

مقاله تحقیقی

مطالعه همراهی چندشکلی‌های rs3024998 و rs699947 در ژن VEGF با خطر بروز سقط مکرر جنین

شهره زارع کاریزی^{۱*}، رضا میرفخرایی^۲

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، ورامین - پیشوا، ایران
۲. گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

* مسئول مکاتبات: آدرس الکترونیکی: shohrehzare@yahoo.com

محل انجام تحقیق: آزمایشگاه ژنتیک پزشکی تهران، دکتر اکبری، آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دانشگاه شهید بهشتی

تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۹

تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۲۱

چکیده

سقط مکرر به وقوع دو یا تعداد بیشتر سقط پشت سر هم قبل از هفته‌ی ۲۰ بارداری اطلاق می‌شود. برخی از دلایل عمده‌ی RPL نقایص آناتومیک رحمی، فاکتورهای ژنتیکی، عفونت‌ها، دلایل ایمنولوژیک، محیطی و... می‌باشند. در مواردی که علت RPL مشخص نباشد از آن به عنوان ایدیوپاتیک نامبرده می‌شود. پلی‌مورفیسم‌های ژن‌های مختلفی در بروز سقط جنین موثر می‌باشند که یکی از این ژن‌ها، ژن فاکتور رشد اندوتلیالی عروقی (VEGF) می‌باشد. در این تحقیق به بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم‌های ژن VEGF با سقط مکرر جنین پرداخته شده است. در این مطالعه‌ی موردی شاهدی ۲۰۰ خانم شامل ۱۰۰ خانم با سابقه حداقل دو سقط پشت سر هم با علت نامشخص و ۱۰۰ فرد کنترل سالم با حداقل سابقه دو تولد زنده و بدون هیچ‌گونه سابقه‌ی سقط مورد بررسی قرار گرفتند. DNA ژنومی هر فرد از لوکوسیت‌های خون استخراج شد. جهت شناسایی پلی‌مورفیسم rs3024998 و rs699947 ژن VEGF از تکنیک PCR-RFLP استفاده شد. آنزیم محدودالایر *MaeI* و *BglIII* به ترتیب برای هضم آنزیمی استفاده شد. محصولات حاصل از هضم آنزیمی روی ژل آکرلامید ۱۲٪ برده شد. آنالیز توصیفی ژنوتیپ‌های هر جایگاه، فراوانی هموزیگوت و هتروزیگوت در دو گروه بیمار و شاهد مطالعه گردید. اختلاف بین فراوانی آلیلی بین افراد بیمار و کنترل با استفاده از آزمون مربع کای توسط نرم‌افزار SPSS ver.18 مورد مطالعه قرار گرفت. آنالیزهای آماری تفاوت معناداری ($P < 0.05$) بین فراوانی آلیلی جایگاه‌های مزبور در افراد بیمار و سالم نشان دادند. مطالعات بیشتر برای ارزیابی اهمیت واریانت ژنتیکی مطالعه شده در جمعیت‌های متفاوت و بررسی اثر این واریانت بر بیان ژن VEGF مورد نیاز می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پلی‌مورفیسم، سقط مکرر جنین، ژن VEGF

مقدمه

حاملگی قبل از هفته بیستم اطلاق می‌شود. سقط خود به خودی از لحاظ بالینی انواع مختلفی دارد که یکی از آن‌ها سقط مکرر می‌باشد و به طور کلاسیک بدین‌گونه تعریف می‌گردد: سه سقط متوالی یا بیشتر قبل از هفته بیستم

یکی از محدود مشکلاتی که زندگی زوج‌های جوان را درگیر کرده و جزو شایع‌ترین عوارض حاملگی می‌باشد، مسأله سقط جنین است (۱). از نظر تعریف سقط به ختم

