شناسایی شبکه تنظیمی عمکردی miRNA-mRNA در سقط مکرر: آنالیز بیوانفورماتیکی پرزهای جفتی انسانی

یاس روحانی[1]، دکتر سمیه رئیسی[2*]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۲. دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۰۴ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۳/۱۰/۰۸

خلاصه

مقدمه: سقط خودبه‌خودی مکرر (RSA)، یک اختلال تولیدمثلی است که مسئله حل نشده‌ای را در زنان ایجاد می‌کند. miRNAها ممکن است در تنظیم رشد جنین و حفظ بارداری نقش داشته باشند. مطالعه حاضر با هدف بررسی پروفایل miRNA در پرز جفتی زنان با سقط مکرر با مطالعات بیوانفورماتیکی انجام شد.

روش‌کار: در این مطالعه، پروفایل بیانی mRNA و miRNA سلول‌های پرز جفتی از پایگاه GEO دریافت شدند. بعد از به‌دست آوردن هدف‌های miRNAهای دارای تغییر بیان، اشتراک این هدف‌ها با mRNAهای کاهشی/افزایشی به‌دست آمد. در مرحله بعد هویت‌شناسی ژنی (GO) و مسیرهای KEGG، برای ژن‌های مشترک انجام شد. شبکه میانکنش پروتئین- پروتئین و ژن‌های کلیدی مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت شبکه تنظیمی miRNA-mRNA رسم شد.

یافته‌ها: تعداد ۱۲۳ miRNA با تغییر بیان (۱۶ عدد کاهش بیان و ۱۰۷ عدد افزایش بیان) و ۶۷۰ ژن با تغییر بیان (شامل ۲۶۹ ژن کاهش بیان و ۳۶۶ ژن با افزایش بیان) آنالیز شدند. بعد از ایجاد اشتراک میان هدف‌های miRNAها و ژن‌های با تغییر بیان، ۲۱۹ ژن مشترک به‌دست آمد. نتایج آنالیز KEGG و GO نشان داد که ژن‌ها در مسیرهای پرولاکتین، اکسی‌توسین، تولید اینترلوکین ۶ و تمایز لوکوسیتی نقش دارند. همچنین در شبکه miRNA-mRNA ترسیم شده، miR-548ap-5p و miR-320b با بیشترین امتیاز مشخص شدند.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر miRNAها و mRNAهای دارای تغییر بیان و همچنین ژن‌های کلیدی در سلول‌های پرز جفتی با RSA را شناسایی کرد. این مطالعه می‌تواند مارکرهای زیستی جدیدی را برای تشخیص یا درمان احتمالی RSA پیشنهاد کند.

کلمات کلیدی: سقط خودبه‌خودی مکرر، شبکه miRNA-mRNA، مسیرهای پیام‌رسانی

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر سمیه رئیسی؛ دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. **تلفن:** ۰۳۸-۲۳۲۴۴۰؛ **پست الکترونیک:** s.reiisi@sku.ac.ir

مقدمه

سقط خودبه‌خودی مکرر (RSA)[1] یک اختلال تولیدمثلی است که مسئله حل نشده‌ای را در زمینه زنان و بارداری ایجاد می‌کند. RSA به‌عنوان از دست رفتن ۳ مورد یا بیشتر از بارداری‌ها به‌صورت خودبه‌خودی گفته می‌شود (۱). فراوانی این عارضه در زنان در سن باروری برابر با ۵-۱٪ است (۲). مطالعات مختلف مشخص کرده‌اند که عوامل مختلفی می‌توانند سبب RSA شود که شامل: سن بالای مادر، ناهنجاری‌های ژنتیکی ارثی، فاکتورهای آناتومیکی، عفونت‌ها و اختلالات غدد درون‌ریز هستند. با این وجود، در بیش از ۵۰٪ موارد، علت اختلال نامشخص است و به‌عنوان سقط جنین مکرر خودبه‌خودی غیرقابل توضیح[2] (URSA) دسته‌بندی می‌شوند (۳، ۴). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که نتایج منفی برای آزمایشات ژنتیک، نقص‌های آناتومیک، غدد درون‌ریز و ایمونولوژیک برای URSA در نظر گرفته می‌شود. پاتوژنز RSA پیچیده است، به‌دلیل عدم فهم در پاتوژنز RSA بدون دلیل، درمان آن به یک چالش مورد توجه در حوزه پزشکی تولیدمثل تبدیل شده است (۵). علاوه بر این در صورت عدم استفاده از روش‌های درمانی مؤثر، بیماری فشار و رنج زیادی بر فیزیولوژی و روان‌شناسی بیمار وارد می‌کند. بنابراین روشن کردن علت عارضه و مطالعات بالینی دقیق برای رفع این مسئله بسیار مهم است و یافتن فاکتورهای مؤثر در این مسیر می‌تواند بسیار مفید و کمک کننده باشد. یکی از بیومارکرهای مورد توجه در ناهنجاری‌های مختلف، RNAهای غیر کدکننده می‌باشند که قسمت عمده آنها را miRNAها تشکیل می‌دهند (۶).

