Journal of
Inflammatory Diseases
(Previous Title: The Journal of Qazvin University of Medical Sciences)

December 2020, January 2021. Vol 24. Num 5

Research Paper

Haplotype Effect of Two Human Leukocyte Antigen-G Polymorphisms of *rs1736933* and *rs2735022* on the Recurrent Pregnancy Loss

Zahra Najafi[1], *Mohammad Khalaj-Kondori[1], Mohammad Ali Hosseinpour Feizi[1], Shamsi Abbasaliizadeh[2]

1. Department of Animal Sciences, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2. Department of Gynecology &Obstetrics, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Najafi Z, Khalaj-Kondori M, Hosseinpour Feizi MA, Abbasaliizadeh Sh. Haplotype Effect of Two Human Leukocyte Antigen-G Polymorphisms of *rs1736933* and *rs2735022* on the Recurrent Pregnancy Loss. Journal of Inflammatory Diseases. 2020; 24(5):398-409. https://doi.org/10.32598/JQUMS.24.5.2

https://doi.org/10.32598/JQUMS.24.5.2

CC BY NC

Received: 8 Apr 2020
Accepted: 14 Sep 2020
Available Online: 01 Dec 2020

Keywords:
Recurrent pregnancy loss, Polymorphism, Haplotype, Human Leukocyte antigen-G

ABSTRACT

Background Recurrent Pregnancy Loss (RPL) is a multifactorial disease that affects 1%-3% of couples. Since Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) gene is involved in fetal maternal immune tolerance, mutations in the *HLA-G* gene can affect the success rate of pregnancy.

Objective The present study aims to investigate the haplotype effect of *rs1736933* and *rs2735022* polymorphisms found in the *HLA-G* gene on the RPL.

Methods In this case-control study, participants were 100 women with RPL and 80 women with normal fertility in northwestern Iran. The *HLA-G* gene promoter was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) method and sequenced. The genotype and allele frequencies of the two polymorphisms were compared between the two groups by using t-test in SPSS software version 22. Haplotype analysis was performed using PHASE 2.1 and Haploview 4.2 applications

Findings C allele and CC genotype in *rs2735022* polymorphism and the G allele and GG genotype in *rs1736933* polymorphism showed a significant association with the RPL (P<0.05). Frequency of haplotypes AA, AC, GA, GC were 0.72, 0.23, 0.01, 0.03 in patients and 0.39, 0.01, 0.02, 0.59 in the control group (P<0.05). The linkage disequilibrium score was 94.

Conclusion Analysis of GC haplotype in *rs2735022* and *rs1736933* polymorphisms of the *HLA-G* gene can be helpful in genetic studies of women with RPL.

Extended Abstract

1. Introduction

Recurrent Pregnancy Loss (RPL) is the most common complication of pregnancy and is defined as the occurrence of two or more miscarriages before the 20th weeks of gestation or before the fetus weighing 500 grams [2-5], which affects about 1%-3% of couples who plan to have children [3]. From an immunological point of view, pregnancy requires the production of inhibitory factors that prevent the rejection of foreign fetal antigens by the maternal immune system [7]. Human Leukocyte Antigen-G (*HLA-G*), a non-classical HLA class I molecule, is expressed in the cytotrophoblast stem cells at the fetal-maternal interface [8]. This molecule inhibits immune responses and induces the production of inhibitory and regulatory cells [9]. Changes in *HLA-G* ex-

* *Corresponding Author:*
Mohammad Khalaj-Kondori, PhD.
Address: Department of Animal Sciences, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
Tel: +98 (912) 3351124
E-Mail: khalaj@tabrizu.ac.ir

Journal of
Inflammatory Diseases
(Previous Title: The Journal of Qazvin University of Medical Sciences)

Table 1. Genotype and allele frequencies of *rs2735022* polymorphism in two study groups

Polymorphism		No. (%)		OR	95%CI	K^2	P
		RPL Group	Control Group				
Genotypes	AA	8 (8)	16 (20)	0.348	0.891-0.132	1.681	0.012
	CA	37 (37)	33 (41.25)	0.836	0.537-1.455		0.319
	CC	55 (55)	31 (38.75)	1.932	1.533-3.059		0.015
Alleles	A	53 (26.5)	65 (40.62)	0.527	0.999-0.277		0.017
	C	147 (73.5)	95 (59.38)	1.897	1.605-3.001		0.019

Journal of
Inflammatory Diseases

OR=Odds Ratio.

Table 2. Genotype and allele frequencies of *rs1736933* polymorphism in two study groups

polymorphism		No. (%)		OR	95%CI	K^2	P
		RPL Group	Control Group				
Genotypes	AA	7 (7)	15 (18.75)	0.324	0.876-0.117	1.479	0.013
	GA	36 (36)	33 (41.25)	0.801	0.475-1.425		0.269
	GG	57 (57)	32 (40)	1.988	1.635-3.090		0.012
Alleles	A	50 (25)	63 (39.37)	0.513	0.981-0.268		0.021
	G	150(75)	97 (60.63)	1.948	1.734-3.019		0.013

Journal of
Inflammatory Diseases

OR=Odds Ratio.

pression have been reported in the tissues of RPL patient [13]. Nucleotide changes in the promoter may affect *HLA-G* expression level by altering binding affinity that target transcription factors [16]. The *rs2735022* (-486 A>C) and *rs1736933* (-689 A>G) polymorphisms, located in the *HLA-G* promoter, may affect its expression [16]. Given that the allele abundance of polymorphisms depends on the genetic background of each population [18, 24, 25], this study aims to evaluate the allele and genotype frequencies of *rs2735022* and *rs1736933* polymorphisms and analyze their association with RPL in Iranian women.

2. Materials and Methods

This case-control study was conducted during 2018-2019 in northwestern Iran. Peripheral blood samples were taken from control (n=80) and RPL (n=100) groups. DNA was extracted by using Miller's salting-out method [26] and DNA quantity and quality was determined using a spectrophotometer and an electrophoresis system. Amplification of DNA fragments containing *rs2735022* and *rs1736933* polymorphisms found in the upstream of *HLA-G* gene was performed by forward primers (5-GACTCACACG-GAAACTTAGG-3) and reverse primers (5-ACACAG-GTTAGGAGAAGGAG-3). The Polymerase Chain Reaction (PCR) was initiated at first denaturation for 5 min at 95°C and then amplified in 40 cycles, each containing denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 58 °C for 30 seconds, and extension at 72°C for 30 seconds. The final extension was performed for 5 minutes at 72°C. The PCR products for sequencing were sent to Microsynth Company in Zurich, Switzerland and the sequences were edited in Chromas 2.6.6 software. Frequencies in both groups were compared by using t-test in SPSS V. 22 software, considering a significance level of $P \leq 0.05$. The haplotypes were determined using PHASE 2.1 and Haploview 4.2 applications

3. Results

Genotype and allele frequencies of *rs2735022* polymorphism

Comparison of allele and genotype frequencies of *rs2735022* between RPL and control groups showed that C allele (OR=1.897) and CC genotype (OR=1.932) were

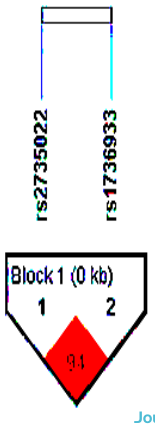


Figure 1. LD analysis result for *rs2735022* and *rs1736933* polymorphisms

significantly different in the two groups (P<0.05), and they had a positive relationship with the RPL (Table 1).

