

Study of the association between *Dicer* (rs3742330 A>G) and *Drosha* (rs10719 C>T) gene polymorphisms and the risk of recurrent pregnancy loss

Mohseni N, Ghorbian S*

Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, I. R. Iran.

Received: 2017/10/8 | Accepted: 2018/05/1

Abstract:

Background: Drosha and Dicer are important molecules that play critical regulatory roles in the biogenesis of micro-RNA. Genetic polymorphism in the *Drosha* and *Dicer* can cause defect on the embryo implantation and lead to the recurrent abortion. The aim of this study was to evaluate an association between *Drosha* and *Dicer* gene polymorphisms and the risk of recurrent pregnancy loss (RPL).

Materials and Methods: This case-control study was performed on 100 women with RPL (with unknown reasons) and 100 women with a successful pregnancy (one alive child) and no abortion history referred to Imam Khomeini Hospital in Ardebil city during 2015-2017. The frequencies of these polymorphisms were evaluated using the PCR-RFLP method.

Results: Results showed no statistically significant difference in the genotype frequency of the *Dicer* gene polymorphism between the case and control groups ($P>0.05$). On the other hand, a statistically significant difference was found in the genotype frequency of the *Drosha* gene polymorphism between the groups ($P<0.05$).

Conclusion: It seems that the *Drosha* gene polymorphism can be a predisposing genetic factor for RPL, whereas the *Dicer* gene polymorphism cannot be considered as a risk factor for predisposing RPL in the studied population.

Keywords: Recurrent abortion, Polymorphism, *Drosha*, *Dicer*

* Corresponding Author.

Email: ghorbian20@yahoo.com

Tel: 0098 41 442 32162

Fax: 0098 41 442 28211

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2018; Vol. 22, No 2, Pages 169-176

Please cite this article as: Mohseni N, Ghorbian S. Study of the association between *Dicer* (rs3742330 A>G) and *Drosha* (rs10719 C>T) gene polymorphisms and the risk of recurrent pregnancy loss. *Feyz* 2018; 22(2): 169-76.

مطالعه ارتباط بین چندشکلی ژن‌های *Dicer* (rs3742330 A>G) و *Drosha* (rs10719 C>T) با خطر سقط مکرر

نگین محسنی^۱، سعید قربان^{۲*}

خلاصه:

سابقه و هدف: مولکول‌های *Dicer* و *Drosha* به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های مهم در بیوژنز miRNAها نقش دارند. چندشکلی در ژن‌های مذکور می‌تواند باعث نقص در فرآیند لانه‌گزینی جنین و منجر به سقط شود. هدف از این مطالعه ارزیابی ارتباط بین چندشکلی ژن‌های *Dicer* (rs 3742330 A>G) و *Drosha* (rs 10719 C>T) با خطر سقط مکرر بود.

مواد و روش‌ها: مطالعه مورد-شاهدی حاضر روی ۱۰۰ خانم مبتلا به سقط مکرر با عامل ناشناخته و ۱۰۰ خانم بدون تاریخچه سقط و واجد یک فرزند زنده مراجعه‌کننده به بیمارستان امام خمینی اردبیل طی سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۶ انجام شد. با روش PCR-RFLP فراوانی چندشکلی ژن‌های *Dicer* (rs 3742330 A>G) و *Drosha* (rs 10719 C>T) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: بین فراوانی ژنوتیپی چندشکلی *Dicer* در افراد سالم و بیمار از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P>0/05$). از طرف دیگر، بین فراوانی ژنوتیپی چندشکلی *Drosha* در افراد سالم و بیمار اختلاف معنی‌دار دیده شد ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد چندشکلی *Drosha* rs 10719 عامل مستعد‌کننده ژنتیکی برای سقط مکرر باشد، این در حالی است که چندشکلی ژن *Dicer* به‌عنوان عامل خطر سقط مکرر در جمعیت مورد مطالعه نقشی ندارد.

واژگان کلیدی: سقط مکرر، چند شکلی، *Drosha*، *Dicer*

دو ماه‌نامه علمی-پژوهشی فیض، دوره بیست و دوم، شماره ۲، خرداد و تیر ۹۷، صفحات ۱۷۶-۱۶۹

مقدمه

سقط مکرر به وقوع سه و یا تعداد بیشتر سقط قبل از هفته بیستم حاملگی اطلاق می‌گردد که تقریباً حدود ۱ درصد از جمعیت کل زوجین را شامل می‌شود. بر اساس نتایج منتشر شده، تقریباً ۱۵-۱۰ درصد از حاملگی‌ها منجر به سقط می‌شود و بیشترین میزان وقوع در ۳ ماهه اول بارداری است [۱]. سقط مکرر به‌عنوان یک سندروم تعریف‌شده است که علی‌رغم پیشرفت‌های زیاد در زمینه تشخیص پزشکی، هنوز تمامی علل سقط مکرر خودبه‌خودی به‌خوبی شناسایی نشده است. به‌علاوه، پروتکل درمانی مناسبی برای همگان وجود ندارد و بیش از ۵۰ درصد از علل آن ناشناخته باقی‌مانده است [۲]. به‌طورکلی سقط خود-به‌خودی در ۷۵ درصد خانم‌هایی که اقدام به حاملگی می‌کنند حادث می‌گردد و طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی روزانه ۱۵۰۰۰۰ سقط در آمریکا اتفاق می‌افتد.

