گزارش کوتاه

بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم 4G/5G در پروموتر ژن PAI-1 با سندروم سقط مکرر

امین خالق‌پرست[1,*]، سعید مروتی[2]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲. دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی

* **مسؤول مکاتبات:** امین خالق‌پرست، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی ژنتیک، تلفن:۰۹۱۹۳۹۴۰۱۸۴، پست الکترونیکی: keyvan_1878@yahoo.com

محل انجام تحقیق: مرکز تحقیقات بیولوژی- مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)

تاریخ دریافت:۹۰/۷/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۲۷

چکیده

یکی از فاکتورهای مطرح در ایجاد ترومبوفیلی در زنان مبتلا به سقط مکرر، پلی‌مورفیسم 4G/5G در پروموتر ژن PAI-1 است. هدف از این تحقیق، بررسی ارتباط این پلی‌مورفیسم با سندروم سقط مکرر به عنوان یکی از عوامل خطر ژنتیکی برای این سندروم بود. در یک مطالعه مورد- شاهدی از میان مراجعین بیمارستان بقیه‌اله و مرکز ناباروری ابن سینا، ۳۰ زن با سابقه سقط مکرر خود به خود با علت نامشخص، به عنوان گروه بیمار و ۱۰ زن بدون سابقه سقط مکرر و دارای حداقل دو باروری موفق، به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. پلی‌مورفیسم 4G/5G در پروموتر ژن PAI-1 با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و هضم آنزیمی محصولات PCR با آنزیم‌های اندونوکلئاز محدودالاثر (PCR-RFLP) بررسی شدند. نتایج به دست آمده از تعیین ژنوتیپ این پلی‌مورفیسم، با نرم‌افزار SPSS ۱۶ و آزمون χ^2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. فراوانی آلل موتانت 4G در زنان دچار سقط مکرر، ۴۶/۷ درصد و در زنان گروه شاهد، ۴۰ درصد بود. فراوانی پلی‌مورفیسم 4G/5G در میان زنان دچار سقط مکرر و زنان گروه شاهد، به ترتیب ۷۶/۷ و ۸۰ درصد بود.۶۰ درصد زنان دچار سقط مکرر و ۸۰ درصد زنان گروه شاهد، برای پلی‌مورفیسم 4G/5G در پروموتر ژن PAI-1 هتروزیگوت بودند. ۵ نفر از زنان دچار سقط مکرر، برای این پلی-مورفیسم، هموزیگوت بودند؛ در حالی که هیچ هموزیگوتی در بین زنان گروه شاهد مشاهده نشد. نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نشان داد که این پلی‌مورفیسم نمی‌تواند توجیه کننده علت سقط مکرر در زنان مورد بررسی محسوب گردد.

واژه‌های کلیدی: سقط خود به خود، ترومبوفیلی، پلی‌مورفیسم، مهار کننده فعال‌کننده پلاسمینوژن نوع I

مقدمه

شایع‌ترین عارضه در سه ماهه اول و دوم حاملگی، سقط جنین است. مفهوم سقط جنین، به ختم بارداری پیش از هفته بیستم اطلاق می‌شود. در این میان، زنانی که بیش از دو بار سقط جنین پی‌درپی را تجربه کنند، دچار سقط مکرر هستند (۱). سقط مکرر، بیماری چند عاملی است. در نیمی از موارد، علت، ناشناخته باقی می‌ماند. اساس ژنتیکی سقط مکرر خودبه‌خودی هنوز به طور دقیق شناخته نشده است (۲)، اما مطالعات بافت‌شناسی جفت نشان داده که بین عوارض بارداری، پاتولوژی جفت و

ترومبوفیلی مادر ارتباط وجود دارد (۳،۴). سلامت جنین، ارتباط مستقیم با گردش خون مادر دارد و هر عاملی که باعث اختلال در این ارتباط شود، برای جنین زیان‌آور به شمار می‌آید (۵).