Genotype and allele frequencies of *rs1736933* polymorphism

Comparison of allele and different genotype frequencies of *rs1736933* polymorphism in RPL and control groups showed that G allele (OR=1.948) and GG genotype (OR=1.988) were significantly different in the two groups (P<0.05), and they had a positive correlation with the RPL (Table 2).

Haplotypes of *rs2735022* and *rs1736933* polymorphisms

Comparing the frequencies of two polymorphisms between the two study groups showed that GC haplotype was associated with RPL. The Linkage Disequilibrium (LD) analysis results showed that the linkage of the studied haplotypes was high (LD =94) for *rs2735022* and *rs1736933* polymorphisms (Figure 1).

4. Discussion and Conclusion

The *HLA-G* promoter shows several peculiarities and the amount of protein produced by *HLA-G* is affected by several polymorphisms in the *HLA-G* gene, including polymorphisms *rs2735022* and *rs1736933* [27]. In our study, a comparison of genotype frequencies between the two study groups in terms of *rs2735022* polymorphism showed that the homozygous CC genotype had a positive significant relationship with the RPL (P=0.015). It was also found that the C allele had a positive significant relationship with the RPL (OR=1.897, P=0.019). For *rs1736933* polymorphism, results showed that the homozygous GG genotype had a positive significant relationship with the RPL (P=0.012). The G allele also had a positive association with the RPL (OR=1.948, P =0.013). Consistent with our results, Ober et al. observed that not only *rs2735022* and *rs1736933* polymorphisms are associated with RPL, but also the serum *HLA-G* level decreases in women with RPL [19]. The main haplotype reported in our study was GC which may be an important factor in RPL in northwestern Iran

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study obtained its ethical approval from the Research Ethics Committee of Tabriz University of Medical Sciences (Code: IR-TBZMED.REC.1398.208).

Funding

This study was extracted from the MA. thesis of first author at Department of Genetics, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz.

Authors' contributions

Conceptualization, methodology, resources, initial draft preparation: Zahra Najafi; Data analysis, editing & review, final approval, and supervision: Mohammad Khalaj-Kondori; Project administration and giving consultation: Mohammad Ali Hosseinpour Feizi and Shamsi Abbasaliizadeh.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

بررسی اثر هاپلوتایپی پلی‌مورفیسم‌های *rs1736933* و *rs2735022* بالادست ژن آنتی‌ژن لکوسیت انسانی G بر اختلال سقط مکرر در زنان شمال غرب ایران

زهرا نجفی[۱]، *محمد خلج کندری[۱]، محمدعلی حسین‌پور فیضی[۱]، شمسی عباسعلیزاده[۲]

۱. گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۲. گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت: ۲۰ فروردین ۱۳۹۹
تاریخ پذیرش: ۲۴ شهریور ۱۳۹۹
تاریخ انتشار: ۱۱ آذر ۱۳۹۹

چکیده

زمینه سقط مکرر یک بیماری چندعاملی است که ۱ تا ۳ درصد از زوج‌ها را درگیر می‌کند. به دلیل اینکه *HLA-G* در حفاظت جنین در مقابل سیستم ایمنی مادر نقش دارد، احتمال می‌رود جهش و تغییر ژنی در ژن *HLA-G* بر موفقیت بارداری اثر بگذارد.

هدف مطالعه حاضر جهت بررسی اثر هاپلوتایپی پلی‌مورفیسم‌های *rs1736933* و *rs2735022* بالادست ژن *HLA-G* بر اختلال سقط مکرر خودبه‌خودی در جمعیت شمال غرب ایران انجام گرفت.

مواد و روش‌ها در این مطالعه مورد شاهدی که در سال ۱۳۹۷ و ۱۳۹۸ انجام شد، پس از نمونه‌گیری از صد زن که دارای سابقه سقط مکرر و خودبه‌خودی بودند و هشتاد فرد با باروری طبیعی و استخراج DNA ژنومی، ناحیه پروموتر ژن *HLA-G* توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر و تعیین توالی شد. فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی دو گروه توسط آزمون آماری تی تست مقایسه شدند. بررسی‌های هاپلوتایپی، با استفاده از نرم‌افزار Phase نسخه ۲/۱ و Haploview نسخه ۴/۲ انجام گرفت.

یافته‌ها نتایج نشان داد که آلل C و ژنوتیپ CC در جایگاه پلی‌مورفیسم ۴۸۶- و همچنین آلل G و ژنوتیپ GG درجایگاه پلی‌مورفیسم ۶۸۹- با بیماری سقط مکرر دارای ارتباط مستقیم و معنی‌داری است ($P<0.05$). فراوانی هاپلوتایپ‌های AA, AC, GA, GC به ترتیب ۰/۰۳، ۰/۰۱، ۰/۲۳، ۰/۷۲ و در گروه شاهد ۰/۵۹، ۰/۰۲، ۰/۰۱ و ۰/۳۹ محاسبه شد. بررسی آماری نشان داد که هاپلوتایپ GC با بروز سقط مکرر همراه است ($P<0.05$). میزان عدم تعادل پیوستگی برابر با ۹۴ محاسبه شد.

نتیجه‌گیری بررسی هاپلوتایپ GC در جایگاه‌های *rs2735022* و *rs1736933* واقع در بالادست ژن *HLA-G* می‌تواند در بررسی‌های ژنتیکی افراد مبتلا به بیماری سقط مکرر در جمعیت زنان شمال غرب ایران کمک‌کننده باشد.

