Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

Study of Micro RNA (miR-23a-3p) Expression Level in Maternal Plasma of Women with Early Recurrent Miscarriage (RM) and Recurrent Implantation Failure (RIF)

Mina Tutunfroush [1], Jafar Mohseni [2*], Saeed Ghorbian [3], Shahla Danaii [3], Mehdi Ghiyamirad [4]

[1] Dept of molecular genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar,Iran
[2] Genetics Research Div, ART Center of ACECR East Azerbaijan Branch, East Azerbaijan ACECR, Tabriz, Iran
[3] Dept of Gynecology, ART center of ACECR East Azarbaijan Branch, East Azarbaijan ACECR, Tabriz, Iran
[4] Dept of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar,Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: 07 January 2023
Revised: 19 June 2023
Accepted: 19 August 2023
Published Online:03 December 2023

**** Correspondence to:***
Jafar Mohseni
Genetics Research Div, ART Center of ACECR East Azerbaijan Branch, East Azerbaijan ACECR, Tabriz, Iran
Email:
Jmohseni46@gmail.com

A B S T R A C T

Introduction: Recurrent Pregnancy Loss and Recurrent Implantation Failure are major limiting factors in the establishment of pregnancy. Recurrent Pregnancy loss is defined as the failure of two or more clinically recognized pregnancies. A considerable proportion of infertile couples undergoing IVF treatment experiencing recurrent implantation failure (RIF) fail repeatedly to implant following at least three IVF cycles. MicroRNAs (miRNAs) can serve as reliable non-invasive diagnostic and prognostic biomarkers for pregnancy-related complications. Therefore, this study aimed to quantify miR-23a-3p expression level in the plasma of patients with idiopathic recurrent pregnancy loss (iRPL) and recurrent implantation failure compared to healthy subjects to evaluate its potential diagnostic value in iRPL and RIF patients.

Material & Methods: This study is a cross-sectional descriptive study. A total of 120 plasma samples were obtained from 40 women with a history of at least two consecutive iRPL, 40 women with RIF, and 40 healthy women without a history of miscarriage to evaluate the expression level of the circulating miR-23a-3p by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) technique. All participants were recruited from Assisted Reproductive Technology (ART) and Stem Cell Research Center, Tabriz, Iran, September 2019-March 2020. Statistical analysis was performed using SPSS (version 22). Diagnostic efficiency of the circulating miRNAs was determined by Receiver Operatig Characteristic curve analysis using Graphpad Prism version 9.1.1.

Findings: Our results showed that the miR-23a-3p expression level in plasma of iRPL patients was lower than those in healthy controls but without a statistically significant difference (P=0.113). We also found that miR-23a-3p plasma level in patients with RIF tended to be lower compared to healthy participants; however, it was not statistically significant (P=0.974).

Discussion & Conclusion: The current study provides evidence indicating that downregulation of miR-23a-3p may be associated with iRPL and RIF. Therefore, further research is needed, such as using different geographic regions, large sample sizes, and other techniques (microarray).

Keywords: Implantation, Micro RNA, Real Time PCR, Recurrent miscarriage

➢ **How to cite this paper**
Tutunfroush M, Mohseni J, Ghorbian S, Danaii SH, ghiyamirad M. Study of Micro RNA (miR-23a-3p) Expression Level in Maternal Plasma of Women with Early Recurrent Miscarriage (RM) and Recurrent Implantation Failure (RIF). Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2023;31(5): 24-32.

© The Author(s) Publisher: Ilam University of Medical Sciences

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام
JIUMS
P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸
E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

مطالعهٔ میزان بیان gmicro RNA miR-23A-3P در پلاسمای خون زنان با سقط مکرر و لانه‌گزینی ناموفق مکرر

مینا توتون‌فروش [۱]، جعفر محسنی [۲*]، سعید قربیان [۳]، شهلا دانایی [۳]، مهدی قیامی‌راد [۴]

[۱] گروه ژنتیک مولکولی، دانشکدهٔ علوم پایه، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
[۲] گروه تحقیقات ژنتیک، مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی آذربایجان شرقی، تبریز، ایران
[۳] گروه تحقیقات زنان، زایمان و نازایی، مرکز ناباروری جهاد دانشگاهی واحد آذربایجان شرقی، تبریز، ایران
[۴] گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم پایه، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۷
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۳/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۸
تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۹/۱۲

نویسنده مسئول:
جعفر محسنی
گروه تحقیقات ژنتیک، مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی آذربایجان شرقی، تبریز، ایران
Email:
Jmohseni46@gmail.com

چکیده

مقدمه: سقط مکرر و لانه‌گزینی ناموفق از عوامل اصلی محدودکننده در بارداری هستند. سقط مکرر به از دست رفتن حداقل دو مورد بارداری به‌صورت پی‌درپی اطلاق می‌گردد. زنان نابارور تحت درمان با تکنیک لقاح آزمایشگاهی (IVF In Vitro Fertilizatio)، در صورت باردار نشدن پس از سه مورد انتقال جنین، به‌عنوان بیماران با لانه‌گزینی ناموفق مکرر (RIF) در نظر گرفته می‌شوند. micro RNAها (ریز آر ان آ ها) به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های پس از ترجمهٔ بیان ژن، در بسیاری از بیماری‌ها نقش کلیدی دارند که امروزه به‌عنوان بیومارکرهای قابل‌اعتماد و غیرتهاجمی در پیش‌آگهی و تشخیص اختلالات تولیدمثلی موردتوجه قرار گرفته‌اند؛ بنابراین، در این مطالعه بر آن شدیم تا با بررسی تغییرات سطح بیان miR-23a-3p در پلاسمای بیماران با سابقهٔ سقط مکرر و لانه‌گزینی ناموفق در مقایسه با زنان باردار طبیعی، قابلیت آن را به‌عنوان بیومارکر تشخیصی در این بیماران تعیین کنیم.