به‌نظر می‌رسد که ایجاد لخته نابه‌جا یا ترومبوز در مویرگ‌های جفت می‌تواند با ایجاد اختلال در روند تبادلات مواد بین مادر و جنین، منجر به سقط گردد (۶). جهش در پروموتر ژن مهارکننده فعال-کننده پلاسمینوژن نوع I (PAI-1)، به‌عنوان یک فاکتور مهم در بروز ترومبوفیلی در نظر گرفته می‌شود. PAI-1 یک مهار کننده فیزیولوژیک برای فعال شدن پلاسمین در خون است. زمانی که عروق خونی آسیب می‌بینند، PAI-1 از سلول های اندوتلیال جداره عروق و پلاکت‌های فعال شده، ترشح می‌شود تا از طریق غیرفعال کردن فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن (u-PA و t-PA) به طور غیرمستقیم از تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین و در نتیجه، تخریب لخته فیبرین ممانعت کند. پس از تشکیل لخته، ترومبین به منظور جلوگیری از ترومبوسیس سیستماتیک، با اتصال به ترومبودولین موجود در سطح سلول‌های عروق، پروتئین C را فعال کرده و باعث کاهش تولید آن می‌شود. پروتئین C فعال شده (APC)، با تأثیر روی سلول‌های اندوتلیال، موجب ترشح t-PA از این سلول‌ها می‌شود. t-PA که فعال‌کنندهٔ اصلی فیبرینولیز است، بر پروآنزیم پلاسمینوژن موجود در گردش خون، اثر کرده و آن را تبدیل به آنزیم پلاسمین می‌کند. از آن‌جایی‌که ترمیم و بازسازی بافت، مستلزم حل لختهٔ فیبرینی است، پلاسمین لخته فیبرینی را تخریب کرده، قطعات پپتیدی کوچکی را به‌نام فرآورده‌های تخریبی فیبرین (FDP) باقی می‌گذارد (۷).

PAI-1 در شرایط طبیعی با غلظت پایین در پلاسما حضور دارد و بر اثر مسائل کلینیکی، غلظت آن در پلاسما افزایش می‌یابد. افزایش سطح پلاسمایی PAI-1 با پیشرفت بیماری‌های ترومبوتیک، انفاکتوس قلبی و ترومبوز شدید وریدی، ارتباط دارد (۱۰-۸). ژن ۱۲/۲ کیلو بازی PAI-1 در انسان در باندهای q۲۲ - ۳ .q۲۱ کروموزوم ۷ قرار گرفته است. این ژن، حاوی ۸ اینترون و ۹ اگزون است. انتهای 5 توالی DNA گلیکوپروتئین PAI-1 دارای عناصر ضروری TATAA و CCAAT برای اتصال RNA پلیمراز است. محل شروع رونویسی bp ۲۵، پایین‌دست توالی توافقی TATA قرار دارد. رونویسی از ژن PAI-1 توسط عوامل مختلفی شامل هورمون‌ها، سیتوکین‌ها (خصوصاً اینترلوکین‌ها)، فاکتورهای رشد و آسیب‌های فیزیکی القا می‌شود (۱۳-۱۱). تنوع ژنتیکی ناشی از پلی‌مورفیسم در ژن PAI-1، منجر به تغییر میزان پلاسمایی PAI-1 می‌گردد. پلی‌مورفیسم ناشی از دخول یا حذف گوانوزین (4G/5G) در محل ۶۷۵- در ناحیه پروموتر، نقش مهمی در تنظیم بیان ژن PAI-1 ایفا می‌کند. تحت شرایط تحریک با سایتوکین‌ها (مانند IL-1)، الل 4G با افزایش سطح رونویسی ژن، موجب افزایش میزان PAI-1 در پلاسما می‌شود (۱۲،۱۴). سطح PAI-1 پلاسمایی، تحت‌تأثیر عوامل محیطی و ژنتیکی است. برخی مطالعات نشان داده‌اند که سطح پلاسمایی PAI-1 در افراد با ژنوتیپ 4G/4G تا ۲۵ درصد، بیش از افراد با ژنوتیپ 5G/5G است. مطالعه روی این پلی‌مورفیسم، ارتباط آن را با ترومبوز، بیماری‌های تصلب شرایین و دیگر اختلالات وریدی نشان می‌دهد. هموزیگوتی الل4G، با بیماری شریان کرونری و سکته قلبی و سندرم حاد انسداد شراین ارتباط دارد. محصول الل 4G ژن PAI-1 به یک فعال‌کننده متصل می-شود؛ درحالی که الل 5G، به یک فعال‌کننده و یک سرکوبگر متصل می‌شود که با کاهش رونویسی PAI-1 همراه است. به‌علت ناتوانی آلل 4G برای اتصال به‌یک پروتئین سرکوبگر رونویسی، بیان mRNA و سطح پروتئین PAI-1 افزایش می‌یابد (۹). با توجه به اهمیت PAI-1 در هموستاز و نقش آن در ابتلا به ترومبوز وریدی و نیز ارتباط ترومبوز با افزایش احتمال سقط مکرر، در مطالعه حاضر، ارتباط پلی‌مورفیسم 4G/5G در پروموتر ژن PAI-1 با سقط مکرر، بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

