

بررسی ارتباط پلی مورفیسم ژن مهارکننده فعال کننده پلازمینوژن-۱

(PAI-1) با سقط مکرر جنین

فاطمه شاکرمی^{۱*}، دکتر محمد تقی اکبری^۲، دکتر شهره زارع کاریزی^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان، رشت

۲. عضو هیأت علمی گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۳. آزمایشگاه ژنتیک پزشکی تهران- دکتر اکبری، خیابان طالقانی، پلاک ۲۵۱

۴. استادیار ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پیشوا، ورامین

چکیده

سابقه و هدف: منظور از سقط تکراری، وقوع ۲ یا ۳ بار سقط متوالی خود به خودی، قبل از هفته ۲۰ می باشد. با توجه به شیوع حدود ۵٪ سقط در زنان، اثرات مخرب روانی سقط بر زندگی خانوادگی افراد و اینکه علت بخشی از این سقطها مشکلات انعقادی است، در این مطالعه، پلی مورفیسم ژن مهارکننده فعال کننده پلازمین-۱ (PAI-1) مورد بررسی قرار گرفت و ارتباط آن با سقط خود به خودی در بیماران ایرانی و گروه کنترل سالم مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه ی مورد-شاهدی، ۱۰۰ بیمار با سابقه ی سقط (حداقل دو بار) به عنوان گروه بیمار و ۱۰۰ زن سالم با حداقل دو زایمان موفق و بدون سابقه ی سقط به عنوان گروه کنترل، مورد مطالعه قرار گرفتند. استخراج DNA از لوكوسیت ها و با روش نمک اشباع، انجام شد. برای بررسی پلی مورفیسم های (4G/5G) PAI-1 واکنش زنجیره ی پلیمرز انجام و حضور یا عدم حضور موتاسیون PAI-1 (4G/5G) توسط روش PCR-RFLP بررسی شد. به منظور تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۸ و از آزمون مربع کای استفاده و ارزش احتمال $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته ها: در مطالعه ی حاضر، برای بررسی پلی مورفیسم PAI-1 (4G/5G)، فراوانی آلل موتانت 4G در زنان دچار سقط مکرر، ۴۲٪ و در زنان گروه شاهد، ۳۰٪ به دست آمد، که نشان دهنده ی افزایش معنی دار ($P = 0.012$) آلل 4G در جمعیت بیمار نسبت به گروه کنترل بود (میزان خطر نسبی در جمعیت: ۱/۸۳). نتایج در مورد ژنوتیپ 4G/4G با فراوانی ۱۷٪ در گروه بیمار، ۵٪ در گروه شاهد و $P = 0.006$ (میزان خطر نسبی: ۴/۶۳) نیز نشان دهنده ی افزایش معنی دار ژنوتیپ 4G/4G در گروه بیماران بود.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج حاصل به نظر می رسد خانم های دارای سقط مکرر، در مواجهه ی بیشتر با آلل 4G و ژنوتیپ 4G/4G هستند. از این رو، بررسی وجود این جهش همراه با سایر عوامل مشکوک مثل MTHFR، فاکتور ۵ لایدن در بیماران مبتلا به سقط مکرر، توصیه می شود.

واژگان کلیدی: سندرم سقط مکرر جنین، ترومبوفیلیا، مهارکننده فعال کننده پلازمین-۱، PCR-RFLP

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Shakarami F, Akbari MT, Zare Karizi S. Association of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) polymorphisms with recurrent pregnancy loss. *Pejouhandeh* 2014;18(6):305-309.

مقدمه

سقط تکراری وقوع ۲ یا ۳ بار سقط متوالی خود به خودی، قبل از هفته ی بیستم می باشد (۱ و ۲). پنجاه درصد از موارد سقط تکراری شامل علل آناتومیک، ایمونولوژیک، ژنتیک، آندوکراین، ترومبوفیلیک و فاکتورهای محیطی می باشد. با این حال، در ۵۰ درصد موارد، علت سقط نامشخص است (۳). از آنجا که بیش از نیمی از موارد سقطهای تکراری با علت نامشخص با اختلالات ترومبوفیلی در ارتباط می باشند، آنالیز

سقط، یکی از شایع ترین عوارض حاملگی است و به مواردی اطلاق می گردد که تا قبل از هفته ی ۲۰ حاملگی به دلایل مختلف مادری و جنینی، حاملگی خاتمه می یابد و منظور از

