

Evaluation of mir-126 rs4636297 Gene Polymorphism in Infertile Women with Endometriosis

Neda Sepahi Hossein Abadi¹,
Leila Kohan²,
Athar Rasekh Jahromi³

¹ MSc Student in Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Arsanjan Branch, Arsanjan, Iran

² Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Arsanjan Branch, Arsanjan, Iran

³ Assistant Professor, Department of Gynecology, Faculty of Medicine, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran

(Received April 10, 2016 ; Accepted July 4, 2016)

Abstract

Background and purpose: Endometriosis is a benign disorder defined by the presence of endometrial tissue out of pelvic cavity and is related to debilitating pelvic pain and infertility. MiRNAs, are a cluster of small endogenous noncoding RNA that bind to 3' UTR of target mRNA and cause mRNA degradation or repressing translation of mRNA. Mir-126 is a type of miRNA that is involved in many vital processes such as invasion and angiogenesis. In this study, mir-126 rs4636297 G/A gene polymorphism was compared between infertile women with endometriosis and healthy women.

Materials and methods: This analytical study was done in 72 infertile women with endometriosis and 252 healthy women as a control group. After extraction of genomic DNA from peripheral blood samples, desired polymorphism was genotyped using Tetra-ARMS-PCR method. Statistical analysis was performed using SPSS ver. 17. Genotype distributions and allelic frequencies of *mir-126* rs4636297 gene polymorphism were compared between patient and control groups by Logistic regression analysis.

Results: A significant association was found between A allele of rs4636297 *mir-126* polymorphism and endometriosis (OR: 0.6, 95% CI: 0.4-0.84, P= 0.005). In the dominant model of A allele (comparison between AA+AG VS. GG), AA+AG had protective effect on endometriosis (OR: 0.48, 95% CI: 0.28-0.82, P= 0.007).

Conclusion: There is a significant association between rs4636297 *mir-126* polymorphism and susceptibility to endometriosis.

Keywords: endometriosis, infertility, Mir-126, polymorphism

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26 (141): 1-7 (Persian).

بررسی پلی مورفیسم rs4636297 ژن *mir-126* در زنان نابارور مبتلا به اندومتريوز

ندا سپه‌ی حسین آبادی^۱

لیلا کهن^۲

اطهر راسخ جهرمی^۳

چکیده

سابقه و هدف: اندومتريوز یک اختلال خوش خیم می‌باشد که به حضور بافت اندومتر در خارج از حفره لگنی اطلاق می‌شود و در ارتباط با درد لگنی تضعیف کننده و ناباروری است. miRNAها، یک خوشه از RNAهای کوچک درون ژنی غیر کدشونده هستند که به 3' UTR مربوط به mRNA هدف متصل و منجر به تخریب mRNA یا مهار ترجمه می‌شوند. Mir-126 نوعی miRNA است که در بسیاری از فرآیندهای حیاتی مثل تهاجم و رگ‌زایی شرکت می‌کند. هدف از این مطالعه، مقایسه پلی مورفیسم rs4636297 G/A ژن *mir-126* در زنان نابارور مبتلا به اندومتريوز و زنان سالم بوده است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مورد-شاهدی روی ۷۱ زن نابارور مبتلا به اندومتريوز و ۲۵۲ زن سالم به عنوان گروه شاهد انجام شد. پس از استخراج DNA از نمونه‌های خون محیطی، تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم مورد نظر، از طریق تکنیک Tetra ARMS PCR صورت گرفت. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۷ انجام شد. توزیع ژنوتیپی و فراوانی آللی پلی مورفیسم rs4636297 ژن *mir-126* بین گروه شاهد و بیمار به وسیله آزمون رگرسیون لجستیک مورد مقایسه قرار گرفت. یافته‌ها: ارتباط معنی داری بین آلل A در پلی مورفیسم rs4636297 ژن *mir-126* و اندومتريوز مشاهده شد ($p=0/005$)، $OR=0/6$ درصد، $95\%CI=0/4-0/84$. در مدل ژنتیک غالب برای آلل A (مقایسه AA+AG در مقابل GG)، ژنوتیپ‌های AA+AG اثر حفاظتی بر ابتلا به بیماری اندومتريوز داشتند ($p=0/007$ ، $95\%CI=0/28-0/82$ ، $OR=0/48$).

استنتاج: ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم rs4636297 ژن *mir-126* و استعداد ابتلا به اندومتريوز وجود دارد.

