**مقاله پژوهشی**
**مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان**
**دوره ۱۷، شهریور ۱۳۹۷، ۵۵۲-۵۳۹**

# ارتباط واریانت‌های نادر rs16972194 و rs56124946 ژن *TNFSF13B* با پره‌اکلامپسی: یک مطالعه مورد- شاهدی

**سارا بستانی[۱]، محبوبه نصیری[۲]**

**دریافت مقاله: ۹۶/۱۰/۴ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۷/۱/۲۸ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۷/۳/۲۱ پذیرش مقاله: ۹۷/۳/۲۷**

**چکیده**

**زمینه و هدف:** پره‌اکلامپسی یک سندرم اختصاصی بارداری و شایع‌ترین اختلال پرفشاری خون در حاملگی است. ناسازگاری‌های ایمونولوژیکی مادر- جنین، استرس اکسیداتیو، واریانت‌های ژنتیکی و اختلال سلول‌های اندوتلیال نقش مهمی در پاتوژنز پره‌اکلامپسی نقش دارند. ژن *TNFSF13B*، به‌عنوان عضوی از خانواده فاکتور نکروزکننده تومور (tumor necrosis factor; TNF)، از تنظیم کننده‌های عمده پاسخ ایمنی است. این مطالعه با هدف تعیین ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های نادر rs16972194 و rs56124946 ژن *TNFSF13B* و بروز بیماری پره‌اکلامپسی انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مورد-شاهدی، ۳۰۸ زن مبتلا به پره‌اکلامپسی و ۲۹۲ زن باردار سالم مراجعه کننده به کلینیک مرجع برای بیماری‌های زنان بیمارستان حضرت زینب (س) شیراز در فاصله زمانی بهمن ۱۳۹۴ تا شهریور ۱۳۹۵ انتخاب شدند و بررسی‌های مولکولی بر روی آنها صورت گرفت. تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم‌های rs56124946 و rs16972194 به ترتیب با تکنیک‌های ARMS PCR و T-ARMS PCR انجام گرفت. تحلیل داده‌ها با استفاده از رگرسیون لجستیک و آزمون مجذور کای انجام گرفت.

**یافته‌ها:** فراوانی ژنوتیپ‌های CC، CG و GG پلی‌مورفیسم rs56124946 در بیماران به ترتیب ۹۵/۲، ۳/۱ و ۱/۷ درصد و در افراد سالم به ترتیب ۹۷/۷، ۱/۳ و ۱ درصد بود. اختلاف آماری معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها و آلل‌های این جایگاه بین دو گروه کنترل و بیمار مشاهده نشد ($p>0/05$). درصد قابل توجهی از جمعیت کنترل (۹۹/۳ درصد) و بیمار (۹۹/۷ درصد) برای پلی‌مورفیسم rs16972194 ژنوتیپ GG نشان داد. تفاوت معنی‌داری بین فراوانی‌های ژنوتیپی در دو گروه بیمار و سالم مشاهده نشد ($p>0/05$).

**نتیجه‌گیری:** یافته‌ها نشان داد که احتمالاً واریانت‌های نادر ژن *TNFSF13B* با بیماری پره‌اکلامپسی مرتبط نمی‌باشند.

**واژه‌های کلیدی:** پره‌اکلامپسی، واریانت ژنتیکی، ژن *TNFSF13B*، ایران

۱- کارشناس ارشد ژنتیک مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان، ارسنجان، ایران
۲- (نویسنده مسئول) استادیار گروه آموزشی زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان، ارسنجان، ایران
تلفن: ۰۷۱-۴۳۵۲۳۹۰۷، دورنگار: ۰۷۱-۴۳۵۲۲۴۸۳، پست الکترونیکی: nasiri@iaua.ac.ir

## مقدمه

پره‌اکلامپسی نوعی اختلال پرفشاری خون مرتبط با حاملگی است که در ۸-۲ درصد بارداری‌ها بعد از هفته بیستم بارداری بروز می‌کند [۱]. اختلاف در میزان بروز بیماری در نژادها و قومیت‌های مختلف مؤید دخالت عوامل ژنتیکی در پاتوژنز بیماری می‌باشد [۲]. علاوه بر نقش ژنتیک، عوامل متعدد دیگری مانند عوامل محیطی، وضعیت اجتماعی-اقتصادی، فصل، چاقی، حاملگی چندقلویی و سن بالای ۳۵ سال مادر در هنگام بارداری نیز در بیماری‌زایی پره‌اکلامپسی درگیر هستند [۳]. با توجه به ماهیت پیچیده بیماری پره‌اکلامپسی هنوز علت دقیق بیماری در سطح ژنتیکی نامشخص است و تلاش‌ها در زمینه شناسایی ژن‌های مرتبط با بیماری در حال پیشرفت می‌باشد [۳].

کلونینگ مکانی جهت تعیین ژن یا جایگاه‌های کروموزومی مرتبط با بیماری پره‌اکلامپسی، بازوی بلند کروموزوم ۱۳ (13q) را مکان بسیار محتمل در پاتوژنز بیماری شناسایی کرده است. ژن *TNFSF13B* در موقعیت 13q32-34 کاندید بسیار قوی برای بیماری می‌باشد [۵-۴]. ژن *TNFSF13B* عضوی از خانواده بزرگ فاکتور نکروز کننده تومور (Tumor necrosis factor; TNF) است. پروتئین حاصل از بیان این ژن اولین بار به‌عنوان محرک مهم تکثیر سلول‌های B و تولید ایمونوگلوبین کشف گردید. بعداً نقش‌های زیادی برای TNFSF13B در سیستم ایمنی ذاتی پیدا شد، به‌طوری‌که هر دو گروه بیماری‌های خودایمنی و بدخیمی‌های سلول B با این پروتئین مرتبط هستند [۸-۶]. علاوه بر این، TNFSF13B در تکوین طبیعی جفت نیز نقش دارد، به‌طوری‌که در بیماران مبتلا به سقط جنین مکرر بیان آن کاهش می‌یابد [۱۱-۹]. TNF از جمله سیتوکین‌های پیش‌التهابی است که در تحریک سلول‌های اندوتلیال و نیز تولید گونه‌های فعال اکسیژن مؤثر است [۱۲]. سطوح پلاسمایی TNF در زنان مبتلا به پره‌اکلامپسی بیشتر از افراد شاهد گزارش شده است [۱۲]. در مطالعات پیوستگی ژنومی وسیع (genome wide association analysis; GWAS) ارتباط معنی‌داری بین تعدادی از واریانت‌های نوکلئوتیدی ژن *TNFSF13B* از جمله پلی‌مورفیسم‌های rs16972194:A>G و rs56124946:C>G با بروز پره‌اکلامپسی مشاهده شده است. پلی‌مورفیسم rs16972194 حدود ۲ کیلوباز بالادست ناحیه شروع ترجمه ژن قرار گرفته است و حضور آلل‌های مختلف این جایگاه روی اتصال فاکتور هسته‌ای oct-1 به DNA بالادست ناحیه کدگذاری ژن اثر می‌گذارد، بنابراین تصور می‌شود این پلی‌مورفیسم از نوع عملکردی باشد [۱۳]. پلی‌مورفیسم rs56124946 در اینترون ۱ ژن قرار گرفته است و ارتباط قابل توجهی بین آلل مینور G در این جایگاه و بروز بیماری مشاهده شده است [۶].

