ORIGINAL ARTICLE

The Role of HLA-G4 and G5 in Threatened-Abortion Women

Faramarz Farzad[1],
Saeid Abediankenari[2],
Zahra Rahmani[3],
Mohammad-Bagher Hashemi-Soteh[4],
Zahra Hosseinikhah[5],
Ebrahim Naghavian[1]

[1] MSc Student, Department of Immunology, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] PhD, Department of Immunology, Immunogenetic Research Center, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] MD, Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] PhD, Department of Biochemistry, Immunogenetic Research Center, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] Cellular and Molecular Biology Research Center, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received July 19, 2013; Accepted September 21, 2013)

Abstract

Background and purpose: Major pathologic cause of abortions is unknown. HLA-G4 and HLA-G5 are two isoforms, membrane (G4) and soluble (G5) of nonclassical molecules of HLA-1b that can induce tolerance between mother and fetus. In this study, expression of two HLA-G isoforms and their effect were evaluated in threatened-abortion women in comparison with controls.

Materials and methods: In a case-control study, 101 threatened-abortion women and 101 health pregnant women in the age range of 20-32 years were studied for expression level of two HLA-G4 and HLA-G5 isoforms after RNA extraction and cDNA synthesize with use of real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) procedure.

Results: The expression of HLA-G4 and G5 were significantly decreased in threatened–abortion women in comparison with controls ($P < 0.0001$). In addition, HLA-G5 higher than HLA-G4 decreased in threatened- abortion women ($P = 0.0001$). Furthermore, senile had direct effect in high abortion risk and low expression level of HLA-G4.

Conclusion: According to our findings, HLA-G5 is affecting molecule in fetus maintenance in comparison with HLA-G4 during pregnancy. Thus, it is proposed to evaluate this molecule before twenty weeks in pregnancy as a prognosis factor for prevention of fetus loss.

Keywords: Human leukocyte antigen, abortion, pregnancy

J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(106): 2-10 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم شماره ۱۰۶ آبان سال ۱۳۹۲ (۱۰-۲)

بررسی بیان آنتی‌ژن‌های HLA-G4 و HLA-G5 در خانم‌های تهدید به سقط

فرامرز فرزاد[۱]
سعید عابدیان کناری[۲]
زهرا رحمانی[۳]
محمد باقرهاشمی- سوته[۴]
زهرا حسینی‌خواه[۵]
ابراهیم نقویان[۱]

چکیده

سابقه و هدف: علت اصلی پاتولوژیک بسیاری از بارداری‌های منجر به سقط همچنان ناشناخته مانده است. HLA-G4 (Human leukocyte antigen) و HLA-G5 دو ایزوفرم غشایی (G4) و محلول (G5) از مولکول‌های غیر کلاسیک کلاس Ib می‌باشند که در ایجاد تحمل بین مادر و جنین نقش دارند. در این مطالعه بیان این دو ایزوفرم و نیز بررسی تفاوت میزان تأثیر بیان هر آنتی‌ژن در زنان باردار تهدید به سقط در مقایسه با گروه شاهد ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه مورد- شاهدی، ۱۰۱ خانم باردار تهدید به سقط و ۱۰۱ فرد باردار سالم (شاهد) در محدوده سنی ۳۲-۲۰ سال برای میزان بیان دو ایزوفرم HLA-G4 و G5 پس از استخراج RNA و سنتز cDNA با استفاده از روش Real-time PCR (Real-time Polymerase chain reaction) مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: بیان HLA-G4 و G5 در افراد تهدید به سقط نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۰۱$). به علاوه کاهش G5 نسبت به G4 در افراد گروه مورد بیشتر است ($P < ۰/۰۰۱$). به علاوه افزایش سن، تأثیر مستقیمی در افزایش خطر سقط و نیز کاهش میزان بیان ایزوفرم HLA-G4 داشت.

استنتاج: نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که HLA-G5 در مقایسه با HLA-G4 مولکول مؤثرتری در حفظ جنین در دوران حاملگی می‌باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود این مولکول قبل از هفته بیستم حاملگی به عنوان یک شاخص پیش‌آگهی به منظور احتمال جلوگیری از سقط مورد ارزیابی قرار گیرد.

واژه های کلیدی: آنتی‌ژن لکوسیتی انسان، سقط، حاملگی

مقدمه

حاملگی، حالتی هموستاتیک است که به موجب آن سیستم ایمنی مادر در تماس نزدیک با بافت های نیمه آلوژن جنین قرار می‌گیرد و جنین در طول بارداری به واسطه مکانیسم‌های ایمونولوژیک مادر دفع نمی‌گردد (۱). بنابراین به نظر می‌آید حاملگی یک تناقض ایمنولوژیکی است (۲). مکانیسم‌های احتمالی در تقویت چنین فرآیندی به طور خلاصه شامل وجود سد ایمونولوژیک است که در مکان رویارویی مادر و جنین،

مقاله حاضر برگرفته از طرح تحقیقاتی به شماره ۶۱-۹۱ مصوب دانشگاه علوم پزشکی مازندران می‌باشد

مولف مسئول: سعید عابدیان کناری –ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک. E-mail: abedianlab@yahoo.co.uk
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دکترای ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. متخصص زنان و زایمان، گروه زنان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. دکترای ژنتیک، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۴/۲۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۲/۶/۱۳ تاریخ تصویب : ۱۳۹۲/۶/۳۰

