

ارزیابی میزان آنزیم‌های Dicer، Drosha و پروتئین DGCR8 در بیماران مبتلا به پره‌اکلامپسی

دکتر رقیه درگاهی^۱، دکتر سمیرا شهباززادگان^{۲*}، دکتر عباس نقی‌زاده
باقی^۳، دکتر سحر صفتی کویخی^۴

۱. استادیار گروه زنان و مامایی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.
۲. استادیار گروه مامایی، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.
۳. دانشیار گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
۴. متخصص زنان و زایمان، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، آستارا، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۰۶

خلاصه

مقدمه: پره‌اکلامپسی به عنوان یک اختلال مهم دوران بارداری شناخته شده است که با افزایش فشارخون در نیمه دوم بارداری و پروتئینوری همراه می‌باشد و یکی از سه عامل اصلی مرگ‌ومیر مادر و جنین به شمار می‌آید. بی‌نظمی در میکروRNAها با مکانسیم تأثیر بر عوامل رگ‌زایی، در پره‌اکلامپسی نقش دارند و می‌توانند برای تشخیص این بیماری به کار روند. مطالعه حاضر با هدف بررسی میزان بیان ژن‌های Drosha و Dicer، DGCR8 در بیماران مبتلا به پره‌اکلامپسی انجام شد.

روش کار: این مطالعه توصیفی - تحلیلی در سال ۹۵-۱۳۹۴ بر روی ۸۴ نفر از زنان باردار و غیرباردار سالم مراجعه‌کننده به درمانگاه زنان مرکز آموزشی و درمانی علوی اردبیل انجام شد. شرکت‌کنندگان به‌طور تصادفی در سه گروه ۲۸ نفره شامل زنان باردار مبتلا به بیماری پره‌اکلامپسی، زنان باردار سالم و زنان غیر باردار سالم (گروه کنترل) قرار گرفتند. مشخصات فردی شرکت‌کنندگان از جمله سن، سن بارداری، وزن، قد و شاخص توده بدنی تعیین گردید. سپس نمونه خون وریدی آنها جهت بررسی بیان ژن‌های Drosha و Dicer، DGCR8 به مرکز تحقیقات دانشکده پزشکی ارسال شد. اطلاعات حاصل از پیامد زایمان بر اساس چک لیست‌های موجود و نتایج بررسی نمونه خون نیز جمع‌آوری شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۱) و آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه، تی‌تست و دقیق فیشر انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: میزان هر سه پروتئین DGCR8 و آنزیم‌های Drosha و Dicer در زنان باردار مبتلا به پره‌اکلامپسی و مادران باردار سالم نسبت به زنان غیر باردار بالاتر بود ($p \leq 0/05$). همچنین میزان پروتئین DGCR8 و آنزیم Dicer در مادران باردار مبتلا به پره‌اکلامپسی از مادران باردار سالم بیشتر بود ($p \leq 0/05$)، ولی میزان آنزیم Drosha در مادران باردار مبتلا به پره‌اکلامپسی از مادران باردار سالم کمتر بود.

نتیجه‌گیری: میزان آنزیم Drosha، Dicer و پروتئین DGCR8 در مادران باردار مبتلا به پره‌اکلامپسی و مادران باردار سالم نسبت به گروه کنترل بالاتر است، بنابراین می‌توان از این مولکول‌ها هم در تشخیص به عنوان مولکول نشانگر احتمالی و هم در درمان استفاده نمود.

کلمات کلیدی: پره‌اکلامپسی، زنان باردار، Drosha، Dicer، microRNA، DGCR8

* نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر سمیرا شهباززادگان؛ دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران. تلفن: ۰۴۵-۳۳۷۲۶۰۸۵
پست الکترونیک: samirashahbazzadegan2000@yahoo.com

مقدمه

پره‌اکلامپسی به عنوان یک اختلال مهم دوران بارداری شناخته شده که با افزایش فشارخون در نیمه دوم بارداری و پروتئینوری همراه می‌باشد. پره‌اکلامپسی یکی از سه عامل اصلی مرگ‌ومیر مادر و جنین به شمار می‌آید و ۱۰٪ بارداری‌ها در کشورهای در حال توسعه را شامل می‌شود (۱-۳). این عارضه یک اختلال سیستمیک محسوب می‌شود و می‌تواند در مادر عوارضی نظیر نقص عملکرد کلیه و کبد، ادم مغزی همراه با تشنج و ابتلاء به سندرم HELLP را به دنبال داشته باشد. در جنین نیز احتمال بروز صدماتی از قبیل محدودیت رشد جنینی که یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر نوزادان به شمار می‌رود، وجود دارد (۱، ۴). تاکنون علت دقیق ایجاد این بیماری، روش‌های تشخیص زودهنگام و پیشگیری از آن مشخص نشده است (۷-۵). در حال حاضر درمان قطعی برای پره‌اکلامپسی وجود ندارد و زنان بارداری که پره‌اکلامپسی در آنها تشخیص داده شود، تحت کنترل و مراقبت‌های ویژه قرار می‌گیرند تا سلامت مادر و جنین حفظ شود. در واقع پره‌اکلامپسی و اکلامپسی شدید به همراه دیگر عوارض بارداری، بیش از ۶۰٪ موارد بستری زنان در بخش مراقبت‌های ویژه را به خود اختصاص می‌دهند (۸).