miRNAها، توالی‌های RNAهای کوچک با طول ۲۵-۱۹ نوکلئوتید هستند که می‌توانند سرکوب پس از رونویسی ژن‌های کد کننده پروتئین را با اتصال به mRNAهای هدفشان هدایت کنند (۷). miRNAها به‌عنوان تنظیم کننده‌هایی مهم در انواع فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی از جمله تمایز، تکثیر، آپوپتوز، متابولیسم و تکوین، شناسایی شده‌اند. بیان نابه‌جای miRNA در بسیاری از فرآیندهای پاتولوژیک، منجر به بیماری‌های خوش‌خیم و بدخیم می‌شود (۸). در سال‌های اخیر، تحقیقات زیادی در خصوص نقش miRNAها در باروری و سقط جنین انجام شده است. برخی miRNAها در پرزهای جفتی زنان با سقط مکرر دچار تغییر معناداری شده‌اند و این نشان می‌دهد که miRNAها ممکن است در تنظیم رشد جنین و حفظ بارداری نقش داشته باشند. برای مثال سطح بیان miR-34a، miR-21 و miR-155 در جفت زنان با سقط مکرر در سه ماهه اول بارداری افزایش معناداری نشان داده است (۹). همچنین مطالعات، کاهش بیان miR-16 و let-7a را در آندومتر زنان با سقط مکرر گزارش داده‌اند (۱۰). بنابراین miRNAها می‌توانند نقش بالقوه برای تشخیص و یا ایجاد هدف‌های درمانی در سقط مکرر داشته باشند. در این جهت، مطالعه حاضر با هدف بررسی پروفایل miRNA در پرز جفتی زنان با سقط مکرر در مقایسه با زنان با بارداری طبیعی با کمک مطالعات بیوانفورماتیکی انجام شد. اطلاعات مورد نیاز از پایگاه داده GEO دریافت و پس از آنالیز، بررسی پروفایل به همراه ژن‌های هدف آنها انجام شد.

روش‌کار

جمع‌آوری داده

دو پروفایل بیانی جداگانه مربوط به نمونه‌های پرز جفتی افراد با سقط مکرر و زنان سالم از نظر بارداری با کدهای دسترسی GSE73025 و GSE22490 به‌ترتیب برای پروفایل miRNA و ژن از پایگاه داده GEO (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) دریافت شدند. داده‌های مورد بررسی برای miRNA شامل ۵ نمونه با سقط جنین و ۵ نمونه نرمال و داده‌های بیانی مربوط به ژن‌ها شامل ۴ نمونه جفتی در افراد با سقط مکرر و ۶ نمونه مربوط به افرد کنترل سالم بودند. معیارهای ورود به مطالعه شامل: افراد فاقد ناهنجاری رحمی، لوله فالوپ و انسداد بخش‌های مختلف رحمی و همچنین از

[1] Recurrent spontaneous abortion
[2] Unexplained recurrent spontaneous abortion

نظر کروموزومی دارای کاریوتایپ نرمال بودند. مطالعه حاضر در کمیته اخلاق دانشگاه شهرکرد مورد بررسی قرار گرفت و با کد IR.SKU.REC.1402.020 تصویب شد.