کلیدواژه‌ها:
سقط مکرر،
پلی مورفیسم،
هاپلوتایپ،HLA-G

مقدمه

طبق تعریف سازمان بهداشت جهانی[1]، سقط جنین به معنای ختم حاملگی قبل از هفته بیستم حاملگی و یا تولد جنینی با وزن کمتر از ۵۰۰ گرم است [۱]. سقط مکرر یا RPL شایع‌ترین عارضه بارداری است و به صورت وقوع دو یا بیش از دوبار سقط قبل از هفته بیستم و یا قبل از رسیدن جنین به وزن ۵۰۰ گرم تعریف می‌شود که حدود ۱ تا ۳ درصد از زوج‌هایی را که قصد بچه‌دار شدن دارند، متأثر می‌کند [۲-۵]. از جمله عواملی که منجر به این بیماری می‌شود، اختلالات سیتوژنتیکی، بدشکلی‌های رحمی، ترومبوفیلی ارثی، خودایمنی، مشکلات اسپرم و فاکتورهای محیطی است [۴]. با وجود این، نیمی از دلایل آن در بیشتر بیماران نامشخص باقی مانده است [۵]. رایج‌ترین ژن‌های دخیل در سقط مکرر، ژن‌های مرتبط با تغییرات متابولیسم مادری، آمبولی خونی (لخته شدن خون)، التهاب و تحمل ایمنی هستند [۶].

از نقطه‌نظر ایمنی‌شناسی، بارداری نیازمند تولید فاکتورهای مهارکننده‌ای است که از رد شدن آنتی‌ژن‌های بیگانه جنین توسط سیستم ایمنی مادر جلوگیری کند [۷]. مولکول *HLA-G* جزو ژن‌های *HLA* کلاس یک غیر کلاسیک است که غالباً در طی بارداری و در رابطه مادر جنین شناخته می‌شود و روی سلول‌های سیتوتروفوبلاست در سطح مشترک مادری جنینی بیان می‌شود [۸]. این مولکول پاسخ‌های ایمنی را مهار کرده و تولید سلول‌های مهاری و تنظیمی را القا می‌کند [۹]. به دلیل تماس نزدیک سلول‌های ایمنی مادر با جنین، *HLA-G* از طریق

1. World Health Organization (WHO)

* **نویسنده مسئول:**
دکتر محمد خلج کندری
نشانی: تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه علوم جانوری.
تلفن: ۳۳۵۱۱۲۴ (۹۱۲) ۹۸+
رایانامه: khalaj@tabrizu.ac.ir

محافظت جنین نیمه‌آلوژنیک در برابر سلول‌های کشنده طبیعی[۲] مادر باعث حفاظت از حاملگی می‌شود [۱۰].

HLA-G اولین‌بار در سال ۱۹۸۶ به دنبال یافتن یک مولکول *HLA* در سطح سلول‌های تروفوبلاست خارج ویلوسی و یک رده سلولی کوریوکارسینوما شناخته شد [۱۱]. بیان این مولکول محدود به سلول‌های جفت نیست، اما بیشتر روی سلول‌های جفت بیان شده است. *HLA-G* به عنوان یک مولکول اختصاصی بیان‌شده توسط سلول‌های سیتوتروفوبلاست بافت جنینی، در سطح مشترک مادری جنینی شناسایی شده است و بررسی‌های انجام‌شده نشان داده است که این مولکول در محافظت جنین از سیستم ایمنی مادر نقش دارد [۱۲]. تغییر بیان *HLA-G* در بافت جفت افراد مبتلا به سقط مکرر گزارش شده است [۱۳].

ژن *HLA-G* یک قطعه ۳۳۶۳ جفت بازی در موقعیت 6.p21.3 با هشت اگزون و هفت اینترون است و یک رونوشت ۱۵۷۸ بازی مربوط به زنجیره سنگین *HLA-G* را کُد می‌کند [۱۴، ۱۵]. این ژن دارای ۵۱ آلل است که شانزده پروتئین مختلف *HLA-G* را کُد می‌کند [۱۲]. تغییرات نوکلئوتیدی در پروموتر ممکن است سطوح *HLA-G* را از طریق تغییر دادن میل ترکیبی توالی‌هایی که هدف عوامل رونویسی هستند، تحت تأثیر قرار دهد [۱۶].

پلی مورفیسم‌های *rs2735022* و *rs1736933* در ناحیه پروموتر ژن *HLA-G* قرار گرفته‌اند و تحت عنوان 486A>C- و 689A>G,T- نیز شناخته می‌شوند [۱۶]. پلی مورفیسم 486- در نزدیکی عنصر شوک گرما قرار دارد [۱۷]. در زنان نابارور و یا دارای مشکلات باروری، کمبود فاکتور شوک گرما مشاهده شده است. این پلیمورفیسم با تحت تأثیر قرار دادن اتصال فاکتور شوک گرما به عنصر شوک گرما، منجر به تفاوت‌های اولیه در بیان *HLA-G* می‌شود [۱۸].

پلی‌مورفیسم 689- در نزدیکی ناحیه GAS قراردارد. اینترفرون گاما 1b مستقیماً به گیرنده نوع ۲ اینترفرون گاما، IFNGR1 متصل می‌شود و طی فرایندهایی درنهایت، STAT1 فسفریله شده و در داخل هسته موجب آغاز رونویسی ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی می‌شود [۱۹]. مطالعات گذشته حاکی از ارتباط این پلی‌مورفیسم با سقط مکرر است [۲۰]. بررسی‌ها نشان می‌دهند که *HLA-G* به عنوان لیگاند برای گیرنده‌های سلولی NK عمل می‌کند و قادر است عملکرد سلول‌های NK را مهار کند و اگر این فعالیت کنترل نشود می‌تواند به صورت بالقوه به جنین آسیب برساند [۲۱]. علاوه بر این، کاهش سطح سرمی *HLA-G* در بیماران مبتلا به سقط مکررخودبه‌خودی و همراهی پلی‌مورفیسم‌های 486- و 689- با آن بیماری گزارش شده است [۱۹]. مطالعات نشان می‌دهند که به طور کلی جهش در ژن *HLA-G* و یا توالی‌های بالادست آن ممکن است با تعدیل بیان ژن *HLA-G* بر موفقیت بارداری تأثیر داشته باشد [۲۲، ۲۳]. با توجه به اینکه فراوانی آللی پلی‌مورفیسم‌ها در جمعیت‌های مختلف به پیش‌زمینه ژنتیکی آن جمعیت‌ها بستگی دارد [۱۸-۲۵]، ممکن است فراوانی پلی‌مورفیسم‌های 689- و 486- واقع در بالادست *HLA-G* نیز در جمعیت زنان شمال غرب ایران با جمعیت‌های دیگر متفاوت باشد؛ بنابراین مطالعه حاضر با هدف مشخص کردن هاپلوتایپ شایع جایگاه‌های مذکور و ارتباط آن با بیماری سقط مکرر در جمعیت زنان شمال غرب ایران انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع مورد شاهدی بوده و در سال‌های ۱۳۹۷ و ۱۳۹۸ انجام گرفت. افراد شرکت‌کننده شامل صد زن بیمار بودند که حداقل در دوبار از حاملگی‌های خود، دارای سابقه سقط مکرر خودبه‌خودی بوده و به بیمارستان الزهرا و درمانگاه مادر تبریز مراجعه کرده بودند و توسط متخصص زنان و زایمان انتخاب و در مطالعه شرکت داده شدند. معیار ورود افراد به گروه بیمار شامل حداقل دو سقط مکرر بدون دلیل و معیارهای خروج از مطالعه، وجود سندرم TORCH (توکسوپلاسموز روبلا سیتومگالوویروس هرپس ویروس)، مشکلات کروموزومی، اختلالات هورمونی و آناتومیکی رحمی بودند [۳۲-۵]. معیار ورود به گروه شاهد داشتن حداقل یک بچه با بارداری طبیعی و معیار خروج از مطالعه داشتن سابقه هرگونه سقط یا استفاده از روش‌های کمک‌باروری بود. همچنین هشتاد زن دارای سابقه بارداری نرمال به عنوان شاهد در مطالعه شرکت داده شدند.

