

بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم ژن های مجموعه پردازشی **MicroRNA**
(*RAN rs14035, DICER rs3742330*) و سقط مکرر خودبخودی در شهر تهران

امیر فلاح سهی^۱، سعید ذاکر بستان آباد^{۱*}، سینا میرزا احمدی^۲

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند، ایران
۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران

چکیده:

سابقه و هدف: سقط مکرر خودبخودی به وقوع حداقل سه سقط پشت سر هم قبل از هفته بیستم بارداری اطلاق می شود. مولکول های کلیدی مانند *Ran* و *Dicer* در ساخت زیستی *microRNA* دخالت دارند. *miRNA* کلید تنظیمی بسیاری از مسیرهای زیستی می باشند. هدف از این مطالعه تعیین ارتباط بین پلی مورفیسم موجود در ژن های مجموعه پردازشی *miRNA (DICER rs3742330, RAN rs14035)* و سقط مکرر خودبخودی در زنان شهر تهران بود.

مواد و روش ها: در یک بررسی شاهد-مورد، تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم *DICER* در ۲۰ زن سالم (دارای حداقل یک فرزند سالم و بدون از دست دادن حاملگی) و ۵۰ زن بیمار مبتلا به سقط مکرر خودبخودی ناشناخته با روش *Tetra ARMS PCR* انجام شد، در بررسی شاهد-مورد دیگری تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم *RAN* در ۱۰ زن سالم (دارای حداقل یک فرزند سالم و بدون از دست دادن حاملگی) و ۴۰ زن بیمار مبتلا به سقط مکرر خودبخودی ناشناخته با روش *PCR* و توالی یابی انجام گرفت. داده های آماری دو پلی مورفیسم توسط آزمون های مربع کای و تست دقیق فیشر تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ و آلل های پلی مورفیسم (*DICER(rs3742330)* و سقط مکرر خودبخودی ناشناخته در گروه های مورد مطالعه نشان داده نشد ($p > 0.05$)، ژنوتیپ های پلی مورفیسم (*RAN(rs14035)* در گروه های مذکور، ارتباط معنی داری با سقط مکرر خودبخودی ناشناخته نشان داد ($p = 0.001$)، اما ارتباطی بین این عارضه و آلل های این پلی مورفیسم نیز مشاهده نشد ($p > 0.05$).

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که بین سقط مکرر خودبخودی و پلی مورفیسم (*RAN(rs14035)* ارتباط معنی داری وجود دارد، اما این عارضه با پلی مورفیسم (*DICER(rs3742330)* ارتباط معنی داری ندارد.

واژه های کلیدی: سقط مکرر خود بخودی، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی، واکنش زنجیره پلیمرز ترا آرمز، توالی یابی، رن، دیسر، ژن های مجموعه پردازشی

مقدمه:

سقط بیش تر بوده و با افزایش سن جنین کاهش می یابد طوری که زیر شش هفته احتمال سقط ۲۲٪ و بعد از ۱۰ هفته ۲٪ می باشد (۲۴،۸). سقط مکرر بر دو نوع اولیه و ثانویه است. در نوع اولیه، بلافاصله چند سقط متوالی رخ می دهد ولی در نوع ثانویه، پس از یک بارداری موفق، سقط های متوالی آغاز می شوند (۲۲). با توجه به این که باروری در اکثر فرهنگ ها از ارزش بالایی برخوردار است و آرزوی داشتن فرزند یکی از اساسی ترین محرک های انسانی است، اگر تلاش برای حاملگی با شکست مواجه شود، ممکن است به یک احساس مخرب و یک واقعه تنش زا بدل گشته و منجر به مختل شدن سلامت روانی فرد شود (۱۲). از دلایل شناخته شده برای سقط جنین می توان به عوامل محیطی، ژنتیکی و پاتولوژیکی اشاره کرد.