واژه های کلیدی: اندومتريوز، ناباروری، *mir-126*، پلی مورفیسم

مقدمه

را تشکیل می‌دهد. ۲۵ درصد باقی مانده به دلیل اندومتريوز یا موارد ناشناخته ایجاد می‌شود (۲). اندومتريوز به معنای رشد بافت اندومتر در خارج از حفره رحمی می‌باشد که به دلیل مسیر برگشتی ضایعات اندومتر در خون قاعدگی از میان مجرای فالوپ ایجاد می‌شود و سپس در محدوده

ناباروری (Infertility) به اختلال سیستم تولید مثلی اطلاق می‌شود که زوج بعد از یک سال تلاش بدون استفاده از هیچ گونه وسایل ضدبارداری موفق به بارداری نشوند (۱). اختلالات تخمک گذاری، انسداد مجاری و اختلالات مایع منی تقریباً ۷۵ درصد از موارد ناباروری

E-mail: Kohan@iaua.ac.ir

مؤلف مسئول: لیلا کهن - فارس: ارسنجان، بلوار دانشگاه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارسنجان

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان، ارسنجان، ایران

۲. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان، ارسنجان، ایران

۳. استادیار، گروه زنان، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱/۲۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۱/۲۴ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۴/۱۴

مواد و روش ها

این مطالعه مورد-شاهدی از مهر ۹۳ شروع شده و در تیر ماه ۹۴ خاتمه یافت. جمعیت مورد مطالعه شامل ۳۲۳ زن (۷۱ زن نابارور مبتلا به اندومتريوز و ۲۵۲ زن سالم به عنوان گروه شاهد) بودند که از لحاظ سن (۵± سال) همسان‌سازی شدند. نمونه‌های خون گروه بیمار مبتلا به اندومتريوز از مرکز نازایی دکتر رستمی و بیمارستان زینبیه در شیراز و گروه شاهد نیز از افراد سالم جمعیت جمع‌آوری گردید. تشخیص بیماری به کمک پزشک متخصص زنان و زایمان و به روش لاپاراسکوپی صورت گرفت. معیارهای خروج از مطالعه عبارت بودند از لیوما، فیروئید، بیماری‌های التهابی لگن، کارسینومای رحم و تخمدان. پس از تکمیل فرم رضایت‌نامه توسط داوطلبان به‌منظور تعیین ژنوتیپ افراد مورد مطالعه ۵ سی‌سی خون از آن‌ها گرفته شد و درون تیوب‌های حاوی EDTA منتقل گردید. نمونه‌های جمع‌آوری شده به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی منتقل شد. پس از استخراج DNA ژنومیک به روش salting out (۱۶)، جهت تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم rs4636297 ژن mir-126 از تکنیک Tetra-ARMS-PCR استفاده شد. در این تکنیک از چهار پرایمر استفاده شده که پرایمرهای خارجی (RO) و FO)، به عنوان کنترل عمل می‌کنند و در سر ۳ پرایمرهای داخلی، نوکلئوتید تغییر یافته در پلی‌مورفیسم قرار داشته که هر پرایمر داخلی به طور اختصاصی و بر اساس نوکلئوتید سر ۳، آلل خاصی را تکثیر می‌کند. جهت طراحی پرایمرها از نرم افزار Oligo 7 استفاده شد. توالی پرایمرها در جدول شماره ۱ آمده است.

جدول شماره ۱: پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام Tetra-ARMS-PCR

توالی که به ۳	پرایمر	پلی مورفیسم
GTCCACGGCACCGCATCGACAA	FI (A allele):	mir-126
GGTCAAGGCTGAGGTCTCAGCGGAGC	RI (G allele):	rs4636297
GAATCTGGCGGAAGCGGTGG	FO	
CCCCAGGAGAGGCCAGCCAGAAG	RO	

FI: Forward Inner
RI: Reverse Inner
FO: Forward Outer
RO: Reverse Outer

خارج رحمی، اغلب در لگن رشد می‌کند (۳). موارد شدید منجر به چسبندگی لگنی و انحرافات آناتومی لگنی می‌شود که دلیل ناباروری این افراد می‌باشد (۴). شیوع اندومتريوز در میان جمعیت زنان در سنین باروری ۷ تا ۱۵ درصد، در میان زنان نابارور ۲۵ تا ۳۰ درصد و در زنان با درد لگنی مزمن ۴۰ تا ۷۰ درصد تخمین زده می‌شود (۵). مطالعات حاکی از آن است که فعالیت‌های زیستی اندومتريوم داخل رحمی که توسط اختلال در بیان ژن تعیین می‌شود، با بیماری‌زایی اندومتريوز در ارتباط است (۶). پروفایل بیان متفاوت miRNA در اندومتريوز می‌تواند نقشی در مرحله ابتدایی در بیان نا به جای ژن در اندومتريوم ایفا کند (۷).

