

بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم ژن های دستگاه (DROSHA & EXPORTIN5) و miRNA و سقط مکرر خودبه خودی در شهر تهران

سید امین اشکان^۱، دکتر سعید ذاکر بستان آباد*^۱، دکتر سینا میرزا احمدی^۲

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

چکیده

سابقه و هدف: شایع ترین عارضه در سه ماهه اول و دوم حاملگی سقط جنین است. هدف از این تحقیق بررسی ارتباط میان پلی-مورفیسم، XPO5 rs11077 & DROSHA rs10719 ماشین های ساخت miRNA در زنان مبتلا به سقط مکرر خودبه خودی می-باشد. تا در صورت اثبات ارتباط، از آن به عنوان نشانگر تشخیصی در خانم هایی که دارای سقط مکرر می باشند، استفاده شود.

مواد و روش ها: در این مطالعه، از نمونه خون ۵۰ زن مبتلا به سقط مکرر خودبه خودی و هم چنین ۲۴ زن بدون سابقه سقط و دارای حداقل دو باروری موفق که به آزمایشگاه مسعود تهران مراجعه کرده بودند، استفاده شد. DNA با استفاده از کیت مخصوص از نمونه های خون محیطی دارای EDTA استخراج شد. پلی مورفیسم دو ژن XPO5 rs11077 و DROSHA rs10719 با روش Tetra-ARMS PCR بررسی و به وسیله الکتروفورز ژل آگارز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها: فراوانی های ژنوتیپی و آلی پلی مورفیسم rs11077(A/C) از ژن XPO5 هیچ رابطه معنی داری را بین دو گروه بیمار و کنترل نشان نداد. در مقابل فراوانی ژنوتیپی و آلی در پلی مورفیسم rs10719(T/C) از ژن DROSHA رابطه معنی داری را بین بیماران و نمونه های کنترل نشان دادند و ژنوتیپ TT به طور معنی داری در گروه بیمار بالاتر از گروه کنترل بود.

بحث: بررسی های ما پیشنهاد می کند که پلی مورفیسم rs10719(T/C) از ژن DROSHA ممکن است با استعداد ابتلا با RPL در جمعیت ایرانی مرتبط باشد و آل T ممکن است در افزایش بروز بیماری نقش داشته باشد.

نتیجه گیری: می توان گفت بررسی پلی مورفیسم های دستگاه ساخت میکرو RNA به تنهایی ثابت کرد در ژن DROSHA rs10719 ارتباطی با سقط وجود دارد که نیاز به بررسی هم زمان با ژن های دیگر دخیل در سقط نیز دارد تا نتایج این تحقیق به صورت کامل کاربردی در تشخیص علل ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: سقط مکرر خودبه خودی، DROSHA، XPO5، پلی مورفیسم rs11077، rs10719.

مقدمه

سقط خود می تواند یک پدیده مفید در جلوگیری از تولد نوزادان ناهنجار و مشکل های دیگر بوده و بالقوه مفید باشد، اما اگر بیش از ۲ یا ۳ بار متوالی تکرار گردد جنبه پاتولوژیک پیدا نموده و تحت عنوان سقط مکرر^۱ (RPL) نامیده می شود و نیازمند بررسی و درمان مناسب خواهد بود. سقط مکرر یکی از مشکل های عمده بیماران است و حدود ۱-۳ درصد از زنان حامله را به خود اختصاص می دهد (۱۳).

منظور از سقط، دفع محصول های حاملگی قبل از هفته بیستم حاملگی است (۷). لازم به ذکر است که گرچه رخداد

نویسنده مسئول:

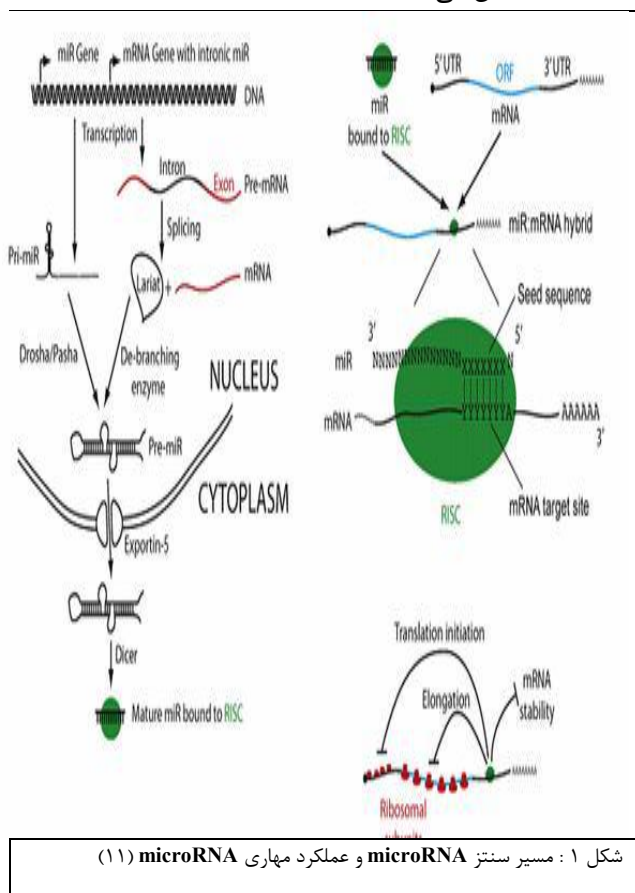
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، پرند، ایران
پست الکترونیکی: saeedzaker@piaou.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۶