مواد و روش‌ها: تحقیق حاضر مطالعه‌ای توصیفی-مقطعی است. تعداد ۱۲۰ نمونه خون از افراد مراجعه‌کننده به مرکز ناباروری جهاد دانشگاهی تبریز، از مهرماه ۱۳۹۸ تا اسفندماه ۱۳۹۹ جمع‌آوری شد که شامل ۴۰ نمونه از بیماران با سابقهٔ حداقل دو مورد سقط، ۴۰ نمونه زنان با سابقهٔ حداقل سه مورد انتقال ناموفق و ۴۰ مورد زنان با بارداری سالم و بدون سابقهٔ ناباروری و یا سقط قبلی بود که برای ارزیابی سطح بیان miR-23a-3p توسط تکنیک Real Time PCR کمی انجام گرفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS vol.22 انجام گردید. نمودار ROC (Receiver Operatig Characteristic) نیز با استفاده از نرم‌افزار Graphpad prism vol.9.1.1 برای بررسی ارزش تشخیصی miR-23a-3p در مواد سقط مکرر و لانه‌گزینی ناموفق مکرر ترسیم شد.

یافته‌های پژوهش: نتایج به‌دست‌آمده حاکی از آن است که سطح بیان miR-23a-3p در بیماران با سابقهٔ سقط مکرر در مقایسه با زنان باردار طبیعی، کاهش بیان داشته است، اگرچه این کاهش بیان از نظر آماری معنی‌دار نیست (P=0.113)؛ همچنین این نتایج کاهش بیان بی‌معنی miR-23a-3p در زنان با لانه‌گزینی ناموفق مکرر را نشان می‌دهد (P=0.974).

بحث و نتیجه‌گیری: یافته‌های به‌دست‌آمده از تحقیق نشان‌دهندهٔ شواهدی مبنی بر ارتباط میان کاهش میزان بیان miR-23a-3p و ابتلا به اختلالات سقط مکرر و لانه‌گزینی ناموفق مکرر است. پیشنهاد می‌شود این مطالعه در نقاط جغرافیایی متفاوت، تعداد نمونهٔ بیشتر و توسط تکنیک‌های پیشرفته‌تر نظیر ریزآرایه و... صورت پذیرد.

واژه‌های کلیدی: سقط مکرر، لانه‌گزینی، تکنیک Real Time PCR، micro RNA

استناد: توتون‌فروش ، مینا؛ محسنی ، جعفر؛ قربیان ، سعید؛ دانایی ، شهلا؛ قیامی‌راد ، مهدی. مطالعهٔ میزان بیان gmicro RNA miR-23A-3P در پلاسمای خون زنان با سقط مکرر و لانه‌گزینی ناموفق مکرر. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، آذر ۱۴۰۲؛۳۱(۵): ۳۲-۲۴.