غربالگری miRNAها و ژن‌های با تغییر بیان در نمونه‌های پرز جفتی

به‌منظور آنالیز داده‌های miRNA و mRNA مربوط به پرز جفتی، از پکیج limma مربوط به نرم‌افزار R استفاده شد. در این روش، نرمال‌سازی توسط روش میانگین‌گیری چندآرایه‌ای قوی (RMA)[1] انجام می‌شود. علاوه بر این ژن‌های دارای تغییر بیان مربوط به داده mRNA (DEM) نیز با حد آستانه غربالگری، معناداری $p<۰/۰۵$ و $|logFC|>1$ بررسی شد. در نهایت نمودار آتشفشانی برای DEmiR و DEMها توسط بسته EnhancedVolcano از نرم‌افزار R رسم شد.

مشخص کردن ژن‌های هدف miRNAهای با تغییر بیان

بعد از تعیین DEmiRهای با تغییر بیان بالاتر و پایین‌تر از ۱، ژن‌های هدف آن‌ها مشخص شد. برای مشخص کردن ژن‌های هدف از بسته نرم‌افزار R به نام multiMiR استفاده شد. بسته multiMiR، یک بسته نرم‌افزاری برای پیش‌بینی هدف‌های miRNA با استفاده از داده‌های پیش‌بینی از ۸ پایگاه داده می‌باشد. این پایگاه‌های داده شامل: DIANA، EIMMO، MicroCosm، miRanda، miRDB، PicTar، PITA و TargetScan می‌باشند. علاوه بر این بسته نرم‌افزاری امکان جستجو در پایگاه‌های داده مربوط به اهداف اعتبارسنجی شده و مورد تأیید با روش‌های آزمایشگاهی را نیز فراهم می‌کند. این پایگاه‌های داده شامل miRecords، miRTarBase و TarBase می‌باشند. در مرحله بعد ژن‌های مشترک میان هدف-های به‌دست آمده برای miRNAها و ژن‌های موجود در گروه DEMها توسط نمودار ون مشخص و انتخاب شدند.

آنالیز غنی‌سازی ژن‌های مشترک

با استفاده از بسته clusterProfiler و پایگاه آنلاین Enr به‌ترتیب هویت‌شناسی ژنی (GO) و مسیرهای KEGG، برای ژن‌های مشترک میان ژن‌های هدف miRNAها و DEMها، مشخص شد. بسته clusterProfiler با استفاده از زبان برنامه‌نویسی R تحلیل GO شامل فرآیندهای بیولوژیکی، عملکردهای مولکولی و اجزای سلولی انجام می‌شود. پایگاه KOBAS، یک روش مبتنی بر یادگیری ماشین را ارائه داده است که به‌طور هوشمندانه، مسیرهای بیولوژیکی مربوطه را اولویت‌بندی می‌کند. در این پایگاه از ۵ پایگاه داده مسیر (KEGG Pathway، PID، BioCyc، Reactome، Panthe) و ۵ پایگاه داده انسانی (OMIM، KEGG Disease، FunDO، GAD، NHGRI GWAS) برای آنالیزها استفاده می‌شود. برای انجام این مسیر، ژن‌های مشترک به‌دست آمده در مرحله قبل به پایگاه داده وارد شدند و تحلیل‌های غنی‌سازی به‌دست آمد.

شبکه میانکنش پروتئین - پروتئین و بررسی ژن-های کلیدی

میانکنش پروتئین- پروتئین (PPI)[2] به میانکنش بین پروتئین‌ها در فرآیندهای بیولوژیکی اشاره می‌کند. هم‌چنین پایگاه داده STRING (the Retrieval of Interacting Genes, https://string-db.org/) یک ابزار مبتنی بر وب است که برای ارزیابی اطلاعات شبکه PPI به‌کار گرفته می‌شود. به‌همین منظور، ابتدا ژن‌های مشترک به‌دست آمده در مرحله قبل در سایت STRING فراخوانی شده و سپس شبکه مربوطه با بکارگیری نرم‌افزار Cytoscape نسخه ۳,۹,۱ حاصل شد. در این راستا از افزونه CutoHabba در نرم‌افزار Cytoscape برای مشخص کردن ژن‌های کلیدی در شبکه با بالاترین امتیاز استفاده شد.

ساخت شبکه تنظیمی mRNA-miRNA

بعد از مشخص کردن ژن‌های مشترک میان DEM و هدف‌های miRNAها، با استفاده از نرم‌افزار

[1] Robust Multiarray Averaging

[2] Protein–protein interaction

Cytoscape نسخه ۳,۹,۱ شبکه تنظیمی mRNA-miRNA ساخته و مشاهده شد. سپس با استفاده از افزونه‌های نرم‌افزار miRNAهای با درجه بالای صد به‌عنوان miRNAهای کلیدی انتخاب شدند.