پس از تصویب کمیته اخلاق دانشگاه به منظور انجام مطالعه، با اخذ رضایت آگاهانه، نمونه گیری از خون محیطی افراد گروه بیمار و شاهد به اندازه ۲ سی‌سی انجام شد. نمونه‌ها در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد جهت استخراج DNA از خون نگهداری شدند. DNA بر اساس روش نمکی میلر استخراج شدند [۲۶] و کمیت و کیفیت آن با استفاده از اسپکتروفتومتر و الکتروفورز تعیین شد. تکثیر قطعه DNA حاوی پلی‌مورفیسم‌های 689- و 486- واقع در بالادست ژن *HLA-G* توسط یک جفت پرایمر (به ترتیب، پرایمر رفت 5-GACTCACACGGAAACTTAGG-3 و برگشت 5-ACACAGGTTAGGAGAAGGAG-3) انجام شد.

پرایمرها با نرم‌افزار الیگو نسخه ۷ طراحی شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آنزیم Tag پلیمراز در یک واسرشتی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه آغاز شد و سپس تکثیر در چهل سیکل که هرکدام شامل واسرشتی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام و با تکثیر نهایی ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. درنهایت محصولات PCR جهت تعیین توالی به شرکت میکروسینس سوئیس ارسال شدند. ژنوتیپ افراد با استفاده از نرم‌افزار Chromas نسخه ۶/۶/۲ تعیین و فراوانی

2. Natural Killer (NK)

ژنوتیپی و آللی در گروه‌های بیمار و شاهد محاسبه شدند. فراوانی‌ها در هر دو گروه توسط آزمون آماری تی و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ مقایسه شدند. P≥۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار فرض شد. هاپلوتایپ‌ها، با استفاده از نرم‌افزار Phase نسخه ۲/۱ و Haploview نسخه ۴/۲ تعیین شد.

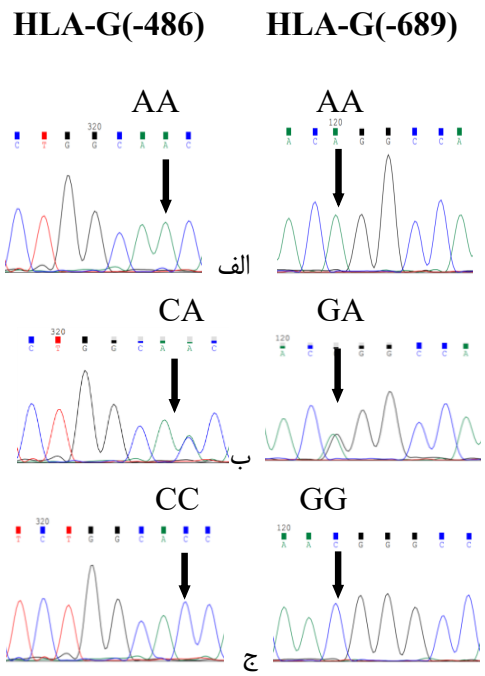
یافته‌ها

تمامی افراد شرکت‌کننده در مطالعه ترک‌زبان بوده و قومیت آذری داشتند. اطلاعات جمعیت‌شناختی و بالینی و شاخص‌های آمار توصیفی در جدول شماره ۱ ارائه شده است.

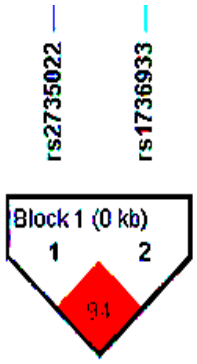
جهت تعیین ژنوتیپ افراد نسبت به پلی‌مورفیسم ۴۸۶- و ۶۸۹-، قطعه‌ای به طول ۶۸۴ جفت باز از ناحیه پروموتری ژن *HLA-G* توسط PCR تکثیر شد. در مرحله بعد محصولات PCR تعیین توالی شدند و ژنوتیپ افراد از روی کروماتوگرام‌های حاصل خوانده شد. نمونه‌هایی از کروماتوگرام‌های مختلف مربوط به جایگاه‌های پلی‌مورفیسم‌های ۴۸۶- و ۶۸۹- در شکل شماره ۱ نشان داده است.

پس از تعیین توالی محصولات PCR، ژنوتیپ افراد نسبت به جایگاه ۴۸۶- تعیین شد. در بین افراد بیمار، هشت نفر هموزیگوت (AA)، ۳۷ نفر هتروزیگوت (CA) و ۵۵ نفر هموزیگوت (CC) بودند و در گروه شاهد شانزده نفر هموزیگوت (AA)، ۳۳ نفر هتروزیگوت (CA) و ۳۱ نفر هموزیگوت (CC) بودند. بررسی تعادل هاردی واینبرگ نشان داد که جمعیت نسبت به این جایگاه ژنی در تعادل است (K^2=۱/۶۸۱). همچنین فراوانی آلل A(آلل نرمال) و فراوانی آلل C برای گروه‌های بیمار و شاهد محاسبه شد (جدول شماره ۲). مقایسه فراوانی‌های آللی و فراوانی‌های ژنوتیپی بین گروه‌های بیمار و شاهد نشان داد که آلل C و ژنوتیپ CC در دو گروه اختلاف معنی‌داری با هم دارند (P<۰/۰۵). مقادیر نسبت شانس OR برای ژنوتیپ CC برابر با ۱/۹۳۲ و برای آلل C برابر با ۱/۸۹۷ به دست آمد که حاکی از همراهی مثبت آنها با بروز بیماری سقط مکرر خودبه‌خودی بود (جدول شماره ۲).

