

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

Baharak Ebrahimi Behnam ¹, Mohammad Khalaj-Kondori ², Mohammad Ali Hosseinpour Feizi ³

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.

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 حسینیور 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: ۳۳۳۹۲۶۷۴-۰۴۱، 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 آن ها استخراج و ژنوتیپ های آن ها 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 CC، CA و AA در گروه بیمار به ترتیب ۸٪، ۳۳٪ و ۵۹٪ و 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=0.005). همچنین بررسی هاپلوتایپی نشان داد که هاپلوتایپ H1 (GA) 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 ماهه اول بارداری و یا قبل از رسیدن وزن جنین به ۵۰۰ گرم تعریف می شود (۱). سقط های مکرر به دو دسته اولیه و ثانویه تقسیم می شوند. سقط مکرر اولیه که به دو سقط پشت سر هم بدون هیچ تولد زنده اطلاق می گردد و سقط های مکرر ثانویه به سقط هایی که بعد از یک بارداری موفق و تولد زنده صورت می گیرد، گفته می شود (۲). سقط مکرر در یک الی دو درصد خانم هایی که قصد دارند صاحب فرزند شوند رخ می دهد (۳). علل سقط مکرر مالتی فاکتوریال است، ولی می توان دلایل آن را به دو دسته عمده جنینی و مادری تقسیم کرد. در مورد علل مادری می توان 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 ایمونوتولرانس Human leukocyte antigen-G (HLA-G) است که نقش مهمی در حفاظت از جنین در قبال سیستم ایمنی مادر دارد. HLA-G یکی از مولکول های غیر کلاسیک از آنتی ژن های سازگاری نسجی کلاس یک انسان است که حدود بیست سال پیش بروز آن توسط سلول های تروفوبلاست جفتی مشخص شد. از آن جایی که سلول های تروفوبلاست مرز بین مادر و جنین را تشکیل می دهند؛ لذا تصور می شود 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

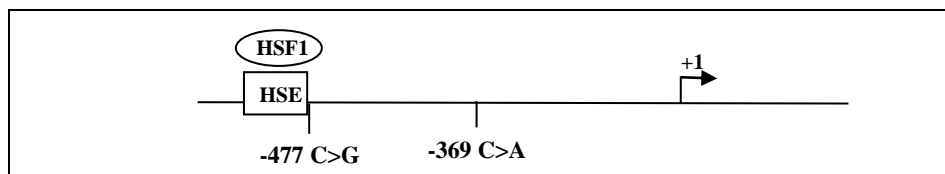
مولکول HLA کلاسیک، مولکول HLA-G نیز دارای دو زنجیره سبک و سنگین است که زنجیره سنگین به صورت غیر کووالان به زنجیره سبک متصل می باشد. زنجیره سنگین توسط ژن HLA-G کد شده و زنجیره سبک (بتا دو میکروگلوبولین) از طریق ژنی در کروموزوم ۱۵ کد می شود. اگزون های یک، دو، سه، چهار، پنج و شش به ترتیب پپتید رهبر، دومین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

ژن HLA-G با پردازش متناوب mRNA هفت پروتئین مختلف ایجاد می کند که از این پروتئین ها 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-G_۱ می گردد. 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 پایه ای در بیشتر سلول ها و بافت ها رونویسی می شود؛ اما بیان آن محدود به بافت هایی نظیر تروفوبلاست، تیموس، ماتریکس ناخن، پانکراس و پیش سازهای اریتروئید و اندوتلیال می باشد (۱۰). مطالعات نشان می دهند فرم همودایمر متصل به بتا دو میکروگلوبولین HLA-G، فرم اصلی HLA-G است که توسط سلول های تروفوبلاست بیان می شود (۱۱). HLA-G اعمال مهاری خود را علیه سلول های کشنده طبیعی (NK Cell)، لنفوسیت های T (T cell) و سلول های عرضه کننده آنتی ژن با اتصال به رسپتورهای مهاری Immunoglobulin-like

| | |
|---|------|
| (LILRB _۱ /CD8۵j)/(ILT _۲)transcript | 2 |
| Immunoglobulin-like transcript | 4 |
| Killer-cell و (LILRB _۲ /CD8۵d)/(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، 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). موجود در سطح سلول‌های تروفوبلاست با رستپورهای مهای سلول‌های NK رومی واکنش نشان می‌دهد. این واکنش باعث می‌شود سیستم ایمنی مادر به جنین حمله نکند. اتصال HLA-G به رستپور KIR2DL4 در سطح NK رومی منجر به افزایش سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رگ زایی می‌شوند که این کار به جایگزینی جنین در رحم و توسعه و رگ زایی 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 مهار 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 گرمایی 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