بارداری یا تولد جنین هایی کمتر از ۵۰۰ گرم (۳،۴). حدود ۵ تا ۱ در صد خانم های باردار سقط مکرر را تجربه می کنند که ممکن است به دلیل نارسایی هایی همچون اختلالات هورمونی، عوامل آناتومیکی، عوامل ایمنونولوژیک، عوامل عفونی، عوامل محیطی، عوامل ترومبوفیلی و اختلالات ژنتیکی از جمله ناهنجاری های کروموزومی و تک ژنی باشد. این در حالی است که درصد قابل توجهی از عوامل مؤثر در سندرم سقط مکرر ناشناخته باقی مانده است (۵). در میان عوامل شناخته شده سقط مکرر، عوامل ژنتیکی شایع ترین عامل است. در مطالعات ژنتیکی مختلف ارتباط بین سقط مکرر و پلی مورفیسم های ژنتیکی مربوط به بازکننده های عروق از جمله VEGF (فاکتور رشد اندوتلیالی عروق) نشان داده شده است (۶،۷). یک حاملگی طبیعی وابسته به ارتباط خونی مادر و جنین می باشد. بعد از مبادله مواد خونی بین جنین و مادر، خون دارای اکسیژن و مواد غذایی از طریق وریدها به ورید نافی و سیستم گردش خون جنین وارد می شود. جفت انسان سرشار از عروق خونی است و در پایان بارداری، به صورت یک شبکه مویرگی با طول ۵۵۲ کیلومتر و سطحی برابر با ۲۵ سانتیمتر مربع گسترده شده است. عروق و رگزایی های بعدی نقش مهمی در تکوین جفت دارند. تنظیم نامناسب و پارگزایی ناکارآمد موجب محدودیت رشد جنین شده و ممکن است موجب بروز سقط شود. مواد مغذی کافی و تأمین بستر مناسب برای رشد طبیعی داخل رحمی جنین، ضروری است. اختلال در جریان خون رحمی با عوارض پریناتال و مرگ و میر ناشی از زایمان زودرس، پره کلآمپسی و یا محدودیت رشد داخل رحم در ارتباط است. از آنجا که بیان ژن *VEGF* وجود این عامل رشد در تشکیل عروق خونی نقش مهمی دارد می تواند در تشکیل جفت و رساندن مواد مغذی از مادر به جنین مؤثر باشد و در صورت عدم وجود این عامل رشد در تشکیل عروق جفت اختلال ایجاد می شود و موجب نارسایی جفت و در نهایت اختلال در انتقال مواد مغذی از مادر به جنین می شود و سقط جنین را به دنبال خواهد داشت (۸).

VEGF یکی از اولین فاکتورهای رگزایی است که

شناسایی شده است. اعتقاد بر این است که *VEGF* مهمترین تنظیم کننده رگزایی نرمال و پاتولوژیک می باشد (۹). *VEGF* باعث مجموعه ای از پاسخ هادرسلول های اندوتلیالی در *in vitro* از جمله تحریک تکثیر و مهاجرت سلول ها و القا بیان ژن های پیش التهابی می شود. ژن کد کننده *VEGF* انسانی روی کروموزوم 6p21.1 به طول ۱۶۳۰۴ جفت باز قرار دارد. این ژن در انسان دارای ۸ اگزون می باشد که با هفت اینترون جدا شده اند (۱۰). الگوهای بیان *VEGF* و گیرنده های انتخابی آن با دو عامل ارتباط دارد یکی زمینه های رشد عروق در حال توسعه جنین و دیگری طول دوره بارداری زنان. مهمترین اثر فقدان *VEGF* و گیرنده های آن، کاهش رشد و نمو عروق و نقص عملکرد عروق می باشد (۱۱، ۱۰). این نکته نیز قابل توجه است که ژن *VEGF* در حالت هتروزیگوت به صورت غیر فعال عمل می کند و منجر به اختلال شدید در گسترش رگ ها و مرگ جنین می شود، که این مطلب نشان دهنده مهم بودن دوز مناسب *VEGF* برای تکامل و رشد عروق می باشد (۱۲). لذا در این مطالعه ارتباط دو چندشکلی rs3024998 و rs699947 در ژن *VEGF* با سقط مکرر جنین در دو گروه شاهد و مورد با استفاده از روش PCR-RFLP بررسی شد.