¹ Recurrent Pregnancy Loss

مهار ترجمه می‌شود، (شکل شماره ۱) (۱۱). توالی بنیادی این microRNA در عملکرد کمپلکس RISC نقش مهمی دارد به‌صورتی که اگر تغییرهای شیمیایی در این نوکلئوتیدها اعمال شود یا اگر خود توالی عوض شود تأثیر کمپلکس RISC بر mRNA کاهش می‌یابد (۱۶).



شکل ۱: مسیر سنتز microRNA و عملکرد مهاري microRNA (۱۱)

محصول عمل آنزیم Dicer در اصل microRNA دو رشته‌ای بوده که یکی از دو رشته به‌دلیل قانون عدم تقارن ترمودینامیکی به‌عنوان microRNA بالغ است. این تک رشته بالغ در یک کمپلکس که شباهت زیادی با RISC دارد، به نام miRNP یا miRISC قرار می‌گیرد، (۱۸). در مواردی که جفت شدن microRNA با هدف خود کامل یا به‌نسبت کامل باشد برش mRNA هدف در ناحیه‌ای که با نوکلئوتیدهای ۱۰ و ۱۱ microRNA یا siRNA جفت شده است انجام می‌گیرد (۸). آرگونوات در این برش نقش اساسی دارد و یکی از پروتئین‌های اساسی کمپلکس miRNPs و RISC است. در اکثر موارد microRNA باعث توقف ترجمه می‌شود و جفت شدن microRNA و mRNA هدف به‌صورت ناقص است. که این کمپلکس mRNA:miRNP در سیتوپلاسم اجسام پردازشی

در مورد علل سقط مکرر باید گفت که حالت غیرطبیعی کروموزومی والدین تنها علت غیر قابل بحث سقط مکرر است. چنین حالت‌های غیر طبیعی کروموزومی در ۵٪ زوج‌هایی که دچار سقط مکرر می‌شوند، حادث می‌شود. از سایر علل می‌توان به اختلال‌های کروموزومی و ژنتیکی، اختلال‌های رحمی، فاکتورهای اندوکرینی، بیماری‌های اتوایمیون و اختلال‌های آلوایمیون، ترومبوفیلی و سایر عوامل دیگر اشاره کرد. البته بعد از ارزیابی واقعی در ۶۰٪ موارد، سقط مکرر غیر قابل توجیه باقی می‌ماند (۱۴-۱۰).

microRNAها مولکول‌هایی تنظیمی با طول ۲۵-۱۹ نوکلئوتید و محصول shRNA یا Pre-miR هستند. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که microRNAها در پدیده‌های زیستی نقش حیاتی دارند (۱).

microRNAها بیشتر توسط RNAPol II رونویسی می‌شوند که این محصول niRNA یا Pri-miR نامیده می‌شود و ساختاری سنجاق سری داشته و دم پلی A در انتهای ۳' آن و کلاهک را در ۵' دارد، و سپس به‌وسیله کمپلکس DGCR8- DROSHA به pri-miR تبدیل می‌شود. pri-miRها از طریق پروتئین exportin5 از هسته به ماتریکس سیتوزولی منتقل می‌گردند و با شکسته شدن از طریق اندوریبونوکلئاز DICER به microRNA بالغ دو رشته‌ای تبدیل می‌شوند. در مرحله بعدی این دو رشته از هم باز شده و رشته راهنما یا microRNA بالغ به پروتئین آرگونوات در کمپلکس RISC متصل می‌شود. ژن اکثر microRNAها در نواحی بین ژنی^۲ هستند ولی بعضی هم داخل اینترون ژن‌های شناخته شده‌اند (۱۱).

پردازش microRNA شامل دو مرحله است یک مرحله داخل هسته توسط RNAase III (Drosha) که در نتیجه عمل این Pri-miR به PremiR تبدیل می‌شود و مرحله دوم پردازش داخل سیتوپلاسم در نتیجه عملکرد RNAase III (Dicer) انجام می‌شود که microRNA دو رشته‌ای ۲۱-۲۴ نوکلئوتیدی تولید می‌شود. microRNA تک رشته‌ای سپس در کمپلکس miRISCs قرار می‌گیرد. که انتخاب تک رشته بر اساس خواص ترمودینامیکی است. این microRNA بالغ از طریق جفت شدن نسبی با mRNA های هدف (به‌طور معمول جفت شدن با ناحیه 3' UTR انجام می‌شود) باعث تجزیه یا

² intergenic

با اتصال microRNA به ناحیه 3' UTR در mRNA هدف کمپلکس miRNP شروع ترجمه را با ممانعت از عملکرد انتهای 5' در فراخوانی eIF4E مهار می‌کند و سپس 2' کمپلکس mRNA:miRNP به سمت اجسام پردازشی هدایت می‌شوند. احتمال بر این هست که قسمتی از mRNA ذخیره شده تجزیه شود یا این که از اجسام پردازشی بیرون آمده، ترجمه را از سر گیرند.