با توجه به نتایج مطالعات پیشین در اهمیت ناحیه کروموزومی 13q و ارتباط واریانت‌های نوکلئوتیدی ژن *TNFSF13B* در پاتوژنز بیماری پره‌اکلامپسی [۵-۴]، در این مطالعه برای اولین بار در ایران به بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های rs16972194 و rs56124946 با بروز بیماری در گروهی از زنان مبتلا به پره‌اکلامپسی مراجعه کننده به کلینیک مرجع برای بیماری‌های زنان بیمارستان حضرت زینب (س) شیراز در سال ۹۵-۱۳۹۴پرداخته شد.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورد-شاهدی ۳۰۸ خانم مبتلا به بیماری پره‌اکلامپسی که دارای فشارخون بالاتر/مساوی

۱۴۰/۹۰ میلی‌متر جیوه همراه با پروتئینوری بیشتر/مساوی ۰/۳ گرم در ادرار ۲۴ ساعته بودند [۵]، از بین مراجعین به بیمارستان حضرت زینب (س) شیراز، کلینیک مرجع برای بیماری‌های زنان، برای بررسی‌های مولکولی بیشتر در فاصله زمانی بهمن ۱۳۹۴ تا شهریور ۱۳۹۵ انتخاب شدند. به منظور انتخاب زنان گروه مورد، ابتدا تمام مراجعین تشخیص داده شده با بیماری پره-اکلامپسی به‌عنوان کاندید شرکت در مطالعه انتخاب شدند و پس از بررسی سوابق بالینی، زنانی که سابقه هرگونه بیماری کبدی، کلیوی و قلبی، هیپرکلسترولمی و پرفشاری خون مزمن داشتند از مطالعه خارج شدند. زنان گروه شاهد (۲۹۲ زن) از بین زنان باردار سالمی که برای انجام معاینات روتین به آن بیمارستان مراجعه کرده بودند و از نظر سن، محل زندگی و سابقه بالینی بیماری‌های هدف با گروه بیمار هم‌سان بودند، انتخاب شدند.

تمام افراد (مورد و شاهد) فرم رضایت آگاهانه مشارکت در طرح تحقیقاتی را تکمیل نمودند. کلیه مراحل پژوهش به تصویب شورای پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان رسید. براساس مروری بر مطالعات پیشین یک چک لیست جامع در ارتباط با عوامل احتمالی مرتبط با بیماری تهیه و هنگام نمونه‌گیری توسط فرد آگاه تکمیل گردید. عوامل مرتبط با حاملگی شامل زمان زایمان، وزن هنگام تولد، پاریتی، گراوید، نوع حاملگی و نوع زایمان و هم‌چنین اطلاعات مرتبط با مادر مانند سن، سابقه پره‌اکلامپسی در بارداری‌های قبلی، عفونت مجاری ادراری و سابقه خانوادگی برای پره‌اکلامپسی به‌طور دقیق برای تمام افراد شرکت کننده ثبت گردید.

از هر فرد ۵ سی‌سی نمونه خون محیطی توسط پرستار بخش زنان گرفته شد و نمونه‌ها در لوله‌های استریل حاوی ماده ضد انعقاد Na-EDTA در شرایط سرد به آزمایشگاه ژنتیک انتقال داده شدند و تا زمان انجام آزمایشات در فریز (شرکت آزمایش، ساخت ایران) ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. استخراج DNA از نمونه‌های خون تام طبق پروتکل پیشنهادی کیت استخراج DNA شرکت یکتا تجهیز آزما (YT9040، ایران) انجام گرفت. برای تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم rs56124946 از روش ARMS PCR و برای پلی‌مورفیسم rs16972194 از روش T-ARMS PCR استفاده شد. هر دو روش مبتنی بر تکثیر اختصاصی آلل با روش PCR هستند که از حساسیت و دقت بالایی در تمایز انواع مختلف آلل‌های یک جایگاه برخوردار می‌باشند [۱۴].

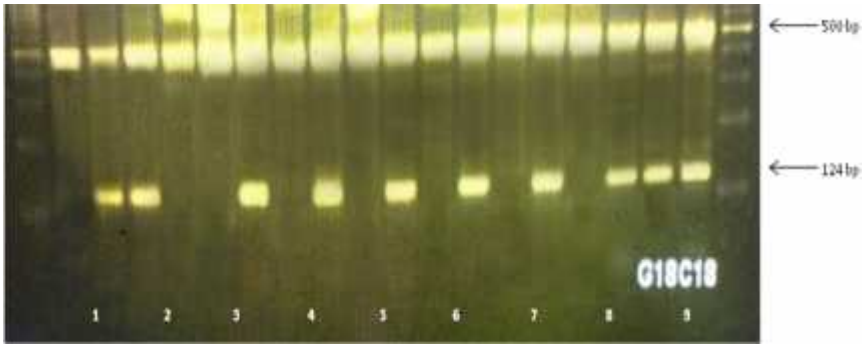
در روش ARMS PCR تعیین ژنوتیپ هر نمونه با انجام دو واکنش PCR صورت می‌گیرد که در هر میکروتیوب پرایمر اختصاصی یک آلل (F[C]، F[G])، یک جفت پرایمر خارجی غیراختصاصی آلل (FO و RO) اضافه می‌شود. براساس این‌که محصول PCR در کدام میکروتیوب تولید شود، نوع ژنوتیپ هموزیگوت و هتروزیگوت تعیین می‌شود.