هرچند علت دقیق پره‌اکلامپسی نامشخص است، اما فاکتورهای ژنتیکی و محیطی متعددی در این خصوص مورد بررسی قرار گرفته‌اند. وارد و همکاران (۲۰۱۴) خطر ابتلاء به پره‌اکلامپسی را در دختران مادران مبتلا ۴۰-۲۰٪، در خواهران زنان مبتلا ۱۱-۳۷٪ و در دوقلوها ۲۲-۴۷٪ گزارش کردند (۹). در نتیجه نقش فاکتورهای ژنتیکی در بروز پره‌اکلامپسی به ویژه ژن‌هایی که در ایجاد اختلالات اندوتلیال، سیستم انعقادی، استرس اکسیداتیو و رگ‌زایی نقش دارند، اهمیت پیدا می‌کند (۱۰، ۱۱).

میکروRNAها، مولکول‌های کوچک ریبونوکلئیک‌اسید هستند که در سلول‌های یوکاریوتی یافت می‌شوند. به جز قارچ‌ها، جلبک‌ها و گیاهان دریایی، یک مولکول میکروRNA در مقایسه با سایر مولکول‌های RNA، طول بسیار کوتاه‌تری دارد و به طور میانگین ۲۲

نوکلئوتید دارد. تاکنون بیش از ۹۰۰ نوع میکروRNA در انسان شناسایی شده است (۱۲). این مولکول‌ها ممکن است توسط ژن‌های خود یا اینترون‌ها ساخته شوند. وظایف آنها بسیار متنوع و شامل مهار رونویسی و ترجمه و یا فعال‌سازی رونویسی و ترجمه می‌باشد (۱۳). همانطور که میکروRNAها در فعالیت‌های طبیعی سلول دخیل هستند، تنظیم نادرست این مولکول‌ها می‌تواند همراه با ایجاد بیماری باشد. تاکنون مولکول‌های میکروRNA متعددی در ارتباط با انواع مختلف بیماری‌ها به خصوص سرطان‌ها و دیابت نوع ۱ و ۲ و غیره شناسایی شده است (۱۴، ۱۵). آنزیم‌های اصلی پردازش‌کننده میکروRNA شامل Drosha و Dicer می‌باشند (۱۶). Dicer آنزیم مسئول بالغ‌سازی نهایی میکروRNAها در سیتوپلاسم سلول و Drosha آنزیم مسئول پردازش میکروRNAها در هسته سلول می‌باشد. ژن DGCR8 یک فاکتور پروتئینی می‌باشد که به عنوان کوفاکتور Drosha عمل می‌کند و برای فعالیت طبیعی آن ضروری است (۱۷، ۱۸). بنابراین می‌توان از آنها در برخی مشکلات بارداری از جمله پره‌اکلامپسی به عنوان مولکول نشانگر استفاده کرد (۱۹). بررسی مطالعات مربوط به میکروRNAهای مرتبط با پره‌اکلامپسی، پتانسیل آنها را به عنوان نشانگر ژن هدف و مسیرهای مربوط به پاتوژنز پره‌اکلامپسی نشان داده است. بی‌نظمی در میکروRANها با مکانسیم تأثیر بر عوامل رگ‌زایی، در پره‌اکلامپسی نقش دارد (۲۰). با این وجود، ناسازگاری در نتایج مطالعات وجود دارد (۲۱). ارزیابی این ژن‌ها در این بیماری می‌تواند مفید باشد و در صورت تأیید ارتباط این ژن‌ها با بیماری پره‌اکلامپسی، می‌توان از این مولکول‌ها هم در تشخیص به عنوان مولکول نشانگر احتمالی و هم در درمان استفاده کرد، لذا مطالعه با هدف تعیین و مقایسه میزان بیان ژن‌های Dicer، Drosha و DGCR8 در گروه‌های مورد مطالعه (زنان باردار مبتلا به پره‌اکلامپسی، زنان باردار سالم و زنان غیر باردار سالم) انجام گرفت.

روش کار

این مطالعه توصیفی - تحلیلی در سال ۹۵-۱۳۹۴ بر روی ۸۴ نفر از زنان باردار و غیرباردار مراجعه‌کننده به درمانگاه زنان مرکز آموزشی و درمانی علوی اردبیل انجام شد. برای تعیین حجم نمونه در یک نمونه‌گیری مقدماتی برای هر گروه، ۷ نمونه انتخاب و داده‌های مربوط به آنها ثبت و پس از اجرای آنالیز واریانس یک طرفه بین سه گروه و در نظر گرفتن نتایج آن، از نرم‌افزار 'PASS' (نسخه ۱۱) استفاده شد و حداقل حجم نمونه با توجه به خروجی نرم‌افزار برای هر گروه، ۲۰ نفر به دست آمد. در این مطالعه تعداد نمونه برای هر گروه ۲۸ نفر در نظر گرفته شد. آزمودنی‌های تحقیق به روش نمونه‌گیری در دسترس و با توجه به معیارهای زیر برای گروه‌های مورد مطالعه انتخاب شدند. گروه اول یا شاهد شامل ۲۸ زن غیر باردار مراجعه‌کننده به درمانگاه زنان به دلایل غیر از بارداری، گروه دوم یا کنترل ۲۸ زن باردار سالم مراجعه‌کننده به درمانگاه، و گروه سوم یا مورد ۲۸ زن باردار مبتلا به پره‌اکلامپسی ارجاع داده شده به بیمارستان بودند. معیارهای ورود به مطالعه در سه گروه شامل: داشتن سن ۲۰-۳۰ سال و در گروه دوم و سوم، حاملگی اول در نظر گرفته شد. زنان باردار که بعد از هفته ۲۰ بارداری دارای معیارهای تشخیصی پره‌اکلامپسی (فشارخون سیستولیک بیشتر مساوی ۱۴۰ میلی‌متر جیوه و یا فشارخون دیاستولیک بیشتر مساوی ۹۰ میلی‌متر جیوه و پروتئین‌اوری) بودند، به عنوان گروه مورد و ۲۸ زن باردار در همان سنین بارداری به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. معیارهای خروج از مطالعه شامل: زنان با سابقه دیابت، بیماری‌های کلیوی، متابولیک و فشارخون قبلی و نیز زنان با حاملگی دوقلویی و یا چندقلویی بود. ملاحظات اخلاقی این مطالعه شامل محرمانه نگه داشتن و عدم افشاء هرگونه اطلاعات خصوصی بود. هزینه اضافی بر بیمار تحمیل نشد. از بیماران جهت انجام آزمایشات رضایت‌نامه اخذ گردید. در صورت درخواست فرد مورد مطالعه، نتیجه تحقیق به مشارکت‌کننده نشان داده می‌شد. ابزار گردآوری داده‌ها در این مطالعه شامل: فرم اطلاعات دو قسمتی شامل اطلاعات فردی (که با