MicroRNAها، RNAهای کوچک غیر کدشونده‌ای هستند که دارای طولی حدود ۲۲ نوکلئوتید می‌باشند. این مولکول‌ها در همه سلول‌های یوکاریوتی یافت می‌شوند و نقش مهمی در همه مسیرهای زیستی ایفا می‌کنند (۸). MicroRNAها از طریق تخریب mRNA و مهار ترجمه، از بیان و عملکرد ژن جلوگیری می‌کنند (۹). Mir-126 یک miRNA اندوتلیال است که درون اینترون ۷ ژن *Egfl7* قرار گرفته است (۱۰). Mir-126 در تنظیم رشد سلول، تمایز سلول، آپوپتوز، حرکت سلولی، چسبندگی سلول، مهاجم سلولی و رگ‌زایی درگیر می‌باشد (۱۱،۷). کاهش بیان mir-126 در انواع مختلف سرطان‌ها مشاهده شده است (۱۲). کاهش سطح بیان mir-126 باعث تسهیل ترشح اندوتلیالی فاکتور مولکول چسبنده سلولی عروقی ۱ (VCAM-1) می‌شود (۱۳) و از این طریق چسبندگی و رگ‌زایی افزایش می‌یابد (۱۴). پلی‌مورفیسم rs4636297 ژن *mir-126* در pri-miR-126 واقع شده است که به‌طور قابل توجهی پردازش miRNA را از pri-miRNA به pre-miRNA تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱۵). هدف از این مطالعه با توجه به اهمیت mir-126 در روند رگ‌زایی، بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم rs4636297 واقع در ژن *mir-126* در زنان نابارور مبتلا به اندومتريوز بوده است.

یافته ها

میانگین سنی افراد در گروه بیمار $32/7 \pm 6/5$ سال و در گروه شاهد $33 \pm 5/9$ سال بود. مقایسه میانگین سنی در دو گروه سالم و بیمار نشان داد که اختلاف آماری معنی داری بین میانگین سنی در دو گروه مورد مطالعه وجود ندارد ($p=0/7$). فراوانی های ژنوتیپی و آللی پلی مورفیسم rs4636297 ژن *mir126* مربوط به دو گروه کنترل و بیمار در جدول شماره ۲ آورده شده است.

جدول شماره ۲: بررسی پلی مورفیسم rs4636297 ژن *mir126* در زنان نابارور مبتلا به اندومتريوز و زنان سالم

پلی مورفیسم	(درصد) تعداد کنترل	(درصد) تعداد بیمار	OR(95% CI)	P
ژنوتیپ				
GG	۸۰ (۳۱/۷)	۳۵ (۴۹/۳)	۱	-
AG	۱۲۹ (۵۱/۲)	۳۰ (۴۱/۳)	۰/۵۳ (۰/۳-۰/۹)	۰/۰۳
AA	۴۳ (۱۷/۱)	۶ (۸/۵)	۰/۳۲ (۰/۱۳-۰/۸۲)	۰/۰۲
AA+AG	۱۷۲ (۶۸/۳)	۳۶ (۴۹/۰)	۰/۴۸ (۰/۲۸-۰/۸۲)	۰/۰۰۷
آلل				
G	۲۸۹ (۵۷)	۱۰۰ (۷۰)	۱	-
A	۲۱۴ (۴۳)	۴۲ (۳۰)	۰/۶ (۰/۴-۰/۸۴)	۰/۰۰۵