CC BY NC

مقدمه

به از دست رفتن خودبه‌خودی حداقل دو مورد بارداری به‌صورت متوالی سقط مکرر جنین اطلاق می‌شود (۱). امروزه با توجه به اینکه شیوع سقط مکرر در میان زوجین حدود ۲ الی ۵ درصد است؛ بنابراین، یک چالش جدی تولیدمثلی به‌شمار می‌رود (۲). سقط مکرر جنین توسط مجموعه‌ای از عوامل اتفاق می‌افتد که این عوامل شامل عوامل شناخته‌شده و عوامل ناشناخته است (۳). ناباروری به ناتوانی در باردار شدن پس از یک سال از ازدواج و بدون استفاده از روش‌های پیشگیری از بارداری گفته می‌شود4)). بارداری به روش IVF یا لقاح خارج رحمی یک تکنیک آزمایشگاهی برای درمان ناباروری افراد است. اغلب افرادی که برای درمان ناباروری تحت درمان با این تکنیک قرار می‌گیرند، بیشتر به سبب ناتوانی در لانه‌گزینی جنین در این افراد قادر به بارداری نیستند (۵). ناتوانی در لانه‌گزینی مکرر (Recurrent Pregnancy Failure) به حالتی گفته می‌شود که در آن علی‌رغم وجود ساک حاملگی، بارداری اتفاق نیفتد (۶). عوامل متعددی در بروز اختلالات سقط مکرر و ناباروری دخیل هستند. این عوامل چندعاملی (مولتی فاکتوریال) شامل عوامل محیطی، عوامل ارثی-ژنتیکی و سازوکارهای اپی‌ژنتیکی است. علی‌رغم موارد عنوان‌شده، بخش عمده‌ای از علل ناباروری و سقط هنوز شناخته نشده است (۸، ۷). رشد و نمو جفت عامل بسیار مهمی در رشد جنین و درنتیجه، بارداری موفقیت‌آمیز است که یکی از عوامل بسیار مهم سازوکار اپی‌ژنتیکی در تنظیم بیان ژن‌هاست که این سازوکارها شامل متیلاسیون DNA، مدیفکاسیون هیستون‌ها و RNAهای غیر کدکنندهٔ تنظیمی (مانند miRNAها) هستند (۹). از میان عوامل ذکرشده، miRNAها مهم‌ترین نقش را در تنظیم دارند (۱۰). microRNAها یا به‌اختصار miRNAها مولکول‌های RNA کوتاهی با طول ۱۹ الی ۲۳ نوکلئوتید هستند که از طریق کنترل بیان ژن‌های مختلف، تنظیم‌کننده‌های اصلی (به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های پس از رونویسی ژن) در سازوکارهای بیولوژیکی شامل رشد و نمو، تمایز سلولی، تکثیر و آپوپتوز به‌شمار می‌روند (۱۲، ۱۱). جایگاه mir-23a-3p در خوشهٔ ژنی mir~23a~27a~24a قرار دارد. افزایش بیان mir-23a-3p از طریق هدف قرار دادن ژن‌های سرکوب‌کنندهٔ تومور (تومورساپرسورها)، در سرطان‌های مختلف گزارش‌شده است. mir-23a-3p در تمایز و تکثیر (differentiation and proliferation) انواع سلول‌ها نقش دارد (۱۳). هدف از انجام این مطالعه تعیین ارتباط میان تغییرات میزان بیان miRNAی miR-23a-3p با بروز سقط مکرر و انتقال ناموفق است. با بررسی میزان بیان این miRNA در خون زنانی که سقط مکرر و یا انتقال ناموفق داشتند، قابلیت بیومارکری آن‌ها برای تشخیص زودهنگام (به‌عنوان روش غیرتهاجمی) مشخص می‌شود و در صورت ارتباط تغییرات میزان بیان این عوامل با بروز سقط مکرر و لانه‌گزینی ناموفق مکرر (RIF)، در موارد بالینی استفاده گردند.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر مطالعه‌ای توصیفی-مقطعی است. نمونه‌های خون استفاده‌شده در مطالعه از ۴۰ خانم با سابقهٔ لانه‌گزینی ناموفق مکرر (سابقهٔ ۳ مورد انتقال جنین ناموفق یا بیشتر و نمونه‌گیری هفت الی ده روز پس از انتقال جنین)، ۴۰ خانم با سابقهٔ سقط مکرر (سابقهٔ حداقل ۲ مورد سقط خودبه‌خودی یا بیشتر و نمونه‌گیری حداکثر تا یک هفته پس از بروز سقط) که به مرکز ناباروری جهاد دانشگاهی تبریز مراجعه کرده بودند و ۴۰ خانم باردار طبیعی زیر ۲۰ هفته (برای انجام آزمایش‌های روتین بارداری در آزمایشگاه جهاد دانشگاهی تبریز) جمع‌آوری شد.

پیش از نمونه‌گیری، دربارهٔ اهداف کلی تحقیق و کاربرد نتایج مطالعه به افراد شرکت‌کننده توضیحات کامل و دقیق ارائه گردید و پس از تکمیل فرم رضایت طراحی‌شده و اطمینان از رضایت آگاهانهٔ ایشان برای شرکت در مطالعه، از افراد نمونهٔ خون گرفته شد (کد اخلاق: IR.IAU.TABRIZ.REC.1398.093). معیار انتخاب برای ورود به مطالعه افرادی بودند که علت ناباروری یا سقط آنان ناشناخته بود. بیمارانی که علت قابل تشخیصی برای ناباروری یا سقط داشتند، نظیر کاریوتایپ غیرطبیعی والدین یا جنین

سقط‌شده (نظیر ترانسلوکاسیون)، آنومالی‌های رحمی، اختلالات هورمونی، اختلال در دستگاه ایمنی (عدم تحمل یا تولرانس ایمنی)، بیماری‌های انعقادی، عفونت‌های تولیدمثلی، اختلالات تیروئیدی، دیابت ملیتوس و غیره، از مطالعه حذف شدند. پس از انتخاب افراد، نمونهٔ خون درون لوله‌های CBC یا لوله‌های حاوی ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری گردید.

پس از نمونه‌برداری از بیماران در ویال‌های وکیوم EDTAدار (5 ml)، همهٔ نمونه‌های خون بلافاصله در ۱۲۰۰۰g و در دمای ۴ درجه، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و پلاسمای نمونه‌ها به میکروتیوب دیگر که عاری از DNase و RNase بود، منتقل گردید و استخراج miRNA با استفاده از کیت miRNA isolation برند NORgene (محصول کشور کانادا) و بر اساس دستورالعمل استخراج شرکت سازندهٔ کیت صورت گرفت.

تعیین خلوص RNA استخراج‌شده توسط دستگاه نانودراپ: تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج‌شده با استفاده از Nano Drop ND-1000 spectrophotometer (Nano drop technologies, Wilmington, DE, USA) انجام پذیرفت. در این مرحله، رقت ۲ به ۹۸ از نمونه توسط آب مقطر تهیه شد. ابتدا دستگاه با آب مقطر به‌عنوان بلانک صفر گردید و سپس با وارد کردن نمونهٔ RNA تهیه‌شده در دستگاه، نتایج مربوط به میزان و خلوص به‌دست آمد (۲۸۰/۲۶۰ OD>1/7-2).

