پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال بیست و یکم، شماره ۱، پی‌درپی ۱۰۹، صفحات ۶ تا ۱۲
فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۵

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۳/۲۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۲/۱

ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های ژنی *VEGF* (2578C/A) و رسپتور آن *KDR* (Q472H) در زنان مبتلا به سقط مکرر خودبخودی

فرشته بهرامی هیدجی[1]، دکتر گلناز اسعدی تهرانی[2]*

۱. کارشناسی ارشد زیست شناسی ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، گروه ژنتیک، زنجان، ایران
۲. PhD ژنتیک مولکولی، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، گروه ژنتیک، زنجان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: فاکتور رشد اندوتلیال رگی (VEGF) و گیرنده واجد دومین کینازی آن (KDR) به منظور فرایند رگ‌زایی و تکامل جنینی واجد اهمیت حیاتی می‌باشند. با این وجود، اطلاعات محدودی پیرامون نقش سیستم VEGF، به خصوص گیرنده KDR در سقط مکرر خودبخودی (RPL) در دسترس است. از این رو هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی تعیین ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های ژن‌های *VEGF* و *KDR* با سقط مکرر خودبخودی با علت ناشناخته می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه‌ی مورد- شاهدی، ۵۰ خانم با سابقه‌ی حداقل دو سقط مکرر با علت نامشخص به عنوان گروه بیمار و ۵۰ خانم بدون سابقه‌ی سقط مکرر و دارای حداقل دو بارداری موفق به عنوان شاهد در استان تهران انتخاب شدند. پلی مورفیسم 2578C/A برای ژن *VEGF* و پلی مورفیسم Q724H برای ژن *KDR* به ترتیب از طریق روش‌های Tetra-primer-ARMS-PCR و PCR-RFLP تعیین ژنوتیپ شدند. نتایج به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) و مربع کای، مورد آنالیز قرار گرفتند.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپ‌های AC، CC و AA در پلی‌مورفیسم VEGF در گروه‌های شاهد و مورد به ترتیب ۵۶ ، ۲۰ و ۲۴ درصد و ۲۶، ۴۶ و ۲۸ درصد محاسبه گردید ($P<0/003$) و در پلی‌مورفیسم KDR مقادیر ژنوتیپ‌های AA، AT و TT گروه شاهد ۴۲، ۱۶ و ۴۲ درصد و در گروه مورد به‌ترتیب ۳۰، ۶۸ و ۲ درصد بود ($P<0/009$).

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد که پلی‌مورفیسم‌های 2578C/A و Q472H در ژن *VEGF* و گیرنده‌ی آن *KDR* با سقط مکرر خودبخودی در خانم‌های ایرانی در ارتباط هستند.

واژگان کلیدی: سقط مکرر خودبخودی (RPL)، ژن VEGF، رسپتور KDR

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:
Bahrami Hidaji F, Asaadi Tehrani G. Association between the *VEGF* (2578C/A) and *KDR* (Q724H) gene polymorphisms and recurrent spontaneous abortion *VEGF* and *KDR* gene polymorphisms and recurrent spontaneous abortion. Pejouhandeh 2016;21(1):6-12.

مقدمه

سقط مکرر خودبخودی (Recurrent spontaneous abortion-RSA) به از دست رفتن تکراری محصول لقاح، پیش از هفته ۲۰ بارداری اطلاق می‌گردد. در حدود ۲۰-۱۵٪ از بارداری‌های تشخیص داده شده از نظر بالینی، به‌صورت خودبخودی در سه ماهه‌ی اول سقط می‌گردند. علت اصلی سقط مکرر، نقایص کروموزومی جنین است، به‌طوری‌که در ۵۰ تا ۶۰ درصد از موارد با آنیوپلوئیدی‌های کروموزومی جنین همراه می‌باشد. از دیگر موارد می‌توان به اختلالات رحمی، عفونت‌ها، علل هورمونال یا اندوکراین، اختلال در فاکتورهای ایمونولوژیک، ترومبوفیلی ارثی و اکتسابی یا عوامل محیطی و تغذیه‌ای اشاره نمود. با این وجود، در بیش از ۵۰٪ از موارد علل سقط از نظر اتیولوژیک ناشناخته است. سطح سرمی b-hCG و فاکتورهای سونوگرافی مثل ضربان قلب جنینی جهت پیش‌آگهی و تشخیص سقط خودبخودی، مورد بررسی قرار می‌گیرند (۲،۱).