*نویسنده مسؤول مکاتبات: فاطمه شاکرمی؛ گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، تلفن همراه: ۰۹۱۲۲۰۶۳۵۲۹، فکس: ۰۴۴۱-۲۳۶۹۷۱۶، پست الکترونیک: shahkarami_fatemeh@yahoo.com

مواد و روش‌ها

در این مطالعه‌ی مورد-شاهدی، ۱۰۰ بیمار با سابقه‌ی حداقل دو سقط خودبخودی به عنوان گروه نمونه و ۱۰۰ خانم دارای حداقل ۲ تولد موفق و بدون هیچ تاریخچه‌ای از سقط، اندومتريوز و یا ناباوری به عنوان گروه شاهد، مورد مطالعه قرار گرفتند. بیماران گروه نمونه، ابتدا از بابت عوامل شناخته شده‌ی دخیل در سقط مکرر جنین مانند عوامل آناتومیک، عوامل ایمنولوژیک، عوامل عفونی، عوامل مرتبط با سیستم اندوکرینی و کاربوتیپ، مورد بررسی قرار گرفته و در تمام موارد سنجیده شده، نرمال بودند. محدوده سنی گروه بیمار، بین ۲۰-۴۵ سال و تعداد سقط‌های مکرر این گروه، بین ۲-۶ مورد بود. همچنین، محدوده سنی گروه شاهد بین ۲۲-۵۰ سال و تعداد بارداری‌های موفق این گروه بین ۲-۶ مورد بود. افراد شرکت کننده در گروه بیمار، از میان افراد مبتلا به سقط مکرر جنین که به آزمایشگاه ژنتیک پزشکی تهران (دکتر اکبری) مراجعه داشتند، انتخاب شدند. همچنین، از تمام افراد مورد مطالعه پس از دادن آگاهی، رضایت‌نامه دریافت شد.

تعیین ژنوتیپ: در این تحقیق از کلیه‌ی افراد مورد مطالعه ۵ میلی‌لیتر خون محیطی در لوله‌های حاوی EDTA اخذ گردید. استخراج DNA ژنومی به روش نمک اشباع انجام شد. پس از آن تکثیر قطعه‌ی ژنی مورد نظر توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) و پرایمرهای اختصاصی، مستقیم-معکوس 5'-CACAGAGAGAGTCTGGACACGTGA3' و 3'-TGCAGCCAGCCACGTGATTGTCTAG3' انجام گرفت (۶). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۸۰ نانوگرم DNA ژنومیک، ۳ میکرولیتر 10X PCR Buffer، ۰/۲۵ میلی‌مولار از هر dNTPs، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۵ تا ۷ پیکومول از هر پرایمر و ۰/۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (سیناژن، ایران) صورت گرفت. تکثیر در ۳۰ سیکل، دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، ۶۹ درجه سانتی‌گراد ۵۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه انجام شد. دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و طویل‌سازی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. محصول اصلی PCR ژن PAI-1 که ۱۴۸ bp طول دارد، محلی برای برش آنزیم محدود کننده BseRI ندارد، ولی تغییر در میان پنج گوانوزین متوالی در ناحیه‌ی پروموتوری و تبدیل آن به ۴ گوانوزین، باعث ایجاد جایگاه برش شده و آنزیم می‌تواند دو قطعه (۳۸ bp و ۱۱۰ bp) ایجاد کند. محصولات PCR پس از هضم آنزیمی توسط آنزیم Bse RI (Biolabs, New

پلی مورفیسم ژن‌های مؤثر در ترومبوفیلی باید در موارد مختلفی مورد مطالعه قرار گیرد.