جایگزین هرگونه عرضه پاتولوژیک آنتی‌ژن‌های اصلی سیستم سازگاری نسجی می‌گردد و یا با پوشاندن آلوآنتی‌ژن‌های پدری، تا حد توان موجب مهار واکنش‌های کلاسیک رد پیوند می‌گردد. همچنین مهار آلورآکتیویتی مادری که می‌توان آن را به عوامل دسیدوآل تحت کنترل هورمون‌های تولید مثل نسبت داد، به همراه آلوآنتی‌بادی‌ها و دیگر عوامل با منشأ جنینی یا مادری، آغازگر و مسؤول مکانیسم‌های مهاری می‌باشند. پدیده سقط تکراری خود به خودی (RSA یا Recurrent spontaneous abortion) شایع‌ترین مشکل در حاملگی است که معضلی دشوار و تنش‌زا را برای پزشک و هم برای زوجین درگیر ایجاد می‌کند. از نظر آماری شانس سقط در اولین بارداری ۱۳-۱۱ درصد و احتمال وقوع مجدد آن پس از یک بار سقط ۲۱-۱۴ درصد، پس از دو بار ۲۹-۲۴ درصد و بعد از سه بار ۳۳-۳۱ درصد می‌باشد. کمابیش از هر چهار زن، یک زن یک بار یا بیشتر سقط را تجربه می‌کند که همین مسأله سقط را به شایع‌ترین مشکل حاملگی و مسأله مهم در بهداشت عمومی تبدیل کرده است (۲).

علل اتیولوژیک ۵۰-۳۰ درصد سقط های خود به خودی و مکرر، ناشناخته باقی مانده است (۱). ممکن است شایع‌ترین علت آن دلیل ایمنولوژیک باشد (۱). تاکنون سیستم‌های آنتی‌ژنیک بسیاری مد نظر قرار گرفته‌اند که قابل توجه‌ترین آن‌ها آنتی‌ژن‌های غیر کلاسیک HLA (Human leukocyte antigen) است. بارزترین این آنتی‌ژن‌ها، HLA-G و ایزوفرم‌های متعدد آن است که مهم‌ترین عامل مورد شناسایی توسط سلول‌های سرکوبگر می‌باشد. مولکول HLA-G غیر کلاسیک عضوی از خانواده HLA کلاس I دارای پلی‌مورفیسم کم و بیان محدود به بافت های جنینی است که اولین بار در ارتباط مادر با جنین در سطح سلول‌های سیتوتروفوبلاست‌های مهاجم یافت شد (۳). این مولکول بر روی سلول‌های T و سلول‌های دندریتیک نیز دیده شد و نقش آن علاوه بر حاملگی در سرطان، پیوند اعضا و بیماری‌های خودایمنی مانند دیابت و به ویژه در القای تحمل ایمنی مشخص شده است (۵، ۴).

HLA-G از آنتی‌ژن‌های HLA کلاس Ib است که از نظر ساختار، مرتبط با محصولات ژن کلاس Ia، یعنی HLA-A، HLA-B و HLA-C می‌باشند (۶) و اغلب بر روی سلول‌های پلاسنتای جنینی بیان می‌گردد (۷). mRNA این مولکول در اثر پیرایش متناوب، هفت پروتئین غشایی و محلول متفاوت را با تغییرپذیری محدود کد می‌کند. این مولکول دارای ساختار مولکولی منحصر به فرد و واجد دم سیتوپلاسمی کوتاه، بروز محدود بافتی و خاصیت مهم تعدیل پاسخ های ایمنی (۶-۴، ۱)، متفاوت با سایر مولکول‌های HLA کلاس I کلاسیک (A-B-C) است. چهار عدد از این هفت ایزوفرم (HLA-G1، G2، G3 و G4) متصل به غشا و سه تای دیگر (HLA-G5، G6 و G7) به صورت محلول هستند (۸). شواهد بسیاری دال بر نقش HLA-G به عنوان مولکول تحمل‌زا و سرکوبگر پاسخ‌های ایمنی گزارش شده است (۹) که اثر مهاری خود را با اتصال به گیرنده مهاری KIR2DL4، به عنوان گیرنده اختصاصی HLA-G بر سطح سلول‌های NK (Natural killer) و ماکروفاژها و نیز از طریق ILT2 و ILT4 که گیرنده سایر مولکول‌های HLA کلاس یک می‌باشد، اعمال می کند. (۱۰).این مولکول در جریان لانه گزینی جنین، تکامل تروفوبلاست‌ها و اتصال بلاستوسیت‌ها به آندومتریوم رحم، تمایز و تهاجم آن‌ها به سلول‌های اپیتلیالی شریانی مادر و شرکت در تشکیل عروق خونی برای تأمین خون کافی برای اکسیژن‌رسانی به جنین نقش دارد (۱۱). همچنین توسط هر دو منبع مادری و جنینی تولید می‌شود و به طور عمده در سطح سیتوتروفوبلاست‌های جنینی دارای تماس مستقیم با مادر یافت می‌شود. به همین دلیل به نظر می‌رسد این مولکول یکی از عوامل ایجاد تحمل در مادر باشند (۳). ملکول HLA-G ممکن است از طریق مهار سلول‌های NK یکی از عوامل مهم عدم دفع جنین باشد (۱۳، ۱۲) که عملکرد مهاری خود را بر پاسخ آلوپرولیفراتیو و سیتوتوکسیسیتی سلولی از طریق ارتباط متقابل با حداقل سه گیرنده مهاری بر سطح سلول‌های NK، T و عرضه کننده آنتی‌ژن (Antigen-presenting cells یا APC) اعمال می کند (۱).

