

حضور پلی مورفیسم های rs2227631 و rs1799889 ژن PAI-1 در سقط مکرر خودبه خودی در زنان ایرانی

سقط جنین به معنای پایان یافتن بارداری پیش از هفته بیستم است و اگر زنی بیش از دوبار سقط جنین پی در پی داشته باشد، دچار سقط مکرر است. حدود ۱۰ تا ۲۰ درصد بارداری ها به سقط جنین می انجامد. سقط مکرر به دو گروه اولیه و ثانویه تقسیم می شود (۱). سقط مکرر عارضه ای چند عاملی است که بسیاری از دلایل آن هنوز ناشناخته است. شایع ترین دلیل سقط غیر عمدی در طول سه ماهه اول بارداری، اختلالات کروموزومی است. بیماری های عروقی، دیابت، مشکلات هورمونی، عفونت، اختلالات رحمی و همچنین اختلالات ژنتیکی می توانند از دیگر عوامل موثر در سقط خود به خودی و غیر عمدی باشند (۲، ۳).

دستاوردهای مقاله های متعدد، بیانگر نقش اختلالات هماتولوژی به ویژه ناهنجاری های ترومبوفیلی در ۱۵ درصد از موارد سقط مکرر است. در این زمینه گزارش شده است که ترومبوفیلی ارثی که منجر به اختلالات انعقادی می شود، به ویژه در سه ماهه دوم و سوم بارداری می تواند باعث سقط جنین شود (۴، ۵).

شایع ترین اختلالات ارثی ترومبوفیلی جهش در ژن فاکتور ۵-لیدن، جهش در ژن پروترومبین و جهش در پروموتور ژن مهارکننده فعال کننده پلاسمینوژن نوع ۱ (PAI-1) هستند. از سایر ناهنجاری های ترومبوفیلی می توان به نقص پروتئین C، پروتئین C، آنتی ترومبین که باعث هایپرکواگولاسیون می شوند نیز اشاره کرد (۶-۸). از آنجایی که سلامت جنین، ارتباط مستقیم با گردش خون مادر دارد، به نظر می رسد که ایجاد هرگونه لخته نابجا (ترومبوز) در مویرگ های جفت می تواند با ایجاد

پیشینه و هدف: سقط های مکرر خودبخود به عنوان یک رویداد تکراری پذیر از دو بار سقط یا بیشتر در قبل از هفته ۲۰ تعریف می شود. در سقط مکرر به عنوان یک بیماری چند عاملی مسائل متعددی دخیل است. نقص ژنتیکی به عنوان یکی از عوامل عمده خطر برای سقط مطرح است. به نظر می رسد وجود پلی مورفیسم در ژن PAI-1 می تواند یکی از عوامل ژنتیکی دخیل در سقط مکرر باشد.

مواد و روش ها: در این بررسی ۱۰۰ زن با سابقه سقط مکرر خودبخود با علت نامشخص و ۱۰۰ زن بدون سابقه سقط مکرر، و دارای دست کم ۲ باروری موفق به عنوان گروه شاهد از میان مراجعه کنندگان به آزمایشگاه پاتوبیولوژی و ژنتیک مسعود انتخاب شدند. برای بررسی پلی مورفیسم های rs2227631 و rs1799889 در ژن PAI-1 از روش PCR-Sequencing استفاده شد و آنالیز آماری داده ها به کمک نرم افزار SPSS ورژن ۲۰ انجام گرفت. در تمام موارد، $P \leq 0.05$ به عنوان اختلاف معنی دار بین گروه های مورد بررسی در نظر گرفته شد. یافته ها: فراوانی الل موتانت G برای پلی مورفیسم rs2227631 در زنان دچار سقط مکرر ۸۶/۵ درصد و در زنان گروه شاهد ۵۲ درصد بود که نشان می دهد الل G در جمعیت بیمار نسبت به گروه شاهد فراوانی بالاتری داشته و می تواند با بروز بیماری در افراد با ژنوتیپ GG و AG ارتباط داشته باشد. ($P\text{-value} = 0.001$). همچنین در پلی مورفیسم rs1799889 فراوانی الل موتانت 4G در زنان دچار سقط مکرر ۵۲/۵ درصد و در زنان گروه شاهد ۱۰/۵ درصد بود که این اختلاف با $P\text{-value}$ کمتر از ۰/۰۵ از نظر بیماری معنادار بود.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش و مطالعات متفاوت در زمینه ارتباط سندروم سقط مکرر و پلی مورفیسم های مختلف در ژن PAI-1 به نظر می رسد، همراهی پلی مورفیسم rs1799889 و ژنوتیپ های 4G/5G و 4G/4G در زنان با یکدیگر به صورت هاپلوتاایپ و به ارث رسیدن همزمان الل ها می تواند شانس خطر بروز سقط را افزایش دهد.