مهارکننده‌ی فعال کننده‌ی پلاسمینوژن-۱ به عنوان یک گلیکوپروتئین (با وزن مولکولی ۵۰ کیلو دالتون) نقش بسیار مهمی در ممانعت از واکنش‌های فیبرینولیز دارد. تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین به عنوان مرحله‌ای مهم در روند انحلال لخته بوده و توسط فعال کننده‌هایی نظیر فعال کننده‌های پلاسمینوژن بافتی (t-PA) و فعال کننده‌های پلاسمینوژن یوروکیناز (u-PA) تنظیم می‌شود (۴). مهارکننده‌ی فعال کننده‌ی پلاسمینوژن-۱، سریع‌ترین مهارکننده‌ی t-PA بوده و میزان تشکیل لخته در سیستم انعقادی را تنظیم می‌کند. اخیراً نشان داده شده است که غلظت پلاسمایی و جفتی مهارکننده‌ی فعال کننده‌ی پلاسمینوژن-۱ در زنان با سابقه‌ی پره اکلامپسی در مقایسه با زنان سالم و بارور، زیادتر بوده و افزایش سطح پلاسمایی مهارکننده‌ی فعال کننده‌ی پلاسمینوژن-۱ منجر به کاهش فعالیت فیبرینولیز می‌شود (۴).

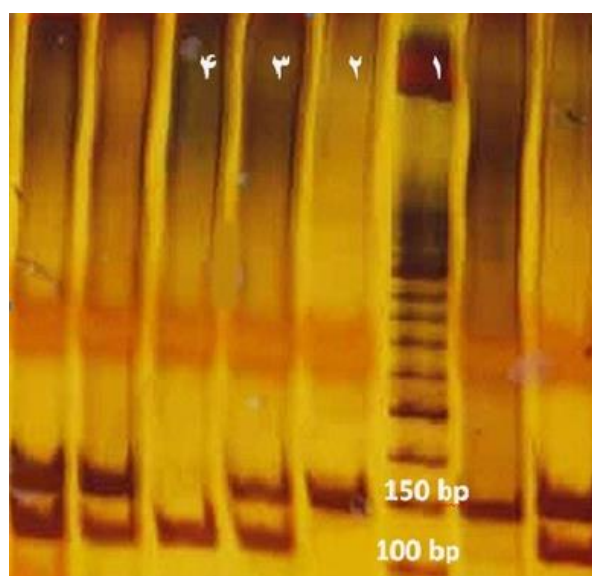
ژن مهارکننده‌ی فعال کننده‌ی پلاسمینوژن-۱ از ۹ اگزون ساخته شده و در حدود ۱۲ کیلو باز طول دارد و بر روی کروموزوم شماره ۷ در موقعیت q21.3-q22 قرار گرفته است. پلی مورفیسم شایع در منطقه‌ی پروموتوری ژن PAI-1 به وضوح با تغییر سطح آن همراه است. این پلی مورفیسم، یک تغییر در میان پنج گوانوزین متوالی در ناحیه ۶۷۵ bp قبل از سایت رونویسی و تبدیل آن به ۴ گوانوزین بوده و منجر به افزایش تولید PAI-1 در پاسخ به محرک‌های مختلف می‌شود (۷).

به طور طبیعی، بیان ژن PAI-1 توسط آلل 5G/5G صورت می‌گیرد. هموزیگوت بودن آلل 4G در ژن PAI-1 در منطقه‌ی پروموتور با افزایش رونویسی از ژن همراه بوده و منجر به افزایش بیان ژن می‌شود. مقدار بالای PAI-1 تولید شده در اثر آلل 4G می‌تواند سبب افزایش تولید لخته شود، چرا که در سیستم فیبرینولیز و انعقاد، اختلال ایجاد شده و می‌تواند باعث ترومبوز مکرر و پیر شدن زودرس جفت شود (۷).

مطالعات زیادی به بررسی ارتباط پلی مورفیسم ژن PAI-1 با سقط مکرر جنین در جمعیت‌های مختلف غیر ایرانی و ایرانی (به طور محدود)، پرداخته و نتایج متناقضی از این مطالعات حاصل شده است. به همین دلیل، بررسی این پلی مورفیسم‌ها بار دیگر پیشنهاد می‌شود تا در صورت شیوع بالای آن در این منطقه، از آن به عنوان نشانگر تشخیصی در خانم‌هایی که دارای سقط مکرر جنین می‌باشند، استفاده شود.

رنگ‌آمیزی با نیترات نقره نتایج حاصله آنالیز گردید.

(England). روی ژل آکریل آمید ۱۲٪ برده شد و پس از



شکل ۱. نتایج حاصل از الکتروفورز هضم آنزیمی ژن PAI-1 بر روی ژل پلی آکریل آمید. چاهک ۱: مارکر اندازه‌گیری DNA، چاهک ۲: هموزیگوت 5G/5G، چاهک ۳: هتروزیگوت 4G/5G، چاهک ۴: هموزیگوت.

