

Evaluating the expression of miRNAs in the culture medium of human embryos with normal sex chromosomes and embryos with an X sex chromosome (Turner syndrome)

Shahrazad Aghajani¹ , Ali Salehzadeh^{1*} , Fatemeh Ghasemian² , Marzieh Mehrafza³ 

¹Dept of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

²Dept of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

³Mehr Fertility Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

Article Info

Article type:

Research article

Article History:

Received: 15 April 2023

Revised: 19 May 2023

Accepted: 02 July 2023

Published Online: 14 October 2023

* Correspondence to:

Ali Salehzadeh

Dept of Biology, Rasht

Branch, Islamic Azad

University, Rasht, Iran

Email:

salehzadeh@iaurasht.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: Assisted reproductive techniques and Preimplantation Genetic Test (PGT) are performed to detect aneuploidy to achieve a euploid baby's birth in infertile or low-fertility couples. miRNAs are single-stranded, non-coding RNA molecules and essential regulators of gene expression in various biological and physiological processes. The present study aimed to investigate some miRNAs damaged in the culture media of human embryos (as diagnostic biomarkers) and their relationship with the degree of aneuploidy of the embryo and assisted reproductive methods.

Material & Methods: The PGT cycles derived sperm intracytoplasmic injection (April 2021 to June 2021) were evaluated using fluorescence in situ hybridization (FISH). Following that, the culture medium of three euploids and three aneuploid embryos with an X sex chromosome (Turner) was collected and the expression of has-miR-199a-5p, has-miR-199b-3p, has-miR-379-5p, has-miR-483-5p, has-miR-99a-5p, and has-miR-432-5p were investigated using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR).

Findings: In the culture medium of euploid embryos, a significant increase was observed in the expression of three miRNAs, including hsa-miR-379-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-3p. Moreover, a decrease was detected in the expression of three miRNAs, including hsa-miR-432-5p, hsa-miR-483-5p, and hsa-miR-99a-5p, with a significant difference ($P < 0.0001$). The expression of these miRNAs in the culture medium of Turner embryos with the model was the opposite.

Discussion & Conclusion: In examining the expression level of miRNAs investigated in this project, the increase in the expression of three miRNAs and the decrease in the expression of three other miRNAs in euploid embryos demonstrated the opposite expression pattern of the same miRNAs in Turner embryos. These results can be considered promising for using non-invasive methods instead of fetal biopsy in the diagnostic studies of the number of sex chromosomes.

Keywords: Fluorescence in Situ Hybridization (FISH), Genetic Testing, miRNA, Intracytoplasmic Sperm Injection, Preimplantation Spent Blastocyst Medium

➤ How to cite this paper

Aghajani S, Salehzadeh A, Ghasemian F, Mehrafza M. Evaluating the expression of miRNAs in the culture medium of human embryos with normal sex chromosomes and embryos with an X sex chromosome (Turner syndrome). Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2023;31(4): 67-78.

بررسی بیان miRNAهای محیط کشت جنین‌های انسانی با کروموزوم‌های جنسی طبیعی و جنین‌های با یک کروموزوم جنسی X (سندرم ترنر)

شهرزاد آقاجانی^۱ ID، علی صالحزاده^{۱*} ID، فاطمه قاسمیان^۲ ID، مرضیه مهرافزا^۳ ID

^۱ گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

^۳ مرکز تحقیقات و درمان ناباروری مهر پویای گیل، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۲۶

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۲/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۱۱

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۷/۲۲

نویسنده مسئول:

علی صالحزاده

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

Email:

salehzadeh@iaurasht.ac.ir

مقدمه: روش‌های کمک‌باروری و آزمایش ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی (PGT) برای تشخیص آنوپلوئیدی، به‌منظور دستیابی به تولد نوزاد یوپلوئید و در زوجین نابارور یا کم بارور انجام می‌شود. miRNAها مولکول‌های RNA غیر رمزگذار تک‌رشته‌ای و مهم تنظیم‌کننده پس از رونویسی بیان ژن در فرایندهای مختلف بیولوژیکی و فیزیولوژیکی هستند. هدف این مطالعه بررسی برخی miRNAهای ترشح‌شده در محیط‌های کشت جنین‌های انسان (به‌عنوان نشانگرهای زیستی تشخیصی) و ارتباط آن با میزان آنوپلوئیدی جنین و نتایج روش‌های کمک‌باروری است.

مواد و روش‌ها: چرخه‌های PGT حاصل از تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (از فروردین سال ۱۴۰۱ تا خرداد سال ۱۴۰۱) با استفاده از مکمل‌سازی فلورسانس درجا (FISH) Fluorescence in situ hybridization ارزیابی شد. در ادامه، محیط کشت سه جنین یوپلوئید و سه جنین آنیوپلوئید با یک کروموزوم جنسی X (ترنر) جمع‌آوری گردید و بیان miRNA hsa-miR-199a-5p، hsa-miR-199b-3p، hsa-miR-379-5p، hsa-miR-483-5p، hsa-miR-99a-5p، hsa-miR-432-5p با استفاده از RT-qPCR بررسی شد.

یافته‌های پژوهش: در محیط کشت جنین‌های یوپلوئید، افزایش معنی‌دار میزان بیان سه miRNA شامل hsa-miR-379-5p، hsa-miR-432-5p، hsa-miR-483-5p و کاهش بیان سه miRNA شامل hsa-miR-199a-5p، hsa-miR-199b-3p، hsa-miR-99a-5p با اختلاف معنی‌دار $P < 0.001$ مشاهده گردید. بیان این miRNAها در محیط کشت جنین‌های ترنر با الگو کاملاً عکس بود.

بحث و نتیجه‌گیری: در بررسی میزان بیان miRNAهای بررسی‌شده در این طرح، افزایش بیان سه miRNA و کاهش بیان سه miRNA دیگر در جنین‌های یوپلوئید با الگو، بیان عکس همین miRNAها در جنین‌های ترنر را نشان داد. این نتایج می‌تواند نویدبخش باشد و برای استفاده از روش‌های غیرتهاجمی به جای بیوپسی جنین در بررسی‌های تشخیصی تعداد کروموزوم‌های جنسی مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم، هیبریداسیون فلورسنت درجا (FISH)، آزمایش ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی، miRNA محیط کشت بلاستوسیت

استناد: آقاجانی، شهرزاد؛ صالحزاده، علی؛ قاسمیان، فاطمه؛ مهرافزا، مرضیه. بررسی بیان miRNAهای محیط کشت جنین‌های انسانی با کروموزوم‌های جنسی طبیعی و جنین‌های با یک کروموزوم جنسی X (سندرم ترنر). مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، مهر ۱۴۰۲؛ ۳۱(۴): ۶۷-۷۸.



گاردنر و همکاران نشان دادند که HSA-MIR-P5B-26 و HSA-MIR-P5-21 می‌تواند به‌عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه برای تولیدمثل، با تشخیص پروفایل miRNA در محیط‌های کشت جنین انسان باشند (۱۰).