درواقع بیشتر سقط‌ها قبل از شناسایی، قبل و یا در حین قاعدگی بعدی دفع می‌شوند و تنها ۲۰-۱۵ درصد آن‌ها پس از تشخیص کلینیکی حاملگی اتفاق می‌افتند. بیش از نیمی از سقط‌های زودرس به دلیل ناهنجاری‌های کروموزومی حادث می‌گردد [۳،۲]. عوامل ژنتیکی مختلفی ازجمله ناهنجاری‌های ساختاری و عددی کروموزومی، جهش‌های ژنی و چندشکلی‌ها، نقایص ساختمانی رحمی، عفونت‌های مزمن دستگاه تولید مثل، اختلالات سیستم انعقادی، هورمونی و ایمونولوژیکی به‌عنوان دلایل سقط‌های مکرر شناخته‌شده است [۴]. حالت‌های غیرطبیعی کروموزومی والدین ۵ درصد، حالت‌های غیرطبیعی ساختمانی رحم ۱۲ درصد، مشکلات هورمونی ۱۷ درصد، عفونت‌ها ۵ درصد، عوامل ایمونولوژیکی ۵ درصد و علل متفرقه دیگر حدود ۱۰ درصد علت سقط مکرر را تشکیل می‌دهد. بااین‌حال، در بیشتر موارد علت سقط‌های مکرر خودبه‌خودی غیرقابل توجیه باقی‌مانده است [۵،۶]. اخیراً گزارش‌های متعددی منتشر شده است که مولکول‌های miRNA در فرایندهای مهم و حیاتی ازجمله لانه‌گزینی جنین، بقا، و رشد و نمو جنینی نقش دارند. تا به حال بیش از ۱۵۰۰ مولکول miRNAs مختلف در انسان شناسایی شده و تخمین زده می‌شود که miRNA بیشتر از ۲۳۰۰ ژن انسان را هدف قرار می‌دهند [۷]. از نظر اندازه این مولکول‌ها تقریباً ۲۳-۱۸ نوکلئوتید طول دارند که در تنظیم پس از نسخه‌برداری (Post-Transcriptional) از طریق پیوند با توالی‌های مکمل روی mRNA هدف تجزیه

^۱ کارشناس ارشد ژنتیک، گروه آموزشی ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

^۲ استادیار، گروه آموزشی ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

آذربایجان شرقی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر، دانشکده علوم پایه، گروه آموزشی ژنتیک مولکولی

دوره نویسی: ۰۴۱ ۴۴۲۲۸۲۱۱

تلفن: ۰۴۱ ۴۴۲۳۲۱۶۲

پست الکترونیک: ghorbian20@yahoo.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۲/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۱۶

توسط متخصصین مربوطه (زنان و نازایی و ژنتیک) و آزمایش‌های تخصصی مبنی بر عفونت‌های مزمن، ترومبوز، بیماری‌های خود-ایمنی و اختلالات غدد درون‌ریز مورد ارزیابی قرار گرفته بودند و علت سقط آنها همچنان به‌صورت نامعلوم باقی مانده بود. اختلالات کروموزومی ایشان نیز از طریق تکنیک‌های مختلف سیتوژنتیکی G-Banding و HR مورد ارزیابی قرار گرفته بود و فاقد ناهنجاری بودند. تعداد ۱۰۰ نفر زن که از نظر نژاد و قومیت ترک بودند، حداقل دارای یک فرزند سالم بوده، فاقد تاریخچه سقط بوده و از نظر سنی در محدوده زنان گروه بیمار بودند و به بیمارستان امام خمینی اردبیل طی سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۵ مراجعه کرده بودند، وارد گروه سالم شدند. از پرونده بیماران مشخصات هر بیمار از جمله سن، نژاد، تعداد دفعات سقط، تمامی آزمایش‌های انجام شده جهت تعیین علت سقط و نشانی محل سکونت با کسب اجازه و رضایت‌نامه استخراج شد. اطلاعات مذکور به‌صورت کاملاً محرمانه و با رعایت کامل موازین اخلاقی دریافت شده و نمونه‌های خونی با کد اختصاری و بدون نام مورد آزمایش قرار گرفتند. استخراج DNA از نمونه‌های خون کامل با روش نمک اشباع (Salting Out) انجام شد [۱۸]. غلظت و خلوص DNA استخراج شده از طریق اسپکتروفتومتری با نانودراپ (Thermo Scientific، آمریکا) تعیین شد. برای ارزیابی فراوانی چندشکلی ژن‌های *Dicer* و *Drosha* از روش PCR-RFLP استفاده شد. برای تکثیر ناحیه اختصاصی (100ng) DNA 1μl، 10pmole) 1μl آغازگرهای مستقیم و معکوس، 13μl از Master Mix Red 2x (Ampliqon، دانمارک) و 9μl آب در حجم نهایی ۲۵ μl مخلوط شد. توالی آغازگرها در جدول شماره ۱ ذکر شده است [۱۹]. مراحل PCR با دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf، آلمان) با یک مرحله واسرشت سازی در ۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه شروع شد. سپس، ۳۵ دور در دماهای ۹۵°C (۲۰ ثانیه)، در دمای اتصال ۵۶°C برای آغازگر *Dicer* (۲۰ ثانیه) و ۵۹°C برای آغازگر *Drosha* برای (۲۰ ثانیه) و ۷۲°C (۶۰ ثانیه) جهت تکثیر تکرار شد. در مرحله پایانی تکثیر نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه دنبال شد. محصولات واکنش PCR برای چندشکلی ژن *Dicer* ۲۳۲ جفت باز و برای ژن *Drosha* ۱۶۸ جفت باز بود. برای تأیید تکثیر محصولات اختصاصی قبل از برش با آنزیم‌های محدودالانر، ابتدا محصولات روی ژل آگارز ۱ درصد جدا شده و با رنگ Safe Stain (سینازن، ایران) شناسایی شدند. جهت تعیین فراوانی ژنوتیپ‌های چندشکلی ژن *Dicer* محصولات تکثیری با آنزیم محدودالانر (Roche، سوئیس) و برای ژن *Drosha* با آنزیم محدودالانر HinIII (Roche، سوئیس) هضم آنزیمی انجام