برخی مطالعات به خصوص حاکی از ارتباط ژن‌ها با سقط مکرر خودبخودی هستند. یکی از مهمترین این ژن‌ها، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular Endothelial Growth Factor-VEGF) می‌باشد که یک گلیکوپروتئین اتصالی به

*نویسنده مسؤول مکاتبات: دکتر گلناز اسعدی تهرانی؛ زنجان، اعتمادیه، خیابان معلم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، دانشکده علوم پایه و پزشکی، گروه ژنتیک؛ کد پستی: ۴۵۱۵۶۱۴۵؛ شماره فکس: ۳۳۴۲۱۱۹۲ (۰۲۴)، تلفن: ۰۹۱۲۵۷۰۶۷۱۹؛ پست الکترونیک: Golnaz_ asaadi @yahoo.com

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-05-06]

هپارین بوده و نقش مهمی در تکامل جنین و توسعه‌ی رگ‌سازی جفت ایفا می‌کند (۳). رگ‌زایی (Angiogenesis) به رشد و تکامل عروق خونی از طریق جوانه زدن از سلول‌های اندوتلیال عروق اطلاق می‌شود (۴) که در افراد سالم و بالغ، پدیده‌ای نادر بوده و فقط به صورت موضعی و موقت، تحت شرایط فیزیولوژیک مشخص همانند ترمیم زخم‌ها، التهاب و چرخه‌ی جنسی زنان صورت می‌گیرد (۵). سلول‌های اصلی دخیل در این فرآیند، سلول‌های اندوتلیالی هستند که عروق خونی را پوشانده و تقریباً تمامی ساختار مویرگ‌ها را تشکیل می‌دهند. به منظور تشکیل عروق خونی جدید، ابتدا سلول‌های اندوتلیال از طریق شکافتن غشای پایه از محل همیشگی خود جدا شده و سپس به سمت ترکیبات محرک آنژیوژنز که از سلول‌های توموری، لنفوسیت‌های فعال شده و یا ماکروفاژهای موجود در محل جراحت ترشح می‌شوند، حرکت می‌نمایند. در غشای پایه سلول‌های اندوتلیال تکثیر می‌شوند تا سلول‌های مورد نیاز جهت تشکیل عروق خونی جدید را فراهم سازند (۶).

فاکتور رشد اندوتلیال رگی در زنان، نقش ویژه‌ای در بیولوژی تخمدان ایفا می‌نماید و در بیماری‌های تخمدان مثل سرطان بدخیم تخمدان مؤثر است (۷). همچنین در مراحل جنینی در توسعه‌ی رگ‌سازی جفت و رشد رگ‌های خونی مادر و جنین در رحم مؤثر است (۹،۸). به‌علاوه، نقش‌های مهمی در بلوغ تخمک، تکثیر تروفوبلاست‌ها و لانه‌گزینی جنین در اوایل بارداری ایفا می‌کند (۱۰). رگ‌زایی پرزهای کوریونی با توسعه‌ی جنینی در ارتباط است و کاهش سطح VEGF تروفوبلاستی جفت در اندومتریوم دزیدوال در سقط خودبخودی مشاهده شده است. VEGF القاکننده‌ی تکثیر و تهاجم سلول‌های اندوتلیال، افزایش‌دهنده‌ی نفوذپذیری عروق، کاهش دهنده‌ی آپوپتوز در سلول‌های اندوتلیال و تحریک‌کننده‌ی پروتئولیز استرومال می‌باشد (۱۲،۱۱).

خانواده‌ی VEGF شامل فاکتورهای رشد جفت VEGF-A، VEGF-B، VEGF-C، VEGF-D و VEGF-E بوده، که در این بین VEGF-A مهمترین فاکتور رگ‌زایی به‌شمار می‌رود. VEGF-A روی کروموزوم 6q21.3 واقع شده و شامل ۸ اگزون و ۷ اینترون می‌باشد (۱۳،۱۲). VEGF و رسپتورهای آن شامل VEGFR1/Flt-1 و VEGFR2/KDR/Flk-1 نقش اساسی در توسعه‌ی رگ‌زایی جنین و جفت ایفا می‌کنند. مشخص شده است که در موش‌های فاقد بیان ژن *VEGF* یا یکی از دو گیرنده، در نتیجه‌ی رگ‌زایی ناکافی داخل رحمی، می‌میرند. با وجود این‌که نقش بیولوژیکی VEGF از طریق این دو گیرنده ایفا می‌شود، تصور می‌شود که کنش بین VEGF و KDR به‌علت فعالیت تیروزین‌کینازی آن و وساطت در اثرکردهای رگ‌زایی پایین‌دست، از اهمیت بیشتری برخوردار باشد. مطالعات ژنتیکی روی سیستم VEGF/KDR در زمینه‌هایی چون سرطان سینه، بیماری‌های عروق کرونر، فوق حساسیت مسیرهای هوایی/ آتروفی، پسوریازیس، بیماری کاواسکی و تخریب عضلانی انجام گرفته است، اما در زمینه‌ی سقط مکرر خودبخودی با علت ناشناخته، هنوز نتیجه‌ی مطالعات، متناقض می‌باشد (۱۴).

