Original Article

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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]

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

نگین محسنی [۱]، سعید قربیان [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 مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی اردبیل طی سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۵ 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 مستعد کننده 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 تقریبا 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.

[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

تلفن: ۰۴۱ ۴۴۲۳۲۱۶۲ **دورنویس:** ۰۴۱ ۴۴۲۲۸۲۱۱

پست الکترونیک: ghorbian20@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۱۶ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۷/۲/۱۱

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 غیرقابل‌توجیه باقی‌مانده است [۶،۵]. اخیرا گزارش-های متعددی منتشر شده است که مولکول‌های miRNA در فرایندهای مهم و حیاتی ازجمله لانه‌گزینی جنین، بقاء، و رشد و نمو جنینی نقش دارند. تابه‌حال 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 تقریبا ۲۳-۱۸ نوکلئوتید طول دارند که در تنظیم پس از نسخه‌برداری (Post-Transcriptional) از طریق پیوند با توالی‌های مکمل روی mRNA هدف تجزیه

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]

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 پردازش miRNA دخیل هستند [۱۰،۹]. گزارش‌شده است که miRNAها می‌توانند سلول‌های سرطانی از تنظیم خارج‌شده را مجدداً تنظیم کنند [۱۱]. احتمالا چندشکلی‌هایی که در 3´-UTR ژن‌های پردازش کننده miRNA قرار دارند، می‌توانند مسئول تغییر موقعیت ساختار ثانویه miRNA شوند و درنتیجه بر میزان پایداری miRNA وابسته به آن تأثیرگذار باشند [۱۳،۱۲]. علاوه برآن، 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 برآن، 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 *Dicer* rs3742330 با سقط مکرر وجود ندارد [۱۷]. باتوجه به این‌که فقط نتایج یک مطالعه را نمی‌توان در جهت تأیید و یا رد ارتباط یک چندشکلی با یک اختلال خاص درنظر گرفت، لذا هدف از این مطالعه آن است تا مشخص گردد که آیا ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی‌های ژن‌های *Dicer* (rs 3742330 A>G) و (rs 10719 C>T) *Drosha* 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 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 ازجمله 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) DNA1µl، (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 به‌مدت 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 به‌مدت 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 محدودالاثر، ابتدا محصولات روی ژل آگارز ۱ درصد جدا شده و با رنگ Safe Stain (سیناژن، ایران) شناسایی شدند. جهت تعیین فراوانی ژنوتیپ‌های چندشکلی ژن *Dicer* محصولات تکثیری با آنزیم محدودالاثر BshnI (Roche، سوئیس) و برای ژن *Drosha* با آنزیم محدودالاثر Hin1II (Roche، سوئیس) هضم آنزیمی انجام

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]