انتخاب گروه بیماران و گروه شاهد

در یک مطالعه مورد- شاهدی، ۳۰ زن با سابقه سقط مکرر خود به خودی با علت نامشخص، به عنوان گروه بیمار و ۱۰ زن بدون سابقه سقط و دارای حداقل دو باروری موفق، به عنوان گروه شاهد از میان مراجعه‌کنندگان به بیمارستان فوق‌تخصصی بقیه‌ا...(عج) و مرکز ناباروری ابن‌سینا در ماه‌های شهریور تا اسفند سال ۱۳۸۸ با توجه به پرونده پزشکی بیماران و نظر متخصص زنان، انتخاب شدند. معیارهای خروج از مطالعه، شامل سایر علل مطرح در سقط، از جمله وجود ناهنجاری‌های کروموزومی در جنین، مشکلات آناتومیکی در رحم، اختلالات هورمونی و عفونت‌های مرتبط با سقط بود. جهت ورود به مطالعه و انجام خون‌گیری، از تمامی افراد مورد مطالعه، رضایت‌نامه آگاهانه گرفته شد.

بررسی ژنوتیپ‌ها

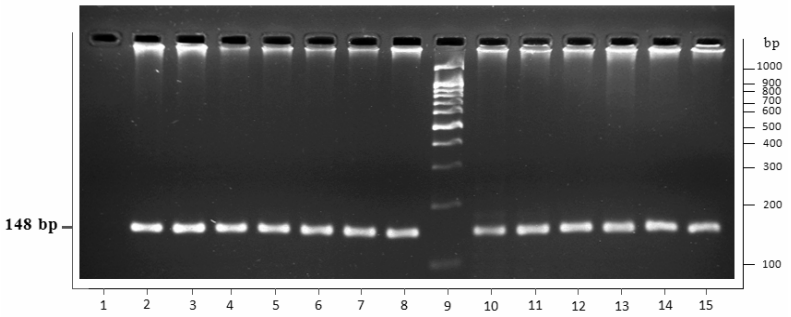
DNA ژنومی از نمونه خون‌هایی که در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA گرفته شده بود، به روش استاندارد رسوب نمکی استخراج گردید (۲۱). تعیین ژنوتیپ، با استفاده از روش PCR-RFLP صورت گرفت. آغازگرهای مناسب برای هر پلی-مورفیسم، به کمک نرم‌افزار طراحی پرایمر Oligo، طراحی و سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای هر جفت آغازگر، بهینه‌سازی شد (جدول ۱).

