

## ارزیابی میزان بیان miR ۲۲۲- و همراهی آن با هورمون AMH جهت تشخیص زود هنگام علائم شبه سندرم تخمدان پلی کیستیک در پلازما بیماران صرعی تحت درمان با والپرات سدیم: یک مطالعه مورد- شاهدی

محیا رجبی<sup>۱</sup>، سیدمحسن میراسماعیلی<sup>۱</sup>، فاطمه منتظری<sup>۲</sup>، مهسا نصرافهانی<sup>۳</sup>،  
سید جلال ضیایی<sup>۴</sup>، سیدمهدی کلانتر<sup>۵\*</sup>

### مقاله پژوهشی

**مقدمه:** اختلال نورولوژی صرع، که با داروهایی مانند سدیم والپرات (یکی از اولویت‌های درمانی بیماران مبتلا به صرع) کنترل می‌شود. سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) یکی از عارضه‌های مصرف والپرات سدیم است. بیماران مبتلا به PCOS به طور مزمین تخمک‌گذاری نمی‌کنند، در نتیجه با عوارض جدی شامل: هیپرپلازی آندومتر به صورت آتیپیک و تیپیک، افزایش خطر کارسینوم آندومتر، دیابت شیرین و کاهش نرخ باروری روبه‌رو هستند. این مطالعه، مطابق با بررسی‌های بیوانفورماتیکی و مطالعات دیگر مبنی بر ارتباط ۲۲۲-miRNA با ژن‌های دخیل در PCOS و هایپرآندروژنیسم، برای ارزیابی رابطه ابتلا به PCOS در بیماران تحت درمان با سدیم والپرات با مقایسه هم‌زمان فاکتور Anti-Mullerian Hormone و مارکر ۲۲۲-miRNA در بازه‌های زمانی خاصی طراحی شد.

**روش بررسی:** در این مطالعه موردی-شاهدی، ۳۳ زن مبتلا به صرع قبل و بعد از مصرف دارو با توجه به معیارهای ورود و خروج انتخاب شدند. پس از خون‌گیری، پلاسمای آن‌ها جدا شد. مطابق دستورالعمل کیت، Total RNA استخراج و سنتز cDNA صورت گرفت و با تکنیک RT-qPCR بیان ۲۲۲-miRNA ارزیابی و تحلیل آماری توسط نرم‌افزار SPSS version ۱۶، آزمون‌های T-test و Anova انجام شد.

**نتایج:** نتایج، بیانگر تفاوت معنادار ( $p < 0/01$ ) میانگین بیان ۲۲۲-miRNA و AMH در افراد بیمار قبل از درمان نسبت به ۳ ماه بعد از درمان می‌باشد. نتایج آزمون همبستگی پیرسون نشان داد که افزایش AMH با کاهش بیان ۲۲۲-miRNA ارتباط مستقیم دارد ( $p < 0/01$ ).

**نتیجه‌گیری:** مطابق با نتایج مطالعه حاضر می‌توان جهت کنترل بهتر عوارض احتمالی دارو، احتمالاً تعویض به موقع دارو و هم‌چنین تشخیص زود هنگام PCOS (علائم شبه PCOS)، از ارزیابی تغییرات بیان ۲۲۲-miRNA هم‌زمان با سنجش AMH استفاده کرد.

**واژه‌های کلیدی:** صرع، سدیم والپرات، ۲۲۲-miRNA، PCOS، AMH

IRCT20190213042701N1

**ارجاع:** رجبی محیا، میراسماعیلی سیدمحسن، کلانتر سیدمهدی، نصرافهانی مهسا، ضیایی سید جلال. ارزیابی میزان بیان ۲۲۲-miR- و همراهی آن با هورمون AMH جهت تشخیص زود هنگام علائم شبه PCOS در پلازما بیماران صرعی تحت درمان با والپرات سدیم: یک مطالعه مورد- شاهدی. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد. ۱۴۰۰؛ ۲۹ (۱۰): ۴۲۰۸-۴۱۹۸.

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه علم و هنر، یزد، ایران.

۲- مرکز تحقیقات سقط، پژوهشکده علوم تولید مثل یزد، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.

۳- گروه آموزشی بیوشیمی، دانشگاه پیام نور تفت، یزد، ایران.

۴- گروه نورولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۵- مرکز تحقیقات ناباروری، پژوهشکده علوم تولید مثل یزد، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.

\* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۳۱۵۱۸۹۱۸، پست الکترونیکی: smkaltar@yahoo.com، صندوق پستی: ۸۹۱۶۸۷۷۳۹۱

با کاهش نرخ باروری روبه‌رو خواهند بود (۲). افزایش هورمون AMH ((anti-mullerian hormone نیز در بیماران مبتلا به PCOS (Polycystic Ovary Syndrome) گزارش شده و همچنین از آن به عنوان یک نشانگر افزایش ذخیره تخمدانی یاد می‌شود (۳). AMH یک هورمون گلیکوپروتئینی و عضوی از فاکتور رشد-بتا است که توسط سلول گرانولوزای تخمدان تولید می‌شود. از نقش‌های اصلی فیزیولوژیکی AMH می‌توان به تعدیل عملکرد (FSH (Follicle-stimulating hormone) در اوایل رشد فولیکولی اشاره کرد. در دوران بلوغ نیز افزایش ترشح آن، از سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های در حال رشد تخمدان و کاهش سطح آن در طی سال‌های باروری را خواهیم داشت. به طوری که پس از یائسگی به علت تهی شدن تخمدان از فولیکول‌های در حال رشد میزان سرمی آن بسیار ناچیز می‌باشد (۴). سطح سرمی AMH با تعداد فولیکول‌های اولیه مرتبط است و در مقایسه با میزان هورمون‌های LH (luteinizing hormone)، FSH، استرادیول، Inhibine B (در سومین روز سیکل ماهیانه) از اختصاصیت بالاتری برخوردار است (۵). در زنان مبتلا به PCOs سطح هورمون AMH نسبت به زنان سالم افزایش چشمگیری دارد (۶). همچنین مطالعات نشان داده است که سطح AMH سرم با تعداد فولیکول آنترال تخمدان (AFC) در زنان مبتلا به PCOS مرتبط است (۷). همچنین مطالعات نشان داد که سطح AMH، ارتباطی قوی با هایپراندرژنیسم و AFC دارد. بنابراین می‌توان از سطح AMH به عنوان یک ابزار جایگزین، (PCOM (Polycystic Ovary Morphology) در سونوگرافی به منظور تشخیص PCOS استفاده کرد (۸). به نظر می‌رسد استعداد‌های ژنتیکی افراد در خصوص پاسخ به درمان دارویی می‌تواند متفاوت باشد (۹). این تحقیق برای بیماران صرع مصرف کننده سدیم‌والپرات جهت ارزیابی مارکر بیولوژی، miRNA-۲۲۲ همچنین تعیین ارتباط آن با ابتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک طراحی شده که با استفاده از آن به توان قبل از تجویز این دارو بیمار را از نظر ابتلا به این سندرم بررسی کرد. همچنین با بررسی تغییرات پروفایل بیانی miRNA-۲۲۲ به جای بررسی PCOM (Polycystic Ovary