در قسمت پایین شکل مدل یک مرحله‌ای نشان داده شده که اتصال miRNP به mRNA هدف عامل هدایت این کمپلکس mRNA:miRNP به سمت اجسام پردازشی است و توقف ترجمه با انتقال به اجسام پردازشی هم‌زمان صورت می‌گیرد (۵).

با توجه به ضرورت بررسی نقش سقط جنین و تأثیر مهمی که در خانواده دارد بر آن شدیم با بررسی یکی از علت‌های ناشناخته آن در جامعه زنان تهران، قدمی کوچک در شناخت علت‌های سقط جنین خودبه‌خودی برداشته باشیم.

روش کار

مطالعه حاضر از نوع موردی-شاهدی^۳ می‌باشد. در این مطالعه از نمونه خون، ۵۰ زن مبتلا به سندرم سقط مکرر خودبه‌خودی (داشتن سابقه حداقل ۲ یا بیش‌تر) که به مرکز آزمایشگاه مسعود تهران مراجعه کرده بودند، استفاده شد. معیار خروج از مطالعه وجود ناهنجاری‌های آناتومیک، اختلال‌های رحمی و بیماری‌های عفونی می‌باشد. هم‌چنین، از نمونه خون، ۲۴ خانم بدون سابقه سقط و دارای حداقل ۲ باروری موفق (به‌منظور حذف موارد سقط مکرر ثانویه) از میان زنان تهرانی به‌عنوان گروه شاهد، استفاده شد.

از هر فرد ۵ سی‌سی خون گرفته شد و برای جلوگیری از انعقاد EDTA، خون در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA نگهداری شد.

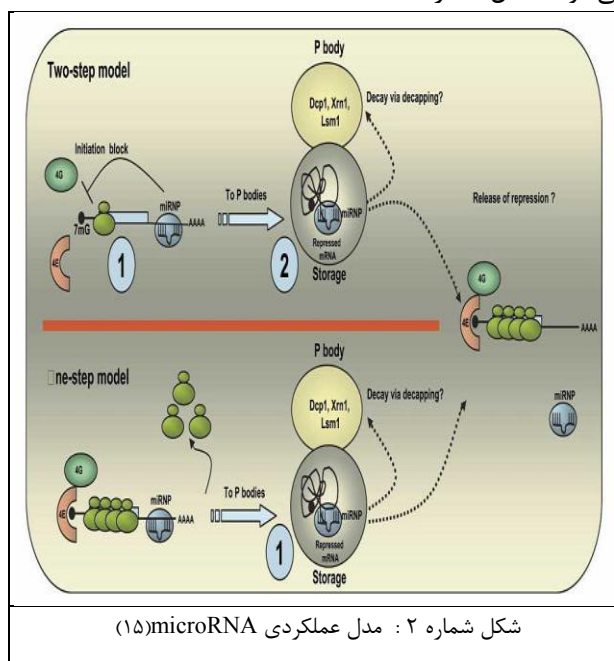
استخراج DNA توسط کیت مخصوص این کار که از شرکت سیناژن تهیه شد به نام cinna pure DNA kit انجام شد.

بعد از طراحی پرایمرهای چهارگانه به‌روش تترا پرایمر آرمز با سفارش از شرکت ژن فن‌آوران خریداری شد که به‌صورت جداگانه برای دو پلی‌مورفیسم rs11077 و rs10719 هر کدام

تجمع دارند. اجسام پردازشی علاوه بر کمپلکس mRNA:miRNP حاوی آنزیم‌های decapping و اگزونوکلئازها و سایر پروتئین‌ها است (۵). نشان داده شده بعد از انتقال به اجسام پردازشی، این mRNA ها می‌توانند تجزیه هم شوند که البته محل برش mRNA در این حالت متفاوت از برش جفت شدن کامل است (۱۵).

مطابق شکل شماره ۲ برای عملکرد microRNA دو مدل پیشنهاد شده است. در مدل دو مرحله‌ای که بیش‌تر مورد قبول دانشمندان است با اتصال microRNA به ناحیه 3' UTR در mRNA هدف کمپلکس miRNP شروع ترجمه را با ممانعت از عملکرد انتهای 5' در فراخوانی eIF4E مهار می‌کند و سپس کمپلکس mRNA:miRNP به سمت اجسام پردازشی هدایت می‌شوند. تصور بر این است که محل ذخیره سازی mRNA مهار شده از مکان آنزیم Dcp1(decapping) و Xrn1 (اگزونوکلئازی) که اجزای مرکزی اجسام پردازشی هستند مجزا است. (شکل شماره ۲) احتمال بر این هست که قسمتی از mRNA ذخیره شده تجزیه شود یا این‌که از اجسام پردازشی بیرون آمده ترجمه را از سر گیرند (۱۵).