با توجه به اهمیت رگ‌زایی در اوایل دوران بارداری و تشکیل جفت، فرضیه‌ی تحقیق حاضر بر این اساس بود که خانم‌های حامل آلل پرخطر ژن‌های *VEGF* و یا *KDR* با احتمال بیشتری مستعد ابتلا به سقط جنین خواهند بود. تغییر در عملکرد KDR باعث نقص در بازده‌ی اتصال VEGF به آن، تغییر در مسیرهای سیگنالی پایین‌دست و تداخل با بارداری می‌شود. تاکنون چندین SNP متداول و مؤثر در کارکرد ژن‌های *VEGF* و *KDR* شناسایی شده است که باتوجه به عملکردشان در کارکرد و بیان این ژن‌ها، به نظر می‌رسد که در پاتوژنز RSA دخیل می‌باشند و درصورت تأیید نقششان می‌توانند به‌عنوان یک مارکر تشخیصی مهم جهت پیش‌گیری از سقط جنین مورد استفاده قرار گیرند. از این جهت در مطالعه‌ی حاضر، ارتباط بین پلی‌مورفیسم 2578C/A در ژن *VEGF* و پلی‌مورفیسم Q472H در رسپتور *KDR* با سقط مکرر خودبخودی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه‌ی مورد- شاهدی، ۵۰ خانم با سابقه‌ی سقط مکرر خودبخودی با علت نامشخص، به عنوان گروه بیمار و ۵۰ خانم بدون سابقه‌ی سقط و دارای حداقل دو باروری موفق، به عنوان گروه شاهد، از میان مراجعه‌کنندگان به بیمارستان تخصصی صارم تهران انتخاب شدند. عوامل مؤثر در سقط مکرر خودبخودی مانند کاریوتیپ، عوامل آناتومی، عوامل هورمونی، عوامل عفونی و عوامل ایمونولوژیک در بیماران مورد ارزیابی قرار گرفتند و در تمامی موارد نرمال بودند. میانگین سنی در گروه بیمار ۲۷/۵۸ سال و تعداد سقط‌های مکرر بین ۲ تا ۱۰ مورد بود. همچنین، میانگین سنی درگروه شاهد ۲۵/۴۸ سال و تعداد بارداری‌های موفق این گروه ۲ تا ۴ مورد بود.

جهت ورود به مطالعه و انجام خون‌گیری، از تمامی افراد مورد مطالعه رضایت‌نامه‌ی آگاهانه اخذ گردید و سپس ۵

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-05-06]

میلی‌لیتر خون محیطی از افراد مورد و شاهد در لوله‌های حاوی EDTA گرفته شد.

بررسی ژنوتیپ‌ها. DNA ژنومی از لوکوسیت‌های خون محیطی استخراج گردید (کیت استخراج DNA شرکت سیناژن) و سپس جهت تعیین ژنوتیپ در ارتباط با پلی‌مورفیسم‌های 2578C/A (rs 699947) و Q472H (rs1870377) به‌ترتیب از روش‌های Tetra-Primer ARMS-PCR و PCR-RFLP استفاده شد. پرایمرهای مناسب برای هر پلی‌مورفیسم توسط نرم‌افزارهای Oligo5 و GeneRunner طراحی و سپس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای هر جفت آغازگر، بهینه‌سازی شد (جدول ۱). مواد لازم برای واکنش Tetra-Primer ARMS-PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر، شامل ۲ میکرولیتر DNA ژنومی (۱۰۰ نانوگرم)، ۱۰ میکرولیتر Master Mix 1X (Master Mix به طور ازپیش‌تهیه شده، حاوی آنزیم Taq DNA Polymerase، PCR buffer، Loading dye، dNTP و $MgCl_2$ می‌باشد)، از هر جفت پرایمر ۰/۵ میکرولیتر (۵ ماکرومولار) و ۶ میکرولیتر آب دیونیزه (D.DW) بود.

مراحل انجام روش PCR به‌ترتیب زیر، روی نمونه‌های DNA از دو گروه بیمار و شاهد انجام شد. پس از دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، قطعات DNA برای پلی‌مورفیسم 2578C/A در ۳۰ سیکل (۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) تکثیر یافتند و به دنبال آن، مرحله‌ی طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. صحت انجام PCR با انجام الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگاروز ۲٪ بررسی و با انجام تعیین توالی مستقیم، تأیید شد.

مواد لازم برای واکنش PCR-RFLP در حجم ۳۰ میکرولیتر، شامل ۲ میکرولیتر DNA ژنومی (۱۰۰ نانوگرم)، ۱۵ میکرولیتر Master Mix 1X، از هر جفت پرایمر ۱ میکرولیتر (۵ ماکرومولار) و آب دیونیزه (D.DW) ۱۱ میکرولیتر 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 ۵ دقیقه، قطعات DNA برای پلی‌مورفیسم (rs1870377(Q472H)) در ۳۰ سیکل (۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) تکثیر یافتند و به دنبال آن، مرحله‌ی طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. صحت انجام PCR با انجام الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگاروز ۲٪ بررسی و با انجام تعیین توالی مستقیم، مورد تأیید قرار گرفت. محصولات PCR توسط آنزیم محدودالاثر *ALU*1 (Fermentase) مورد هضم قرار گرفت. سپس قطعات حاصل روی ژل آگاروز ۳٪، الکتروفورز شد و طول قطعات حاصل از هضم آنزیمی، مشاهده گردید.