صرع بیماری عصبی و مزمنی است که حداقل ۵۰ میلیون نفر در سراسر دنیا به آن مبتلا هستند، مهم‌ترین مشخصه آن تشنجات بدون تحریک و مکرر است که با دارو کنترل می‌شود همچنین در موارد مقاوم به دارو نیاز به جراحی پیشنهاد می‌شود. کنترل حملات صرع با تجویز بیش از ۱۵ نوع داروی ضد صرع در دسترس انجام می‌شود. در این بیماران یکی از اولویت‌های درمانی، داروی سدیم‌والپرات بوده، که دارای فعالیت ضد تشنجی و تثبیت‌کننده خلق و خو می‌باشد همچنین کاربرد فراوانی در نوروپاتوفیزیولوژی شامل: صرع، اختلالات دوقطبی، سردردهای میگرنی، دردهای عصبی مزمن دارد. این دارو با تنظیم سطح گاما بوتیریک اسید و فعالیت کانال سدیمی، سبب مهار فعالیت بیش از حد نورون‌ها می‌شود. در مطالعات پیشین ثابت شده است که سدیم‌والپرات می‌تواند عوارض جانبی روی هورمون‌ها و نیز تاثیر نامطلوبی روی زندگی فرد از جمله: افزایش ریسک ابتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، کاهش املاح معدنی در استخوان‌ها و کاهش باز جذب کلسیم در استخوان‌ها، کاهش عملکرد جنسی به همراه داشته باشد. همچنین در افراد مسن نیز با ریسک پارکینسون برگشت‌پذیر و اختلالات شناختی حاصل از آن روبه‌رو خواهیم بود (۱). در بعضی مقالات روانپزشکی و نورولوژی، سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (Polycystic Ovary Syndrome) به عنوان یکی از عارضه‌های مصرف دراز مدت والپروات سدیم شناخته می‌شود. این سندرم که شایع‌ترین اختلال غدد درون‌ریز در زنان در سن باروری است، که به صورت اختلال عملکرد تخمک‌گذاری، سطح بالای آندروژن بالینی (هیرسوتیسم) و بیوشیمیایی (هورمون‌های مرتبط) و تخمدان‌های پلی‌کیستیک (با تشخیص سونوگرافی) در بیماران دیده می‌شود، که در نتیجه آن با عوارض جدی شامل: هیپرپلازی آندومتر به صورت آتیپیک و تیپیک، افزایش خطر کارسینوم آندومتر، احتمالاً سرطان پستان، چاقی، افزایش خطر بیماری قلبی و عروقی و افزایش خطر دیابت شیرین (T2DM) روبه‌رو هستند، همچنین در نهایت نیز، این بیماران

هایپراندرورژنیک و کیست تخمدان و اختلالات متابولیک شبیه به PCOs در انسان مورد بررسی قرار گرفت (۱۸). محققان با القای دهیدروتسترون در مدل موشی PCOs و بررسی پروفایل بیانی miRNAهای مرتبط دریافتند که ۲۵ microRNA از جمله بیان miRNA-222 پایین و متفاوتی را در بافت کیستیک تخمدان در مقایسه با گروه نرمال داشتند. همچنین محققان بازده سلول‌های رحمی که با DHT تیمار شده‌اند نیز با کاهش بیان miRNA-222 تایید کردند. کاهش بیان miRNA-222 در سلول‌های Theca تایید شده که موجب افزایش تکثیر سلولی با هدف قرار دادن  $\frac{1}{2}P/kip$  در این سلول‌ها می‌شود (۱۹). به‌علاوه بیش بیان miRNA-222 با کاهش رسپتور استروژن و مسیر سیگنال‌دهی آن و همچنین ژن‌های هدف رسپتور استروژن مرتبط است (۲۰). Sang و همکاران که بیان miRNA-222 در مایع فولیکولی افراد مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک گزارش کرده و همچنین microRNAهایی از جمله: miRNA-520c, miRNA-222- که miRNA-24, miRNA-132, miRNA-320, miRNA نقش مهمی در استروئیدوژنز و تنظیم غلظت استرادیول دارند، را گزارش کردند (۲۱). بر اساس مطالعات miRNA-320 دارند، و miRNA-132 در مایع فولیکولی افراد مبتلا به PCOs مقایسه با افراد سالم کاهش بیان داشتند همچنین ۲۴- miRNA و p53-483- miRNA نیز در تغییر غلظت پروژسترون در افراد مبتلا به PCOs نقش ایفا می‌کنند (۲۲). مطالعات نشان داد که بیان miRNA-222 در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ افزایش داشته است (۲۳).