mRNA یا مهار شروع ترجمه را باعث می‌شوند. جایگاه اتصال برای این مولکول‌ها در ناحیه ترجمه نشده انتهای 3'-UTR توالی mRNA هدف واقع شده که در این حالت با miRNAهای اختصاصی پیوند یافته و به علت ممانعت از آغاز فرآیند ترجمه، بیان ژن هدف در سطح پایین‌تری تنظیم می‌گردد [۸]. مولکول‌های حیاتی و مهمی چون *Drosha* و *Dicer* در سلول‌های تروفو-پلاستی جفت جنین شناسایی شده‌اند که در بیوژنز و پرده‌پزشی miRNA دخیل هستند [۱۰، ۹]. گزارش شده است که hamiRNA می‌تواند سلول‌های سرطانی از تنظیم خارج شده را مجدداً تنظیم کنند [۱۱]. احتمالاً چندشکلی‌هایی که در 3'-UTR ژن‌های پرده‌پزش کنند miRNA قرار دارند، می‌توانند مسئول تغییر موقعیت ساختار ثانویه miRNA شوند و در نتیجه بر میزان پایداری miRNA وابسته به آن تأثیرگذار باشند [۱۳، ۱۲]. علاوه بر آن، این نوع تغییرات در ساختارهای ثانویه می‌تواند در برهمکنش پروتئین‌های متصل به miRNA نیز مؤثر باشد که این امر پایداری زنجیره miRNA را تحت تأثیر قرار خواهد داد [۱۴]. جنین انسان تعداد زیادی miRNA تولید می‌کند که در رشد جنینی دخیل هستند. علاوه بر آن، miRNAهای حاصل، بیان مجموعه‌ای از ژن‌های در رحم مادر را تنظیم می‌کنند که با عکس‌العمل التهاب در طی دوره لانه‌گزینی تخمک در ارتباط هستند و در میزان مقاومت سیستم ایمنی مادری-جنینی مشارکت دارند [۱۶، ۱۵]. تنها در یک مطالعه نقش و اهمیت چندشکلی‌های ژن‌های *Dicer* و *Drosha* در سقط‌های مکرر مورد بررسی قرار گرفته است. در بررسی Jung و همکاران نشان داده شده است که ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی rs10719 *Drosha* و rs3742330 با سقط مکرر وجود ندارد [۱۷]. با توجه به این که فقط نتایج یک مطالعه را نمی‌توان در جهت تأیید و یا رد ارتباط یک چندشکلی با یک اختلال خاص در نظر گرفت، لذا هدف از این مطالعه آن است تا مشخص گردد که آیا ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی‌های ژن‌های *Dicer* (rs 3742330 A>G) و *Drosha* (rs 10719 C>T) با خطر ابتلا به سقط‌های مکرر خود-به‌خودی با عامل ناشناخته در زنان استان اردبیل وجود دارد یا خیر؟

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورد-شاهدی ۱۰۰ زن مبتلا به سقط مکرر خودبه‌خودی با عامل ناشناخته مراجعه‌کننده به بیمارستان امام خمینی اردبیل طی سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۵ که دارای حداقل دارای ۳ بار سقط مکرر بودند، انتخاب شدند. زنانی وارد مطالعه شدند که