جدول ۱- توالی آغازگرها، آنزیم‌های محدودالاثر و محصولات PCR و RFLP پلی‌مورفیسم (4G/5G) در پروموتر ژن PAI-1.

پلی مورفیسم	توالی پرایمرها	محصول PCR (bp)	آنزیم محدودالاثر	محصول RFLP (bp)
PAI-1 -675 (4G/5G)	F: 5′- CACAGAGAGAGTCTGGACACGTGA -3′ R: 5′- TGCAGCCAGCCACGTGATTGTCTAG -3′	148	BseR I	(148)* (110 ،38)**

*الل نرمال **الل موتانت

مواد لازم برای واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر، شامل ۴۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۲ میلی‌مول $MgCl_2$، ۰/۲۵ میلی‌مول dNTPs، ۰/۴ میلی‌مول از هر جفت آغازگر و ۱ واحد آنزیم Taq پلیمراز بود. مراحل انجام روش PCR به ترتیب زیر روی نمونه‌های DNA از دو گروه بیمار و شاهد انجام شد. پس از دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، قطعات DNA برای پلی‌مورفیسم (4G/5G) PAI-1 در ۳۵ سیکل (۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه) تکثیر یافتند و به دنبال آن، مرحله طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۷ دقیقه انجام شد. صحت انجام PCR، با انجام الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد تأیید شد. RFLP روی محصولات PCR برای پلی-مورفیسم 4G/5G در پروموتر ژن PAI-1 توسط آنزیم‌های محدودالاثر *Bse*R I مطابق دستورالعمل شرکت تولید کننده آنزیم انجام شد. سپس، قطعات حاصل از RFLP روی ژل آگارز ۳ درصد، الکتروفورز شد و طول قطعات حاصل از هضم آنزیمی، مشاهده گردید. محصول PCR پلی‌مورفیسم (4G/5G) PAI-1، ۱۴۸ bp طول دارد (تصویر ۱).



تصویر ۱- نتایج الکتروفورز محصول PCR برای جفت پرایمر (4G/5G) PAI-1. ۱: کنترل منفی؛ ۸ - ۲ و ۱۵- ۱۰: باند ۱۴۸ bp محصول PCR؛ ۹: DNA Ladder (۱۰۰ bp).

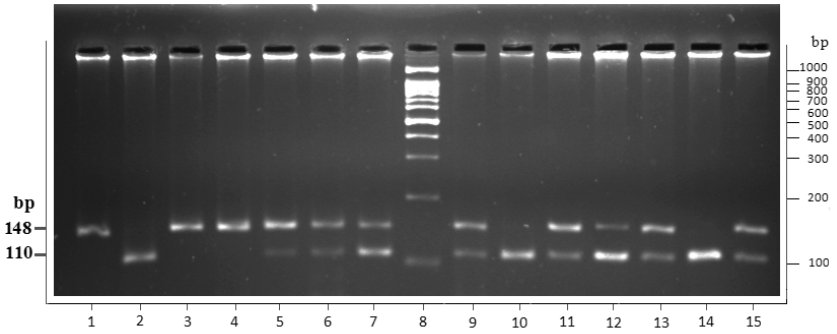
آلل نرمال برای آنزیم *BseR I*، هیچ توالی قابل شناسایی ندارد، اما در آلل جهش یافته، به علت جهش رخ داده، یک جایگاه شناسایی برای آنزیم ایجاد می‌شود. حاصل این تغییر، ایجاد دو قطعه ۱۱۰bp و ۳۸bp پس از هضم آنزیمی است. باند ۳۸bp به علت کوچکی اندازه، در ژل آگاروز ۳ درصد مشاهده نمی‌شود. بنابراین، ملاک بررسی برای تعیین ژنوتیپ 4G/5G، باند ۱۱۰bp است.

