

Association of rs1632943 and rs1736932 Polymorphisms of HLA-G gene with Recurrent Abortion in the Women in Northwest of Iran

Baharak Ebrahimi Behnam¹, Mohammad Khalaj-Kondori², Mohammad Ali Hosseinpour Feizi³

1.MSc, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran. ORCID ID: 0000-0001-6985-685X

2.Associate Professor, Department Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran., ORCID ID: 0000-0001-9231-889X, khalaj@tabrizu.ac.ir , Tel: +984133392674

3.Professor, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran. ORCID ID: 0000-0002-1508-5022

ABSTRACT

Background and Aim: Recurrent spontaneous abortion (RSA) is the most common complication of pregnancy that refers to two or more miscarriages before the 20th week of pregnancy. HLA-G immunoglobulin molecule plays an important role in protecting the fetus against mother's immune system. The aim of this study was to investigate the association between rs1632943 and rs1736932 polymorphisms with recurrent spontaneous abortion in Northwest of Iran.

Materials and Methods: This case-control study included 100 women with history of RSA as our case group and 80 healthy women with one or more than one children as the control group. Genomic DNA was purified from their peripheral blood samples and their genotypes were determined by PCR-sequencing method. Using SPSS 16, statistical analysis was performed by chi-square test.

Results: In rs1632943 polymorphism the frequency of CC, CA and AA genotypes were 8%, 33% and 59% in the patient group and 16.25%, 43.75% and % 40 in the control group, respectively. Statistical analysis showed that AA genotype was associated with the recurrent spontaneous abortion ($P = 0.005$). In the rs1736932 polymorphism, the frequency of CC, CG and GG genotypes were 8%, 32% and 60% in the patient group and 17.5%, 41.25% and 41.25% in the control group, respectively. Statistical analysis showed that GG genotype was associated with the recurrent miscarriage ($P = 0.005$). Also, haplotype analysis showed that H1 haplotype (GA) is associated with the disorder.

Conclusion: Results of the study showed that rs1632943 and rs1736932 polymorphisms might be considered as risk factors for RSA in the women in Northwest of Iran.

Keywords: HLA-G antigens, recurrent miscarriage, Single nucleotide polymorphism, Genetic association studies

Received: Jan 21, 2020

Accepted: Dec 20, 2020

How to cite the article: Baharak Ebrahimi Behnam, Mohammad Khalaj-Kondori, Mohammad, Ali Hosseinpour Feizi. Association of rs1632943 and rs1736932 Polymorphisms of HLA-G gene with Recurrent Abortion in the Women in Northwest of Iran. *SJKU* 2021;26(6):69-82.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

همراهی پلی مورفیسم های rs1632943 و rs1736932 ژن HLA-G با سقط مکرر در جمعیت زنان شمال غرب ایران

بهارک ابراهیمی بهنام^۱، محمد خلیج کندی^۲، محمدعلی حسینپور فیضی^۳

۱. کارشناسی ارشد، گروه علوم جانوری / دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. کد ارکید: ۶۸۵X-۶۹۸۵-۰۰۰۱-۰۰۰۰

۲. دانشیار، گروه علوم جانوری / دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، پست الکترونیک: khalaj@tabrizu.ac.ir، تلفن: ۰۴۱-۳۳۳۹۲۶۷۴، کد

ارکید: ۸۸۹X-۹۲۳۱-۰۰۰۱-۰۰۰۰

۳. استاد، گروه علوم جانوری / دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. کد ارکید: ۵۰۲۲-۱۵۰۸-۰۰۰۲-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: سقط مکرر (RSA) شایع ترین عارضه بارداری است که به وقوع دو یا بیش از دو مورد سقط قبل از هفته بیستم بارداری اطلاق می گردد. یکی از عوامل مهم دفع جنین مولکول ایمونوتولرانس HLA-G است که نقش مهمی در حفاظت از جنین در قبال سیستم ایمنی مادر دارد. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی مورفیسم های rs1632943 و rs1736932 ناحیه پروموتور ژن HLA-G با سقط مکرر در زنان شمال غرب ایران است.

مواد و روش ها: در این مطالعه مورد-شاهدی، ۱۰۰ زن با سابقه سقط مکرر به عنوان گروه مورد و ۸۰ زن سالم با یک یا بیشتر از یک کودک به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. DNA ژنومی از نمونه خون محیطی آنها استخراج و ژنوتیپ های آنها با استفاده از روش تعیین توالی مشخص شد. بررسی آماری نتایج حاصل، توسط آزمون مربع کای و نرم افزار SPSS ورژن ۱۶ انجام شد.

یافته ها: در پلی مورفیسم rs1632943 فراوانی ژنوتیپ های CA، CC و AA در گروه بیمار به ترتیب ۸٪، ۳۳٪ و ۵۹٪ در گروه شاهد ۱۶/۲۵٪، ۴۳/۷۵٪ و ۴۰٪ بود. تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که ژنوتیپ AA با سقط مکرر خود به خود همراه است (p=0.005) و در پلی مورفیسم rs1736932 فراوانی ژنوتیپ های CC، CG و GG به ترتیب ۸٪، ۳۲٪ و ۶۰٪ در گروه بیمار و ۱۷/۵٪، ۴۱/۲۵٪ و ۴۱/۲۵٪ در گروه شاهد بود. تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که ژنوتیپ GG با سقط مکرر همراه است (P=۰/۰۰۵). همچنین بررسی هاپلوتایپی نشان داد که هاپلوتایپ (GA) H1 با بیماری همراهی نشان می دهد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن است که پلی مورفیسم های rs1632943 و rs1736932 می توانند به عنوان یک عامل خطر برای RSA در زنان شمال غربی ایران در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: آنتی ژنهای HLA-G، سقط مکرر، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی، مطالعات همراهی ژنتیکی

وصول مقاله: ۹۸/۱۱/۱ اصلاحیه نهایی: ۹۹/۷/۲۸ پذیرش: ۹۹/۹/۳۰

مقدمه

سقط مکرر (RSA) به صورت دو بار یا بیشتر از دست دادن محصول حاملگی به طور پیاپی، در سه ماهه‌ی اول بارداری و یا قبل از رسیدن وزن جنین به ۵۰۰ گرم تعریف می‌شود (۱). سقط های مکرر به دو دسته اولیه و ثانویه تقسیم می‌شوند. سقط مکرر اولیه که به دو سقط پشت سر هم بدون هیچ تولد زنده اطلاق می‌گردد و سقط های مکرر ثانویه به سقط‌هایی که بعد از یک بارداری موفق و تولد زنده صورت می‌گیرد، گفته می‌شود (۲). سقط مکرر در یک الی دو درصد خانم‌هایی که قصد دارند صاحب فرزند شوند رخ می‌دهد (۳). علل سقط مکرر مالتی فاکتوریال است، ولی می‌توان دلایل آن را به دو دسته عمده جنینی و مادری تقسیم کرد. در مورد علل مادری می‌توان اختلالات انعقادی، اختلالات غدد درون ریز و نقص های اندومتریال را نام برد (۴ و ۵). از دیگر عوامل مهم، عوامل ایمنولوژیک هستند. در کل علت حدود نیمی از موارد سقط مکرر ناشناخته است که در این میان نقش عوامل ایمنولوژیک بیش از سایر عوامل مطرح است (۶).

