و پیشرفت مراحل بیماری بخش مهمی از پژوهش‌های انجام‌یافته در این حوزه را به خود اختصاص داده است.^{۱۷}

در این راستا امروزه انجام مطالعات همبستگی گسترده ژنوم در جمعیت‌های هدف منجر به دستیابی داده‌های ارزشمندی در زمینه عوامل ژنتیکی موثر بر بروز انواع بیماری‌ها و از جمله آن‌ها سقط مکرر و چندشکلی‌های گوناگون ژنی مرتبط با آن‌ها شده است. تاکنون مطالعات گسترده ژنومی، بر روی بیشتر جمعیت‌های بزرگ دنیا انجام پذیرفته است که نتایج حاصل از این پژوهش‌ها و فراوانی آللی واریانت‌های ژنی هر یک از جمعیت‌های مورد مطالعه در بانک‌های اطلاعاتی بزرگی همچون HapMap و genome 1000 قابل دسترسی می‌باشد. بر این اساس، یافته‌های انتشاریافته در این بانک‌های اطلاعاتی حاکی از نقش ژن FCGR2A (CD32) در سیستم ایمنی بدن بوده که این امر این ژن را به یکی از ژن‌های کاندید احتمالی مرتبط با بروز سقط مبدل می‌سازد.^{۱۳}

با توجه به نقش و اهمیت گیرنده FCGR2A در سیستم ایمنی بدن و نقش حفاظتی مهم آن در بسیاری از بیماری‌ها به‌ویژه بیماری‌هایی که به‌وسیله باکتری‌های کپسول‌ایجاد می‌شوند،^{۱۴} تاکنون مطالعات گوناگونی در زمینه ارتباط میان چندشکلی‌های شناخته‌شده این ژن و بروز بیماری‌های عفونی و خودایمنی انجام یافته است. از جمله این مطالعات می‌توان به پژوهش انجام‌یافته توسط Yuan و همکارانش اشاره نمود. نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌داد که تحت شرایط آزمایشگاهی سلول‌های چند هسته‌ای یک‌تخمی دارای آلل H131 دارای قابلیت بیگانه‌خواری بهتری در مقایسه با R131 می‌باشند.^{۱۸}

از طرفی، آنالیزهای انجام‌شده در پژوهش کنونی، گویای عدم وجود ارتباط معنادار در سطح آللی و ژنوتیپی میان پلی‌مورفیسم ژن FCGR2A و خطر ابتلا به سقط مکرر در جمعیت زنان ایرانی می‌باشد (P=۰/۱۱). لازم به توضیح است که این مطالعه برای اولین بار نه‌تنها

می‌باشد، چراکه میزان معناداری در هر دو سطح آلی و ژنوتیپی به‌میزان تعیین‌شده جهت معناداری بسیار نزدیک می‌باشد. به‌عبارت دیگر نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش لزوم انجام دوباره آن‌را در حجم نمونه بیشتر و در سایر اقوام ایرانی پیش از پیش آشکار می‌سازد. از طرفی مطالعه و بررسی فاکتورهای درگیر در ایجاد سقط که خطر ابتلا به این بیماری را افزایش می‌دهند بسیار ضروری به‌نظر می‌رسد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه با عنوان "بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم *R/H131* در ژن *FCGR2A* با خطر ابتلا به سقط مکرر در زنان نابارور" مصوب در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۴ و کد ۶۶۸۵ می‌باشد که با حمایت مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل پژوهشکده رویان اجرا شده است. بدین‌وسیله از اساتید گرانقدر دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرسنل زحمتمکش پژوهشکده رویان و تمام بیمارانی که در اجرای این پژوهش شرکت نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

درحالی‌که سطح بیان *Histocompatibility complex (MHC) class II* بدون تغییر باقی مانده می‌ماند. نتایج گویای آن است که ایمنی غیراختصاصی به‌وسیله بیان و عملکرد *FCGR* در طول بارداری افزایش می‌یابد.^{۱۰}

با توجه به نقش پلی‌مورفیسم *R131H* ژن *FCGR2A* در سیستم دفاع ایمنی بدن از یک‌سو و نقش اختلالات ایمنی به‌عنوان مهمترین عامل از دست دادن جنین در سقط مکرر از سوی دیگر، مطالعه کنونی به‌منظور بررسی ارتباط میان این پلی‌مورفیسم و سقط مکرر برای نخستین‌بار در جمعیت زنان ایرانی انجام یافت. نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش گویای نبود ارتباط معنادار میان پلی‌مورفیسم *R131H*، تعداد دفعات سقط و سن شرکت‌کنندگان و خطر ابتلا به سقط مکرر در نمونه مورد مطالعه متشکل از ۱۵۰ فرد دارای سابقه ابتلا به سقط و ۱۵۰ فرد سالم بود. بااین‌حال و با وجود عدم وجود ارتباط معنادار، توجه به سطح معناداری به‌دست‌آمده در این پژوهش از نکات قابل توجه