است که فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده در گروه‌های مورد مطالعه، از تعادل هاردی-واینبرگ تبعیت می‌کند. با توجه به نتایج مشاهده شده در الکتروفورز محصول RFLP، ژنوتیپ هر فرد برای پلی‌مورفیسم 4G/5G ژن PAI-1 مشخص شد. در مطالعه‌ی حاضر، فراوانی آلل موتانت 4G در زنان دچار سقط مکرر، ۴۲ درصد و در زنان گروه شاهد، ۳۰ درصد بود که نشان می‌دهد آلل 4G در جمعیت بیمار نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری ($P=0/012$) دارد و میزان خطر نسبی برای آن در جمعیت، تقریباً $1/83$ می‌باشد. این نتایج در مورد ژنوتیپ 4G/4G با فراوانی ۱۷ درصد در گروه بیمار و ۵ درصد در گروه شاهد، $P=0/006$ و میزان خطر نسبی $4/63$ نیز صدق می‌کند.

تحلیل آماری: مشاهدات وارد نرم افزار SPSS (نگارش ۱۸) شد. توزیع ژنوتیپ‌های هر موتاسیون، فرکانس هموزیگوت و هتروزیگوت در دو گروه بیمار و شاهد با استفاده از مربع کای مورد سنجش قرار گرفت. P-value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. بنابراین P-value و نسبت خطر (Odds Ratio) برای هر گروه محاسبه گردید.

یافته‌ها

در این تحقیق، پلی‌مورفیسم ژن (4G/5G) PAI-1 در ۱۰۰ خانم که حداقل ۲ تولد موفق داشتند و ۱۰۰ خانم مبتلا به سقط مکرر، با استفاده از روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از فراوانی اللی و ژنوتیپی برای چند شکلی ژن PAI-1 در جدول ۱، آورده شده است. لازم به ذکر

جدول ۱. فراوانی ژنوتیپی، اللی و بررسی سطح معنی‌داری برای پلی‌مورفیسم PAI-1(4G/5G) در گروه مورد و شاهد.

فراوانی اللی در کل افراد مطالعه شده				
شاهد (%)	بیمار (%)	OR (95% CI)	P-value	
۱۴۰ (۷۰)	۱۱۶ (۵۸)	۱	-	5G
۶۰ (۳۰)	۸۴ (۴۲)	۱/۶۹ (۱/۱۱-۲/۵۵)	۰/۰۱۲۷	4G
فراوانی ژنوتیپ در کل افراد مطالعه شده				
شاهد (%)	بیمار (%)	OR (95% CI)	P-value	
۴۵ (۴۵)	۳۳ (۳۳)	۱	-	5G/5G
۵۰ (۵۰)	۵۰ (۵۰)	۱/۳۶ (۰/۷۵-۲/۴۷)	۰/۳	5G/4G
۵ (۵)	۱۷ (۱۷)	۴/۶۳ (۱/۵۵-۱۳/۸۴)	۰/۰۰۶	4G/4G

بحث

فعال کننده‌ی مهارکننده‌ی پلاسمینوژن-۱، یک سرین پروتئاز است که بخشی از آبشار آنزیم تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین را تشکیل می‌دهد. به نظر می‌رسد، u-PA، گیرنده‌ی PAI-1 و u-PA، پروتئولیز و بازسازی بافت مادر را طی تهاجم تروفوبلاستی بر عهده دارند. در بارداری‌های موفق، این سیستم شدیداً برای ایجاد تعادل مناسب بین تشکیل ماتریکس خارج سلولی و فیبرین، تحت کنترل و تنظیم است. به علاوه، لخته‌های خونی درون وریدی و افزایش فیبرین فضای بین پرزهای جفت، از جمله یافته‌های مورفولوژیک رایجی در بافت‌های سقط خود به خودی هستند که اختلال در هموستاز را نشان می‌دهند (۹). از این رو، بررسی چند شکلی‌های ژن PAI-1 در زنان مبتلا به سقط مکرر بدون علت، امکان کشف ارتباط این چندشکلی‌ها با سقط مکرر را فراهم می‌سازد.