مواد و روش ها

در این مطالعه مورد-شاهدی ۱۰۰ زن مبتلا به سقط مکرر با علت ناشناخته با میانگین و انحراف معیار سن (۵/۰۳ ± ۲۷/۷) که حداقل ۲ سقط قبل از هفته بیستم بارداری داشته به عنوان مورد انتخاب شدند. گروه مورد به گونه ای انتخاب شدند که فاقد مشکلات آناتومیکی رحم، مشکلات سیتوژنتیکی، مشکلات هورمونی، مشکلات ایمنونولوژیک و اختلالات اسپرم همسر باشند. به همین منظور به بیماران پیشنهاد انجام آزمایشات: تعیین کاربوتیپ خانم و آقا، Vaginal Ultrasound Scan، سنجش FBS، LH، PRL، TSH، T3، T4، ارزیابی فاکتورهای ترومبوفیلی (PT، PTT Antithrombin III، Protein C)، آزمایشات Anti-dsDNA، TORCH Study، Protein S) و آنالیز ایمونولوژی (APA، ACA) ANA، TPOAb، TgAb) و آنالیز

شاهد در لوله‌های حاوی EDTA اخذ شد. نمونه‌ی DNA این افراد با روش نمک اشباع استخراج شد (۱۳). تکثیر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای هر قطعه انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت بررسی چند شکلی‌های rs3024998 و rs699947 ژن VEGF و طول محصولات PCR برای هر پرایمر در جدول ۱ ارائه شده است.

اسپرم (Motility, Volume, pH, Sperm Count) Morphology, داده شد. این زنان در طی سال‌های ۱۳۸۹-۱۳۹۱ از نقاط مختلف ایران به آزمایشگاه ژنتیک پزشکی تهران-دکتر اکبری مراجعه کرده بودند. در مقابل ۱۰۰ زن که حداقل ۲ تولد موفق داشته و فاقد سابقه سقط بودند به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. میانگین و انحراف معیار سن این افراد $30 \pm 4/66$ بود. پس از دادن آگاهی و تکمیل رضایت نامه، ۵ میلی لیتر خون محیطی از افراد مورد و

جدول ۱ - توالی پرایمرهای مورد استفاده و طول محصولات PCR جهت بررسی چند شکلی rs3024998 و rs699947.

نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه محصول (bp)
rs3024998-F rs3024998-R	5'-CACCACCCATCACCATCGAC-3' 5'-TATGTGGGTGGGTGTGTCTACAG-3'	251
rs699947-F rs699947-R	5'-TAACCTAGCACCTCCACCAAAC-3' 5'-AGAGTGGGACCAGTCAGTCTG-3'	200

در مورد چندشکلی rs699947 محصول PCR طولی معادل ۲۰۰ جفت باز خواهد داشت که وجود آلل C فاقد جایگاه برش برای آنزیم *Bgl*III است، در نتیجه یک قطعه ۲۰۰ جفت بازی ایجاد خواهد نمود و ژنوتیپ AA ایجاد دو قطعه ۱۶۳ و ۳۷ جفت بازی می‌کند. محصولات PCR پس از هضم آنزیمی روی ژل آکریل آمید ۱۲٪ برده شد و پس از رنگ‌آمیزی با نیترات نقره نتایج حاصله آنالیز گردید. مشاهدات وارد نرم افزار spss-version18 شد و توزیع ژنوتیپ‌های هر جهش، فراوانی هموزیگوت و هتروزیگوت‌ها در دو گروه بیمار و شاهد با استفاده از مربع کای پیروسون و تست دقیق فیشر مورد سنجش قرار گرفت. p-value کم‌تر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. p-value و میزان خطر نسبی محاسبه گردید.

نتایج

در این تحقیق چندشکلی rs3024998 و rs699947 در 100 زن که حداقل ۲ تولد موفق داشتند و ۱۰۰ زن مبتلا به سقط مکرر با استفاده از روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. فراوانی ژنوتیپی و آللی برای چند شکلی rs3024998 در جدول ۲ ارائه شده است. فراوانی ژنوتیپی

واکنش PCR برای هر دو چندشکلی در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۵۰ نانوگرم DNA ژنومیک، ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR Buffer، ۰/۲۵ میلی مولار از هر dNTPs، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۵-۷ پیکو مول از هر پرایمر و ۰/۵ واحد آنزیم *Taq* DNA polymerase (سیناژن، ایران) صورت گرفت. تکثیر در ۳۲ سیکل، دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۳ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد و طویل‌سازی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد صورت گرفت. جهت شناسایی چندشکلی‌های rs3024998 محصول PCR مربوطه با استفاده از آنزیم محدودالتر *Mae*I مورد هضم آنزیمی قرار گرفت.

محصول PCR جهت بررسی rs3024998 طولی معادل ۲۵۱ جفت باز خواهد داشت. آلل جهش یافته T برای آنزیم *Mae*I هیچ توالی قابل شناسایی ندارد و برشی ایجاد نمی‌کند، اما آلل C با آنزیم برش یافته و ایجاد دو قطعه ۱۰۵ و ۱۴۶ جفت بازی می‌کند.