شد. بدین‌منظور ۱۰ µl محصول PCR، ۲ µl Buffer 10x، ۱ µl آنزیم و ۱۷ µl آب مخلوط شده و به‌مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. جهت شناسایی قطعات حاصل از برش، محصولات روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۰ درصد جدا شده و با رنگ‌آمیزی نیترات نقره شناسایی شدند. بنابراین، احتمال ۳ نوع ژنوتیپ (هموزیگوت سالم) AA، (هتروزیگوت) AG و (هموزیگوت جهش‌یافته) GG برای چندشکلی ژن *Dicer* و ۳ نوع ژنوتیپ (هموزیگوت سالم) CC، (هتروزیگوت) CT و (هموزیگوت جهش‌یافته) TT برای چندشکلی ژن *Drosha* وجود داشت (جدول شماره ۱). بعد از بررسی تک‌تک افراد ازنظر ژنوتیپ، داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۲۳ مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند. فراوانی ۳ حالت هموزیگوت سالم، هتروزیگوت و هموزیگوت جهش‌یافته در دو گروه سالم و شاهد برای این چندشکلی‌ها با استفاده از آزمون آماری مجذور کای مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به‌دست‌آمده با سطح معنی‌داری کمتر از $P<0/05$ 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 ۴/۲۸±۳۰/۷۱ سال و در زنان سالم ۴/۸۰±۳۱/۲۴ سال بود. اختلاف معنی‌داری از نظر میانگین سنی در بین افراد دو گروه مشاهده نشد ($P=0/755$). در مطالعه حاضر ارزیابی ارتباط بین چندشکلی ژن‌های (rs 3742330 A>G) *Dicer* و (rs 10719 C>T) *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 نمونه‌ای 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 نمونه‌ای از نتایج PCR-RFLP ژن *Drosha* نشان داده شده است که ستون اول فردی با ژنوتیپ هموزیگوت سالم CC، ستون دوم فردی با ژنوتیپ 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 معنی‌داری مشاهده نشد ($P=0/430$). این در حالی است که فراوانی ژنوتیپی برای چندشکلی ژن *Drosha* از نظر آماری تفاوت معنی‌داری را بین دو گروه نشان داد ($P=0/008$). فراوانی ژنوتیپ‌ها در جدول‌های شماره ۲ و ۳ ذکر شده است. در این بررسی اختلاف ژنوتیپ‌ها در ۳ الگوی توارثی غالب، مغلوب و هم‌بارزی بین دو گروه بیمار و سالم مورد ارزیابی قرار گرفت. فراوانی ژنوتیپی در چندشکلی (rs 3742330) *Dicer* در الگوی توارثی هم‌بارزی اختلاف معنس‌داری را نشان نداد ($P=0/428$, CI:0/417-1/450; OR=0/778). در حالت مغلوب نیز به‌دلیل یکسان بودن فراوانی ژنوتیپ‌ها با حالت هم‌بارزی اختلاف معنی‌داری 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 به‌شمار نمی‌رود. این در حالی است که فراوانی ژنوتیپی چندشکلی (rs 10719) *Drosha* در الگوهای توارثی مغلوب و هم‌بارزی اختلاف معنی‌داری را نشان داده بودند؛ به‌ترتیب (۰/۰۱۸ , $P=0/887$, CI:0/271-0/490; OR=0/490) و ($P=0/002$, 4/338- OR=2/429; CI:1/359). نتایج این ارزیابی حاکی از آن است که چندشکلی در ژن *Drosha* خطر ابتلا زنان به سقط را افزایش می‌دهد. نسبت شانس (OR) در سطح اطمینان (CI) ۹۵ درصد برای هرکدام از ژنوتیپ‌های این دو ژن به‌طور جداگانه در جدول‌های شماره ۴ و ۵ ذکر شده است.

بحث

در این مطالعه به بررسی ارتباط بین چندشکلی ژن‌های *Dicer* و *Drosha* که در روند بیوژنز و پردازش miRNA نقش دارند با افزایش خطر سقط در میان زنان مبتلا به سقط مکرر با عامل ناشناخته پرداخته شد. یافته‌های این بررسی نشان داد که حامل بودن چندشکلی rs3742330 *A>G* ارتباط معنی‌داری با خطر سقط‌های مکرر ندارد. این در حالی است که حامل بودن چندشکلی rs10719C>T ارتباط معنی‌داری با خطر سقط مکرر نشان داد. *Drosha* یک آنزیم RNasII و جزء اصلی کمپلکسی است که پدیده بیوسنتز miRNAها را کاتالیز می‌کند. این ژن از نظر جایگاه سیتوژنتیکی روی کروموزوم 5p13.3 قرار دارد. *Drosha* جز خانواده‌ای از ریبونوکلئازها است که در تمام سلول‌های 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 به‌واسطه چندشکلی ژنتیکی به‌وجود می‌آید، با چندشکلی *Drosha* شدت بیشتری می‌یابد. چندشکلی *Dicer* می‌تواند باعث نقص در نحوه لانه‌گزینی جنین شده و این امر منجر

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]

به سقط جنین گردد [۱۰]. در مطالعات متعدد تأثیر چندشکلی‌های ژن‌های miRNA بر خطر سقط‌های مکرر گزارش‌هایی منتشر شده است، ولی تنها در یک بررسی ارتباط بین چندشکلی‌های ژن‌های ماشین پردازش کننده miRNAها 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 چندشکلی در ژن‌های ماشین پردازش کننده miRNAها 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 چندشکلی *Drosha* rs10719 در جمعیت کره به‌طور قابل توجهی خطر بدخیمی روده بزرگ را افزایش داده است [۲۱].

