

## **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 (rs10719 C>T) و Dicer (rs3742330 A>G) با خطر سقط مکرر

\*<sup>۱</sup> نگین محسنی ، <sup>۲</sup> سعید قربیان

## خلاصه:

سابقه و هدف: مولکول‌های Dicer و Drosha به عنوان 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 10719 C>T) و Drosha (rs 3742330 A>G) با خطر سقط مکرر بود.

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

نتایج: بین فراوانی ژنتیکی چندشکلی Dicer در افراد سالم و بیمار اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ( $P > 0.05$ ). از طرف دیگر، بین فراوانی ژنتیکی 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 به عنوان عامل خطر سقط مکرر در جمعیت مورد مطالعه نقشی ندارد.

واژگان کلیدی: سقط مکرر، چندشکلی، Dicer، Drosha

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

## مقدمه

در الواقع بیشتر سقط‌ها قبل از شناسایی، قبل و یا در حین قاعده‌گی بعدی دفع می‌شوند و تنها ۱۵-۲۰ درصد آن‌ها پس از تشخیص کلینیکی حاملگی اتفاق می‌افتد. بیش از نیمی از سقط‌های زودرس به دلیل ناهنجاری‌های کروموزومی حادث می‌گردد [۱، ۲]. عوامل ژنتیکی مختلفی از جمله ناهنجاری‌های ساختاری و عددی کروموزومی، جهش‌های ژنی و چندشکلی‌ها، تقاضه ساختمانی رحمی، عفونت‌های مزمن دستگاه تولید مثل، اختلالات سیستم اعصابی، هورمونی و ایمونولوژیکی به عنوان دلایل سقط‌های مکرر شناخته شده است [۳]. حالت‌های غیرطبیعی کروموزومی والدین 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 سقط‌های مکرر تشکیل می‌دهد. با این حال، در بیشتر موارد علت سقط‌های مکرر خودبه‌خودی غیرقابل توجیه باقی‌مانده است [۴]. اخیراً گزارش‌های متعددی منتشر شده است که مولکول‌های miRNA در فرآیندهای مهم و حیاتی از جمله لانه‌گزینی جنین، بقاء، 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 [۵]. از نظر اندازه این مولکول‌ها تقریباً ۱۸-۲۳ نوکلئوتید طول دارند که در تنظیم پس از نسخه‌برداری (Post-Transcriptional) از طریق پیوند با توالی‌های مکمل روی mRNA هدف تجزیه

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 ۱۰-۱۵ درصد از حاملگی‌ها منجر به سقط می‌شود و بیشترین میزان وقوع در ۳ ماهه اول بارداری است [۶]. سقط مکرر به عنوان یک سندروم تعریف شده است که علی‌رغم پیشرفت‌های زیاد در زمینه تشخیص پزشکی، هنوز تمامی علل سقط مکرر خودبه‌خودی به خوبی شناسایی نشده است. به علاوه، پرتوکل درمانی مناسبی برای همگان وجود ندارد و بیش از ۵۰ درصد از علل آن ناشناخته باقی‌مانده است [۷]. به طور کلی سقط خود-به‌خودی در ۷۵ درصد خانم‌هایی که اقدام به حاملگی می‌کنند حادث می‌گردد و طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی روزانه ۱۵۰۰۰ سقط در آمریکا اتفاق می‌افتد.

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد ژنتیک، گروه آموزشی ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

<sup>۲</sup> 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  
دوره‌پس: ۰۴۱ ۴۴۲۳۲۸۲۱۱

پست الکترونیک: ghorbani20@yahoo.com

تاریخ دیده‌گذشت: ۱۳۹۶/۷/۱۶  
تاریخ پذیرش (نهایی): ۱۳۹۷/۲/۱۱

توسط متخصصین مربوطه (زنان و نازابی 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 به صورت 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 قویت 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 ۱۳۹۵-۱۳۹۶ 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 به صورت کاملاً محترمانه 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 DNA اشباع (Salting Out) انجام شد [۱۸]. غلظت و خلوص Thermo PCR استخراج شده از طریق اسپکتروفتومتری با نانودرایپ (Scientific Amerika) تعیین شد. برای ارزیابی فراوانی چندشکلی ژن‌های *Drosha* و *Dicer* از روش PCR-RFLP استفاده شد. برای تکثیر ناحیه اختصاصی (100ng).DNA ۱µl (10pmole) Master Mix Red ۱3 µl آغازگرهای مستقیم و معکوس، ۱µl Ampliqon ۲x ۱۰۰ آب در حجم نهایی ۱۰۰ µl. دانمارک) و ۱۰۰ Ampliqon ۲x مخلوط شد. توالي آغازگرهای PCR با دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf، آلمان) [۱۹]. مراحل PCR با سیستم ایمنی مادری-جنینی مشارکت با یک مرحله واسرتست 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 ۷۲°C (۲۰ ثانیه) و ۷۲°C (۶۰ ثانیه) جهت تکثیر تکرار شد. در مرحله پایانی تکثیر نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه *Dicer* دنبال شد. محصولات واکنش PCR برای چندشکلی ژن *Drosha* باز شد. برای ژن *Drosha* جفت باز ۱۶۸ جفت باز بود. برای تأیید تکثیر محصولات اختصاصی قبل از برش با آنزیم‌های محدود‌الاثر، ابتدا محصولات روی ژل آکارز 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 HinII (Roche، سوئیس) هضم آنزیمی انجام