پس از تعیین توالی محصولات PCR، ژنوتیپ افراد نسبت به جایگاه ۶۸۴- تعیین شد. در بین افراد بیمار، هفت نفر هموزیگوت (AA)، ۳۶ نفر هتروزیگوت (GA) و ۵۷ نفر هموزیگوت (GG) وجود داشت و در بین افراد شاهد پانزده نفر هموزیگوت (AA)، ۳۳ نفر هتروزیگوت (GA) و ۳۲ نفر هموزیگوت (GG) داشتند. بررسی جمعیت از نظر تعادل نشان داد که جمعیت مورد بررسی نسبت به جایگاه ۶۸۴- در تعادل هاردی واینبرگ قرار دارد (K^2=۱/۴۷۹). فراوانی آللی آلل‌های A (آلل نرمال) و G برای گروه‌های بیمار و شاهد در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. مقایسه فراوانی‌های آللی و فراوانی‌های ژنوتیپ‌های مختلف گروه‌های بیمار و شاهد نشان داد که آلل G و ژنوتیپ GG در دو



شکل ۱. نمونه‌هایی از کروماتوگرام‌های حاصل از تعیین توالی محصولات PCR برای دو پلی‌مورفیسم ۶۸۹- و ۴۸۶-
الف)کروماتوگرام‌های افراد هموزیگوت AA در دو جایگاه؛
ب) کروماتوگرام‌های افراد هتروزیگوت در دو جایگاه؛
ج) کروماتوگرام فرد هموزیگوت CC در جایگاه ۴۸۶- و فرد هموزیگوت GG در جایگاه ۶۸۹-.



مجله بیماری‌های التهابی

شکل ۲. میزان عدم تعادل پیوستگی پلی‌مورفیسم‌های ۴۸۶- و ۶۸۹-

گروه نسبت به هم اختلاف معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵). مقادیر Odds Ratio برای ژنوتیپ GG برابر با ۱/۹۸۸ و برای آلل G برابر با ۱/۹۴۸ محاسبه شد که حاکی از همراهی مثبت آن‌ها با بروز بیماری سقط مکرر خودبه‌خودی است (جدول شماره ۳).

آنالیز هاپلوتایپی توسط نرم‌افزار Haploview نسخه ۶/۶/۲ چهار هاپلوتایپ برای این دو جایگاه شناسایی کرد. فراوانی هاپلوتایپ‌های GC، GA، AC و AA به ترتیب در گروه بیمار برابر با ۷۱/۹۵، ۳/۰۴، ۱/۵۴ و ۲/۳۴ درصد و در گروه شاهد برابر با ۵۸/۷۳، ۱/۸۸، ۰/۶۳ و ۳۸/۷۳ درصد محاسبه شد (جدول شماره ۴). مقایسه این فراوانی‌ها بین دو گروه نشان داد که هاپلوتایپ GC با بیماری سقط مکرر خودبه‌خودی همراهی نشان می‌دهد. آنالیز LD با نرم‌افزار Haplo-view نسخه ۶/۶/۲ نشان داد که میزان پیوستگی هاپلوتایپ‌های مطالعه‌شده برای هر دو پلی‌مورفیسم ۶۸۹- و ۴۸۶- بالاست (LD=۹۴) (شکل شماره ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

پروموتر *HLA-G* تغییرات متعددی نشان می‌دهد و سطح پروتئین تولیدشده توسط *HLA-G* متأثر از چندین پلی‌مورفیسم در ژن *HLA-G* است که از جمله آن‌ها پلی‌مورفیسم A>C- ۴۸۶ و ۶۸۹A>G- است [۲۷]. مطالعه حاضر، جهت بررسی اثر هاپلوتایپی پلی مورفیسم‌های *rs1736933* و *rs2735022* بالادست ژن *HLA-G* بر اختلال سقط مکرر خودبه‌خودی در جمعیت زنان آذری شمال غرب ایران انجام گرفت.

نتایج حاصل از تحلیل آماری پلی‌مورفیسم ۴۸۶- نشان داد که فراوانی ژنوتیپ‌های CC، CA و AA در گروه بیمار به ترتیب ۵۵(۵۵)، ۳۷(۳۷) و ۸(۸) و در گروه شاهد ۳۱(۳۸/۷۵)، ۳۳ (۴۱/۲۵) و ۱۶ (۲۰) است. مقایسه فراوانی‌های ژنوتیپی بین

جدول ۱. شاخص‌های آمارتوصیفی متغیرهای جمعیت‌شناختی برای گروه شاهد و بیمار

متغیرها		بیمار	شاهد
سن (سال) (میانگین±انحراف معیار)		۳۳/۱۷±۷/۰۷	۳۲/۲۵±۶/۹۸
محدوده سنی		۴۵-۲۰	۴۳-۲۲
تعداد سقط	۲	۴۸	–
	۳	۴۳	–
	≥۴	۹	–
	کل	۱۰۰	–
سابقه خانوادگی	بله	۲۲	–
	خیر	۷۸	–
	کل	۱۰۰	–
تحصیلات	دانشگاهی	۴۸	۳۹
	دیپلم	۳۶	۲۵
	دیپلم >	۱۶	۱۶
	کل	۱۰۰	۸۰
تولد زنده	۱	–	۴۶
	۲	–	۲۹
	۳	–	۵
	کل	–	۸۰

مجله بیماری‌های التهابی

جدول ۲. توزیع ژنوتیپی و آللی پلی‌مورفیسم ۴۸۶- در زنان مبتلا به بیماری سقط مکرر و گروه شاهد

(-۴۸۶)		بیمار N=۱۰۰ F (درصد)	شاهد N=۸۰ F (درصد)	نسبت شانس	(95%CI)	کای اسکوئر	سطح معنی‌داری
ژنوتیپ‌ها	AA	۸ (۸)	۱۶ (۲۰)	۰/۳۴۸	(۰/۸۹۱-۰/۱۳۲)	۱/۶۸۱	۰/۰۱۲
	CA	۳۷ (۳۷)	۳۳ (۴۱/۲۵)	۰/۸۳۶	(۱/۵۳۷-۰/۴۵۵)		۰/۳۱۹
	CC	۵۵ (۵۵)	۳۱ (۳۸/۷۵)	۱/۹۳۲	(۳/۵۳۳-۱/۰۵۹)		۰/۰۱۵
آل‌ها	A	۵۳ (۲۶/۵)	۶۵ (۴۰/۶۲)	۰/۵۲۷	(۰/۹۹۹-۰/۲۷۷)		۰/۰۱۷
	C	۱۴۷ (۷۳/۵)	۹۵ (۵۹/۳۸)	۱/۸۹۷	(۳/۶۰۵-۱/۰۰۱)		۰/۰۱۹