در T-ARMS PCR به‌طور هم‌زمان ۴ پرایمر شامل دو پرایمر اختصاصی آلل (FI و RI) و دو پرایمر غیراختصاصی خارجی (FO و RO) در یک میکروتیوب ریخته می‌شود. اختلاف اندازه محصولات حاصل در تعیین نوع ژنوتیپ تعیین کننده است. پرایمرهای اختصاصی برای هر روش با نرم‌افزار آنلاین primer 1 (http://primer1.soton.ac.uk) طراحی و پس از بلاست کردن و تأیید اختصاصیت آن‌ها در تکثیر ناحیه هدف، مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱).

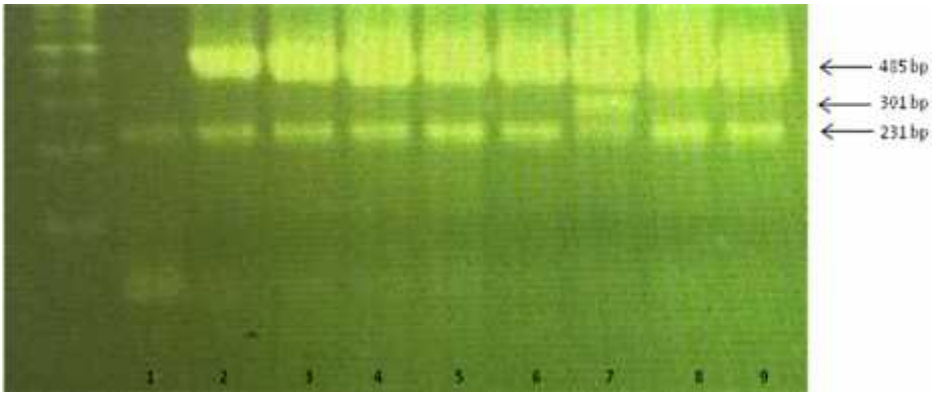
***جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر پلی‌مورفیسم‌های rs16972194 و rs56124946 در زنان جنوب ایران***

| نام پرایمر | توالی پرایمر (۵ به ۳) |
|---|---|
| **rs56124946-FO** | GCCCCAACCTTCAAAGTTCAAGTA |
| **rs56124946-RO** | CGCTTATTTCTGCTGTTCTGACTG |
| **rs56124946-FI(C)** | CTACACTGCTGCCTCTCCGTC |
| **rs56124946-FI(G)** | CTACACTGCTGCCTCTCCGTG |
| **rs16972194-FO** | ACCACCTATTCCCCAAACAC |
| **rs16972194-RO** | AGGACTGTTGCATTCATTATA |
| **rs16972194-FI** | GTAAACTTCTTACTTAAGACTTTG |
| **rs16972194-RI** | TTCTGTCTCACTCTACATTTCAAT |

واکنش PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر برای تکثیر هر دو پلی‌مورفیسم با استفاده از مسترمیکس آماده شرکت یکتا تجهیز آزما انجام گرفت. شرایط انجام واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر T100™ (شرکت Bio Rad، ساخت آمریکا) شامل دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ سیکل (دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (rs16972194) و دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد (rs56124946) به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه) و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد (rs56124946) و ۳ درصد (rs16972194) بارگذاری شدند و پس از رنگ‌آمیزی با رنگ ایمن DNA safe stain در دستگاه ترانس‌لومیناتور (UVITEC, UK) با نور UV مشاهده و آنالیز شدند. تصویر ژل الکتروفورز تکثیر دو پلی‌مورفیسم انتخاب شده در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است.




***شکل ۱- تصویر الکتروفورز پلی‌مورفیسم rs56124946C/G با روش ARMS PCR روی ژل آگارز ۲٪. چاهک اول از هر واکنش مربوط به آلل G (باند ۱۲۴ جفت بازی) و چاهک دوم مربوط به آلل C (باند ۱۲۴ جفت بازی) می‌باشد. نمونه‌های ۱، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ ژنوتیپ CC دارند. نمونه ۲ ژنوتیپ GG و نمونه ۹ ژنوتیپ CG دارد. چاهک اول و آخر مربوط به سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی می‌باشد. باند ۵۳۱ جفت بازی به‌عنوان کنترل داخلی می‌باشد.***




***شکل ۲- تصویر الکتروفورز نتایج حاصل از تکثیر پلی‌مورفیسم rs16972194 A/G روی ژل آگارز ۳٪***
***نمونه‌های ۱-۶، ۸ و ۹ دارای ژنوتیپ GG (طول باند: ۴۸۵ و ۲۳۱ جفت بازی) می‌باشند و نمونه ۷ دارای ژنوتیپ هتروزیگوت AG (طول باند: ۴۸۵، ۲۳۱ و ۳۰۱ جفت بازی) است. از سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی در چاهک اول استفاده شده است.***

آنالیز آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با آزمون t مستقل انجام شد. صفات کیفی با آزمون مجذور کای بین دو گروه مقایسه شدند. تأثیر ژنوتیپی، آللی و عوامل خطر احتمالی بر روی استعداد بروز بیماری با استفاده از نسبت شانس (Odds ratio; OR) و فاصله اطمینان ۹۵ درصد در مدل رگرسیون لجستیک ارزیابی شد. مقایسه مقادیر مورد انتظار و مشاهده شده ژنوتیپ‌ها در هر دو گروه کنترل و بیمار با آزمون مجذور کای مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## نتایج

در مطالعه حاضر ۳۰۸ خانم بیمار مبتلا به پره‌اکلامپسی با میانگین و انحراف معیار سن ۲۹/۳۷±۵/۱۶ سال با ۲۹۲ خانم باردار سالم با میانگین و انحراف معیار سن ۲۸/۹۴±۵/۸۰ سال (p = ۰/۳۳۹) مورد بررسی قرار گرفتند. خصوصیات جمعیتی زنان بررسی شده در جدول ۲ آورده شده است.