### روش بررسی

در این مطالعه موردی-شاهدی، نمونه خون مربوط به ۳۳ زن مبتلا به صرع (از نوع کوچک یا پارشیال ویا فوکل، که توسط پزشک متخصص تشخیص داده شده بود) از میان ۱۰۹ بیماری که جهت درمان صرع به درمانگاه صرع مسیح یا کلینیک خانواده مراجعه کرده بودند وارد مطالعه شدند. بدین شرح که ۵۰ بیمار برای اولین بار تحت درمان با سدیم

(Morphology) در سونوگرافی و ارزیابی پروفایل هورمونی دخیل در این سندرم، حین مصرف دارو در بیماران مصروع عوارض دارو را بررسی و از پیشرفت آن جلوگیری کرد. همچنین می‌توان برای بیماران مستعد ابتلا به این سندرم، داروهای دیگری به جای سدیم‌والپرات تجویز نمود و یا با استفاده از درمان‌های کمکی به موقع، سبب پیشگیری از بروز سندرم تخمدان پلی کیستیک با تجویز دارویی همانند متفورمین ریسک ابتلا به این سندرم و یا حتی ریسک عوارض بعدی ناشی از سندرم تخمدان پلی کیستیک را کاهش داد. miRNAها قطعه‌ای از RNAهای کوچک الیگونوکلوئیدی، که قادر به تنظیم بیان ژن در سطح پس از رونویسی هستند (۱۰) و نقش مهمی در مسیر سیگنال‌دهی و در نتیجه بروز بیماری‌ها ایفا می‌کنند (۱۱). بیان miRNA تغییر یافته با اختلالات مختلفی از جمله IR, T2DM, اختلال لیپید، ناباروری، تصلب شرایین، آندومتریوز و سرطان همراه است. با توجه به اینکه PCOS نیز دارای ویژگی‌های مشابه است (۱۲)، علاقه به بررسی نقش miRNAها در تشخیص و مدیریت PCOS افزایش می‌یابد. در سال‌های اخیر، مطالعات نشان داده است که miRNA در مایعات مختلف بدن از جمله مایع فولیکولی زنان مبتلا به PCOS وجود دارد. بنابراین، می‌تواند به عنوان یک نشانگر زیستی بالقوه عمل کند و می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی جدید برای تشخیص و درمان PCOS باشد (۱۳). Mir222 از یک جفت دسته ژن واقع در کروموزوم X (Xp3.11) رونویسی می‌شوند که شامل قطعه‌ای حفظ شده و شامل ۷۲۷ باز می‌باشد (۱۴). در بسیاری از مطالعات ارتباط شروع و پیشرفت سرطان و دیگر بیماری‌ها با miRNA-222 تایید شده است (۱۵). هایپراندرورژنیک یکی از ویژگی‌های کلیدی در افراد مبتلا به PCOs است و سطح آندروژن‌های گردش‌ی چون: تستوسترون، اندرواستندیون، دهیدروتسترون (DHT) در این بیماران بالا می‌باشد (۱۶). در شماری از مدل‌های حیوانی با القای دهیدروآندرواستندیون، پاتولوژی PCOs مورد بررسی قرار گرفت (۱۷). در گزارش اخیر بر روی مدل موشی PCOs مزمن و با القای DHT حالت

گزارش آزمایش بیماران یا پرسشنامه پر شده توسط متخصصان استخراج شده است. این موارد شامل سطح هورمون آنتی مولرین (AMH)، BMI (Body mass index)، سن، نوع صرع، فراوانی، سابقه خانوادگی و سن بروز علائم تشنج است.

نمونه‌گیری خون و استخراج RNA برای بررسی miRNA مورد مطالعه

جهت بررسی حدود ۵ CC خون افراد واجد شرایط در لوله‌های EDTA دار جمع‌آوری شد و سریعاً لوله در یخ خشک قرار داده شد و در کمتر از یک ساعت نمونه‌ها در دور rpm ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و بعد از آن پلاسما حاصله به تیوپ‌های RNase free منتقل و در فریزر -۸۰ و تا زمان جمع‌آوری تمامی نمونه‌ها (۶ ماه) نگهداری گردید. به دلیل مقاوم‌تر بودن miRNA نسبت به RNA نمونه‌ها از دست نمی‌روند، در این مطالعه miRNAهای مورد نظر از نوع خارج سلولی (ترشحی) می‌باشند بنابراین به پروتئین‌های خارج سلولی نیز متصل بوده، که این خاصیت بر طول مدت نگهداری آن‌ها می‌افزاید. استخراج RNA به کم. High Pure ROCH miRNA Isolation Kit (Cat.No ۰۵۰۸۰۵۷۶۰۰۱) و مطابق با پروتکل آن صورت گرفت. RNA استخراج شده در فریزر -۸۰ را در فریزر نگهداری می‌کنیم. جهت ارزیابی مقدار و کیفیت RNA استخراج شده، از دستگاه نانو دراپ (c-Thermo NanoDrop ۲۰۰۰ scientific) استفاده شد. این دستگاه بدون نیاز به کووت و تنها با استفاده از ۱ الی ۲ میکرولیتر از نمونه قادر است در زمانی کمتر از ۱۰ ثانیه کلیه طول موج‌های موجود در طیف مورد نظر را با دقت ۱ نانومتر اسکن نماید و غلظت یا جذب نوری ماده مورد نظر را نیز تعیین کند. برای این منظور با استفاده از جذب نمونه در طول موج ۲۶۰ nm، غلظت RNA به دست آمد. برای تعیین میزان خلوص RNA و بررسی احتمال وجود آلودگی با پروتئین نسبت  $260A/280A$  محاسبه شده در نمونه‌ها برابر ۲-۱/۸ بود. این نسبت محاسبه شده توسط دستگاه در محدوده استاندارد است، نشان‌دهنده عدم آلودگی نمونه به پروتئین است.