شد. بدین منظور ۱۰ µl محصول PCR، ۱۰x Buffer ۲، ۱ µl آنزیم و ۱۷ µl آب مخلوط شده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. جهت شناسایی قطعات حاصل از برش، محصولات روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد جدا شده و با رنگ آمیزی نیترا ت نقره شناسایی شدند. بنابراین، احتمال ۳ نوع ژنوتیپ (هموزیگوت سالم) AA، (هتروزیگوت) AG و (همو-زیگوت جهش یافته) GG برای چندشکلی ژن *Dicer* و ۳ نوع ژنوتیپ (هموزیگوت سالم) CC، (هتروزیگوت) CT و (همو-زیگوت جهش یافته) TT برای چندشکلی ژن *Drosha* وجود داشت (جدول شماره ۱). بعد از بررسی تک تک افراد از نظر ژنوتیپ، داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ویرایش ۲۳ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. فراوانی ۳ حالت هموزیگوت سالم، هتروزیگوت و هموزیگوت جهش یافته در دو گروه سالم و شاهد برای این چندشکلی ها با استفاده از آزمون آماری مجذور کای مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به دست آمده با سطح معنی-داری کمتر از ۰/۰۵ $P <$ مقایسه شد.

نتایج

از ۱۰۰ زن با سابقه سقط مکرر، ۷۲ درصد دارای ۳ بار سقط، ۲۲ درصد دارای ۴ بار سقط، ۳ درصد دارای ۵ بار سقط و ۳ درصد دارای ۶ بار سابقه سقط بودند. میانگین و انحراف معیار سنی در گروه زنان با سابقه سقط $30/71 \pm 4/28$ سال و در زنان سالم $31/24 \pm 4/80$ سال بود. اختلاف معنی داری از نظر میانگین سنی در بین افراد دو گروه مشاهده نشد ($P=0/755$). در مطالعه حاضر ارزیابی ارتباط بین چندشکلی ژن های ($A > G$) rs 3742330 و *Dicer* و ($C > T$) rs 10719 و *Drosha* با خطر سقط مکرر در ۱۰۰ زن با تاریخچه حداقل سه بار سقط مکرر و ۱۰۰ زن بدون سابقه سقط و حداقل با یک بارداری موفق و فرزند زنده مورد بررسی قرار گرفت. در شکل شماره ۱ نمونه ای از نتایج PCR-RFLP ژن *Dicer* نشان داده شده است که ستون اول فردی با ژنوتیپ هتروزیگوت CT و ستون دوم فردی با ژنوتیپ هموزیگوت سالم CC بود. در شکل شماره ۲ نمونه ای از نتایج PCR-RFLP ژن *Drosha* نشان داده شده است که ستون اول فردی با ژنوتیپ هموزیگوت سالم CC، ستون دوم فردی با ژنوتیپ تیپ هموزیگوت جهش یافته TT و ستون سوم فردی با ژنوتیپ هتروزیگوت CT بود. جهت تعیین اختلاف فراوانی ژنوتیپی برای چندشکلی ژن *Dicer* بین دو گروه سالم و بیمار از آزمون آماری مجذور کای استفاده شد که اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P=0/430$). این در حالی است که فراوانی ژنوتیپی برای چند-

شکلی ژن *Drosha* از نظر آماری تفاوت معنی داری را بین دو گروه نشان داد ($P=0/008$). فراوانی ژنوتیپ ها در جدول های شماره ۲ و ۳ ذکر شده است. در این بررسی اختلاف ژنوتیپ ها در ۳ الگوی توارثی غالب، مغلوب و هم بارزی بین دو گروه بیمار و سالم مورد ارزیابی قرار گرفت. فراوانی ژنوتیپی در چندشکلی (rs 3742330) *Dicer* در الگوی توارثی هم بارزی اختلاف معنی-داری را نشان نداد ($P=0/428$; CI: ۰/۴۱۷-۱/۴۵۰; OR=۰/۷۷۸). در حالت مغلوب نیز به دلیل یکسان بودن فراوانی ژنوتیپ ها با حالت هم بارزی اختلاف معنی داری بین دو گروه مشاهده نشد ($P=0/428$). نتایج این ارزیابی نشان داد که چندشکلی در ژن *Dicer* عامل مستعدکننده خطر برای ابتلا زنان به سقط به شمار نمی رود. این در حالی است که فراوانی ژنوتیپی چندشکلی (rs 10719) *Drosha* در الگوهای توارثی مغلوب و هم بارزی اختلاف معنی داری را نشان داده بودند؛ به ترتیب (۰/۱۸ و $P=0/002$; CI: ۰/۲۷۱-۰/۸۸۷; OR=۰/۴۹۰) و (۰/۳۳۸ و $P=0/002$; CI: ۱/۳۵۹-۲/۴۲۹; OR=۲/۴۲۹). نتایج این ارزیابی حاکی از آن است که چندشکلی در ژن *Drosha* خطر ابتلا زنان به سقط را افزایش می دهد. نسبت شانس (OR) در سطح اطمینان (CI) ۹۵ درصد برای هر کدام از ژنوتیپ های این دو ژن به طور جداگانه در جدول های شماره ۴ و ۵ ذکر شده است.