اختلال در روند تبادلات مواد بین مادر و جنین سبب سقط شود. بنا به گزارشات متعدد جهش در ژن PAI-1 می تواند یکی از فاکتورهای مهم در بروز ترومبوفیلی باشد (۹). از آنجایی که محصول این ژن نقش مهمی در مهار واکنش های فیبرینولیز دارد، می تواند با مهار t-PA میزان تشکیل لخته در سیستم انعقادی را تنظیم کند. سطح PAI-1 پلاسمایی تحت تاثیر عوامل محیطی و ژنتیکی در افراد متفاوت است. تنوع ژنتیکی ناشی از پلی مورفیسم با اضافه یا حذف گوانوزین (4G/5G) در پروموتور ژن PAI-1 می تواند منجر به تغییر میزان سطح پلاسمایی این ژن شود (۱۰، ۱۱).

در این مطالعه سعی شده است به بررسی دو پلی مورفیسم rs2227631 و rs1799889 ژن PAI-1 و ارتباط آن ها با سقط مکرر خودبه خودی در زنان شهر تهران پرداخته شود.

مواد و روش ها

در این مطالعه مورد-شاهدی، ۱۰۰ زن با سابقه حداقل ۲ سقط خودبه خودی به عنوان گروه بیمار و ۱۰۰ زن دارای حداقل ۲ زایمان موفق به عنوان گروه شاهد مورد مطالعه قرار گرفتند. میانگین سن افراد ۱۸ تا ۴۰ سال در نظر گرفته شد. افراد با سابقه بیماری های عفونی، عوامل آنتومیکسی و ایمنولوژیکی موثر در سقط و یا هرگونه عامل ناشناخته که منجر به سقط در افراد بیمار شده بود، از مطالعه خارج شدند. همچنین از تمام افراد مورد مطالعه پس از دادن آگاهی، رضایت نامه دریافت شد.

در این پژوهش، نخست از همه افراد تحت بررسی ۵ میلی لیتر خون محیطی در لوله های حاوی EDTA جمع آوری شد. نمونه ها تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از DNA Extractione Kit DNP (سیناکلون-ایران) به روش ستونی انجام شد. پس از استخراج، به منظور بررسی کمیت و کیفیت DNA به دست آمده از اسپکتروفوتومتری (نانودراپ (Berthold)) و الکتروفورز ژل ۱٪ استفاده شد.

در مرحله بعد به کمک پرایمرهای طراحی شده توسط نرم افزار oligo7 و سپس blast به منظور تایید آن ها (که توالی آن ها در جدول ۱ آمده است)، واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) صورت گرفت. برای این منظور ۱۲٫۵ میکرولیتر مستر میکس PCR - 1.5 MgCl₂ (Ampliqon، دانمارک)، ۸٫۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۱۰ پیکومول) و ۲ میکرولیتر DNA مخلوط و در دستگاه ترموسایکلر قرار

داده شد. برنامه دمایی و زمانی PCR براساس دمای Tm پرایمرها طراحی شد. سپس به منظور واسرشت اولیه ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، و برای ۳۲ سیکل در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، دمای اتصال برای پرایمرهای rs2227631 و rs1799889 به ترتیب ۶۲ و ۶۳ درجه سانتی گراد و ۵ دقیقه به منظور طویل شدن در دستگاه ترموسایکلر گذاشته شد. محصول PCR جهت بررسی هتروزیگوت و هموزیگوت بودن در آزمایشگاه پاتوبیولوژی مسعود توالی یابی شد.

برای بررسی های آماری نتایج به دست آمده به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. توزیع ژنوتیپ های هر موتاسیون، فرکانس هموزیگوت و هتروزیگوت در دو گروه بیمار و شاهد با استفاده از مربع کای مورد سنجش قرار گرفت. سپس P-value و Odds Ratio برای هر دو پلی مورفیسم محاسبه گردید. همچنین P-value کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شده است.