گروه های مورد مطالعه از تعادل هاردی-واینبرگ تبعیت می کند. فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده برای این چند شکلی در بین گروه زنان مبتلا به سقط مکرر و گروه شاهد به ترتیب بدین قرار است: ۵۲ درصد مقابل ۳۴ درصد هموزیگوت CC، ۰ درصد مقابل ۶ درصد هموزیگوت AA و ۴۸ درصد مقابل ۶۰ درصد هتروزیگوت AC. در جدول ۵ نیز نتایج بررسی ارتباط ژنوتیپ های rs699947 با سقط مکرر جنین ارائه شده است. همان طور که ملاحظه می شود ارتباط معنی داری بین این چند شکلی با سقط مکرر جنین مشاهده شد (p=0.03).

مشاهده شده در گروه های مورد مطالعه از تعادل هاردی-واینبرگ تبعیت می کند. فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده برای این چند شکلی در بین گروه زنان مبتلا به سقط مکرر و گروه شاهد ارتباط معنی داری نشان نداد و به ترتیب بدین قرار است: ۴۵ درصد مقابل ۳۳ درصد هموزیگوت CC، ۵ درصد مقابل ۱۷ درصد هموزیگوت TT و ۵۰ درصد مقابل ۵۰ درصد هتروزیگوت CT. در جدول ۳ نیز ارتباط ژنوتیپ های rs3024998 با سقط مکرر جنین مشاهده می شود. ژنوتیپ TT دارای ارتباط معنی دار با استعداد ابتلا به سقط مکرر جنین می باشد (p=0.006).
فراوانی ژنوتیپی و آللی برای این چند شکلی rs699947 در جدول ۴ ارائه شده است. فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده در

جدول ۲- فراوانی ژنوتیپی و آللی rs3024998 در بیماران دارای سقط مکرر جنین.

	مورد	شاهد
	درصد	درصد
آلل		
C	۷۰	۵۸
T	۳۰	۴۲
ژنوتیپ		
C/C	۴۵	۳۳
C/T	۵۰	۵۰
T/T	۵	۱۷

جدول ۳- ارتباط ژنوتیپ های rs3024998 با سقط مکرر جنین.

چند شکلی	مورد (درصد)	شاهد (درصد)	OR(95% CI)	P-value
CC	۴۵	۳۳	۱/۰۰	۰/۰۰۶
CT	۵۰	۵۰	۱/۳۶ (۰/۷۵ - ۲/۴۷)	
TT	۵	۱۷	۴/۳۶ (۱/۱۳ - ۵۵/۸۴)	

جدول ۴- فراوانی ژنوتیپی و آللی rs699947 در بیماران دارای سقط مکرر جنین.

	مورد	شاهد
	درصد	درصد
آلل		
C	۷۶	۶۳/۳
A	۲۴	۳۶/۴۶
ژنوتیپ		
CC	۵۲	۳۴
CA	۴۸	۶۰
AA	۰	۶

جدول ۵- ارتباط ژنوتیپ های rs3024998 با سقط مکرر جنین.

چند شکلی	مورد (درصد)	شاهد (درصد)	OR(95% CI)	P-value
C/C	۵۲	۳۴	۱/۰۰	۰/۰۳
C/A	۴۸	۶۰	۱/۶۸ (۱/۵۷-۹/۶۳)	
A/A	۰	۶	۱۲/۱۱ (۱/۳۶-۷/۹)	