آنالیز آماری. کلیه داده‌ها در نرم افزار آماری SPSS وارد و برای مقایسه‌ی ژنوتیپ‌ها و فراوانی آللی بین دو گروه، از آزمون χ^2 و با تجزیه و تحلیل توالی مورد بررسی قرار گرفت. P<۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌دار در آنالیزهای آماری در نظر گرفته شد.

جدول ۱. توالی پرایمرها و محصولات PCR پلی‌مورفیسم 2578C/A ژن VEGF و Q472H ژن KDR.

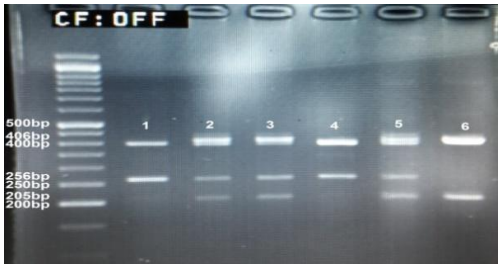
پلی مورفیسم	توالی پرایمرها	روش مطالعه	محصول PCR (bp)
VEGF 2578C/A	FIP: 5´- GCCAGCTGTAGGCCAGACCCTGGTAA-3´ RIP: 5´- CCAGTCAGTCTGATTATCCACCCAGACCG-3´ FOP :5´- GCCAGCCCTTTTCCTCATAAGGGCCTTA-3 ROP : 5´- ACATCTTCCCTAAGTGCTCCCAAAGGCC-3´	ARMS-PCR	AA:406/205 AC:406/256/205 CC:406/205
KDR rs1870377 (Q472H)	F 5´-CCTCCTGTATCCTGAATGAATCT-3´ R 5´-TGGTACTGCTAAAAGTCAATGGT-3´	PCR-RFLP	AA:285/205 AT:283/493/212 TT:493

یافته‌ها

تحقیق حاضر روی ۱۰۰ نمونه شامل ۵۰ نفر در گروه مورد و ۵۰ نفر در گروه شاهد انجام گرفت. در بررسی پلی‌مورفیسم 2578C/A در VEGF از روش Tetra-ARMS-PCR استفاده گردید که وجود باند ۴۰۶ bp روی ژل آگارز حاکی از اتصال پرایمرهای خارجی می‌باشد. دو پرایمر داخلی (Inner primer) نیز در این تکنیک استفاده گردید. پرایمر داخلی IPA هنگامی که جهش تک نوکلئوتیدی سیتوزین به آدنین صورت گرفته باشد به نوکلئوتید ۲۵۷۸ اگزون ۸ ژن VEGF متصل می‌گردد و باند ۲۵۶ bp را نشان

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-05-06]

می‌دهد. پرایمر داخلی IPC هنگامی که جهش مذکور در نوکلئوتید ۲۵۷۸ صورت نگرفته باشد به این ناحیه متصل می‌شود و باند ۲۰۵ bp را نشان می‌دهد (شکل ۱).



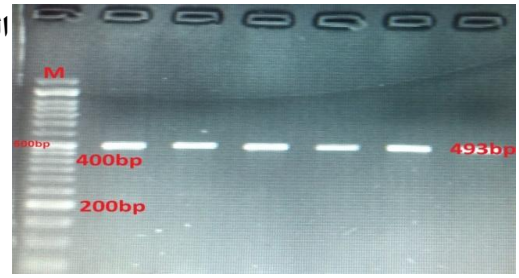
شکل ۱. نتایج محصول PCR پلی‌مورفیسم 2578C/A در ژن VEGF در ژل آگارز ۲٪. چاهک M مارکر ۵۰bp. چاهک ۱ و ۴: فرد هموزیگوت موتانت با ژنوتیپ CC. چاهک ۲ و ۳ و ۵: فرد هتروزیگوت با ژنوتیپ AC. چاهک ۶: فرد هموزیگوت نرمال با ژنوتیپ AA.