مدل یک مرحله‌ای حاکی از آن است که اتصال miRNP به mRNA هدف عامل هدایت این کمپلکس mRNA:miRNP به سمت اجسام پردازشی است. پلی‌زوم موجود روی mRNA قبل از ورود به اجسام پردازشی متلاشی می‌شود و پلی‌پتید سنتز شده هم تجزیه می‌شود mRNA سپس داخل اجسام پردازشی یا تجزیه می‌شود یا توقف ترجمه رخ داده و ذخیره می‌شود (شکل شماره ۲) (۱۷-۲).



شکل شماره ۲: مدل عملکردی microRNA (۱۵)

براساس یافته‌های این پژوهش داده‌ها در نرم افزار spss مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آزمون‌های مربع کای^۴ به شرح زیر بود.

۴ پرایمر : Reverse inner , Forward inner , Reverse outer , Forward outer تهیه شد.

توالی پرایمرهای rs11077

DNA Oligo Name : 11077 if
5'-AGT ACC TCC AAG GAC CAG GGC TGA GA-3'

DNA Oligo Name: 11077ir
5'-CTC TAA AGG GGA TGT TAG CAC TAA AGA TTG-3'

DNA Oligo Name : 11077of
5'-CAA CTA CTT GTG CCA GAG TTT CTC TTG G-3'

DNA Oligo Name : 11077 or
5'-TGG TCT GTA TTA TCC TTG GAT GAC AAC G-3'

و توالی پرایمرهای rs10719

DNA Oligo Name : 10719if
5'-TAG CCT AGT TTT CCT GCA GAC AAT GCA T-3'

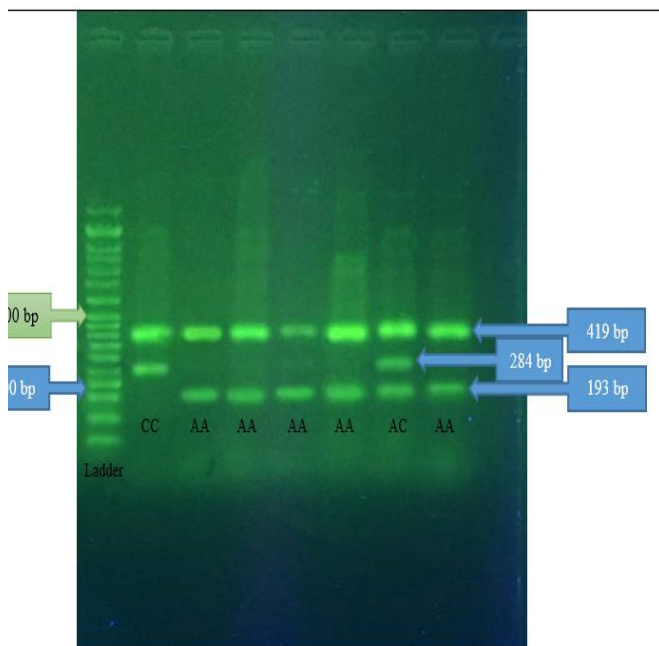
DNA Oligo Name : 10719ir
5'-TCT GTA TTT TAT TTC AAT GAG CAC ACT GCG-3'

DNA Oligo Name : 10719of
5'-CTT GTG TCA GAT AAT TTT CCC CAG ATG G-3'

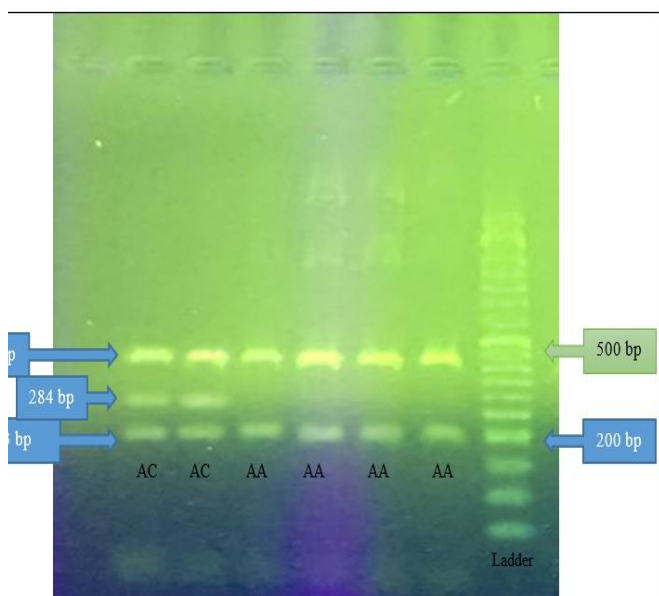
DNA Oligo Name : 10719or
5'-GGA AGT AAT GCA CAT TCA CCA AAG TCA AG-3'

انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) به روش تترا آرمز برای هر پلی‌مورفیسم از ژن‌های DROSHA rs10719 و XPO5 rs11077 در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix، ۱ میکرولیتر از هر Primer، ۲ میکرولیتر از هر نمونه DNA استخراج شده، ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه شده، و در نهایت از ۳ میکرولیتر روغن برای جلوگیری از تبخیر و کم شدن حجم مایع استفاده شد. بعد از اتمام واکنش PCR محصول واکنش را روی ژل آگارز ۱/۵٪ برده و با استفاده از دستگاه ژل داک باندها مشاهده شد. اطلاعات به دست آمده توسط نرم افزار SPSS 15.0 بررسی شد. چگونگی وقوع این پلی‌مورفیسم به سه حال نرمال، هتروزیگوت و هموزیگوت در دو گروه بیمار و شاهد با استفاده از آزمون Chi-square بررسی شد. نتایج با $p\text{-value} < 0.05$ معنی دار تلقی گردیدند.