یکی از عوامل مهم دفع جنین مولکول ایمنوتولرانس Human leukocyte antigen-G (HLA-G) است که نقش مهمی در حفاظت از جنین در قبال سیستم ایمنی مادر دارد. HLA-G یکی از مولکول‌های غیر کلاسیک از آنتی‌ژن‌های سازگاری نسجی کلاس یک انسان است که حدود بیست سال پیش بروز آن توسط سلول‌های تروفوبلاست جفتی مشخص شد. از آن جایی که سلول‌های تروفوبلاست مرز بین مادر و جنین را تشکیل می‌دهند؛ لذا تصور می‌شود HLA-G نقش مهمی در حفاظت از جنین در قبال سیستم ایمنی مادر را داشته باشد (۷). ژن HLA-G در موقعیت کروموزومی 6p21.3 است (۸). ساختار ژن آن مشابه با لوکوس HLA کلاسیک شامل هشت اگزون، هفت اینترون و یک ناحیه غیر قابل ترجمه در انتهای ۳ است (۹). همانند

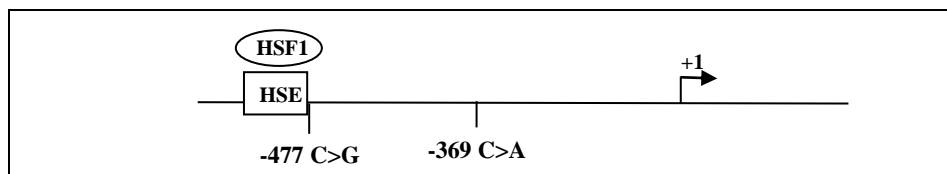
مولکول HLA کلاسیک، مولکول HLA-G نیز دارای دو زنجیره سبک و سنگین است که زنجیره سنگین به صورت غیر کووالان به زنجیره سبک متصل می‌باشد. زنجیره سنگین توسط ژن HLA-G کد شده و زنجیره سبک (بتا دو میکروگلوبولین) از طریق ژنی در کروموزوم ۱۵ کد می‌شود. اگزون‌های یک، دو، سه، چهار، پنج و شش به ترتیب پپتید رهبر، دومین آلفا یک، دومین آلفا دو، دومین آلفا سه، ناحیه ترانس ممبرین و دم سیتوپلاسمی را کد می‌کنند. مولکول‌های HLA-G به علت حضور یک کدون پایان زودرس در اگزون شش، دم سیتوپلاسمی کوتاه تری در مقایسه با مولکول‌های HLA کلاسیک، دارند (۸).

ژن HLA-G با پردازش متناوب mRNA هفت پروتئین مختلف ایجاد می‌کند که از این پروتئین‌ها چهار پروتئین متصل به غشا (HLA-G_۱ تا HLA-G_۴) و سه تا محلول (HLA-G_۵ تا HLA-G_۷) است. فرم کامل HLA-G mRNA باعث تولید پروتئین HLA-G1 می‌گردد. این پروتئین شامل سه دومن کروی خارج سلولی، یک دومن متصل به غشا و یک دومن داخل سیتوپلاسمی است. در افراد سالم HLA-G در یک تراز پایه‌ای در بیشتر سلول‌ها و بافت‌ها رونویسی می‌شود؛ اما بیان آن محدود به بافت‌هایی نظیر تروفوبلاست، تیموس، ماتریکس ناخن، پانکراس و پیش‌سازهای اریترئوئید و اندوتلیال می‌باشد (۱۰). مطالعات نشان می‌دهند فرم همودایمر متصل به بتا دو میکروگلوبولین HLA-G، فرم اصلی HLA-G است که توسط سلول‌های تروفوبلاست بیان می‌شود (۱۱). HLA-G اعمال مهاری خود را علیه سلول‌های کشنده طبیعی (NK Cell)، لنفوسیت‌های T (T cell) و سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن با اتصال به رسپتورهای مهاری Immunoglobulin-like

(LILRB _۱ /CD _{8۵j})	/	(ILT _۲)	transcript	2
Immunoglobulin-like			transcript	4
Killer-cell	و	(LILRB _۲ /CD _{8۵d})	/	(ILT ₄)
immunoglobulin-like		receptor		2DL4

مترادف‌اند؛ لذا ترکیب اسید آمینه را در ساختار پروتئین تغییر نمی‌دهند. در ساختار این ژن، پلی مورفیسم در ناحیه کد کننده، ناحیه تنظیمی بالادست، پروموتور و ناحیه غیر قابل ترجمه در انتهای ۳ ژن گزارش شده است. پلی مورفیسم در نواحی غیر کد کننده ژن HLA-G، روی بیان HLA-G اثر گذاشته و پروتئین‌هایی با اعمال مختلف ایجاد می‌کند (۱۸). امروزه ۵۰ آلل برای این مولکول شناسایی شده است که ۱۸ پروتئین با ساختاری متفاوت را کد می‌نماید که شامل همه ایزوفرم‌ها است (۱۹). تاکنون ۲۹ پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در ناحیه پروموتور گزارش شده است (۲۰). پلی مورفیسم‌های rs1632943 و rs1736932 در ناحیه پروموتوری ژن HLA-G قرار گرفته و تحت عنوان -369 C>A و -477 C>G, A نیز شناخته می‌شوند که بازدهی رونویسی را تغییر داده و در بروز سقط مکرر نقش دارند. موقعیت کروموزومی پلی مورفیسم‌های rs1632943 و rs1736932 در شکل شماره ۱ نشان داده شده است.

HLA-G (CD158d)/(KIR2DL4) انجام می‌دهد (۱۲). HLA-G موجود در سطح سلول‌های تروفوبلاست با رسپتورهای مھاری سلول‌های NK رھمی واکنش نشان می‌دهد. این واکنش باعث می‌شود سیستم ایمنی مادر به جنین حمله نکند. اتصال HLA-G به رسپتور KIR2DL4 در سطح NK رھمی منجر به افزایش سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رگ‌زایی می‌شوند که این کار به جایگزینی جنین در رحم و توسعه و رگ‌زایی جفت کمک زیادی می‌کند (۱۳). بررسی‌ها نشان داده‌اند که هم فرم متصل به غشا و هم فرم محلول HLA-G، عملکرد سیتولیتیک لنفوسیت‌های T کشنده سلولی و NK cell را مھار می‌کند (۱۴). علاوه بر این، فرم محلول HLA-G قادر است در سلول‌های NK و TDC⁺ آپوپتوزیس را القا کند (۱۵ و ۱۶). مولکول sHLA-G₁ به کمک پروسه Fas/FasL و مستقل از TCR، باعث آپوپتوز در سلول‌های TCD₈ می‌شود؛ لذا تصور می‌شود در دوران بارداری sHLA-G₁ از این طریق باعث حذف سلول‌های فعال مادر گردد (۱۷). اکثر پلی مورفیسم‌ها در ژن HLA-G



شکل ۱. موقعیت کروموزومی پلی مورفیسم‌های rs1632943 (-369 C>A) و rs1736932 (-477 C>G). +1 نشان دهنده محل شروع رونویسی می‌باشد. HSE محل توالی عنصر شوک گرمايي می‌باشد که HSF1 به آن متصل می‌شود.