آنالیز آماری

نتایج به دست آمده از تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم 4G/5G در پروموتر ژن PAI-1 برای سه حالت نرمال، هتروزیگوت و هموزیگوت در دو گروه بیمار و شاهد، با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۶ و آزمون χ^2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج برای این آزمون با $p<۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی گردیدند.

نتایج

با توجه به نتایج مشاهده شده در الکتروفورز محصول RFLP، ژنوتیپ هر فرد برای پلی‌مورفیسم 4G/5G در پروموتر ژن PAI-1 مشخص شد (تصویر ۲). فراوانی آلل موتانت 4G در زنان دچار سقط مکرر، ۴۶/۷ درصد و در زنان گروه شاهد، ۴۰ درصد بود، اما این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نبود.



تصویر ۲- نتایج الکتروفورز محصولات PCR پس از RFLP برای پلی مورفیسم PAI-1 (4G/5G). ۱: نمونه محصولات PCR قبل از RFLP؛ ۳،۴: نرمال؛ ۱۵، ۱۳، ۱۲، ۱۱، ۹، ۷، ۶، ۵: هتروزیگوت؛ ۲، ۱۰، ۱۴: هموزیگوت؛ ۸: DNA Ladder (۱۰۰ bp).

فراوانی پلی‌مورفیسم 4G/5G در میان زنان دچار سقط مکرر و زنان گروه شاهد، به ترتیب۷۶/۷ و ۸۰ درصد بود. ۱۸ نفر از زنان دچار سقط مکرر (۶۰٪) و ۸ نفر از زنان گروه شاهد (۸۰٪) برای این پلی‌مورفیسم، هتروزیگوت بودند. ۵ نفر از زنان دچار سقط مکرر برای این پلی‌مورفیسم هموزیگوت بودند، اما هیچ هموزیگوتی در بین زنان گروه شاهد مشاهده نشد. ۷ نفر از ۳۰ زن دچار سقط مکرر (۲۳/۳ ٪) و ۲ نفر از ۱۰ زن گروه شاهد (۲۰ ٪) فاقد پلی‌مورفیسم 4G/5G در پروموتر ژن PAI-1 بودند (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه ژنوتیپ‌ها و آلل‌های پلی‌مورفیسم 4G/5G در پروموتر ژن PAI-۱ در زنان دچار سقط مکرر و زنان نرمال.

	نمونه (n= ۳۰)	شاهد (n= ۱۰)
ژنوتیپ		
4G/4G	۵(۱۶/۷ ٪)	۰(۰ ٪)
4G/5G	۱۸(۶۰ ٪)	۸(۸۰ ٪)
5G/5G	۷(۲۳/۳ ٪)	۲(۲۰ ٪)
آلل		
4G	۲۸(۴۶/۷٪)	۸ (۴۰٪)
5G	۳۲ (۵۳/۳٪)	۱۲(۶۰٪)

در مقایسه بین دو گروه، در هیچ یک از ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (p-value>0.05).

بحث

برای لانه‌گزینی موفق، تهاجم سیتوتروفوبلاست به عمق مناسب آندومتر رحم، امری حیاتی است. این پدیده، لنگری برای جنین ایجاد می‌کند و سازگاری چرخه جفتی- رحمی را پیش می‌برد. به نظر می‌رسد u-PA، PAI-1 و گیرنده u-PA، پروتئولیز و بازسازی بافت مادر را طی تهاجم تروفبوبلاستی برعهده دارند.

در بارداری‌های موفق، این سیستم برای ایجاد تعادل مناسب بین تشکیل ماتریکس خارج سلولی و فیبرین، تحت کنترل و تنظیم است. به‌علاوه، لخته‌های خونی درون وریدی و افزایش فیبرین فضای بین پرزهای جفت، از جمله یافته‌های مورفولوژیک رایج در بافت‌های سقط خود به خودی هستند که اختلال در هموستاز را نشان می‌دهند (۱۵). ارتباط بین پلی‌مورفیسم (4G/5G) ۶۷۵- و سقط مکرر، همیشه مورد سوال بوده است.