می‌دهد و منجر به تفاوت های اولیه در بیان ژن HLA-G می‌شود که بیان سایتوکاین هایی نظیر اینترلوکین ۱۰ را تحت تأثیر قرار می‌دهد. با این حال برای توضیحات بیشتر به آزمایش‌های 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 می‌شود (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 روش‌ها

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 (عفونت‌ها، مشکلات کروموزومی، اختلالات هورمونی و آناتومیکی رحمی) هستند، نمونه‌گیری انجام شد. همه بیماران دارای حداقل دو سابقه سقط بودند. افراد

گروه کنترل نیز حداقل دارای دو تولد زنده و فاقد سابقه سقط مکرر بودند. بعد از اخذ رضایت‌نامه از افراد، نمونه‌گیری از خون وریدی انجام گردید. از هر فرد به مقدار ۴ سی‌سی خون گرفته شد. تمامی نمونه‌ها 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. نمونه‌های 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 زنجیره‌ای پلیمرز توسط یک جفت پرایمر اختصاصی انجام گرفت. طراحی پرایمرها با استفاده از نرم افزار OLIGO7 صورت گرفت و اختصاصات آن‌ها توسط Primer-BLAST بررسی شد. پرایمرها توسط شرکت Metabion آلمان ساخته شدند. توالی پرایمرها در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده

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

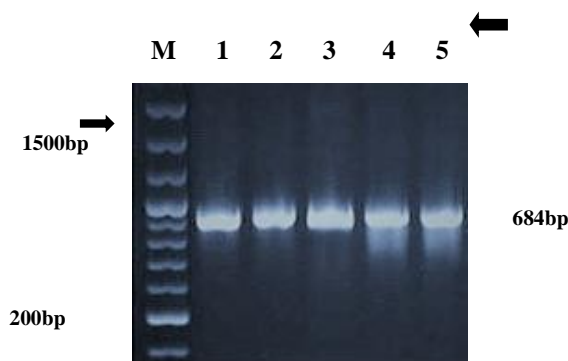
فراواني در دو گروه بيمار و كنترل توسط آزمون مربع كاي مقايسه گرديد. سطح معني داري $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

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 ($p=0.171$, $95\% CI: 0.396-1.363$, $OR=0.735$).

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.

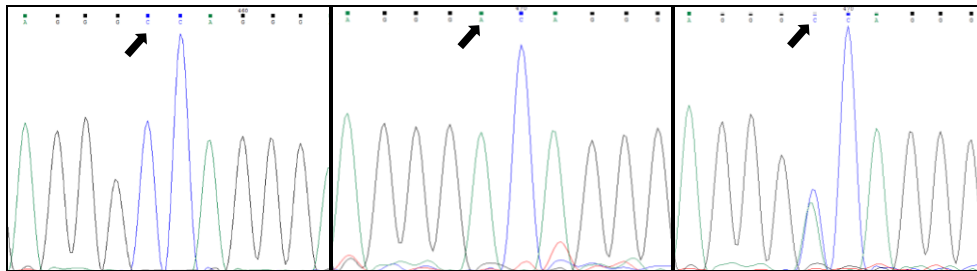
ژنوتپ هاي مختلف پلي مورفيسم rs1632943 را نشان مي دهد.

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 ژنوتپ:

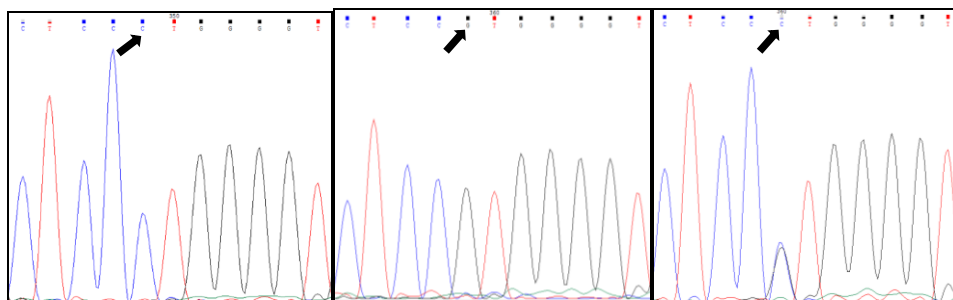
در اين تحقيق از روش توالي يابي براي تعيين ژنوتپ افراد استفاده گرديد. براي اين منظور محصولات PCR نمونه ها جهت تعيين توالي به شركت ميكروسينس سويس ارسال شدند. نتايج توالي يابي توسط نرم افزار Chromas تجزيه و تحليل گرديد. فراواني هاي آللي و ژنوتپي تمام افراد از روي نتايج تعيين توالي مشخص و محاسبه شده، سپس

فراواني ژنوتپي و آللي پلي مورفيسم هاي rs1632943 و rs1736932 براي مشخص كردن ژنوتپ 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 آلل های 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 (CC) و (AA) بین دو گروه وجود داشت ($P<0.05$).