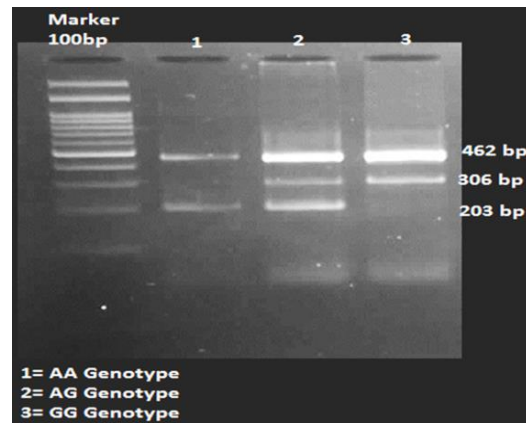
OR: odds ratio
CI: confidence interval

فراوانی آلل های A و G در گروه کنترل به ترتیب ۴۳ (درصد) و ۲۱۵ (درصد) و ۲۸۹ (درصد) و در گروه بیمار به ترتیب ۳۰ (درصد) و ۴۲ (درصد) بود. نتایج حاصل از بررسی توزیع ژنوتیپ ها نشان داد که گروه کنترل ($\chi^2=0/54$, $df=2$, $p=0/46$) و گروه بیمار ($\chi^2=0/1$, $df=2$, $p=0/9$) برای توزیع ژنوتیپ های پلی مورفیسم مورد مطالعه، در تعادل هاردی- واینبرگ می باشند. همان طور که در جدول شماره ۲ مشخص است، آلل A با کاهش خطر ابتلا به اندومتريوز همراه می باشد ($OR=0/6$ ، $95\%CI=0/4-0/84$ ، $p=0/005$). بررسی های حاصل از آنالیز آماری نشان داد که آلل A در حالت غالب و ژنوتیپ های حامل آلل A (AG و AA) باعث کاهش خطر ابتلا به بیماری اندومتريوز می شوند.

بحث

ناباروری یکی از علائم نگران کننده در ارتباط با اندومتريوز می باشد که راه حل کنترلی در زمینه آن هنوز

واکنش PCR در حجم نهایی ۱۲/۵ که شامل ۰/۵ از هر چهار پرایمر، ۳/۲۵ آب مقطر، ۶/۲۵ مخلوط واکنش (کیت PCR، Amplicon) و ۱۱ از DNA، بود، تهیه گردید. برنامه PCR PCR Tetra-ARMS شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه و پس از آن ۳۵ سیکل PCR که شامل دناتوراسیون ۹۵°C به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر ۶۵°C به مدت ۳۵ ثانیه و تکثیر ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه بود و در نهایت تکثیر نهایی در دمای ۷۲°C در مدت زمان ۷ دقیقه انجام شد. سپس جهت بررسی تکثیر موفق، ۸ از محصول PCR، روی ژل آگارز ۳ درصد به کمک رنگ آمیزی با DNA safe stain مورد آزمایش قرار گرفت. با استفاده از پرایمرها، ناحیه دارای پلی مورفیسم rs4636297 تکثیر و تعیین ژنوتیپ گردید. آلل A قطعه ۲۰۳ جفت بازی، آلل G قطعه ۳۰۶ جفت بازی و کنترل داخلی قطعه ۴۶۲ جفت بازی را روی ژل آگارز ۲ درصد را نشان دادند (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: تعیین ژنوتیپ rs4636297 ژن *mir-126* به کمک تکنیک Tetra-ARMS PCR

ارتباط بین پلی مورفیسم rs4636297 ژن *mir-126* و استعداد ابتلا به اندومتريوز با استفاده از آزمون رگرسیون لجستیک و محاسبه OR با فاصله اطمینان ۹۵ درصد انجام شد. هم چنین مقایسه میانگین ها با استفاده از T-test به وسیله نرم افزار SPSS ۱۷ مورد بررسی قرار گرفت. $p < 0/05$ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

به صورت مبهم باقی مانده است (۱۷). فهم این که اندومتریوز چطور باعث ناباروری می شود تا حدودی آسان است زیرا که این بیماری یک اختلال مخرب بوده که موجب درد شدید و انحراف آناتومی اندام های لگنی می گردد (۱۸). اندومتریوز به عنوان یک بیماری چندعاملی و پلی ژنیک محسوب می شود که عدم تنظیم miRNAها می تواند از دلایل ایجاد بیماری باشد (۱۹). به نظر می رسد که miRNAها از تنظیم کنندگان اصلی بیان ژن در بیماری اندومتریوز می باشند (۲۰). miR-126 در تنظیم رشد سلول، تمایز، حرکت سلول، چسبندگی سلولی، مهاجم و رگ زایی دخالت دارد (۷، ۱۱). سطح بیان miR-126 در طول هر مرحله در اندومتریوم خارج رحمی در مقایسه با اندومتریوم داخل رحمی افزایش می یابد و هم چنین کاهش سطح بیان miR-126 در طول پیشرفت بیماری از مرحله خفیف به مرحله شدید، مشاهده شده است (۲۱).