در مطالعه‌ی حاضر، فراوانی الل موتانت 4G در زنان دچار سقط مکرر، ۴۲ درصد و در زنان گروه شاهد، ۳۰ درصد بود که نشان می‌دهد الل 4G در جمعیت بیمار نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری ($P=0/012$) دارد. این ارتباط معنی‌دار در مورد ژنوتیپ 4G/4G با $P=0/006$ نیز صدق می‌کند. نتایج حاصل مبنی بر ارتباط معنی‌دار بین پلی مورفیسم 4G/4G ژن PAI-1 و سقط مکرر توسط دو مطالعه‌ی قبلی انجام شده در ایران نیز تأیید می‌شوند. این دو مطالعه، شامل مطالعه‌ی انجام گرفته توسط سلطان قرایی و همکاران در سال ۲۰۰۷ و مطالعه‌ی انجام گرفته توسط اعرابی و همکاران در سال ۲۰۱۱ می‌باشند (۱۰). این ارتباط معنی‌دار در مطالعه‌ی Goodman و همکاران (آمریکا، ۲۰۰۹)، Guan و همکاران (چین، ۲۰۰۵)، Al Sallout و همکاران (نوار غزه، ۲۰۱۱) نیز مشاهده شده است (۱۳ و ۱۴).

در مقابل، مطالعات دیگری از جمله مطالعات انجام شده توسط Dossenbach-Glaning و همکاران (۲۰۰۳، اتریش)، Ivanov و همکاران (۲۰۱۱، بلغارستان) و دو مطالعه‌ی انجام گرفته توسط Coulam و همکاران در سال‌های ۲۰۰۶ و ۲۰۰۸ در آمریکا می‌باشند که ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ 4G/4G با سقط مکرر جنین نشان نمی‌دهند (۱۵).

در واقع در مطالعات انجام شده در ارتباط با پلی مورفیسم PAI-1 4G/5G و سقط مکرر، حتی در مطالعات انجام گرفته در یک کشور نیز تناقضاتی در نتایج یافت می‌شود. مثالی از این تناقضات، مطالعه‌ی Wolf و همکاران در آلمان است که ارتباط بین عوامل دخیل در هیپوفیبرینولیز را با سقط مکرر،

مورد بررسی قرار داده و در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند که ۵۱ درصد از زنان دچار سقط مکرر و ۴۹ درصد از زنان گروه کنترل برای موتاسیون 4G در ژن PAI-1، هتروزیگوت و ۳۵ درصد از زنان دچار سقط مکرر و ۳۱ درصد از زنان گروه کنترل برای این موتاسیون، هموزیگوت هستند. با توجه به این نتایج، ارتباط معناداری میان پلی مورفیسم 4G/5G در ژن PAI-1 و سقط مکرر گزارش نکردند (۱۱).

با این حال، در مطالعه‌ی دیگری که در سال ۲۰۰۸، Schenk و همکاران در آلمان انجام دادند، گزارش کردند که در مقایسه با گروه کنترل، فراوانی الل‌های 4G (ژنوتیپ 4G/4G یا 4G/5G) در گروه بیمار، به طور معناداری بالاتر بود (۱۲). این امر احتمالاً مربوط به تفاوت در جمعیت مورد مطالعه، زمینه‌های ژنتیکی، تعداد گروه مورد مطالعه، رانش ژنی، مهاجرت جمعیت‌ها یا انتخاب طبیعی است.

به همین منظور، جهت بررسی دقیق‌تر این فاکتورها و ارتباط آن با سقط مکرر جنین، در مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود که نمونه‌های انتخابی حتی المقدور از مناطق مشابهی انتخاب گردند و یا اینکه پس زمینه‌ی ژنتیکی نمونه‌های شاهد و بیمار با هم مشابهت داشته باشد. عوامل محیطی خطر ساز شناخته شده برای سقط مکرر، مانند استفاده از دخانیات، BMI در پرسشنامه‌ی بیمار لحاظ گردد و ریسک آن با بیماری نیز محاسبه گردد.

نتیجه‌گیری

عملکردهای بیولوژیک PAI-1 در تنظیم فعالیت فیبرینولیتیک در تشکیل جفت و تهاجم تروفوبلاست در دوران بارداری انسان مهم هستند. نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر نیز وجود الل 4G و ژنوتیپ 4G/4G را به عنوان فاکتور مؤثر در سقط نشان می‌دهد.