بحث

پاتوژن سقط مکرر جنین پیچیده است. از علل سقط، می توان به مشکلات آناتومیک رحم، جابه جایی کروموزومی، بیماری های خودایمنی که به عنوان ریسک فاکتور شناخته شدند، اشاره داشت. مهار رشد جنین و مرگ جنین ناشناخته است، اما می توان گفت هر بارداری با افزایش سطح پیش انعقاد های طبیعی و کاهش سطح ضد انعقاد های طبیعی مانند پروتئین S همراه است (۱۴،۱۵). برقراری یک حاملگی موفق، مستلزم تنظیم تعامل اجزای مختلفی است که در ارتباط میان مادر و جنین مشارکت می کنند. تشکیل جفت نیز به تعامل میان محصولات ژنی و فعالیت سلولی مادر و جنین نیازمند است. رشد سلول و تکثیر، آپوپتوز و تمایز، تهاجم سلول، رگزایی، آزاد شدن سایتوکاین های مختلف، هورمون ها و عوامل رشد از جمله فعالیت های برجسته ای است که در خلال تشکیل جفت صورت می پذیرد. بدیهی است که این حوادث متعدد به هم پیوسته، نیاز به تنظیم مناسب هزاران ژن دارد. این مطالعه به منظور بررسی ژن VEGF در سقط جنین ناشناخته انجام شد. با توجه به اهمیت رگزایی در اوایل حاملگی زانی که حامل آلل خطر در ژن VEGF هستند، مستعد ابتلا به سقط جنین می باشند (۱۶). VEGF نقش مهمی را در این فرآیند با شرکت در رگزایی و نفوذ پذیری عروق و تهاجم فیبروبلاست برای لانه گزینی ایفا می کند. هر گونه اختلال و کاهش بیان ژن می تواند منجر به شکست لانه گزینی رویان شود. مطالعات انجام شده بر نقش مهم VEGF در پیشرفت شبکه های رگ های خونی اشاره دارد. بیان ژن VEGF در اوایل حاملگی و نقش آن در رگزایی در جفت انسان مشاهده شده است و بیان رونوشت VEGF در اوایل بارداری افزایش می یابد و کاهش بیان رونوشت VEGF با حاملگی ضعیف مرتبط می باشد. بنابراین حذف VEGF،

منجر به نقص در عروق بافت جنین، نمو جفت و رگزایی و در نهایت مرگ جنین رخ می دهد (۷). در این میان، بسیاری از پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی ژن VEGF، علاوه بر نقش در استعداد ابتلا به سقط در بیماری های دیگر از قبیل سرطان پستان، بیماری های قلبی و نارسایی زودرس تخمدان موثرند (۷،۱۵).

VEGF نقش مهمی را در پاتوژن پره اکلامپسی و تنظیم و بازسازی عروق جفت بازی می کند. از این رو در سال ۲۰۰۶ تحقیقی در مجارستان در مورد ارتباط پلی مورفیسم های G+405C و C-2578A ژن VEGF روی ۸۴ زن با پره اکلامپسی شدید و ۹۶ نفر شاهد با حاملگی اول بدون عارضه انجام شد. روش RFLP استفاده شد. G+405C استعداد ابتلا به پره اکلامپسی را کاهش می دهد. وجود آلل C-2578A موجب تغییر پیشرفت پره اکلامپسی می شود (۱۷).

VEGF در بیماری های آترواسکلروز مانند بیماری های عروق مغزی و بیماری های قلبی و عروقی در ارتباط است با این حال اثر پلی مورفیسم های 936C>T، 2578C>A، -634G>C، 1154G>A در استعداد ابتلا به سکته مغزی و انفارکتوس مغزی گزارش نشده است. به این منظور kim و همکاران در سال ۲۰۱۱ در این مورد روی ۶۱۵ بیمار مبتلا به سکته ایسکمیک و ۳۷۶ نفر مبتلا به سکته مغزی و ۴۹۴ نفر به عنوان شاهد را مورد مطالعه قرار دادند. در نهایت مشاهده کردند که پلی مورفیسم های C>634G- و T>936C با سطح هموسیستئین بیماران و انسداد یک یا چند واحد عروقی کوچک ارتباط دارد (۱۸).

شهبازی و همکاران نیز در سال ۲۰۰۲ در مورد ارتباط پلی مورفیسم های VEGF با بیماری رد پیوند کلیه تحقیقی را انجام دادند. ۱۷۳ فرد دریافت کننده پیوند که پیوندشان رد شده بود را در نظر گرفتند و پس از بررسی مشاهده

میزان VEGF به سایر عوامل درگیر در روند لخته‌سازی وابسته است. جهش در افرادی با شرایط رژیم غذایی غنی از فیبر و فاقد چربی، ورزش‌های روزانه، عدم استفاده از دخانیات و سایر عوامل ناشناخته‌ی دیگر عارضه‌ای قابل تحمل است، درحالی‌که در افراد فاقد شرایط مذکور وقوع این جهش می‌تواند منجر به بروز فنوتیپ‌های بالینی یا بیوشیمیایی گردد. بدین ترتیب اختلاف در عوامل محیطی می‌تواند اختلاف در اثر چند شکلی‌های VEGF بر سقط مکرر جنین در جوامع مختلف را توجیه کند (۲۱،۲۲).