علی‌رغم سال‌ها تلاش برای بهبود روش‌های کمک‌باروری در انسان، تأثیرات مثبت و منفی استفاده از روش‌های تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم، انجماد، ذوب و بیوپسی برای انجام آزمایش‌های ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی، در روند تکوین در آزمایشگاه، به‌عنوان مسائل حل‌نشده در این زمینه باقی‌مانده است (۱۱). امروزه، بررسی‌ها در سطح miRNAها بسیار پرکاربرد شده است و بررسی آن‌ها می‌تواند گام تشخیصی بزرگی در پیشبرد روش‌های تشخیص پیش از لانه‌گزینی به‌صورت کاملاً غیرتهاجمی باشد؛ از این‌رو، اینکه آیا می‌توان با تشخیص برخی miRNA خاص ترشح‌شده توسط جنین در محیط کشت جنین‌ها، از طبیعی بودن یا نبودن جنین‌ها مطلع شد، گامی مهم و اثربخش در عرصه درمان ناباروری و بررسی‌های ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی خواهد بود. فرض بر این بوده است که با تشخیص الگوی بیان miRNAهای محیط کشت جنین‌های انسانی با کروموزوم‌های جنسی طبیعی و جنین‌های با یک کروموزوم جنسی X (سندرم ترنر)، از وضعیت کروموزومی جنین حتی بدون انجام آزمایش ژنتیکی مطلع شد. نتایج قابل‌استناد در روش‌های غیرتهاجمی تشخیصی پیش از لانه‌گزینی روی جنین‌های انسانی می‌تواند بسیاری از نگرانی‌ها و آسیب‌های حاصل از روش‌های تهاجمی تشخیصی پیش از لانه‌گزینی بر جنین‌های انسانی را مرتفع سازد. هدف این مطالعه بررسی برخی miRNAهای ترشح‌شده در محیط‌های کشت جنین‌های انسان (به‌عنوان نشانگرهای زیستی تشخیصی) و ارتباط آن با میزان آنوپلوئیدی جنین و نتایج روش‌های کمک‌باروری است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، مشخصات بیان miRNAهای ترشح‌شده توسط جنین‌های پیش از لانه‌گزینی، از طریق بررسی miRNAهای استخراج‌شده از محیط کشت در

miRNAها مولکول‌های RNA غیر رمزگذاری تک‌رشته‌ای و مهم تنظیم‌کننده در تنظیم پس از رونویسی بیان ژن، در فرایندهای مختلف بیولوژیکی و فیزیولوژیکی هستند (۱). miRNAها می‌توانند سطح بسیاری از ژن‌های هدف را به‌طور هم‌زمان، توسط توالی‌های مکمل جزئی و مداخلات بعدی با پایداری mRNA و یا ترجمه پروتئین تنظیم کنند (۲)، (۱). از آنجا که آن‌ها در محیط خارج سلولی پایداری و بیان غیرطبیعی آن‌ها با وضعیت فیزیولوژیکی یا پاتولوژیک همراه است، می‌توان miRNAها را به‌عنوان نشانگرهای جدید غیرتهاجمی درمان مدنظر قرار داد (۳). به‌طور گسترده‌ای گزارش شده است که miRNAها در کاشت جنین و نارسایی کاشت شرکت می‌کنند و نقش دارند (۴، ۵). باسان و همکاران پیشنهاد کردند که miR31- در تنظیم دستگاه ایمنی در هنگام کاشت نقش داشته باشد (۶)، درحالی‌که راجو و همکاران نشان دادند که miR26- ممکن است یک نشانگر نامزد برای بارداری بیشتر در گاوها باشد (۷). امروزه miRNAها در زمینه‌های مختلف پزشکی، از جمله روش‌های کمک‌باروری مورد توجه قرار گرفته‌اند.

یک روش ایدئال برای پیش‌بینی سلامت جنین نباید کاشت جنین را به خطر بیندازد. اعتقاد بر این بوده است که با جمع‌آوری miRNAهای ترشح‌شده در محیط‌های کشت جنینی جنین‌های انسان، به‌راحتی این امکان فراهم می‌آید که از آن‌ها به‌عنوان نشانگرهای زیستی غیرتهاجمی برای تعیین صلاحیت تولیدمثلی جنین استفاده شود. تحقیقات گسترده‌ای را در زمینه توسعه غیرتهاجمی نشانگرهای زیستی انجام داده‌اند که با هدف کلی بهبود میزان موفقیت کاشت و درمان IVF بوده است. جیانگ و همکاران miRNAهایی را که از جنین‌های پیش از کاشت به داخل محیط‌های کشت جنینی ترشح می‌شوند، تجزیه و تحلیل کردند و مشخص نمودند که miR-634 با نتیجه مثبت بارداری ارتباط دارد (۸)؛ سپس در سال ۲۰۱۹، گرادستین و همکارانش گزارش دادند که فراوانی miR-p3b-19 در نمونه‌های محیط کشت (SCM) مرتبط با بارداری مثبت، به‌طور چشمگیری کمتر بود (۹).

آزمایشگاه جنین‌شناسی مرکز تحقیقات و درمان ناباروری مهر پویای گیل رشت ارزیابی شد. سنجش میان یک گروه سه‌تایی از جنین‌های یوپلوئید از نظر کروموزوم‌های جنسی و گروه دوم سه‌تایی شامل جنین‌های آنیوپلوئید (ترنر) انجام گردید که در فاصله زمانی فروردین ۱۴۰۱ تا خرداد ۱۴۰۱ تحت درمان IVF و آزمایش ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی برای بررسی کروموزوم‌های جنسی بوده‌اند. نتایج برای بررسی نشانگرهای پیش‌بینی‌کننده بالقوه تجزیه و تحلیل شد.

جمع‌آوری نمونه محیط کشت جنین‌های انسانی: جنین‌های انسانی پس از انجام بیوپسی تک‌بلاستومر به قطرات جنینی شماره‌گذاری شده منتقل گردیدند. پس از انجام آزمایش ژنتیکی و مشخص شدن وضعیت کروموزوم‌های جنسی و با توجه به نتایج، مقدار ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت جنینی (جنین‌های یوپلوئید با دو کروموزوم جنسی و جنین‌های با یک کروموزوم جنسی X) توسط پمپ در میکروتیوب‌های شماره‌گذاری شده ریخته شد و به فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید.

استخراج miRNA با استفاده از کیت یکتا تجهیز و دقیقاً بر اساس دستورالعمل کیت صورت گرفت. پس از تعیین مقدار و غلظت RNA استخراج شده، ساخت مولکول cDNA از روی RNA استخراج شده بر اساس دستورالعمل کیت Revert Aid TM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) انجام شد؛ سپس کیفیت و غلظت RNAهای استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ ارزیابی گردید.