بحث

در این مطالعه به بررسی ارتباط بین چندشکلی ژن های *Dicer* و *Drosha* که در روند پیوستن و پردازش miRNA نقش دارند با افزایش خطر سقط در میان زنان مبتلا به سقط مکرر با عامل ناشناخته پرداخته شد. یافته های این بررسی نشان داد که حامل بودن چندشکلی rs3742330 $A > G$ ارتباط معنی داری با خطر سقط های مکرر ندارد. این در حالی است که حامل بودن چندشکلی rs10719 $C > T$ ارتباط معنی داری با خطر سقط مکرر نشان داد. *Drosha* یک آنزیم RNaseII و جزء اصلی کمپلکسی است که پدیده پیوستن miRNA را کاتالیز می کند. این ژن از نظر جایگاه سیتوژنتیکی روی کروموزوم 5p13.3 قرار دارد. *Drosha* جز خانواده ای از ریبونوکلازها است که در تمام سلول های زنده وجود دارند. محصول ژن *Dicer* یکی دیگری از اجزای ماشین پردازش کننده miRNAها است که از نظر جایگاه سیتوژنتیکی روی کروموزوم 14q32.13 قرار دارد [۲۰]. عملکرد ناقص *Dicer* که به واسطه چندشکلی ژنتیکی به وجود می آید، با چندشکلی *Drosha* شدت بیشتری می یابد. چندشکلی *Dicer* می تواند باعث نقص در نحوه لانه گزینی جنین شده و این امر منجر

در ژن‌های ماشین پردازش کننده miRNA انجام داده بودند، نشان دادند که ژنوتیپ AG در چند شکلی *Dicer1* rs3742330 خطر ابتلا به بدخیمی روده بزرگ را افزایش می‌دهد. نتایج آن‌ها نشان داد که ژنوتیپ هموزیگوت CC در چند شکلی *Drosha* rs10719 در جمعیت کره به‌طور قابل توجهی خطر بدخیمی روده بزرگ را افزایش داده است [۲۱].

به سقط جنین گردد [۱۰]. در مطالعات متعدد تأثیر چند شکلی‌های ژن‌های miRNA بر خطر سقط‌های مکرر گزارش‌هایی منتشر شده است، ولی تنها در یک بررسی ارتباط بین چند شکلی‌های ژن‌های ماشین پردازش کننده miRNA با سقط‌های مکرر مورد ارزیابی قرار گرفته است. Cho و همکاران در مطالعه‌ای که روی مبتلایان به بدخیمی روده بزرگ و به‌منظور بررسی ارتباط آن با چند شکلی

جدول شماره ۱- توالی آغازگرها، اندازه محصولات تکثیری PCR و طول قطعات حاصل از برش هضم آنزیمی

نام آغازگرها	توالی آغازگرها	PCR اندازه محصولات	آنزیم محدودالانتر	طول قطعات محصول PCR بعد از هضم آنزیمی
Dicer-F	5'-CCTGCCTTGACAACATGAAA-3'	۲۳۲ جفت باز	BshnI	هموزیگوت سالم AA=۲۳۲
Dicer-R	5'-GGTCTCAGTTTGGTGGCTTC-3'			هتروزیگوت AG=۲۳۲+۱۸۷+۴۵ هتروزیگوت AG=۲۳۲+۱۸۷+۴۵
Drosha-F	5'-TAGTTTTCTGCAGACAATGCA-3'	۱۶۸ جفت باز	HinIII	هموزیگوت سالم CC=۱۴۳+۲۵
Drosha-R	5'-GTAATGCACATTACCAAAGTCA-3'			هتروزیگوت CT=۱۶۸+۱۴۳+۲۵ هموزیگوت جهش یافته TT=۱۶۸

جدول شماره ۲- مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌های چند شکلی ژن *Dicer* (rs 3742330 A>G) در بین گروه‌های سالم و بیمار

P	جمع	گروه		چند شکلی <i>Dicer</i> (rs3742330 A>G)
		تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	
		سالم	بیمار	
۰/۴۳۰	۱۴۵	۷۰ (٪۴۸)	۷۵ (٪۵۲)	هموزیگوت سالم (AA)
	۵۵	۳۰ (٪۵۵)	۲۵ (٪۴۵)	هتروزیگوت (AG)
	۰	۰	۰	هموزیگوت جهش یافته (GG)

جدول شماره ۳- مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌های چند شکلی ژن *Drosha* (rs10719 C>T) در بین گروه‌های سالم و بیمار

P	جمع	گروه		چند شکلی <i>Drosha</i> (rs10719 C>T)
		تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	
		سالم	بیمار	
۰/۰۰۸	۱۱	۸ (٪۷۳)	۳ (٪۲۷)	هموزیگوت سالم (CC)
	۱۱۹	۴۹ (٪۴۱)	۷۰ (٪۵۹)	هتروزیگوت (CT)
	۷۰	۴۳ (٪۶۱)	۲۷ (٪۳۹)	هموزیگوت جهش یافته (TT)