مصاحبه بیماران تکمیل شد) و اطلاعات حاصل از نمونه خون بود. برای تعیین روایی پرسشنامه، از روایی محتوایی استفاده شد؛ بدین‌ترتیب که پس از مطالعه کتب و مقالات مربوطه، پرسشنامه‌ای تنظیم و در اختیار اساتید علوم پایه و زنان قرار گرفت و در آخر پس از اعمال تغییرات، پرسشنامه نهایی تنظیم شد. جهت پایایی ابزار از روش سنجش بین آزمایش‌ها استفاده شد که ضریب همبستگی ۰/۹۰ به دست آمد. برای جمع‌آوری داده‌ها در صورت واجد شرایط بودن افراد، اهداف مطالعه توضیح داده شد و بعد از اخذ رضایت‌نامه کتبی، افراد در ابتدای ورود به مطالعه مورد ارزیابی بالینی قرار گرفتند. این ارزیابی بالینی شامل تعیین سن، وزن (حداقل لباس و با دقت ۰/۱ کیلوگرم)، قد (بدون کفش و با دقت ۰/۵ سانتی‌متر) و شاخص توده بدنی (شاخص توده بدنی از طریق تقسیم وزن فرد به کیلوگرم بر مجذور قد به متر) بود. سپس از هر فرد ۴ سی‌سی نمونه خون وریدی گرفته شد و در لوله حاوی EDTA جهت بررسی از نظر میکروRNAها به مرکز تحقیقات دانشکده پزشکی ارسال شد.

جداسازی RNA:

مجموع RNA سلولی توسط معرف تریزول از سلول ایزوله و جداسازی شد. به دنبال این روند، سلول‌های کشت داده شده برداشت و با دور ۱۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. جهت از بین بردن لایه رویی، ۰/۸ میلی‌لیتر از واکنش‌گر تریزول به ازای ۱۰^۵ سلول اضافه شد، پس از آن ۰/۲ میلی‌لیتر کلروفرم افزوده شد و لوله‌ها به شدت تکان داده شدند، پس از آن نمونه‌ها در ۱۲۰۰۰ دور برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفوژ شدند. سپس فاز مایع رویی به یک لوله جدید انتقال داده شد و لوله در زاویه ۴۵ درجه قرار گرفت و محلول تخلیه شد. پس از آن ۰/۵ میلی‌لیتر از ایزوپروپرانول افزوده و در دمای اتاق برای مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد، سپس نمونه‌ها در ۱۲۰۰۰ دور برای مدت زمان ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد، پس از آن مایع رویی برداشته و لوله‌ها با ۱ میلی‌لیتر از محلول اتانول ۷۵٪ شست‌وشو داده شده و در ۷۵۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۵ دقیقه

¹ power Analysis & Sample Size

میکرولیتر مخلوط dNTP + ۱ میکرولیتر ترانس کریپتاز معکوس به هر نمونه اضافه شد. نمونه‌ها بلافاصله در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه شدند، پس از آن در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفتند و واکنش با حرارت دادن در ۷۰ درجه سلیوس به مدت ۵ دقیقه به پایان رسید. رونویس معکوس در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد.

Real-time-PCR کمی: آغازگرها از مطالعات قبلی که در آن سند و همکاران (۲۰۱۲)، اجزای Dicer, Drosha, DGCR8 و RPL38 را در مطالعه خود ارزیابی کردند، مورد استفاده قرار گرفت (۲۲). آغازگرها (Dicer, Drosha, DGCR8 و RPL38) به‌عنوان ژن نگهدارنده با استفاده از پرایمر اکسپرس ۳/۰ مطابق جدول ۱ طراحی شدند.

در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتی‌فیوژ شدند، در نهایت مایع رویی دور ریخته و لوله‌های حاوی RNA برای مدت ۱۰ دقیقه در هوا خشک شدند و مجدداً به همراه ۴۰ میکرولیتر از آب بدون RNA به حالت محلول در آمدند. RNAهای آماده شده در یخچال با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد جهت استفاده بعدی نگهداری شدند.

