

## چند شکلی ژنتیکی 4G/5G در پروموتور ژن مهارکننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱ در زنان با سابقه سقطهای خود به خودی مکرر و افراد کنترل سالم

مرتضی باقری<sup>۱</sup>، دکتر عیسی عبدی راد<sup>۲</sup>، دکتر میرداوود عمرانی<sup>۳</sup>، دکتر فریبا نانبخش<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت ۸۹/۱۰/۲ تاریخ پذیرش ۸۹/۱۲/۱۲

### چکیده

**پیش زمینه و هدف:** با افزودن و یا حذف یک گوانوزین (G) در پروموتور ژن مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱ چند شکلی ژنتیکی حاوی آلل‌های 4G و 5G ایجاد می‌شود. نتایج مطالعات اخیر نشان داده است حضور آلل 4G در ژن مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱ احتمال بروز بیماری‌های انسان را افزایش می‌دهد. با انجام این مطالعه، چند شکلی ژنتیکی 4G/5G در پروموتور ژن مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱ در زنان با سابقه سقطهای خودبه‌خودی مکرر و افراد کنترل سالم تعیین می‌شود.

**مواد و روش کار:** ژنوتایپ ۴۵ بیمار با سابقه سقطهای خودبه‌خودی مکرر (۳ بار یا بیشتر) و ۶۴ نفر کنترل، به روش RFLP-PCR تعیین شد. **یافته‌ها:** فراوانی آلل 4G در بیماران و گروه کنترل به ترتیب معادل (۶۷/۷۸ درصد) و ۶۱ (۳۶/۷۲ درصد) می‌باشد. فراوانی ژنو تایپ‌های 5G/5G و 4G/5G به ترتیب در گروه بیماران معادل (۳۵/۵۶ درصد) و ۱۶ (۶۴/۴۴ درصد) و در گروه کنترل معادل (۲۶/۵۶ درصد) و ۱۷ (۷۳/۴۴ درصد) می‌باشد. در گروه‌های مورد بررسی ژنوتایپ 4G/4G یافت نشد. آنالیزهای آماری نشان داد بین دو گروه بیمار و کنترل از لحاظ فراوانی آلل‌ها و ژنو تایپ‌ها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. **بحث و نتیجه گیری:** در جمعیت مورد مطالعه، بین آلل 4G در ژن مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱ و احتمال بروز بیماری سقطهای خودبه‌خودی مکرر ارتباط معنی‌داری وجود ندارد.

**کلید واژه‌ها:** پروموتور ژن مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱، بیماری سقطهای خودبه‌خودی مکرر، چند شکلی ژنتیکی، 5G، 4G

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و دوم، شماره دوم، ص ۸۵-۹۱، خرداد و تیر ۱۳۹۰

آدرس مکاتبه: ارومیه، بیمارستان مطهری، بخش ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، تلفن: ۰۴۴۱۲۲۴۰۱۶۶

Email: mortazabagheri@yahoo.com

### مقدمه

مهارکننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱ به عنوان یک گلیکوپروتئین (با وزن مولکولی ۵۰ کیلو دالتون) نقش بسیار مهمی در ممانعت از واکنش‌های فیبرینولیز دارد. تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین به عنوان مرحله‌ای مهم در فیبرینولیتیک بوده و توسط فعال کننده‌هایی نظیر فعال کننده‌های پلاسمینوژن بافتی (t-PA) و فعال کننده‌های پلاسمینوژن یوروکیناز (u-PA) تنظیم می‌شود.

مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱ سریع‌ترین مهار کننده t-PA بوده و میزان تشکیل لخته در سیستم انعقادی را تنظیم می‌کند (۱). اخیراً نشان داده شده است که غلظت پلاسمایی و پلاستایی مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱ در زنان با سابقه پره اکلامپسی در مقایسه با زنان سالم و بارور زیادتر است (۳،۲). و افزایش سطح پلاسمایی مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱ منجر به کاهش فعالیت فیبرینولیتیک می‌شود (۴،۳).

<sup>۱</sup> مربی ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

<sup>۲</sup> دانشیار ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

<sup>۳</sup> استاد ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

<sup>۴</sup> دانشیار زنان و زایمان، بخش زنان و زایمان، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

غربی، انجام دادن چنین مطالعه‌ای ضروری می‌باشد؛ لذا برای اولین بار با انجام این مطالعه در جمعیت مورد نظر، چند شکلی ژنتیکی 4G/5G در پروموتور ژن مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-1 در زنان با سابقه سقط‌های خودبه‌خودی مکرر و افراد کنترل سالم تعیین می‌شود.