جدول شماره ۴- مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌های چند شکلی ژن *Dicer* در افراد سالم و بیماران با سابقه سقط مکرر مراجعه کننده به بیمارستان امام

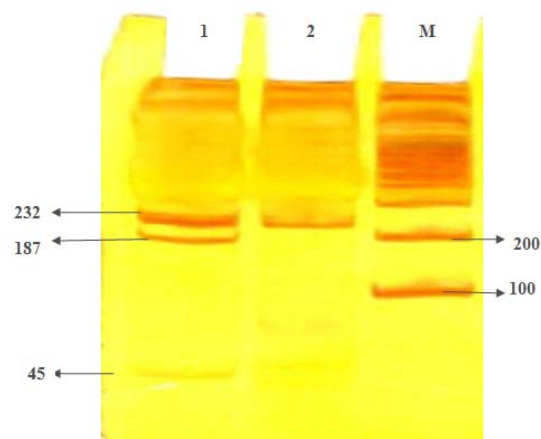
خمینی اردبیل طی سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۶

P	فاصله اطمینان ٪۹۵		نسبت شانس	جمع	گروه		چند شکلی <i>Dicer</i> (rs3742330 A>G)
	بالا	پایین			تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	
					سالم	بیمار	
۰/۴۲۸	۰/۴۱۷	۱/۴۵۰	۰/۷۷۸	۵۵	۳۰ (٪۵۵)	۲۵ (٪۴۵)	الگوی هم‌بارزی AG
				۱۴۵	۷۰ (٪۴۸)	۷۵ (٪۵۲)	AA+GG

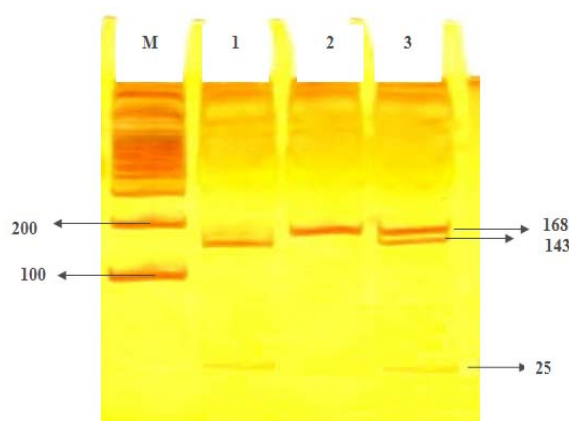
جدول شماره ۵- مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌های چندشکلی ژن *Drosha* در افراد سالم و بیماران با سابقه سقط مکرر مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی اردبیل طی سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۶

P	فاصله اطمینان ۹۵٪		نسبت شانس	جمع	گروه		چندشکلی (Drosha rs10719 C>T)
					تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	
	پایین	بالا			سالم	بیمار	
* ۰/۰۰۲	۱/۳۵۹	۴/۳۳۸	۲/۴۲۹	الگوی هم‌بارزی			
				۱۱۹	۴۹ (٪۴۱)	۷۰ (٪۵۹)	CT
				۸۱	۵۱ (٪۶۳)	۳۰ (٪۳۷)	CC+TT
۰/۱۲۱	۰/۷۲۴	۱۰/۹۲۴	۲/۸۱۲	الگوی غالب			
				۱۸۹	۹۲ (٪۴۹)	۹۷ (٪۵۱)	CT+TT
				۱۱	۸ (٪۷۳)	۳ (٪۲۷)	CC
* ۰/۰۱۸	۰/۲۷۱	۰/۸۸۷	۰/۴۹۰	الگوی مغلوب			
				۷۰	۴۳ (٪۶۱)	۲۷ (٪۳۹)	TT
				۱۳۰	۵۷ (٪۴۴)	۷۳ (٪۵۶)	CC+CT