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

نام آغازگرها	توالی آغازگرها	اندازه محصولات PCR	آنزیم محدودالاثر	طول قطعات محصول PCR بعد از هضم آنزیمی
Dicer-F	5'-CCTGCCTTGACAACATGAAA-3	۲۳۲ جفت باز	Bshn1	هموزیگوت سالم AA=۲۳۲
Dicer-R	5'- GGTCTCAGTTTGGTGGCTTC-3'			هتروزیگوت AG=۲۳۲+۱۸۷+۴۵
				هتروزیگوت AG=۲۳۲+۱۸۷+۴۵
Drosha-F	5'-TAGTTTTCCTGCAGACAATGCA-3'	۱۶۸ جفت باز	Hin1II	هموزیگوت سالم CC=۱۴۳+۲۵
Drosha-R	5'-GTAATGCACATTCACCAAAGTCA-3'			هتروزیگوت CT=۱۶۸+۱۴۳+۲۵
				هموزیگوت جهش‌یافته TT=۱۶۸

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

چندشکلی *Dicer* (rs3742330 A>G)	گروه		جمع	*P*
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)		
	بیمار	سالم		
هموزیگوت سالم (AA)	۷۵ (٪۵۲)	۷۰ (٪۴۸)	۱۴۵	۰/۴۳۰
هتروزیگوت (AG)	۲۵ (٪۴۵)	۳۰ (٪۵۵)	۵۵	
هموزیگوت جهش‌یافته (GG)	۰	۰	۰	

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

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

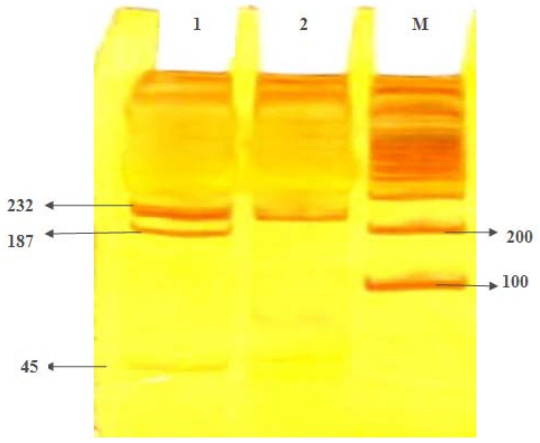
جدول شماره ۴- مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌های چندشکلی ژن *Dicer* در افراد سالم و بیماران با سابقه سقط مکرر مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی اردبیل طی سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۵

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

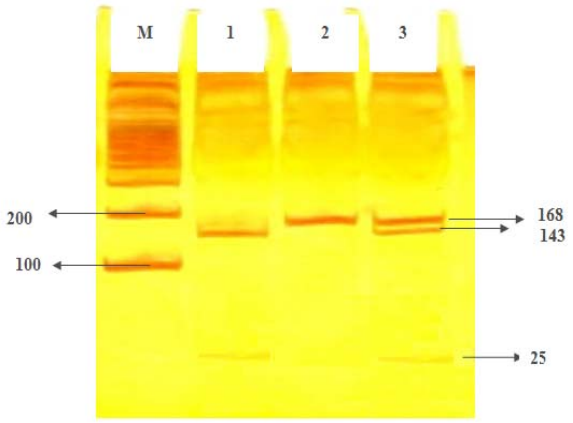
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]

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 ۱۳۹۶-۱۳۹۵

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



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 ۱٪. M: شاخص وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (100bp)، ۱: هموزیگوت CC، ۲: هموزیگوت TT، ۳: هتروزیگوت 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 rs3742330 *Dicer1* خطر ابتلا به بدخیمی حنجره را افزایش داده است؛ این در حالی است که ژنوتیپ TT در ژن rs6877842 *Drosha* 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 شیزوفرنی در ۲۵۶ فرد بیمار و ۲۵۲ فرد سالم پرداخته بودند، نشان داد که حضور چند-شکلی‌ها می‌توانند استعداد ابتلاء به شیزوفرنی 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-RFL 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 ژن *Dicer* rs3742330

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]

مطابق با نتایج تحقیق گذشته، ارتباطی بین گروه‌های سالم و بیمار نشان داده نشد و برعکس برای چندشکلی rs10719 ژن *Drosha* 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 درنظر 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 آناتومیکی 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 براین، 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 مطالعه قرار گیرند. علاوه براین، می‌توان در مطالعات بعدی میزان بیان ژن‌های هدف و تغییرات در سطح متیلاسیون پرموترهای ژن‌های مذکور را در این نوع زنان بررسی کرد. لازم به‌ذکر است که جهت تائید 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 تائید کرد.

نتیجه‌گیری

چندشکلی rs10719 *Drosha* عامل مستعدکننده‌ای برای سقط مکرر در زنان مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی اردبیل است و می‌تواند به‌عنوان 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, Knegt 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.
[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

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]

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. ***Menopause*** 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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-29]