رونویسی معکوس و سنتز cDNA:

CDNA رشته‌ای اولیه از RNA سلول‌ها توسط کیت بازگردانی معکوس cDNA رشته‌ای اولیه Fermentas، با توجه به پروتکل سازنده ساخته شد. به‌طور خلاصه ۴ میکرولیتر RNA جدا شده از سلول با ۱ میکرولیتر از پرایمر هگزامر تصادفی و ۷ میکرولیتر از آب بدون آنزیم RNAase مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد مخلوط شد. سپس میکرولوله‌ها بر روی یخ سرد شدند، پس از آن مخلوطی از ۴ میکرولیتر بافر واکنش + ۱ میکرولیتر مهارکننده RNAase + ۲

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده در Real-time-PCR کمی اندازه و درجه حرارت ذوب

Tm (°C)	Amplicon Size (bp)	Sequence	Target
58.5	94	5'-TTAACCTTTTGGTGTGGATGAGTGT-3'	Dicer F
57.1		5'-GGACATGATGGACAATTTTCACA-3'	Dicer R
58.4	115	5'-CATGTCACAGAATGTCGTTCCA-3'	Drosha F
59.8		5'-GGGTGAAGCAGCCTCAGATTT-3'	Drosha R
57.3	93	5'-GCAAGATGCACCCACAAAGA-3'	DGCR8 F
59.8		5'-TTGAGGACACGCTGCATGTAC-3'	DGCR8 R
61	88	5'-TCACTGACAAAGAGAAGGCAGAGA-3'	RPL38 F
59.7		5'-TCAGTGTGTCTGGTTCATTTTCAGTT-3'	RPL38 R

F: forward primer, R: reverse primer, bp: base pairs, RPL38: ribosomal protein (housekeeping gene)

mRNA هدف در نمونه محاسبه و سپس در ارتباط با سطح رونویسی RPL38 mRNA به عنوان ژن نگهبان نرمال شد. روش مقایسه‌ای Ct مورد استفاده قرار گرفت (۲۳).

اطلاعات حاصل از چک لیست‌های موجود به همراه داده‌های حاصل از بررسی نمونه خون با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۱) و روش‌های آمار توصیفی (در قالب جداول و محاسبه فراوانی و درصد) و آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه، تی تست برای گروه‌های مستقل و آزمون دقیق فیشر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

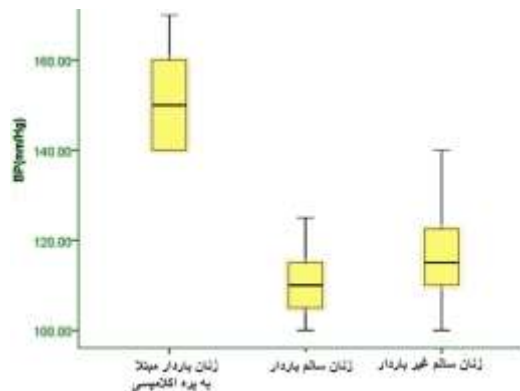
پرایمرها با استفاده از سرویس سنتز الیگونوکلوئید انتخابی تولید شدند. آنالیز کمی Real time-PCR با استفاده از دستگاه SYBR Green PCR Master Mix Power و سیستم One Real-time PCR انجام شد. هر مخلوط واکنش شامل کل حجم ۲۵ میکرولیتر (مخلوط اصلی ۱۲/۵ میکرولیتر، 3 cDNA میکرولیتر و ۵/۶ H2O میکرولیتر) بود.

شرایط انجام RT-PCR کمی به‌صورت ۵۰ درجه سلسیوس برای مدت ۲ دقیقه، ۹۵ درجه سلیوس برای ۱۰ دقیقه، ۶۰ دور در دمای ۹۵ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه و سپس ۷۲ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه بود. مقادیر نسبی

یافته‌ها

میانگین سن زنان باردار مبتلا به پره‌اکلامپسی $28/64 \pm 7/37$ ، زنان باردار سالم $26/00 \pm 6/68$ و زنان سالم غیر باردار $28/29 \pm 7/90$ سال بود که بر اساس آزمون واریانس یک‌طرفه، بین میانگین سن مادران در گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($p=0/359$).

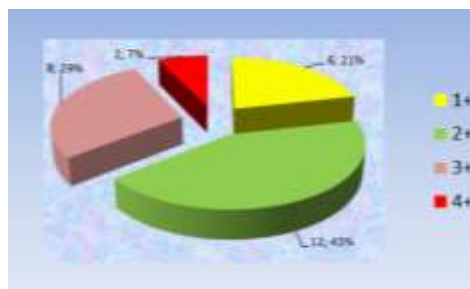
میانگین فشارخون سیستولیک مادران در گروه‌ها در نمودار ۱ ارائه شده است. بر اساس نتایج آزمون واریانس یک‌طرفه، بین میانگین فشارخون سیستولیک مادران در گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p=0/001$). همچنین بر اساس آزمون تعقیبی LSD، در مقایسه جفت جفت بین تمامی زوج‌ها تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p=0/001$).



نمودار ۱- نمودار جعبه‌ای فشارخون سیستولیک مادران بر حسب میلی‌متر جیوه در گروه‌های مورد مطالعه

میانگین فشارخون دیاستولیک مادران در گروه‌های مورد مطالعه در زنان باردار مبتلا به پره‌اکلامپسی $95/36 \pm 6/37$ ، در زنان باردار سالم $68/57 \pm 6/92$ و در زنان سالم غیر باردار $72/32 \pm 8/22$ میلی‌متر جیوه بود که بر اساس نتایج آزمون واریانس یک‌طرفه، بین میانگین فشارخون دیاستولیک مادران در گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p=0/001$). همچنین بر

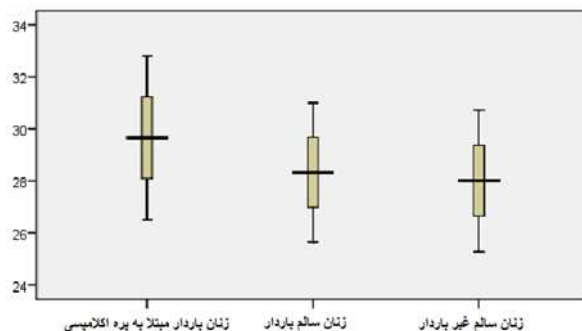
اساس آزمون تعقیبی LSD، به جز زوج زنان باردار سالم و زنان سالم غیر باردار در مقایسه جفت جفت، بین سایر زوج‌ها تفاوت معنی‌داری وجود داشت. فراوانی و درصد نتایج پروتئینوری در گروه مادران پره‌اکلامپسی با توجه به آزمایش Dipstick در نمودار ۲ نشان داده شده است.