mRNA یا مهار شروع ترجمه را باعث می‌شوند. جایگاه اتصال برای این مولکول‌ها در ناحیه ترجمه نشده انتهای ۳'-UTR mRNA هدف واقع شده که در این حالت با miRNA اختصاصی پیوند یافته و به علت ممانعت از آغاز فرآیند ترجمه، بیان ژن هدف در سطح پایین‌تری تنظیم می‌گردد [۸]. مولکول‌های جاتی و مهمی چون *Dicer* در سلول‌های تروفو-پلاستی جفت جنین شناسایی شده‌اند که در بیوژنر و پردازش miRNA دخیل هستند [۱۰، ۹]. گزارش شده است که miRNA می‌تواند سلول‌های سرطانی از تنظیم خارج شده را مجددًا تنظیم کنند [۱۱]. احتمالاً چندشکلی‌هایی که در ۳'-UTR ژن‌های پردازش کننده mRNA 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 mRNA را تحت تأثیر قرار خواهد داد [۱۴]. جنین انسان تعداد زیادی mRNA تولید می‌کند که در رشد جنینی دخیل هستند. علاوه برآن، بیان مجموعه‌ای از ژن‌های در رحم مادر را تنظیم می‌کنند که با عکس العمل 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 *Drosha* و *Dicer* در سقط‌های مکرر مورد بررسی قرار گرفته است. در بررسی Jung و همکاران نشان داده شده است که ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی rs10719 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 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 *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 خود-به‌خودی با عامل ناشناخته مراجعت کننده به بیمارستان امام خمینی اردبیل طی سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۶ که دارای حداقل دارای ۳ بار سقط مکرر بودند، انتخاب شدند. زنانی وارد مطالعه شدند که

شکلی ژن *Drosha* از نظر آماری تفاوت معنی‌داری را بین دو گروه نشان داد ( $P=0.008$ ). فراوانی ژنتیپ‌ها در جدول‌های شماره ۲ و ۳ ذکر شده است. در این بررسی اختلاف ژنتیپ‌ها در ۳ الگوی توارثی غالب، مغلوب و هم‌بارزی بین دو گروه بیمار و سالم مورد ارزیابی قرار گرفت. فراوانی ژنتیپی در چندشکلی (rs-3742330) در الگوی توارثی هم‌بارزی اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ( $P=0.428$ ; OR=0.778; CI: 0.417-1.450,  $P=0.428$ ). در حالت مغلوب نیز به‌دلیل یکسان بودن فراوانی ژنتیپ‌ها 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 ژنتیپی چندشکلی (rs-10719) در الگوهای توارثی مغلوب و هم‌بارزی اختلاف معنی‌داری را نشان داده بودند؛ به‌ترتیب ( $P=0.018$ , OR=0.438;  $P=0.002$ ; CI: 0.271-0.887) و ( $P=0.002$ ; OR=0.490; CI: 0.271-0.429). 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 هر کدام از ژنتیپ‌های این دو ژن به‌طور جداگانه در جدول‌های شماره ۴ و ۵ ذکر شده است.

### بحث

در این مطالعه به بررسی ارتباط بین چندشکلی ژن‌های *Drosha* و *Dicer* که در روند بیوژنی 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 RNaseH و جزء اصلی کمپلکسی است که پدیده بیوستر miRNA را کاتالیز می‌کند. این ژن از نظر جایگاه سیتوژنتیکی روی کروموزوم 5p13.3 قرار دارد. 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 به وجود می‌آید، با چندشکلی *Drosha* شدت بیشتری می‌یابد. چندشکلی *Dicer* می‌تواند باعث نقص در نحوه لانه‌گزینی جنین شده و این امر منجر