پرایمرهای اختصاصی طراحی شده: پرایمرهای اختصاصی هر مارکر از روی مقالات رفرنس انتخاب و سفارش داده شد. به منظور افزایش بازدهی واکنش Real-

time RT-PCR و جلوگیری از موارد مثبت کاذب ناشی از تکثیر توالی‌های نوکلئوتیدی DNA، کارایی پرایمرها (efficiency) سنجیده گردید و پرایمرهای با کارایی ۹۹-۹۸ درصد استفاده شدند. جدول شماره ۱ ویژگی‌های پرایمرهای استفاده شده را نمایش می‌دهد. پرایمرهای ژن کنترل داخلی از توالی‌هایی انتخاب گردید که در مطالعات پیشین استفاده شده بودند. پس از دریافت پرایمرهای ساخته شده به شکل پودر لیوفلیزه از شرکت سازنده، رقیق‌سازی محلول پرایمر با غلظت 100 pm/μl با افزودن آب مقطر اتوکلاو شده انجام و این محلول تا زمان استفاده در دمای ۲۰°C- نگهداری شد. برای استفاده نهایی از پرایمر، این محلول رقیق‌سازی گردید و با غلظت ۱۰ pm/μl وارد واکنش نهایی شد.

انجام واکنش PCR Real-Time با SYBR2 Premix Ex Taq Kit: واکنش PCR کپی‌هایی از DNA الگو را در یک قالب تصاعدی ایجاد می‌کند. همان‌طور که از معنی واژه برمی‌آید، مفهوم Real-Time PCR مشاهده لحظه‌به‌لحظه فرایند است، به گونه‌ای که می‌توان میزان محصول PCR را هنگامی که هنوز در فاز تصاعدی است، محاسبه کرد. از کیت محصول شرکت Takara استفاده گردید که SYBR green دارد که یک رنگ فلورسانس است و پس از اتصال به DNA دورشته‌ای، نور فلورسانس ساطع می‌کند و توسط دستگاه ترموسایکلر قابل اندازه‌گیری است. در این واکنش، از cDNA ساخته شده در مرحله پیش به‌عنوان الگو استفاده شد. تکثیر ژن‌ها در دو تکرار و با استفاده از کیت‌های اختصاصی هر ژن و Master mix صورت گرفت.

جدول شماره ۱. مشخصات توالی پرایمرها و اندازه محصولات به کاررفته در واکنش Real-Time PCR

پرایمر	توالی	اندازه (جفت باز)	TM	درصد GC
miR-199b-3p				
F	5'- GTCACAGTAGTCTGCACAT -3'	۱۹	۵۵	۶۵
R	-3' 5'- GTTGCAGGGTCCGAGGT	۱۷	۵۶	۶۶
hsa-miR-199a-5p				
F	5'- CCCAGTGTTCCAGACTACCTGTTC -3'	۲۳	۶۲	۵۳
R	5'- CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT -3'	۲۰	۶۲	۶۰
hsa-miR-379-5p				

F	5'- GCGCTGGTAGACTATGGAA -3'	۱۹	۵۹	۵۴
R	5'- GTGTCAGGTGTCCGAGGT -3'	۱۸	۵۸	۵۷
hsa-miR-432-5p				
F	5'- AACGAGACGACGACAGACT -3'	۱۹	۵۸	۵۴
R	5'- CTTGGAGTAGGTCATTGGGT -3'	۲۰	۶۰	۵۵
hsa-miR-99a-5p				
F	5'- AACCCGTAGATCCGATCTTGTG -3'	۲۲	۶۲	۵۴
R	5'- CACAAGATCGGATCTACGGGTT -3'	۲۲	۶۳	۵۴
hsa-miR-483-5p				
F	5'- CCGAGAAGACGGGAGGAAA -3'	۱۹	۶۲	۵۷
R	5'- CTCAACTGGTGTCTGTGGA -3'	۱۸	۵۷	۵۵
human hsa-U6				
F	5'- TCCGACGCCCATCTCTA -3'	۱۹	۶۳	۵۸
R	5'- TATCGCACATTAAGCCTCTA -3'	۲۰	۶۱	۵۶

حاصل گردد و حتی الامکان از اشتباهاتی اجتناب شود که تفسیر نتایج را با مشکل مواجه می کنند (مانند تشکیل primer dimer). پس از تعیین مقدار چرخه آستانه (Ct) مربوط به ژن های پژوهش ما و مقایسه آن با Ct ژن کنترل داخلی، نتایج آنالیز شد. پس از انجام واکنش، داده های خام به صورت Ct از دستگاه استخراج گردید و اندازه گیری میزان بیان ژن با روش $\Delta\Delta Ct$ ، با استفاده از نرم افزار Rest صورت گرفت.

آنالیز آماری: آنالیز داده های Real time-PCR بر اساس مقایسه Ct انجام شد. در این مطالعه، ΔCt به دست آمده از نمونه های آزمایش شده (محیط کشت جنین های غیر طبیعی ترنر) و نمونه های کنترل (محیط کشت جنین های یوپلوئید از نظر کروموزوم های جنسی) محاسبه گردید و با استفاده از فرمول $\Delta\Delta Ct$ ، ژن هدف به نسبت به ژن کنترل داخلی (U6) از طریق سنجش ۲- $\Delta\Delta Ct$ محاسبه شد؛ سپس با استفاده از نرم افزار Graph pad vol.6، نمودار بیان ژن رسم گردید. از آزمون های آماری one-way ANOVA و Tukey's HSD post-hoc به منظور بررسی آماری میزان تغییرات بیان ژن ها استفاده شد؛ همچنین همه واکنش ها به صورت دو تکرار انجام گردید. این مطالعه کد اخلاق کار بر محیط کشت جنین های انسانی از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت به

روش تفسیر نتایج: پس از پایان هر واکنش، تفسیر نتایج بر اساس منحنی های Melting peak و Amplification صورت گرفت. بدین منظور، در انتهای انجام هر نوبت آزمایش، پیک ذوب (Melting peak) مربوط به هر نمونه آزمایش شده بررسی گردید و چنانچه در محدوده دمایی منطبق بر دمای ذوب قطعه تکثیر شده (Amplicon melting temperature) ژن مورد بررسی قرار داشت، به عنوان جواب مثبت تلقی می شد. با توجه به اینکه دمای ذوب شاخصی است که تحت تأثیر غلظت یونی محیط تغییر می کند؛ بنابراین، در محدوده ۱ درجه بالاتر و پایین تر از میزان اعلام شده قابل قبول تلقی گردید. برای بررسی آلودگی های احتمالی از روش کنترل منفی استفاده شد. در این روش، یک واکنش Real-time PCR با اجزای غلظت ها و همچنین دما و زمان های کاملاً مشابه با واکنش اصلی انجام می شود که بدون cDNA الگو است؛ بنابراین، اصطلاحاً به آن No Template Control یا به اختصار NTC اطلاق می گردد. منفی بودن نتیجه این واکنش به مفهوم نبود آلودگی در اجزای استفاده شده در واکنش است.

اجزا و دماهای واکنش در مراحل setup مقدماتی تحقیق به گونه ای تنظیم شد که بهینه ترین نتایج برای ژن ها

شماره 1398.053 IR.IAU.RASHT.REC دارد.