یافته‌ها:



شکل شماره ۳: نتایج الکتروفورز نمونه های بیمار از ژن XPO5 (rs11077) روی ژل آگارز با لدر 50 bp



شکل شماره ۴: نتایج الکتروفورز چند نمونه سالم از ژن XPO5 (rs11077) روی ژل آگارز با لدر 50bp

⁵ Chi-Square

Chi-Square Tests

	Value	df	Asy mp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.122 ^b	1	.727		
Continuity Correction ^a	.025	1	.874		
Likelihood Ratio	.122	1	.727		
Fisher's Exact Test				.850	.440
N of Valid Cases	148				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 14.92.

جدول ۲: مربع کای برای آلل های XPO5

Chi-Square Tests

	Value	df	Asy mp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	6.521 ^a	2	.038
Likelihood Ratio	7.768	2	.021
N of Valid Cases	74		

a. 1 cells (16.7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4.86.

جدول ۳: مربع کای برای ژنوتیپ پلی مورفسم های DROSHA

با توجه به نتایج مشاهده شده الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ ژنوتیپ هر فرد برای هر پلی مورفسم مشخص شد.

Chi-Square Tests

	Value	df	Asy mp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	8.369 ^b	1	.004		
Continuity Correction ^a	7.338	1	.007		
Likelihood Ratio	8.900	1	.003		
Fisher's Exact Test				.005	.003
N of Valid Cases	148				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 16.86.

جدول ۴: مربع کای برای آلل های DROSHA

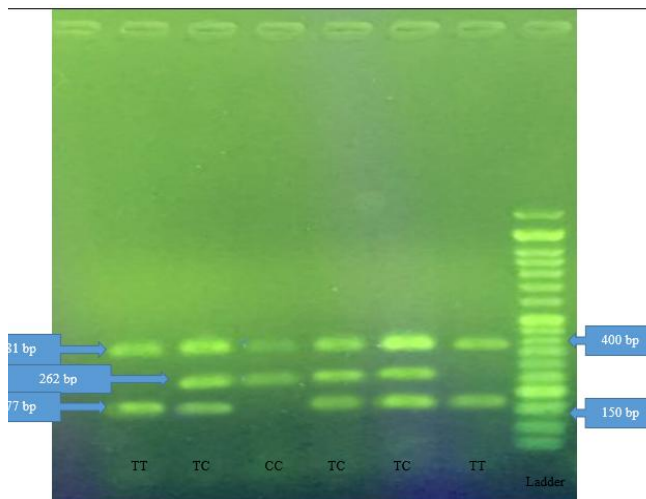
پس از تعیین فراوانی ژنوتیپها برای هر دو گروه بیمار و کنترل، بررسی های آماری انجام شد. بر اساس جدول های ۴ و ۳ فقط DROSHA rs10719 نتایج معنی دار بود. در ابتدا آزمون مربع کای برای هر ۳ ژنوتیپ ممکن در دو گروه شاهد و نمونه انجام گرفت که برای XPO5 جدول های ۱ و ۲ و برای DROSHA جدول های ۳ و ۴ بود که در بین این دو فقط برای DROSHA rs10719 نتایج معنی دار بود. مطابق جدول ۳ که بر اساس فراوانی ژنوتیپی افراد سالم و بیمار ژن DROSHA مشخص شده است، ($p\text{-value} < 0.038$) به دست آمده که کوچکتر از سطح معنی دار ۰/۰۵ است ($p\text{-value} < 0.05$)، که نشان دهنده ارتباط معنی دار بین فراوانی ژنوتیپی DROSHA و نمونه های با سقط مکرر است.

Chi-Square Tests

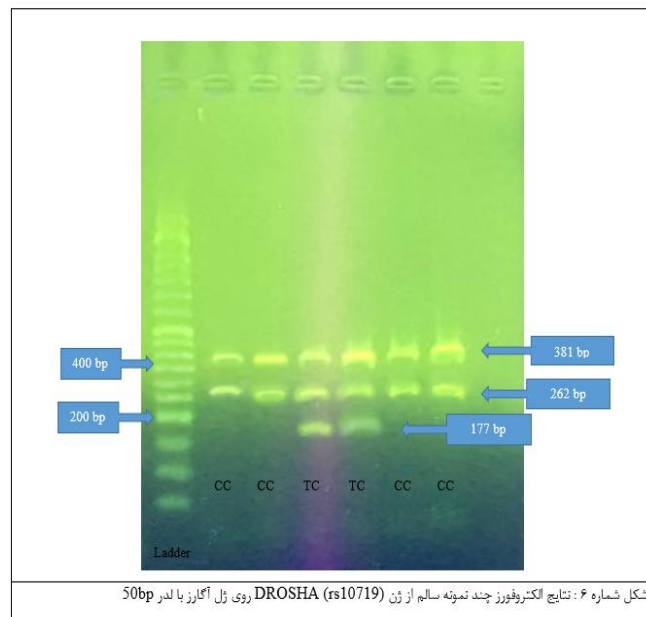
	Value	df	Asy mp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	2.292 ^a	2	.318
Likelihood Ratio	2.528	2	.283
N of Valid Cases	74		