با اثبات نقش تعدیل کنندگی HLA-G در واکنش‌های ایمنی و تأثیر آن در حفظ تحمل به جنین نیمه آلوژن و نیز اثبات ارتباط نقش و میزان بیان HLA-G با تنوع آللی، پلی‌مورفیسم و تنظیم بروز آن پس از نسخه‌برداری به طور مستحکمی این ایده به وجود آمده است که مطالعات وسیع‌تر و دقیق‌تر در ابعاد مختلف ژنی و مولکولی جهت درک علل ناشناخته سقط‌های مکرر خود به خودی لازم است. بنابراین در این مطالعه نقش دو ایزوفرم HLA-G4 و HLA-G5 برای اولین بار در زنان تهدید به سقط در مقایسه با زنان سالم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

انتخاب بیماران

در یک مطالعه مورد- شاهدی (Case-Control) ارتباط بیان ایزوفرم‌های HLA-G4 و G5 با سقط مکرر با علت نامشخص در زنان باردار تهدید به سقط در مقایسه با گروه شاهد مراجعه کننده به متخصص زنان کلینیک تخصصی طوبی ساری در سال ۱۳۹۱-۱۳۹۰ مورد بررسی قرار گرفت.

افراد مورد مطالعه در سنین بین ۲۰ تا ۳۲ سال بودند. ازتمامی افراد فرم رضایتنامه آگاهانه جهت شرکت در مطالعه گرفته شد. گروه مورد، ۱۰۱ بیمار مبتلا به سقط مکرر یا تهدید به سقط، زنان بارداری بودند که با لکه‌بینی وخونریزی قبل از هفته بیستم بارداری به متخصص زنان مراجعه می‌کردند و با توجه به سوابق کلینیکی و پاراکلینیکی توسط متخصص زنان، تشخیص تهدید به سقط با علت نامشخص در آن‌ها تأیید می گردید. افراد شاهد نیز ۱۰۱ خانم باردار قبل از هفته بیستم بارداری و هم سن گروه مورد بودند که دارای بارداری طبیعی و نیز بدون سابقه سقط با علل پاتولوژیک بودند. معیار ورود به مطالعه داشتن سابقه تهدید به سقط و یا سقط بدون علت بود. معیارهای خروج نیز داشتن بارداری کامل طبیعی قبلی و نیز هر گونه سقط با علت پاتولوژیک مشخص مانند تروما، علل نوروآندوکرینولوژیک، دیابت، سقط های ناشی از علل عفونی و ویروسی، مشکلات کاریوتایپی و ژنتیکی، آنومالی‌های وضعیت آناتومیکی رحمی و یا هر علت ایمنولوژیکی یا اتوایمیونیتی مشخص مانند داشتن آنتی بادی ضد فسفولیپید یا کاردیولیپین ویا آنتی کواگولانت ها و نیز لوپوس و نیز مصرف داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی بود. این موارد بر اساس سابقه بارداری بیماران، آزمایشات و معاینات دوره‌ای ذکر شده و یا توسط پرسشنامه و یا متخصص زنان تأیید گردید.

استخراج RNA

میزان ۲ سی‌سی خون از هر یک از داوطلبین جمع‌آوری شد و بلافاصله داخل کرایوتیوب‌های حاوی EDTA جهت جداسازی RNA ریخته شد. استخراج RNA با استفاده از کیت حاوی محلول تریزول (شرکت Bioneer، کره جنوبی) انجام شد. ابتدا ۷۰۰ میکرولیتر خون با ۳۰۰ میکرولیتر محلول Bioneer و ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم در میکروتیوپ استریل مخلوط شد وادامه مراحل استخراج RNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. در انتها RNA در ۵۰ میکرولیتر آب DEPC حل شد و سپس با استفاده از دستگاه پیکودراپ (انگلستان) و گرفتن جذب نوری در ۲۶۰ نانومتر، غلظت RNA محاسبه شد.

ساخت cDNA

با کیت RevertAid first strand cdna synthesis شرکت Thermo scientific (فرمنتاز، ایتالیا) (کاتالوگ K۱۶۲۲) و lot 00110470 طبق دستورالعمل کیت، ۲ میکرولیتر از Total RNA استخراج‌شده برداشت شد و با استفاده از پرایمرهای راندوم هگزامر و انزیم ترانسکریپتاز معکوس cDNA تولید شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction یا PCR)

پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام Real time PCR ایزوفرم‌های G4 و G5 و HGPRT به عنوان ژن مرجع، طراحی شدند. در جدول شماره ۱ خلاصه مراحل Real-time PCR نوشته شده است.

PCR کمی با استفاده از کیت شرکت Thermo scientific (فرمنتاز) با شماره کاتالوگ K0242 و Lot 00115027 حاوی ویال‌های Master mix و nuclease-free و آب طبق پروتکل کیت انجام شد. برنامه دمایی Real time PCR، جهت ایزوفرم G4 شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه جهت واسرشت اولیه، ۴۰ سیکل به صورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه، ۶۱ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، بود.