شایع ترین عارضه در سه ماهه اول و دوم حاملگی، سقط جنین است. مفهوم سقط جنین به ختم بارداری پیش از هفته بیستم اطلاق می شود. در این میان، زنانی که بیش از دو بار سقط جنین پی در پی را تجربه می کنند دچار سقط مکرر هستند (۱). در اوایل بارداری احتمال

نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی،

دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند، ایران

پست الکترونیکی: saeedzaker20@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۲

از رونویسی ژن، بیان آن را از طریق برش یا مهار ترجمه mRNA هدف کنترل می کنند. غالب ترین مکانیسم مهار ترجمه mRNA مکانیسم "خاموشی ژنی" بوده و از روش به کارگیری فاکتور برهم زننده تجمع ریبوزوم اعمال می شود (۱۹). miRNAهایی که به مقدار زیاد در جفت تولید می شوند به احتمال در تمایز جفت و نگه داری حاملگی درگیرند و با توجه به این که حاملگی سالم توسط ژن های مادری و جنینی کنترل می شود، مطالعه این miRNAها در حاملگی سالم و سقط مکرر جنین لازم است (۱۰). هدف از انجام این تحقیق تعیین ارتباط بین پلی مورفیسم ژن های مجموعه پردازشی miRNA (*DICERrs3742330*, *RANrs14035*) و سقط مکرر خود به خودی در زنان شهر تهران بود.

مواد و روش ها:

برای این مطالعه مورد-شاهد، ۵ سی سی خون ۵۰ خانم دارای شرایط سقط مکرر (حداقل ۳ سقط) که از نظر هیستروسکوپی، عفونت، انعقاد خون و مقادیر هورمونی نرمال می باشد به عنوان بیمار و خون ۲۰ خانم نرمال بدون داشتن سقط با داشتن حاملگی سالم از آزمایشگاه مسعود جمع آوری شد. برای جلوگیری از انعقاد خون، آن ها در لوله های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در این مطالعه از واکنش زنجیره پلی مرز تترآ آرمز (TetraARMS PCR) برای تعیین ژنوتیپ های پلی مورفیسم (*DICER(rs3742330)* و از واکنش زنجیره پلی مرز و توالی یابی سنگر برای تعیین ژنوتیپ های پلی مورفیسم (*RAN(rs14035)* استفاده گردید. در واکنش زنجیره پلی مرز تترآ آرمز از ۴ پرایمر در یک واکنش برای تعیین ژنوتیپ استفاده می شود. در ابتدای واکنش، دو پرایمر غیر آلل-ویژه ناحیه ای که پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی را در برمی گیرد را بسط می دهد، که پرایمرهای خارجی نامیده می شوند، سپس با تولید قطعه-های پرایمرهای خارجی، این قطعه ها به عنوان الگو برای دو پرایم آلل-ویژه داخلی، قطعه های آلل-ویژه را می سازند (۱۸). دو قطعه آلل-ویژه به خاطر اندازه های مختلفشان در یک ژل آگارز تمیز داده می شوند (۲۵). طرح شماتیک