### مواد و روش کار

برای انجام این مطالعه، پس از تصویب و اخذ مجوزهای لازم از دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، 45 بیمار با سابقه سقط‌های خودبه‌خودی مکرر و 64 نفر کنترل (زنان سالم در سنین باروری و دارای حداقل دو زایمان زنده) در این مطالعه شرکت کردند. افراد کنترل شرکت کننده در این طرح، از بین زنان مراجعه کننده به بخش‌های ژنتیک و کوثر بیمارستان شهید مطهری که در مشاوره و معاینه، یافته‌های پاتولوژیک یا سابقه بیماری ارثی نداشتند و سالم ارزیابی شدند در صورت داشتن حداقل دو فرزند با زایمان زنده انتخاب شدند؛ و زنان بیمار از مراکز دیگر نظیر بخش کوثر بیمارستان شهید مطهری و بیمارستان‌های شهرستان ارومیه و شهرهای دیگر به بخش ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی ارومیه ارجاع شدند. روش انتخاب افراد برای مطالعه به صورت در دسترس و آسان می‌باشد. سن افراد شرکت کننده در مطالعه بین 18 تا 40 سال می‌باشد؛ و از کل بیماران و گروه کنترل رضایت نامه کتبی اخذ شد.

شرایط ورود به مطالعه و خروج از مطالعه برای گروه‌های کنترل و بیمار، به طور تکمیل توسط دیگران توصیف شده است (15). برخی از شرایط ورود به مطالعه عبارتند از: داشتن حداقل 3 بار یا بیشتر سابقه خودبه‌خودی مکرر بین 8 تا 20 هفته بارداری به دلایل نامشخص، کاریوتایپ طبیعی، سطح هورمون های پرولاکتین و تیروئید طبیعی و نیز از لحاظ فیزیکی و آناتومی رحم طبیعی و از بابت تست‌های سونوگرافی، هیسترو سالپنگوگرافی و هیستروسکوپی و از لحاظ آنتی بادی‌های ضد فسفولیپید و ضد کاردیولیپین طبیعی ارزیابی شوند؛ و همچنین، بیماران با مصرف بیش از سه عدد سیگار در روز، هورمون های تیروئیدی بالا یا پایین و بیماری‌هایی نظیر دیابت، اپیلپسی و بیماری‌های بافت پیوندی نظیر لوپوس از مطالعه خارج شدند. از هر بیمار خون محیطی به میزان 2-3 میلی لیتر در لوله حاوی اتیلن دی آمین تترا استیک اسید به‌عنوان ماده ضد انعقاد خون جمع‌آوری و به کمک روش‌های استاندارد DNA ژنومی استخراج گردید (16).

با استفاده از دستگاه بیوفوتومتر از خلوص DNA ژنومی استخراج شده اطمینان حاصل شد. DNA ژنومی حاصل توسط دستگاه ترموسایکلر (دستگاه تکثیر ژن) در ناحیه مورد نظر روی

تا زمانی که حالت هموستاز حفظ شود و بین سیستم‌های فیبرینولیتیک و انعقادی تعادل وجود داشته باشد احتمال سقط شدن جنین وجود ندارد؛ لذا با از بین رفتن تعادل بین سیستم‌های فیبرینولیتیک و انعقادی، سیستم مانع از رسوب فیبرین در عروق جفت نخواهد شد و در نهایت احتمال سقط جنین افزایش می‌یابد (5). ژن مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-1 از 9 آگزون ساخته شده و در حدود 12/3 کیلو باز طول دارد. ژن مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-1 در روی کروموزوم شماره 7 در موقعیت q21.3-q22 قرار گرفته است (6).

با توجه به افزودن و یا حذف یک گوانوزین (G) در موقعیت 675- در پروموتور ژن مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-1 قبل از محل شروع ترجمه، روی توالی DNA دو آلل که حاوی 5G و یا 4G در یک ردیف می‌باشند، به وجود می‌آید؛ بنابراین سه نوع ژنوتایپ ممکن عبارتند از: 5G/5G، 5G/4G و 4G/4G (7). غلظت پلاسمایی مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-1 در افراد هموزیگوت برای جهش حذفی (4G) در سطح بالا، در افراد هتروزیگوت برای جهش‌های حذفی (4G) و افزودنی (5G) در سطح متوسط و در افراد هموزیگوت برای جهش افزودنی (5G) در سطح پایین می‌باشد (7).