Gris و همکاران در فرانسه، غلظت بالاتر PAI-1 را در زنان دچار سقط مکرر اولیه، گزارش کردند و نشان دادند که پروتئولیز وابسته به پلاسمین ناقص، از طریق محدود کردن رشد و نمو تروفوبلاست، افزایش جذب فیبرین در چرخه اولیه جفتی و یا هر دو، می‌تواند باعث سقط مکرر شود (۲۲). غلظت پلاسمایی PAI-1، به پلی‌مورفیسم (4G/5G) ۶۷۵- مربوط است. هموزیگوتی برای ژنوتیپ حذف (4G/5G) با غلظت بالاتر PAI-1 نسبت به ژنوتیپ اضافه شدن (5G/5G) ارتباط دارد. بنابراین، باعث کاهش فعالیت فیبرینولیتیک می‌شود (۱۵). Guan و همکاران در چین نیز طی در مطالعه‌ای گسترده، پس از بررسی ۱۲۷ زن با حداقل سه سقط مکرر نامشخص در سه ماهه اول حاملگی و ۱۱۷ زن دارای حداقل یک بارداری بدون سابقه سقط یا دیگر عوارض شدید حاملگی (تشنج حاملگی، تولد نوزاد مرده)، در سال ۲۰۰۵ گزارش دادند که فراوانی ژنوتیپ 4G/4G و الل 4G در زنان دچار سقط مکرر، بیشتر از گروه کنترل است و نتیجه گرفتند که رابطه معنی‌داری بین ژنوتیپ 4G/4G و سقط مکرر اولیه وجود دارد (۱۶). Vora و همکاران در هند نیز پس از بررسی ۸ زن با سابقه سقط با علت نامشخص، در سال ۲۰۰۹ گزارش کردند که سه زن برای الل 4G هموزیگوت بودند که بررسی هیستومورفولوژیک بافت جفت در این سه زن، نشان دهنده وجود لخته در رگ و نکروز ناشی از وقفه در گردش خون به علت ایجاد لخته در بافت پرزها بود (۱۷).

Wolf و همکاران در آلمان، ارتباط بین عوامل دخیل در هیپوفیبرینولیز را با سقط مکرر مورد بررسی قرار دادند و در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند که ۵۱ درصد زنان دچار سقط مکرر و ۴۹ درصد زنان گروه کنترل برای جهش 4G در ژن PAI-1 هتروزیگوت و ۳۵ درصد زنان دچار سقط مکرر و ۳۱ درصد زنان گروه کنترل برای این جهش هموزیگوت هستند. با توجه به این نتایج، ارتباط معنی‌داری میان پلی‌مورفیسم 4G/5G در ژن PAI-1 و سقط مکرر وجود ندارد و سقط جنین با الل 4G مرتبط نیست (۱۸). Sotiriadis و همکاران در یونان، شیوع نقص‌های فیبرینولیتیک را در میان زنان دچار سقط مکرر و زنان گروه کنترل، مقایسه کرده و در سال ۲۰۰۷ گزارش کردند که پلی‌مورفیسم (4G/5G) PAI-1 و افزایش فعالیت مهارکننده فعال‌کننده پلاسمینوژن، ارتباط معنی‌داری با سقط مکرر ندارند (۱۹). Schenk و همکاران در آلمان، پلی‌مورفیسم (4G/5G) PAI-1 را در میان ۶۹ زن حامله دچار ترومبوز وریدی و ۳۹ زن حامله دچار سقط خود به خودی، مورد بررسی قرار دادند و در سال ۲۰۰۸ گزارش کردند که در مقایسه با گروه کنترل، فراوانی الل‌های 4G (ژنوتیپ 4G/4G یا 4G/5G) در زنان حامله دچار ترومبوز وریدی، به طور معنی‌داری بالاتر بود، در حالی که این فراوانی در زنان حامله دچار سقط با وجود این که بیشتر از گروه کنترل بود، به لحاظ آماری، معنی‌دار نبود. آن‌ها از این یافته‌ها نتیجه گرفتند که این ژنوتیپ‌ها در حاملگی، فقط با ترومبوز وریدی و نه با سقط، ارتباط دارند (۲۰). در مطالعه حاضر نیز از ۳۰ زن دچار سقط مکرر، ۱۸ نفر (۶۰٪) هتروزیگوت و ۵ نفر (۱۶/۷٪) هموزیگوت برای پلی‌مورفیسم 4G/5G بودند؛ در حالی که هیچ هموزیگوتی در میان زنان گروه کنترل مشاهده نشد. فراوانی الل 4G در زنان دچار سقط مکرر، ۴۶/۷ درصد و در زنان گروه کنترل، ۶۰ درصد بود. با توجه