گونه استرس به سلول مانند افزایش حرارت، موجب اتصال فاکتور شوک گرما به عنصر شوک گرما می‌شود که منجر به فعال شدن رونویسی می‌شود. در زنانی که نابارور هستند و یا مشکلات بارداری دارند کمبود فاکتور شوک گرما مشاهده شده است. پلی مورفیسم rs1736932 اتصال فاکتور شوک گرما به عنصر شوک گرما را تحت تأثیر قرار

پلی مورفیسم rs1736932 در نزدیکی عنصر شوک گرما قرار دارد که به نظر می‌رسد فاکتور شوک گرما توانایی اتصال به این عنصر را دارد. عنصر شوک گرما از توالی‌های تکراری پشت سر هم nGAAn تشکیل شده است. این عنصر در منطقه پروموتور ژن HLA-G که پروتئین‌های شوک گرما از روی آن رونویسی می‌شوند، قرار دارد. هر

گروه کنترل نیز حداقل دارای دو تولد زنده و فاقد سابقه سقط مکرر بودند. بعد از اخذ رضایت نامه از افراد، نمونه گیری از خون وریدی انجام گردید. از هر فرد به مقدار ۴ سی سی خون گرفته شد. تمامی نمونه ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد جهت استخراج DNA از خون نگهداری شدند. فرم رضایت انجام طرح تحقیقاتی توسط بیماران تکمیل گردیده و کد اخلاقی پزشکی به شماره IR.TABRIZU.REC.1398.029 مربوط به انجام این طرح نیز از دانشگاه تبریز اخذ شد.

استخراج DNA:

استخراج DNA ژنومی با روش نمک اشباع صورت گرفت. نمونه های استخراج شده به ترتیب با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز (۱٪) و اسپکتروفوتومتر از نظر کیفی و کمی بررسی شدند. DNA استخراج شده تا زمان انجام واکنش PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR):

به منظور بررسی پلی مورفیسم های rs1632943 و rs1736932 واکنش زنجیره ای پلیمرز توسط یک جفت پرایمر اختصاصی انجام گرفت. طراحی پرایمرها با استفاده از نرم افزار OLIGO7 صورت گرفت و اختصاصات آن ها توسط Primer-BLAST بررسی شد. پرایمرها توسط شرکت Metabion آلمان ساخته شدند. توالی پرایمرها در جدول ۱ ارائه شده است.

می دهد و منجر به تفاوت های اولیه در بیان ژن HLA-G می شود که بیان سایتوکاین هایی نظیر اینترلوکین ۱۰ را تحت تأثیر قرار می دهد. با این حال برای توضیحات بیشتر به آزمایش های جدیدی نیاز است (۲۱). پلی مورفیسم rs1632943 در ناحیه پروموتور ژن HLA-G قرار گرفته است و تغییر نوکلئوتیدی در این جایگاه باعث تغییر محل شناسایی برای فاکتورهای رونویسی می شود (۲۲). هدف از این مطالعه بررسی ارتباط دو پلی مورفیسم rs1632943 و rs1736932 با HLA-G با سابقه سقط مکرر در میان زنان شمال غرب ایران (استان های آذربایجان شرقی، غربی و اردبیل) بود.

مواد و روش ها

این مطالعه یک مطالعه موردی-شاهدی بوده که در آن ۸۰ فرد سالم و ۱۰۰ فرد بیمار مورد ارزیابی قرار گرفته اند. طیف سنی در گروه مورد ۲۰ تا ۴۲ سال با میانگین ۳۳/۱۷ و در گروه شاهد نیز ۲۲ تا ۴۳ سال با میانگین ۳۲/۲۵ بود. همه ۱۰۰ بیمار مطالعه شده، مبتلایان مراجعه کننده به کلینیک مادر و یا بیمارستان الزهرا واقع در شهر تبریز بودند. این بیماران از تمام نقاط شمال غرب ایران به این مراکز مراجعه نموده و پس از تشخیص متخصص زنان و زایمان مبنی بر اینکه بیماران مبتلا به سقط مکرر فاقد دلایل شناخته شده از جمله (عفونت ها، مشکلات کروموزومی، اختلالات هورمونی و آناتومیکی رحمی) هستند، نمونه گیری انجام شد. همه بیماران دارای حداقل دو سابقه سقط بودند. افراد

جدول ۱. مشخصات آغاز گره های مورد استفاده

نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه محصول	منطقه مورد بررسی
HLA-G (Forward)	5'_GACTCACACGGAACTTAGG_3'	۶۸۴bp	پروموتور HLA-G ژن
HLA-G (Reverse)	5'_ACACAGGTTAGGAGAAGGAG_3'		

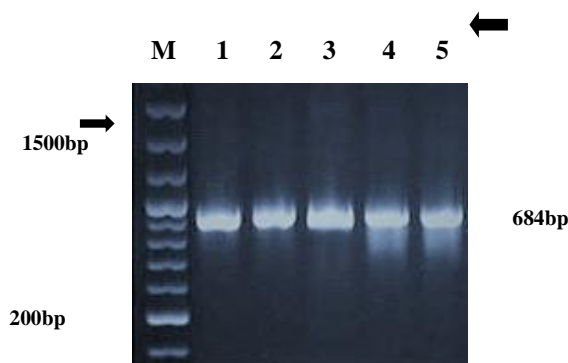
فراواني در دو گروه بيمار و كنترل توسط آزمون مربع كاي مقايسه گرديد. سطح معني داري $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

يافته ها

در اين مطالعه ١٨٠ نفر شركت داشتند كه از اين تعداد ١٠٠ نفر با سابقه سقط مكرر به عنوان گروه مورد و ٨٠ نفر بدون سابقه سقط به عنوان گروه شاهد بودند. ميانگين سني در گروه مورد ٣٣.١٧ سال و در گروه شاهد ٣٢.٢٥ سال بود. بر اساس نتايج مطالعه، بين دو گروه مورد و شاهد از نظر ميانگين سني اختلاف آماري معني داري وجود نداشت ($p=0.171$, 95% CI: ٠.٣٩٦_١.٣٦٣, OR=٠.٧٣٥).