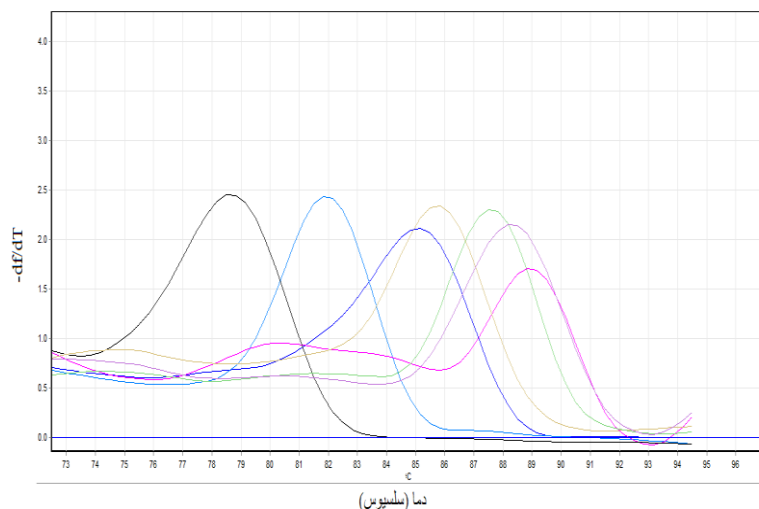
یافته های پژوهش

بررسی منحنی ذوب و تکثیر واکنش Real-time PCR ژن های مطالعه شده نشان داد که تکثیر ژن ها بدون آلودگی است و قطعات مدنظر به خوبی تکثیر شده اند. شکل های شماره ۱ و ۲ به ترتیب منحنی ذوب و تکثیر ژن های مطالعه شده را نمایش می دهد. نتایج به دست آمده از آنالیز آماری این شش miRNA در گروه های مطالعه که شامل محیط کشت سه جنین یوپلوئید از نظر کروموزوم جنسی که سلامتشان توسط آزمایش FISH بررسی شده بود و توسط پروب های رنگی کاملاً طبیعی و واضح کروموزوم های X و Y در آن ها مشاهده شده است، با محیط کشت سه جنین آنیوپلوئید از نظر کروموزوم های جنسی و با یک کروموزوم جنسی X (سندرم ترنر) نشان می دهد که میزان بیان این miRNA ها در جنین های یوپلوئید و آنیوپلوئید الگوی متفاوتی را نشان می دهد که از نظر آماری نیز کاملاً معنی دار است.

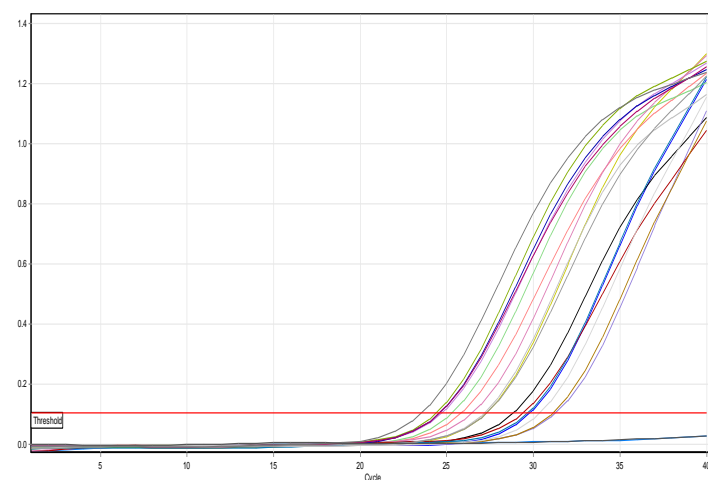
بیان hsa-miR-379-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-3p در محیط کشت جنین های یوپلوئید به طور معنی داری افزایش دارد و بیان hsa-miR-432-5p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-99a-5p را کاهش نشان داد، در حالی که بیان این miRNA ها در محیط کشت جنین های ترنر با یک

کروموزوم جنسی X الگوی کاملاً عکس را نشان می دهد. در محیط کشت جنین های ترنر بیان سه hsa-miR- amirNA hsa-miR-379-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-3p معنی داری کاهش دارد و hsa-miR-432-5p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-99a-5p افزایش بیان می یابند. میزان و روند بیان این سه ژن در جنین های یوپلوئید در مقایسه با جنین های ترنر کاملاً برعکس، ناهمسو و با تفاوت معنی دار آماری است (شکل شماره ۳).

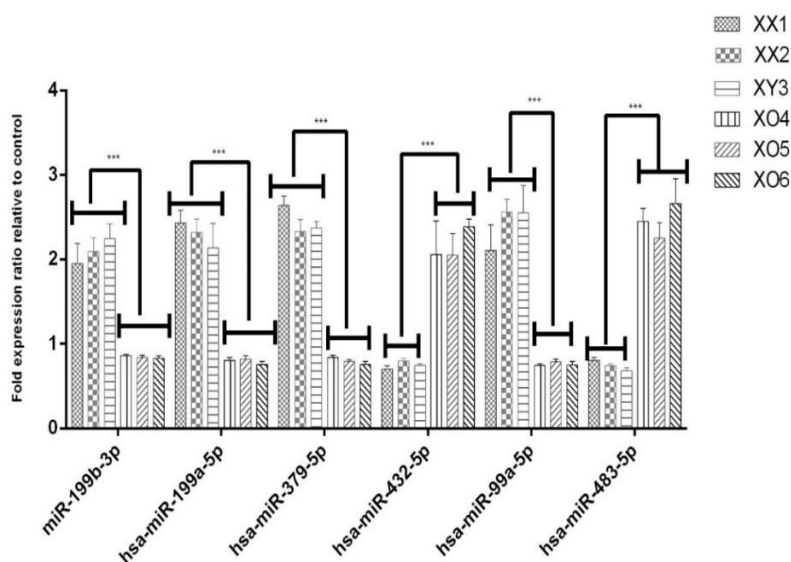
مقایسه تک به تک و دقیق میزان بیان miRNA های محیط کشت جنین ها با یکدیگر تفاوت معنی داری در جنین های یوپلوئید در مقایسه با جنین های ترنر و با یک کروموزوم جنسی به همراه آنالیز آماری آن در جدول شماره ۲ آورده شده است. این نتایج در جنین های با کروموزوم های جنسی یوپلوئید بیان بالاتر در سه hsa-miR-379-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-3p و بیان کمتر سه miRNA hsa-miR-432-5p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-99a-5p را و در جنین های با یک کروموزوم جنسی (ترنر) بیان بالاتر سه miRNA hsa-miR-432-5p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-99a-5p و بیان پایین تر سه miRNA hsa-miR-379-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-3p را نشان می دهد.



شکل شماره ۱. منحنی ذوب مربوط به hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-432-5p, hsa-miR-99a-5p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-379-5p و hsa-miR-199b-3p در محیط کشت یک جنین یوپلوئید (نرم افزار Rest (U6) به عنوان رفرنس در مطالعه قرار گرفته است).



شکل شماره ۲. تکثیر محصولات در Real-time PCR بر حسب سیکل (Ct). مراحل فاز خطی، فاز رشد نمایی تا رسیدن به فاز اشباع در این نمودار به خوبی نشان داده شده است. نمودارهای ذوب به صورت تجمیع ارائه گردیده اند (نرم افزار Rest).