كه بيانگر آن است كه اين ژنوتپ مى تواند احتمال ابتلا به سقط مكرر را در اين جمعيت افزايش دهد. همچنين مقايسه فراوانى هاى آللى آلل هاى C و G حاكى از اختلاف معنادار آمارى در بين گروه بيمار و كنترل بود و براى آلل G مقدار بزرگتر از يك به دست آمد (CI: ۱/۹۵۱ , OR=۳/۷۶۷-۱/۰۱۴) كه بيانگر اين است كه اين آلل مى تواند باعث افزايش احتمال ابتلا به سقط مكرر در اين جمعيت شود. فراوانى ژنوتپى و فراوانى آللى پلى مورفيسم هاى rs1736932 و rs1632943 در گروه بيمار و كنترل در جدول ۲ ذكر گرديده است.

فراوانى پلى مورفيسم rs1736932 در بين افراد مبتلا، ۸ بيمار هموزيگوت (CC)، ۳۲ بيمار هتروزيگوت (CG) و ۶۰ بيمار هموزيگوت (GG) تشخيص داده شدند. از بين افراد گروه كنترل، ۱۴ فرد هموزيگوت (CC)، ۳۳ فرد هتروزيگوت (CG) و ۳۳ فرد هموزيگوت (GG) يافت شدند. در پلى مورفيسم rs1736932 همان طور كه جدول ۲ نشان مى دهد اختلاف معنادارى بين فراوانى هاى ژنوتپ هاى (CC) و (GG) بين دو گروه وجود داشت ($P<0.05$) مقدار odd's ratio به دست آمده براى ژنوتپ (GG) بزرگتر از يك مى باشد (CI: ۱/۱۶۹-۳/۹۱۳ , OR=۲/۱۳۶)

جدول ۲. فراوانى ژنوتپى و آللى پلى مورفيسم هاى rs1736932 و rs1632943 در گروه بيمار و كنترل

| متغير | بیماران (درصد) | کنترل (درصد) | OR (CI95%) | سطح معنی داری |
|------------------|-------------------|-----------------|--------------------|---------------|
| rs1632943 | | | | |
| ژنوتپ | | | | |
| 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 | | | | |
| ژنوتپ | | | | |
| 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 $P<0.05$

كه فراوانى هاپلوتاىپ ها در افراد بيمار و كنترل در جدول شماره ۳ درج شده اند.

آناليز هاپلوتاىپ ها: بعد از دادن ژنوتپ افراد كنترل و بيمار به نرم افزار SNP Analyzer چهار هاپلوتاىپ به عنوان نتايج نمايان گرديد

جدول ۳. فراوانى هاپلوتاىپ ها در افراد بيمار و كنترل

| هاپلوتاىپ | توالى | فراوانى در افراد كنترل | فراوانى در افراد بيمار | فراوانى در كل | 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 $C > G, A$ و ۴۷۷- نیز شناخته می شوند، بازدهی 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 ($OR = ۱/۱۶۹-۳/۳۱۹$, $CI = ۲/۱۳۶$) 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 ۳/۷۶۷- ($OR = ۱/۹۵۱$, $CI = ۱/۰۱۴$) 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 $C > A$