استخراج DNA و انجام PCR:

پس از استخراج DNA، واكنش PCR براي تكثير ناحيه دربردارنده پلي مورفيسم هاي مورد مطالعه انجام شد و محصول PCR بر روي ژل آگاروز الكتروفورز شدند. شكل ٢ الكتروفورز تعدادي از نمونه ها را نشان مي دهد كه در آن تكثير قطعه اي به طول ٦٨٤ جفت مشاهده مي شود.



شكل ٢: الكتروفورز محصولات PCR روي ژل آگاروز ٢٪. چاهك DNA = M ماركر 100 bp شركت NEB، چاهك هاي ١، ٢، ٣ و ٤ محصول چهار نمونه مختلف مي باشد.

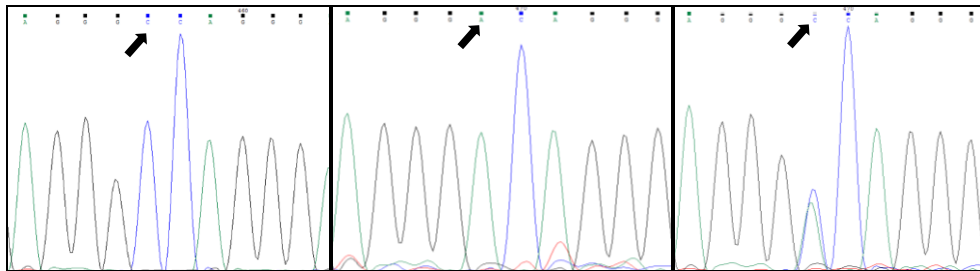
ژنوتيب هاي مختلف پلي مورفيسم rs1632943 را نشان مي دهد.

فرايند PCR در دستگاه ترموسايكلر (شركت سازنده SENSOQUSE آلمان) شامل واسرشتي اوليه، يك سيكل ٥ دقيقه اي در دماي ٩٥، به دنبال آن ٤٠ سيكل شامل ٣٠ ثانيه واسرشتي در دماي ٩٥، ٣٠ ثانيه اتصال در دماي ٥٨، ٣٠ ثانيه تكثير در دماي ٧٢ و در نهايت ٥ دقيقه در دماي ٧٢ انجام شد. براي تائيد تكثير قطعه مورد نظر به طول ٦٨٤ جفت باز، الكتروفورز محصولات PCR بر روي ژل آگارز ٢٪ صورت گرفت.

تعيين ژنوتيب:

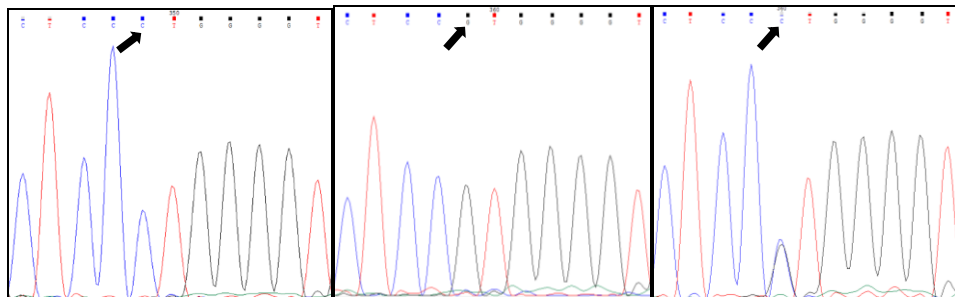
در اين تحقيق از روش توالي يابي براي تعيين ژنوتيب افراد استفاده گرديد. براي اين منظور محصولات PCR نمونه ها جهت تعيين توالي به شركت ميكروسينس سويس ارسال شدند. نتايج توالي يابي توسط نرم افزار Chromas تجزيه و تحليل گرديد. فراواني هاي آلي و ژنوتيب تمام افراد از روي نتايج تعيين توالي مشخص و محاسبه شده، سپس

فراواني ژنوتيب و آلي پلي مورفيسم هاي rs1632943 و rs1736932 براي مشخص كردن ژنوتيب افراد از روش تعيين توالي استفاده شد. شكل ٣ نمونه اي از كروماتوگرام



شکل ۳: کروماتوگرام نشان دهنده از چپ به راست فرد هموزیگوت (CC)، (AA) و هتروزیگوت (CA) در جایگاه پلی مورفیسم (rs1632943)

همچنین نمونه هایی از کروماتوگرام مربوط به ژنوتیپ های مختلف پلی مورفیسم rs1736932 در شکل ۴ نشان داده شده است.



شکل ۴: کروماتوگرام نشان دهنده از چپ به راست فرد هموزیگوت (CC)، (GG) و هتروزیگوت (CG) در جایگاه پلی مورفیسم (rs1736932)

مقدار odd's ratio به دست آمده برای ژنوتیپ (AA) بزرگتر از یک می باشد (OR=2.159, CI: 1.181-3.955) که بیانگر آن است که این ژنوتیپ می تواند احتمال ابتلا به سقط مکرر را در این جمعیت افزایش دهد. همچنین مقایسه فراوانی های آللی C و A حاکی از اختلاف معنادار آماری در بین گروه بیمار و کنترل بود و برای آلل A مقدار بزرگتر از یک به دست آمد (OR=1/899, CI: 0.989-3.622) که بیانگر این است که این آلل می تواند باعث افزایش احتمال ابتلا به سقط مکرر در این جمعیت شود.

توزیع ژنوتیپی پلی مورفیسم های rs1632943 و rs1736932 ژن HLA-G برای افراد مبتلا به بیماری سقط مکرر و گروه کنترل محاسبه گردید. در این بررسی فراوانی پلی مورفیسم rs1632943 در بین افراد مبتلا، ۸ بیمار هموزیگوت (CC)، ۳۳ بیمار هتروزیگوت (CA) و ۵۹ بیمار هموزیگوت (AA) تشخیص داده شدند. همچنین از بین افراد گروه کنترل، ۳۱ فرد هموزیگوت (CC)، ۳۵ فرد هتروزیگوت (CA) و ۳۲ فرد هموزیگوت (AA) یافت شدند. در پلی مورفیسم rs1632943 همان طور که جدول ۲ نشان می دهد اختلاف معناداری بین فراوانی های ژنوتیپ های (AA) و (CC) بین دو گروه وجود داشت ($P < 0.05$).

که بیانگر آن است که این ژنوتیپ می‌تواند احتمال ابتلا به سقط مکرر را در این جمعیت افزایش دهد. همچنین مقایسه فراوانی های آللی های C و G حاکی از اختلاف معنادار آماری در بین گروه بیمار و کنترل بود و برای آلل G مقدار بزرگتر از یک به دست آمد (OR=۱/۹۵۱, CI: ۱/۰۱۴-۳/۷۶۷) که بیانگر این است که این آلل می‌تواند باعث افزایش احتمال ابتلا به سقط مکرر در این جمعیت شود. فراوانی ژنوتیپی و فراوانی آللی پلی مورفیسم های rs1736932 و rs1632943 در گروه بیمار و کنترل در جدول ۲ ذکر گردیده است.