یافته‌ها

بررسی پروفایل‌های بیانی miRNA و mRNA در نمونه‌های سقط مکرر در مقایسه با فرد سالم

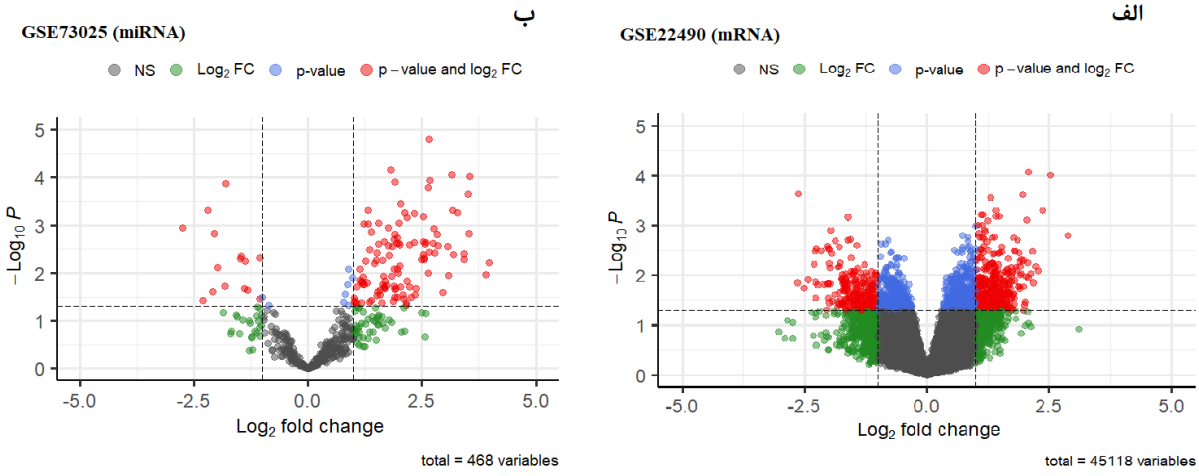
قبل از انجام فرآیند تجزیه و تحلیل تفرق بیان ژن و miRNA، بررسی کیفیت و نرمال‌سازی داده‌های بیانی (GSE73025 و GSE22490) انجام شد. به‌منظور بررسی کیفیت داده‌ها، میزان داده‌های با بیان بسیار پایین و نزدیک و مساوی با صفر در هر نمونه بررسی و سپس با فیلتر کردن داده‌ها، موارد مربوط به اینگونه داده‌ها حذف شدند. نرمال‌سازی داده‌ها با استفاده از روش‌های موجود در بسته limma انجام شد. با تجزیه و تحلیل داده‌های بیانی تصحیح شده و بر مبنای معیارهای معناداری $p<۰/۰۵$ و $|log2FC>1|$، برای داده‌های مربوط به GSE73025 تعداد ۱۲۳ miRNA با تغییر بیان غربالگری شد که ۱۶ عدد از آنها دارای کاهش بیان و ۱۰۷ عدد با افزایش بیان بودند. در خصوص داده‌های GSE22490، تعداد ۶۷۰ ژن با تغییر بیان تحلیل شدند که شامل ۲۶۹ ژن با کاهش بیان و ۳۶۶ ژن با افزایش بیان مشخص شدند. جدول ۱ تعداد ۲۰ miRNA و ژن با بیشترین تغییرات بیانی را در هر دو مجموعه داده نشان می‌دهد. علاوه بر این نمودارهای آتشفشانی در شکل ۱ برای داده‌های مدنظر رسم شد که در آن نقاط قرمز رنگ، موارد دارای تغییر بیان را نشان می‌دهد.

پیش‌بینی ژن‌های هدف miRNA

ژن‌های هدف miRNAهای دارای تغییر بیان توسط بسته multiMiR در نرم‌افزار R پیش‌بینی شدند. پیش‌بینی ژن‌های هدف برای miRNAهای دارای کاهش بیان و افزایش بیان به‌صورت جدگانه انجام شد. هدف‌های مشترک میان miRNAهای هر گروه مشخص شدند تا برای مرحله بعدی تحلیل استفاده شوند. در این بررسی تعداد ۶۲۳۲ هدف مربوط به miRNAهای دارای کاهش بیان و ۱۵۷۵۷ هدف مربوط به miRNAهای دارای افزایش بیان مشخص شد.