به نسبت افراد واجد جهش 4G در ژن PAI-1 در دو گروه از زنان ایرانی مورد بررسی (۷۶/۷ درصد در زنان دچار سقط مکرر و ۸۰ درصد در زنان گروه کنترل) ارتباطی بین این جهش و سقط مکرر وجود ندارد.

در این مطالعه، با وجود این که شیوع پلی‌مورفیسم PAI-1 (4G/5G) در زنان دچار سقط مکرر، بیشتر از گروه کنترل است، این اختلاف به لحاظ آماری، معنی‌دار نیست. نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که این پلی‌مورفیسم نمی‌تواند توجیه کننده علت سقط مکرر در زنان مورد بررسی محسوب شود.

تقدیر و تشکر

از آقایان دکتر مهران آزاده و رضا پایون در بیمارستان فوق تخصصی بقیه‌ا...(عج) و نیز از کارشناسان مرکز تحقیقات بیولوژی- مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج) به ویژه خانم‌ها زهرا سفیری، فاطمه پورعلی و عذرا باقری که در انجام این مطالعه ما را یاری کردند و همچنین از همفکری‌های آقایان دکتر محمود جدی تهرانی و فخرالدین ریحانی ثابت در پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی ـ ابن سینا کمال تشکر و امتنان را داریم.

منابع مورد استفاده

1. Aruna, M., Reddy, B. M., 2006. Recurrent spontaneous abortions: An overview of the Genetic and Non-Genetic backgrounds. Int J Hum Genet 6: 109-117.
2. James, A. H., 2009. Venous thromboembolism in pregnancy. Arterioscler Thromb Vasc Biol 29: 326-31.
3. Kupferminc, M. J., 2003. Thrombophilia and pregnanc Reprod Biol Endocrinol 1: 111.
4. Sierra, S., Stephenson, M., 2006. Genetics of recurrent pregnancy loss. Seminars in reproductive medicine 24: 17-24.
5. Robertson, L., Wu, O., Langhorne, P., Twaddle, S., Clark, P., Lowe, G. D., Walker, I. D., Greaves, M., Brenkel, I., Regan, L., Greer, I. A., 2006. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. British journal of Haematology 132: 171-196.
6. Many, A., Schreiber, L., Rosner, S., Lessing, J. B., Eldor, A., Kupferminc, M. J., 2001. Pathologic features of the placenta in women with severe pregnancy complications and thrombophilia. Obstet Gynecol 98: 1041-1044.
7. Southern, D., Ens, G. E., 1995. “Normal Hemostasis.” In Rodak BF, *Dignostic Hematology*. WB. Sanders Company, Philadelphia, Ch. 32: 466-480.
8. Lawrence, D. A., Strandberg, L., Ericson, J., Ny, T., 1990. Structure-function studies of the SERPIN plasminogen activator inhibitor type 1. Analysis of chimeric strained loop mutants. The Journal of Biological Chemistry 265: 20293-20301.
9. Festa, A., D'Agostino, R., Rich, S. S., Jenny, N. S., Tracy, R. P., Haffner, S. M., 2003. Promoter (4G/5G) plasminogen activator inhibitor-1 genotype and plasminogen activator inhibitor-1 levels in blacks, Hispanics, and non-Hispanic whites. Circulation 107: 2422-2427.
10. Bosma, P. J., van den Berg, E. A., Kooistra, T., Siemieniak, D. R., Slightom, J. L., 1988. Human plasminogen activator inhibitor-1 gene. Promoter and structural gene nucleotide sequences. The Journal of Biological Chemistry 263: 9129-9141.
11. Dupont, D. M., Madsen, J. B., Kristensen, T., Bodker, J. S., Blouse, G. E., Wind, T., Andreasen, P.A., 2009. Biochemical properties of plasminogen activator inhibitor-1. Frontiers in bioscience 14: 1337-1361.
12. Healy, A. M., Gelehrter, T. D., 1994. Induction of plasminogen activator inhibitor-1 in HepG2 human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. The Journal of Biological Chemistry 269: 19095-19100.
13. Orfeo, T., Jenny, N. S., Everse, S. J., Mann, K. G., 2004. "Blood Coagulation and Fibrnolysis." In Greer, JP, Foerster, J, Lukens, JN, Rodgers, GM, Paraskevas, F. and Glader, B. *Wintrobe’s Clinical Hematology*, 11th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia,Vol. 1, Ch. 21: 679-740.
14. Dupont, D. M., Madsen, J. B., Kristensen, T., Bodker, J. S., Blouse, G. E., Wind, T., Andreasen, P. A., 2009. Biochemical properties of plasminogen activator