***جدول ۲- خصوصیات دموگرافیک زنان سالم و بیمار مبتلا به پره‌اکلامپسی***

| خصوصیات | کنترل (n=۲۹۲) | بیمار (n=۳۰۸) | مقدار p |
|---|---|---|---|
| | میانگین±انحراف معیار | میانگین±انحراف معیار | |
| میانگین سن (سال) | ۲۸/۹۴ ± ۵/۸۰ | ۲۹/۳۷ ± ۵/۱۶ | ۰/۳۳۹ |
| دامنه سنی (سال) | ۱۷-۴۵ | ۱۵-۴۲ | - |
| سن شروع قاعدگی (سال) | ۱۳/۱۳ ± ۱/۶۷ | ۱۳/۳۱ ± ۱/۷۱ | ۰/۱۷۴ |
| شاخص توده بدنی (کیلوگرم/مترمربع) | ۲۶/۱۹ ± ۳/۶۰ | ۲۵/۸۳ ± ۳/۴۷ | ۰/۲۱۴ |
| فشارخون سیتولی (میلی‌متر جیوه) | ۱۰۹/۳۷ ± ۱۱/۰۷ | ۱۵۱/۸۴ ± ۱۰/۷۸ | <۰/۰۰۱ |
| فشارخون دیاستولی (میلی‌متر جیوه) | ۶۴/۸۵ ± ۹/۰۲ | ۹۴/۹۵ ± ۶/۸۸ | <۰/۰۰۱ |

****آزمون t مستقل، p<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار***

اختلاف معنی‌داری در شاخص توده بدنی و سن شروع قاعدگی بین دو گروه مشاهده نشد (p>۰/۰۵). زمان زایمان در زنان مبتلا به پره‌اکلامپسی زودتر از زنان با حاملگی طبیعی بود (p<۰/۰۰۱). وزن جنین‌های متولد شده در حاملگی‌های پره‌اکلامپسی به‌طور قابل توجهی کمتر از وزن جنین در حاملگی‌های طبیعی بود (p=۰/۰۰۸). نوع زایمان در گروه زنان مبتلا عمدتاً از نوع سزارین بود و اختلاف معنی‌داری با نوع زایمان در زنان سالم نشان داد (p=۰/۰۰۱). اختلاف آماری معنی‌داری از نظر تعداد زایمان (پاریتی) و تعداد حاملگی یا گراوید (اعم از حاملگی‌های منجر به تولد زنده و یا مرگ جنینی) و نوع حاملگی (تک قلویی/چند قلویی) بین دو جمعیت زنان سالم و بیمار مشاهده نشد (p>۰/۰۵). نتایج آنالیز آماری در جدول ۳ آورده شده است.

***جدول ۳- خصوصیات مرتبط با حاملگی در زنان سالم و مبتلا به پره‌اکلامپسی در جنوب ایران***

| ویژگی‌ها | کنترل (n=۲۹۲) | بیمار (n=۳۰۸) | مقدار p |
|---|---|---|---|
| | انحراف معیار ± میانگین | انحراف معیار ± میانگین | |
| زمان زایمان (هفته) | ۳۷/۷۳ ± ۲/۸۲ | ۳۶/۹۲ ± ۲/۹۲ | <۰/۰۰۱* |
| وزن هنگام تولد (گرم) | ۲۸۲۴/۷۹ ± ۵۳۱/۵۲ | ۲۷۰۴/۶۸ ± ۵۷۴/۱۸ | ۰/۰۰۸ |
| | (درصد) تعداد | (درصد) تعداد | |
| **نوع حاملگی** | | | ۰/۸۲۶** |
| **تک قلویی** | ۲۸۱ (۹۶/۲) | ۲۹۸ (۹۶/۸) | |
| **چند قلویی** | ۱۱ (۴/۸) | ۱۰ (۳/۲) | |
| **نوع زایمان** | | | ۰/۰۰۱ |
| **طبیعی** | ۲۱۰ (۷۱/۹) | ۱۸۱ (۵۸/۸) | |
| **سزارین** | ۸۲ (۲۸/۱) | ۱۲۷ (۴۱/۲) | |
| **پاریتی** | | | ۰/۸۰۲ |
| **نولی‌پار** | ۱۱۲ (۳۸/۴) | ۱۲۲ (۳۹/۶) | |
| **مالتی‌پار** | ۱۸۰ (۶۱/۶) | ۱۸۶ (۶۰/۴) | |
| **گراوید** | | | ۰/۹۳۱ |
| **پریمی‌گراوید** | ۹۴ (۳۲/۲) | ۱۰۱ (۳۲/۸) | |
| **مالتی‌گراوید** | ۱۹۸ (۶۷/۸) | ۲۰۷ (۶۷/۲) | |

**** آزمون t مستقل، ** آزمون مجذور کای، p ≤ ۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار***

براساس نتایج حاصل از بررسی ارتباط عوامل خطر متعدد و خطر بروز پره‌اکلامپسی، سابقه خانوادگی بیماری در خویشاوندان درجه اول (مادر و/یا خواهر)، دیابت مادری و سابقه پره‌اکلامپسی در بارداری های قبلی به عنوان عامل خطر برای بیماری شناخته شدند (جدول ۴).