یک سری دلایل شناخته نشده برای سقط مکرر جنین وجود دارد که اینگونه سقطها را سقط مکرر خود به خودی یا ایدوپاتیک می نامند (۲۰). miRNAها مولکول های ریبونوکلئوتید اسید اندوژن کوتاه (حدود ۲۲ نوکلئوتید) غیر کد شونده هستند که بیان ژن را در مرحله بعد از رونویسی توسط سرکوب ترجمه ای ویژه-سکانس یا کاهش mRNA تنظیم می کنند (۱۷). به طور تقریبی ۳۰٪ ژن های انسان هدف های miRNAهای حفاظت شده می باشند، که نشان می دهد miRNAها کلید تنظیمی بسیاری از مسیرهای زیستی می باشد (۱۶). بیوژنز miRNAها در هسته و سیتوپلاسم صورت می گیرد. رونوشت آغازین miRNAها چندین کیلو جفت باز طول دارد و توسط RNA پلیمراز II رونویسی شده و پلی آدنیله می شود. ساختار ساقه-حلقه این رونوشتها توسط یک کمپلکس آنزیمی مستقر در هسته که ۶۵۰ کیلودالتون وزن دارد تشخیص داده شده و پردازش می شود. کمپلکس مذکور حاوی یک RNase III مخصوص برش RNA دو رشته ای به نام Droscha و پروتئین متصل شونده به RNA دو رشته ای به نام DGCR8 در انسان و Pasha در مگس می باشد (۲). پردازش اولیه منجر به ایجاد یک پیش ساز سنجاق سری ۱۱۰ الی ۶۰ نوکلئوتیدی می شود، که این پیش ساز توسط فاکتور صادرکننده هسته ای Exportin-گو فاکتور کمکی GTP-Ran به سیتوپلاسم منتقل می شود. در سیتوپلاسم، RNase III دیگری به نام Dicer منجر به پردازش نهایی میکرو RNA می شود، که همراه عامل کمکی متصل شونده به RNA دو رشته ای که در انسان HIV1-TRBP نامیده می شود، لوپ انتهایی Pri-miRNA را برش می دهد و میکرو RNA (دو رشته ای) ۱۹-۲۲ نوکلئوتیدی را ایجاد می کند (۲۳). با کمک Dicer یک کمپلکس خاموش کننده القاء شده توسط RISC ایجاد می شود. از آنجائی که فقط یکی از رشته های دوتایی میکرو RNA می تواند نقش رشته راهنما و هدایت کننده RISC به mRNAهای هدف را براساس جفت شدن با mRNA ایفا کند، رشته دوم حذف می شود. رشته حاوی جفت باز ضعیف در پایانه ۵' به عنوان رشته راهنما انتخاب می گردد. میکرو RNAهای متصل شونده به RISC به ناحیه ترجمه نشدنی ۳' mRNA هم جنس جفت می شوند و پس

بیمار و ۲۰ نمونه DNA زن سالم) استفاده شد، سپس واکنش PCR انجام شد، مراحل واکنش های PCR در جدول نشان داده شده است (جدول ۲).

جدول ۲: مراحل واکنش های PCR برای تعیین هر دو پلی مورفیسم دمای ۵۷ درجه سانتی گراد دمای انیلینگ بهینه بود.

مرحله	دما	زمان	تعداد سیکل
دنا تراسیون اولیه	۹۴°C	۵ دقیقه	۱
دنا تراسیون	۹۴°C	۴۵ ثانیه	۳۰
انیلینگ	۵۷°C	۱ دقیقه	
اکستنشن	۷۲°C	۱ دقیقه	

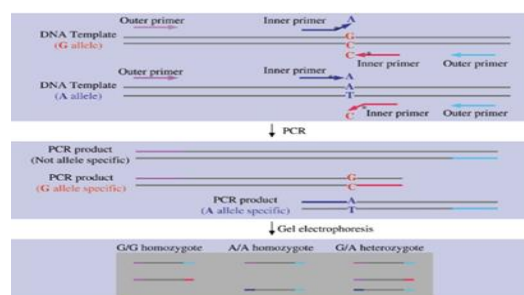
پس از انجام واکنش، محصول های آن در ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی Safe stain الکتروفورز شدند. پس از انجام الکتروفورز با قرار دادن ژل تحت اشعه فرابنفش و تحلیل آن ژنوتیپ های rs3742330 مشخص شد، برای اطمینان از نتایج چند نمونه به صورت شانسی توالی یابی شدند. به منظور ارزیابی تفاوت در فراوانی ژنوتیپی و آلی این پلی مورفیسم آزمون های مربع کای و تست دقیق فیشر بر روی اطلاعات به دست آمده انجام گرفت، نسبت شانس (OR) و حدود اطمینان ۹۵٪ نیز محاسبه شد. در آزمون سطح معنی داری ۵ درصد در نظر گرفته شد. نرم افزار مورد استفاده SPSS ورژن ۲۲ بود. پرایمرهای Forward و Reverse برای تعیین پلی مورفیسم rs14035 به روش توالی یابی سنگر طراحی شد و از شرکت ژن فن آوران خریداری شدند، توالی پرایمرها در جدول نشان داده شده است (جدول ۳).

جدول ۳: توالی پرایمرهای طراحی شده برای PCR. طول محصول ۲ پرایمر طراحی شده ۴۲۵ جفت باز می باشد.