مجله بیماری‌های التهابی

جدول۳. توزیع ژنوتیپی و آللی پلی‌مورفیسم ۶۸۹- در زنان مبتلا به بیماری سقط مکرر و گروه شاهد

(-۶۸۹)		F (درصد) بیمار N=۱۰۰	F (درصد) شاهد N=۸۰	نسبت شانس	(95%CI)	کای اسکوئر	سطح معنی‌داری
ژنوتیپ‌ها	AA	۷ (۷)	۱۱۵ (۱۸/۷۵)	۰/۳۲۴	(۰/۸۷۶-۰/۱۱۷)	۱/۴۷۹	۰/۰۱۳
	GA	۳۶ (۳۶)	۳۳۳ (۴۱/۲۵)	۰/۸۰۱	(۱/۴۷۵-۰/۴۲۵)		۰/۲۶۹
	GG	۵۷ (۵۷)	۳۲ (۴۰)	۱/۹۸۸	(۳/۶۳۵-۱/۰۹۰)		۰/۰۱۲
آل‌ها	A	۵۰ (۲۵)	۶۳ (۳۹/۳۷)	۰/۵۱۳	(۰/۹۸۱-۰/۲۶۸)		۰/۰۲۱
	G	۱۵۰ (۷۵)	۹۷ (۶۰/۶۳)	۱/۹۴۸	(۳/۷۳۴-۱/۰۱۹)		۰/۰۱۳

مجله بیماری‌های التهابی

جدول ۴. هاپلوتیپ‌های جایگاه‌های ۴۸۶- و ۶۸۹- ژن *HLA-G* و فراوانی آن‌ها به تفکیک گروه‌های بیمار و شاهد

شاخص	هاپلوتایپ‌ها	تعداد	فراوانی گروه بیمار	SE† بیمار	فراوانی گروه شاهد	SE شاهد
H1	GC	۲۳۸	۰/۷۱۹۵۴۹	/۰۰۱۴۳۶	۰/۵۸۷۳۷۵	۰/۰۰۰۸۷۶
H2	GA	۹	۰/۰۳۰۴۵۱	۰/۰۰۱۴۳۶	۰/۰۱۸۸۷۵	۰/۰۰۰۸۷۶
H3	AC	۴	۰/۰۱۵۴۵۱	۰/۰۰۱۴۳۶	۰/۰۰۶۳۷۵	۰/۰۰۰۸۷۶
H4	AA	۱۰۹	۰/۲۳۴۵۴۹	۰/۰۰۱۴۳۶	۰/۳۸۷۳۷۵	۰/۰۰۰۸۷۶ (GGIH)

مجله بیماری‌های التهابی

†خطای استاندارد.

دو گروه نشان داد که ژنوتیپ هموزیگوت CC همراهی مثبتی با سقط مکرر دارد (P=۰/۰۱۵). فراوانی آللی آلل‌های A و C به ترتیب در گروه بیمار (۲۶/۵) ۵۳ و (۷۳/۵) ۱۴۷ و در گروه شاهد (۴۰/۶۲) ۶۵ و (۵۹/۳۸) ۹۵ محاسبه شد و مشخص شد که آلل C با OR=۱/۸۹۷ و P=۰/۰۱۹ افزایش معنی‌داری در بیماری سقط مکرر دارد.

همچنین نتایج تحلیل آماری پلی‌مورفیسم ۶۸۹- نشان داد که فراوانی ژنوتیپ‌های GG، GA و AA در گروه بیمار به ترتیب (۵۷) ۵۷، (۳۶) ۳۶ و (۷) ۷ و در گروه شاهد (۴۰) ۳۲، (۴۱/۲۵) ۳۳ و (۱۸/۷۵) ۱۵ است. مقایسه فراوانی‌های ژنوتیپی بین دو گروه نشان داد که ژنوتیپ هموزیگوت GG همراهی مثبت با سقط مکرر دارد (P=۰/۰۱۲). فراوانی آللی آلل‌های A و G به ترتیب در گروه بیمار (۲۵) ۵۰ و (۷۵) ۱۵۰ و در گروه شاهد (۳۹/۳۷) ۶۳ و (۶۰/۶۳) ۹۷ محاسبه و مشخص شد آلل G با OR=۱/۹۴۸ و P=۰/۰۱۳ افزایش معنی‌داری در بیماری سقط مکرر نشان داد. در این مطالعه، متوسط سنی گروه بیمار ۲۰-۴۵ سال بود که می‌تواند محدوده خطرساز برای سقط جنین باشد.

با توجه به اهمیت مولکول *HLA-G* در ایجاد تولرانس مادری جنینی، این مولکول ممکن است از طریق مهار سلول‌های NK مانع از دفع جنین توسط سیستم ایمنی مادر شود [۲۱]. از

سوی دیگر تغییر در بیان مولکول *HLA-G* در سطح سلول‌ها و یا تغییرات غلظت سرمی آن در برخی اختلالات دوران بارداری مانند اکلامپسی، پره اکلامپسی و سقط‌های مکرر خودبه‌خودی مورد توجه قرار گرفته است [۲۵]. در ساختار ژن HLA-G، پلی‌مورفیسم‌هایی در ناحیه کُدکننده، ناحیه غیر قابل ترجمه در انتهای ´3 ژن، ناحیه تنظیمی بالادست و پروموتر گزارش شده‌اند که روی بیان *HLA-G* اثر گذاشته و پروتئین‌هایی با اعمال مختلف ایجاد می‌کند و از آنجا که *HLA-G* دارای خواص سیستم ایمنی است، درک تنظیم ژن و نقش جایگاه‌های چندشکلی روی عملکرد ژن ممکن است روش خاصی در استفاده از *HLA-G* برای اهداف درمانی در آینده باشد [۲۴-۱۶].

برگر[3] و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی جایگاه پلی‌مورفیسم ۴۸۶- روی زنان قفقازی دریافتند که آلل C با بیماری سقط مکرر همراهی نشان می‌دهد. در مطالعه آن‌ها، آلل G از جایگاه ۶۸۹- با OR=۱/۳۳ همراهی مثبتی با بیماری نشان داد [۲۸]. نتایج حاصل از مطالعه ما با نتایج برگر و همکاران مطابقت دارد و یافته‌های آن‌ها را تأیید می‌کند. این نتایج حاکی از اهمیت دو جایگاه پلی‌مورفیسم مورد مطالعه در بیماران مبتلا به سقط مکرر است. همچنین، اگراوال[4] و همکاران در مطالعه خود در سال ۲۰۱۵ در هندوستان، همراهی معنی‌داری بین جایگاه ۶۸۹- و بیماری مشاهده نکردند. با وجود این، نتایج آن‌ها حاکی از همراهی معنی‌دار بین آلل C جایگاه ۴۸۶- با سقط مکرر بود [۲۹].