جدول ۱- توالی پرایمر های به کار رفته در این تحقیق و طول محصول PCR		
نام پرایمر	توالی	طول قطعات
Forward	CACACCCTGCAAACCTGCCATGAATTGA	۳۷۳ جفت باز
Reverse	GGACTTTGGGCCCAACAGAGGACTCTTTGG	۳۷۳ جفت باز

یافته ها

در این پژوهش وابستگی میان پلی مورفیسم های rs2227631 و rs1799889 ژن PAI-1 و سقط مکرر خودبه خودی در ۱۰۰ خانم مبتلا به سقط مکرر و ۱۰۰ خانم که حداقل ۲ تولد موفق داشتند، در ایران به روش PCR و سپس توالی یابی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از فراوانی آللی و ژنوتیپی برای چند شکلی ژن PAI-1 برای دو پلی مورفیسم مورد مطالعه در جدول ۲ و ۳ آورده شده است. براساس نتایج به دست آمده فراوانی الل موتانت G برای پلی مورفیسم rs2227631 در زنان دچار سقط مکرر ۸۶/۵ درصد و در زنان گروه شاهد ۵۲ درصد بود که نشان می دهد الل G در جمعیت بیمار نسبت به گروه شاهد فراوانی بالاتری داشته و می تواند با بروز بیماری در افراد با ژنوتیپ GG و AG ارتباط داشته باشد. هرچند این ارتباط در خصوص این پلی مورفیسم و همراهی آن با بروز بیماری از نظر آماری معنا دار بود

بحث و نتیجه گیری

ژن PAI-1 به عنوان یک سرین-پروتئاز می تواند در مسیر آبخاری تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین نقش کلیدی ایفا کند. براساس مطالعات، در بارداری های موفق، به نظر می رسد محصول این ژن، بازسازی بافت مادر را در طی تهاجم تروفوبلاستی به عهده دارد. در شرایط طبیعی-PAI-1 با غلظت پایین در پلازما حضور دارد اما غلظت آن

در طی پیشرفت بیماری هایی نظیر انفارکتوس قلبی، بیماری های ترومبوتیک و ترومبوز وریدی افزایش می یابد. تنوع ژنتیکی ناشی از پلی مورفیسم در این ژن می تواند باعث تغییر سطح پلاسمایی آن شود. نتایج برخی از مطالعات نشان می دهد که افراد با ژنوتیپ 4G/4G نسبت به افرادی با ژنوتیپ 5G/5G تا حدود ۲۵ درصد سطح پلاسمایی بالاتری از محصول ژن PAI-1 را

(P-value=۰.۰۰۱). همچنین در پلی مورفیسم rs1799889 فراوانی الل موتانت 4G در زنان دچار سقط مکرر ۵۲/۵ درصد و در زنان گروه شاهد ۱۰/۵ درصد بود که این اختلاف با P-value کمتر از ۰/۰۵ از نظر بیماری معنادار بود. در این پلی مورفیسم وجود الل موتانت 4G در افرادی با ژنوتیپ هموزیگوت 4G/4G و هتروزیگوت 4G/5G می تواند با بروز بیماری ارتباط داشته باشد (P-value=۰.۰۰۱).

جدول ۲: تحلیل نتایج توزیع فراوانی دو پلی مورفیسم rs1799889 و rs2227631 در دو گروه مورد بررسی