3742330OF	5'- TTCTTCTGAGATAATGCAAATGGGT- 3'
3742330OR	5'- ATGAAACTGAGGCTGCTTGGTTCAT - 3'
3742330G	5'- GCTTCAATCTGTGTAAGGGATTCCG -3'
3742330A	5'- AAATATTGGATCTTGTCTGTTAGGGGT - 3'

برای تعیین ژنوتیپ RAN(rs14035) به روش PCR و توالی یابی از مخلوط ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix 2x تهیه شده از شرکت سیناکلون (حاوی آنزیم Taq DNA Polymerase) و ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲ میکرولیتر از هر نمونه DNA استخراج شده، و در نهایت از هر ۱۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه شده، و در نهایت از هر ۱۰ میکرولیتر برای هر

نحوه عملکرد پرایمرها و تعیین ژنوتیپ در واکنش زنجیره پلیمرز تترا آرمز در شکل نشان داده شده است (شکل ۱).



شکل ۱: طرح شماتیک نحوه عملکرد Tetra ARMS PCR. پس از برش توالی ها توسط

پرایمرهای خارجی و ژنوتیپ با برش آلل-ویژه پرایمر های داخلی مشخص می شود.

برای استخراج DNA نمونه های خون از کیت استخراج DNA با نام cinna pure DNA kit که از شرکت سینا کلون تهیه شد، استفاده گردید. سپس ۴ پرایمر Outer Reverse, Forward, Inner و Inner Forward برای تعیین پلی مورفیسم rs3742330 به روش تترا پرایمر آرمز طراحی شدند و از شرکت ژن فن آوران خریداری شدند، توالی پرایمرها در جدول نشان داده شده است (جدول ۱). طول محصول در تعیین پلی مورفیسم rs3742330 به روش Tetra ARMS PCR برای دو پرایمر خارجی ۲۹۳ جفت باز و برای آلل A و G به ترتیب ۱۴۵ و ۲۰۴ جفت باز می باشد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای طراحی شده برای Tetra ARMS PC. پرایمر خارجی Outer forward

14035F	5'- CATGTCACACAAACTGATGATGACAG -3'
14035R	5'- AGTCTAGGAGTACCTGAAAAGTGGGT- 3'

و Outer reverse، ۲ پرایمر داخلی inner forward که ویژه آلل G و inner reverse که ویژه آلل A می باشد.

برای تعیین ژنوتیپ DICER(rs3742330) به روش Tetra ARMS PCR از مخلوط ۱۲/۵ میکرولیتر 2x Master Mix تهیه شده از شرکت سیناکلون (حاوی آنزیم Taq DNA Polymerase) و ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲ میکرولیتر از هر نمونه DNA استخراج شده، و در نهایت از هر ۱۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه شده، و در نهایت از هر ۱۰ میکرولیتر روغن برای جلوگیری از تبخیر و کم شدن حجم مایع برای هر یک از نمونه ها (۵۰ نمونه DNA زن

محاسبه شد. در آزمون سطح معنی داری ۵ درصد در نظر گرفته شد. نرم افزار مورد استفاده SPSS ورژن ۲۲ بود.

یافته‌ها:

در این مطالعه تحلیل ژنوتیپ‌ها و آلل‌های پلی‌مورفیسم rs3742330 بین دو گروه سالم و بیمار، ارتباط معنی داری بین سقط مکرر خود به خودی و این پلی‌مورفیسم نشان نداد (در تحلیل ژنوتیپ $P=0/430$ ، Value = در تحلیل آلل $P=0/446$). هموزیگوت AA در هر دو گروه دارای بیشترین فراوانی بود و هموزیگوت GG در هیچ یک از گروه‌ها یافت نشد، نتایج تحلیل آماری ژنوتیپ‌ها و آلل‌های این پلی‌مورفیسم در جدول نشان داده شده است (جدول ۴ و ۵).

جدول ۴: فراوانی ژنوتیپی پلی‌مورفیسم $DICER(rs3742330)$. نتایج آماری ارتباط معنی داری بین دو گروه نشان نداد.