نمودار ۲- فراوانی پروتئینوری با توجه به آزمایش Dipstick ادرار در مادران مبتلا به پره‌اکلامپسی

میانگین شاخص توده بدنی مادران در گروه‌های تحقیق در نمودار ۳ ارائه شده است. بر اساس نتایج آزمون واریانس یک‌طرفه، بین میانگین شاخص توده بدنی

مادران در گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($p=0/210$).



نمودار ۳- میانگین شاخص توده مادران در گروه‌های مورد مطالعه

از نظر زمان زایمان، ۱۶ نفر (۵۷/۱٪) از مادران مبتلا به پره‌اکلامپسی زایمان پره‌ترم (سن حاملگی کمتر از ۳۷ هفته) داشتند، در حالی که در ۲ زن باردار سالم (۷/۱٪) زایمان پره‌ترم مشاهده گردید که بر اساس آزمون فیشر این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود ($p=0/001$).

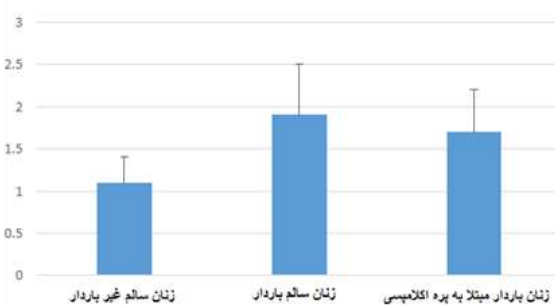
میزان بیان ژن آنزیم Drosha زنان در گروه‌های سه‌گانه تحقیق (مادران باردار مبتلا به پره‌اکلامپسی، مادران باردار سالم و زنان غیر باردار سالم) در نمودار ۴ ارائه شده است. بر اساس این نمودار، میزان آنزیم Drosha در زنان باردار مبتلا به پره‌اکلامپسی و مادران باردار سالم نسبت به زنان سالم غیر باردار (گروه کنترل) بالاتر بود و در مادران باردار سالم از مادران باردار مبتلا به پره‌اکلامپسی نیز بیشتر بود که بر اساس آزمون واریانس یک‌طرفه، بین گروه‌ها از این نظر اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p \leq 0/05$).

میانگین وزن نوزادان مادران در دو گروه مادران پره‌اکلامپسی $2648/21 \pm 846/27$ گرم و در مادران سالم $3282/14 \pm 477/11$ گرم بود که بر اساس نتایج آزمون تی‌تست برای گروه‌های غیرمستقل، میانگین وزن نوزادان مادران مبتلا به پره‌اکلامپسی از مادران سالم کمتر بود و این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود ($p=0/001$).

بر اساس نتایج آزمون فیشر در تعیین رابطه بین جنسیت نوزادان و بیماری پره‌اکلامپسی در بارداری، بین جنسیت نوزادان و بیماری پره‌اکلامپسی در بارداری ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد ($p=1/00$).

از نظر نوع زایمان، ۲۲ نفر (۷۸/۶٪) از مادران مبتلا به پره‌اکلامپسی سزارین شدند، در حالی که ۵ زن باردار سالم (۱۷/۹٪) سزارین شدند.

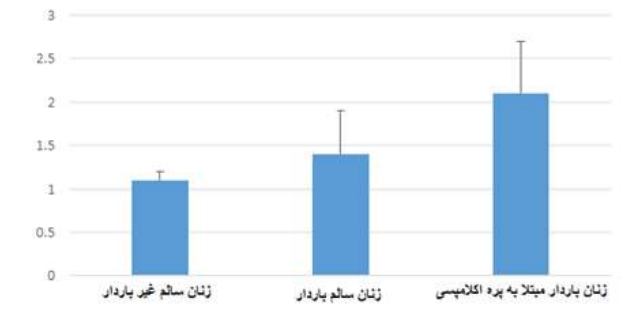
بر اساس نتایج آزمون فیشر در تعیین رابطه بین نوع زایمان مادر و بیماری پره‌اکلامپسی در بارداری، بین نوع زایمان مادر و بیماری پره‌اکلامپسی در بارداری ارتباط معنی‌داری مشاهده شد ($p=0/001$).