الکتروفورز RNA استخراج‌شده روی ژل آگارز برای کنترل کیفیت انجام شد. برای این کار، از پودر آگارز ۲ درصد استفاده گردید. برای تهیهٔ ژل، ۰/۴ گرم پودر آگارز وزن و به داخل ارلن منتقل شد. مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از بافر بافرتریس بورات (EDTA TBE) با غلظت X۱۰ به داخل ارلن اضافه گردید. پس از حل شدن کامل و خنک شدن نسبی، رنگ stain safe DNA به مقدار ۰/۲ میکرولیتر و مقدار ۱۰ میکرولیتر دی‌اتیل پیروکربنات (DEPES water) به داخل محلول افزوده و پس از یکنواخت شدن رنگ، ژل به داخل قالب که قبلاً شانه‌ها در جایگاه آن قرار گرفته بودند، ریخته شد؛ سپس ژل به داخل تانک منتقل گردید و داخل تانک با بافر بافرتریس بورات (EDTA) با غلظت X۱ پر شد تا حدی که از سطح ژل بالاتر شود. هر نمونه از RNA با مقدار هم‌حجم خود از بافر لودکننده (Loading dye) ترکیب پر گردید و به داخل چاهک مربوطه لود شد. یک چاهک نیز برای لدر (ladder) در نظر گرفته شد؛ سپس نمونه‌ها در ولتاژ حدود ۹۰ ولت جداسازی run گردیدند. پس از اینکه نمونه‌ها حدود دوسوم از ژل را طی کردند، ژل به داخل دستگاه ژل داکت منتقل شد تا از حضور باندهای مربوط به RNA اطمینان حاصل گردد.

با توجه به ناپایداری RNA استخراج‌شده، بلافاصله پس از استخراج، سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت زیست‌رویش و بر اساس دستورالعمل این شرکت صورت گرفت و cDNA سنتزشده تا زمان انجام Real Time PCR، در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

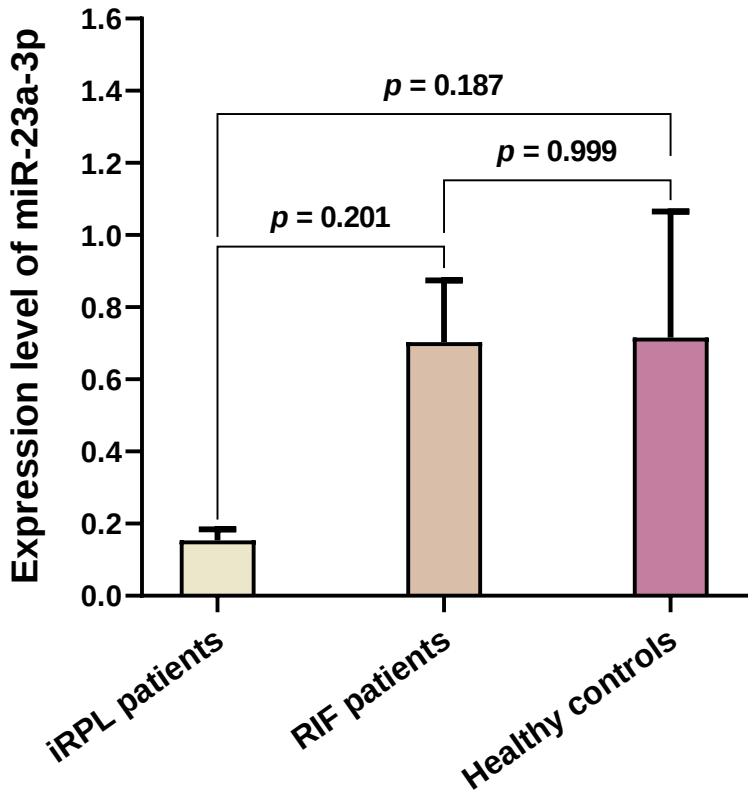
میزان بیان miR-23a-3p در پلاسمای نمونه‌های جمع‌آوری‌شده توسط تکنیک qPCR ارزیابی گردید. این تکنیک به‌صورت سه‌گانه برای همهٔ نمونه‌ها، با استفاده از Syber Green-I dye in AccuPower® 2X GreenStarTM qPCR Master Mix (Bioneer Inc, Seoul, South Korea) خریداری‌شده از شرکت زیست‌رویش و پرایمرهای اختصاصی miRNAها مطابق دستورالعمل شرکت سازندهٔ توسط سیستم StepOnePlusTM(Real-Time PCR)Applied Biosystems, Foster City, USA انجام گرفت. برای تعیین میزان و کمیت بیان یا حضور ژن از نرمالیزاسیون محصول PCR آن با ژن رفرنس U6 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. حجم کلی واکنش با 25 µl شامل 100 ng از cDNA سنتزشده با 12/ 5µL از مستر میکس ۲ X SYBER Green (Bioneer Inc.Seul, South Korea) و 10pmol از هرکدام از پرایمرهای اختصاصی و پرایمر ژن رفرنس U6 بود. برنامهٔ دمایی واکنش شامل ۴۰ سیکل و مرحلهٔ دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه و دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه بود. از کنترل منفی یا NTC برای بررسی بودن یا نبودن آلودگی در نمونه‌ها استفاده گردید. در انتها، پیش از آنالیز داده‌ها، منحنی‌های ذوب (Melting Curve) به‌دست‌آمده از هر واکنش Realtime PCR برای تأیید

صحت منحنی مربوط به هرکدام از miRNAها و ژن رفرنس (U6) و همچنین نبودن پرایمر دایمر بررسی شد. تغییرات سطح بیان توسط روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید.

آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS vol.22 انجام پذیرفت. برای مقایسهٔ میزان بیان miRNAی miR-23a-3p میان گروه‌های پژوهش، از آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) استفاده شد. آنالیز ROC برای ارزیابی ارزش تشخیصی miRNAی miR-23a-3p، به‌عنوان بیومارکر، با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism vol.9.1.1 صورت گرفت.

یافته های پژوهش

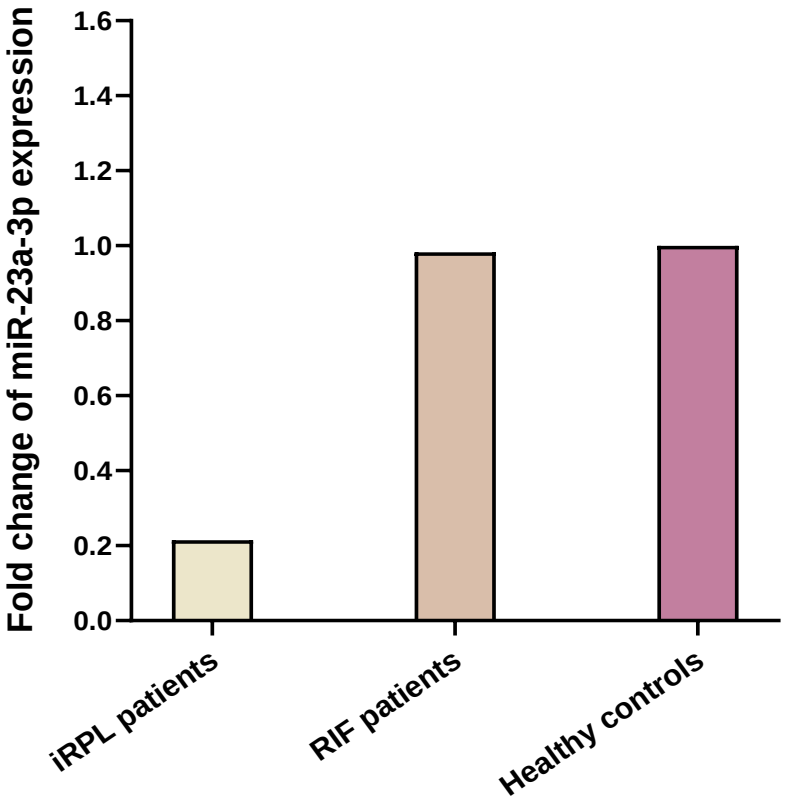
مقایسهٔ میانگین بیان ژن miR-23a-3p در گروه‌های پژوهش: با استفاده از تکنیک qPCR، میزان بیان miRNAی miR-23a-3p در پلاسمای خون زنان در گروه بیماران مبتلا به سقط مکرر، زنانی با سابقهٔ لانه‌گزینی ناموفق مکرر و گروه باردار طبیعی اندازه‌گیری شد. با آنالیز داده‌های به‌دست‌آمده، به این نتیجه رسیدیم که میزان بیان mir-23a-3p در بیماران مبتلا به سقط مکرر در مقایسه با گروه کنترل، کاهش می‌یابد، اگرچه این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نیست (P=0.187) (شکل شمارهٔ ۱). در سطح پلاسمایی miR-23a-3p در زنان با سابقهٔ لانه‌گزینی ناموفق مکرر، در مقایسه با گروه کنترل، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P=0.999) (شکل شمارهٔ ۱). علاوه بر این، نتایج ما نشان داد که سطح پلاسمایی miR-23a-3p در بیماران مبتلا به سقط مکرر، در مقایسه با زنانی که سابقه لانه‌گزینی ناموفق مکرر داشتند، کاهش یافته است، هرچند که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نیست (P=0.201) (شکل شمارهٔ ۱).