***جدول ۴- ارتباط عوامل خطر احتمالی با خطر بروز بیماری پره‌اکلامپسی در زنان جنوب ایران***

| عامل خطر | کنترل (تعداد = ۲۹۲) (درصد) تعداد | بیمار (تعداد = ۳۰۸) (درصد) تعداد | مقدار p | OR (95%CI) * |
|---|---|---|---|---|
| **سن مادر (سال)** | | | | |
| **۱۵-۲۰** | ۲۸ (۹/۶) | ۲۳ (۷/۵) | - | Reference |
| **۲۱-۳۰** | ۱۴۹ (۵۱) | ۱۷۱ (۵۵/۵) | ۰/۲۷۰ | ۱/۳۹ (۰/۷۷-۲/۵۳) |
| **۳۱+** | ۱۱۵ (۳۹/۴) | ۱۱۴ (۳۷) | ۰/۵۴۵ | ۱/۲۱ (۰/۶۶-۲/۲۲) |
| **شاخص توده بدنی (کیلوگرم/مترمربع)** | | | | |
| **طبیعی (۲۴/۹- ۱۸)** | ۱۰۰ (۳۴/۲) | ۱۱۹ (۳۸/۷) | - | Reference |
| **اضافه وزن (۲۹/۹- ۲۵)** | ۱۴۷ (۵۰/۳) | ۱۵۰ (۴۸/۷) | ۰/۳۸۹ | ۰/۸۶ (۰/۶۰-۱/۲۲) |
| **چاق (≥۳۰)** | ۴۵ (۱۵/۴) | ۳۹ (۱۲/۷) | ۰/۲۱۸ | ۰/۷۳ (۰/۴۴-۱/۲۱) |
| **سابقه خانوادگی** | | | | |
| **ندارند** | ۲۸۳ (۶۹/۹) | ۲۸۱ (۹۱/۲) | - | Reference |
| **دارند** | ۹ (۳/۱) | ۲۷ (۸/۸) | ۰/۰۰۵ | ۳/۰۲ (۱/۳۹-۶/۵۴) |
| **دیابت مادر** | | | | |
| **ندارد** | ۲۵۹ (۸۸/۷) | ۲۵۴ (۸۲/۵) | - | Reference |
| **دارد** | ۳۳ (۱۷/۵) | ۵۴ (۱۷/۵) | ۰/۰۳۱ | ۱/۶۷ (۱/۰۵-۲/۶۶) |
| **سابقه قبلی پره‌اکلامپسی** | | | | |
| **ندارد** | ۲۸۷ (۹۸/۳) | ۲۹۲ (۹۴/۸) | - | Reference |
| **دارد** | ۵ (۱/۷) | ۱۶ (۵/۲) | ۰/۰۲۷ | ۳/۱۴ (۱/۱۴-۸/۶۹) |
| **عفونت مجاری ادراری** | | | | |
| **ندارد** | ۲۲۶ (۷۷/۴) | ۲۵۶ (۸۳/۱) | - | Reference |
| **دارد** | ۶۶ (۲۲/۶) | ۵۲ (۱۶/۹) | ۰/۰۷۹ | ۰/۶۹ (۰/۴۶-۱/۰۴) |

**** رگرسیون لجستیک، OR (Odds ratio): نسبت شانس، CI (Confidence interval): فاصله اطمینان، p<۰/۰۵: ارتباط معنی‌دار***

مقادیر ژنوتیپی مشاهده شده در جمعیت کنترل ($\chi^2$ =۰/۰۰۳, df =۱, p = ۰/۹۵۳) برای پلی‌مورفیسم rs16972194 با مقادیر مورد انتظار در تعادل Hardy-Weinberg اختلاف معنی‌داری نشان نداد. در هر دو جمعیت سالم و بیمار برای پلی مورفیسم rs16972194، ژنوتیپ AA اصلاً مشاهده نشد. درصد قابل توجهی از جمعیت کنترل (۹۹/۳ درصد) و جمعیت بیمار (۹۹/۷ درصد) ژنوتیپ GG داشتند. ارتباط معنی‌داری بین این پلی‌مورفیسم و خطر بروز پره‌اکلامپسی مشاهده نشد (p =۰/۵۴۱). فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی در جدول ۵ آورده شده است. به‌منظور بررسی ارتباط بین ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs56124946 با بیماری پره‌اکلامپسی، ژنوتیپ CC به‌عنوان مرجع در نظر گرفته شد و ارتباط سایر ژنوتیپ‌ها با بروز بیماری، نسبت به آن سنجیده شد. فراوانی‌های ژنوتیپی در دو گروه بیمار و کنترل بسیار شبیه به هم بودند و در هیچ‌کدام از روابط آللی (هم‌بارز، غالب برای آلل C و مغلوب برای آلل C) ارتباط معنی‌داری با استعداد بروز بیماری مشاهده نشد (p > ۰/۰۵). آلل‌های این جایگاه نیز ارتباط آماری معنی‌داری با بروز بیماری نشان ندادند (p > ۰/۰۵) (جدول ۵).

***جدول ۵- ارتباط پلی‌مورفیسم‌های rs56124946 و rs16972194 با بروز پره اکلامپسی در زنان جنوب ایران***

| ژنوتیپ/ آلل | کنترل (تعداد = ۲۹۲) (درصد) تعداد | بیمار (تعداد = ۳۰۸) (درصد) تعداد | مقدار p | (95%CI) OR* |
|---|---|---|---|---|
| **rs56124946** | | | | |
| **CC** | ۲۷۸ (۹۵/۲) | ۳۰۱ (۹۷/۷) | - | Reference |
| **CG** | ۹ (۳/۱) | ۴ (۱/۳) | ۰/۱۴۲ | ۰/۴۱ (۰/۱۳-۱/۳۵) |
| **GG** | ۵ (۱/۷) | ۳ (۱) | ۰/۴۲۲ | ۰/۵۵ (۰/۱۴-۲/۳۴) |
| **CC+CG** | ۲۸۷ (۹۸/۳) | ۳۰۵ (۹۹) | ۰/۴۳۷ | ۱/۷۷ (۰/۴۲-۷/۴۸) |
| **GG+CG** | ۱۴ (۴/۸) | ۷ (۲/۳) | ۰/۱۰۰ | ۰/۴۶ (۰/۱۸-۱/۱۶) |
| **C** | ۵۶۵ (۰/۹۷) | ۶۰۶ (۰/۹۸) | - | Reference |
| **G** | ۱۹ (۰/۰۳) | ۱۰ (۰/۰۲) | ۰/۰۷۲ | ۰/۴۹ (۰/۲۳-۱/۰۶) |
| **rs16972194** | | | | |
| **GG** | ۲۹۰ (۹۹/۳) | ۳۰۷ (۹۹/۷) | - | Reference |
| **AG** | ۲ (۰/۷) | ۱ (۰/۳) | ۰/۵۴۱ | ۰/۴۷ (۰/۰۴-۵/۲۳) |
| **G** | ۵۸۲ (۰/۹۹) | ۶۱۵ (۰/۹۹) | - | Reference |
| **A** | ۲ (۰/۰۱) | ۱ (۰/۰۱) | ۰/۵۴۲ | ۰/۴۷ (۰/۰۴-۵/۲۳) |

**** رگرسیون لجستیک، OR (Odds ratio): نسبت شانس، CI (Confidence interval): فاصله اطمینان، p<۰/۰۵ ارتباط معنی‌دار***

## بحث

پره‌اکلامپسی یک اختلال پیچیده ژنتیکی است و به بیماری فرضیه‌ها معروف است، زیرا با وجود مطالعات وسیعی که در مورد پاتوژنز این بیماری انجام گرفته است علت آن هنوز به‌درستی مشخص نشده است [۱۵]. علی-رغم نامشخص بودن علت بیماری، براساس نتایج مطالعات می‌توان گفت اختلالات جفتی نظیر محدودیت رشد درون رحمی، نتیجه دخالت عوامل ایمونولوژیک و مشکلات مادری نتیجه تغییرات ژنتیکی می‌باشند [۱۶].