در سال ۱۳۹۷ یزدانی و همکاران نشان دادند که پلی‌مورفیسم‌های rs1736937 و rs1632948 بالادست ژن *HLA-G* با سقط مکرر مرتبط هستند. این نتایج حاکی از اهمیت پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNPs) پروموتر *HLA-G* در موفقیت بارداری است [۲۰]. طبق نتایج مطالعه حاضر، آبر[5] و همکاران در مطالعه خود مشاهده کردند که نه‌تنها پلی‌مورفیسم‌های ۴۸۶- و ۶۸۹- با سقط مکرر خودبه‌خودی همراهی نشان می‌دهند، بلکه سطح سرمی *HLA-G* در افراد مبتلا کاهش می‌یابد. به طور کلی، مطالعه آن‌ها سطح فوق‌العاده‌ای از تغییر در منطقه تنظیمی بالادست *HLA-G* را مشخص کرده و شواهدی برای ارتباط بین SNP منطقه پروموتر و میزان از بین رفتن جنین فراهم آورد [۱۹]. گذشته از آن، استفاده از فناوری‌های نوین توالی‌یابی اهمیت بالای تغییرات و پلی‌مورفیسم‌های بالادست ژن *HLA-G* را آشکار کرده و بیش از پیش به سبب‌شناسی این بیماری کمک کرده است [۳۰].

گزارشات حاکی از آن است که مطالعات همراهی بر اساس تعیین هاپلوتایپ شناساگرها می‌تواند قدرت تعیین نقشه و ژن‌های عامل بیماری‌ها را بهبود بخشد [۳۱]؛ بنابراین در مطالعه حاضر، اثر هاپلوتیپی دو جایگاه ۴۸۶- و ۶۸۹- بر سقط مکرر و همراهی آن‌ها با بیماری سقط مکرر مورد بررسی بیشتر قرار گرفت. طبق تجزیه و تحلیل نتایج هاپلوتایپی، بیشترین فراوانی هاپلوتیپی در این مطالعه، مربوط به هاپلوتیپ GC بوده و به ترتیب در گروه‌های بیمار و غیر بیمار ۷۱/۹۵ و ۵۸/۷۴ درصد به دست آمد. این نتایج نشان می‌دهند که هاپلوتایپ GC در زنان شمال غرب ایران با سقط مکرر خودبه‌خودی همراهی نشان می‌دهد. با بررسی عدم تعادل پیوستگی آلل‌های دو جایگاه مورد مطالعه، میزان پیوستگی برای آلل‌های دو جایگاه برابر با ۹۴ درصد (LD=۹۴) به دست آمد که حاکی از عدم تعادل پیوستگی قوی بین دو جایگاه در جمعیت مورد مطالعه است. این نتایج نشان می‌دهند که هاپلوتایپ GC می‌تواند به عنوان یکی از عوامل تأثیرگذار در بیماری سقط مکرر در زنان شمال غرب ایران در نظر گرفته شود.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که آلل C و ژنوتیپ CC در پلی‌مورفیسم ۴۸۶- وآلل G و ژنوتیپ GG در پلی‌مورفیسم ۶۸۴- در جمعیت زنان آذری شمال غرب ایران همراهی مثبتی با بیماری سقط مکرر دارد. همچنین هاپلوتایپ GC، هاپلوتایپ شایع در جمعیت مورد مطالعه بوده و با بیماری سقط مکرر مرتبط است؛ بنابراین بررسی ژنوتیپ افراد نسبت به این جایگاه ممکن است بتواند برای تصمیم‌گیری و ارائه خدمات بهداشتی‌درمانی توسط متخصصان زنان و زایمان کمک‌کننده باشد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه در کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز، با شماره IR- TBZMED. REC.1398.208 مورد تأیید قرار گرفت.

حامی مالی

این مقاله حاصل بخشی از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول در دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی است.

مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی، روش‌شناسی، جست‌وجوی منابع، نگارش و پیش‌نویس اصلی: زهرا نجفی؛ نظارت و اصلاح پروژه، تجزیه و تحلیل داده‌ها، ویراستاری و تأیید نسخه نهایی: محمد خلج کندری؛ مدیریت و مشاوره: محمدعلی حسین‌پور فیضی و شمسی عباسعلی‌زاده.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان تعارض منافعی در مقاله وجود ندارد.

3. Berger
4. Agrawal
5. Ober

Journal of
Inflammatory Diseases
(Previous Title: The Journal of Qazvin University of Medical Sciences)

References

[1] Ghanami Gashti N, Salehi Z, Zahiri Sorouri Z, Eskafi Sabet E. Analysis of 4977-bp mitochondrial DNA deletion in the women with spontaneous abortion. J Guilan Univ Med Sci. 2014; 22(88):1-6. [In Persian] http://journal.gums.ac.ir/article-1-412-en.html

[2] Keirse MJ, Rush RW, Anderson AB, Turnbull AC. Risk of preterm delivery in patients with previous pre-term delivery and/or abortion. Br J Obstet Gynaecol. 1978; 85(2):81-5. [DOI:10.1111/j.1471-0528.1978.tb10457.x] [PMID]

[3] Alemayehu M, Yebyo H, Medhanyie AA, Bayray A, Fantahun M, Goba GK. Determinants of repeated abortion among women of reproductive age attending health facilities in Northern Ethiopia: A case-control study. BMC Public Health. 2017; 17(1):188. [DOI:10.1186/s12889-017-4106-1] [PMID] [PMCID]

[4] Carosella ED, Moreau P, Lemaoult J, Rouas-Freiss N. HLA-G: From biology to clinical benefits. Trends Immunol. 2008; 29(3):125-32. [DOI:10.1016/j.it.2007.11.005] [PMID]

[5] Pokale YS. Recurrent miscarriage. Int Res J Med Sci. 2015; 3(9):13-9. http://www.isca.in/MEDI_SCI/Archive/v3/i9/2.ISCA-IRJMedS-2015-036.php

[6] Vaiman D. Genetic regulation of recurrent spontaneous abortion in humans. Biomed J. 2015; 38(1):11-24. [DOI:10.4103/2319-4170.133777] [PMID]

[7] Le Bouteiller P, Sargent IL. HLA class I molecules in the placenta: which ones, where and what for? A workshop report. Placenta. 2000; 21 Suppl A:S93-6. [DOI:10.1053/plac.1999.0530] [PMID]

[8] Carosella ED, LeMaoult J. HLA-G: A look back, a look forward. Cell Mol Life Sci. 2011; 68(3):337-40. [DOI:10.1007/s00018-010-0577-2] [PMID]