شد. بدین‌منظور  $1\text{ }\mu\text{l}$  Buffer 10x PCR،  $2\text{ }\mu\text{l}$  مخصوص  $10\text{ }\mu\text{l}$  آنزیم و  $1\text{ }\mu\text{l}$  آب مخلوط شده و به مدت ۴ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  انکویه شدند. جهت شناسایی قطعات حاصل از برش، محصولات روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۰ درصد جدا شده و با رنگ‌آمیزی نیترات نقره شناسایی شدند. بنابراین، احتمال ۳ نوع ژنتیپ (هموزیگوت سالم) AA، (هتروزیگوت) AG و (هموزیگوت جهش‌یافته) GG برای چندشکلی ژن *Dicer* و ۳ نوع ژنتیپ (هموزیگوت سالم) CC، (هتروزیگوت) CT و (هموزیگوت جهش‌یافته) TT برای چندشکلی ژن *Drosha* وجود داشت (جدول شماره ۱). بعد از بررسی تک‌تک افراد از نظر ژنتیپ، داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۲۳ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. فراوانی ۳ حالت هموژیگوت سالم، هتروزیگوت و هموژیگوت جهش‌یافته در دو گروه سالم و شاهد برای این چندشکلی‌ها با استفاده از آزمون آماری مجذور کای مورد بررسی قرار گرفت و نتایج بدست‌آمده 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  $30.71\pm 4.28$  سال و در زنان سالم  $31.24\pm 4.80$  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 A>G) چندشکلی *Dicer* (rs 3742330) و (rs 10719 C>T) با خطر سقط مکرر در ۱۰۰ زن با تاریخچه حداقل سه بار سقط مکرر و ۱۰۰ زن بدون سابقه سقط و حداقل با یک بار دارای 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 ژنتیپ هتروزیگوت CT و ستون دوم فردی با ژنتیپ هموژیگوت سالم CC بود. در شکل شماره ۲ نمونه‌ای از نتایج PCR-RFLP ژن *Drosha* نشان داده شده است که ستون اول فردی با ژنتیپ هموژیگوت سالم CC، ستون دوم فردی با ژنو-تیپ هموژیگوت CT و ستون سوم فردی با ژنتیپ هتروزیگوت CT بود. جهت تعیین اختلاف فراوانی ژنتیپی 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 ژنتیپی برای چند-

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

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

جدول شماره ۱- توالی آغازگرهای، 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'    | جفت باز ۲۳۲        | Bshn1             | AA=۲۳۲ هموزیگوت سالم                  |
| Dicer-R      | 5'-GGTCTCAGTTGGTGGCTTC-3'     |                    |                   | AG=۲۳۲+۱۸۷+۴۵ هتروزیگوت               |
| Drosha-F     | 5'-TAGTTTCCTGCAGACAATGCA-3'   | جفت باز ۱۶۸        | Hin1II            | CC=۱۴۳+۲۵ هموزیگوت سالم               |
| Drosha-R     | 5'-GTAATGCACATTACCAAAAGTCA-3' |                    |                   | CT=۱۶۸+۱۴۳+۲۵ هتروزیگوت               |
|              |                               |                    |                   | TT=۱۶۸ هموزیگوت جهش‌یافته             |

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

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

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

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

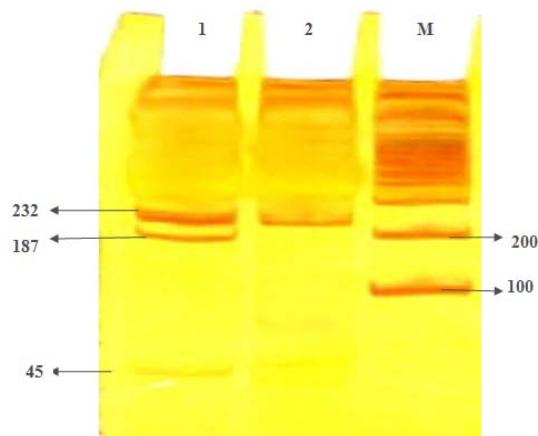
جدول شماره ۴- مقایسه فراوانی ژنتوتیپ‌های چندشکلی ژن *Dicer* در افراد سالم و بیماران با سابقه سقط مکرر مراجعت کننده به بیمارستان امام خمینی اردبیل طی سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۶

| P             | نسبت شانس | فاصله اطمینان ۹۵% | گروه         |       | Dicer (rs3742330 A>G)   |  |
|---------------|-----------|-------------------|--------------|-------|-------------------------|--|
|               |           |                   | تعداد (درصد) |       |                         |  |
|               |           |                   | سالم         | بیمار |                         |  |
| الگوی همبارزی |           |                   |              |       |                         |  |
| ۰/۴۲۸         | ۰/۴۱۷     | ۱/۴۵۰             | ۰/۷۷۸        | ۵۵    | (٪۵۵) ۳۰ AG             |  |
|               |           |                   |              | ۱۴۵   | (٪۴۸) ۷۰ (٪۵۲) ۷۵ AA+GG |  |