نمودار ۴- میزان بیان ژن آنزیم Drosha زنان در گروه‌های مورد مطالعه

باردار سالم نسبت به زنان سالم غیر باردار (گروه کنترل) بالاتر بود و در مادران باردار مبتلا به پره اکلامپسی نیز از مادران باردار سالم و زنان غیرباردار سالم) در نمودار ۵ ارائه شده است. بر اساس این نمودار، میزان پروتئین DGCR8 در زنان باردار مبتلا به پره اکلامپسی و مادران

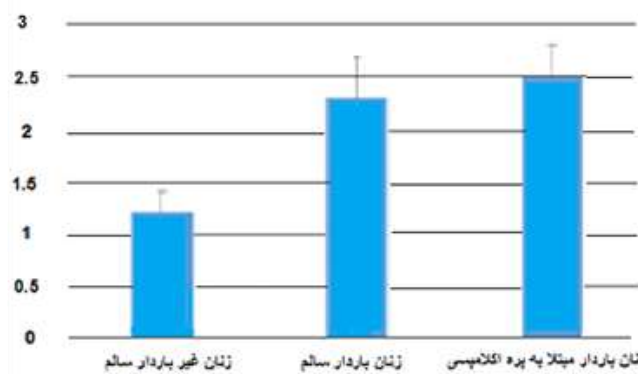
میزان بیان ژن پروتئین DGCR8 زنان در گروه‌های سه‌گانه تحقیق (مادران باردار مبتلا به پره اکلامپسی، مادران باردار سالم و زنان غیرباردار سالم) در نمودار ۵ ارائه شده است. بر اساس این نمودار، میزان پروتئین DGCR8 در زنان باردار مبتلا به پره اکلامپسی و مادران



نمودار ۵- میزان بیان ژن پروتئین DGCR8 زنان در گروه‌های مورد مطالعه

نسبت به زنان سالم غیر باردار (گروه کنترل) بالاتر بود و در مادران باردار مبتلا به پره اکلامپسی نیز از مادران باردار سالم بیشتر بود که بر اساس آزمون واریانس یک‌طرفه، بین گروه‌ها از این نظر اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p \leq 0.05$).

میزان بیان ژن آنزیم Dicer زنان در گروه‌های سه‌گانه تحقیق (مادران باردار مبتلا به پره اکلامپسی، مادران باردار سالم و زنان غیر باردار سالم) در نمودار ۶ ارائه شده است. بر اساس این نمودار، میزان آنزیم Dicer نیز در زنان باردار مبتلا به پره اکلامپسی و مادران باردار سالم



نمودار ۶- میزان بیان ژن آنزیم Dicer زنان در گروه‌های مورد مطالعه

DGCR8 در مادران باردار مبتلا به پره اکلامپسی و مادران باردار سالم نسبت به گروه کنترل بالا بود. جفت، مهم‌ترین ساختار برای درک مکانیسم‌های مولکولی پره اکلامپسی است. تغییرات رشد در جفت می‌تواند باعث کاهش میزان اکسیژن و در نتیجه استرس رتیکوکسی اکسیداتیو و اندوپلاسمی شود (۲۳). بسیاری از miRNAهای خاص بیان شده در سلول‌های جفتی

بحث

در مطالعه حاضر که با هدف ارزیابی میزان سطوح آنزیم‌های Drosha، Dicer و پروتئین DGCR8 در خون بیماران مبتلا به پره اکلامپسی و مقایسه آن با مادران باردار سالم و زنان سالم غیر باردار (کنترل) انجام گرفت، میزان آنزیم Dicer، Drosha و پروتئین

در مطالعه ساندریم و همکاران (۲۰۱۶)، نشان داده شد که میزان سرمی 5-miRNA-195 p در افراد مبتلا به پره‌اکلامپسی افزایش یافته و این افزایش با مقادیر سطح sFLT-1 متناسب است. اگرچه نقش sFLT-1 در پره‌اکلامپسی به خوبی ثابت شده است، ولی مکانیزم مربوط به سنتز آن هنوز ناشناخته است و به نظر می‌رسد افزایش میزان sFLT-1 از طریق افزایش میزان p-5 miRNA-195 انجام می‌شود (۲۷).

در مطالعه حاضر میزان آنزیم Drosha در زنان باردار مبتلا به پره‌اکلامپسی و مادران باردار سالم نسبت به زنان سالم غیر باردار (گروه کنترل) بالا بود و در مادران باردار سالم از مادران باردار مبتلا به پره‌اکلامپسی نیز بیشتر بود. این کاهش آنزیم Drosha در زنان باردار مبتلا به پره‌اکلامپسی در مقایسه با زنان باردار سالم می‌تواند از این فرضیه حمایت کند که عدم افزایش مناسب این آنزیم می‌تواند منجر به عدم تنظیم مناسب بیان میکروRNAsها شود که این خود می‌تواند در پیدایش پره‌اکلامپسی نقش داشته باشد.

در مطالعه حاضر میزان آنزیم Dicer و میزان پروتئین DGCR8 در زنان باردار مبتلا به پره‌اکلامپسی و مادران باردار سالم نسبت به زنان سالم غیر باردار (گروه کنترل) بالا بود و در مادران باردار مبتلا به پره‌اکلامپسی نیز از مادران باردار سالم بیشتر بود و از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها وجود داشت و این نتیجه مطابق با نتایج به‌دست آمده در مطالعات دیگر می‌باشد که به اهمیت نقش میکروRNA در ایجاد بیماری پره‌اکلامپسی و سایر بیماری‌ها پرداختند. مطالعه حاضر اولین مطالعه‌ای می‌باشد که نشان داد بیان آنزیم Dicer در زنان باردار مبتلا به پره‌اکلامپسی و مادران باردار سالم نسبت به زنان سالم غیر باردار (گروه کنترل) بالا می‌باشد و این فرضیه را مطرح می‌کند که بیان نامناسب آنزیم Dicer متعاقباً باعث بیان نامناسب تشکیلات میکروRNA شده که این خود می‌تواند از عوامل ایجاد کننده پره‌اکلامپسی باشد. لذا با توجه به این حقایق که میکروRNAها در فعالیت طبیعی سلول دخیل هستند و تنظیم نادرست این مولکول می‌تواند همراه با بیماری باشد و آنزیم‌های اصلی پردازش‌کننده میکروRNA