Osuch-Wojcikiewicz و همکاران که در مطالعه‌ای ارتباط بین چندشکلی در ژن‌های پردازش کننده ماشین miRNAها با خطر ابتلا به بدخیمی حنجره را در جمعیت لهستانی انجام داده بودند، نشان دادند که ژنوتیپ‌های AG در *Dicer1* rs3742330 خطر ابتلا به بدخیمی حنجره را افزایش داده است؛ این در حالی است که ژنوتیپ TT در ژن *Drosha* rs6877842 هیچ‌گونه افزایش خطری برای این بیماری به همراه نداشته است [۲۲]. نتایج مطالعه Zhou و همکاران که به ارزیابی ارتباط ۶ چندشکلی در ژن‌های ماشین پردازش کننده miRNAها با خطر شیروفرنی در ۲۵۶ فرد بیمار و ۲۵۲ فرد سالم پرداخته بودند، نشان داد که حضور چند-شکلی‌ها می‌توانند استعداد ابتلاء به شیروفرنی را افزایش دهد [۲۳]. Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۶ در بررسی‌ای تحت عنوان اهمیت بیان ژن *Drosha* در رحم موش در اوایل دوران حاملگی و نقش آن در فرآیند لانه‌گزینی نشان داده‌اند که میزان بیان ژن *Drosha* بعد از تأثیر هورمون پروژسترون افزایش می‌یابد. در این مطالعه و با استفاده از مدل کشت سلولی Stromal نشان داده شد که بیان ژن *Drosha* با رشد تدریجی سلول‌های پوشاننده غشاء مخاطی رحمی همراه بوده و این می‌تواند بیان‌گر اهمیت و نقش بیان ژن *Drosha* در فرآیند لانه‌گزینی در موش باشد [۲۴]. در یک مطالعه که روی ۲۳۸ زن سالم و ۳۳۸ زن با حداقل ۲ بار و یا بیشتر سابقه سقط انجام شده، چندشکلی‌های *Dicer* (rs3742330) و *Drosha* (rs10719) با روش PCR-RFLP مورد ارزیابی قرار گرفته است. نتایج حاصل نشان داده که ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی *Drosha* rs10719 و *Dicer* rs3742330 با سقط مکرر وجود ندارد [۱۷]. این در حالی است که در بررسی حاضر برای چندشکلی *Dicer* rs3742330 ژن



شکل شماره ۱- نتایج PCR-RFLP برای چندشکلی ژن *Dicer* در ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۰٪: M: شاخص وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (100bp)، ۱: هتروزیگوت CT، ۲: هموزیگوت CC



شکل شماره ۲- نتایج PCR-RFLP برای چندشکلی ژن *Drosha* در ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۰٪: M: شاخص وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (100bp)، ۱: هموزیگوت CC، ۲: هموزیگوت TT، ۳: هتروزیگوت CT

مطالعه قرار گیرند. علاوه بر این، می‌توان در مطالعات بعدی میزان بیان ژن‌های هدف و تغییرات در سطح متیلاسیون پرموترهای ژن‌های مذکور را در این نوع زنان بررسی کرد. لازم به ذکر است که جهت تأیید و یا عدم تأیید این ارتباط، به انجام مطالعات وسیع‌تر در جمعیت‌هایی با نژادهای مختلف نیاز است و نمی‌توان ژنتیکی بودن یک اختلال خاص را با نتایج چند بررسی محدود در جمعیت‌های خاص تأیید کرد.

نتیجه‌گیری

چندشکلی *Drosha rs10719* عامل مستعدکننده‌ای برای سقط مکرر در زنان مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی اردبیل است و می‌تواند به عنوان بیومارکری در پیش‌آگاهی و ارزیابی سقط‌های مکرر مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد ژنتیک با کد مصوب ۹۳۱۰۳۹ از دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر است. این مطالعه با مشارکت کارکنان بیمارستان امام خمینی اردبیل انجام گرفته و بدین وسیله از کلیه افرادی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

- [1] Morley L, Shillito J, Tang T. Preventing recurrent miscarriage of unknown aetiology. *Obstetrician Gynaecologist* 2013; 15(2): 99-105.
- [2] Carrington B, Sacks G, Regan L. Recurrent miscarriage: pathophysiology and outcome. *Current Opinion Obstetrics Gynecol* 2005; 17(6): 591-7.
- [3] Hogge WA, Byrnes AL, Lanasa MC, Surti U. The clinical use of karyotyping spontaneous abortions. *Am J Obstetrics Gynecol* 2003; 189(2): 397-400.
- [4] Berry CW, Brambati B, Eskes TK, Exalto N, Fox H, Geraedts JP, et al. The Euro-Team Early Pregnancy (ETEP) protocol for recurrent miscarriage. *Human Reprod* 1995; 10(6): 1516-20.
- [5] Ghorbian S, Saliminejad K, Sadeghi MR, Javadi GR, Kamali K, Amirjannati N, et al. The Association between Y Chromosome Microdeletion and Recurrent Pregnancy Loss. *Iran Red Crescent Med J* 2012; 14(6): 358-62.
- [6] Franssen MT, Korevaar JC, Leschot NJ, Bossuyt PM, Knecht AC, Gerssen-Schoorl KB, et al. Selective chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: case-control study. *BMJ* 2005; 331(7509): 137-41.