در مرحله بعد برای مشخص کردن ژن‌های درگیر در سقط مکرر، میان ژن‌های دارای تغییر بیان و هدف‌های به‌دست آمده در مرحله قبل، اشتراک انجام شد. شکل ۲ نمودارهای ون مربوط به این آنالیز را نشان می‌دهد. مشخص شد که بین ژن‌های دارای کاهش بیان و هدف‌های miRNAهای افزایش بیان، تعداد ۱۳۹ ژن مشترک وجود دارد و اشتراک میان ژن‌های با افزایش بیان و هدف‌های miRNAها با کاهش بیان، تعداد ۸۰ ژن را نشان می‌دهد.

الف

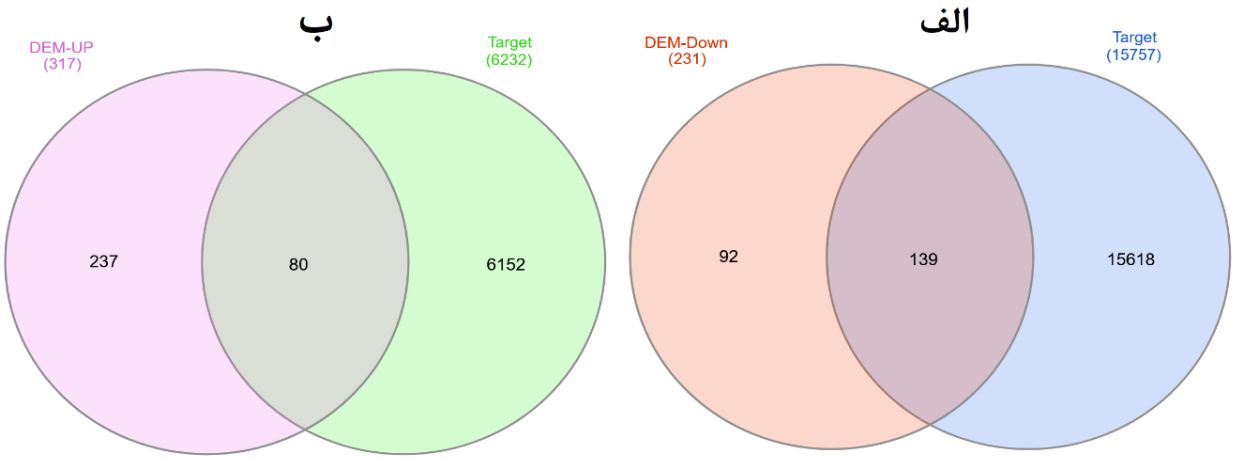


ب

شکل ۱- الف) نمودار آتش‌فشانی مربوط به آنالیز mRNA، ب)نمودار آتش‌فشانی مربوط به آنالیزهای miRNA. نقاط قرمز نشان‌دهنده ژن‌های با p-value کمتر از ۰/۰۵ و |log2FC>۱| هستند.