برنامه دمایی برای ایزوفرم G5 شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه جهت واسرشت اولیه، ۴۰ سیکل به صورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۶ درجه سانتی‌گراد ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، بود. این برنامه برای HGPRT به عنوان ژن مرجع،۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه جهت واسرشت اولیه، ۴۰ سیکل به صورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه به وسیله ترموسیکلر بیوراد (Bio Rad iQ5 Multicolor Real time PCR detection system) انجام شد. میزان بیان نسبی ژن به وسیله فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ در دوگروه مورد و شاهد با روش CtΔ مقایسه‌ای مطابق توضیح Moreau و همکاران (۱۴) بررسی شد.

داده‌های حاصل از تحقیق توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ (version 21, SPSS Inc., Chicago, IL) و نیز نرم‌افزار R نسخه ۳ با آزمون‌های Mann-Whitney U و Spearman آنالیز شد و میزان همبستگی بیان ژن‌ها و تأثیر بیان آن‌ها در کاهش خطر سقط توسط آزمون Logistic regression بررسی شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۲۰۲ خانم باردار شرکت داشتند که از این تعداد ۱۰۱ نفر با سابقه یک بار یا بیشترسقط بدون علت پاتولوژیک مشخص و بدون سابقه تولد زنده به عنوان مورد و ۱۰۱ نفر خانم باردار با بارداری ترم بدون سابقه سقط به عنوان شاهد بودند.

خصوصیات دموگرافیک افراد مورد بررسی در هر دو گروه در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. ملاحظه می‌شود که اختلاف سن دو گروه معنی‌دار نبود (P = ۰/۳۷۳).

به علاوه کلیه افراد مورد مطالعه در هر دو گروه از نظر VDRL (Venereal disease research laboratory) و HBsAG (Hepatitis B virus surface antigen) منفی بودند و هیچ یک از این افراد سابقه مصرف داروی سرکوبگر ایمنی نداشتند. به علاوه هیچ یک از زوجین با یکدیگر نسبت فامیلی نداشتند

بیان نسبی هر دو ایزوفرم با محاسبه میانگین $2^{-\Delta\Delta ct}$ کاهش معنی‌داری را در گروه مورد نسبت به شاهد نشان داد (P < ۰/۰۰۱) (جدول شماره ۳). به علاوه این کاهش در ایزوفرم G5 بیشتر بود (نمودار شماره ۱).

میزان اثر هر ایزوفرم بر اساس سن بر خطر وقوع سقط در جدول شماره ۴ نشان داده شد است.

همان طور که در جدول دیده می‌شود به ازای هر سال افزایش سن میزان خطر سقط ۱/۱۸ افزایش پیدا می‌کند (با فاصله اطمینان ۹۵ درصد ۱/۲۶-۱/۱۲ و P < ۰/۰۰۱).

جدول شماره ۱: پرایمرهای مورد استفاده در Real time PCR

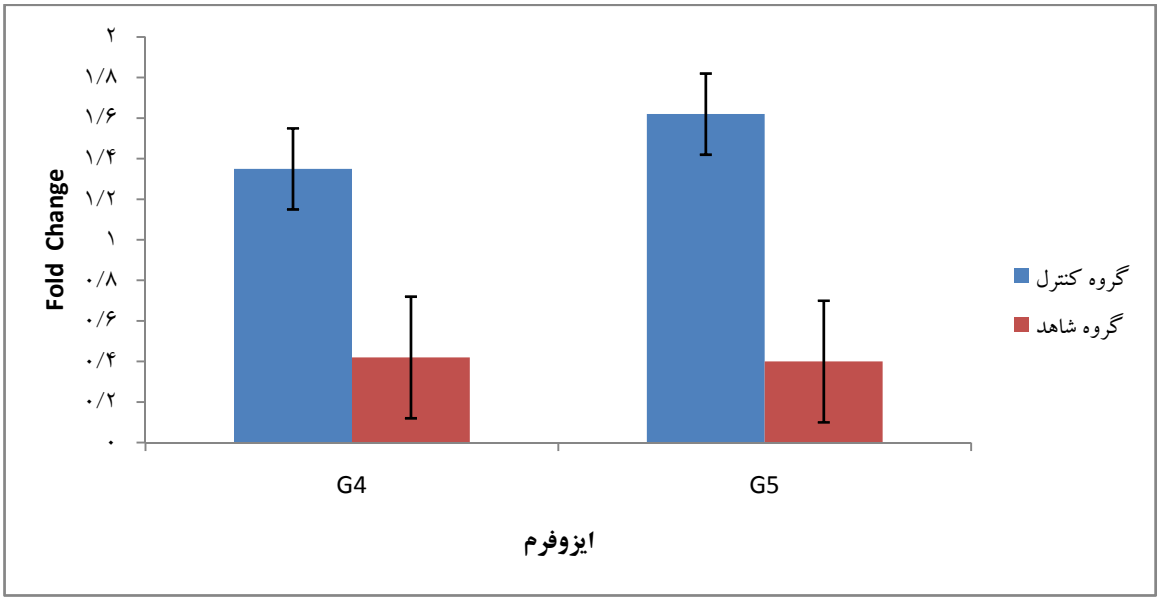
	پرایمرها	mRNA location	Acc. No	طول محصول (جفت باز)
HLA-G4	5′-GAGACCTGGGCGGGCTCC-3′	Exon 2-3	NM_002127	۲۴۸
	5′-GGTTGGCCTCGCTCTGGTTG-3′	Exon 3-5		
HLA-G5	5′-CGGAGTATTGGGAAGAGGAGA-3	Exon3	NM_002127	۲۸۰
	5′-TGGTACCCGCGCGCTGCAG-3′	Exon 4 - Intron 4		
HGPRT	5′-CTA ATTATGGACAGGACTGAACG-3′	Exons 2-3	NM_000194.2	۲۱۱
	5′-TTGACTGGTCATTACAATAGCTC-3′	Exons 4-3		