والپرات قرار گرفتند (new case) و ۴۵ بیمار دیگر قبلاً داروهای دیگری مانند فنوباربیتال یا گاباپنتین مصرف می‌کردند یا تحت درمان هم‌زمان با چند داروی ضد صرع بودند. گروه بیماران مورد بررسی در محدوده سنی ۱۸-۳۵ سال و از قومیت‌های مختلف ایرانی بودند (البته ۱۱ بیمار نیز زیر سن ۱۸ سال بوده که از مطالعه حذف شدند). از جمله معیارهای ورود و خروج به این مطالعه عبارتند از: ۱- بیماران نباید هیچ‌گونه سابقه بیماری کبدی یا کلیوی و یا داروهای مربوط به نارسایی‌های کبد و کلیه را در حین درمان مصرف کنند (تست کبد نرمال: آلانین آمینوترانسفراز و اسپاراتات آمینوترانسفراز بیش از ۳ واحد بیشتر از محدوده نرمال بوده و نارسایی کلیوی داشته باشند یعنی کراتینین سرم شان بیش از ۱/۷ میلی‌گرم در دسی‌لیتر باشد). ۲- بیماران نباید هیچ‌گونه داروی ضدبارداری در حین مطالعه مصرف کرده باشند (که در حین مطالعه ۱ نفر به علت حاملگی از مطالعه خارج شد). ۳- سابقه بیماری تیروئیدی یا سندرم تخمدان پلی‌کیستیک نداشته باشند (که ۲ بیمار به علت سابقه بیماری تیروئید از مطالعه خارج شدند). بیماران مورد بررسی افراد مصروعی هستند که با سدیم والپرات (۵۰۰ میلی‌گرمی رها دارو) با (مقدار دوز نهایی مورد استفاده بیمار: ۱۰۰۰ میلی‌گرم یعنی قرص ۵۰۰ میلی‌گرمی یکی صبح یکی شب مصرف می‌شود) تحت درمان‌اند و پس از گذشت ۶ ماه ابتلا به PCO آن‌ها طبق معیار (NIH) اثبات شد. لازم به ذکر است از ۵۰ بیمار مورد بررسی ۱۰ بیمار به علت تعویض دارو و یا تجویز داروی دیگری همراه با والپرات سدیم و ۴ مورد نیز به علت مصرف داروهایی مانند متفورمین از مطالعه حذف شدند. با توجه به هدف مطالعه در حین بررسی ۳۶ نفر باقی‌مانده ۳ نفر به علت عدم پیگیری کامل درمان نیز از مطالعه حذف شدند. در این مطالعه طبق قوانین اخلاقی رضایت‌نامه‌ای تنظیم و به‌صورت آگاهانه توسط افراد بیمار در ابتدا پژوهش تکمیل گردید و چنانچه هر یک از شرکت‌کنندگان در این پژوهش طی مطالعه تمایل به قطع همکاری داشتند آزادانه از مطالعه خارج شدند. برخی از اطلاعات مورد نیاز در این مطالعه از

## روش ساخت cDNA و پرایمرهای آن

در این مطالعه، سنتز cDNA با پرایمرهای stem loop که با استفاده از [http:// microRNA database](http://microRNA_database) و [www.mirbase.org](http://www.mirbase.org) طراحی و توسط شرکت بن یاخته سنتز شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت BON-miR 1st-strand cDNA (Cat.BON.209001) QRT-synthesis miRNA انجام شد. در نهایت واکنش QRT-PCR برای miRNA با استفاده از کیت High-Specificity miRNA QPCR (Cat.BON.209002) Core BON-miR Reagent Kit، پرایمر فوروارد اختصاصی و پرایمر reverse (universal) مورد نظر انجام شد. در انجام

یک واکنش، استفاده از کنترل داخلی به منظور یکسان‌سازی تغییرات در مقدار cDNA در نمونه‌های مختلف ضروری است. در کیت حاضر، از پرایمرهای SNORD به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. همچنین در این از (Cat. No. A325402) AMPLIQON QReal Plus 2x Green High ROX Master Mix به‌عنوان معرف فلوئورسنت استفاده شد.

## پرایمرهای مورد استفاده برای سنتز cDNA

پرایمرهای stem loop اختصاصی miRNA-۲۲۲ و پرایمر Snord (کنترل داخلی) مورد استفاده در این مطالعه، توسط شرکت بن یاخته سنتز شد، همچنین توالی این پرایمرها در جدول زیر بیان شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده

miRNA	Tm	primer(stem loop)
Hsa- miRNA-۲۲۲	۵/۵۸	AACTACATCTGGCTACTGGGT
hsa- snord۴۷-F	۶۰	ATC ACT GTA AAA CCG TTC CA

بررسی بیان کمی miRNA مورد مطالعه با استفاده از تکنیک

## Real Time PCR

برای اجرای Real time PCR از پروتکل پیشنهادی شرکت AMPLIQON استفاده شد. زیرا مسترمیکس حاوی سایبرگرین این شرکت مورد استفاده قرار گرفت. پس از مخلوط کردن اجزای واکنش مطابق با دستور العمل کیت BON-miR QPCR انجام شد. کیت مذکور حاوی معرف‌های لازم برای انجام واکنش QPCR بر روی cDNA تهیه شده از miRNAها می‌باشد. دقت معرف‌ها به حدی بالاست که توانایی شناسایی miRNA در مقادیر کم و حتی با یک نوکلئوتید تفاوت را نیز دارا می‌باشند، واکنش Real time PCR در دستگاه Applied Biosystems StepOne انجام شد. پس از اتمام واکنش، تعیین مقادیر Ct، تحلیل و مقادیر  $2^{-\Delta Ct}$  گزارش شد.

## تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی آماری نتایج از نرم‌افزار SPSS version 16 استفاده شد. از آزمون‌های T-test student, ANOVA

Tukey, Corralation, برای آنالیز آماری نتایج آزمایشات و ارزیابی آن‌ها استفاده شد. معنی‌داری نتایج برحسب  $Pvalue < 0/05$  سنجیده شد.

## ملاحظات اخلاقی

در این تحقیق ملاحظات اخلاقی مورد تایید شورای کمیته اخلاق قرار گرفته است (کداخلاق: IR.SSU.RSI.REC.1396.8).