مطالعات اخیر نشان داده است ژن‌ها و چند شکلی‌های ژنتیکی متعددی از جمله جهش‌های ژنتیکی ترومبوفیلی نظیر فاکتور پنج لیدن، فاکتور دو پروترومبین، فاکتور انعقادی 13، آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین و آنزیم متیلن تترا هیدروفولات ردوکتاز و نیز جهش حذفی (4G) در ژن مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-1، ریسک و خطر بروز سقط‌های مکرر خودبه‌خودی را افزایش می‌دهد (8). حضور ژنوتایپ 4G/4G در ژن مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-1 با افزایش بیان ژن مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-1 ارتباط دارد (9). مطالعات زیادی نشان داده است که چند شکلی ژنتیکی ژن مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-1 با بیماری‌های انسان نظیر میوکاردیال انفارکشن (7، 10-12)، دیابت ملیتوس غیر وابسته به انسولین (13) و بیماری‌های عروقی- مغزی (سربرو واسکولر) (14) ارتباط دارد. نتایج مطالعات اخیر نشان داد چند شکلی‌های ژنتیکی جهش‌های حذفی (4G) و افزودنی (5G) در پروموتور ژن مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-1 در بیماری سقط‌های خود به خودی مکرر به ترتیب، به صورت 4G/5G و 4G/4G می‌باشد (8، 23). با توجه به عدم وجود گزارش رسمی در مورد حضور یا فقدان چند شکلی‌های ژنتیکی جهش‌های حذفی (4G) و افزودنی (5G) در پروموتور ژن مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-1 در بیماری سقط‌های خود به خودی مکرر در سطح منطقه به خصوص استان آذربایجان

ژن مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱ در موقعیت ۶۷۵- با استفاده از دو سری پرایمر

OR (95% C.I.) و p-value با استفاده از نرم افزارهای آماری SPSS16 و Excel2003 محاسبه گردید. مقادیر p-value کم‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار قلمداد گردید.

F: 5'-CACAGAGAGAGTCTGGACACGTGA-3'

R: 5'-TGCAGCCAGCCACGTGATTGTCTAG-3'

تحت برنامه دستگاه ترموسایکلر شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه در ۳۲ سیکل تکثیر شد (۱۷). در این مرحله طول باندهای تشکیل شده معادل ۱۴۸ باز می‌باشد. برای تعیین آلل‌ها و ژنو تایپ‌ها قطعات تکثیر یافته را به روش آنزیمی توسط آنزیم برش دهنده Bse RI برش داده و سپس توسط الکتروفورز با ژل آگاروز ۲ درصد به آنالیز باندها می‌پردازیم. با قرار دادن ژل حاصله تحت پرتوی فرابنفش، قطعات تشکیل شده را تفسیر نمودیم. مشاهده یک باند ۱۴۸ بازی بدون برش، نشان دهنده حضور آلل 5G و ژنوتایپ هموزیگوت 5G/5G و دو باند ۱۱۰ و ۱۸ بازی، نشان دهنده حضور آلل 4G و ژنوتایپ هموزیگوت 4G/4G و ۳ باند ۱۴۸، ۱۱۰ و ۱۸ بازی، نشان دهنده حضور هر دو آلل 5G و 4G و ژنوتایپ هتروزیگوت 5G/4G می‌باشد. فراوانی آلل‌ها و ژنو تایپ‌ها در گروه‌های کنترل و بیمار با شمارش مستقیم باندها فراهم شد. فراوانی آلل‌ها و ژنو تایپ‌ها در گروه بیمار در مقایسه با گروه کنترل توسط آزمون‌های کای اسکوئر و فیشر مقایسه گردید. برای کل آنالیزهای آماری<sup>۲</sup>