تمایز تروفوبلاستیک، آنژیوژنز، تکثیر، آپوپتوز، مهاجم و مهاجرت را تنظیم می‌کنند که نشان می‌دهد miRNAs نقش مهمی در رشد جفتی دارند (۲۴). در این رابطه، مواد آزاد شده از جفت به خون مادر، ابزار تشخیصی بالقوه برای پره‌اکلامپسی هستند. شناسایی مولکول‌های miRNA که به طور خاص در پلاسما در حاملگی‌های پره‌اکلامپیک تغییر می‌کند، ممکن است در شناسایی بیومارکرها برای پیش‌بینی و علت پره‌اکلامپسی استفاده شود. پره‌اکلامپسی بیماری مرتبط با بارداری است که از عوامل ژنتیکی، اپی‌ژنتیک و فاکتورهای محیطی تأثیر می‌پذیرد. افزایش آپوپتوز در سلول‌های جفت افراد مبتلا به پره‌اکلامپسی مشاهده شده است. میکروRNAها در تنظیم آپوپتوز مشارکت داشته و به فراوانی در جفت مشاهده می‌شوند. مطالعه لاساپووا و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که میکروRNAهای مرتبط با آپوپتوز miRNA-21 و miRNA-122 در جفت مبتلا به پره‌اکلامپسی دچار بی‌نظمی می‌شوند. افزایش بیان میکروRNAها نشان می‌دهد که مهار اهداف mRNAهای بالقوه، می‌تواند در پاتوژنز پره‌اکلامپسی نقش داشته باشد. آنها توانستند افزایش قابل توجهی در بیان ژن‌های مربوط به miRNA-155، miRNA-21 و miRNA-122 در جفت مبتلا به پره‌اکلامپسی مشاهده کنند (۲۵).

اولین تحقیقی که miRNA و پره‌اکلامپسی را پیوند داد، توسط پینلس و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد (۲۶). رحیمی و همکاران (۲۰۱۵) به افزایش سطح آنزیم‌های فرآیندساز میکروRNAها در زنان باردار اشاره کردند (۱۴). تنظیم نامتناسب میکروRNA و در نتیجه عدم عملکرد مناسب میکروRNAها می‌تواند در پره‌اکلامپسی نقش داشته باشد. از آنجایی که آنزیم‌های Drosha، Dicer در سنتز بیولوژیکی میکروRNA نقش دارند، بنابراین تغییر سطوح آنها از حد نرمال احتمالاً می‌تواند در تشخیص پره‌اکلامپسی به کار رود که نتیجه این تحقیق نیز حاکی از افزایش سطوح این نشانگرها بود. گونل و همکاران (۲۰۱۷) بر کارایی روش‌های مبتنی بر miRNA در تشخیص مشکلات مربوط به بارداری از جمله پره‌اکلامپسی تأکید کردند (۱۹).

بررسی ارتباط بیان ژن‌های مسئول سنتز microRNA شامل Dicer و Drosha با عوارض پره‌اکلامپسی انجام شود.

نتیجه‌گیری

سطح آنزیم‌های Dicer، Drosha و پروتئین DGCR8 در حاملگی پره‌اکلامپسی نسبت به حاملگی سالم بالاتر است. افزایش سطح آنزیم‌های Dicer و Drosha و پروتئین DGCR8 با تنظیم نامتناسب میکروRNAها و در نتیجه عملکرد میکروRNAها در ارتباط است، بنابراین استفاده از بیانگرهای میکروRNAs مرتبط با پره‌اکلامپسی در پلاسمای مادر می‌تواند در پیش‌بینی و تشخیص زود هنگام و پیش‌گیری و درمان پره‌اکلامپسی مفید باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل و تمام مادران شرکت‌کننده در این مطالعه، تشکر و قدردانی می‌گردد.

شامل: Dicer و Drosha می‌باشند و DGCR8 یک فاکتور پروتئینی می‌باشد که برای فعالیت طبیعی Drosha ضروری می‌باشد و میزان آنزیم Dicer و پروتئین DGCR8 در افراد مبتلا به پره‌اکلامپسی در مقایسه با افراد سالم افزایش می‌یابد و با توجه به این حقیقت که میکروRNAs در فعالیت طبیعی سلول‌ها نقش دارند، بنابراین از این آنزیم‌ها می‌توان به‌عنوان نشانگر مولکولی جهت تشخیص سریع پره‌اکلامپسی استفاده کرد.

در این مطالعه میانگین وزن و سن نوزادان در گروه مادران پره‌اکلامپسی به‌طور معنی‌داری کمتر از مادران سالم بود که این یافته منطبق با منابع، قابل انتظار بود (۲۹). بین جنسیت نوزادان و بیماری پره‌اکلامپسی رابطه معنی‌داری مشاهده نشد. میزان زایمان سزارین در مادران مبتلا به پره‌اکلامپسی بیشتر بود که این یافته نیز منطبق با سایر مطالعات می‌باشد (۳۰).

پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری برای مقایسه بیان ژن‌های مسئول سنتز microRNA شامل Dicer و Drosha در بیماران پره‌اکلامپتیک و اکلامپتیک و

منابع

1. Lotfalizadeh M, Deldar K, Salehi M, Ghomian N. Diagnostic value of the test of protein to creatinine ratio in random urine in pregnant women with hypertension for diagnosis of preeclampsia. *Iran J Obstet Gynecol Infertil* 2014; 17(123):1-6. (Persian).
2. Hutcheon JA, Lisonkova S, Joseph KS. Epidemiology of pre-eclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011; 25(4):391-403.
3. Grill S, Rusterholz C, Zanetti-Dällenbach R, Tercanli S, Holzgreve W, Hahn S, et al. Potential markers of preeclampsia--a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7:70.
4. Shahshahan Z, Hashemi M. Crown-rump length discordance in twins in the first trimester and its correlation with perinatal complications. *J Res Med Sci* 2011; 16(9):1224-7.
5. Mohaupt M. Molecular aspects of preeclampsia. *Mol Aspects Med* 2007; 28(2):169-91.
6. Sibai BM, Stella CL. Diagnosis and management of atypical preeclampsia-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200(5):481-7.
7. Chadha G, Sood D. Hellp Syndrome-revisited. *Apollo Med* 2009; 6(3):242-6.
8. Jabelameli M, Shahshahan Z, Azizian A. Evaluating the correlation of systemic inflammatory response syndrome with mortality and morbidity in critically III obstetric patients in ICU. *Qom Univ Med Sci J* 2010; 4(1):37-41. (Persian).
9. Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Spong CY, Dashe J. *Williams obstetrics*. 23th ed. New York: McGraw Hill; 2010. P. 712.
10. Dalmez CA, Santos KG, Botton MR, Tedoldi CL, Roisenberg I. Relationship between polymorphism thrombophilic genes and preeclampsia in Brazilian population. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 37(2):107-10.
11. Hill LD, York TP, Kusanovic JP, Gomez R, Eaves LJ, Romero R, et al. Epistasis between COMT and MTHFR in maternal-fetal dyads increase risk for preeclampsia. *PLoS One* 2011; 6(1):e16681.
12. de Faria Maraschin J. Classification of diabetes. *Adv Exp Med Biol* 2012; 771:12-9.
13. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004; 5(7):522-31.
14. Rahimi G, Jafari N, Khodabakhsh M, Shirzad Z, Dogaheh HP. Upregulation of microRNA processing enzymes Drosha and Dicer in gestational diabetes mellitus. *Gynecol Endocrinol* 2015; 31(2):156-9.

15. Jafari N, Dogaheh HP, Bohlooli S, Oyong GG, Shirzad Z, Alibeiki F, et al. Expression levels of microRNA machinery components Drosha, Dicer and DGCR8 in human (AGS, HepG2, and KEYSE-30) cancer cell lines. *Int J Clin Exp Med* 2013; 6(4):269-74.
16. Zhao C, Dong J, Jiang T, Shi Z, Yu B, Zhu Y, et al. Early second-trimester serum miRNA profiling predicts gestational diabetes mellitus. *PLoS One* 2011; 6(8):e23925.
17. Collares CV, Evangelista AF, Xavier DJ, Rassi DM, Arns T, Foss-Freitas MC, et al. Identifying common and specific microRNAs expressed in peripheral blood mononuclear cell of type 1, type 2, and gestational diabetes mellitus patients. *BMC Res Notes* 2013; 6:491.
18. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2):281-97.
19. Gunel T, Hosseini MK, Gumusoglu E, Kisakesen HI, Benian A, Aydinli K. Expression profiling of maternal plasma and placenta microRNAs in preeclamptic pregnancies by microarray technology. *Placenta* 2017; 52:77-85.
20. Harapan H, Yeni CM. The role of microRNAs on angiogenesis and vascular pressure in preeclampsia: the evidence from systematic review. *Egypt J Med Hum Genet* 2015; 16(4):313-25.
21. Sheikh AM, Small HY, Currie G, Delles C. Systematic review of micro-RNA expression in pre-eclampsia identifies a number of common pathways associated with the disease. *PLoS One* 2016; 11(8):e0160808.
22. Sand M, Skrygan M, Georgas D, Arenz C, Gambichler T, Sand D, et al. Expression levels of the microRNA maturing microprocessor complex component DGCR8 and the RNA-induced silencing complex (RISC) components argonaute-1, argonaute-2, PACT, TARBP1, and TARBP2 in epithelial skin cancer. *Mol Carcinog* 2012; 51(11):916-22.
23. Kuehbacher A1, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res* 2007; 10(1):59-68.
24. Li Q, Long A, Jiang L, Cai L, Xie LI, Gu J, et al. Quantification of preeclampsia-related microRNAs in maternal serum. *Biomed Rep* 2015; 3(6):792-6.
25. Lasabová Z, Vazan M, Zibolenova J, Svecova I. Overexpression of miR-21 and miR-122 in preeclamptic placentas. *Neuro Endocrinol Lett* 2015; 36(7):695-9.
26. Pineles BL, Romero R, Montenegro D, Tarca AL, Han YM, Kim YM, et al. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196(3):261-6.
27. Sandrim VC, Eleuterio N, Pilan E, Tanus-Santos JE, Fernandes K, Cavalli R. Plasma levels of increased miR-195-5p correlates with the sFLT-1 levels in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2016; 35(2):150-8.
28. Chen D, Wang W. Human placental microRNAs and preeclampsia. *Biol Reprod* 2013; 88(5):130-1.
29. Shulman JP, Weng C, Wilkes J, Greene T, Hartnett ME. Association of maternal preeclampsia with infant risk of premature birth and retinopathy of prematurity. *JAMA Ophthalmol* 2017; 135(9):947-53.
30. Khader YS, Batieha A, Al-Njadat RA, Hijazi SS. Preeclampsia in Jordan: incidence, risk factors, and its associated maternal and neonatal outcomes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2018; 31(6):770-6.