شکل شماره ۱. نتایج آنالیز آماری بیان شش miRNA در نمونه های یوپلوئید و آنیوپلوئید (ترنر) از نظر کروموزوم های جنسی در جنین های انسانی.

جدول شماره ۲. مقایسه تک به تک و دقیق میزان بیان miRNA های محیط کشت جنین ها با یکدیگر. بررسی دقیق فاصله اطمینان نتایج معنادار بیان miRNA های محیط کشت جنین های یوپلوئید با جنین های ترنر با ضریب معناداری کمتر از ۰/۰۰۰۱ را برای بیان سه hsa-miR-379-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-3p در مقایسه با miRNA های hsa-miR-432-5p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-99a-5p در جنین های یوپلوئید نشان می دهد (نرم افزار Rest).

آزمون مقایسه ای چند گانه Tukey's	خطای اطمینان	فاصله اطمینان ۹۵ درصد	معناداری	مقدار احتمال P Value
hsa-miR-199b-3p				
XX1 vs. XX2, XY3	۲۹/۰-؛ ۱۴/۰-	۱۹/۰ تا ۷۷/۰-؛ ۳۴/۰ تا ۶۲/۰-	بی معنا	۰/۹۵، ۰/۴۶
XX1 vs. XO4, XO5, XO6	۱/۱۱؛ ۱/۱۲؛ ۱/۱۳	۶۰/۱ تا ۶۵/۱؛ ۵۹/۱ تا ۶۴/۱؛ ۵۷/۱ تا ۶۲/۱	معنادار	<۰/۰۰۰۱
XX2 vs. XY3	۱۵/۰-	۳۳/۰ تا ۶۳/۰-	بی معنا	۰/۹۳

XX2 vs. X04, X05, X06	۲۷/۰؛ ۱ ۲۶/؛ ۱ ۲۴/۱	۷۴/۱ تا ۷۹/۰؛ ۰ ۷۳/۱ تا ۷۸/۰؛ ۰ ۷۱/۱ تا ۷۶/۰	معنادار	<۰/۰۰۰۱
XY3 vs. X04, X05, X06	۴۲/؛ ۱ ۴۱/؛ ۱ ۳۹/۱	۸۹/۱ تا ۹۴/۰؛ ۰ ۸۸/۱ تا ۹۳/۰؛ ۰ ۸۶/۱ تا ۹۱/۰	معنادار	<۰/۰۰۰۱
X04 vs. X05, X06	۰۳/؛ ۰ ۰۲/۰	۵۱/۰ تا ۴۵/۰-؛ ۰ ۵۰/۰ تا ۴۶/۰-	بی معنا	>۰/۹۹
X05 vs. X06	۰۱/۰	۴۹/۰ تا ۴۷/۰-	بی معنا	>۰/۹۹
hsa-miR-199a-5p				
XX1 vs. XX2, XY3	۳۰/؛ ۰ ۱۱/۰	۷۷/۰ تا ۱۸/۰-؛ ۰ ۵۹/۰ تا ۳۶/۰-	بی معنا	۰/۹۸ ، ۰/۴۳
XX1 vs. X04, X05, X06	۶۸/؛ ۱ ۶۱/؛ ۱ ۶۲/۱	۱۵/۲ تا ۲۰/؛ ۱ ۰۹/۲ تا ۱۴/؛ ۱ ۱۰/۲ تا ۱۵/۱	معنادار	<۰/۰۰۰۱
XX2 vs. XY3	۱۹/۰	۶۶/۰ تا ۲۹/۰-	بی معنا	۰/۸۵
XX2 vs. X04, X05, X06	۵۷/؛ ۱ ۵۱/؛ ۱ ۵۰/۱	۰۴/۱ تا ۰۹/؛ ۱ ۹۸/۱ تا ۰۳/؛ ۱ ۹۹/۱ تا ۰۴/۲	معنادار	<۰/۰۰۰۱
XY3 vs. X04, X05, X06	۳۸/؛ ۱ ۳۲/؛ ۱ ۳۳/۱	۸۶/۱ تا ۹۰/؛ ۰ ۷۹/۱ تا ۸۴/؛ ۰ ۸۱/۱ تا ۸۵/۰	معنادار	<۰/۰۰۰۱
X04 vs. X05, X06	۰۵/؛ ۰ ۰۲/۰-	۵۳/۰ تا ۴۳/۰-؛ ۰ ۴۶/۰ تا ۴۹/۰-	بی معنا	>۰/۹۹ ؛ ۰/۹۹
۶ vs. X0۵X0	۰۷/۰	۵۴/۰ تا ۴۱/۰-	بی معنا	۰/۹۹
hsa-miR-379-5p				
XX1 vs. XX2, XY3	۲۷/؛ ۰ ۳۱/۰	۷۴/۰ تا ۲۱/۰-؛ ۰ ۷۹/۰ تا ۱۷/۰-	بی معنا	۰/۳۸ ، ۰/۵۶
XX1 vs. X04, X05, X06	۸۹/؛ ۱ ۸۴/؛ ۱ ۸۰/۱	۳۶/۲ تا ۴۱/؛ ۱ ۳۲/۲ تا ۳۷/؛ ۱ ۲۸/۲ تا ۳۳/۱	معنادار	<۰/۰۰۰۱
XX2 vs. XY3	۰۵/۰-	۴۳/۰ تا ۵۲/۰-	بی معنا	۰/۹۹
XX2 vs. X04, X05, X06	۵۸/؛ ۱ ۵۴/؛ ۱ ۴۹/۱	۰۵/۲ تا ۱۰/؛ ۱ ۲۰/۱ تا ۱/۰۶ ۹۶/۱ تا ۰۲/۱	معنادار	<۰/۰۰۰۱
XY3 vs. X04, X05, X06	۶۲/؛ ۱ ۵۸/؛ ۱ ۵۴/۱	۰۹/۲ تا ۱۵/؛ ۱ ۰۵/۲ تا ۱۱/؛ ۱ ۰۱/۲ تا ۰۶/۱	معنادار	<۰/۰۰۰۱
۶X04 vs. X05, X0	۰۸/؛ ۰ ۰۴/۰	۵۶/۰ تا ۳۹/۰-؛ ۰ ۵۲/۰ تا ۴۳/۰-	بی معنا	۰/۹۹
۶X05 vs. X0	۰۴/۰	۵۲/۰ تا ۴۴/۰-	بی معنا	۰/۹۹
hsa-miR-432-5p				
XX1 vs. XX2, XY3	۰۴/۰-؛ ۰ ۰۹/۰-	۴۴/۰ تا ۵۲/۰-۳۹/؛ ۰ ۵۷/۰-	بی معنا	۰/۹۹
XX1 vs. X04, X05, X06	۶۸/۱-؛ ۳۴/۱-؛ ۳۵/۱-	تا ۱۶/۲-؛ ۸۷/۰- تا ۸۲/۱-؛ ۸۸/۰- تا ۸۳/۱- ۲۰/۱-	معنادار	<۰/۰۰۰۱
XX2 vs. XY3	۰۵/۰	۵۳/۰ تا ۴۲/۰-	بی معنا	۰/۹۹
XX2 vs. X04, X05, X06	۵۹/۱-؛ ۲۵/۱-؛ ۲۶/۱-	تا ۰۶/۲-؛ ۷۷/۰- تا ۷۳/۱-؛ ۷۸/۰- تا ۷۴/۱- ۱۱/۱-	معنادار	<۰/۰۰۰۱
XY3 vs. X04, X05, X06	-؛ ۳۱/۱-؛ ۳۱۵/۱- ۶۴/۱	تا ۱۲/۲-؛ ۸۳/۰- تا ۷۸/۱-؛ ۸۴/۰- تا ۷۹/۱- ۱۶۷/۱	معنادار	<۰/۰۰۰۱
X04 vs. X05, X06	۳۳/۰-؛ ۰۱/۰	۱۵/۰ تا ۸۰/۰-؛ ۰ ۴۸/۰ تا ۴۷/۰-	بی معنا	>۰/۹۹ ؛ ۰/۳۳
X05 vs. X06	۳۴/۰-	۱۴/۰ تا ۸۱/۰-	بی معنا	۰/۲۹
hsa-miR-99a-5p				