مطالعات GWAS به‌صورت کوهورت روی شجره‌های استرالیایی/ نیوزلندی منجر به شناسایی یک لوکوس مستعد کننده برای پره‌اکلامپسی روی بازوی بلند کروموزوم ۲ (2q) گردید. مطالعات بیشتر در این خانواده‌ها منجر به شناسایی جایگاه‌های مستعد کننده برای پره‌اکلامپسی روی 5q و 13q شد [۶]. مطالعه مشابه اما مستقلی در خانواده‌های نروژی انجام گرفت که منجر به شناسایی ژن‌های گیرنده *Activin A* تیپ IIA و آمینوپپتیداز اندوپلاسمی ۲ (*ERAP2*) به ترتیب در موقعیت 2q22 و 5q در ارتباط با بیماری پره‌اکلامسپی شد. در این مطالعه ارتباطی بین بازوی بلند کروموزوم ۱۳ (13q) و پره‌اکلامپسی مشاهده نشد [۱۱، ۱۸-۱۷]. مطالعه پلی‌مورفیسم‌های شناسایی شده در خانواده‌های استرالیایی/نیوزلندی به شناسایی ژن tumor necrosis factor (ligand) superfamily 13B (*TNFSF13B*) به-

عنوان ژن کاندید قدرتمند در موقعیت کروموزومی 13q منجر شد [۱۱]. در مطالعه وسیع‌تری با تعیین توالی نواحی پروموتری، اینترونی و اگزونی و توالی‌های ترجمه نشونده سر ۵ و ۳ ژن *TNFSF13B* و انجام مطالعات پیوستگی، ارتباط معنی‌داری بین سه پلی‌مورفیسم نادر ژن *TNFSF13B* شامل rs16972194، rs16972197 و rs56124946 و پره‌اکلامپسی مشاهده شد [۶]. این نتایج نشان می‌دهند که احتمالاً *TNFSF13B* در سازگاری ایمونولوژیکی طبیعی در ضمن بارداری مشارکت دارد و حضور این سه پلی‌مورفیسم در جفت‌زایی غیرطبیعی در برخی جمعیت‌ها دخالت دارند [۱۵].

تغییرات اولیه بارداری شامل جابه‌جایی تعادل سیتوکینی سلول‌های T کمکی Th-1/Th-2 به سمت سیتوکین‌های Th-2 می‌باشد. فرآیندهای التهابی/عفونی این تعادل را به سمت Th-1 جابه‌جا می‌کنند که این تغییر با موفقیت بارداری سازگار نمی‌باشد [۱۹]. ژن *TNFSF13B* توسط سیتوکین‌های پاسخ التهابی تحریک می‌شود و ماکروفاژها را تحریک به ترشح سیتوکین‌های التهابی می‌نماید [۲۱-۲۰]. بنابراین، هرگونه تداخل با تنظیم هموستازی TNFSF13B می‌تواند تعادل سیتوکینی تنظیم شده در بارداری را تخریب نماید. سلول‌های استرومای دسیدوا در فعالیت‌هایی که برای ارتباط ایمونولوژیکی بین مادر و جنین لازم هستند، مشارکت دارند. مطالعات بررسی بیان ژن، حضور mRNA و محصول پروتئینی ژن *TNFSF13B* در سلول‌های استرومای دسیدوا تأیید می‌کنند [۲۳-۲۲].

به‌نظر می‌رسد ارتباط بین سلول‌های کشنده دسیدوا و سلول‌های allogenic extracillous trophoblast (EVT) در تهاجم عمقی سلول‌های EVT در طی لانه‌گزینی و تشکیل جفت مشارکت دارند [۲۴]. سلول‌های کشنده طبیعی (NK cells) لوکوسیت‌های غالب در دسیدوا هستند و فعالیت سلول NK توسط TNFSF13B در موش افزایش می‌یابد [۲۵]. در انسان TNFSF13B پاسخ ایمونولوژیکی به اتصال گیرنده‌های شبه Toll (toll-like receptor; TLR) بروز می‌دهد [۲۶]. TLRها در سلول‌های NK جفت بیان می‌شوند و کمک به تشخیص آنتی‌ژن‌های خودی از بیگانه و عوامل عفونی می‌کنند [۲۷]. این فعالیت‌های بیولوژیکی در پاتوژنز پره‌اکلامپسی دخالت دارند و TLRها نیز در مشکلات مرتبط با حاملگی مانند محدودیت رشد داخل رحمی، زایمان زودرس و پره‌اکلامپسی دخالت دارند [۲۹-۲۸]. با توجه به نقش‌های اشاره شده به‌نظر می‌رسد که تخریب یا تغییر الگوی بیان ژن *TNFSF13B* از طریق تخریب مسیر سیگنالینگ TLR در مسیر بیماری‌زایی پره‌اکلامپسی نقش داشته باشد.

در مطالعه حاضر، پلی‌مورفیسم‌های rs16972194 و rs56124946 ژن *TNFSF13B* در ارتباط با بیماری پره‌اکلامپسی بررسی شدند. یافته‌ها ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های این جایگاه‌های پلی‌مورف و استعداد بروز بیماری نشان نداد. پلی‌مورفیسم rs16972194 در پروموتر ژن *TNFSF13B* قرار دارد و حاصل تغییر نوکلئوتیدی G به A است. آلل مینور A یک توالی پروموتری بسیار شبیه به موتیف اتصال فاکتور رونویسی Oct1 ایجاد می‌کند. Oct1 عضوی از خانواده فاکتور رونویسی دومین POU است [۱۳] و توالی شناسایی DNA آنها یک موتیف ۸ مری به‌صورت '5-ATGCAAT-3' است که بین اعضای خانواده فاکتور رونویسی Oct/Pou مشترک است [۳۰]. اتصال متمایز فاکتور رونویسی به آلل مینور این پلی‌مورفیسم پشنهاد کننده نقش عملکردی این واریانت

می‌باشد، علی‌رغم این‌که یک واریانت نادر است. براساس گزارش اخیر مشخص شده است که پلی‌مورفیسم‌هایی که نظم الگوی اتصال فاکتورهای رونویسی را تغییر می‌دهند، احتمالاً دارای مکانیسم تکاملی مهمی هستند [۳۱].