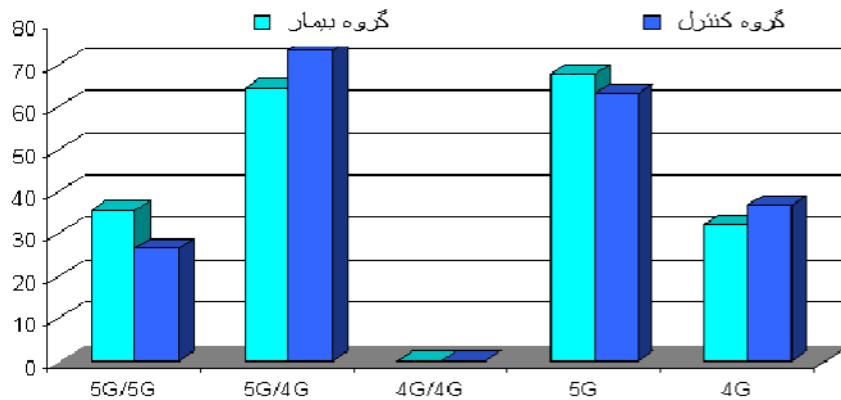
### یافته‌ها

یافته‌های این مطالعه در جدول شماره ۱ خلاصه شده است. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد: فراوانی (درصد) آلل 4G در بیماران و گروه کنترل به ترتیب معادل (۳۲/۲۲ درصد) و ۲۹ و ۶۳/۲۸ (درصد) و ۸۱ و فراوانی (درصد) آلل 5G در بیماران و گروه کنترل به ترتیب معادل (۶۷/۷۸ درصد) و ۶۱ و (۳۶/۷۲ درصد) و ۴۷ می‌باشد. فراوانی (درصد) ژنو تایپ‌های 5G/5G و 4G/5G به ترتیب در گروه بیماران معادل (۳۵/۵۶ درصد) و ۱۶ و (۶۴/۴۴ درصد) و در گروه کنترل معادل (۲۶/۵۶ درصد) و ۱۷ و (۷۳/۴۴ درصد) و ۴۷ می‌باشد؛ و در گروه‌های مورد بررسی ژنوتایپ 4G/4G یافت نشد. شکل شماره ۱ را ببینید. آنالیزهای آماری نشان داد بین دو گروه بیمار و کنترل از لحاظ فراوانی آلل‌ها و توزیع ژنو تایپ‌ها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد بین جهش حذفی (4G) در ژن مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱ و ریسک و خطر بروز سقط‌های مکرر خودبه‌خودی ارتباط وجود ندارد. شکل شماره ۲ آنالیز ژنو تایپ‌های ژن مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱ را روی ژل آگاروز نشان می‌دهد.

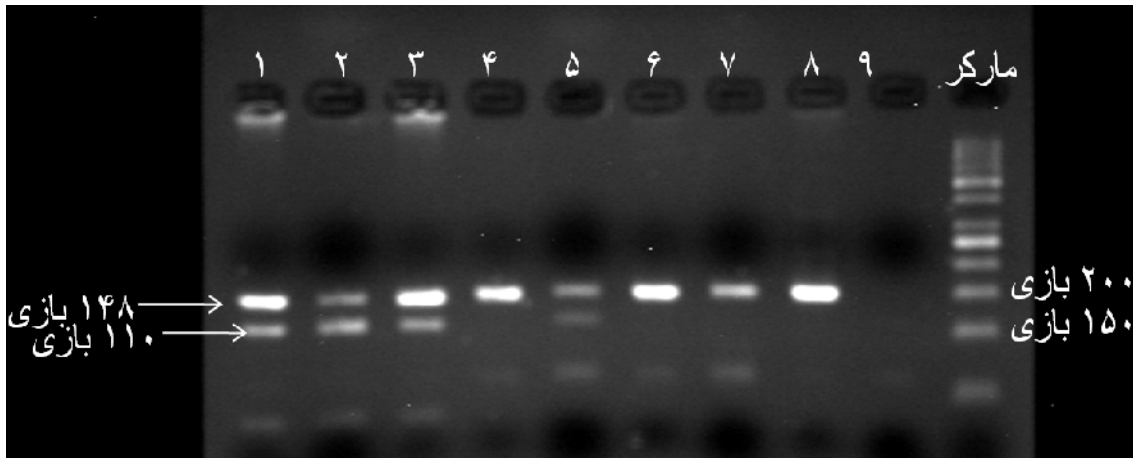
جدول شماره (۱): فراوانی (درصد) آلل 4G و 5G و نیز ژنو تایپ‌های 5G/5G و 4G/5G در گروه‌های بیمار و