فراوانی پلی مورفیسم rs1736932 در بین افراد مبتلا، ۸ بیمار هموزیگوت (CC)، ۳۲ بیمار هتروزیگوت (CG) و ۶۰ بیمار هموزیگوت (GG) تشخیص داده شدند. از بین افراد گروه کنترل، ۱۴ فرد هموزیگوت (CC)، ۳۳ فرد هتروزیگوت (CG) و ۳۳ فرد هموزیگوت (GG) یافت شدند. در پلی مورفیسم rs1736932 همان‌طور که جدول ۲ نشان می‌دهد اختلاف معناداری بین فراوانی‌های ژنوتیپ های (CC) و (GG) بین دو گروه وجود داشت ($P < 0.05$) مقدار odd's ratio به دست آمده برای ژنوتیپ (GG) بزرگ‌تر از یک می‌باشد (OR=۲.۱۳۶, CI: ۱.۱۶۹-۳/۹۱۳)

جدول ۲. فراوانی ژنوتیپی و آللی پلی مورفیسم های rs1736932 و rs1632943 در گروه بیمار و کنترل

متغیر	بیماران (درصد)	کنترل (درصد)	OR (CI95%)	سطح معنی داری
rs1632943				
ژنوتیپ CC	۸(۸)	۱۳(۱۶/۲۵)	۰/۴۴۸(۱/۱۶۶-۱/۱۸۲)	۰/۰۵۴*
CA	۳۳(۳۳)	۳۵(۴۳/۷۵)	۰/۶۳۳(۰/۳۴۲-۱/۱۷۰)	۰/۰۷۸
AA	۵۹(۵۹)	۳۲(۴۰)	۲/۱۵۹(۱/۱۸۱-۳/۹۵۵)	۰/۰۰۵*
آلل C	۴۹(۲۴/۵)	۶۱(۳۸/۱۲۵)	۰/۵۲۷(۰/۲۷۴-۱/۰۱۱)	۰/۰۱۹*
A	۱۵۱(۷۵/۵)	۹۹(۶۱/۸۷۵)	۱/۸۹۹(۰/۹۸۹-۳/۶۲۲)	۰/۰۱۴*
rs1736932				
ژنوتیپ CC	۸(۸)	۱۴(۱۷/۵)	۰/۴۱۰(۰/۱۵۳-۱/۰۶۹)	۰/۰۳۵*
CG	۳۲(۳۲)	۳۳(۴۱/۲۵)	۰/۶۷۰(۰/۳۶۰-۱/۲۴۵)	۰/۱۱
GG	۶۰(۶۰)	۳۳(۴۱/۲۵)	۲/۱۳۶(۱/۱۶۹-۳/۹۱۳)	۰/۰۰۵*
آلل C	۴۸(۲۴)	۶۱(۳۸/۱۲۵)	۰/۵۱۳(۰/۲۶۵-۰/۹۸۶)	۰/۰۲۲*
G	۱۵۲(۷۶)	۹۹(۶۱/۸۷۵)	۱/۹۵۱(۱/۰۱۴-۳/۷۶۷)	۰/۰۱۱*

CI=فاصله اطمینان * معنی داری از لحاظ آماری $P < 0.05$

آنالیز هاپلوتایپ ها: بعد از دادن ژنوتیپ افراد کنترل و بیمار به نرم افزار SNP Analyzer چهار هاپلوتایپ به عنوان نتایج نمایان گردید که فراوانی هاپلوتایپ ها در افراد بیمار و کنترل در جدول شماره ۳ درج شده اند.

جدول ۳. فراوانی هاپلوتایپ ها در افراد بیمار و کنترل

هاپلوتایپ	توالی	فراوانی در افراد کنترل	فراوانی در افراد بیمار	فراوانی در کل	OR (CI95%)	سطح معنی داری
H1	GA	۰/۶۰۶	۰/۷۲۳	۱۷/۶۷٪	۱/۷۱۲(۱/۰۹۹-۲/۶۶۹)	۰/۰۱*

	H2	CC	۰/۳۶۸	۰/۲۰۸	۲۸٪	۰/۴۵۵(۰/۲۸۵-۰/۷۲۷)	۰/۰۰۸*
	H3	GC	۰/۰۱۲	۰/۰۳۶	۲,۵۵٪	۲/۸۶۵(۰/۵۸۷-۱۳/۹۸۸)	۰/۳
	H4	CA	۰/۰۱۲	۰/۰۳۱	۲/۲۸٪	۲/۴۴۳(۰/۴۸۶-۱۲/۲۷۳)	۰/۴

CI=فاصله اطمینان * معنی داری از لحاظ آماری P<0.05

۳۶۹- و C>G,A ۴۷۷- نیز شناخته می شوند، بازدھی رونویسی را تغییر می دهند و همچنین در بروز سقط مکرر نقش دارند. در مطالعه حاضر پلی مورفیسم های rs1632943 و rs1736932 مورد بررسی قرار گرفته است. بر اساس این مطالعه در پلی مورفیسم rs1632943 فراوانی ژنوتیپ(AA) در گروه بیمار بیشتر از گروه کنترل بوده و تفاوت توزیع این ژنوتیپ معنی دار است (P=۰/۰۰۵) همچنین بر اساس میزان Odd ratio بدست آمده ۳/۹۹۵- (OR=۲/۱۵۹, CI=۱/۱۸۱) به احتمال زیاد این ژنوتیپ خطر ابتلا به بیماری سقط مکرر را افزایش می دهد؛ لذا می تواند به عنوان یک فاکتور خطر محسوب شود. همان طور که در جدول ۲ مشاهده می شود فراوانی آلل A در افراد بیمار بیشتر از کنترل بوده و تفاوت توزیع این آلل معنی دار است(P=۰/۰۱۴) بر اساس میزان Odd ratio به دست آمده (OR=۱/۸۹۹, CI=۳/۶۵۶-۰,۹۸۹) احتمال دارد آلل A یک فاکتور خطر محسوب شود و با توجه به نتایج به دست آمده برای پلی مورفیسم rs1736932، فراوانی ژنوتیپ (GG) در گروه بیمار بیشتر از گروه کنترل بوده و تفاوت توزیع این ژنوتیپ معنی دار می باشد (P=۰/۰۰۵). همچنین بر اساس میزان Odd ratio بدست آمده (OR=۲/۱۳۶, CI=۱/۱۶۹-۳/۳۱۹) به احتمال زیاد این ژنوتیپ خطر ابتلا به بیماری سقط مکرر را افزایش می دهد و می تواند به عنوان یک فاکتور خطر محسوب شود. همان طور که در جدول ۲ مشاهده می شود فراوانی آلل G در افراد بیمار بیشتر از کنترل بوده و تفاوت توزیع این آلل معنی دار است (P=۰/۰۱۱) بر اساس میزان Odd ratio بدست آمده (OR=۱/۹۵۱, CI=۱/۰۱۴-۳/۷۶۷) احتمال دارد آلل G یک فاکتور خطر محسوب شود. مطالعات متعددی در مورد ارتباط پلی مورفیسم های ژن HLA-G و سقط مکرر در جمعیت های

P-value محاسبه شده برای هاپلوتایپ های H1 و H2 کمتر از ۰/۰۵ است و با توجه به مقادیر Odd ratio، هاپلوتایپ H1 همراهی معنی داری با سقط مکرر نشان می دهد.