[9] Shah I, Åhman E. Unsafe abortion: Global and regional incidence, trends, consequences, and challenges. J Obstet Gynaecol Can. 2009; 31(12):1149-58. [DOI:10.1016/S1701-2163(16)34376-6]

[10] Daher S, Mattar R, Gueuvoghlanian-Silva BY, Torloni MR. Genetic polymorphisms and recurrent spontaneous abortions: An overview of current knowledge. Am J Reprod Immunol. 2012; 67(4):341-7. [DOI:10.1111/j.1600-0897.2012.01123.x] [PMID]

[11] Ellis SA, Sargent IL, Redman CW, McMichael AJ. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. Immunology. 1986; 59(4):595-601. [PMID] [PMCID]

[12] Ferreira LMR, Meissner TB, Tilburgs T, Strominger JL. HLA-G: At the interface of maternal-fetal tolerance. Trends Immunol. 2017; 38(4):272-86. [DOI:10.1016/j.it.2017.01.009] [PMID]

[13] Craenmehr MHC, Nederlof I, Cao M, Drabbels JJM, Spruyt-Gerritse MJ, Anholts JDH, et al. Increased *HLA-G* expression in term placenta of women with a history of recurrent miscarriage despite their genetic predisposition to decreased *HLA-G* levels. Int J Mol Sci. 2019; 20(3):625. [DOI:10.3390/ijms20030625] [PMID] [PMCID]

[14] Mosaferi E, Majidi J, Mohammadian M, Babaloo Z, Monfaredan A, Baradaran B. *HLA-G* expression pattern: Reliable assessment for pregnancy outcome prediction. Adv Pharm Bull. 2013; 3(2):443-6. [DOI:10.5681/apb.2013.072] [PMID] [PMCID]

[15] LeMaoult J, Le Discorde M, Rouas-Freiss N, Moreau P, Menier C, McCluskey J, et al. Biology and functions of human leukocyteantigen-G in health and sickness. Tissue Antigens. 2003; 62(4):273-84. [DOI:10.1034/j.1399-0039.2003.00143.x] [PMID]

[16] Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, Moreau P. Implications of the polymorphism of *HLA-G* on its function, regulation, evolution and disease association. Cell Mol Life Sci. 2011; 68(3):369-95. [DOI:10.1007/s00018-010-0580-7] [PMID] [PMCID]

[17] Berger DS. Molecular associations of recurrent spontaneous abortion [PhD. dissertation]. Pittsburgh, PA: University of Pittsburgh; 2007. http://d-scholarship.pitt.edu/10015/

[18] Lau HH, Ng NHJ, Loo LSW, Jasmen JB, Teo AKK. The molecular functions of hepatocyte nuclear factors - In and beyond the liver. J Hepatol. 2018; 68(5):1033-48. [DOI:10.1016/j.jhep.2017.11.026] [PMID]

[19] Ober C, Aldrich CL, Chervoneva I, Billstrand C, Rahimov F, Gray HL, et al. Variation in the *HLA-G* promoter region influences miscarriage rates. Am J Hum Genet. 2003; 72(6):1425-35. [DOI:10.1086/375501] [PMID] [PMCID]

[20] Yazdani N, Shekari Khaniani M, Bastami M, Ghasemnejad T, Afkhami F, Mansoori Derakhshan S. *HLA-G* regulatory variants and haplotypes with susceptibility to recurrent pregnancy loss. Int J Immunogenet. 2018; 45(4):181-9. [DOI:10.1111/iji.12364] [PMID]

[21] Hviid TV, Rizzo R, Christiansen OB, Melchiorri L, Lindhard A, Baricordi OR. *HLA-G* and IL-10 in serum in relation to *HLA-G* genotype and polymorphisms. Immunogenetics. 2004; 56(3):135-41. [DOI:10.1007/s00251-004-0673-2] [PMID]

[22] Dias FC, Bertol BC, Poras I, Souto BM, Mendes-Junior CT, Castelli EC, et al. The genetic diversity within the 1.4 kb *HLA-G* 5′ upstream regulatory region moderately impacts on cellular microenvironment responses. Sci Rep. 2018; 8(1):5652. [DOI:10.1038/s41598-018-24009-7] [PMID] [PMCID]

[23] Sipak O, Rył A, Grzywacz A, Laszczyńska M, Zimny M, Karakiewicz B, et al. The relationship between the *HLA-G* polymorphism and sHLA-G levels in parental pairs with high-risk pregnancy. Int J Environ Res Public Health. 2019; 16(9):1546. [DOI:10.3390/ijerph16091546] [PMID] [PMCID]

[24] Castelli EC, Ramalho J, Porto IO, Lima TH, Felício LP, Sabbagh A, et al. Insights into *HLA-G* genetics provided by worldwide haplotype diversity. Front Immunol. 2014; 5:476. [DOI:10.3389/fimmu.2014.00476] [PMID] [PMCID]

[25] Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, Melchiorri L, Criscuoli L, Dabizzi S, et al. Embryonic soluble *HLA-G* as a marker of developmental potential in embryos. Human Reprod. 2005; 20(1):138-46. [DOI:10.1093/humrep/deh572] [PMID]

[26] 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. [DOI:10.1093/nar/16.3.1215] [PMID] [PMCID]

[27] Tan Z, Shon AM, Ober C. Evidence of balancing selection at the *HLA-G* promoter region. Hum Mol Genet. 2005; 14(23):3619-28. [DOI:10.1093/hmg/ddi389] [PMID]

[28] Berger DS, Hogge WA, Barmada MM, Ferrell RE. Comprehensive analysis of HLA-G: Implications for recurrent spontaneous abortion. Reprod Sci. 2010; 17(4):331-8. [DOI:10.1177/1933719109356802] [PMID]

[29] Agrawal D, Prakash S, Misra MK, Phadke SR, Agrawal S. Implication of *HLA-G* 5′ upstream regulatory region polymorphisms in idiopathic recurrent spontaneous abortions. Reprod Biomed Online. 2015; 30(1):82-91. [DOI:10.1016/j.rbmo.2014.09.015] [PMID]

[30] Quintero-Ronderos P, Laissue P. Genetic variants contributing to early recurrent pregnancy loss etiology identified by sequencing approaches. Reprod Sci. 2019; 1933719119831769. [DOI:10.1177/1933719119831769] [PMID]

[31] Wang X, Biernacka JM. Assessing the effects of multiple markers in genetic association studies. Front Genet. 2015; 6:66. [DOI:10.3389/fgene.2015.00066] [PMID] [PMCID]

[32] Karimzadeh Meybodi MA, Taheripanah R. Infections in Recurrent Miscarriage. J Reprod Infertil. 2000; 1(2):24-34. [In Persian] https://www.jri.ir/article/327

This Page Intentionally Left Blank