جدول شماره ۲: مقایسه ویژگی‌های دموگرافیک و بیوشیمیایی شرکت‌کنندگان در بررسی بیان ژنی HLA-G4 و G5 در دو گروه مورد و شاهد

	گروه مورد انحراف معیر ± میانگین	گروه شاهد انحراف معیر ± میانگین	مقدار P
سن (سال)	۲۵/۴۳ ±۳/۲۳	۲۴/۰۱ ± ۲/۴۳	۰/۳۷۳
دفعات سقط (تعداد)	۱/۴ ± ۰/۵۷	–	–
وزن (کیلوگرم)	۷۱/۳۲ ± ۸/۹۵	۷۴/۴۳ ± ۷/۶۷	۰/۷۹۹
قند خون (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۸۷/۷۳ ± ۸/۳	۸۸/۵۶ ± ۹/۰۴	۰/۱۲۴
هموگلوبین خون (گرم در دسی‌لیتر)	۱۱/۸۷ ± ۰/۵۹	۱۲/۰۷ ± ۰/۶	۰/۶۶۷
هماتوکریت (درصد)	۳۵/۷ ± ۱/۸۱	۳۶/۳۳ ± ۱/۹۷	۰/۴۱۲
اوره خون (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۱۳/۱۵ ± ۴/۶۱	۱۲/۷۷ ± ۳/۶۲	۰/۴۱۵
کراتینین خون (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۰/۷۵ ±۰/۲۳	۰/۶۸ ± ۰/۱۴	۰/۰۶۶
T4 (میکروگرم در دسی‌لیتر)	۷/۳۲ ± ۲/۵۲	۸/۰۹ ± ۲/۴۳	۰/۲۵۷
TSH (میکروگرم در دسی‌لیتر)	۲/۰۴ ± ۱/۴۷	۲/۶۶ ± ۱/۲۹	۰/۰۷۷

جدول شماره ۳: میانگین و انحراف معیار بیان نسبی HLA-G4 و G5 در دو گروه تهدید به سقط و شاهد

	گروه شاهد	گروه مورد	
HLA-G4	۱/۳۶ ± ۰/۴۴	۰/۴۷ ± ۰/۲۲	< ۰/۰۰۱
HLA-G5	۱/۶۴ ± ۰/۵۵	۰/۴ ± ۰/۱۶	< ۰/۰۰۱



نمودار شماره ۱: نمودار مقایسه میانگین بیان ژنی دو ایزوفرم HLA-G4 و HLA-G5 در زنان باردار تهدید به سقط و گروه شاهد

جدول شماره ۴: میزان اثر HLA-G4 و HLA-G5 بر خطر سقط بر اساس سن

	OR	فاصله اطمینان ۹۵ درصد	مقدار P
سن	۱/۱۸	۱/۱۲–۱/۲۶	< ۰/۰۰۱
HLA-G4	۰/۴۵	۰/۲۸–۰/۶۹	< ۰/۰۰۱
HLA-G5	۰/۲۶	۰/۱۳–۰/۴۶	< ۰/۰۰۱

همچنین مشخص شد بیشترین تأثیر بیان ژن بر کاهش خطر سقط مربوط به ایزوفرم HLA-G5 بود. به علاوه ایزوفرم G4 در رتبه دوم بیشترین میزان تأثیر بر شانس سقط قرار داشت.

نمونه های مورد بررسی بر اساس میزان بیان G4 و G5 نسبت به سن طبقه بندی شدند سپس همبستگی بین بیان ژن‌ها و

سن با آزمون Spearman بررسی شد (جدول شماره ۵). نتایج نشان داد که افزایش سن با بیان G4 اثر همبستگی معکوسی دارد، اما این همبستگی با بیان G5 دیده نشد.

جدول شماره ۵: بررسی همبستگی بیان ایزوفرم‌های G4 و G5 و سن در نمونه‌های مورد بررسی

		G4	G5	سن
G4	ضریب همبستگی	۱/۰۰	۰/۴۱۹**	-۰/۲۱۴**
	مقدار P	.	<۰/۰۰۱	۰/۰۰۲
	تعداد	۲۰۲	۲۰۲	۲۰۲
G5	ضریب همبستگی	۰/۴۱۹**	۱/۰۰	-۰/۰۷۲
	مقدار P	۰.۰۰۰	.	۰.۳۰۶
	تعداد	۲۰۲	۲۰۲	۲۰۲
سن	ضریب همبستگی	-۰/۲۱۴**	-۰/۰۷۲	۱/۰۰
	مقدار P	۰/۰۰۲	۰/۳۰۶	.
	تعداد	۲۰۲	۲۰۲	۲۰۲

**: همبستگی در سطح کمتر از ۰/۰۱ معنی‌دار است.

به علاوه با استفاده از محاسبات خوشه‌بندی و وجود همبستگی بین بیان دو ایزوفرم G4 و G5، مشخص شد بیشترین احتمال وقوع سقط زمانی مشاهده می‌شود که میزان بیان هر دو ایزوفرم G4 و G5 با هم در فرد کاهش داشته باشد.