## نتایج

بیان miRNA-۲۲۲ در نمونه پلاسما افراد مبتلا به صرع در بازه‌های زمانی قبل از درمان، ۳ و ۶ ماه بعد از درمان اندازه‌گیری و با کمک نرم‌افزار SPSS تحلیل شد. بررسی‌های آماری مشخص کرد که بیان miRNA-۲۲۲ در نمونه پلاسما افراد مبتلا به صرع بعد از مصرف دارو نسبت به نمونه پلاسما افراد صرعی قبل از مصرف دارو، کاهش و سطح هورمون AMH افزایش معنی‌داری داشته است ( $P > 0/05$ ). با تست TUKey

تست correlation که بین بیان miRNA-222 در سه بازه زمانی و دو متغیر دیگر سن و BMI انجام شد، نشان داد که در نتیجه تغییرات سن و BMI با تغییرات بیان miRNA-222 مرتبط یا هم‌بسته نیست یا به عبارتی این دو عامل بر بیان miRNA-222 تاثیرگذار نیستند و هیچ ارتباط معناداری بین آن‌ها پیدا نشد. اما ارتباط معناداری بین بازه زمانی مصرف دارو، میزان AMH و بیان miRNA-222 یافت شد (جدول ۳).

ANOVA بیان miRNA-222 و دیگر متغیرها در سه بازه زمانی مذکور آنالیز شد. که در نتیجه این آنالیز تغییرات سن و BMI در دوبازه زمانی قبل از درمان و ۳ ماه بعد از آن نسبت به بازه زمانی ۶ ماه معنادار نیست. بیان miRNA-222 و تغییرات هورمونی AMH با توجه به آنالیز صورت گرفته در دو بازه زمانی ۳ و ۶ ماه نسبت به قبل از درمان معنادار بوده که شرح بیان miRNA-222 در هر سه گروه در (نمودار ۱) است. بیان miRNA-222 و هم‌چنین سطح AMH در بازه زمانی ۳ ماه نسبت به ۶ ماه معنی‌دار نبوده است. نتایج به دست آمده از

جدول ۲: مقایسه میانگین و انحراف استاندارد متغیرها در بیماران مبتلا به صرع قبل و بعد از درمان با سدیم والپروات در بازه‌های ۳ و ۶ ماه

متغیرها	قبل از درمان (تعداد بیماران=۳۳)			۳ ماه پس از درمان (تعداد بیماران=۳۳)			۶ ماه پس از درمان (تعداد بیماران=۳۳)		
	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	P-value (بین بازه‌های زمانی)	P-value (بین بازه‌های زمانی)	P-value (بین بازه‌های زمانی)
سن	۲۶/۵ ± ۰/۹۵۰	۲۶/۵ ± ۰/۹۵۰	۲۶/۵ ± ۰/۹۵۰	۲۶/۵ ± ۰/۹۵۰	۲۶/۵ ± ۰/۹۵۰	۲۶/۵ ± ۰/۹۵۰	-	-	-
شاخص توده بدنی <sup>۱</sup> (kg/m <sup>2</sup> )	۲۴/۶۴ ± ۰/۵۸۰	۲۵/۰ ± ۶۷/۷۴	۲۵/۰ ± ۶۷/۷۴	۲۵/۰ ± ۶۷/۷۴	۲۵/۰ ± ۶۷/۷۴	۲۵/۰ ± ۶۷/۷۴	۰/۱۷	۰/۳۵	۰/۵۱
آنتی مولرین هورمون <sup>۲</sup> (mIU/mL)	۲/±۷۶/۰/۱۴	۶/۰ ± ۳۰/۳۱	۶/۰ ± ۳۰/۳۱	۶/۰ ± ۳۰/۳۱	۶/۰ ± ۳۰/۳۱	۶/۰ ± ۳۰/۳۱	*۰/۰	*۰/۰۳	*۰/۰
بیان miRNA - ۲۲۲ (۲ <sup>-ΔCT</sup> )	۰/۲۰۹ ± ۰/۰۱۳	۰/۱۷۸ ± ۰/۰۲۱	۰/۱۷۸ ± ۰/۰۲۱	۰/۱۷۸ ± ۰/۰۲۱	۰/۱۷۸ ± ۰/۰۲۱	۰/۱۷۸ ± ۰/۰۲۱	*۰/۰	۰/۰۷۳	*۰/۰۱۱

\*P value .۱>۰/۰۵ Body Mass Index .۲ anti-mullerian hormone

جدول ۳: همبستگی متغیرهای دموگرافیک و هورمون AMH با میزان بیان miRNA-222 بین بازه های زمانی ۳ و ۶ ماه بعد از مصرف دارو و قبل از آن

متغیرها	شاخص همبستگی	بیان miRNA (۲ <sup>-ΔCT</sup> ) N=۳۳	آنتی مولرین هورمون N=33
سن	ضریب همبستگی پیرسون P-value	-۰/۱۱۵ ۰/۲۸۲	-۰/۱۱۰ ۰/۳۰۱
شاخص توده بدنی	ضریب همبستگی پیرسون P-value	-۰/۰۵ ۰/۶۳۸	-۰/۱۰۱ ۰/۳۴۶
بیان miRNA-222 (۲ <sup>-ΔCT</sup> )	ضریب همبستگی پیرسون P-value	۱ P-value	۰/۵۰۱ **۰۰۰/۰
آنتی مولرین هورمون	ضریب همبستگی پیرسون P-value	۰/۵۰۱ **۰۰۰/۰	۱

\*\* P-value > ۰.۰۱ و همبستگی در سطح ۰.۰۵ و ۰.۰۱ هم معنادار است.



نمودار ۱: میانگین و انحراف معیار بیان (miRNA-۲۲۲) در بیماران مبتلا به صرع قبل و بعد از درمان با سدیم والپرات در بازه‌های ۳ و ۶ ماه