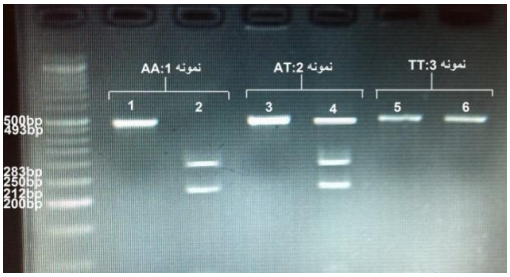
در بررسی فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی این پلی‌مورفیسم، در افراد بیمار درصد فراوانی‌های ژنوتیپی AA، AC و CC به‌ترتیب ۲۸٪، ۲۶٪ و ۴۶٪ و در جمعیت سالم مورد بررسی به‌ترتیب ۲۴٪، ۵۶٪ و ۲۰٪ به‌دست آمد. همچنین درصد فراوانی آللی 2578A و 2578C در جمعیت بیمار به‌ترتیب ۴۴٪ و ۵۶٪ و در جمعیت سالم به‌ترتیب ۵۲٪ و ۴۸٪ بود. طبق نتایج به‌دست آمده با وجود این‌که شیوع آلل تغییر یافته C در نمونه‌های بیمار، بیشتر از افراد شاهد بود، اما از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (P=۰/۱۵۶). همچنین فراوانی افراد هموزیگوت موتانت 2578CC در جمعیت بیمار، بیشتر از جمعیت نرمال مورد بررسی می‌باشد، این نشان‌دهنده‌ی آن است که افراد هوموزیگوت نرمال به میزان کمتری دچار سقط مکرر خودبخودی می‌شوند. این نتایج با بررسی آماری نیز تأیید شد. آنالیز آماری نشان داد که χ^2=۰/۰۰۳ (کوچکتر از ۰/۰۵) بوده و در نتیجه بین دو جمعیت بیمار و نرمال، تفاوت معنی‌دار وجود دارد (جدول ۲).

جدول ۲. فراوانی ژنوتیپی و آللی در پلی‌مورفیسم‌های ژنی VEGF و گیرنده‌ی KDR برحسب گروه‌ها.

پلی مورفیسم	فراوانی آللی در کل افراد مورد مطالعه	شاهد (٪) N=۵۰	بیمار (٪) N=۵۰	P-value
VEGF 2578C/A	A	۲۶(٪۵۲)	۲۲(٪۴۴)	۰/۱۵۶
	C	۲۴(٪۴۸)	۲۸(٪۵۶)	
KDR Q472H	A	۳۲(٪۶۴)	۳۱(٪۶۲)	۰/۸۸۳
	T	۱۸(٪۳۶)	۱۹(٪۳۸)	
	فراوانی ژنوتیپی در کل افراد مورد مطالعه	**شاهد (٪)**	**بیمار(٪)**	**P-value**
VEGF 2578C/A	AA	۱۲(٪۲۴)	۱۴(٪۲۸)	۰/۰۰۳
	AC	۲۸(٪۵۶)	۱۳(٪۲۶)	
	CC	۱۰(٪۲۰)	۲۳(٪۴۶)	
KDR Q472H	AA	۲۱(٪۴۲)	۱۵(٪۳۰)	۰/۰۰۹
	AT	۲۱(٪۴۲)	۳۴(٪۶۸)	
	TT	۸(٪۱۶)	۱(٪۲)	

در بررسی پلی‌مورفیسم Q472H در ژن KDR محصول PCR تکثیر یافته با اندازه‌ی ۴۹۳ bp در طی الکتروفورز مشاهده گردید که از طریق هضم با آنزیم ALU1 دو باند ۲۱۲bp و ۲۸۱ bp در افراد واجد آلل نرمال و یک باند ۴۹۳bp در افراد واجد آلل موتانت دیده شد (شکل ۲).





شکل ۲. بررسی نتایج مولکولی پلی‌مورفیسم در ژن KDR. الف) نتایج الکتروفورز محصول PCR پلی‌مورفیسم (rs1870377 (Q472H)) در ژن گیرنده VEGF (*KDR*) در ژل آگاروز ۲٪ که محصول PCR با اندازه ۴۹۳ جفت باز را نشان می‌دهد. ب) انجام واکنش هضم آنزیمی روی محصول PCR: چاهک M مارکر ۵۰bp. چاهک ۱: محصول PCR بدون انجام هضم آنزیمی نمونه ۱. چاهک ۲: محصول PCR با انجام هضم آنزیمی نمونه ۱ با ژنوتیپ AA. چاهک ۳: محصول PCR بدون انجام هضم آنزیمی نمونه ۲. چاهک ۴: محصول PCR با انجام هضم آنزیمی نمونه ۲ با ژنوتیپ AT. چاهک ۵: محصول PCR بدون انجام هضم آنزیمی نمونه ۳. چاهک ۶: محصول PCR با انجام هضم آنزیمی نمونه ۳ با ژنوتیپ TT.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-05-06]