بحث

در این تحقیق دو فرم از مولکول‌های تولرانس ایمنی شامل HLA-G4 و G5 به عنوان مولکول‌های مؤثر در بقای جنین در خانم‌های تهدید به سقط قبل از هفته بیستم حاملگی در مقایسه با گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند، که بیان این دو مولکول تفاوت معنی‌داری در مقایسه با افراد باردار سالم داشت.. خطر از دست رفتن حاملگی قبل از هفته بیستم و یا مرده‌زایی قبل از هفته بیست و چهارم با خصوصیات ویژه‌ایی در مادر مرتبط است که شناسایی آن‌ها می‌تواند کمک بسیاری در جهت جلوگیری و یا درمان سقط باشد. علت سقط می‌تواند چندگانه باشد از علل ژنتیکی، محیطی، عفونی، متابولیک و اندوکرینی تا مشکلات آناتومیکی. از این میان تنها علل آنومالی‌های کروموزومی والدین، آنومالی‌های متابولیک و آناتومیک تا حدود زیادی به خوبی شناخته شده‌اند. با این وجود، فراوانی سقط بدون علت که حدود ۵۰-۳۰ درصد موارد سقط و ۱ تا ۳ درصد تمام زوجین را تشکیل می‌دهد آن را به معضلی برای خانواده ها و اجتماع تبدیل نموده است. در مطالعه آذرگون و همکاران که روی ۵۸ زن با دو یا بیشتر سقط انجام دادند، در ۳۱/۰۳ درصد افراد مورد مطالعه هیچ علتی یافت نشد (۱۵).

اولین بار Medawar سعی کرد تا استراتژی‌های رد جنین توسط مادر را توضیح دهد. وی به درستی فرض کرد که این پروسه باید دارای خصوصیات عمده ایمنولوژیک شامل مکانیسم‌های حفاظت فیزیکی بین بافت‌های مادر و جنین جهت جلوگیری از عرضه آنتی‌ژنی، بیان ضعیف آنتی‌ژن‌های جنینی و نیز گسترش تولرانس مادر نسبت به جنین باشد (۱۶).

صحت اساس این فرضیات امروزه به درستی شناخته شده است و اثبات شده است که علل سقط‌های بدون علت به طور عمده ایمنولوژیک است و القای تحمل در مادر نسبت به جنین عامل عمده حفظ بارداری است (۱).

مطالعات فراوانی که برای تعیین عوامل القای تحمل انجام شده‌اند، مولکول HLA-G را به عنوان یکی از مهم‌ترین این عوامل معرفی کرده‌اند.

Rouas-Freiss و همکاران نشان دادند که HLA-G علاوه بر ایفای نقش در تحمل بین مادر و جنین، نقش مهمی در تکامل بلاستوسیت ها و القای جایگزینی تخم دارد (۱۷). Hunt و همکاران نشان دادند که HLA-G محلول در تمام مراحل حاملگی در خون مادر وجود دارد و مقدار آن با پیشرفت حاملگی افزایش می‌یابد (۱۸).

در مطالعه ما برای اولین بار دو ایزوفرم غشایی G4 و محلول G5 از نظر میزان بیان ژنی در ۲۰۲ زن باردار در گروه تهدید به سقط و بارداری طبیعی بررسی شدند. با توجه به نتایج به دست‌آمده مشابه برخی از نتایج مطالعات قبلی، دو ایزوفرم مورد بررسی ما در گروه تهدید به سقط نسبت به گروه شاهد دارای اختلاف کاهشی معنی داری بود. افزایش سن بر خلاف

مطالعات پیشین تنها با کاهش بیان ایزوفرم G4 ارتباط مستقیم داشت که با نتایج حاصل از مطالعاتی که اثر سن را بر HLA-G محلول نشان داده‌اند متناقض به نظر می‌رسد و این تناقض ظاهری ممکن است به دلیل عدم توانایی جداسازی ایزوفرم G5 از ایزوفرم G1 در روش‌های مبتنی بر اندازه گیری آن‌ها باشد. بنابراین بررسی حاضر در مقایسه با سایر مطالعات انجام‌شده مبتنی بر تأثیر افزایش سن بر فرم‌های محلول HLA-G در بارداری‌های منجر به سقط، نشان داد که کاهش زیاد ایزوفرم G1 (و نه کاهش G5) می تواند باعث به دست آوردن نتایج مشابه یافته‌های این مطالعه شود.

مطالعات بسیاری، اهمیت و ضرورت غلظت های متفاوت ایزوفرم‌های HLA-G را در حفظ بارداری و ارتباط آن با سن مادر در سقط و نیز اثر نواحی پلی‌مورفیسم مختلف ژن HLA-G بر میزان بیان آن نشان داده‌اند (۱۹، ۱۸).