مطالعات نشان دادند که جهش ها و چندشکلی های تک نوکلئوتیدی (SNPs) در miRNAها و نقاط اتصال آنها، با افزایش خطر ابتلا به بسیاری از سرطان ها به همراه می باشند (۲۲). بعضی از SNP های واقع در miRNA یا نقاط مجاور آن بر بلوغ miRNA تاثیر می گذارد (۲۳). در مطالعه حاضر نتایج نشان داد که آلل A در پلی مورفیسم rs 4636297 ژن *mir-126* و ژنوتیپ های حامل آلل A در حالت غالب دارای اثر حفاظتی بر بیماری اندومتریوز می باشند. آنالیزهای *in vivo* نشان دادند که آلل G در جایگاه پلی مورفیسم rs4636297 از پردازش pri-miRNA به pre-miRNA جلوگیری می کند و بدین ترتیب بیان miR-126 بالغ کاهش می یابد. در بررسی ها مشخص شده که pri-miR-126-24G در مقایسه با miR-126-A باعث کاهش سطح miR-126 به واسطه سرکوب ترجمه می گردد (۱۵). کاهش سطح بیان miR-126، ترشح اندوتلیالی VCAM-1 را تسهیل می بخشد که باعث چسبندگی و رگ زایی بیش تر

می شود (۱۳). به علاوه کاهش بیان miR-126، بیان فاکتور رشد اندوتلیالی عروقی A (VEGFA) را در جهت تقویت رگ زایی افزایش می دهد (۱۴). بر اساس مطالعات اخیر گزارش شده است که رگ زایی نقش مهمی در بیماری زایی اندومتریوز ایفا می کند. همانند متاستازهای توموری، لانه گزینی های اندومتریوزی به رگ زایی جدید به منظور تکثیر، مهاجم به ماتریکس خارج سلولی و ایجاد جراحات اندومتریوزی نیاز دارد (۲۴).

پلی مورفیسم rs4636297 ژن *mir-126* در مطالعه Yang و همکاران در سال ۲۰۱۱ برای اولین بار در ارتباط با خطر ابتلا به سرطان سینه مورد بررسی قرار گرفت. این گروه تحقیقاتی گزارش کردند که ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم rs4636297 ژن *mir-126* و خطر ابتلا به سرطان سینه وجود ندارد اما با توجه به نقش *mir-126* در رگ زایی، بهتر است که این پلی مورفیسم در ارتباط با پیشرفت و متاستاز سرطان بررسی شود (۲۵). هم چنین در مطالعه دیگری که توسط McAuley و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام شد، گزارش گردید که پلی مورفیسم rs4636297 ژن *mir-126* با خطر رتینوپاتی در دیابت همراه می باشد (۲۶). با توجه به جستجو در سایت های معتبر علمی به نظر می رسد که تاکنون مطالعه ای در ارتباط با *mir-126* و اندومتریوز صورت نگرفته باشد و مطالعه حاضر برای اولین بار به این بررسی پرداخته است.

در این مطالعه پلی مورفیسم rs4636297 ژن *mir-126* در زنان نابارور مبتلا به اندومتریوز بررسی شد که نتایج نشان داد آلل A در این جایگاه پلی مورف، باعث کاهش خطر ابتلا بیماری می شود به طوری که در افراد واجد ژنوتیپ های حامل آلل A ریسک ابتلا به اندومتریوز کاهش می یابد. با توجه به این که این مطالعه اولین تحقیق در ارتباط با پلی مورفیسم rs4636297 ژن *mir-126* و اندومتریوز می باشد، پیشنهاد می گردد که این ارتباط توسط محققان دیگر با تعداد نمونه بیش تر و جمعیت های نژادی مختلف تایید گردد.

سپاسگزاری

این تحقیق برگرفته از پایان نامه دانشجویی مقطع کارشناسی ارشد می باشد که بدین وسیله، نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی

واحد ارسنجان، کارشناسان محترم آزمایشگاه ژنتیک، سرکار خانم نسیمه جعفری و نجمه نوروزی و هم چنین آزمایشگاه دکتر فخری نیا بابت همکاری در اجرای این مطالعه تشکر و قدردانی می نمایند.