معناداری در پلاسما و بافت تخمدان زنان مبتلا به PCOs نسبت به سالم کاهش دارد (۲۶). و در نهایت باتوجه به آنالیزهای آماری بیوانفورماتیکی نشان داده شده که ژن هدف این miRNA درگیر در آپتوزیس، چرخه سلولی و مسیر آندوکرینی شامل مسیره‌های: JAK-STA, WNT, MAPK می‌شود (۲۷). در مطالعات انجام شده روی بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک این چنین مطرح شد که افزایش سیگنالینگ گابا در آنها سبب ازدیاد فعالیت سیستم GnRH/LH و در نتیجه ارتباط موثر با پایین دست خودش باشد. خانم‌های مبتلا به PCOs در مایع مغزی نخاعی خود دارای سطح بالاتری نسبت به گروه شاهد می‌باشند. استفاده از والپرات سدیم نیز (که خود افزایش دهنده سطح گابا است) جهت درمان بیماران صرعی نیز تجویز می‌شود، با ابتلا به PCOs همبستگی دارد. مطالعات نشان داد که، بیان miRNA-۲۲۲ علاوه بر تاثیر در رشد سرطان سینه، تهاجم و مهاجرت سلول‌ها، با هدف قرار دادن مسیر PTEN/AKT در افزایش توانایی خود نوسازی سلول‌های بنیادی نیز نقش ایفا می‌کند (۲۸). کاهش بیان miRNA-۲۲۲ با کاهش تنظیمی هیستون داستیلاز که در فعالیت سلول‌های NK/c-Jun و فعال کردن فاکتور هسته‌ای NF-κB نقش دارند موجب پیشرفت سرطان بعضی سرطان‌ها از جمله سرطان کبد نیز می‌شود (۲۹). Tanaka و همکاران دریافتند که متفورمین با مهار بیان miRNA-۲۲۲ سبب توقف سلول در فاز G1، افزایش فرایند آپتوز و تنظیم بالای P27 می‌شود (۳۰).

### بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که AMH به صورت مشهود با کاهش بیان miRNA-۲۲۲ ارتباط مستقیم دارد. سدیم والپرات یک ترکیب استیک بوده، که به عنوان ضد تشنج در درمان صرع، mood stabilizing agent در درمان مانیا و بیماری دو قطبی، سردردهای میگرنی، دردهای عصبی مزمن، به خوبی عمل می‌کند. در بیماران مبتلا به صرع یکی از اولویت‌های درمانی، داروی سدیم والپرات است، با وجود این، تحقیقات نشان داد در مبتلایان به صرع که این دارو را مصرف می‌کنند در بعضی موارد عوارضی مانند PCOs گزارش شده است، به نظر می‌رسد استعداد‌های ژنتیکی افراد می‌تواند روی میزان پاسخ درمانی به این دارو تاثیرگذار باشد. با استفاده از تکنیک microarray که توسط Long و همکاران انجام شد، آنالیز پروفایل بیانی microRNAهای سرم در افراد مبتلا به PCOs مورد بررسی قرار گرفت که در این مطالعه افزایش بیان ۸ microRNA شامل: miRNA-۲۲۲, miRNA-۱۶, miRNA-۱۸۶, miRNA-۱۹۹a, miRNA-۲۴, miRNA-۱۴۶a, miRNA-۱۰۶b, miRNA-۳۰c گزارش شد. یافته‌های Q-PCR نیز بیش بیان miRNA-۲۲۲, miRNA-۳۰c را در افراد مبتلا به PCOs تایید کرد (۲۴). نتیجه چند آنالیز لجستیک نیز بیان این ۲ microRNA را به عنوان بیومارکرهای مهمی در PCOs معرفی کرد (۲۵). در مطالعات اخیر نشان داده شده که سطح بیان miRNA-۲۲۲ به طور

شناسایی افراد مبتلا و کنترل عوارض کمک کرد (۳۴).

### نتیجه گیری

مطابق با نتایج مطالعه حاضر، مبنی بر افزایش هورمون AMH که خود نشان دهنده افزایش ذخایر فولیکولی در بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک است و هم چنین با توجه به نتایج تست correlation که بیانگر ارتباط معناداری بین بازه زمانی مصرف دارو، میزان AMH و بیان miRNA-۲۲۲ بود. پس در نتیجه می توان جهت کنترل بهتر عوارض احتمالی دارو، احتمالاً تعویض به موقع دارو و هم چنین تشخیص زود هنگام PCOs (علائم شبه PCOs)، ازارزایی تغییرات بیان miRNA-۲۲۲- هم زمان با سنجش AMH استفاده کرد

### سپاس گذاری

این پژوهش ماحصل بخش اولیه طرح تحقیقاتی مصوب در مرکز تحقیقات سقط، پژوهشکده علوم تولید مثل یزد می باشد. با سپاس و قدردانی فراوان از استاد بزرگوار دکتر سید مهدی کلانتر و مدیر مرکز و تمامی پرسنل آزمایشگاه ژنتیک این مرکز از جمله سرکار خانم دکتر فاطمه منتظری و هم چنین از آقای دکتر سید مسعود اعتمادی فر و تمامی پرسنل زحمت کش آزمایشگاه ژنوم تحت مدیریت آقای دکتر منصور صالحی و آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان الزهرا اصفهان که در امر نمونه گیری یاری رساندند، کمال تشکر را دارم. از تمامی اساتید راهنما و مشاور نیز سپاس گزار هستم.

حامی مالی: پژوهشکده علوم تولید مثل یزد

تعارض در منافع : ندارد

با خاموش کردن miRNA-۲۲۲ با الیگونوکلوئید anti-miRNA می توان به واسطه بیش تنظیمی PTEN رشد سلول های سرطانی را مهار و تهاجم سلولی را کنترل نمود، هم چنین سبب افزایش حساسیت به رادیواکتیو در سلول های سرطانی به واسطه بیش تنظیمی این پروتئین را خواهیم داشت. بیان miRNA-۲۲۲ در پلازما هبستگی معناداری با متاستاز غد دلنفاوی و بقای آن ها دارد (۳۱). در حقیقت والپرات باعث افزایش آندروژنیز از طریق مهار سیتوکروم P۴۵۰ که منجر به مهار تبدیل تسترون به استروژن می شود، یک حالت هایپراندرژنیک را ایجاد می کند. آندروژنیز در تخمدان در اولین مرحله توسط سلول های thecal که ژن cytochrome P ۴۵۰c را بیان می کنند، LH را به (DHEA androstenedione) تبدیل می کند (۳۲). بیشتر این پیش سازها توسط سلول های گرانولار که آنزیم P۴۵۰ aromatase را داشته باشند، تبدیل به استروژن می شوند البته، معمولاً تخمدان ها بر خلاف غدد آدرنال مستقیماً آندروژن تولید می کنند، معمولاً به صورت تستوسترون و آندرواستندیون. P۴۵۰c یکی از مهم ترین آنزیم ها، جهت تولید استروئید و بیوژنز آندروژن ها است. این آنزیم توسط یک ژن توسط سلول های thecal کد می شود که هم فعالیت ۱۷,۲۰-lyase و ۱۷α-hydroxylase را دارند، که در تولید کورتیزول، آلدوسترون و DHEA نقش ایفا می کنند (۳۳). افزایش هورمون AMH که خود نشان دهنده افزایش ذخایر فولیکولی در بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک است، اما در این مطالعه با بررسی این هورمون می توان مانند بیان miRNA-۲۲۲ به

### References:

1-Shorvon S. *Handbook of Epilepsy Treatment*. 3<sup>th</sup> ed. Progress in Neurology and Psychiatry. American: John Wiley & Sons(Wiley); 2010; 4.