	(%) (Case (N=100	(%) (Control (N=100	P value	(OR (95% CI
rs1799889 ۰,۰۰۰۱				
G/5G۵	۳۳ (۳۳۲,۰۰)	۸۴ (۸۴,۰۰)	۰,۰۰۱	۰,۰۸۶ (۰,۲۰۹-۰,۰۳۵)
G/5G۴	۲۹ (۲۹,۰۰)	۱۱ (۱۱,۰۰)	۰,۰۱۱	۳,۷۶۷ (۱,۰۳۱-۱,۳۷۶)
G/4G۴	۳۸ (۳۸,۰۰)	۵ (۵,۰۰)	۰,۰۰۱	۱۱,۵۰ (۴۱,۰۰۰-۳,۲۲۶)
^b (Carrier (4G/5G+4G/4G	۶۷ (۶۷,۰۰)	۱۶ (۱۶,۰۰)	۰,۰۰۱	۰,۰۸۶ (۰,۲۰۹-۰,۰۳۵)
Frequency of 4G allele	۵۲,۵۰	۱۰,۵۰	۰,۰۰۱	۹,۹۳۱ (۱۹,۸۸-۴,۹۶۰)
^c HWE chi-squared	۱۷,۵۱	۱۷,۲۰		
rs2227631 ۰,۰۰۰۱				
AA	۳۰ (۳۰,۰۰)	۴ (۴,۰۰)	۰,۰۰۱	۱۲,۴۱ (۵۵,۱۲-۲,۶۷۳)
AG	۳۶ (۳۶,۰۰)	۱۹ (۱۹,۰۰)	۰,۰۴۱	۲,۵۱۳ (۵,۸۰۴-۱,۰۸۸)
GG	۳۴ (۳۴,۰۰)	۷۷ (۷۷,۰۰)	۰,۰۰۱	۰,۱۴۵ (۰,۳۲۶-۰,۰۶۵)
^b (Carrier (AG+GG	۷۰ (۷۰,۰۰)	۹۶ (۹۶,۰۰)	۰,۰۰۱	۱۲,۴۱ (۵۵,۱۲-۲,۶۷۳)
Frequency of G allele	۵۲,۰۰	۸۶,۵۰	۰,۰۰۱	۰,۱۵۸ (۰,۳۰۱-۰,۰۸۳)
^c HWE chi-squared	۷,۷۷	۳,۴۷		

جدول ۳: تحلیل نتایج توزیع فراوانی دو پلی مورفیسم rs1799889 و rs2227631 در دو گروه مورد مطالعه

	(%) (Case (N=100	(%) (Control (N=100	P value	(OR (95% CI
rs1799889 ۰,۰۰۰۱				
G/5G۵	۳۳ (۳۳۲,۰۰)	۸۴ (۸۴,۰۰)	۰,۰۰۱	۰,۰۸۶ (۰,۲۰۹-۰,۰۳۵)
G/5G۴	۲۹ (۲۹,۰۰)	۱۱ (۱۱,۰۰)	۰,۰۱۱	۳,۷۶۷ (۱,۰۳۱-۱,۳۷۶)
G/4G۴	۳۸ (۳۸,۰۰)	۵ (۵,۰۰)	۰,۰۰۱	۱۱,۵۰ (۴۱,۰۰۰-۳,۲۲۶)
^b (Carrier (4G/5G+4G/4G	۶۷ (۶۷,۰۰)	۱۶ (۱۶,۰۰)	۰,۰۰۱	۰,۰۸۶ (۰,۲۰۹-۰,۰۳۵)
Frequency of 4G allele	۵۲,۵۰	۱۰,۵۰	۰,۰۰۱	۹,۹۳۱ (۱۹,۸۸-۴,۹۶۰)
^c HWE chi-squared	۱۷,۵۱	۱۷,۲۰		
rs2227631 ۰,۰۰۰۱				
AA	۳۰ (۳۰,۰۰)	۴ (۴,۰۰)	۰,۰۰۱	۱۲,۴۱ (۵۵,۱۲-۲,۶۷۳)
AG	۳۶ (۳۶,۰۰)	۱۹ (۱۹,۰۰)	۰,۰۴۱	۲,۵۱۳ (۵,۸۰۴-۱,۰۸۸)
GG	۳۴ (۳۴,۰۰)	۷۷ (۷۷,۰۰)	۰,۰۰۱	۰,۱۴۵ (۰,۳۲۶-۰,۰۶۵)
^b (Carrier (AG+GG	۷۰ (۷۰,۰۰)	۹۶ (۹۶,۰۰)	۰,۰۰۱	۱۲,۴۱ (۵۵,۱۲-۲,۶۷۳)
Frequency of G allele	۵۲,۰۰	۸۶,۵۰	۰,۰۰۱	۰,۱۵۸ (۰,۳۰۱-۰,۰۸۳)
^c HWE chi-squared	۷,۷۷	۳,۴۷		

دارا هستند. از آنجایی که ال 4G توانایی اتصال به پروتئین سرکوبگر رونویسی را ندارد، در افراد دارای ال 4G بیان بالاتری از ژن PAI-1 مشاهده می شود. براساس مقالات، هموزیگوتی برای ال 4G با بیماری های شریان کرونری، سکنه قلبی، سندروم حاد انسداد شرایین و سقط مکرر می تواند ارتباط مستقیمی داشته باشد (۱۲-۱۴).