جدول ۱- لیست ۲۰ miRNA و mRNAهای دارای بالاترین تغییر بیان تحلیل شده در مطالعه

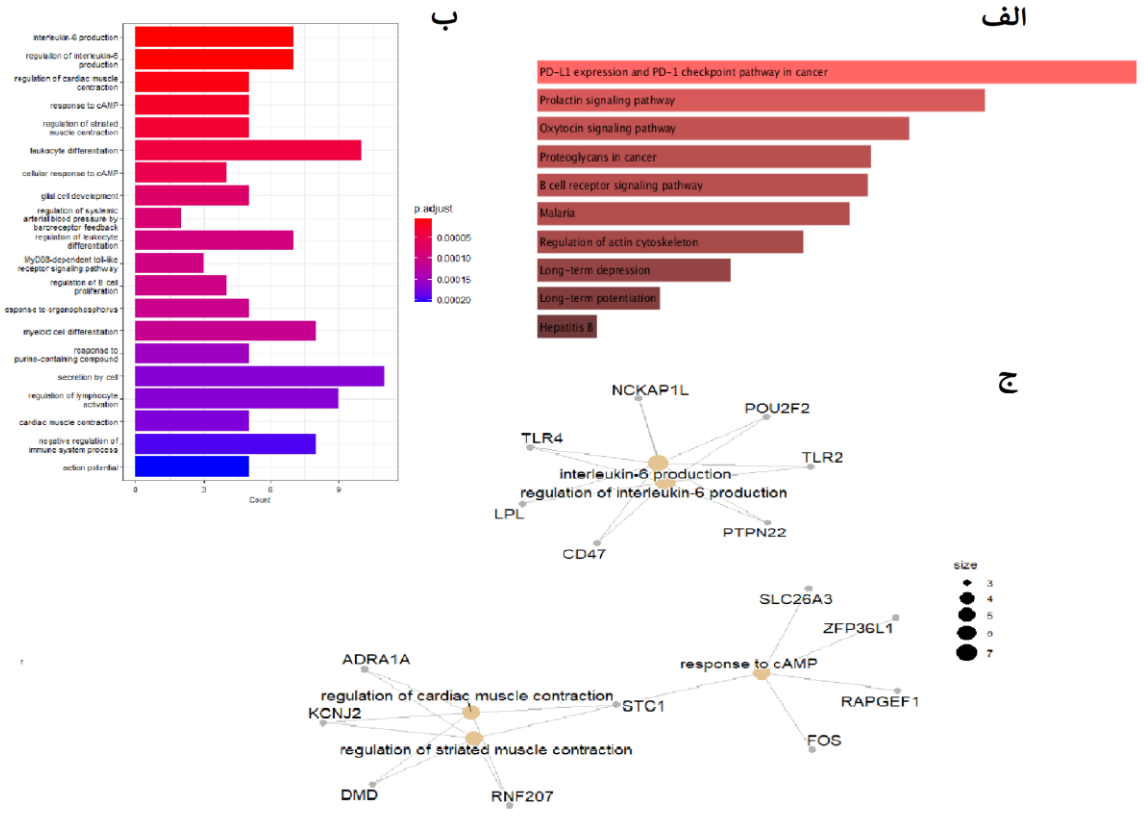
miRNAهای دارای تغییر بیان			ژن‌های دارای تغییر بیان		
miRNA name	LogFC	P.Value	mRNA name	LogFC	P.Value
hsa-miR-614	۲/۷۴۴۱۳-	۰/۰۰۱۱۴	LOC101927093	۲/۶۵۰۴۳-	۰/۰۱۴۰۴۷
hsa-miR-548aa	۲/۳۰۸۵۹-	۰/۰۳۷۷۱۲	SCN4B	۲/۶۲۵۷۵-	۰/۰۰۰۲۳۵
hsa-miR-5000-3p	۲/۰۸۲۵۶-	۰/۰۲۴۷۵۳	GNAL	۲/۵۲۲۷۹-	۰/۰۱۸۰۸۱
hsa-miR-4524b-5p	۲/۰۵۴۷۲-	۰/۰۰۱۵۱۹	GALNT5	۲/۴۲۷۶۸-	۰/۰۱۲۱۳۲
hsa-miR-24-1-5p	۱/۹۸۶۳۱-	۰/۰۰۷۷۷۶	TPM2	۲/۴۵۶۰۴-	۰/۰۰۲۸۳۸۷
hsa-miR-550a-3p	۱/۸۲۷۲۱-	۰/۰۱۹۰۴۹	RHBDL2	۲/۳۰۲۷۲-	۰/۰۰۵۸۸۹
hsa-miR-5100	۱/۸۱۶۸۲-	۰/۰۰۰۰۰۱	FOXP2	۲/۲۹۳۲۷-	۰/۰۰۳۳۵۷
hsa-miR-767-5p	۱/۸۱۱۳۹-	۰/۰۰۰۱۳۷	NRXN2	۲/۲۸۲۰۱-	۰/۰۲۸۸۶۵