inhibitor-1. Frontiers in Bioscience 14: 1337-1361.
15. Dossenbach-Glaninger, A., van Trotsenburg, M., Dossenbach, M., Oberkanins, C., Moritz, A., Krugluger, W., Huber, J., Hopmeier, P., 2003. Plasminogen activator inhibitor 1 4G/5G polymorphism and coagulation factor XIII Val34Leu polymorphism: impaired fibrinolysis and early pregnancy loss. Advances in Clinical Chemistry 49: 1081-1086.
16. Guan, L. X., Du, X. Y., Wang, J. X., Gao, L., Wang, R. L., Li, H. B., Wang, S. X. , 2005. Association of genetic polymorphisms in plasminogen activator inhibitor-1 gene and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene with recurrent early spontaneous abortion. Chinese Journal of Medical Genetics 22: 330-333.
17. Vora, S., Shetty, S., Khare, M., Ghosh, K., 2009. Placental histomorphology in unexplained foetal loss with thrombophilia. The Indian journal of Medical Research 129: 144-149.
18. Wolf, C. E., Haubelt, H., Pauer, H. U., Hinney, B., Krome-Cesar, C., Legler, T. J., Hellstern, P., Emons, G., Zoll, B., Köhler, M., 2003. Recurrent pregnancy loss and its relation to FV Leiden, FII G20210A and polymorphisms of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor. Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis 33: 134-137.
19. Sotiriadis, A., Makrigiannakis, A., Stefos, T., Paraskevaidis, E., Kalantaridou, S. N., 2007. Fibrinolytic defects and recurrent miscarriage: a systematic and meta-analysis. Obstetrics and Gynecology 109: 1146-1155.
20. Schenk, J. F., Stephan, B., Zewinger, S., Speer, T., Pindur, G., 2008. Comparison of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G gene polymorphism in females with venous thromboembolism during pregnancy or spontaneous abortion. Clinical Hemorheology and Microcirculation 39: 329-332.
21. Miller, S. A., Dykes, D. D., Polesky, H. F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 16: 1215.
22. Gris, J. C., Neveu, S., Mares, P., Biron, C., Hedon, B., Schved, J. F., 1993. Plasma fibrinolytic activators and their inhibitors in women suffering from early recurrent abortion of unknown etiology. J Lab Clin Med 122: 606-615.