کنترل و مقایسه آن‌ها با یکدیگر

مقدار P	آزمون کای دو	نسبت شانس و فاصله اطمینان %۹۵	گروه کنترل (%)	گروه بیماران (%)	PAI-1
۰/۳۱۴	۱/۰۱۲	۱/۵۲(۰/۶۷-۳/۴۸)	۱۷(۲۶/۵۶)	۱۶(۳۵/۵۶)	5G/5G
۰/۳۱۴	۱/۰۱۲	۰/۶۵(۰/۲۹-۱/۵)	۴۷(۷۳/۴۴)	۲۹(۶۴/۴۴)	5G/4G
-	-	-	۰(۰)	۰(۰)	4G/4G
۰/۴۹۳	۰/۴۷۱	۱/۲۲(۰/۶۹-۲/۱۶)	۸۱(۶۳/۲۸)	۶۱(۶۷/۷۸)	5G
۰/۴۹۳	۰/۴۷۱	۰/۸۱(۰/۴۶-۱/۴۵)	۴۷(۳۶/۷۲)	۲۹(۳۲/۲۲)	4G



شکل شماره (۱): درصد فراوانی آلل‌های 4G و 5G و نیز ژنوتایپ‌های 5G/5G، 4G/5G و 4G/4G ژن مهارکننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱ را در گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد.



شکل شماره (۲): آنالیز ژنوتایپ‌های ژن مهارکننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱ روی ژل آگاروز ۲٪. لاین‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۵، ۷، ۸ و ۹ نشان دهنده ژنوتایپ هتروزیگوت برای ژن مهارکننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱ (4G/5G) و لاین‌های ۴، ۶، ۷ و ۸ نشان دهنده ژنوتایپ هموزیگوت برای ژن مهارکننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱ (5G/5G) و لاین شماره نشان دهند کنترل منفی می‌باشد.

## بحث و نتیجه گیری

سقط‌های خودبه‌خودی مکرر از مهم‌ترین مشکلات روحی برای زنان حامله می‌باشد و شامل سه یا بیش از سه سقط خودبه‌خودی مکرر می‌شود. سقط معمولاً به عنوان اتمام حاملگی قبل از بیستمین هفته بارداری تعریف می‌شود. و در حدود بیش از پنج درصد از زنان از این بیماری رنج می‌برند (۱۸). اتیولوژی بیماری سقط خودبه‌خودی مکرر شناخته شده نیست لذا در دهه اخیر نقش عوامل محیطی و ژنتیکی به عنوان فاکتورهای خطر در حال بررسی می‌باشد (۱۹). در حدود ۳۰ درصد موارد سقط‌های خودبه‌خودی مکرر به علت بروز جهش و تنوع در ژنوم عوامل

ترومبوفیلی به وجود می‌آیند و باعث بروز مشکل در بارداری می‌شوند. با توجه به این‌که ترومبوفیلی یک ناهنجاری چند ژنی می‌باشد لذا فاکتورها و ژن‌های متعددی در بروز آن نقش دارند (۱۹-۲۱). برخی از جهش‌ها و نیز چند شکلی‌های مطالعه شده در ژنوم فاکتورهای ترومبوفیلی عبارتند از: فاکتور پنچ لیدن، فاکتور دو پروترومبین، فاکتور انعقادی سیزده، آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین و آنزیم متیلن تترا هیدروفولات ردوکتاز، به تافیرینوژن ۴۴۸ و گوناگونی ژن همو کروماتوزیز ... (۲۱-۱۹). این مطالعه چند شکلی ژنتیکی 4G/5G (4G5G, 5G5G) و 4G4G در پروموتور ژن مهارکننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱

بیمار بسیار حائز اهمیت می‌باشد (۲۵). با توجه به این‌که زمینه ژنتیکی افراد در گروه‌ها و جوامع مختلف از تنوع زیادی برخوردار است (۲۶) لذا انجام مطالعات در این زمینه بسیار سودمند خواهد بود. یافته‌های این پژوهش برای اولین بار به صورت رسمی فراوانی آلل‌ها و توزیع ژنو تایپ‌های ژن مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱ در جمعیت استان آذربایجان غربی و زنان آذری زبان گزارش می‌دهد. نتایج این مطالعه می‌تواند به عنوان مطالعه پایه و کنترل در سایر بیماری‌های انسان بکار آید. غربالگری مولکولی جهش‌های ژنی مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱ می‌تواند در شناسایی افراد در معرض خطر کم‌کند کننده باشد و ابزار نیرومندی را در مبارزه با بیماری‌ها مطابق با زمینه ژنتیکی اختصاصی افراد فراهم آورد. با این حال تعداد نمونه‌ها می‌تواند به عنوان محدودیتی برای مطالعه ما محسوب شود. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد بین آلل 4G در ژن مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱ و ریسک و خطر بروز سقط‌های مکرر خودبه‌خودی ارتباط معنی‌داری وجود ندارد.

### تشکر و قدردانی

کلیه هزینه‌های این پژوهش توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه تقبل گردید. نویسندگان این مقاله از تمام افرادی که در اجرای پژوهش همکاری داشتند و به خصوص خانواده‌های محترم شرکت کننده در این مطالعه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

در جمعیت مورد مطالعه، براساس حضور یا عدم حضور جایگاه برش آنزیمی، آنزیم محدودالتر Bse RI در دو گروه بیمار و کنترل تعیین شد؛ و فراوانی آلل‌ها (4G یا 5G) و توزیع ژنو تایپ‌های ژن مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱ در موقعیت ۶۷۵- (4G4G و 4G5G,5G5G) در هر دو گروه با یکدیگر مقایسه گردید. یافته‌های ما نشان می‌دهد: (۱) فراوانی آلل 4G در بیماران و گروه کنترل به ترتیب معادل ۰/۳۲ و ۰/۶۳ و (۲) فراوانی آلل 5G در بیماران و گروه کنترل به ترتیب معادل ۰/۶۷ و ۰/۳۶ می‌باشد. (۳) فراوانی ژنو تایپ‌های 5G/5G و 4G/5G به ترتیب در گروه بیماران معادل ۰/۳۵ و ۰/۶۴ و (۴) در گروه کنترل معادل ۰/۲۶ و ۰/۷۳ می‌باشد. و (۵) در گروه‌های مورد بررسی بیمار و کنترل، ژنوتایپ 4G/4G یافت نشد. آنالیزهای آماری نشان داد بین دو گروه بیمار و کنترل از لحاظ فراوانی آلل‌ها و توزیع ژنو تایپ‌ها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد بین جهش حذفی (4G) در ژن مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن-۱ و ریسک و خطر بروز سقط‌های مکرر خودبه‌خودی ارتباط معنی‌داری وجود ندارد. یافته‌های این مطالعه همسو با سایر مطالعات بوده و توسط دیگران تایید می‌شود (۲۲-۲۴). نتایج مطالعات قبلی نشان می‌دهد که بیماری سقط‌های مکرر خودبه‌خودی به عنوان یک بیماری پیچیده و چند ژنی به دلیل جهش‌های ژنتیکی متعددی (مجموعه‌ای از جهش‌های ژنی) در ژنوم انسان به وجود می‌آید؛ بنابراین بررسی سایر جهش‌ها و ژنوم مرتبط با مشکلات ترومبوفیلی جهت روشن شدن مکانیسم این

### References:

1. Wiman B. Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in plasma: Its role in thrombotic disease. *Thromb Haemost* 1995; 74: 71-6.
2. Reith A, Booth NA, Moore NR, Cruickshank DJ, Bennett B. Plasminogen activator inhibitors (PAI-1 and PAI-2) in normal pregnancies, pre-eclampsia and hydatidiform mole. *Br J Obstet Gynaecol* 1993; 100(4):370-4.
3. Estelles A, Gilibert J, Aznar J, Loskutoff DJ, Schleef RR. Changes in the plasma levels of type 1 and type 2 plasminogen activator inhibitors in normal pregnancy and in patients with severe preeclampsia. *Blood* 1989 74: 1332-38.
4. Estelles A, Gilibert J, Keeton M, Eguchi Y, Aznar J, Granca S, et al. Altered expression of plasminogen activator inhibitor type 1 in placentas from pregnant women with preeclampsia and/or intrauterine fetal growth retardation. *Blood* 1994 84: 143-50.
5. Abbate R, Sofi F, Gensini F, Fatini C, Sticchi E, Fedi S. Thrombophilias as risk factors for disorders of pregnancy and fetal damage. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32:318-21.
6. Follo M, Ginsburg D. Structure and expression of the human gene encoding plasminogen activator inhibitor, PAI-1. *Gene* 1989; 84(2):447-53.
7. Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1