علی‌رغم مشخص شدن نقش عملکردی این پلی‌مورفیسم، مطالعه‌ای در ارتباط با نقش این پلی‌مورفیسم در بیماری‌های انسانی انجام نشده است. پلی‌مورفیسم rs56124946 در اینترون ۱ ژن *TNFSF13B* قرار دارد و در مطالعه Fenstad و همکاران ارتباط قابل توجهی بین آلل G این پلی‌مورفیسم و استعداد ابتلاء به پره‌اکلامپسی مشاهده شد [۶].

یکی از محدودیت‌های مطالعه حاضر اندازه کوچک نمونه و محدود بودن نمونه‌ها به منطقه جنوب کشور می‌باشد که پیشنهاد می‌گردد مطالعات مشابه با اندازه نمونه بزرگ‌تر و پراکندگی جمعیتی بیش‌تر در سایر نقاط کشور انجام گردد.

## نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر که برای اولین بار در زنان مبتلا به پره‌اکلامپسی انجام گرفت، ارتباط معنی‌داری بین دو پلی‌مورفیسم نادر rs16972194 و rs56124946 ژن *TNFSF13B* با بیماری پره‌اکلامپسی در جمعیت مطالعه شده در جنوب ایران نشان نداد. تفاوت در نتایج حاصل از مطالعه حاضر با نتایج حاصل از مطالعات آنالیز پیوستگی در سایر جمعیت‌ها، علاوه بر آشکار کردن تفاوت‌های ژنتیکی جمعیت‌ها، دانش اولیه‌ای را نیز برای سایر محققان ایرانی برای مطالعات پیش‌رو فراهم می‌کند.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب قدردانی و تشکر خود را از پرسنل محترم بیمارستان حضرت زینب (س) شیراز که همکاری‌های بی‌دریغ و دلسوزانه‌ای جهت تهیه نمونه خون بیماران داشتند، ابراز می‌دارند. هم‌چنین شایان ذکر است که بدون همراهی و مشارکت صمیمانه بیماران گرامی این تحقیق با کد طرح IR:۱۶۰۳۰۵۰۳۹۴۲۰۱۴ به سرانجام نمی‌رسید. نتایج این مطالعه از پایان‌نامه خانم سارا بستانی به‌منظور دریافت درجه کارشناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان استخراج شده است.

# References

[1] Rowlands S. Social predictors of repeat adolescent pregnancy and focused strategies. *Best Practice Res Clin Obstetrics Gynaecol* 2010; 24(5): 605-616.

[2] Haddad B, Barton JR, Livingston JC, Chahine R, Sibai BM. Risk Factors for Adverse Maternal Outcomes among Women with HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes,

and low platelet count) Syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183(2): 444-8.

[3] Lawler J, Osman M, Shelton JA, Yeh J. Population-based Analysis of Hypertensive Disorders in Pregnancy. *Hypertens Pregnsncy* 2007; 26(1): 67-76.

[4] Johnson MP, Fitzpatrick E, Dyer TD, Jowett JB, Brennecke SP, Blangero J, et al. Identification of two novel quantitative trait loci for preeclampsia susceptibility on chromosomes 5q and 13q using a variance components-based linkage approach. *Mol Hum Reprod* 2007; 13(1): 61-7.

[5] Dieti J. The pathogenesis of pre-eclampsia: new aspects. *J Perinat Med* 2000; 28(6): 464-71.

[6] Fenstad MH, Johnson MP, Roten LT, Aas PA, Forsmo S, Klepper K, et al. Genetic and Molecular Functional Characterization of Variants within TNFSF13B, a Positional Candidate Preeclampsia Susceptibility Gene on 13q. *PLoS ONE* 2010; 5(9): e12993.

[7] Khetsuriani T, Sanikitze T, Khugashvili R. Alterations of oxidative metabolism at the pregnancy attended with preeclampsia. *Ann Biomed Res Edu* 2004; 4(1): 34-6.

[8] Moore PA, Belvedere O, Orr A, Pieri K, LaFleur DW, Feng P, et al. BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science* 1999; 285(5425): 260-3.

[9] Davis AR, Beasley AD. Abortion in adolescents: epidemiology, confidentiality, and methods. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2009; 21(5): 390-5.

[10] Phillips TA, Ni J, Hunt JS. Death-inducing tumour necrosis factor (TNF) superfamily ligands and receptors are transcribed in human placentae, cytotrophoblasts, placental macrophages and placental cell lines. *Placenta* 2001; 22(8-9): 663-72.

[11] Roten LT, Johnson MP, Forsmo S, Fitzpatrick E, Dyer TD, Brennecke SP, et al. Association between the candidate susceptibility gene ACVR2A on chromosome 2q22 and pre-eclampsia in a large Norwegian population-based study (the HUNT study). *Eur J Hum Genet* 2009; 17(2): 250-7.

[12] LaMarca BD, Ryan MJ, Gilbert JS, Murphy SR, Granger JP. Inflammatory cytokines in the pathophysiology of hypertension during preeclampsia. *Curr Hypertens Rep* 2007; 9(6): 480-5.

[13] Ryan AK, Rosenfeld MG. POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes Dev* 1997; 11(10): 1207–25.

[14] Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(17): E88.

[15] Valenzuela FJ, Pérez-Sepúlveda A, Torres MJ, Correa PA, Repetto GM, Illanes SE. Pathogenesis of Preeclampsia: The Genetic Component. *J pregnancy* 2012; 2012: 632732.

[16] Spinillo A, Capuzzo E, Colonna L, Piazzi G, Nicola S, Baltaro F. The effect of work activity in pregnancy on the risk of severe pre-eclampsia. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 1995; 35(4): 380-5.