Hviid و همکاران (۱۹) و Yao و همکاران (۲۰)، اثر پیرایش متفاوت بر میزان بیان متفاوت HLA-G را در هاپلوتایپ‌های اللی مختلف نشان دادند. در مطالعه Sipak-Szmigiel و همکاران مشخص شد که میزان HLA-G محلول در افراد با برخی الل‌ها نسبت به افراد دارای الل‌های دیگر، متفاوت است (۱۳). همچنین در مطالعه Moreau و همکاران تأثیر پلی‌مورفیسم نواحی پروموتری و 3´UTR بر بیان مولکول HLA-G نشان داده شد (۱). در مطالعه Flajollet و همکاران مولکول RREB-1 به عنوان مهارکننده رونویسی ژن HLA-G معرفی شد (۲۱). مطالعه LeMaoult و همکاران، تأثیر HLA-G را در بیان افزایشی گیرنده‌های مهاری عرضه آنتی‌ژن در مونوسیت‌ها و APCها و نیز گیرنده‌های مهار پرولیفراسیون سلول‌های T و سیتوتوکسیسیتی در سلول‌های NK، بار دیگر تأیید کرد (۲۲). Holling و همکاران نشان دادند مکانیسم های تنظیمی بیان ژنی پس از ترجمه در میزان بیان ژن مولکول دخیل هستند. همچنین جهش های بی معنی و یا جهش هایی که مانع ترجمه mRNA پروتئین می‌شوند، نشان داده شد (۲۳). Jassem و همکاران با گرفتن نمونه از مادران باردار در مدت کوتاهی پس از سقط مکرر بدون علت و بررسی میزان HLA-G محلول و پلی‌مورفیسم ژنی چنین نتیجه گیری کردند که کاهش مولکول HLA-G می‌تواند یکی از دلایل مهم سقط باشد ولی کاهش میزان آنتی‌ژن محلول همیشه علت سقط نیست. آن‌ها تاثیر آلل‌های مختلف بر میزان بیان مولکول را تأیید نمودند.اما در مطالعه حاضر کاهش بیان مولکول‌های محلول از دلایل عمده سقط بود. این عدم تشابه در نتیجه گیری ممکن است به علت تفاوت زمانی بررسی HLA-G هنگام بروز علایم تهدید به سقط در این مطالعه در مقایسه با بررسی پس از سقط در مطالعه Jassem و همکاران باشد (۲۴).

بررسی‌های دیگر ثابت نموده است که قرارگیری برخی رده های سلولی در معرض شوک گرمایی یا آرسنیک و نیز در برخی سلول‌های توموری با وجود رونویسی از ژن HLA-G، بیان پروتینی آنتی‌ژن انجام نمی‌شود. به علاوه برخی الگوی‌های سایتوکاینی مترشحه در رده‌های مختلف سلولی به ضرر افزایش رونویسی ژن و یا پایداری رونوشت ژن HLA-G است (۲۶، ۲۵).

علاوه بر این مطالعات انجام‌شده در In vitro نشان می‌دهند که در یک واکنش آلوژنیک، فعال‌سازی G5 به صورت اختصاصی صورت می گیرد. به علاوه ایزوفرم‌های حاوی اینترون ۴ (مانند G5) در رده‌های سلولی تحریک‌شده به طور ترجیحی بیشتر بیان می‌شوند که شاید به دلیل وجود نواحی تنظیم پیرایش متناوبی که با فرم‌های اللی متفاوت در ارتباط هستند، باشد (۲۷، ۱۴). به عنوان مثال برخی جهش‌ها در اینترون چهار به نفع بیان بیشتر ایزوفرم‌های دارای اینترون چهار است که ممکن است باعث پایداری بیشتر رونوشت ژن و در نتیجه افزایش اثرگذاری خواص بیولوژیک پروتئین گردد.

بنابراین با توجه به نتایج برخی مطالعات قبلی و نتایج ما، به نظر می‌رسد بیان ایزوفرم G5 بیشتر تحت کنترل عوامل ژنتیکی و نقش پذیری ژنی (Imprinting) است و G4 نیز بیانی مرتبط با عوامل محیطی و ناشی از تغییرات سن دارد که تأثیر هم‌زمان این دو ایزوفرم با هم مشخص کننده نتیجه بارداری است؛ هر چند این نتیجه گیری نیازمند مطالعات هم‌زمان بیان ژن در

سلول‌های ترانسفرم شده و مطالعات مولکولی مرتبط جهت بررسی میزان تأثیر ژنتیک و محیط بر بیان ژنی می‌باشد.

کاهش بیان دو مولکول مؤثر در تولرانس بین مادر و جنین، در زنان باردار تهدید به سقط در مقایسه با زنان باردار سالم از نتایج مهم این مطالعه بود. با توجه به یافته‌های به دست‌آمده در این بررسی مشخص شد که تغییرپذیری محدود پروتئین و جایگزینی اسید آمینه می‌تواند عامل مهمی در تغییر عملکرد بیولوژیکی مولکول HLA-G شامل اتصال به پپتید، تولید ایزوفرم‌ها، توانایی پلیمریزاسیون و تعدیل سیستم ایمنی باشد. از این رو بررسی نواحی پلی‌مورفیک ژن، به خصوص نواحی اینترونیک و جایگاه‌های پذیرنده و گیرنده پیرایش، هم‌زمان با میزان بیان هر ایزوفرم می‌تواند علت اصلی کاهش بیان ژنی را در برخی افراد نسبت به سایرین مشخص نماید. بنابراین به نظر می‌رسد مولکول HLA-G5 می‌تواند به عنوان یکی از اصلی ترین ایزوفرم‌های دخیل در ایجاد تولرانس، یکی از شاخص‌های مؤثر در تعیین افراد تهدید به سقط باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود بررسی مولکول‌های HLA-G4 و G5 به عنوان مولکول‌های مؤثر در باروری، در خانم‌ها مورد ارزیابی قرارگیرد تا بتوان علاوه بر اهداف درمانی، پیش‌آگهی مناسبی از سقط های خود به خودی بر پایه این ایزوفرم‌های ویژه ترسیم نمود.