مختلف انجام گرفته است. ويد و همكارانش در سال ١٩٩٩ اولين تحقيق خود را بر روي پروموتور ژن HLA-G انجام دادند. هدف آن ها بررسي تأثير هر گونه تغيير توالي ممكن بر روي اتصال فاكور هاي رونويسي بود كه اين تغييرات بر روي سطح بيان ژن HLA-G تأثير مي گذاشت. آن ها در اين تحقيق ٧ پلي مورفيسم و يك ناحيه حذف را در پروموتور ژن HLA-G گزارش كردند (٢٩). ويد و همكارانش در سال ٢٠٠٢ بيان كردند كه غلظت پايين ايزوفرم هاي محلول موجب نتايج منفي در IVF مي شود و نتيجه گرفتند كه پلي مورفيسم هاي HLA-G با بارداري پاتولوژيك ارتباط دارد. با اين وجود، اين موضوع هنوز بحث برانگيز باقي مانده است (٣٠). ابر و همكارانش در سال ٢٠٠٣ در آمريكاي شمالي گروه ي ٨٤ نفر متشكل از ٤٢ زن با سابقه سقط مكرر و ٤٢ زن به عنوان كنترل بدون داشتن سابقه مكرر را مورد بررسي قرار دادند. در اين مطالعه ١٨ پلي مورفيسم از جمله پلي مورفيسم هاي ٣٦٩ - و ٤٧٧ - در ناحيه پروموتور ژن HLA-G گزارش گرديد. تنها پلي مورفيسم ٧٢٥ - در ناحيه پروموتور ژن HLA-G همراهي معني داري را با سقط مكرر نشان داد. در اين مطالعه نشان دادند كاهش سطح HLA-G1 مي تواند با سقط مكرر ارتباط داشته باشد (٢٢). ويد و همكارانش در سال ٢٠٠٤ مطالعه خود را روي ٨٥ زوج دانماركي كه براي IVF مراجعه كرده بودند انجام دادند. در اين مطالعه ١٢ پلي مورفيسم از جمله پلي مورفيسم هاي ٣٦٩ - و ٤٧٧ - گزارش گرديد. همچنين در اين مطالعه سطح HLA-G5\ sHLA و غلظت اينترلوكين ١٠ در سرم نمونه ها مورد بررسي قرار گرفت. در ٢١٪ نمونه ها sHLA1/HLA-G5 شناسايي شد؛ ولي هيچ ارتباطي بين sHLA1/HLA-G5 و غلظت اينترلوكين ١٠ در سرم اين افراد يافت نشد. ويد و همكارانش نتيجه گرفتند كه هر گونه تغيير در ناحيه پروموتور ژن HLA-G منجر به كاهش سطح sHLA-G گرديده و اين باعث سقط مكرر مي شود (٣١). ويد و همكارانش در سال ٢٠٠٦ مطالعه خود را روي ٦١

زوج قفقازي انجام دادند و ١١ پلي مورفيسم از جمله پلي مورفيسم هاي ٣٦٩ - و ٤٧٧ - را شناسايي كردند. آن ها نشان دادند پلي مورفيسم موجود در ناحيه ٥' URR ژن HLA-G مي تواند ترشح اينترلوكين ١٠ را تحت تأثير قرار دهد. پلي مورفيسم ٤٧٧ - كه در پروموتور ژن HLA-G قرار دارد ارتباط معني داري با غلظت اينترلوكين ١٠ را نشان داد (٣٢). دارا سوزان برگر و همكارانش در سال ٢٠١٠ يك گروه ٢٣٨ نفر ي از زنان قفقازي كه سابقه حداقل دو سقط جنين را داشتند و ٢٣٨ نفر گروه كنترل بدون داشتن سابقه سقط را از نظر وجود پلي مورفيسم هاي ٣٦٩ - و ٤٧٧ - مورد بررسي قرار دادند و با توجه به P-value به دست آمده ($P < 0.05$) براي هر دو پلي مورفيسم مذكور، دارا سوزان برگر و همكارانش به اين نتيجه رسيدند كه ارتباط معني داري بين اين پلي مورفيسم ها و سقط مكرر وجود دارد. نتايج حاصل از مطالعه ما با نتايج حاصل از مطالعه برگر و همكارانش بر روي جمعيت زنان قفقازي سازگار است و آن ها هم در مطالعه خود بين پلي مورفيسم هاي rs1632943 و rs1736932 و سقط مكرر همراهي معناداري مشاهده كردند (٣٣). مونت ي و همكارانش در سال ٢٠١٩ با بررسي ارتباط بين پلي مورفيسم ١٤bp در منطقه ٣' UTR ژن HLA-G در حالت هاي ١٤bp/+١٤bp و -١٤bp/+١٤bp (١٤bp) بروي زنان داراي سقط مكرر به اين نتيجه رسيدند كه ارتباط معناداري بين ژنوتپ ١٤bp/+١٤bp و سقط مكرر وجود دارد. همچنين نشان دادند فراواني ژنوتپ ١٤bp/+١٤bp در زنان داراي سقط مكرر نسبت به زنان بدون سابقه سقط بيشتر است (95% ; $odds\ ratio = 1/562$; $CI = 1/203 - 2/027$) (٣٤). مظفري و همكارانش در سال ٢٠١٩ با استفاده از تكنيك real-time pcr با بررسي ارتباط بين بيان ژن HLA-G و سقط مكرر بر روي نمونه هاي بافتي (جفت) زنان به اين نتيجه رسيدند كه در زنان داراي سقط مكرر بيان ژن HLA-G كاهش مي يابد (٣٥). كرينمهر و همكاران در سال ٢٠١٩ با مطالعه روي پلي مورفيسم ١٤bp

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

درکل 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.