References

- Hullender Rubin L, Cantor D, Marx BL. Recurrent Pregnancy Loss and Traditional Chinese Medicine. *Med Acupunct* 2013;25(3):232-7.
- Regan L, Rai R. Epidemiology and the medical causes of miscarriage. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000;14(5):839-54.
- Nelen WL, Blom HJ, Steegers EA, den Heijer M, Thomas CM, Eskes TK. Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 2000;95(4):519-24.
- Lashen H, Fear K, Sturdee DW. Obesity is associated with increased risk of first trimester and recurrent miscarriage: matched case-control study. *Hum Reprod* 2004;19(7):1644-6.
- Nelen WL, Steegers EA, Eskes TK, Blom HJ. Genetic risk factor for unexplained recurrent early pregnancy loss. *Lancet* 1997;350(9081):861.
- Parveen F, Faridi RM, Das V, Tripathi G, Agrawal S. Genetic association of phase I and phase II detoxification genes with recurrent miscarriages among North Indian women. *Mol Hum Reprod* 2010;16(3):207-14.
- Coulam CB, Jayendran RS. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 2008;59(4):301-5.
- Babbage SJ, Arkwright PD, Vince GS, Perrey C, Pravica V, Quenby S, et al. Cytokine promoter gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2001;51(1):21-7.
- van Sorge NM, van der Pol WL, van de Winkel JG. FcgammaR polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue Antigens* 2003;61(3):189-202.
- Yuan FF, Tanner J, Chan PK, Biffin S, Dyer WB, Geczy AF, et al. Influence of FcgammaRIIA and MBL polymorphisms on severe acute respiratory syndrome. *Tissue Antigens* 2005;66(4):291-6.
- Kuwano ST, Bordin JO, Chiba AK, Mello AB, Figueiredo MS, Vieira-Filho JP, et al. Allelic polymorphisms of human fcgamma receptor IIa and Fcgamma receptor IIIb among distinct groups in Brazil. *Transfusion* 2000;40(11):1388-92.
- Torkildsen Ø, Utsi E, Mellgren SI, Harbo HF, Vedeler CA, Myhr K-M. Ethnic variation of Fcγ receptor polymorphism in Sami and Norwegian populations. *Immunology* 2005;115(3):416-21.
- Brooks DG, Qiu WQ, Luster AD, Ravetch JV. Structure and expression of human IgG FcRII(CD32). Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes. *J Exp Med* 1989;170(4):1369-85.
- Omi K, Ohashi J, Patarapotikul J, Hananantachai H, Naka I, Looareesuwan S, et al. Absence of association between the Fc gamma receptor IIIA-176F/V polymorphism and the severity of malaria in Thai. *Jpn J Infect Dis* 2002;55(5):167-9.
- Lee RM, Silver RM. Recurrent pregnancy loss: summary and clinical recommendations. *Semin Reprod Med* 2000;18(4):433-40.
- Clark DA. Anti-TNFalpha therapy in immune-mediated subfertility: state of the art. *J Reprod Immunol* 2010;85(1):15-24.
- Thum MY, Bhaskaran S, Abdalla HI, Ford B, Sumar N, Bansal A. Prednisolone suppresses NK cell cytotoxicity in vitro in women with a history of infertility and elevated NK cell cytotoxicity. *Am J Reprod Immunol* 2008;59(3):259-65.
- Yuan FF, Wong M, Pererva N, Keating J, Davis AR, Bryant JA, et al. Fcgamma RIIA polymorphisms in Streptococcus pneumoniae infection. *Immunol Cell Biol* 2003;81:192-5.
- Castellano F, Montcourrier P, Chavrier P. Membrane recruitment of Rac1 triggers phagocytosis. *J Cell Sci* 2000;113 (Pt 17):2955-61.
- Xia HZ, Du WD, Wu Q, Chen G, Zhou Y, Tang XF, et al. E-selectin rs5361 and FCGR2A rs1801274 variants were associated with increased risk of gastric cancer in a Chinese population. *Mol Carcinog* 2012;51(8):597-607.

Association between 497A>G polymorphism in *FCGR2A* gene with recurrent miscarriage in infertile women

Zahra Mofidimanesh M.Sc.¹
Khadijeh Onsory Ph.D.^{1*}
Anahita Mohseni Meybodi Ph.D.²

1- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran.

2- Department of Genetics, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran.

* Corresponding author: Department of Biology, Faculty of Science, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran.
Tel: +98 21 56733053
E-mail: onsory@gmail.com

Abstract

Received: 09 Nov. 2016 Revised: 09 Feb. 2017 Accepted: 17 Feb. 2017 Available online: 18 Feb. 2017

Background: The results indicated that the immunologic and genetic factors play a key role in the susceptibility to this syndrome compared to other risk factors. Immunoglobulin G, representing approximately 80% of Immunoglobulins in humans and the only way that IgG2 can be passed from mother to fetus blood circulation is binding to Fcγ receptor (FcγR) classes which have been coded by *Fcγ receptor (FcγRIIA)* gene. Any changes in the *FcγRIIA* gene structure such as mutations or polymorphisms can be considered as risk factors on the incidence of abortion through causing the inflammation or decreasing fetus safety. This receptor is the only which can have an interaction with IgG2 antibody and the Therefore, the current study was carried out to assess the association between R/H131 polymorphism in the *FcγRIIA* gene and susceptibility to recurrent abortions in Iranian women.

Methods: For this reason, a case-control study was confirmed to compare the frequency of *FCGR2A* gene R/H131 polymorphism in 150 women with recurrent miscarriage history having normal karyotype and 150 healthy women with no abortion history as control which were collected in March 2014 up to September 2015, from Royan Institute for Reproductive, Tehran, Iran. The genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes and genotyping was performed using amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction (ARMS-PCR).

Results: The frequency of AA, AG, and GG genotypes in case and control groups were 31.3%, 54.7%, 14% and 27.3%, 49.2%, 23.5% respectively. According to the findings, the presence of the risk allele was not associated with increased risk of recurrent miscarriage compared with individuals lacking the risk allele and it statistically was significant (P= 0.11). No significant association was found between the age of participants and risk of abortion in Iranian studied population (P= 0.083).

Conclusion: The results of present study do not support the previous findings of an association between R/H131 polymorphism in *FCGR2A* gene and recurrent miscarriage.

Keywords: *FCGR2A* gene, polymerase chain reaction, recurrent miscarriage, R/H131 polymorphism.