- in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1993; 268(15):10739-45.
8. Goodman C, Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev RG. Which thrombophilic gene mutations are risk factors for recurrent pregnancy loss? *Am J Reprod Immunol* 2006; 56:230-236.
  9. Sartori MT, Wiman B, Vettore S, Dazzi F, Girolami A, Patrassi GM. 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene promoter and fibrinolytic capacity in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Haemost*. 1998; 80(6):956-60.
  10. Eriksson P, Kallin B, Van 't Hooft FM, Bavenholm P, Hamsten A. Allele specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(6): 1851-55.
  11. Ye S, Green FR, Scarabin PY, Nicaud V, Bara L, Dawson SJ, et al. The 4G/5G genetic polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene is associated with differences in plasma PAI-1 but not with risk of myocardial infarction in the ECTIM study. *Thromb Haemost* 1995; 74(3): 837-41.
  12. Rallidis LS, Gialeraki A, Merkouri E, Liakos G, Dages N, Sionis D, et al. Reduced carriership of 4G allele of plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in very young survivors of myocardial infarction. *J Thromb Thrombolysis* 2010; 29(4):497-502.
  13. Panahloo A, Mohamed-Ali V, Lane A, Green F, Humphries SE, Yudkin JS. Determinants of plasminogen activator inhibitor 1 activity in treated NIDDM and its relation to a polymorphism in the plasminogen activator inhibitor 1 gene. *Diabetes* 1995; 44(1): 37-42.
  14. Catto AJ, Carter AM, Strickland M, Bamford JM, Davies JA, Grant PJ. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphism and levels in subjects with cerebrovascular disease. *Thromb Haemost* 1997; 77(4): 730-4.
  15. Vettriselvi V, Vijayalakshmi K, Paul SF, Venkatachalam P. ACE and MTHFR gene polymorphisms in unexplained recurrent pregnancy loss. *J Obstet Gynaecol Res* 2008; 34(3):301-6.
  16. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3):1215.
  17. Reiner AP, Schwartz SM, Frank MB, Longstreth WT Jr, Hindorff LA, Teramura G, et al. Polymorphisms of coagulation factor XIII subunit A and risk of nonfatal hemorrhagic stroke in young white women. *Stroke* 2001; 32(11):2580-86.
  18. Stephenson MD. Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertil Steril* 1996; 66(1): 24-29.
  19. Preston FE, Rosendaal FR, Walker ID, Briët E, Berntorp E, Conard J, et al. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet* 1996; 348: 913-16.
  20. Buchholz T, Thaler CJ. Inherited thrombophilia: impact on human reproduction. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50(1):20-32.
  21. Hickey M, Fraser IS. Clinical implications of disturbances of uterine vascular morphology and function. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2000; 14(6):937-51.
  22. Goodman C, Hur J, Goodman CS, Jeyendran RS, Coulam C. Are polymorphisms in the ACE and PAI-1 genes associated with recurrent spontaneous miscarriages? *Am J Reprod Immunol* 2009; 62(6):365-70.
  23. Dossenbach-Glaninger A, van Trotsenburg M, Dossenbach M, Oberkanins C, Moritz A, Krugluger W, et al. Plasminogen activator inhibitor 1 4G/5G polymorphism and coagulation

- factor XIII Val34Leu polymorphism: impaired fibrinolysis and early pregnancy loss. *Clin Chem* 2003; 49(7):1081-86.
24. Wolf CE, Haubelt H, Pauer HU, Hinney B, Krome-Cesar C, Legler TJ, et al. Recurrent pregnancy loss and its relation to FV Leiden, FII G20210A and polymorphisms of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003; 33(3):134-37.
25. Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. Multiple thrombophilic gene mutations rather than specific gene mutations are risk factors for recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 2006; 55(5):360-68.
26. Barley J, Blackwood A, Carter ND, Crews DE, Cruickshank JK, Jeffery S, et al. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism: association with ethnic origin. *J Hypertens* 1994;12(8):955-57.