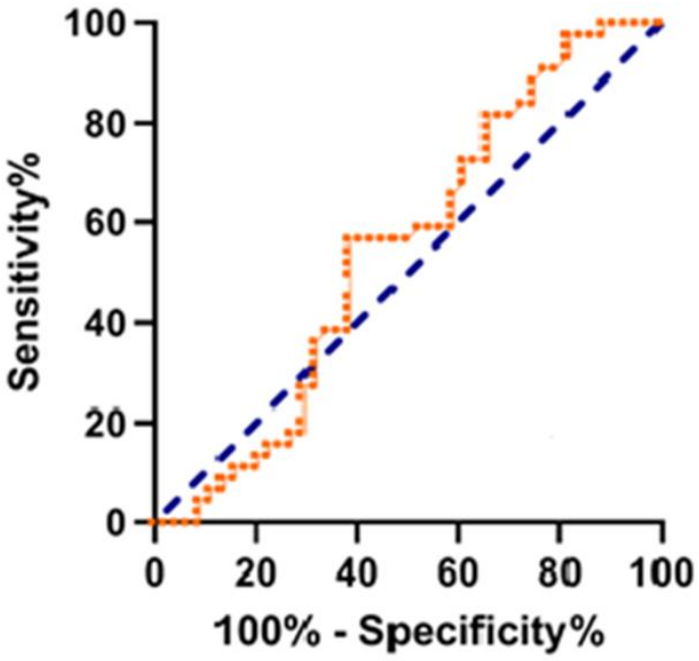
شکل شماره ۱. زنان با سابقهٔ سقط مکرر (iRPL))، زنان با سابقهٔ لانه‌گزینی ناموفق مکرر (RIF)) و زنان باردار طبیعی زیر ۲۰ هفته (Healthy Control). مقایسهٔ میانگین بیان miR-23a-3p در میان بیماران مبتلا به سقط مکرر، زنانی با سابقهٔ لانه‌گزینی ناموفق مکرر و گروه کنترل از نظر آماری هیچ اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.

برای مقایسهٔ تغییرات نسبی بیان miR-23a-3p در میان بیماران مبتلا به سقط مکرر، زنانی با سابقهٔ لانه‌گزینی ناموفق و گروه کنترل، مقادیر بیان چند برابر (Fold Change) محاسبه شد تا نشان دهد که افزایش یا کاهش بیان ژن مدنظر در میان گروه‌های پژوهش چقدر است. نتایج نشان داد که سطح پلاسمایی miR-23a-3p در بیماران مبتلا به سقط مکرر در مقایسه با زنانی با سابقهٔ لانه‌گزینی ناموفق (۴/۵۸ برابر) و گروه کنترل (۴/۶۶ برابر) کاهش یافته است (شکل شمارهٔ ۲)، درحالی‌که سطح پلاسمایی miR-23a-3p در گروه کنترل در مقایسه با زنانی با سابقهٔ لانه‌گزینی ناموفق، افزایش نسبی ۱/۰۱۸ برابری دارد (شکل شمارهٔ ۲).

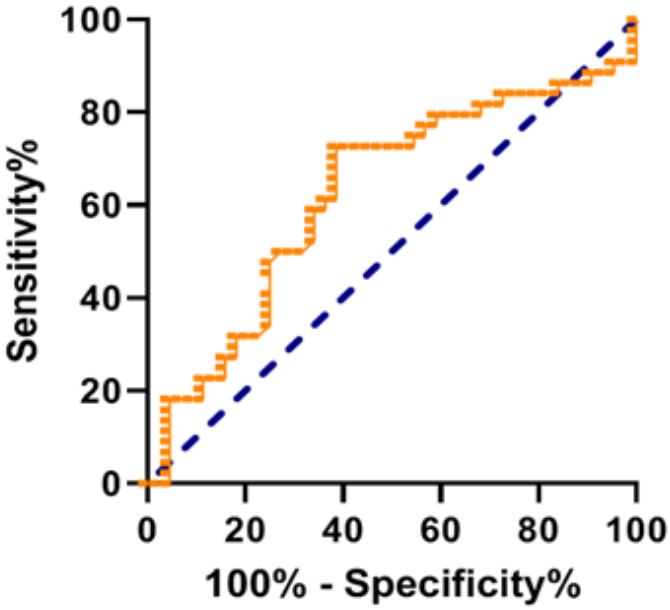
miR-23a-3p به‌عنوان بیومارکر: برای تعیین حساسیت و اختصاصیت miR-23a-3p به‌عنوان بیومارکرهای تشخیصی غیرتهاجمی منحنی (Receiver operating characteristic, ROC) ترسیم شد. نتایج منحنی ROC نشان داد که حساسیت و اختصاصیت miR-23a-3p به‌عنوان بیومارکر غیرتهاجمی، در تشخیص بیماران مبتلا به سقط‌های مکرر به‌ترتیب ۵۶/۸۲ درصد و ۶۱/۳۶ درصد است (سطح زیر منحنی: ۰/۵۴۰، P=0.515 و۹۵٪ CI=0.4173-0.3366) (شکل شمارهٔ ۳)؛ همچنین حساسیت و اختصاصیت miR-23a-3p به‌عنوان بیومارکر در زنانی با سابقهٔ RIF به‌ترتیب ۷۲/۷۳ درصد و ۶۱/۳۶ درصد است (سطح زیر منحنی: ۰/۶۱۹، P=0.053 و۹۵٪ CI=0.4995-0.7396) (شکل شمارهٔ ۴).



شکل شماره ۲. مقایسهٔ تغییرات نسبی بیان mir-23a-3p در میان گروه‌های پژوهش نشان‌دهندهٔ کاهش نسبی بیان ژن در بیماران مبتلا به سقط مکرر در مقایسه با زنانی با سابقهٔ RIF و گروه کنترل است.