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان مراتب قدردانی و تشکر خود را از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران اعلام می‌دارند.

References

1. Moreau P, Contu L, Alba F, Lai S, Simoes R, Orru S, et al. HLA-G gene polymorphism in human placentas: possible association of G*0106 allele with preeclampsia and miscarriage. Biol Reprod 2008; 79(3): 459-67.
2. Carosella ED, LeMaoult J. HLA-G: a look back, a look forward. Cell Mol Life Sci 2011; 68(3): 337-40.
3. Fuzzi B, Rizzo R, Criscuoli L, Noci I, Melchiorri L, Scarselli B, et al. HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. Eur J Immunol 2002; 32(2): 311-5.
4. Abediankenari S, Eslami MB, Sarrafnejad A, Mohseni M, Larijani B. Dendritic cells bearing HLA-G inhibit T-Cell activation in type 1 diabetes. Iran J Allergy Asthma Immunol 2007; 6(1): 1-7.
5. Carosella ED, Favier B, Rouas-Freiss N, Moreau P, LeMaoult J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. Blood 2008; 111(10): 4862-70.
6. Carosella ED, Moreau P, LeMaoult J, Rouas-Freiss N. HLA-G: from biology to clinical benefits. Trends Immunol 2008; 29(3): 125-32.
7. LeMaoult J, Le DM, Rouas-Freiss N, Moreau P, Menier C, McCluskey J, et al. Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness. Tissue Antigens 2003; 62(4): 273-84.
8. Huddleston H, Schust DJ. Immune interactions at the maternal-fetal interface: a focus on antigen presentation. Am J Reprod Immunol 2004; 51(4): 283-9.
9. Apps R, Gardner L, Moffett A. A critical look at HLA-G. Trends Immunol 2008; 29(7): 313-21.
10. 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.
11. Hviid TV. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. Hum Reprod Update 2006; 12(3): 209-32.
12. 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. Hum Reprod 2005; 20(1): 138-46.
13. Sipak-Szmigiel O, Ronin-Walknowska E, Cybulski C, Plonka T, Lubinski J. Antigens HLA-G, sHLA- G and sHLA- class I in reproductive failure. Folia Histochem Cytobiol 2007; 45(Suppl 1): S137-S141.
14. Moreau P, Mouillot G, Rousseau P, Marcou C, Dausset J, Carosella ED. HLA-G gene repression is reversed by demethylation. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100(3): 1191-6.
15. Azargoon A, Heidary S, Alavi Toussy J. Comparing the causes of abortion in patients with two or more than two consecutive miscarriages. Tehran Univ Med J 2011; 69(4): 245-52. (Persian).
16. Medawar PB. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. Symp Soc Exp Biol

1953; 7: 320-38.
17. Rouas-Freiss N, Goncalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytolysis. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94(21): 11520-5.
18. Hunt JS, Jadhav L, Chu W, Geraghty DE, Ober C. Soluble HLA-G circulates in maternal blood during pregnancy. Am J Obstet Gynecol 2000; 183(3): 682-8.
19. Hviid TV, Hylenius S, Rorbye C, Nielsen LG. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. Immunogenetics 2003; 55(2): 63-79.
20. Yao YQ, Barlow DH, Sargent IL. Differential expression of alternatively spliced transcripts of HLA-G in human preimplantation embryos and inner cell masses. J Immunol 2005; 175(12): 8379-85.
21. Flajollet S, Poras I, Carosella ED, Moreau P. RREB-1 is a transcriptional repressor of HLA-G. J Immunol 2009; 183(11): 6948-59.
22. LeMaoult J, Zafaranloo K, Le DC, Carosella ED. HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. FASEB J 2005; 19(6): 662-4.
23. Holling TM, Bergevoet MW, Wierda RJ, van Eggermond MC, van den Elsen PJ. Genetic and epigenetic control of the major histocompatibility complex class Ib gene HLA-G in trophoblast cell lines. Ann N Y Acad Sci 2009; 1173: 538-44.
24. Jassem RM, Shani WS, Loisel DA, Sharief M, Billstrand C, Ober C. HLA-G polymorphisms and soluble HLA-G protein levels in women with recurrent pregnancy loss from Basrah province in Iraq. Hum Immunol 2012; 73(8): 811-7.
25. Abediankenari S, Shaker D, Abedian F, Mirabi A. The effect of beta interferon on dendritic cells and cytokine synthesis by CD4+ T cells. Iran J Immunol 2009; 6(2): 61-6.
26. Verloes A, Van d, V, LeMaoult J, Mateizel I, Cauffman G, Horn PA, et al. HLA-G expression in human embryonic stem cells and preimplantation embryos. J Immunol 2011; 186(4): 2663-71.
27. Abediankenari S, Ghasemi M, Kim YJ. Human leukocyte antigen-G expression on dendritic cells induced by transforming growth factor-beta1 and CD4+ T cells proliferation. Iran Biomed J 2011; 15(1-2): 1-5.