در سال ۲۰۱۹ جوکسیک و همکارانش گزارش کردند در زنان مبتلا به سقط مکرر اولیه، غلظت PAI-1 بالا بوده که می تواند سقط مکرر را در طی پروتئولیز وابسته به پلاسمین ناقص در پی داشته باشد (۱۵). در سال ۲۰۱۶ نیز در مطالعه گوان و همکارانش در ۱۲۷ زن چینی مبتلا به سندروم سقط مکرر گزارش شد، فراوانی ژنوتیپ 4G/4G و ال 4G در زنان دچار سقط تقریباً ۲/۵ برابر بیشتر از گروه کنترل بوده است (۱۶). ورا و همکاران در هند نیز پس از بررسی ۸ زن با سابقه سقط با علت نامشخص در سال ۲۰۰۹ گزارش کردند که سه زن برای ال 4G هموزیگوت بودند. بررسی هیستومورفولوژی بافت جفت در این سه زن، وجود لخته در رگ و نکروز ناشی از وقفه در گردش خون به علت ایجاد لخته را در بافت پرزها نشان می دهد (۱۷).

در مطالعه حاضر نیز برای هر دو پلی مورفیسم rs2227631 و rs1799889 مشاهده شد فراوانی ال 4G نسبت به 5G بیشتر بوده است و ارتباط معناداری بین وجود ژنوتیپ 4G/4G و ریسک خطر ابتلا به سقط در افراد با پلی مورفیسم rs1799889 دیده شد ($P < 0.05$). این نتایج با نتایج گزارش شده در دو مطالعه قبلی که در جمعیت ایرانی انجام شده است مطابقت دارد. در سال ۲۰۰۷ قرائی و همکاران و در سال ۲۰۱۱ اعرابی و همکارانش نتیجه مشابه را گزارش کرده اند (۱۸). همچنین در سال ۲۰۱۱ Al Sallout و همکارانش گزارش کردند وجود پلی مورفیسم rs1799889 در جمعیت زنان نوار غزه می تواند با بروز سقط ارتباط داشته باشد (۱۹).

البته نتایج در این زمینه متناقض است. به عنوان مثال Wolf و همکارانش در سال ۲۰۱۳ در مطالعه ای تحت عنوان عوامل دخیل در هیپوفیبرینولیز را با سقط مکرر عنوان کردند ۵۱ درصد از زنان دچار سقط مکرر و ۴۹ درصد از زنان گروه کنترل برای موتاسیون 4G در ژن PAI-1 هتروزیگوت و ۳۵ درصد از زنان دچار سقط مکرر و ۳۱ درصد از زنان گروه کنترل برای این موتاسیون

هموزیگوت هستند. اما آنها از نظر آماری رابطه معناداری میان پلی مورفیسم 4G/5G در ژن PAI-1 و سقط مکرر گزارش نکردند (۲۰). این امر احتمالاً مربوط به تفاوت در جمعیت مورد مطالعه، زمینه های ژنتیکی، تعداد گروه مورد بررسی، رانش ژنی، مهاجرت جمعیت ها یا انتخاب طبیعی است. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش و مطالعات متفاوت در زمینه ارتباط سندروم سقط مکرر و پلی مورفیسم های مختلف در ژن PAI-1 به نظر می رسد، همراهی پلی مورفیسم rs1799889 و ژنوتیپ های 4G/5G و 4G/4G در زنان می تواند شانس خطر بروز سقط را افزایش دهد.

نتیجه گیری

یکی از فاکتورهای مطرح در ایجاد ترومبوفیلی در زنان مبتلا به سقط، ژنوتیپ 4G/4G و 4G/5G در rs1799889 و همچنین ژنوتیپ AG و در پلی مورفیسم rs2227631 در پروموتور ژن PAI-1 است. براساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر مشخص گردید بین وجود پلی مورفیسم 4G/4G و 4G/5G و سندروم سقط مکرر ارتباط معنادار وجود دارد. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش و مطالعات متفاوت در زمینه ارتباط سندروم سقط مکرر و پلی مورفیسم های مختلف در ژن PAI-1 به نظر می رسد، همراهی پلی مورفیسم rs1799889 و ژنوتیپ های 4G/5G و 4G/4G در زنان با یکدیگر به صورت هاپلوتایپ و به ارث رسیدن همزمان ال ها می تواند شانس خطر بروز سقط را افزایش دهد.