بحث

از زمان کشف و کلون کردن HLA-G در سال ۱۹۸۷ مطالعات زیادی روی این مولکول صورت گرفته است(۹). بیان HLA-G اولین بار، در طول بارداری روی سلول های سیتوتروفوبلاست طبیعی نشان داده شد. در حقیقت اولین عملکرد شناخته شده HLA-G نقش آن در ایجاد تولرانس در مادر نسبت به جنین در طول بارداری است(۲۳). به تدریج در طول دو دهه بعد، مشخص گردید HLA-G یک مولکول مهم در سیستم ایمنی بوده و نقش حیاتی در تولید مثل، پیوند، عفونت و نیز بیماری های خود ایمنی دارد(۲۴) و HLA-G محلول باعث ایجاد آپوپتوز در سلول های TCD8 می گردد و این کار را از طریق اتصال به CD8 و با مکانیسم وابسته به Fas انجام می دهد. HLA-G در بارداری عملکرد سیتولیتیک سلول های NK مادری را مهار می کند؛ لذا جنین را از سقط نجات می دهد. (۲۶،۲۷). مطالعات چندی برای بررسی ارتباط بیان HLA-G در بافت ها و بیماری های مختلف صورت گرفته است. تعدادی از مطالعات، ارتباط بین HLA-G و مشکلاتی نظیر سقط مکرر را نشان داده اند(۲۸). تاکنون بیشترین مطالعه در زمینه ارتباط HLA-G با بیماری ها، راجع به نقش HLA-G در سقط مکرر جنینی است. در میان آن ها شایع ترین واریانت ها در ارتباط با سقط مکرر در پروموتور این ژن قرار دارد. پلی مورفیسم های rs1632943 و rs1736932 در ناحیه پروموتور ژن HLA-G قرار گرفته اند که تحت عنوان C>A

زوج قفقازى انجام دادند و ۱۱ پلى مورفيسم از جمله پلى مورفيسم هاى ۳۶۹ - و ۴۷۷ - را شناسايى كردند. آن ها نشان دادند پلى مورفيسم موجود در ناحيه ۵' URR ژن-HLA-G مى تواند ترشح اينترلوکين ۱۰ را تحت تأثير قرار دهد. پلى مورفيسم ۴۷۷- که در پروموتور ژن HLA-G قرار دارد ارتباط معنى دارى با غلظت اينترلوکين ۱۰ را نشان داد (۳۲). دارا سوزان برگر و همکارانش در سال ۲۰۱۰ يك گروه ۲۳۸ نفرى از زنان قفقازى که سابقه حداقل دو سقط جنين را داشتند و ۲۳۸ نفر گروه کنترل بدون داشتن سابقه سقط را از نظر وجود پلى مورفيسم هاى ۳۶۹ - و ۴۷۷ - مورد بررسى قرار دادند و با توجه به P-value به دست آمده ($P < 0.05$) براى هر دو پلى مورفيسم مذکور، دارا سوزان برگر و همکارانش به اين نتيجه رسيدند که ارتباط معنى دارى بين اين پلى مورفيسم ها و سقط مکرر وجود دارد. نتايج حاصل از مطالعه ما با نتايج حاصل از مطالعه برگر و همکارانش بر روى جمعيت زنان قفقازى سازگار است و آن ها هم در مطالعه خود بين پلى مورفيسم هاى rs1632943 و rs1736932 و سقط مکرر همراهمعادارى مشاهده کردند (۳۳). موتى و همکارانش در سال ۲۰۱۹ با بررسى ارتباط بين پلى مورفيسم ۱۴bp در منطقه UTR ۳' ژن HLA-G در حالت هاى +۱۴bp/+۱۴bp و -۱۴bp/+۱۴bp (۱۴bp بروى زنان داراى سقط مکرر به اين نتيجه رسيدند که ارتباط معنادارى بين ژنوتيب +۱۴bp/+۱۴bp و سقط مکرر وجود دارد. همچنين نشان دادند فراوانى ژنوتيب +۱۴bp/+۱۴bp در زنان داراى سقط مکرر نسبت به زنان بدون سابقه سقط بيشتر است (95% ; $1/562$; odds ratio = $1/203-2/27$) (۳۴). مظفرى و همکارانش در سال ۲۰۱۹ با استفاده از تکنیک real-time pcr با بررسى ارتباط بين بيان ژن HLA-G و سقط مکرر بر روى نمونه هاى بافى (جفت) زنان به اين نتيجه رسيدند که در زنان داراى سقط مکرر بيان ژن HLA-G کاهش مى يابد (۳۵). کرينمهر و همکاران در سال ۲۰۱۹ با مطالعه روى پلى مورفيسم +۱۴bp

مختلف انجام گرفته است. ويد و همکارانش در سال ۱۹۹۹ اولين تحقيق خود را بر روى پروموتور ژن HLA-G انجام دادند. هدف آن ها بررسى تأثير هر گونه تغيير توالى ممکن بر روى اتصال فاکتور هاى رونويسى بود که اين تغييرات بر روى سطح بيان ژن HLA-G تأثير مى گذاشت. آن ها در اين تحقيق ۷ پلى مورفيسم و يك ناحيه حذف را در پروموتور ژن HLA-G گزارش کردند (۲۹). ويد و همکارانش در سال ۲۰۰۲ بيان کردند که غلظت پايين ايزوفرم هاى محلول موجب نتايج منفى در IVF مى شود و نتيجه گرفتند که پلى مورفيسم هاى HLA-G با باردارى پاتولوژيک ارتباط دارد. با اين وجود، اين موضوع هنوز بحث برانگيز باقى مانده است (۳۰). ابر و همکارانش در سال ۲۰۰۳ در آمريکاي شمالى گروهى ۸۴ نفر متشکل از ۴۲ زن با سابقه سقط مکرر و ۴۲ زن به عنوان کنترل بدون داشتن سابقه مکرر را مورد بررسى قرار دادند. در اين مطالعه ۱۸ پلى مورفيسم از جمله پلى مورفيسم هاى ۳۶۹ - و ۴۷۷ - در ناحيه پروموتور ژن HLA-G گزارش گرديد. تنها پلى مورفيسم ۷۲۵- در ناحيه پروموتور ژن HLA-G همراهمعنى دارى را با سقط مکرر نشان داد. در اين مطالعه نشان دادند کاهش سطح HLA-G1 مى تواند با سقط مکرر ارتباط داشته باشد (۲۲). ويد و همکارانش در سال ۲۰۰۴ مطالعه خود را روى ۸۵ زوج دانماركى که براى IVF مراجعه کرده بودند انجام دادند. در اين مطالعه ۱۲ پلى مورفيسم از جمله پلى مورفيسم هاى ۳۶۹ - و ۴۷۷ - گزارش گرديد. همچنين در اين مطالعه سطح HLA-G5\ sHLA-G و غلظت اينترلوکين ۱۰ در سرم نمونه ها مورد بررسى قرار گرفت. در ۲۱٪ نمونه ها sHLA-G1/HLA-G5 شناسايى شد؛ ولى هيچ ارتباطى بين sHLA-G1/HLA-G5 و غلظت اينترلوکين ۱۰ در سرم اين افراد يافت نشد. ويد و همکارانش نتيجه گرفتند که هر گونه تغيير در ناحيه پروموتور ژن HLA-G منجر به کاهش سطح sHLA-G گرديده و اين باعث سقط مکرر مى شود (۳۱). ويد و همکارانش در سال ۲۰۰۶ مطالعه خود را روى ۶۱