شکل شماره ۳. ارزش تشخیصی miR-23a-3p به‌عنوان بیومارکرهای تشخیصی غیرتهاجمی برای تشخیص بیماران مبتلا به سقط‌های مکرر با استفاده از ترسیم منحنی ROC



شکل شمارهٔ ٤. ارزش تشخیصی miR-23a-3p به‌عنوان بیومارکرهای تشخیصی غیرتهاجمی برای تشخیص زنانی با سابقهٔ لانه‌گزینی ناموفق با استفاده از ترسیم منحنی ROC

بحث و نتیجه‌گیری

علی‌رغم پیشرفت‌های چشمگیر در زمینهٔ تشخیص و درمان موارد سقط و ناباروری، هنوز علل برخی از موارد سقط و ناباروری ناشناخته مانده است. در سال‌های اخیر، با روشن شدن نقش تنظیمی miRNAها در فرایندهای سلولی، مطالعات روزافزونی در حال انجام است. نقش miRNAهای تنظیمی در تنظیم فرایندها، به‌صورت مهار و یا القای بیان ژن‌ها است (۱۵). miRNAها به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های پس از ترجمهٔ بیان ژن، در بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی مانند لانه‌گزینی و بارداری نیز نقش حیاتی دارند (۱۴). در بارداری، بیان

miRNAها در خون مادر و جفت به‌عنوان یک عامل اپی‌ژنتیکی، نقش مهمی در رشد و تمایز و نمو جنین دارد؛ بنابراین، ما به شناسایی عوامل خطر جدید منجر به سقط و یا شکست لانه‌گزینی علاقه‌مند شدیم. شناسایی miRNAها به‌عنوان بیومارکرهای غیرتهاجمی تشخیصی رویکرد جدیدی را به‌منظور تشخیص و درمان مبتنی بر miRNAها در موارد اختلالات تولیدمثلی نظیر سقط مکرر و لانه‌گزینی ناموفق موردتوجه بیشتر محققان همانند دیگر بیماری‌ها مانند بیماری قلبی و عروقی، سرطان هم هست (۱۶).

طی مطالعات صورت‌گرفته در تحقیق حاضر، تغییرات سطح بیان miR-23a-3p در خون زنان با سابقهٔ سقط مکرر و همچنین زنان با سابقهٔ لانه‌گزینی ناموفق در مقایسه با افراد با بارداری طبیعی تأییدشده است. در این مطالعه که میزان بیان miR-23a-3p توسط تکنیک Real Time PCR در سه گروه بررسی شد که علی‌رغم کاهش بیان در دو گروه سقط و زنان با سابقهٔ لانه‌گزینی ناموفق، نسبت به گروه باردار طبیعی، این کاهش معنی‌دار نبود؛ بنابراین، miR-23a-3p قابلیت بیوماکری در موارد تشخیص غیرتهاجمی اختلالات سقط را ندارد؛ اما در گروه زنان با سابقهٔ لانه‌گزینی ناموفق می‌تواند به‌عنوان بیومارکر متوسط در نظر گرفته شود. همسو با تحقیق حاضر، مطالعاتی انجام‌گرفته است که در ادامه به‌اختصار اشاره خواهد شد.

یکی از مطالعات همسو با مطالعهٔ ما را یانگ و همکاران در سال ۲۰۱۸، با عنوان ارتباط سطح miRNAهای خون محیطی در زنان با سقط مکرر و زنان نابارور با لانه‌گزینی ناموفق مکرر انجام دادند. این پژوهش نشان داد که miR-23a-3p در سرم زنان با سابقهٔ سقط مکرر و زنان نابارور کاهش بیان داشته است؛ همچنین آنان ثابت کردند که سطح سرمی اندک miR-23a-3p با شکست لانه‌گزینی مرتبط است که این اختلاف نیز مشابه نتایج ما، معنی‌دار نبود (۱۷).

در مطالعه‌ای که کیم و همکاران در سال ۲۰۱۹ روی موش انجام دادند، سطح بیان miR-23a-3p در بلاستوسیست‌های لانه‌گزینی‌شدهٔ در حال رشد را با بلاستوسیست‌هایی که لانه‌گزینی نکرده و رشد آن‌ها متوقف شده بود، مقایسه کردند و به این نتیجه رسیدند که در مرحلهٔ تکامل پیش از لانه‌گزینی رویان، میزان بیان miR-23a-3p به‌طور قابل‌توجهی افزایش بیان داشت که این نتایج نیز همسو با نتایج تحقیق ما بود (۱۸). در مطالعه‌ای که رومادنیکوا و همکاران در سال ۲۰۲۳ انجام دادند، به بررسی نقش miRNAهای مرتبط با بیماری‌های قلبی-عروقی برای پیش‌بینی وقوع سقط‌های مکرر در افراد باسابقه پرداخته شد. نتایج این مطالعه همسو با نتایج تحقیق حاضر و نشان‌دهندهٔ ارتباط معنی‌داری میان افزایش یا کاهش بیان miRNAهای بررسی‌شده با بروز سقط در افراد بود (۱۹).

مطالعهٔ حاضر همانند همهٔ مطالعات با محدودیت‌هایی مواجه بود که مشکلات در تأمین مواد و کیت‌های استفاده‌شده با توجه به شرایط موجود از محدودیت‌های اصلی آن است.