بررسی درصد فراوانی ژنوتیپی AA، AT و TT در افراد بیمار به ترتیب ۳۰٪، ۶۸٪ و ۲٪ و در جمعیت سالم مورد بررسی به ترتیب ۴۲٪، ۴۲٪ و ۱۶٪ به‌دست آمد. درصد فراوانی آللی 472A و 472T نیز در جمعیت بیمار به‌ترتیب ۶۲٪ و ۳۸٪ و در جمعیت سالم به‌ترتیب ۶۴٪ و ۳۶٪ بود. طبق نتایج به‌دست آمده، از نظر فراوانی آللی، تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین جمعیت شاهد و کنترل مشاهده نگردید (P=۰/۸۸۳) اما در بررسی ژنوتیپی نشان داده شد که فراوانی ژنوتیپ نرمال TT در افراد شاهد، ۸ برابر جمعیت بیمار بوده و همچنین در حدود ۹۸٪ از بیماران واجد آلل تغییر یافته A به‌صورت هوموزیگوت AA (۳۰٪) یا هتروزیگوت AT (۶۸٪) بودند. این نتایج با بررسی آماری نیز تأیید شد. با توجه به نتایج آزمون χ^2 مقدار P در فراوانی ژنوتیپی برابر ۰/۰۰۹ محاسبه گردید که نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنادار آماری بین جمعیت بیمار و نرمال می‌باشد (جدول ۲).

بحث

تحقیق انجام گرفته نشان داد که پلی‌مورفیسم 2578C/A در ژن *VEGF* به‌صورت قابل ملاحظه‌ای با سقط مکرر با علت نامشخص در جمعیت خانم‌ها در استان تهران، در ارتباط است، به‌طوری‌که فراوانی ژنوتیپ تغییر یافته CC در ۴۶٪ یعنی نزدیک به نیمی از جمعیت بیمار مورد مطالعه، مشاهده گردید. این در حالی است که در جمعیت شاهد، فراوانی این ژنوتیپ تنها ۲۸٪ بود. همچنین در ارتباط با گیرنده‌ی آن *KDR* نیز ژنوتیپ نرمال TT به‌صورت قابل توجهی در جمعیت افراد بیمار در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافته بود، که این مسأله تأییدی بر اهمیت آن در رابطه با سقط مکرر خودبخودی می‌باشد.

حفظ بارداری نیازمند رگ‌زایی وسیع در ویلی‌های کوریونی و همچنین در طی مراحل تکامل بافت‌های جنینی است. در شرایط سقط مکرر، سطح بیان VEGF تروفوبلاستی جفت در اندتلیوم دزیدوال کاهش می‌یابد، که کاهش رگ‌زایی جفت با مرگ زود هنگام جنینی همراه است (۸). همچنین بلاستوسیست‌ها نیز mRNA رمزکننده‌ی VEGF را بیان می‌کنند که برای جنین لانه‌گزینی نموده، امکان القای سریع رگ‌زایی را از طریق اتصال VEGF به گیرنده‌ی اندومتریال خود فراهم می‌سازد. روی هم رفته، سیستم VEGF/KDR در مراحل اولیه‌ی بارداری از جمله لانه‌گزینی، تکامل جنینی و تشکیل جفت، مؤثر است (۱۲). VEGF دارای نقش‌های مهمی در نفوذپذیری عروق، رگ‌زایی و تنظیم عملکردهای چندگانه‌ی سلول‌های اندوتلیال است. VEGF، القاکننده‌ی تکثیر سلول‌های اندوتلیال، مهاجرت، تمایز و تحریک بقای سلول‌های اندوتلیال است که بسته به خصوصیات رگ‌زایی و میتوژنی خود، در توسعه‌ی جنینی حایز اهمیت می‌باشد. جفت جنین، غنی از فاکتورهای رگ‌زایی مثل VEGF است که نه‌تنها در تشکیل عروق جفتی، بلکه در تطابق عروق مادری در طی بارداری نیز مؤثر است، به‌طوری‌که تشکیل عروق خونی جدید جفت به‌صورت de novo مهمترین واقعه در سه ماه اول بارداری محسوب می‌شود. نقش VEGF در توسعه‌ی جنینی و رگ‌زایی تروفوبلاست‌ها تعیین شده و تغییر بیان VEGF و گیرنده‌های آن در جفت و نمونه‌های دزیدوآل در موارد سقط اولیه، گزارش شده است (۱۵).

پلی‌مورفیسم‌های کارکردی در VEGF باعث تغییر نابهنگامی در تولید آن می‌گردد. ژن *VEGF* نه تنها روی سقط، بلکه در بسیاری از عوارض بارداری نیز مؤثر است. ژن *VEGF* بسیار پلی‌مورفیک می‌باشد. در مطالعات متعددی نشان داده شده است که تنوع ژنتیکی در فعالیت و بیان VEGF مؤثر است (۱۷،۱۶). مهمترین پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی شناسایی شده در این ژن شامل 1154G/A (rs1570360)، +936C/T (rs3025039)، −634G/C (rs2010963)، -583T/C (rs3025020) و -2578C/A (rs699947) می‌باشد. تاکنون ارتباط بین ۴ پلی‌مورفیسم اول به‌عنوان ریسک فاکتور سقط مکرر تأیید شده است، اما در طی تحقیقات انجام شده، نتایج متناقضی در ارتباط با نقش پلی‌مورفیسم 2578C/A و سقط مکرر گزارش گردیده است (۱۸).