از طرف دیگر پراکندگی (توزیع) SNPها در جوامع مختلف متفاوت است. سومین عامل موثر در توجیه نتایج متناقض در جوامع مختلف و حتی نتایج حاصل از مطالعات مختلف در یک جمعیت، اندازه، ترکیب، پراکنش جغرافیایی و قومیت جمعیت مورد مطالعه می‌باشد (۲۱،۲۲).

در نهایت، اثرات فنوتیپی چندشکلی‌های ژنی به وسیله سایر عوامل ژنتیکی یا زمینه ژنتیکی فرد و عوامل محیطی متاثر می‌گردد که بهترین مثال از برهمکنش ژن-محیط در ایجاد یک فنوتیپ است. از اینرو این امر محتمل است که چندشکلی‌ها تنها در ارتباط با پیش زمینه ژنتیکی خاص و یا همراه با عوامل محیطی می‌توانند منجر به بروز اختلال شوند (۲۲،۲۱).

تقدیر و تشکر

بدین وسیله مراتب تشکر خویش را از کلیه عزیزانی که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند، ابراز می‌داریم. این مقاله ماحصل طرح تحقیقاتی می‌باشد.

کردند که آلل‌های G ۱۱۵۴- و C ۲۵۷۸- ارتباط معنی داری با تولید *VEGF* و رد پیوند داشت (۱۹).

در این تحقیق چندشکلی rs3024998 و rs699947 در 100 زن مبتلا به سقط مکرر و ۱۰۰ زن نرمال مورد بررسی قرار گرفت. هر دو چند شکلی دارای ارتباط معنی دار با سقط مکرر جنین بودند.

Luo و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی ارتباط چند شکلی rs699947 و rs3024998 در ۲۲۷ زن دارای سقط مکرر و ۲۳۲ زن نرمال در جمعیت چین پرداختند. در این مطالعه در مورد چندشکلی rs699947 ژنوتیپ CC فراوانی ۵۶ و ۶۳ درصد، ژنوتیپ AA فراوانی ۶/۱۷ و ۳/۴۵ درصد و ژنوتیپ AC فراوانی ۳۸ و ۳۴ درصد به ترتیب در گروه مورد و شاهد مشاهده شد. به این ترتیب ارتباط معنی داری بین سقط مکرر با چند شکلی rs3024998 در جمعیت مورد مطالعه دیده نشد ($p=0.5$). در همین جمعیت چند شکلی rs3024998 نیز بررسی شد. فراوانی ژنوتیپ CC در گروه مورد و شاهد به ترتیب 33 و 34 درصد، ژنوتیپ TT فراوانی 10 و ۱۴ درصد و ژنوتیپ CT فراوانی ۵۷ و ۵۳ درصد در گروه مورد و شاهد داشت. این چند شکلی نیز فاقد ارتباط معنی دار ($p=0.14$) با سقط مکرر جنین بود (۲۰).

با توجه به مطالعات محدود انجام شده در چین و مقایسه آنها با مطالعه کنونی می‌توان علت اختلاف نتایج در نمونه‌های مورد بررسی مواردی باشد که ذیل توضیح داده شده است. نتایج متضاد در جمعیت‌های متفاوت نشان می‌دهد که نقش پلی مورفیسم‌های VEGF در سندرم سقط مکرر جنین احتمالاً به دلیل عوامل ژئوگرافی و نژادی تحت تاثیر قرار می‌گیرد و فنوتیپ نهایی، حاصل برهمکنش این عوامل می‌باشد (۲۸). در واقع اثر SNP های مذکور بر

منابع مورد استفاده

1. Carp, H. J. A., 2018. Progestogens and pregnancy loss. *Climacteric* 22:1-5.
2. Du, Y., Chen, L., Lin, J., Zhu, J., Zhang, N., Qiu, X., Li, D., Wang, L., 2018. Chromosomal karyotype in chorionic villi of recurrent spontaneous abortion patients. *Biosci Trends* 12(1): 32-39.
3. Smorgick, N., Mittler, A., Ben-Ami, I., Maymon, R., Vaknin, Z., Pansky, M., 2018. Retained products of conception: What is the risk for recurrence on subsequent pregnancies? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 5(224):1-5.
4. Kaser, D., 2018. The status of genetic screening in recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol Clin North Am* 45(1):143-154.
5. Hansen, K. A., 2017. What is new in recurrent miscarriage?: Best articles from the past year. *Obstet Gynecol* 130(6): 1380-1382.
6. Wagner, M. M., Visser, J., Verburg, H., Hukkelhoven, C. W. P. M., Van Lith, J. M. M.,