a. 1 cells (16.7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.59.

جدول ۱: مربع کای ژنوتیپ پلی مورفسم های XPO5



شکل شماره ۵: نتایج الکتروفورز چند نمونه بیمار از ژن DROSHA (rs10719) روی ژل آگارز با لدر 50 bp



شکل شماره ۶: نتایج الکتروفورز چند نمونه سالم از ژن DROSHA (rs10719) روی ژل آگارز با لدر 50bp

مطالعه پلی مورفیسم DROSHA rs10719 با سقط مکرر ارتباط معنی دار داشت.

در مطالعه دیگری که توسط الشرفا و همکاران در سال ۲۰۱۳ صورت گرفت میزان بیان miRNAهای ۲۱، ۱۲۶، ۱۵۵، ۱۸۲، ۲۲۲ و ۵۱۷ در زنان مبتلا به سقط مکرر پرداختند. در نهایت به این نتیجه رسیدند که بیان miRNA 21 و miRNA126 در حین بارداری و قبل از آن در زنان مبتلا به شدت کاهش می یابد (۹). که این نیز نشان دهنده نقش miRNAها در سقط مکرر است و نشان می دهد سنتز برخی miRNAها می تواند در کاهش سقط مؤثر باشد.

یک مطالعه دیگر در کره ارتباط پلی مورفیسم های miRNA و سقط مکرر را در سال ۲۰۱۱ مورد بررسی قرار داد. در این مطالعه جون و همکاران به این نتیجه رسیدند که در خانم های کره ای مبتلا به سقط مکرر ایدیوپاتیک، miRNA 196aCC و miRNA 499AG+GG ترکیبی از miRNA 196aCC/miRNA 499AG+GG دارای شیوع بالاتری نسبت به خانم های سالم این جمعیت می باشند. در نتیجه، پلی مورفیسم های مورد نظر با افزایش خطر سقط مکرر ایدیوپاتیک در خانم های کره ای ارتباط دارند (۱۲). که این پژوهش نیز نشان از نقش و تأثیر miRNAها در بروز سقط را دارد، هر چند که ژن مورد مطالعه در این تحقیق با تحقیق حاضر متفاوت است اما تشابه زیاد این نوع مطالعه ها باعث بررسی و شناخت بیشتر ما از سوابق مطالعه های این چینی شد.

در مطالعه دیگری که روی زنان چینی انجام شده نیز نشان داد نقش ارتباط پلی مورفیسم rs6505162 miRNA423 به طور قابل توجه با RPL ارتباط مستقیم داشته است. در این مطالعه که روی ۱۷۵ بیمار مبتلا به RPL و ۲۰۱ مورد سالم از دانشگاه پزشکی Ningxia شرکت داشتند، miRNA423 به طور قابل توجه با وقوع سقط مکرر خودبه خودی ارتباط داشته و آل نادر A به افزایش بیان miRNA بالغ کمک کرده است (۱۹). از میان مطالعه های انجام شده روی miRNAهای مختلف و تأثیرهای متفاوت آنها در RPL چند نمونه که به شباهت بیشتری با این پژوهش داشتند ذکر شد هر چند که به جز مطالعه آقای جونگ و همکاران مطالعه های دیگر با شباهت کمتری به مطالعه حاضر بودند اما نتایج مهم و تأثیر گذاری روی شناخت عوامل مؤثر بر RPL داشتند که ذکر آنها مفید به نظر می رسد.

همچنین مطابق جدول ۴ که بر اساس فراوانی آلی ژن DROSHA مشخص شده است ($p\text{-value} < 0.004$) دست آمده که کوچکتر از سطح معنی دار ۰/۰۵ است ($p\text{-value} < 0.05$) که نشان می دهد بین فراوانی آلی DROSHA و سقط مکرر نیز ارتباط معنی داری وجود دارد. مطابق جدول ۱ رابطه فراوانی ژنوتیپی افراد بیمار و سالم بر اساس وجود ژن XPO5 مشخص شده که با توجه به ($p\text{-value} < 0.0318$) که بزرگتر از سطح معنی دار ۰/۰۵ است هیچ ارتباط معنی داری بین وجود ژن XPO5 و سقط مکرر را نشان نمی دهد. همچنین مطابق جدول ۲ که رابطه فراوانی آلی ژن XPO5 بین افراد سالم و بیمار بررسی شده که با توجه به ($p\text{-value} < 0.0727$) این عدد نیز بزرگتر از سطح معنی دار ۰/۰۵ بوده و ارتباط معنی داری را نشان نمی دهد.