2-Lizneva D, Suturina L, Walker W, Brakta S, Gavrilova-Jordan L, Azziz R. *Criteria, Prevalence, and Phenotypes of Polycystic Ovary Syndrome*. Fertility and Sterility 2016; 106(1): 6-15 .



- 3-Wang L, Fan H, Zou Y, Yuan Q, Hu X, Chen X, et al. *Aberrant Expression of Long Non-coding RNAs in Exosomes in Follicle Fluid from PCOS Patients*. Front Genet 2021; 11: 1-10 .
- 4-Bedenk J, Vrtačnik-Bokal E, Virant-Klun I. *The Role of Anti-Müllerian Hormone (AMH) in Ovarian Disease and Infertility*. J Assist Reprod Genet 2020; 37(1): 89-100 .
- 5-Qin L, Zhao S, Yang P, Cao Y, Zhang J, Chen ZJ, et al. *Variation Analysis of Anti-Müllerian Hormone Gene in Chinese Women with Polycystic Ovary Syndrome*. Endocrine 2021; 72(1): 287-93 .
- 6-Stracquadiano M, Ciotta L, Palumbo MA. *Relationship between Serum Anti-Mullerian Hormone and Intrafollicular AMH Levels in PCOS Women*. Gynecol Endocrinol 2018; 34(3): 223-8. Available
- 7-Sova H, Unkila-Kallio L, Tiitinen A, Hippeläinen M, Perheentupa A, Tinkanen H, et al. *Hormone Profiling, Including Anti-Müllerian Hormone (AMH), for the Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) and Characterization of PCOS Phenotypes*. Gynecol Endocrinol 2019; 35(7): 595-600 .
- 8-Dewailly D, Barbotin AL, Dumont A, Catteau-Jonard S, Robin G. *Role of Anti-Müllerian Hormone in the Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome*. Front Endocrinol (Lausanne) 2020; 11: 641 .
- 9-Gerhard L. *Impact of Epilepsy and AEDs on Reproductive Health*. In: Harden CL, Thomas SV, Tomson T, editors. Epilepsy in Women. 1rd ed. American: John Wiley & Sons(Wiley); 2013; 53-63 .
- 10-Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. *Horizontal Transfer of Micronas: Molecular Mechanisms and Clinical Applications*. Protein Cell 2012; 3(1): 28-37 .
- 11-Wang J, Chen J, Sen S. *MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics*. J Cell Physiol 2016; 231(1): 25-30 .
- 12-Chen Z, Ou H, Wu H, Wu P, Mo Z. *Role of microRNA in the Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome*. DNA Cell Biol 2019; 38(8): 754-62 .
- 13-Abdalla M, Deshmukh H, Atkin SL, Sathyapalan T. *Mirnas as a Novel Clinical Biomarker and Therapeutic Targets in Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): A Review*. Life Sci 2020; 259:118174 .
- 14-Han SH, Kim HJ, Gwak JM, Kim M, Chung YR, Park SY. *Microrna-222 Expression as a Predictive Marker for Tumor Progression in Hormone Receptor-Positive Breast Cancer*. J Breast Cancer 2017; 20(1): 35-44 .
- 15-Kim EJ, Jang M, Choi JH, Park KS, Cho IH. *An improved dehydroepiandrosterone-induced rat model of polycystic ovary syndrome (Pcos): Post-pubertal improve pcos's features*. Front Endocrinol (Lausanne) 2018; 9: 1-7 .
- 16-Guedikian AA, Lee AY, Grogan TR, Abbott DH, Largaespada K, Chazenbalk GD, et al. *Reproductive and Metabolic Determinants of Granulosa Cell Dysfunction in Normal-Weight Polycystic Ovary*. Fertil Steril 2019; 109(3): 508-15.
- 17-Rababa'h AM, Matani BR, Ababneh MA. *The Ameliorative Effects of Marjoram in Dehydroepiandrosterone Induced Polycystic Ovary Syndrome in Rats*. Life Sci 2020; 261: 118353 .
- 18-Hossain MM, Cao M, Wang Q, Kim JY, Schellander K, Tesfaye D, et al. *Altered Expression*