- Bloemenkamp, K. W. M., 2018. Pregnancy before recurrent pregnancy loss more often complicated by post-term birth and perinatal death. *Acta Obstet Gynecol Scand* 97(1): 82-88.
7. Hashemi, M., Danesh, H., Bizhani, F., Mokhtari, M., Bahari, G., Tabasi, F., Taheri, M., 2018. The -2549 insertion/deletion polymorphism in the promoter region of VEGF is associated with the risk of recurrent spontaneous abortion. *Biomed Rep* 8(3): 297-300.
 8. Burton, G. J., Yung, H. W., Cindrova-Davies, T., Charnock-Jones, D. S., 2009. Placental endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathophysiology of unexplained intrauterine growth restriction and early onset preeclampsia. *Placenta* 30: 43-48.
 9. Traver, D., Zon, L. I. 2002. Walking the walk: migration and other common themes in blood and vascular development. *Cell* 108(6): 731-734.
 10. Breier, G., Albrecht, U., Sterrer, S., Risau, W., 1992. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 114(2): 521-532.
 11. Ferrara, N., Gerber, H. P., LeCouter, J., 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 9(6): 669-676.
 12. Miquerol, L., Langille, B. L., Nagy, A., 2000. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development* 127(18): 3941-3946.
 13. Miller, S. A, Dykes, D. D, Polesky, H. F., 1998. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research Journal* 16:1215.
 14. Chatzidimitriou, M., Chatzidimitriou, D., Mavridou, M., Anetakis, C., Chatzopoulou, F., Lialiaris, T., Mitka, S., 2017. Thrombophilic gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss in Greek women. *Int J Lab Hematol* 39(6): 590-595.
 15. Gris, J. C., Quéré, I., Sanmarco, M., Boutiere, B., Mercier, E., Amiral, J., Mares, P., 2000. Antiphospholipid and anti-protein syndromes in non-thrombotic, non-autoimmune women with unexplained recurrent primary early fetal loss-the Nimes obstetricians and hematologists Study. *Thromb Haemost* 82(2): 634-640.
 16. Bagheri, A., Kumar, P., Kamath, A., Rao, P., 2017. Association of angiogenic cytokines (VEGF-A and VEGF-C) and clinical characteristic in women with unexplained recurrent miscarriage. *Bratisl Lek Listy* 118(5): 258-264.
 17. Bányász, I., Szabó, S., Bokodi, G., Vannay, Á., Vásárhelyi, B., Szabó, A., Rigó, J. 2006. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in severe pre-eclampsia. *Molecular human reproduction* 12(4): 233-236.
 18. Kim, O. J., Hong, S. H. O., S. H., Kim, T. G., Min, K. T. O. D., Kim, N. K., 2011. Association between VEGF polymorphisms and homocysteine levels in patients with ischemic stroke and silent brain infarction. *Stroke* 42(9): 2393-2402.
 19. Shahbazi, M., Fryer, A. A., Pravica, V., Brogan, I. J., Ramsay, H. M., Hutchinson, I. V., Harden, P. N., 2002. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *Journal of the American Society of Nephrology* 13(1): 260-264.
 20. Luo, L., Donghong, L., Shuguang, W., Hongbo, Z., Jing, Z., Shengbin, L., 2012. Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene associated with recurrent spontaneous miscarriage. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 26(7): 686-690.
 21. Saboori, S., Noormohammadi, Z., Zare-Karizi, S., 2016. Genetic variation in vascular endothelial growth factor gene and its association with recurrent spontaneous abortion. *Bratisl Lek Listy* 117(2): 80-6.
 22. Shahsavari, S., Noormohammadi, Z., Zare Karizi, S., 2015. Association of kinase insert domain-containing receptor (KDR) gene polymorphism/ haplotypes with recurrent spontaneous abortion and genetic structure. *Int J Reprod Biomed (Yazd)* 13(12):755-64.