بحث :

در پژوهش بزرگی که در سال ۲۰۱۴ در کره توسط یونگ ووک جونگ و همکاران انجام شد روی ۲۳۸ مورد کنترل سالم و ۳۳۸ مورد با سابقه حداقل ۲ سقط متوالی بررسی ژنوتیپ ماشین های ساخت miRNA شامل DROSHA rs10719 – DICER rs3742330 – exportin 5 (XPO5) rs11077 – RNA GTPase (RAN) rs14035 که با روش آنالیز (PCR-RFLP) مورد بررسی قرار گرفتند و ترکیب آل های (DICER/DROSHA/RAN/XPO5) A-T-T-C and G-RPL C-T-A ۲۰ بار بیشتر از گروه شاهد در گروه مبتلا به بودند. اما در آنالیز جداگانه هر یک از این ژن ها تنها پلی مورفیسم RAN rs14035 با شیوع RPL ارتباط معنی دار داشت که در گروه کنترل فراوانی ژنوتیپ CT به طور قابل توجه بالاتر از گروه مبتلا به RPL بود (۲۱). تفاوت این مطالعه با پژوهش حاضر در بررسی همه جانبه مطالعه آقای جونگ و همکاران روی machinery gene و هر ۴ ژن سازنده miRNA است که به شکل گسترده روی جامعه کره انجام دادند اما در نهایت نتایج این تحقیق نشان دهنده تأثیر بعضی از این ژن ها روی سقط مکرر خودبه خودی است که مشابه پژوهش این مقاله است. در مطالعه آقای جونگ تأثیر همزمان ژن ها هم مورد بررسی قرار گرفته بود که نشان داد در گروه بیمار درصد آل اختلاف زیادی با گروه سالم داشتند همچنین در بررسی جداگانه ژن ها تنها پلی مورفیسم RAN rs14035 با افزایش سقط مکرر ارتباط معنی دار داشته در حالی که در این

یک SNP می‌تواند در یک جمعیت با RPL در ارتباط باشد و در جمعیتی دیگر بدون تأثیر باشد. مطالعه‌های گسترده‌تری در رابطه با نقش دقیق پلی‌مورفیسم miRNAها در افزایش ریسک سقط مکرر مورد نیاز است، در مطالعه حاضر مشخص شد پلی‌مورفیسم XPO5 rs11077 چه از نظر بررسی ژنوتیپی و چه از نظر آللی به اختلاف معنی‌داری بین دو گروه بیمار و سالم بر نخوردیم و محاسبه آماری و نموداری ارتباط معنی‌داری را بین این پلی‌مورفیسم و وقوع سقط مکرر خودبه‌خودی نشان نداد. اما پلی‌مورفیسم DROSHA rs10719 در جامعه زنان ایرانی نتایج متفاوتی داشت و به‌صورت جداگانه هم در بررسی ژنوتیپی و هم آللی با توجه به اختلاف معنی‌دار بین نمونه سالم و بیمار نشان از نقش مؤثر خود در RPL می‌داد. ژنوتیپ TT بین افراد سالم و بیمار که در افراد بیمار به شکل معنی‌داری بیش‌تر بود و p-value به‌دست آمده در آزمون مربع کای نیز تأییدی بر این نتیجه گذاشت. بر اساس فراوانی آللی نیز نتایج نشان داد که آلل T در افراد بیمار به شکل معنی‌داری بیش‌تر بوده و بر اساس p-value به‌دست آمده از آزمون مربع کای نقش معنی‌دار این آلل نیز در وقوع RPL را نشان داد. بر اساس پژوهشی که در سال ۲۰۱۷ انجام شده نقش حضور rs10719 باعث اختلال در تعامل بین miR-27b و DROSHA می‌شود که ممکن است مکانیسم پایه مشاهده شده باعث افزایش خطر ابتلا به پرفشاری خون شود و این مورد نیز می‌تواند روی نقش این rs در سقط جنین نیز تأثیر داشته باشد (۲۰).

سپاسگزاری

با تشکر از معاونت پژوهش و فن‌آوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند و اساتید گرامی برای کمک‌های بی‌دریغ در مسیر این پژوهش، هم‌چنین از پرسنل محترم آزمایشگاه مسعود و فام.

نتایج مطالعه‌های قبلی نشان می‌دهد که بیماری سقط‌های مکرر خودبه‌خودی به‌عنوان یک بیماری پیچیده و چند ژنی به‌دلیل جهش‌های ژنتیکی متعددی (مجموعه‌ای از جهش‌های ژنی) در ژنوم مرتبط به‌وجود می‌آید؛ بنابراین بررسی سایر جهش‌ها و ژنوم مرتبط با سقط مکرر جهت روشن شدن مکانیسم این بیماری بسیار حائز اهمیت می‌باشد (۶). با توجه به این که زمینه ژنتیکی افراد در گروه‌ها و جوامع مختلف از تنوع زیادی برخوردار است (۳) لذا انجام مطالعه در این زمینه بسیار سودمند خواهد بود.