ژنوتیپ		گروه		کل	بحث آماری		
		بیمار	کنترل		P_Value	OR	CI
GA	تعداد	۸	۱	۹	۰/۴۳۰	۰/۲۷۶	۰/۰۳۲ to ۲/۳۶۸
	درصد در گروه	۱۶	۵	۱۲/۹			
AA	تعداد	۴۲	۱۹	۶۱			
	درصد در گروه	۸۴	۹۵	۸۷/۱			
GG	تعداد	۰	۰	۰			
	درصد در گروه	۰	۰	۰			
کل	تعداد	۵۰	۲۰	۷۰			
	درصد در گروه	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰			
	درصد کل	۷۱/۴	۲۸/۶	۱۰۰			

جدول ۵: فراوانی آللی پلی‌مورفیسم $DICER(rs3742330)$. نتایج آماری ارتباط معنی داری بین دو گروه نشان نداد.

آلل‌ها	نرمال	بیمار	کل	P_Value	OR	CI
G آلل	۲/۵٪	۸٪	۶/۴	۰/۴۴۶		۰/۴۱۰ to ۲۸/۰۳۷
A آلل	۹۷/۵٪	۲۹٪	۹۳/۶		۳/۳۹	

داده شده است (جدول ۶). آلل‌های این پلی‌مورفیسم ارتباط معنی داری بین سقط مکرر خود به خودی و این پلی‌مورفیسم نشان نداد ($P=0/109$)، نتایج این تحلیل‌های آماری در جدول آمده است (جدول ۷).

جدول ۶: فراوانی ژنوتیپی پلی‌مورفیسم $RAN(rs14035)$. نتایج آماری ارتباط معنی داری بین سقط مکرر خود به خودی و این پلی‌مورفیسم نشان داد.

ژنوتیپ		گروه		کل	بحث آماری		
		بیمار	کنترل		P_Value	OR	CI
CC	تعداد	۲۵	۱	۲۶	۰/۰۰۱	۰/۱۷۱	۰/۰۵۵ to ۰/۵۳۳
	درصد در گروه	۶۲/۵	۱۰	۵۲			
TT	تعداد	۸	۱	۹			
	درصد در گروه	۲۰	۱۰	۱۸			
CT	تعداد	۷	۸	۱۵			
	درصد در گروه	۱۷/۵	۸۰	۳۰			
کل	تعداد	۴۰	۱۰	۵۰			
	درصد در گروه	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰			
	درصد کل	۸۰	۲۰	۱۰۰			

جدول ۷: فراوانی آللی پلی مورفیسیم *RAN(rs14035)*، نتایج آماری ارتباط معنی داری بین این پلی مورفیسیم و سقط مکرر خود به خودی نشان نداد.

آلل ها	نرمال	بیمار	کل	P_Value	OR	CI
آلل C	۵۰٪	٪۷۱/۳	۶۷٪	۰/۱۰۹	۰/۴۰۴	۰/۱۴۸ to ۱/۰۹۸
آلل T	۵۰٪	٪۲۸/۷	۳۳٪			