- of Mirnas in a Dihydrotestosterone-Induced Rat PCOS Model.* J Ovarian Res 2013; 6: 1-11 .
- 19-Sun Y, Chen G, He J, Huang ZG, Li SH, Yang YP, et al. *Clinical Significance and Potential Molecular Mechanism of Mirna-222-3p in Metastatic Prostate Cancer.* Bioengineered 2021; 12(1): 325-40 .
- 20-Hossain MM, Cao M, Wang Q, Kim JY, Schellander K, Tesfaye D, et al. *Altered Expression of Mirnas in a Dihydrotestosterone-Induced Rat PCOS Model.* J Ovarian Res 2013; 6(1): 36 .
- 21-Sørensen AE, Wissing ML, Salö S, Englund ALM, Dalgaard LT. *Micrnas Related to Polycystic Ovary Syndrome (Pcos).* Genes (Basel) 2014; 5(3): 684-708 .
- 22-Liu S, Sun X, Wang M, Hou Y, Zhan Y, Jiang Y, et al. *A Microna 221- And 222-Mediated Feedback Loop Maintains Constitutive Activation of Nfkb and STAT3 in Colorectal Cancer Cells.* Gastroenterology 2014; 147(4): 847-59.e11 .
- 23-Balasubramanyam M, Aravind S, Gokulakrishnan K, Prabu P, Sathishkumar C, Ranjani H, et al. *Impaired Mir-146a Expression Links Subclinical Inflammation and Insulin Resistance in Type 2 Diabetes.* Mol Cell Biochem. 2011; 351(1-2): 197-205 .
- 24-Long W, Zhao C, Ji C, Ding H, Cui Y, Guo X, et al. *Characterization of Serum Micrnas Profile of PCOS and Identification of Novel Non-Invasive Biomarkers.* Cell Physiol Biochem 2014; 33(5): 1304-15 .
- 25-Trikudanathan S. *Polycystic Ovarian Syndrome.* Medical Clinics of North America 2015; 99: 221-35 .
- 26-Chen B, Xu P, Wang J, Zhang C. *The Role of Mirna in Polycystic Ovary Syndrome (PCOS).* Gene 2019; 706: 91-6 .
- 27-Imbar T, Eisenberg I. *Regulatory Role of Micrnas in Ovarian Function.* Fertility and Sterility 2014; 101(6): 1524-30 .
- 28-Li B, Lu Y, Wang H, Han X, Mao J, Li J, et al. *Mir-221/222 Enhance the Tumorigenicity of Human Breast Cancer Stem Cells Via Modulation of PTEN/Akt Pathway.* Biomed Pharmacother 2016; 79: 93-101 .
- 29-Bae HJ, Jung KH, Eun JW, Shen Q, Kim HS, Park SJ, et al. *Microna-221 Governs Tumor Suppressor HDAC6 to Potentiate Malignant Progression of Liver Cancer.* J Hepatol 2015; 63(2): 408-19 .
- 30-Tanaka R, Tomosugi M, Horinaka M, Sowa Y, Sakai T. *Metformin Causes G1-Phase Arrest Via Down-Regulation of MIR-221 and Enhances TRAIL Sensitivity Through DR5 Up-Regulation in Pancreatic Cancer Cells.* PLoS One 2015; 10(5): e0125779 .
- 31-Fu Z, Qian F, Yang X, Jiang H, Chen Y, Liu S. *Circulating Mir-222 in Plasma and its Potential Diagnostic and Prognostic Value in Gastric Cancer.* Med Oncol 2014; 31(9): 164 .
- 32-Zore T, Joshi NV, Lizneva D, Azziz R. *Polycystic Ovarian Syndrome: Long-Term Health Consequences.* Semin Reprod Med 2017; 35(3): 271-81 .
- 33-Dewailly D, Robin G, Peigne M, Decanter C, Pigny P, Catteau-Jonard S. *Interactions between Androgens, FSH, Anti-Mullerian Hormone and Estradiol During Folliculogenesis in the Human Normal and Polycystic Ovary.* Hum Reprod Update 2016; 22(6): 709-24 .
- 34-Cavallo GP, Cavallo R. *New Perspectives on the Pathogenesis of Rhinitis.* G Bacteriol Virol Immunol 2018; 84(1-12): 107-24.

## Evaluating Mirna-222 Expression Level and Its Association with AMH for Early Diagnosis of Pcos-Like Symptoms in Epileptic Patients Plasma Treated with Sodium Valproate: A Case – Control Study

Mahya Rajabi<sup>1,2</sup>, Seyed Mohsen Miresmaeili<sup>1</sup>, Fatemeh Montazri<sup>2</sup>,  
Mahsa Nasresfahani<sup>3</sup>, Seyed Jalal Zieai<sup>4</sup>, Seyed Mehdi Kalantar<sup>\*5</sup>

### Original Article

**Introduction:** Epileptic neurological disorder, which is controlled with medications such as sodium valproate (one of the treatment priorities for the patients with epilepsy). Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of complication of sodium valproate. Ovulation in PCOs Patients is disrupted, resulting in serious complications, including endometrial hyperplasia with typical and atypical forms, increased the risk of endometrial cancer, diabetes mellitus, and decreased fertility rates. This study, in accordance with bioinformatics studies and other studies based on the association of miRNA-222 with genes involved in PCOs and hyperandrogenism, was designed to evaluate the association of PCOs in the patients treated with sodium valproate by simultaneously comparing the AMH factor and miRNA-222 marker at specific time periods .

**Methods:** In this case-control study, 33 women with epilepsy before and after use the drug were selected based on inclusion and exclusion criteria. After blood sampling, their plasma was isolated. According to the instructions of the Total RNA extracted kit , cDNA synthesized and miRNA-222 expression was evaluated by RT-qPCR technique and statistical analysis was performed by SPSS 23 software, T-test and ANOVA tests.

**Results:** The results of statistical tests such as T-test and ANOVA test (done with SPSS software) which showed a significant difference ( $p < 0/01$ ) between the mean expression of mir-222 and AMH in the patients before treatment compared to 3 month after treatment. The results of Pearson correlation test showed that the increase in AMH is directly related to the decrease in miRNA-222 expression ( $p < 0/01$ ) .

**Conclusion:** According to the results of the present study, in order to better control the possible side effects of the drug and possibly timely drug change and early diagnosis of PCOs (PCOs-like symptoms), evaluation of miRNA-222 expression changes can be used at the same time with AMH assay.

**Keywords:** Epilepsy, Sodium valproate, miRNA-222, PCOs, AMH

**Citation:** Rajabi M, Miresmaeili S.M, Montazri F, Nasresfahani M, Zieai S.J, Kalantar S.M. **Evaluating Mirna-222 Expression Level and Its Association with AMH for Early Diagnosis of Pcos-Like Symptoms in Epileptic Patients Plasma Treated with Sodium Valproate: A Case – Control Study.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2022; 29(10): 4198-4208.

<sup>1</sup>Department of Biology, Science and Arts University, Yazd, Iran.

<sup>2</sup>Abortion Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, Payame Noor Taft University, Yazd, Iran.

<sup>4</sup>Department of Neurology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

<sup>5</sup>Infertility Research Center, Yazd Reproductive Sciences Research Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, Yazd, Iran.

\*Corresponding author: Tel: 09131518918, email: smkalantar@yahoo.com