References

- Kara E, Simoni M. Genetic screening for infertility: When should it be done? Middle East Fertil Soc J 2010; 15(3): 139-45.
- Fassbender A, Burney RO, O DF, D'Hooghe T, Giudice L. Update on Biomarkers for the Detection of Endometriosis. Biomed Res Int 2015; 2015: 130854.
- Giudice LC. Clinical practice. Endometriosis. N Engl J Med 2010; 362(25): 2389-2398.
- Fassbender A, Vodolazkaia A, Saunders P, Lebovic D, Waelkens E, De Moor B, et al. Biomarkers of endometriosis," Fertil Steril 2013; 99(4): 1135-1145.
- McLeod BS, Retzlöff MG. Epidemiology of endometriosis: an assessment of risk factors. Clin Obstet Gynecol 2010; 53(2): 389-396.
- Aghajanpour L, Mashayekhi F, Rajaei F. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene polymorphism and endometriosis in northern Iran. Arch Gynecol Obstet 2011; 283(5): 1035-1039.
- Feng R, Chen X, Yu Y, Su L, Yu B, Li J, et al. miR-126 functions as a tumor suppressor in human gastric cancer. Cancer Lett 2010; 298(1): 50-63.
- Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. Molecular Oncology 2012; 6(6): 590-610.
- Du T, Zamore PD. MicroPrimer: the biogenesis and function of microRNA. Development 2005; 132(21): 4645-4652.
- Kuehbacher A, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. Circ Res 2007; 101(1): 59-68.
- Zhu N, Zhang D, Xie H, Zhou Z, Chen H, Hu T, et al. Endothelial-specific intron-derived miR-126 is down-regulated in human breast cancer and targets both VEGFA and PIK3R2. Mol Cell Biochem 2011; 351(1-2): 157-161.
- Schetter AJ, Okayama H, Harris CC. The role of microRNAs in colorectal cancer. Cancer J 2012; 18(3): 244-252.
- Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. MiR-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105(5): 1516-1521.
- Croce CM, Calin GA. miRNAs, cancer, and stem cell division. Cell 2005; 122(1): 6-7.
- Harnprasopwat R, Ha D, Toyoshima T, Lodish H, Tojo A, Kotani A. Alteration of processing induced by a single nucleotide polymorphism in pri-miR-126. Biochem Biophys Res Commun 2010; 399(2): 117-122.
- Rabbanizadeh F, Kohan L, Najib F. Association between Interleukin-8 -251T/A polymorphism and endometriosis in Iranian women. Research in Molecular Medicine (RMM) 2015; 3(2): 1-5.
- Cahill DJ. What is the optimal medical management of infertility and minor endometriosis? Analysis and future prospects. Hum Reprod 2002; 17(5): 1135-1140.

18. Cahill DJ. What is the optimal medical management of infertility and minor endometriosis? Analysis and future prospects. *Hum Reprod* 2002; 17(5): 1135-1140.
19. Cosin R, Gilabert-Estelles J, Ramon LA, Gómez-Lechón MJ, Gilabert J, Chirivella M, et al. Influence of peritoneal fluid on the expression of angiogenic and proteolytic factors in cultures of endometrial cells from women with endometriosis. *Hum Reprod* 2010; 25(2): 398-405. PMID:19945964
20. Hawkins SM, Creighton CJ, Han DY, Zariff A, Anderson ML, Gunaratne PH, et al. Functional microRNA involved in endometriosis. *Mol Endocrinol* 2011; 25(5): 821-832.
21. Liu S, Gao S, Ying Wang X, Wang DB. Expression of miR-126 and Crk in endometriosis: miR-126 may affect the progression of endometriosis by regulating Crk expression. *Arch Gynecol Obstet* 2012; 285(4): 1065-1072.
22. Yang R, Schlehe B, Hemminki K, Sutter C, Bugert P, Wappenschmidt B, et al. A genetic variant in the pre-miR-27a oncogene is associated with a reduced familial breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 121(3): 693-702.
23. Wu M, Jolicœur N, Li Z, Zhang L, Fortin Y, L'Abbe D, et al. Genetic variations of microRNAs in human cancer and their effects on the expression of miRNAs. *Carcinogenesis* 2008; 29(9): 1710-1716.
24. Laschke MW, Menger MD. In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 2007; 13(4): 331-142.
25. Yang R, Dick M, Marme F, Andreas Schneeweiss A, Langheinze A, Hemminki K, et al. Genetic variants within miR-126 and miR-335 are not associated with breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 127(2): 549-554.
26. McAuley AK, Dirani M, Wang JJ, Connell PP, Lamoureux EL, Hewitt AW. A genetic variant regulating miR-126 is associated with sight threatening diabetic retinopathy. *Diab Vasc Dis Res.* 2015; 12(2):133-138.