XX1 vs. XX2, XY3	۴۵/۰-؛ ۴۵/۰-	۰۳/۰ تا ۹۲/۰-؛ ۰۲/۰ تا ۹۳/۰-	بی معنا	۰/۰۷، ۰/۰۸
XX1 vs. XO4, XO5, XO6	۳۵/۱؛ ۳۲/۱؛ ۳۶/۱	۸۳/۱ تا ۸۸/۱؛ ۰۷۹/۱ تا ۸۴/۱؛ ۰۸۳/۱ تا ۸۸/۱	معنادار	<۰/۰۰۰۱
XX2 vs. XY3	۰۱/۰	۴۸/۰ تا ۴۶/۰-	بی معنا	>۰/۹۹
XX2 vs. XO4, XO5, XO6	۸۱/۱؛ ۷۷/۱؛ ۸۱/۱	۲۸/۲ تا ۳۳/۱؛ ۲۵/۲ تا ۳۰/۱؛ ۲۹/۲ تا ۳۴/۱	معنادار	<۰/۰۰۰۱
XY3 vs. XO4, XO5, XO6	۸۰/۱؛ ۷۶/۱؛ ۸۱/۱	۲۷/۲ تا ۳۲/۱؛ ۲۴/۲ تا ۲۹/۱؛ ۲۸/۲ تا ۳۳/۱	معنادار	<۰/۰۰۰۱
XO4 vs. XO5, XO6	۰۱/۰-؛ ۰۴/۰-	۴۷/۰ تا ۴۸/۰-؛ ۰۴۳/۰ تا ۵۱/۰-	بی معنا	۰/۹۹
XO5 vs. XO6	۰۴/۰	۵۱/۰ تا ۴۴/۰-	بی معنا	>۰/۹۹
hsa-miR-483-5p				
XX1 vs. XX2, XY3	۱۲/۱؛ ۰۷/۰	۶۰/۰ تا ۳۶/۰-؛ ۵۵/۰ تا ۴۱/۰-	بی معنا	۰/۹۹، ۰/۹۷
XX1 vs. XO4, XO5, XO6	۸۶/۱-؛ ۴۵/۱-؛ ۶۵/۱-	۱۲/۲- تا ۱۷/۱-؛ ۹۲/۱- تا ۹۷/۰-؛ ۳۳/۲- تا ۳۸/۱	معنادار	<۰/۰۰۰۱
XX2 vs. XY3	۰۶/۰	۵۳/۰ تا ۴۲/۰-	بی معنا	۰/۹۹
XX2 vs. XO4, XO5, XO6	۹۲/۱-؛ ۵۱/۱-؛ ۷۱/۱-	۱۹/۲- تا ۲۴/۱-؛ ۹۹/۱-؛ ۰۴/۱- تا ۴۰/۲- تا ۴۵/۱	معنادار	<۰/۰۰۰۱
XY3 vs. XO4, XO5, XO6	۹۷/۱-؛ ۵۶/۱-؛ ۷۶/۱-	۲۴/۲- تا ۲۹/۱-؛ ۰۴/۲- تا ۴۵/۲- تا ۵۰/۱	معنادار	<۰/۰۰۰۱
XO6؛ XO4 vs. XO5	۲۱/۰-؛ ۲۰/۰	۲۷/۰ تا ۶۹/۰-؛ ۶۷/۰ تا ۲۸/۰-	بی معنا	۰/۸۰، ۰/۷۷
XO5 vs. XO6	۴۱/۰-	۰۶۵/۰ تا ۸۹/۰-	بی معنا	۰/۱۲

توجه: P<0.05 از نظر آماری بی معنا در نظر گرفته شد و t تست و یا آزمون فیشر دقیق مبنا قرار گرفت.

بحث و نتیجه گیری

است. آثار روش های نهجی بررسی جنین ها پیش از لانه گزینی همواره مورد بحث و بررسی است و مطالعاتی با داده هایی ناهمساز آن موجود است (۱۱). در مطالعه حاضر، تفاوت miRNA های میان جنین های یوپلوئید از نظر کروموزوم های جنسی در برابر جنین های ترنر (با یک کروموزوم جنسی X) سنجیده شد. تفاوت معنی دار بیان بیشتر سه miRNA، hsa-miR-379-5p، hsa-miR-199a-5p، hsa-miR-199b-3p در جنین های یوپلوئید و در مقابل، بیان کمتر سه miRNA، hsa-miR-432-5p، hsa-miR-483-5p، hsa-miR-99a-5p مشاهده گردید. الگوی بیان این miRNA ها کاملاً عکس miRNA های محیط کشت جنین های ترنر بود. اخیراً نقش انواع نشانگرهای زیستی از جمله miRNA ها، پروتئین ها و هورمون ها در محیط کشت جنین، به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. بورگس و همکاران

با توجه به محدودیت ها و میزان موفقیت اندک IVF

ناشی از شکست لانه گزینی پس از درمان IVF-ET، بررسی بیومارکرها برای کیفیت جنین و پیش بینی نتایج انتقال جنین می تواند به توسعه روش های کمک باروری کمک کند (۱۲).