مطابق با نتایج تحقیق گذشته، ارتباطی بین گروه‌های سالم و بیمار نشان داده نشد و برعکس برای چندشکلی *Drosha rs10719* برخلاف گزارش قبلی، ارتباط معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه نشان داده شد. تناقضات دیده شده بین مطالعات انجام شده روی این چندشکلی‌ها شاید به‌خاطر اختلاف در توزیع جغرافیایی آللی، اختلاف‌های نژادی و قومیتی و زمینه ژنتیکی مختلف افراد مورد مطالعه باشد. همچنین، معیارهای مختلفی که در انتخاب گروه بیماران و سالم در نظر گرفته می‌شود، می‌تواند منتهی به اختلاف در نتایج گردد. در مطالعه حاضر برای انتخاب نمونه‌های بیماران معیارهای ورود و خروج از مطالعه با دقت و حساسیت بالایی در نظر گرفته شد. این افراد دارای حداقل ۳ بار سقط مکرر بودند و ناهنجاری کروموزومی یا اختلالات آناتومیک و هیچ اختلال بالینی دیگری نداشتند و لذا فرضیه ارتباط معنی‌داری چندشکلی *Drosha* با خطر سقط‌های مکرر خودبه‌خودی بیشتر قوت می‌یابد. از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به ارزیابی زنان با نژاد خاص که فقط به مرکز درمانی مورد مطالعه مراجعه کرده بودند، اشاره کرد. علاوه بر این، در این بررسی فقط یک نوع چندشکلی مورد ارزیابی قرار گرفت و شاید دیگر چندشکلی‌های موجود این در ژن‌ها با استعداد ابتلا زنان به سقط‌های مکرر ارتباط داشته باشند. و لذا پیشنهاد می‌گردد که چندشکلی‌های بیشتری از این ژن‌ها مورد

- [7] Parveen F, Agrawal S. Recurrent Miscarriage and Micro-RNA Among North Indian Women. *Reprod Sci* 2015; 22(4): 410-5.
- [8] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009; 136(4): 642-55.
- [9] Luense LJ, Carletti MZ, Christenson LK. Role of Dicer in female fertility. *Trends Endocrinol Metabol* 2009; 20(6): 265-72.
- [10] Morales Prieto DM, Markert UR. MicroRNAs in pregnancy. *J Reprod Immunol* 2011; 88(2): 106-11.
- [11] Kotlabova K, Doucha J, Hromadnikova I. Placental-specific microRNA in maternal circulation—identification of appropriate pregnancy-associated microRNAs with diagnostic potential. *J Reprod Immunol* 2011; 89(2): 185-91.
- [12] Jeon YJ, Kim SY, Rah H, Choi DH, Cha SH, Yoon TK, et al. Association of the miR-146aC> G, miR-149T> C, miR-196a2T> C, and miR-499A> G polymorphisms with risk of spontaneously aborted fetuses. *Am J Reprod Immunol* 2012; 68(5): 408-17.
- [13] Jeon YJ, Choi YS, Rah H, Kim SY, Choi DH, Cha SH, et al. Association study of microRNA polymorphisms with risk of idiopathic recurrent

spontaneous abortion in Korean women. *Gene* 2012; 494(2): 168-73.

[14] Abrahams Y, Laguette MJ, Prince S, Collins M. Polymorphisms within the COL5A1 3'-UTR That Alters mRNA Structure and the MIR608 Gene are Associated with Achilles Tendinopathy. *Annals Human Genetics* 2013; 77(3): 204-14.

[15] Fu G, Brkić J, Hayder H, Peng C. MicroRNAs in human placental development and pregnancy complications. *Int J Mol Sci* 2013; 14(3): 5519-44.

[16] Hong X, Luense LJ, McGinnis LK, Nothnick WB, Christenson LK. Dicer1 is essential for female fertility and normal development of the female reproductive system. *Endocrinology* 2008; 149(12): 6207-12.

[17] Jung YW, Jeon YJ, Rah H, Kim JH, Shin JE, Choi DH, et al. Genetic variants in microRNA machinery genes are associate with idiopathic recurrent pregnancy loss risk. *PloS One* 2014; 9(4): e95803.

[18] 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.

[19] Rah H, Jeon YJ, Lee BE, Kim JO, Shim SH, Lee WS, et al. Association of polymorphisms in microRNA machinery genes (DROSHA, DICER1, RAN, and XPO5) with risk of idiopathic primary

ovarian insufficiency in Korean women. *Meno-pause* 2013; 20(10): 1067-73.

[20] Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425(6956): 415-9.

[21] Cho SH, Ko JJ, Kim JO, Jeon YJ, Yoo JK, Oh J, et al. 3'-UTR Polymorphisms in the MiRNA Machinery Genes DROSHA, DICER1, RAN, and XPO5 Are Associated with Colorectal Cancer Risk in a Korean Population. *PloS One* 2015; 10(7): e0131125.

[22] Osuch-Wojcikiewicz E, Bruzgielewicz A, Niemczyk K, Sieniawska-Buccella O, Nowak A, Walczak A, et al. Association of polymorphic variants of miRNA processing genes with larynx cancer risk in a polish population. *BioMed Res Int* 2015; 2015: 298378.

[23] Zhou Y, Wang J, Lu X, Song X, Ye Y, Zhou J, et al. Evaluation of six SNPs of MicroRNA machinery genes and risk of schizophrenia. *J Mol Neurosci* 2013; 49(3): 594-9.

[24] Zhang C, Long X, Ding Y, Chen X, He J, Liu S, et al. Expression of DROSHA in the Uterus of Mice in Early Pregnancy and Its Potential Significance During Embryo Implantation. *Reprod Sci* 2016; 23(2): 154-62.