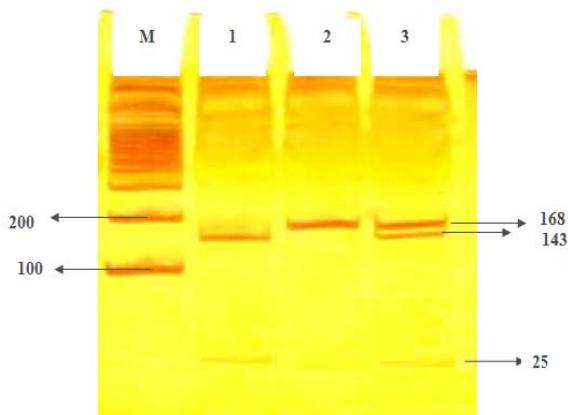
جدول شماره ۵- مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌های چندشکلی ژن *Drosha* در افراد سالم و بیماران با سابقه سقط مکرر مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی اردبیل طی سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۶

| P              | فاصله اطمینان ۹۵٪ |        | نسبت شناس | جمع   | گروه         |              | چندشکلی (Drosha rs10719 C>T) |
|----------------|-------------------|--------|-----------|-------|--------------|--------------|------------------------------|
|                | پایین             | بالا   |           |       | تعداد (درصد) | تعداد (درصد) |                              |
|                |                   |        | سالم      | بیمار |              |              |                              |
| الگوی هم‌بارزی |                   |        |           |       |              |              |                              |
| ۰/۰۰۲*         | ۱/۳۵۹             | ۴/۳۳۸  | ۲/۴۲۹     | ۱۱۹   | (٪۴۱) ۴۹     | (٪۵۹) ۷۰     | CT                           |
|                |                   |        |           | ۸۱    | (٪۵۳) ۵۱     | (٪۴۷) ۳۰     | CC+TT                        |
| الگوی غالب     |                   |        |           |       |              |              |                              |
| ۰/۱۲۱          | ۰/۷۲۴             | ۱۰/۹۲۴ | ۲/۸۱۲     | ۱۸۹   | (٪۴۹) ۹۲     | (٪۵۱) ۹۷     | CT+TT                        |
|                |                   |        |           | ۱۱    | (٪۷۳) ۸      | (٪۲۷) ۳      | CC                           |
| الگوی مغلوب    |                   |        |           |       |              |              |                              |
| ۰/۰۱۸*         | ۰/۲۷۱             | ۰/۸۸۷  | ۰/۴۹۰     | ۷۰    | (٪۶۱) ۴۳     | (٪۳۹) ۲۷     | TT                           |
|                |                   |        |           | ۱۳۰   | (٪۴۴) ۵۷     | (٪۵۶) ۷۳     | CC+CT                        |

Osuch-Wojciekiewicz 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 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 چندشکلی‌ها می‌توانند استعداد ابتلا به شیزوفرنی را افزایش دهد [۲۳]. Zhou 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 مخاطری 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 ۲۲۸ زن سالم و ۳۳۸ زن با حداقل ۲ بار و یا بیشتر سابقه سقط انجام شده، چندشکلی‌های PCR-RFLP با روش *Drosha* (rs10719) و *Dicer* (rs3742330) 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



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



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

مطالعه قرار گیرند. علاوه براین، می‌توان در مطالعات بعدی میزان بیان ژن‌های هدف و تغییرات در سطح متیلاسیون پرموتراهای ژن‌های مذکور را در این نوع زنان بررسی کرد. لازم به ذکر 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 *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, 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

مطابق با نتایج تحقیق گذشته، ارتباطی بین گروه‌های سالم و بیمار نشان داده نشد و بر عکس برای چندشکلی *Drosha rs10719* ژن برخلاف گزارش قبلی، ارتباط معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه نشان داده شد. تناقضات دیده شده بین مطالعات انجام شده روی این چندشکلی‌ها شاید به خاطر اختلاف در توزیع جغرافیایی آللی، اختلاف‌های نژادی و قومی 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 آناتومیکی و هیچ اختلال بالینی دیگری نداشتند و لذا فرضیه ارتباط معنی‌داری چندشکلی *Drosha* با خطر سقط‌های مکرر خودبه‌خودی بیشتر قوت می‌باید. 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. ولذا پیشنهاد می‌گردد که چندشکلی‌های بیشتری از این ژن‌ها مورد

- 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, Bruzgilewicz 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.