با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر و مطالعات پیشین انجام گرفته در ایران بر روی ارتباط این فاکتور و سقط مکرر جنین و پاتوژن ارتباط این فاکتور با سقط مکرر، فرضیه‌ی مرتبط بودن این فاکتور با سندرم سقط مکرر در جمعیت ایران کماکان پا برجاست. به همین منظور جهت بررسی دقیق‌تر این فاکتور و ارتباط آن با سقط مکرر جنین، انجام مطالعات بیشتر و مطالعه‌ی COHORT (هم‌گروهی) پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

این پروژه با حمایت مالی آزمایشگاه ژنتیک پزشکی تهران انجام شد. نویسندگان مقاله از زحمات فراوان کارشناسان

می‌نمایند. لازم به ذکر است رضایت‌نامه‌ی کتبی از بیمار، مبنی بر انتشار این مقاله اخذ شده است.

محترم آزمایشگاه ژنتیک پزشکی تهران- دکتر اکبری برای همکاری صمیمانه در اجرای این طرح، تشکر و قدردانی

REFERENCES

1. Tulandi T, Al-Fozan HM. Definition and etiology of recurrent pregnancy loss. 2011; Available from: <http://www.uptodate.com/contents/definition-and-etiology-of-recurrent-pregnancy-loss>.
2. Christiansen OB, Nielsen HS, Kolte A, Pedersen AT. Research methodology and epidemiology of relevance in recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2006;24(1):5-16.
3. Franssen MT, Korevaar JC, Leschot NJ, Bossuyt PM, Knekt AC, Gerssen-Schoorl KB. Selective chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: case-control study. *BMJ* 2005;331(7509):137-41.
4. Kuhli C, Luchtenberg M, Scharrer I, Hattenbach LO. Massive subhyaloidal hemorrhage associated with severe PAI-1 deficiency. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005;243:963-6.
5. Yepes M, Loskutoff DJ, Lawrence DA. Plasminogen activator inhibitor-1. In: Coleman RW, Marder VJ, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2006. p. 365-80.
6. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16(3):1215-20.
7. Festa A, D'Agostino RJr, Rich SS, Jenny NS, Tracy RP, Haffner SM. Promoter (4G/5G) plasminogen activator inhibitor-1 genotype and plasminogen activator-1 levels in blacks, Hispanics and non Hispanic whites: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Circulation* 2003;20:2422-7.
8. Buchholz T, Lohse P, Rogenhofer N, Kosian E, Pihusch R, Thaler CJ. Polymorphisms in the ACE and PAI-1 genes are associated with recurrent spontaneous miscarriages. *Hum Reprod* 2003;18:2473-7.
9. Dossenbach-Glaninger A, van Trotsenburg M, Dossenbach M, Oberkanins C, Moritz A, Krugluger W, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and coagulation factor XIII Val34Leu polymorphism: impaired fibrinolysis and early pregnancy loss. *Clin Chem* 2003;49(7):1081-6.
10. Aarabi M, Memariani T, Arefi S, Aarabi M, Hantoosh Zadeh S, Akhondi MA, et al. Polymorphisms of plasminogen activator inhibitor-1, angiotensin converting enzyme and coagulation factor XIII genes in patients with recurrent spontaneous abortion. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011;24:545-8.
11. 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.
12. Schenk JF, Stephan B, Zewinger S, Speer T, Pindur G. Comparison of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G gene polymorphism in females with venous thromboembolism during pregnancy or spontaneous abortion. *Clin Hemorheol Microcirc* 2008;39(1-4): 329-32.
13. Goodman C, Hur J, Goodman CS, Jeyendran RS, Coulam C. Are polymorphisms in the ACE and PAI-1 genes associated with recurrent spontaneous miscarriages? *Am J Reprod Immunol* 2009;62:365-70.
14. Al Sallout RJ, Sharif FA. Polymorphisms in NOS3, ACE and PAI-1 genes and risk of spontaneous recurrent miscarriage in the Gaza Strip. *Med Princ Pract* 2010;19:99-104.
15. Su MT, Lin SH, Chen YC, Kuo PL. Genetic association studies of ACE and PAI-1 genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Thromb Haemost* 2012;109(1):8-15.