hsa-miR-375	۱/۴۸۳۱۱-	۰/۰۰۵۰۸۸	SFRP5	۲/۲۷۲۸۸-	۰/۰۱۳۵۳
hsa-miR-3676-5p	۱/۴۷۲۰۶-	۰/۰۰۴۴۱۲	PITPNM2	۲/۲۵۷۰۵-	۰/۰۰۲۸۳۴
hsa-miR-4497	۴/۱۰۳۸۱۳	۰/۰۰۰۰۰۱	CXCL8	۲/۸۸۶۴۴۸	۰/۰۰۱۵۸
hsa-miR-4533	۳/۹۷۲۲۸۵	۰/۰۰۶۰۷۴	KCNJ11	۲/۵۲۴۴۳۸	۰/۰۰۰۰۰۱
hsa-miR-3133	۳/۸۹۶۰۱	۰/۰۱۰۹۷۷	AQP9	۲/۳۶۴۴۶۲	۰/۰۰۰۵۰۲
hsa-miR-149-3p	۳/۶۸۴۴۹۸	۰/۰۰۰۰۰۱	HLA-DRB4	۲/۲۶۲۴۹۲	۰/۰۰۸۲۱۲
hsa-miR-365a-3p	۳/۵۲۲۰۹۳	۰/۰۰۱۵۱۷	PENK	۲/۲۱۹۱۷۹	۰/۰۰۶۴۸۹
hsa-miR-1469	۳/۵۱۰۷۰۶	۰/۰۰۰۲۲۴	SFT2D3	۲/۱۷۶۷۲	۰/۰۱۳۸۶۳
hsa-miR-622	۳/۴۲۸۱۷۲	۰/۰۰۳۹۱۳	S100A8	۲/۱۵۲۶۳۱	۰/۰۰۳۳۰۸
hsa-miR-711	۳/۴۲۰۴۷۹	۰/۰۰۵۱۱۳	RNF212	۲/۱۱۶۶۶۶	۰/۰۰۹۲۵
hsa-miR-3149	۳/۲۷۳۷۱۲	۰/۰۰۰۵۳۸	LINC01503	۲/۰۸۲۷۲۷	۰/۰۱۱۵۷۲
hsa-miR-361-3p	۳/۱۹۶۵۶۹	۰/۰۰۴۱۰۸	FAM26F	۲/۰۸۱۷۱۸	۰/۰۰۰۰۰۱