فن های غیر نهجی بررسی ژنتیکی کروموزوم های جنین ها به ویژه بررسی های دقیق مولکولی و تشخیصی در سطح miRNA، در دهه اخیر بسیار مورد توجه دانشمندان و پزشکان بوده است، به ویژه به دنبال شباهتی که درباره آسیب به جنین در طول نمونه برداری و یا کاهش پتانسیل تکوین و لانه گزینی و به دنبال آن، شانس بارداری وجود دارد. علی رغم پیشرفت های بسیار در آزمایش های ژنتیکی از جمله استفاده از توالی یابی نسل جدید (NGS) و انجام عمل بیوپسی روی جنین، به علت کاهش پتانسیل تکوینی، همچنان چالش برانگیز

پیشنهاد کردند که miR-142-3p ممکن است یک نشانگر زیستی بالقوه برای شکست کاشت بلاستوسیت باشد (۱۳) و افزایش سطح آپولیپروتئین A1 در محیط کشت حاوی بلاستوسیت‌های با درجه مورفولوژیکی بالاتر وجود دارد که ممکن است نقش لیپوپروتئین‌ها را در رشد جنینی اولیه نشان دهد (۱۴). ونگ و همکاران گنادوتروپین جفتی بتا انسانی (HCG) ترشح‌شده را به‌عنوان یک نشانگر زیستی مفید برای انتخاب جنین در روش IVF-ET نشان دادند (۱۵)، در حالی که ونگ و همکاران گزارش دادند که غلظت HCG در محیط کشت ارتباط مثبتی با وضعیت رشد اولیه جنین و نرخ لانه‌گزینی دارد و بنابراین، به‌عنوان یک نشانگر مفید برای انتخاب جنین در روش IVF-ET عمل می‌کند (۱۵). در این پژوهش، پروفایل‌های شش miRNA ترشح‌شده از جنین‌های پیش از لانه‌گزینی در نمونه‌های محیط کشت میان یک گروه جنین‌های با کروموزوم‌های جنسی طبیعی و یک گروه با یک کروموزوم جنسی X که تحت درمان IVF و آزمایش ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی قرار گرفته بودند، به‌عنوان نشانگرهای زیستی، برای مقایسه با نتایج آزمایش ژنتیکی تجزیه و تحلیل گردید. در مجموع، شش miRNA شناخته‌شده در نمونه‌های محیط کشت گروه باردار شناسایی شد و از میان آن‌ها، سه miRNA شامل hsa-miR-483-5p، hsa-miR-199a-5p و hsa-miR-432-5p در محیط کشت جنین‌های با دو کروموزوم جنسی سالم، بیان بالاتری داشتند.

شواهد چشمگیری نشان داده‌اند که miR-199a-5p در سرطان‌های مختلف نقش دارد (۱۶) و گزارش شده است که mmu-miR-199a-5p، خود تجدید سلول‌های بنیادی جنینی موش را خاموش می‌کند (۱۷). سنگ و همکاران گزارش دادند که در مقایسه با یک گروه لقاح داخل بدن، miR-199a-5p با تنظیم پایین در بلاستوسیت‌های IVF مسئول پتانسیل رشد کمتر و زنده ماندن بعدی است (۱۹). در مجموع، در طرح حاضر به این نتیجه رسیدیم که بیان miRNA های hsa-miR-379-5p، hsa-miR-199a-5p، hsa-miR-199b-3p ارتباط نزدیکی با تعداد کروموزوم‌های جنسی جنین دارد؛ اما سازوکار اساسی الگویابی بیان این

miRNA ها در جنین‌های پیش از لانه‌گزینی، نیاز به کاوش بیشتری دارد.

از آنجا که بیان بیش‌ازحد miR-483-5p تکثیر سلول‌های گلیوما را سرکوب می‌کند و باعث توقف G0/G1 می‌گردد، به‌عنوان یک سرکوب‌کننده تومور در نظر گرفته می‌شود (۱۸). گزارش شده است که miR-483-5p غلظت پروژسترون را در یک رده سلولی تومور مانند گرانولوزای انسان استروئیدوژن تنظیم می‌کند (۱۹). miR-483-5p با تنظیم پایین در سلول‌های کومولوس تخمک متافاز II از زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک مشاهده شد (۲۰) و یک مطالعه اکتشافی نشان داد که miR-483-5p تنظیم‌نشده با پیامدهای نامطلوب مرتبط با بارداری مرتبط است (۲۱). گزارش شده است که miR-483-5p یک تنظیم‌کننده اختصاصی سطح MeCP2 در مغز جنین انسان است (۲۲)، در حالی که کاهش miR-483-5p در جفت بیماران مبتلا به مسمومیت بارداری (پره‌اکلامپسی) و زایمان زودرس در مقایسه با زمان طبیعی حاملگی مشاهده شد که نشان می‌دهد تغییر بیان و عملکرد بیمار ممکن است با عوارض بارداری مرتبط باشد (۲۳). در این مطالعه، بیان کمتر سه miRNA، hsa-miR-432-5p، hsa-miR-483-5p، hsa-miR-99a-5p در نمونه محیط کشت گروه جنین‌های با دو کروموزوم جنسی طبیعی شناسایی شد، در حالی که دقیقاً همین سه miRNA در گروه جنین‌های با یک کروموزوم جنسی X و سندروم ترنر، بیان بالاتری را به‌صورت معناداری نشان دادند. این یافته‌ها ممکن است نشان دهد که این سه miRNA نقش متمایز و منحصر به فردی را در تنظیم تعداد کروموزوم‌های جنین ایفا می‌کند.

در سال‌های اخیر، نقش miR-432-5p در سرطان‌ها به‌طور گسترده مطالعه شده است. مطالعه پیشین نشان داد که کاهش miR-432-5p با هدف قرار دادن E2F3 باعث رشد و مهاجرت سلول‌های سرطان سینه می‌شود (۲۴)؛ همچنین گزارش شده است که miR-432-5p با فعال کردن سیگنال‌دهی Wnt/ β -catenin و ترویج رشد و متاستاز سلولی در کارسینوم سلول‌های کبدی انسان، در تسهیل پیشرفت سلولی نقش دارد (۲۵، ۲۶). یانگ و همکاران گزارش کردند

نگرفته بود، نقطه قوت این طرح را نشان می‌دهد. این نتایج ممکن است با تنظیم ژن‌های هدف در تعداد کروموزوم‌های جنسی جنین نقش داشته باشند و امکان استفاده از miRNA های ترشح‌شده توسط جنین‌ها در محیط کشت را به‌عنوان نشانگرهای زیستی غیرتهاجمی، برای پیش‌بینی نتایج آزمایش‌های ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی نشان می‌دهد.

سپاس‌گزاری

از همکاری‌های صمیمانه پروفسور احمد حسینی و خانم دکتر مرضیه مهرافزا، رئیس و مدیرعامل مرکز تحقیقات و درمان ناباروری مهر پویای گیل رشت، برای در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌کنیم.

تعارض منافع

بدین‌وسیله همه نویسندگان اظهار می‌دارند که هیچ تعارض منافی درباره این تحقیق وجود ندارد. تمام نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش همه بخشهای پژوهش حاضر مشارکت داشته‌اند.

کد اخلاق: IR.IAU.RASHT.REC.1398.053

References

- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340:17-8. doi: 10.1016/0140-6736(92)92425-F.
- Yang D, Brown SE, Nguyen K, Reddy V, Brubaker C, Winslow KL. Live birth after the transfer of human embryos developed from cryopreserved oocytes harvested before cancer treatment. *Fertil Steril* 2007; 1: 87:1469-e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.07.1546.
- Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. Fertilization and cleavage in vitro of preovulatory human oocytes. *Nature* 1970; 26:227:1307-9. doi:10.1038/2271307a0.
- Niu X, Wang CT, Li R, Haddad G, Wang W. Is day 7 culture necessary for in vitro fertilization of cryopreserved/warmed human oocytes? *Reprod Biol Endocrinol* 2020; 18:1-4. doi: 10.1186/s12958-020-0565-9.
- Singla S, Iwamoto-Stohl LK, Zhu M, Zernicka-Goetz M. Autophagy-mediated apoptosis eliminates aneuploid cells in a mouse model of chromosome mosaicism. *Nat Commun* 2020; 11:2958. doi: 10.1038/s41467-020-16796-3.