با آنالیز نتایج به‌دست‌آمده از qPCR، با توجه به کاهش بیان در هر دو گروه بیماران سقط مکرر و زنان با سابقهٔ لانه‌گزینی ناموفق در مقایسه با زنان باردار سالم و همچنین با توجه به مقادیر سطح زیر منحنی نمودار ROC، miR-23a3p به‌عنوان بیومارکر برای تشخیص غیرتهاجمی سقط‌های مکرر توصیه نمی‌شود؛ اما در زنان با سابقهٔ لانه‌گزینی ناموفق بیومارکر متوسطی در نظر گرفته می‌شود. پیشنهاد می‌گردد این مطالعه در مقیاس بزرگ‌تر و در نقاط جغرافیایی متفاوت، تعداد نمونهٔ بیشتر و همچنین تکنیک‌های پیشرفته‌تر نظیر ریزآریه و... انجام پذیرد.

سپاس‌گزاری

از همهٔ افراد شرکت‌کننده در طرح و همچنین از ریاست محترم و کارکنان مرکز درمان ناباروری تبریز کمال تشکر را داریم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافعی وجود ندارد.

کد اخلاق

IR.IAU.TABRIZ.REC.1398.093

References

1. Tomkiewicz J, Darmochwal D. The Diagnostics and Treatmet of Recurrent pregnancy lose. Clin Med 2023; 12: 47-68. doi:10.3390/jcm12144768.
2. Stephenson M, Awartani K, Robinson W. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. Hum Reprod 2002; 17:446-51. doi: 10.1093/humrep/17.2.446.
3. Hyde KJ, Schust DJ. Genetic considerations in recurrent pregnancy loss. Cold Spring Harb Perspect Med 2015;5: a023119. doi: 10.1101/cshperspect. a023119.
4. Brugo-Olmedo S, Chillik C, Kopelman S. Definition and causes of infertility. Reprod Biomed Online 2001; 2:41-53. doi: 10.1016/s1472-6483(10)62187-6.
5. Benkhalifa M, Demirol A, Sari T, Balashova E, Tsouroupaki M, Giakoumakis Y. Autologous embryo-cumulus cells co-culture and blastocyst transfer in repeated implantation failures: a collaborative prospective randomized study. Zygote 2012; 20: 173-80. doi: 10.1017/S0967199411000062.
6. Coughlan C, Ledger W, Wang Q, Liu F, Demirol A, Gurgan T, et al. Recurrent implantation failure: definition and management. Reprod Biomed Online 2014; 28: 14-38. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.08.011.
7. Tur-Torres M, Alijotas-Reig J. Genetics of recurrent miscarriage and fetal loss. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2017; 42: 11-25. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2017.03.007.
8. Rinehart J. Recurrent implantation failure: definition. J Assist Report Genet 2007; 24: 284-7. doi: 10.1007/s10815-007-9147-4.
9. Li H, Ge Q, Guo L, Lu Z. Maternal plasma miRNAs expression in preeclamptic pregnancies. Biomed Res Int 2013; 97: 1-9. doi: 10.1155/2013/970265.
10. Hosseini MK, Gunel T, Gumusoglu E, Benian A, Aydinli K. MicroRNA expression profiling in placenta and maternal plasma in early pregnancy loss. Mol Med Rep 2018; 17: 4941-52. doi: 10.3892/mmr.2018.8530.
11. Valian S, borujeni S, Kheradmand P. Bioligy, function and detection of microRNA. J Lab Diagnosis 1394; 28: 32-40.
12. Mattick JS, Makunin IV. Small regulatory RNAs in mammals. Hum Mol Genet 2005; 14: 121-32. doi: 10.1093/hmg/ddi101.
13. Godfrey TC, Wildman BJ, Beloti MM, Kemper AG, Ferraz EP, Roy B, et al. The microRNA- 23a cluster regulates the developmental HoxA cluster function during osteoblast differentiation. J Biol Chem 2018; 293: 17646-60. doi: 10.1074/jbc.RA118.003052.
14. Barchitta M, Maugeri A, Quattrocchi A, Agrifoglio O, Agodi A. The role of miRNAs as biomarkers for pregnancy outcomes: a comprehensive review. Int J Genomics 2017; 201:1-11. doi: 10.1155/2017/8067972.
15. An X, Ma H, Liu Y, Li F, Song Y, Li G, et al. Effects of miR-101-3p on goat granulosa cells in vitro and ovarian development in vivo via STC1. J Anim Sci Biotechnol 2020; 11: 102-10. doi:10.1186/s40104-020-00506-6.
16. Bartel D. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 2004; 116: 281-97. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.
17. Yang Q, Gu WW, Gu Y, Yan NN, Mao YY, Zhen X, et al. Association of the peripheral blood levels of circulating microRNAs with both recurrent miscarriage and the outcomes of embryo transfer in an in vitro fertilization process. J Transl Med 2018; 16:172-86. doi: 10.1186/s12967-018-1556-x.
18. Kim J, Lee J, Jun JH. Identification of differentially expressed microRNAs in outgrowth embryos compared with blastocysts and non-outgrowth embryos in mice. Reprod Fertil Dev 2019; 31: 645-57. doi: 10.1071/RD18161.
19. Hromadnikova I, Kotlabova K, Krofta L. First-Trimester Screening for Miscarriage or Stillbirth-Prediction Model Based on MicroRNA Biomarkers. Int J Mol Sci 2023; 24:10137. doi :10.3390/ ijms241210137.