نتیجه‌گیری:

با تمام این توضیحات، ارتباط پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی با سقط مکرر هنوز به‌طور کامل مشخص نیست و مطالعه‌های بیش‌تری در این رابطه نیاز است. همان‌طور که می‌دانیم عوامل متعددی در سقط مکرر نقش دارند، بنابراین مشخص کردن عوامل اصلی در این رابطه تا حدی دشوار می‌باشد. از آن‌جایی که به نظر می‌رسد سقط مکرر، یک بیماری نباشد، بهتر است آن را یک سندرم اطلاق کرد. عوامل مختلفی می‌توانند در سقط مکرر نقش داشته باشند و می‌توان این‌گونه استنباط کرد که به احتمال پلی‌مورفیسم‌های ژن‌های مختلف می‌توانند با RPL در ارتباط باشند. نقصی که در رابطه با مطالعه‌های پلی‌مورفیسم ژن‌ها و RPL می‌توان در نظر گرفت، این است که تأثیر SNPها به تنهایی بر RPL بررسی شده است و بهتر است در مطالعه‌ها به بررسی ترکیب این SNPها در ارتباط با سقط پرداخته شود که البته لازمه این کار تأمین شرایط مالی و امکانات بیش‌تری است.

به‌علاوه، مطالعه‌های ژنتیکی پیچیده هستند و نتایج حاصل از آن‌ها باید به روش‌های مختلف بررسی و تأیید گردند. اگرچه یک سری از مطالعه‌ها پیچیدگی‌های خود را داشته و امکان تکرار و مقایسه آن‌ها وجود ندارد. تفاوت‌های قومی به‌احتمال می‌توانند بر فرکانس‌های ژنوتیپی تأثیرگذار باشند و این عامل مهم می‌تواند نتایج مطالعه‌ها را تحت تأثیر قرار دهد. بنابراین

منابع

1. Ambros V, Bartel B, Bartel DP. A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 2003; 9:277-9.
2. Bagga S, Bracht J, Hunter S. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 2005; 122: 553- 63.
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):955-57.
4. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116:281-97.
5. Bashkirov VI, Scherthan H, Solinger JA. A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *J Cell Biol* 1997; 136: 761-73.
6. Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. Multiple thrombophilic gene mutations rather than specific gene mutations are risk factors for recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 2006; 55(5):360-68.
7. Cunningham. Williams obstetrics. 1997; 20th Edition
8. Elbashir SM, Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 2001; 20: 6877-88.
9. El-Shorafa HM, Sharif FA. Dysregulation of micro-RNA contributes to the risk of unexplained recurrent pregnancy loss. *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology*. 2013; 2(3):330-5.
10. Ghosh K, Shetty S, Vora S, Salvi V. Successful pregnancy outcome in women with bad obstetric history and recurrent fetal loss due to thrombophilia: effect of unfractionated heparin and low-molecular weight heparin. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2008;14(2):174-9. Epub 2007/12/28.
11. Iorio MV, Casalini P, Piovan C. Breast cancer and microRNAs: the therapeutic impact. *Breast* 2011; Suppl 3:S63-70.
12. 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.
13. Kenneth J.R MD. Kistner's Gynecology. Principles and practice. 1990; 6th edition. 1995;330-365
14. Lim KJ, Odukoya OA, Li TC, Cooke ID. Cytokines and immuno-endocrine factors in recurrent miscarriage. *Human reproduction update*. 1996;2(6):469-81. Epub 1996/11/01.
15. Pillai RS. MicroRNA function: Multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA* 2005; 11:1753-61.
16. Quesne JL, Caldas C. Micro-RNAs and breast cancer. *Mol Oncol* 2010; 230-41.
17. Teixeira D, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Motamed N, Azadmanesh K. Processing bodies require RNA for assembly and contain non translating mRNAs. *RNA* 2005; 11: 371-82.
18. Tomari, Y. and Zamore, P.D. Perspective: Machines for RNAi. *Genes Dev* 2005; 19: 517-29.
19. Xing Su, Yi Hu, Ying Li, Jing-Li Cao, Xue-Qin Wang, Xu Ma, and Hong-Fei Xia . The polymorphism of rs6505162 in the MIR423 coding region and recurrent pregnancy loss, *society for reproduction and fertility* ISSN 1470-1626 (paper) 1741-7899 (online) (2015)
20. Yabing Zhang, Ai-lin Cao, Chung Dong . rs10719 Polymorphism Located within DROSHA 3'-ntranslated Region is Responsible for Development of Primary Hypertension by Disrupting Binding with microRNA-27b. 2017; 23: 911-918
21. Yong Wook Jung, Young Joo Jeon, HyungChul Rah, Ji Hyang Kim, Ji Eun Shin, Dong Hee Choi, Sun Hee Cha, Nam Keun Kim (2014) Genetic Variant in MicroRNA Machinery Genes Are Associate with Idiopathic Recurrent Pregnancy Loss Risk. Volume 9 Issue 4 e95803