مورد مطالعه نشان داد که شایع ترین هاپلوتایپ، هاپلوتایپ H1 با توالی GA و فراوانی ۶۷/۱۷ درصد و نادرترین هاپلوتایپ، هاپلوتایپ H4 با توالی CA و فراوانی ۲/۲۸ درصد می باشد. همچنین هاپلوتایپ GA با نسبت احتمال شانس ۱/۷۱۲ همراهی مثبت با سقط مکرر نشان می دهد و می تواند به عنوان عامل خطر در نظر گرفته شود. در مقابل هاپلوتایپ CC با داشتن نسبت احتمال شانس ۰/۴۵۵ به عنوان یک فاکتور حفاظتی برای موفقیت بارداری در جمعیت مورد مطالعه محسوب می شود. در این راستا، یزدانی و همکارانش در سال ۲۰۱۸ پلی مورفیسم های ناحیه متفاوتی از ناحیه مورد بررسی در مطالعه ما را در زنان دارای سقط مکرر بررسی کرده و نشان دادند که هاپلوتایپ (ATCCAGGTACGCAA) منجر به کاهش سقط مکرر و هاپلوتایپ (CTTCGAGAACGCAG) منجر به افزایش سقط مکرر می شوند (۳۹).

نتیجه گیری

در کل مطالعه حاضر نشان داد که پلی مورفیسم های rs1736932 و rs1632943 با سقط مکرر در جمعیت مورد مطالعه همراهی نشان می دهند. همچنین هاپلوتایپ GA بالاترین هاپلوتایپ را در جمعیت زنان شمال غرب ایران داشته و با بیماری سقط مکرر همراهی نشان می دهد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه افراد شرکت کننده در این مطالعه تشکر و قدردانی می شود.

واقع در منطقه UTR ۳' ژن HLA-G و ارتباط آن با سقط مکرر به این نتیجه رسیدند که فراوانی ژنوتیپ ۱۴bp del/del در زنان دارای سقط کمتر از گروه کنترل است (OR= ۰.۲۸; p=۰.۰۳۹). همچنین نشان دادند که مقدار بیان پروتئین در بافت جفت در زنان دارای سقط، بیشتر از گروه کنترل است (۳۶). کوچ و همکاران در سال ۲۰۱۸ در ترکیه با تعیین توالی منطقه UTR ۳' ژن HLA-G به این نتیجه رسیدند که آلل G*01:04 به طور معناداری با سقط جنین همراه بود (p=۰.۰۰۷) و سقط مکرر جنین هیچ ارتباط معنا داری با حذف ۱۴bp ناحیه UTR ۳' ژن HLA-G ندارد (۳۷). به طور کلی، جستجو برای یافتن ژن ها و تغییرات توالی مرتبط با سقط مکرر ادامه دارد؛ مثلاً شی و همکاران در سال ۲۰۱۷ با مطالعه گسترده بر روی ۱۲۴ پلی مورفیسم از ۳۷ ژن مختلف و ارتباط آن با سقط مکرر به این نتیجه رسیدند که ۳۵ پلی مورفیسم از ۳۷ ژن ارتباط معناداری با سقط مکرر دارند. آنان تخمین زدند که واریانت های ژنتیکی از ژن های HLA-G، IFNG، TNF، IL-6، MTHFR، MTR، ITGB3، FXIII، FV، FII، IL-10، CYP17، VEGFA، TP53، KDR، NOS3، PAI-1، CYP1A1، CYP2D6، ANXA5 و XCI می توانند به عنوان مارکر های بیولوژیکی برای سقط عمل کنند (۳۸). بررسی های هاپلوتایپی و یافتن ارتباط معنی دار بیماری با هاپلوتایپ های خاص از اهمیت ویژه ای برخوردار است و می تواند اطلاعات دقیق تری در مقایسه با یک پلی مورفیسم فراهم کند. فراوانی هاپلوتایپ ها در جمعیت های مختلف، متفاوت بوده و به پیش زمینه ژنتیکی آن جمعیت بستگی دارد (۳۹). نتایج حاصل از بررسی هاپلوتایپی در جمعیت

منابع

1. Ford, H. B., & Schust, D. J. (2009). Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol*, 2(2), 76.
2. Bulletti, C., Flamigni, C., & Giacomucci, E. (1996). Reproductive failure due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update*, 2(2), 118-136.