بحث

در این مطالعه ارتباط بین پلی مورفیسیم ژن های مجموعه پردازشی miRNA شامل *RAN(rs14035)* و *DICER(rs3742330)* و سقط مکرر خود به خودی بررسی شد. این مطالعه ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسیم *rs14035* و سقط مکرر خود به خودی نشان داد و ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسیم (*rs3742330*) و سقط مکرر خود به خودی نشان نداد. در مطالعه های شبیه مطالعه کنونی یانگ ووک جونگ و همکاران ارتباط بین پلی مورفیسیم های ژن های مجموعه پردازشی با سقط مکرر خود به خودی را در زنان کره ای بررسی کردند که در آن مطالعه ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسیم *rs14035* و سقط مکرر خود به خودی ناشناخته وجود داشت و ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسیم *rs3742330* و این عارضه وجود نداشت (۲۶)، که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت. مطالعات قدیمی تر نشان داده است که miRNA نقش کلیدی در مسیرهای تنظیمی متفاوت دارد، که شامل کنترل زمان بندی تکوینی، تمایز سلول های خونی، آپوپتوز، تکثیر سلولی و تکوین اندام می باشد (۱۴) و همچنین miRNAها بر ایجاد تعداد فراوانی از بیماری های چند عاملی انسان هم چون سرطان ها (۴)، بیماری های قلبی عروقی (۲۱)، اختلالات عضلانی ابتدایی (۹) و دیابت (۱۳) دلالت دارند. مطالعه ها بر روی بیان miRNA در چندین اندام نشان داده است که بیان miRNA ویژه هر بافت است و به مقدار فراوان در جفت بیان می شود (۱۵). به علاوه miRNAها بیان ژن رحمی را تنظیم می کنند که با پاسخ های التهابی در طی دوره لانه گزینی اولیه در ارتباط هستند و در قدرت تحمل ایمنی مادر-جنینی شرکت می کنند (۵). گزارش های فراوانی وجود دارد که ارتباط بیان miRNA نابه جا با تعداد فراوانی از بیماری های وابسته به تولید مثل انسان را نشان می دهد (۱۱). همچنین مطالعه های زیادی گزارش داده اند که پلی مورفیسیم های ژنتیکی با سقط مکرر جنین در ارتباط هستند (۶). مولکول های کلیدی که در بیوژنر miRNA دخالت دارند مانند *XPO5.DROSHA*، *DICER*، در سلول های تروفوبلاستی شناسایی شده اند که این موضوع که مسیر بیوژنر در جفت انسان فعال است را

تأیید می کند (۷). تحقیقات فراوانی در کشور ایران و کشورهای خارجی در مورد ارتباط miRNAها با سقط مکرر خود به خودی وجود دارد که بسیاری از موارد وجود ارتباط معنی داری بین miRNA و سقط مکرر خود به خودی را نشان می دهد. جمعیت ایران به عنوان یکی از جمعیت های کهن و متعلق به تمدن ایران با منشأ هند و اروپایی شناخته می شود. شواهد تاریخی نشان دهنده هم ریشه بودن جمعیت ایران با جمعیت های اروپا و شمال هند است. مطالعه های متعددی در زمینه ژنتیک انسانی بر روی پلی مورفیسیم های ژنی در جمعیت های مختلف دنیا به انجام رسیده است. براساس این مطالعه های ثابت شده است که هرچه قرابت ژنتیکی در ریشه های اصلی دو جمعیت بیش تر باشد درصد و نوع پلی مورفیسیم های ژنی خاص در آن جمعیت ها شباهت بیشتری به هم دارند. با توجه به این که زمینه ژنتیکی افراد در گروه ها و جوامع مختلف از تنوع زیادی برخوردار است (۳)، لذا انجام مطالعه های در دیگر قومیت های نژادی کشور بسیار سودمند خواهد بود. با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعه اخیر بهتر است این بررسی بر روی تعداد بیشتری از افراد انجام شود تا با اطمینان بیشتری بتوان ارتباط بین سقط مکرر خود به خودی و پلی مورفیسیم *RAN* و *DICER* را گزارش نمود و در نهایت گامی در جهت درمان بیماران برداشته شود.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه حاکی از آن است که پلی مورفیسیم *DICER(rs3742330)* ارتباط معنی داری با سقط مکرر خود به خودی ندارد، اما پلی مورفیسیم *RAN(rs14035)* ارتباط معنی داری با سقط مکرر خود به خودی دارد.

سپاسگزاری

از کلیه افراد شرکت کننده در این طرح تحقیقاتی و موسسه فام تشکر و قدردانی می گردد.