که سطوح پایین‌تری از miR-432-5p هم در بافت‌ها و هم در سلول‌های گلیوم مشاهده گردید (۲۷). بر اساس بررسی‌ها، هیچ مطالعه‌ای وجود ندارد که miR-432-5p را با کاهش تعداد کروموزوم‌های جنسی جنین مرتبط کند. در مطالعه حاضر، بیان hsa-miR-432-5p در نمونه محیط کشت گروه جنین‌های با کروموزوم جنسی طبیعی افزایش بیان داشت که نشان‌دهنده تأثیر تعداد کروموزوم‌های جنسی در بیان بالاترین miRNAها است، هرچند نقش hsa-miR-432-5p در تعداد کروموزوم‌های جنسی جنین باید بیشتر مطالعه شود.

محدودیت‌های مطالعه حاضر، فراوانی اندک miRNAها و حجم اندک نمونه است. اگرچه نتایج qRT-PCR قابلیت اطمینان نتایج توالی‌یابی RNA ما را نشان می‌دهد، آزمایش‌های ex-vivo برای تأیید نقش miRNAهای بررسی‌شده در این مطالعه مورد نیاز است و اعتبار بالینی با حجم نمونه بزرگ‌تر الزامی است تا اثربخشی آن را تأیید کند.

یافته‌های حاصل از بررسی و تحلیل بیان شش miRNA ذکر شده که تاکنون بررسی مشابه آن صورت

- Bassan S. Different but same: A call for a joint pro-active regulation of cross-border egg and surrogacy markets. *Health Matrix Clevel* 2018; 28:323-374.
- Rama Raju GA, Jaya Prakash G, Murali Krishna K, Madan K. Neonatal outcome after vitrified day three embryo transfers: a preliminary study. *Fertil Steril* 2009; 92:143-8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.05.014.
- Jiang B, Li W, Stewart S, Ou W, Liu B, Comizzoli P, et al. Sand-mediated ice seeding enables serum-free low-cryoprotectant cryopreservation of human induced pluripotent stem cells. *Bioact Mater* 2021; 6:4377-88. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.04.025.
- Gradstein SR, Hekking WH. Studies on Colombian Cryptogams IV. A catalog of the Hepaticae of Colombia. *J Hattori Bot Lab* 1979; 455:93-144.
- Gardner D, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Volume 2: Clinical Perspectives*: CRC Press. 2017; P.468-76.
- Aghajani S, Salehzadeh A, Ghasemian F, Mehrfaza M, Hosseini A. Teffect of Single Embryo Blastomere Biopsy from Human Frozen Embryos on Assisted Reproductive Outcomes. *Cell J* 2022; 24:628-36. doi: 10.22074/cellj.2022.8328.

12. Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *New England J Med* 2001; 345:1400-8. doi: 10.1056/NEJMra000763.
13. Borges Jr E, Setti AS, Braga DP, Geraldo MV, Rita de Cássia SF, Iaconelli Jr A. miR-142-3p as a biomarker of blastocyst implantation failure-A pilot study. *JBRA Assist Reprod* 2016; 20:200-205. doi: 10.5935/1518-0557.20160039.
14. Mains LM, Christenson L, Yang B, Sparks AE, Mathur S, Van Voorhis BJ. Identification of apolipoprotein A1 in the human embryonic secretome. *Fertil Steril* 2011; 96:422-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.05.049.
15. Wang H, Zhang R, Han D, Liu C, Cai J, Bi Y, et al. Association of human chorionic gonadotropin level in embryo culture media with early embryo development. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2014; 34:1039-41, 1047.
16. Tan K, Wang X, Zhang Z, Miao K, Yu Y, An L, et al. Downregulation of miR-199a-5p disrupts the developmental potential of in vitro-fertilized mouse blastocysts. *Biol Reprod* 2016; 95:54-1. doi: 10.1095/biolreprod.116.141051.
17. Wang Y, Melton C, Li YP, Shenoy A, Zhang XX, Subramanyam D, et al. miR-294/miR-302 promotes proliferation, suppresses G1-S restriction point, and inhibits ESC differentiation through separable mechanisms. *Cell Rep* 2013; 4:99-109. doi: 10.1016/j.celrep.2013.05.027.
18. Wang L, Shi M, Hou S, Ding B, Liu L, Ji X, et al. MiR-483-5p suppresses the proliferation of glioma cells via directly targeting ERK1. *FEBS Lett* 2012; 586:1312-17. doi: 10.1016/j.febslet.2012.03.035.
19. Sang Q, Yao Z, Wang H, Feng R, Wang H, Zhao X, et al. Identification of microRNAs in human follicular fluid: characterization of microRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98:3068-79. doi: 10.1210/jc.2013-1715.
20. Shi L, Liu S, Zhao W, Shi J. miR-483-5p and miR-486-5p are down-regulated in cumulus cells of metaphase II oocytes from women with polycystic ovary syndrome. *Reprod Biomed Online* 2015; 31:565-72. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.06.023.
21. Rodosthenous RS, Burris HH, Sanders AP, Just AC, Dereix AE, Svensson K, et al. Second trimester extracellular microRNAs in maternal blood and fetal growth: an exploratory study. *Epigenetics* 2017; 12:804-10. doi: 10.1080/15592294.2017.1358345.
22. Han K, Gennarino VA, Lee Y, Pang K, Hashimoto-torii K, Choufani S, et al. Human-specific regulation of MeCP2 levels in fetal brains by microRNA miR-483-5p. *Genes Dev* 2013; 27:485-90. doi: 10.1101/gad.207456.112.
23. Mayor-Lynn K, Toloubeydokhti T, Cruz AC, Chegini N. Expression profile of microRNAs and mRNAs in human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia and preterm labor. *Reprod Sci* 2011; 18:46-56. doi: 10.1177/193371911103741.
24. Liu Y, Lu C, Zhou Y, Zhang Z, Sun L. Circular RNA hsa_circ_0008039 promotes breast cancer cell proliferation and migration by regulating miR-432-5p/E2F3 axis. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 502:358-63. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.05.166.
25. Jiang N, Chen WJ, Zhang JW, Xu C, Zeng XC, Zhang T, et al. Downregulation of miR-432 activates Wnt/ β -catenin signaling and promotes human hepatocellular carcinoma proliferation. *Oncotarget* 2015; 6:7866. doi: 10.18632/oncotarget.3492.
26. Liu H, Xue L, Song C, Liu F, Jiang T, Yang X. Overexpression of circular RNA circ_001569 indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma and promotes cell growth and metastasis by sponging miR-411-5p and miR-432-5p. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 503:2659-65. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.08.020.
27. Yang G, Han B, Feng T. ZFAS1 knockdown inhibits viability and enhances cisplatin cytotoxicity by up-regulating miR-432-5p in glioma cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2019; 125:518-26. doi: 10.1111/bcpt.13286.