تشکر و قدردانی:

بدین وسیله از همه همکاران و کارکنان آزمایشگاه پاتوبیولوژی و ژنتیک مسعود که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع:

1. Giakoumelou S, Wheelhouse N, Cuschieri K, Entrican G, Howie SE, Horne AW. The role of infection in miscarriage. Human reproduction update. 2016;22(1):116-33.
2. Muntyan O, Bulavenko O. SPECIAL ASPECTS OF MISCARRIAGE IN WOMEN WITH RECURRENT MISCARRIAGE. Galician Medical Journal. 2018;25(1).

et al. The roles of PAI-1 gene polymorphisms in atherosclerotic diseases: a systematic review and meta-analysis involving 149,908 subjects. *Gene*. 2018;673:167-73.

13. Luo M, Ji Y, Luo Y, Li R, Fay W, Wu J. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates the vascular expression of vitronectin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2017;15(12):2451-60.

14. Kawarada Y, Inoue Y, Kawasaki F, Fukura K, Sato K, Tanaka T, et al. TGF- β induces p53/Smads complex formation in the PAI-1 promoter to activate transcription. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-13.

15. Joksic I, Mikovic Z, Filimonovic D, Munjas J, Orlic NK, Egic A, et al. Combined presence of coagulation factor XIII V34L and plasminogen activator inhibitor 1 4G/5G gene polymorphisms significantly contribute to recurrent pregnancy loss in serbian population. *Journal of Medical Biochemistry*. 2019;1(ahead-of-print).

16. Rai V. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and recurrent pregnancy loss risk in Asian population: a meta-analysis. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2016;31(4):402-13.

17. Vora S, Shetty S, Khare M, Ghosh K. Placental histomorphology in unexplained foetal loss with thrombophilia. *Indian Journal of Medical Research*. 2009;129(2):144-50.

18. Sadeghifard V, Ebrahimi A, Aghasadeghi MR, Sadat SM. The effects of 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene in Iranian patients with schizophrenia. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 2014;17(2):24-32.

19. Adler G, Mahmutbegovic E, Valjevac A, Adler MA, Mahmutbegovic N, Safranow K, et al. Association between-675 ID, 4G/5G PAI-1 gene polymorphism and pregnancy loss: A systematic review. *Acta Informatica Medica*. 2018;26(3):156.

20. Taghavi S. Validity and reliability of the general health questionnaire (GHQ-28) in college students of Shiraz University. *Journal of psychology*. 2002;5(4):381-98.

3. Mutiso SK, Murage A, Mwaniki AM. Factors associated with a positive depression screen after a miscarriage. *BMC psychiatry*. 2019;19(1):8.

4. Tur-Torres M, Garrido-Gimenez C, Alijotas-Reig J. Genetics of recurrent miscarriage and fetal loss. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2017;42:11-25.

5. Bigdeli R, Younesi MR, Panahnejad E, Asgary V, Heidarzadeh S, Mazaheri H, et al. Association between thrombophilia gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss risk in the Iranian population. *Systems biology in reproductive medicine*. 2018;64(4):274-82.

6. Turki RF, Assidi M, Banni HA, Zahed HA, Karim S, Schulten H-J, et al. Associations of recurrent miscarriages with chromosomal abnormalities, thrombophilia allelic polymorphisms and/or consanguinity in Saudi Arabia. *BMC medical genetics*. 2016;17(1):69.

7. Pritchard AM, Hendrix PW, Paidas MJ. Hereditary thrombophilia and recurrent pregnancy loss. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2016;59(3):487-97.

8. Ahangari N, Doosti M, Mousavifar N, Attaran M, Shahrokhzadeh S, Memarpour S, et al. Hereditary thrombophilia genetic variants in recurrent pregnancy loss. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2019;300(3):777-82.

9. Barut MU, Bozkurt M, Kahraman M, Yildirim E, Imirzalioglu N, Kubar A, et al. Thrombophilia and recurrent pregnancy loss: the enigma continues. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 2018;24:4288.

10. Jusić A, Balić D, Avdić A, Pođanin M, Balić A. The association of factor V G1961A (factor V Leiden), prothrombin G20210A, MTHFR C677T and PAI-1 4G/5G polymorphisms with recurrent pregnancy loss in Bosnian women. *Med Glas (Zenica)*. 2018;15(02):158-63.

11. Barlik M, Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Klejewski A, Kurzawińska G, Łowicki Z, et al. Correlation between factor VII and PAI-1 genetic variants and recurrent miscarriage. *Ginekologia Polska*. 2016;87(7):504-9.

12. Liu Y, Cheng J, Guo X, Mo J, Gao B, Zhou H,