در سال ۲۰۰۵، Papazoglou و همکاران به بررسی ارتباط بین چهار پلی‌مورفیسم شایع ژن فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (2578C/A، -1154G/A، -634G/C و 936C/T) با سقط مکرر خودبخودی در جمعیت یونان پرداختند که نتایج به‌دست آمده هیچ ارتباط معنی‌دار آماری بین پلی‌مورفیسم‌های 2578C/A (P=۰/۵۴)، 634G/C (P=۰/۲۱) و 936C/T (P=۰/۲۵) و سقط مکرر خودبخودی با توجه به فراوانی ژنوتیپی و آللی مشاهده نشد. تنها پلی‌مورفیسم 1154G/A از نظر آماری با سقط مکرر خودبخودی مرتبط بود (۱۹). در تحقیق مشابهی که در سال ۲۰۱۲ توسط Samli و همکاران در جمعت ترکیه انجام گرفت، ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های 936C/T، 460C/T، 2578C/A و 1154G/A در ژن *VEGF* با سقط مکرر خودبخودی بررسی شد که تنها در مورد پلی‌مورفیسم

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-05-06]

1154G/A به‌صورت قابل ملاحظه‌ای بین جمعیت شاهد و بیمار اختلاف مشاهده گردید (۲۰).

مطالعه روی اهمیت پلی‌مورفیسم Q472H در گیرنده‌ی KDR و به‌صورت همزمان پلی‌مورفیسم‌های 115G/A- و V291I در ژن VEGF با سقط مکرر خودبخودی در تحقیقی توسط Su و همکاران در جمعیت تایوان انجام گرفت که نتایج این تحقیق نشان‌دهنده‌ی تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین بیماران و جمعیت کنترل و همچنین فرکانس هاپلوتایپ‌های VEGF (A-T-G) و KDR (A-C-T-G) بود (P<۰/۰۵) (۲۱).

در مطالعه‌ی حاضر برای نخستین بار نشان داده شد که در جمعیت مورد مطالعه، پلی‌مورفیسم Q472H در ژن *KDR* با سقط مکرر در ارتباط است. این SNP در اگزون ۱۱ گیرنده قرار گرفته و در گذشته به‌عنوان یک آلل پرخطر در بیماری عروق کرونر گزارش شده بود (۲۲). KDR واجد نقشی کلیدی در توسعه‌ی سلول‌های اندوتلیال بوده و بیان آن به این سلول‌ها و پیش‌سازهای جنینی آن محدود می‌شود (۲۳). همچنین KDR وظایف مهمی در توسعه‌ی شبکه‌ی عروق خونی ایفا می‌کند. با اتصال VEGF به KDR، چندین آبشار سیگنالی پایین دست از جمله مسیرهای AKT/PI3 kinase، پروتئین کیناز C، MAP کیناز و eNOS فعال می‌شوند که به مهاجرت و تکثیر سلول‌های اندوتلیال و در نهایت تحریک رگ‌زایی منتهی می‌گردند (۲۵،۲۴). پلی‌مورفیسم Q472H ژن KDR در دومین خارج سلولی N– ترمینال شبه‌ایمونوگلوبینی آن کارایی اتصال KDR به VEGF را کاهش داده و سبب تغییر فعالیت بیولوژیکی مسیرهای سیگنالی می‌گردد که در استقرار و حفظ بارداری مؤثرند (۲۲).

نتیجه‌گیری

در این تحقیق به بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم 2578C/A در ژن VEGF و پلی‌مورفیسم Q472H در ژن رسپتور KDR با سقط مکرر خودبخودی در جمعیت زنان تهران پرداخته شد. نتایج به دست آمده نشان دادند تفاوت معنادار آماری بین دو گروه بیمار و نرمال از نظر هر دو پلی‌مورفیسم وجود دارد. همچنین، نظر به اینکه هرچه قرابت ژنتیکی در ریشه‌های اصلی دو جمعیت بیشتر باشد درصد و نوع پلی‌مورفیسم‌های ژنی خاص در آن جمعیت‌ها شباهت بیشتری به یکدیگر دارند. به نظر می‌رسد که بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم‌های مورد مطالعه با سقط مکرر خودبخودی، در سایر قومیت‌های نژادی کشور نیز انجام گیرد تا از نحوه‌ی ارتباط بین این پلی‌مورفیسم و ابتلا به سقط‌های مکرر، اطلاعات بیشتری در دست باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پرسنل مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی زنجان و جناب آقای دکتر میرزا احمدی به‌دلیل همکاری صمیمانه در انجام این پروژه، کمال امتنان را دارند.