3. Hyde, K. J., & Schust, D. J. (2015). Genetic considerations in recurrent pregnancy loss. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 5(3), a023119.
4. Adelman, D. M., Gertsenstein, M., Nagy, A., Simon, M. C., & Maltepe, E. (2000). Placental cell fates are regulated in vivo by HIF-mediated hypoxia responses. *Genes dev*, 14(24), 3191-3203.
5. Li, T. C., Makris, M., Tomsu, M., Tuckerman, E., & Laird, S. (2002). Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. *Hum Reprod Update*, 8(5), 463-481.
6. Laird, S. M., Tuckerman, E. M., Cork, B. A., Linjawi, S., Blakemore, A. I. F., & Li, T. C. (2003). A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update*, 9(2), 163-174.
7. Apps, R., Gardner, L., & Moffett, A. (2008). A critical look at HLA-G. *Trends Immunol*, 29(7), 313-321.
8. Donadi, E. A., Castelli, E. C., Arnaiz-Villena, A., Roger, M., Rey, D., & Moreau, P. (2011). Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell Mol Life Sci*, 68(3), 369-395.
9. Geraghty, D. E., Koller, B. H., & Orr, H. T. (1987). A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci*, 84(24), 9145-9149.
10. Carosella, E. D., Moreau, P., Le Maoult, J., Le Discorde, M., Dausset, J., & Rouas-Freiss, N. (2003). HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv Immunol*, 81, 199-252.
11. Apps, R., Gardner, L., Sharkey, A. M., Holmes, N., & Moffett, A. (2007). A homodimeric complex of HLA-G on normal trophoblast cells modulates antigen-presenting cells via LILRB1. *Eur J Immunol*, 37(7), 1924-1937.
12. LeMaoult, J., Zafaranloo, K., Le Danff, C., & Carosella, E. D. (2005). HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. *The FASEB J*, 19(6), 662-664.
13. Fons, P., Chabot, S., Cartwright, J. E., Lenfant, F., L'Faqihi, F., Giustiniani, J., ... & Aguerre-Girr, M. (2006). Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood*, 108(8), 2608-2615.
14. LeMaoult, J., Krawice-Radanne, I., Dausset, J., & Carosella, E. D. (2004). HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci*, 101(18), 7064-7069.
15. Fournel, S., Aguerre-Girr, M., Huc, X., Lenfant, F., Alam, A., Toubert, A., ... & Le Bouteiller, P. (2000). Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8. *J Immunol*, 164(12), 6100-6104.
16. Contini, P., Ghio, M., Poggi, A., Filaci, G., Indiveri, F., Ferrone, S., & Puppo, F. (2003). Soluble HLA-A,-B,-C and-G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur J Immunol*, 33(1), 125-134.
17. Le Bouteiller, P., & Solier, C. (2001). Is antigen presentation the primary function of HLA-G?. *Microbes Infect*, 3(4), 323-332.

- 18.Hviid, T. V. F., Hylenius, S., Rørbye, C., & Nielsen, L. G. (2003). HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics*, 55(2), 63-79.
- 19.Persson, G., Melsted, W. N., Nilsson, L. L., & Hviid, T. V. F. (2017). HLA class Ib in pregnancy and pregnancy-related disorders. *Immunogenetics*, 69(8-9), 581-595.
- 20.Castelli, E. C., Ramalho, J., Porto, I. O., Lima, T. H., Felício, L. P., Sabbagh, A., ... & Mendes-Junior, C. T. (2014). Insights into HLA-G genetics provided by worldwide haplotype diversity. *Front Immunol*, 5, 476.
- 21.Hviid, T. V. F., Rizzo, R., Melchiorri, L., Stignani, M., & Baricordi, O. R. (2006). Polymorphism in the 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions of the HLA-G gene in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression. *Hum immunol*, 67(1-2), 53-62.
- 22.Ober, C., Aldrich, C. L., Chervoneva, I., Billstrand, C., Rahimov, F., Gray, H. L., & Hyslop, T. (2003). Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. *Am J Hum Genet*, 72(6), 1425-1435.
- 23.Durmanova, V., Homolova, M., Drobny, J., Shawkatova, I., & Buc, M. (2013). Role of HLA-G and other immune mechanisms in pregnancy. *Cent. Eur. J. Biol*, 8(3), 226-239.
- 24.Wang, Q., Zhuang, G. L., Zhou, C. Q., Li, J., Zhong, Y. P., Xu, Y. W., ... & Deng, M. F. (2005). Expression of soluble human leukocyte antigen G and its relationship to embryo development. *Zhonghua fu chan ke za zhi*, 40(2), 112-115.
- 25.Duan BF, Li zp. HLA-G and tumor. *West chin Med j (Chin)* 2006, 21: 200-201.
- 26.Hviid, T. V. F., Hylenius, S., Lindhard, A., & Christiansen, O. B. (2004). Association between human leukocyte antigen-G genotype and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome. *Tissue antigens*, 64(1), 66-69.
- 27.Carreiras, M., Montagnani, S., & Layrisse, Z. (2002). Preeclampsia: a multifactorial disease resulting from the interaction of the feto-maternal HLA genotype and HCMV infection. *Am J Reprod Immunol*, 48(3), 176-183.
- 28.Aldrich, C., Verp, M. S., Walker, M. A., & Ober, C. (2000). A null mutation in HLA-G is not associated with preeclampsia or intrauterine growth retardation. *J Reprod Immunol*, 47(1), 41-48.
- 29.Hviid, T. V., Sørensen, S., & Morling, N. (1999). Polymorphism in the regulatory region located more than 1.1 kilobases 5' to the start site of transcription, the promoter region, and exon 1 of the HLA-G gene. *Hum immunol*, 60(12), 1237-1244.
- 30.Hviid, T. V., Hylenius, S., Hoegh, A. M., Kruse, C., & Christiansen, O. B. (2002). HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. *Tissue antigens*, 60(2), 122-132.
- 31.Hviid, T. V. F., Rizzo, R., Christiansen, O. B., Melchiorri, L., Lindhard, A., & Baricordi, O. R. (2004). HLA-G and IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. *Immunogenetics*, 56(3), 135-141.
- 32.Hviid, T. V. F., Rizzo, R., Melchiorri, L., Stignani, M., & Baricordi, O. R. (2006). Polymorphism in the 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions of the HLA-G gene in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression. *Hum Immunol*, 67(1-2), 53-62.
- 33.Berger, D. S., Hogge, W. A., Barmada, M. M., & Ferrell, R. E. (2010). Comprehensive analysis of HLA-G: implications for recurrent spontaneous abortion. *Reprod Sci*, 17(4), 331-338.

- 34.Monti, M., Lupoli, R., Fernandez, L. M. S., Cirillo, F., & Di Minno, M. N. D. (2019). Association of human leukocyte antigen-G 14 bp polymorphism with recurrent pregnancy loss in European countries: a meta-analysis of literature studies. *Fertil Steril*, 112(3), 577-585.
- 35.Mosaferi, E., Gharamaleki, N. A., Farzadi, L., Majidi, J., & Babaloo, Z. (2019). The Study of HLA-G Gene and Protein Expression in Patients with Recurrent Miscarriage. *Adv Pharm Bull*, 9(1), 70.
- 36.Craenmehr, M. H., Nederlof, I., Cao, M., Drabbels, J. J., Spruyt-Gerritse, M. J., Anholts, J. D., ... & Haasnoot, G. W. (2019). 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*, 20(3), 625.
- 37.Koc, A., Kirbiyik, O., Kutbay, Y. B., Ozyilmaz, B., Ozdemir, T. R., Kaya, O. O., ... & Koc, Z. P. (2018). Fetal HLA-G alleles and their effect on miscarriage. *Adv Clin Exp Med*, 27(9), 1233-1237.
- 38.Shi, X., Xie, X., Jia, Y., & Li, S. (2017). Maternal genetic polymorphisms and unexplained recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Clin Genet*, 91(2), 265-284.
- 39.Yazdani, N., Shekari Khaniani, M., Bastami, M., Ghasemnejad, T., Afkhami, F., & Mansoori Derakhshan, S. (2018). HLA-G regulatory variants and haplotypes with susceptibility to recurrent pregnancy loss. *Int J Immunogenet*, 45(4), 181-189.