[17] Fitzpatrick E, Johnson MP, Dyer TD, Forrest S, Elliott K, Blangero J, et al. Genetic association of the activin A receptor gene (ACVR2A) and preeclampsia. *Mol Hum Reprod* 2009; 15(3): 195–204.

[18] Johnson MP, Roten LT, Dyer TD, East CE, Forsmo S, Blangero J, et al. The ERAP2 gene is associated with preeclampsia in Australian and Norwegian populations. *Hum Genet* 2009; 126(5): 655–66.

[19] Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF, Petraglia F. Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci* 2009; 16(2): 206–15.

[20] Chang SK, Arendt BK, Darce JR, Wu X, Jelinek DF. A role for BLyS in the activation of innate immune cells. *Blood* 2006; 108(8): 2687–94.

[21] Hatada EN, Do RK, Orlofsky A, Liou HC, Prystowsky M, MacLennan IC, et al. NF-kappa B1 p50 is required for BLyS attenuation of apoptosis but dispensable for processing of NF-kappa B2 p100 to p52 in quiescent mature B cells. *J Immunol* 2003; 171(2): 761–68.

[22] Guo WJ, Qu X, Yang MX, Zhang WD, Liang L, Shao QQ, et al. Expression of BAFF in the trophoblast and decidua of normal early pregnant women and patients with recurrent spontaneous miscarriage. *Chin Med J (Engl)* 2008; 121(4): 309–15.

[23] Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. Immunoregulation in normal pregnancy and preeclampsia: an overview. *Reprod Biomed Online* 2006; 13(5): 680–6.

[24] Santoni A, Zingoni A, Cerboni C, Gismondi A. Natural killer (NK) cells from killers to regulators: distinct features between peripheral blood and decidual NK cells. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58(3): 280–8.

[25] Zhang W, Wen L, Huang X, Liang J, Gao W, Zhang S, et al. hsBAFF enhances activity of NK cells by regulation of CD4 (+) T lymphocyte function. *Immunol Lett* 2008; 120(1-2): 96–102.

[26] Xu W, Santini PA, Matthews AJ, Chiu A, Plebani A, He B, et al. Viral double-stranded RNA triggers Ig class switching by activating upper respiratory mucosa B cells through an innate TLR3 pathway involving BAFF. *J Immunol* 2008; 181(1): 276–87.

[27] Erridge C. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J Leukoc Biol* 2010; 87(6): 989–99.

[28] Conde-Agudelo A, Villar J, Lindheimer M. Maternal infection and risk of preeclampsia: systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198(1): 7-22.

[29] Riley JK, Nelson DM. Toll-like Receptors in Pregnancy Disorders and Placental Dysfunction. *Clin Rev Allergy Immunol* 2010; 39(3): 185-93.

[30] Klemm JD, Rould MA, Aurora R, Herr W, Pabo CO. Crystal structure of the Oct-1 POU domain bound to an octamer site: DNA recognition with tethered DNA-binding modules. *Cell* 1994; 77(1): 21–32.

[31] Schmidt D, Wilson MD, Ballester B, Schwalie PC, Brown GD, Marshall A, et al. Five vertebrate ChIP-seq reveals the evolutionary dynamics of transcription factor binding. *Science* 2010; 328(5981): 1036–40.

# Association of rs16972194 and rs56124946 Rare Variants of *TNFSF13B* Gene with Preeclampsia : A Case- Control Study

**S. Bostany[1], M. Nasiri[2]**

**Received: 26/08/2017 Sent for Revision: 17/04/2018 Received Revised Manuscript: 11/06/2018 Accepted: 17/06/2018**

**Background and Objectives:** Preeclampsia is a pregnancy-related syndrome and the most common hypertensive disorder in pregnancy. Feto-maternal immune incompatibility, oxidative stress, genetic variants, and endothelial cells injuries play an important role in the pathogenesis of the disease. *TNFSF13B* gene, a member of tumor necrosis factor (TNF) family, is a main regulator of an immune response. This study was done with the aim of investigating the association between the rs16972194 and rs56124946 rare polymorphisms of *TNFSF13B* gene and preeclampsia disease.

**Materials and Methods:** In this case-control study, 308 women with preeclampsia and 292 healthy pregnant women, referring to the reference clinic for women's diseases in Hazrat Zeinab hospital in Shiraz from January to August 2016, were selected and underwent molecular testing. Genotyping of the rs16972194 and rs56124946 polymorphisms were determined using ARMS PCR and T-ARMS PCR, respectively. The data were analyzed using logistic regression and chi-square test.

**Results:** The frequency of CC, CG, and GG rs56124946 polymorphism genotypes in the patients were respectively 95.2, 3.1, and 1.7 percent and 97.7, 1.3 and 1 percent in the controls. Statistically significant difference was not found in the frequency of genotypes and alleles of this polymorphic site between the case and control groups ($p> 0.05$). A significant percent of the controls (99.3%) and patients (99.7%) showed GG genotype for this polymorphism. No significant difference in the genotype frequencies was observed between the cases and controls ($p> 0.05$).

**Conclusion:** The results showed that the rare variants of the *TNFSF13B* gene are not probably related to preeclampsia disease.

**Key words**: Preeclampsia, Genetic variant, *TNFSF13B* gene, Iran

**Funding:** This research was funded by Islamic Azad University, Arsanjan Branch.

**Conflict of interest:** None declared.

**Ethical approval:** The Research Committee of Islamic Azad University, Arsanjan Branch approved the study (16030503942014).

**How to cite this article:** Bostany S, Nasiri M**.** Association of rs16972194 and rs56124946 Rare Variants of *TNFSF13B* Gene with Preeclampsia: A Case- Control Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2018; 17 (6): 539-52. [Farsi]

*1- MSc in Molecular Genetics, Dept. of Biology, Islamic Azad University, Arsanjan Branch, Arsanjan, Iran, ORCID: 0000-0002-3993-4367*
*2- Assistant Prof., Dept. of Biology, Islamic Azad University, Arsanjan Branch, Arsanjan, Iran, ORCID: 0000-0003-1370-6849*
*(Corresponding Author) Tel: (071) 43523907, Fax: (071) 43522483, Email: nasiri@iaua.ac.ir*