REFERENCES

1. Kutteh WH, Triplett DA. Thrombophilias and recurrent pregnancy loss. Semin Reprod Med 2006;24(1):54–66.

2. Yalcintepe SA, Silan F, Hacivelioglu SO, Uludag A, Cosar E, Ozdemir O. Fetal VEGF genotype is more important for abortion risk than mother genotype. Int J Mol Cell Med 2014;3(2):88–94.

3. Nonaka T, Ooki I, Enomoto T, Takakuwa K. Complex chromosomal rearrangements in couples affected by recurrent spontaneous abortion. Int J Gynaecol Obstet 2015;128(1):36–9.

4. Triggianese P, Perricone C, Perricone R, De Carolis C. Prolactin and natural killer cells: evaluating the neuroendocrine-immune axis in women with primary infertility and recurrent spontaneous abortion. Am J Reprod Immunol 2015;73(1):56–65.

5. Wong L, Poter T, de Jesus G. Recurrent early pregnancy loss and antiphospholipid antibodies: where do we stand? Lupus 2014;12:1226–8.

6. Ghafourian Boroujerdnia M, Amozegari Z. Increase of NK cells in decidua of women with recurrent spontaneous abortion. J Reprod Infertil 2002;3(1):22–31.

7. Fox S, Gasparini G, Harris A. Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. Lancet Oncol 2001;2(5):278–89.

8. Zygmuni M, Herr F, Munstedt K, Lang U, Liang OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2003;110 Suppl 1:S10–8.

9. Gualandris A, Rusnati M, Belleri M, Nelli EE, Bastaki M, Molinari-Tosatti MP, *et al*. Basic fibroblast growth factor overexpression in endothelial cells: an autocrine mechanism for angiogenesis and angioproliferative diseases. Cell Growth Differ 1996;7(2):147–60.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-05-06]

10. Kawamura H, Li X, Harper SJ, Bates D, Claesson-Welsh L. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165b is a weak in vitro agonist for VEGF receptor-2 due to lack of coreceptor binding and deficient regulation of kinase activity. Cancer Res 2008;15(68):4683–92.

11. Jackson M, Carney B, Lye S, Ritchie J. Localization of two angiogenic growth factors (PDECGF and VEGF) in human placenta throughout gestation. Placenta 1994;15:341–53.

12. Kruessel J, Behr B, Milki A, Hirchenhain J, Wen Y, Bielfeld P, *et al*. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA splice variants are differentially expressed in human blastocysts. Mol Hum Reprod 2001;7:57–63.

13. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, *et al*. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. J Am Soc Nephrol 2002;13(1):260–4.

14. Choi H, JH C, Kim J. nterleukin-18, transforming growth factor-beta, and vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and susceptibility to primary glomerulonephritis. Tissue Antigens 2010;76:289–96.

15. Demir R, Kaufmann P, Castellucci M, Erbengi T, Kotowski A. Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. Acta Anat (Basel) 1989;136(3):190–203.

16. Mohammadi M, Ollier W, Hutchinsdon I. functional association study of VEGF gene promoter polymorphisms with VEGF expression by stimulated PBM cells. Hum Immunol 2003;64(10): S125.

17. Su MT, Lin SH, Chen YC. Genetic association studies of angiogenesis- and vasoconstriction-related genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Update 2011;17(6):803–12.

18. Xu X, Du C, Li H, Du J, Yan X. Association of VEGF genetic polymorphisms with recurrent spontaneous abortion risk: A systematic review and meta-analysis. PloS one 2015;10(4):e0123696.

19. Papazoglou D, Galazios G, Papatheodorou K, Liberis V, Papanas N, Maltezos E, *et al*. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. Fertil Steril 2005;83(4):959–63.

20. Samli H, Demir BC, Ozgoz A, Atalay MA, Uncu G. Vascular endothelial growth factor gene 1154 G/A, 2578 C/A, 460 C/T, 936 C/T polymorphisms and association with recurrent pregnancy losses. Genet Mol Res 2012;11(4) 4739–45.

21. Su M, Lin S, Lee I, Chen Y, Kuo P. Association of polymorphisms haplotypes of the genes encoding vascular endothelial growth factor and its KDR receptor with recurrent pregnancy loss. Hum Reprod 2011;26(4):758–64.

22. Wang Y, Zheng Y, Zhang W, Yu H, Lou K, Zhang Y, *et al*. Polymorphisms of KDR gene are associated with coronary heart disease. J Am Coll Cardiol 2007;50(8):760–7.

23. Hiratsuka S, Kataoka Y, Nakao K, Nakamura K, Morikawa S, Tanaka S. VEGF-A is involved in guidance of VEGF-receptor positive cells to the anterior portion of early embryos. Mol Cell Biol 2005;25:355–63.

24. Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. Trends Biochem Sci 2003;28(9):488–94.

25. Li X, Claesson-Welsh L, Shibuya M. VEGF receptor signal transduction. Methods Enzymol 2008;443:261–84.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-05-06]