منابع:

- 1-Aruna M, Reddy BM. Recurrent spontaneous abortions: An overview of the Genetic and NonGenetic backgrounds. *Int. J. Hum. Genet*, 2006; 6: 109- 117.
- 2-Babashah S, Soleimani M. The oncogenic and tumour suppressive roles of microRNAs in cancer and apoptosis. *Eur J Cancer*, 2011; 47(8): 1127-1137.
- 3-Barley J, Blackwood A, Carter ND, Crews DE, Cruickshank JK, Jeffery S, et al. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism: association with ethnic origin. *J Hypertens*, 1994; 12(8): 955-957.
- 4-Calin, G. Croce, C. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*, 2006; 6: 857-866.
- 5-Chakrabarty A, Tranguch S, Daikoku T, Jensen K, Furneaux H, Dey SK. MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007; 104: 15144-15149.
- 6-Choi YS, Kwon H, Kim JH, Shin JE, Choi Y, Yoon T. Haplotype-based association of ACE I/D, AT1R 1166A.C, and AGT M235T polymorphisms in renin-angiotensin-aldosterone system genes in Korean women with idiopathic recurrent spontaneous abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2011; 158: 225- 228.
- 7-Donker RB, Mouillet JF, Nelson DM, Sadovsky Y. The expression of Argonaute2 and related microRNA biogenesis proteins in normal and hypoxic trophoblasts. *Mol Hum Reprod*, 2007; 13: 273-279.
- 8-Edmonds DK, Lindsay KS, Miller JF, et al. Early embryonic mortality in women. *Fertil Steril*, 1982; 38: 447.
- 9-Eisenberg I, Eran A, Nishino I, Moggio M, Lamperti C, Amato A, et al. Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proceedings of National Academy of Science(USA)*, 2007; 104 43: 17016-17021.
- 10-El-Shorafa H, Sharif FA. dysregulation of micro-RNA contributes to the risk of unexplained recurrent pregnancy loss. *Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol*, 2013; 2.3: 330-335.
- 11-Enquobahrie DA, Abetew DF, Sorensen TK, Willoughby D, Chidambaram K, et al. Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 2011; 204(178), 112-121.
- 12-Haji-Aghajani S, Asadi Noghabi AA. *Psychiatric nursing, mental health*, 1st ed, Tehran, Boshra, 2000, p 16.
- 13-Joglekar M, Parekh V, Hardikar A. Islet-specific microRNAs in pancreas development, regeneration and diabetes. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2011; 49 6: 401-408.
- 14-Kim E. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2005; 6: 376-385.
- 15-Kotlabova K, Doucha J, Hromadnikova I, Placental-specific microRNA in maternal circulation-identification of appropriate pregnancy-associated microRNAs with diagnostic potential. *Journal of Reproductive Immunology*, 2011; 89(2): 185- 191.
- 16-Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2005; 120: 15-20.
- 17-O'Toole AS, Miller S, Haines N, Zink MC, Serra MJ. Comprehensive thermodynamic analysis of 3' double-nucleotide overhangs neighboring Watson-Crick terminal base pairs. *Nucleic Acids Res*, 2006; 34: 3338-3344.
- 18-Rubio, M. Caranta, C. Palloix, A. Functional markers for selection of potyvirus resistance alleles at the pvr2-eIF4E locus in pepper using tetra-primer ARMS-PCR. *Genome*, 2008; 51,9: 767-771.
- 19-Schaefer A, Jung M, Kristiansen G, Lein M, Schrader M, Miller K, et al. MicroRNAs and cancer: current state and future perspectives in urologic oncology. *Urol Oncol*, 2010; 28(1): 4-13.
- 20-Stephenson M D, Awartani K A, Robinson W P. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod*, 2002; 17(2): 446-51.

- 21-Thum T, Catalucci D, Bauersachs J. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovascular Research*, 2008; 79.4: 562-570.
- 22-Tulppala M, Ylikorkala O. Recurrent spontaneous abortion: where do we stand now?. *Ann Med*, 1991; 23(6): 603-604.
- 23-Wiener EA . The role of microRNAs in cancer: no small matter. *Eur J Cancer*, 2007; 43(10): 1529-1544.
- 24-Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, et al. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med*, 1988; 319: 189.
- 25-Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins A R, Day I N. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research*, 2001; 29: 17.
- 26-Jung YW, Jeon YJ, Rah H, Kim JH, Shin JE, et al. Genetic Variants in MicroRNA Machinery Genes Are Associate with Idiopathic Recurrent Pregnancy Loss Risk. *PLoS ONE*, 2014 9(4): e95803.