شکل۲- نمودار Venn به‌منظور مشخص کردن ژن‌های مشترک میان ژن‌های هدف غربالگری شده و ژن‌های آنالیز شده. الف) دایره آبی رنگ، ژن‌های هدف miRNAهای آنالیز شده با افزایش بیان و رنگ قرمز، ژن‌های با تغییر بیان کاهشی در نمونه‌های پرز جفتی است. ب) دایره سبز رنگ، ژن‌های هدف miRNAهای آنالیز شده با کاهش بیان و دایره صورتی رنگ، ژن‌های با تغییر بیان افزایشی در نمونه‌های پرز جفتی است. قسمت‌های تیره ایجاد شده در بین دو دایره، نشان‌دهنده ژن‌های مشترک می‌باشد.

نتایج مربوط به غنی‌سازی ژنی

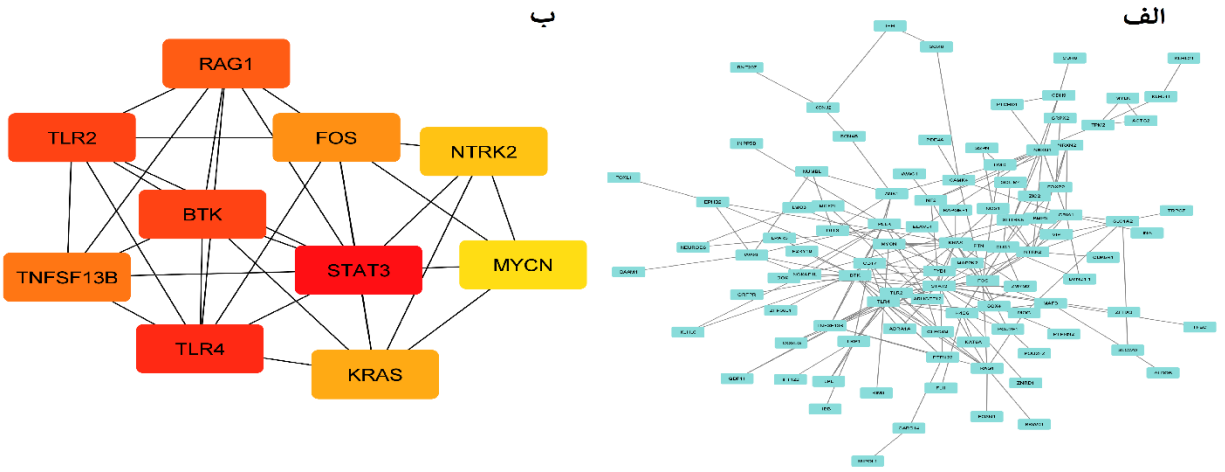
به‌منظور بررسی بیشتر ژن‌های مشترک بین ژن‌های هدف miRNAهای کاهشی/ افزایشی و ژن‌های دارای تغییر بیان (DEM)، آنالیز GO و مسیرهای پیام‌رسانی در پایگاه KEGG انجام شد. در این بررسی، مسیرهای با بالاترین امتیاز مشخص شدند. در خصوص ژن‌های مشترک میان هدف‌های miRNAها و DEMهای با تغییر بیان، مسیرهای پیام‌رسانی مشخص شده در پایگاه KEGG شامل مسیرهای پرولاکتین، اکسیتوسین، پروتئوگلیکان در سرطان، مسیر رسپتوری سلول B، تنظیم سایتواسکلتون اکتین و هپاتیت B با معناداری بالایی بودند (شکل ۳- الف). آنالیز GO در این ژن‌ها، مواردی مانند تولید اینترلوکین ۶ و تنظیم تولید آن، تنظیم انقباض در عضله قلبی، پاسخ به cAMP، تمایز لوکوسیتی، پاسخ سلولی به cAMP، تکوین سلول گلیال، تمایز سلولی میلوئیدی، تنظیم منفی فرآیندهای سیستم ایمنی و پتانسیل اکتین می‌باشد (شکل ۳- ب). برای مشخص شدن ارتباط میان مسیرها و ژن‌های وابسته به آن‌ها گراف cnetplot ترسیم شد (شکل ۳- ج). مطابق با نتایج این گراف، ژن‌های TLR2، TLR4، NCKAP1L، POU2F2 و PTPN22 با فرآیند تولید اینترلوکین ۶ و تنظیم تولید آن در ارتباط بودند. همچنین ژن‌های SLC26A3، FOS، ZFP36L1، RAPGEF1 با فرآیند پاسخ به cAMP و به‌صورت غیرمستقیم با تنظیم انقباض در عضله قلبی در ارتباط بودند.



شکل ۳- الف) مسیرهای KEGG ب) فرآیندهای GO مربوط به ژن‌های مشترک میان هدف‌های miRNAها و ژن‌های دارای تغییر بیان. ج) گراف cnetplot برای ارتباط میان ژن‌ها و فرآیندهای مهم در GO

شبکه میانکنش پروتئین- پروتئین و مشخص کردن ژن‌های کلیدی

با استفاده از پایگاه داده string، اطلاعات تعامل بین ژن‌های مشترک از طریق شبکه میانکنش پروتئین-پروتئین به‌دست آمد. شبکه رسم شده برای ژن‌های مشترک دارای ۲۱۱ گره و ۱۴۶ یال و درجه ۰/۳۹ بود. شبکه میانکنش ایجاد شده از پایگاه String دانلود و در نرم‌افزار Cytoscape فراخوانی و تجزیه و تحلیل شد (شکل ۴- الف). به منظور به‌دست آوردن ژن‌های کلیدی در شبکه، از افزونه CytoHabba در نرم‌افزار استفاده شد. در این نرم‌افزار از روش‌های مختلف برای مشخص کردن ژن‌های کلیدی استفاده می‌شود که در مطالعه حاضر از روش MCC[1] برای جداسازی ژن‌های کلیدی استفاده شد. این روش دارای دقت مناسبی برای مشخص کردن پروتئین‌های ضروری بر اساس بیشترین مرکزیت در شبکه می‌باشد و آن‌ها را بر اساس بالاترین امتیاز مشخص می‌کند (شکل ۴- ب). مطابق با نتایج به‌دست آمده، ژن‌های کلیدی شامل STAT3، TNFSF13B، RAG1، BTK، TLR2، TLR4، FOS، KRAS، NTRK2، MYCN بودند.

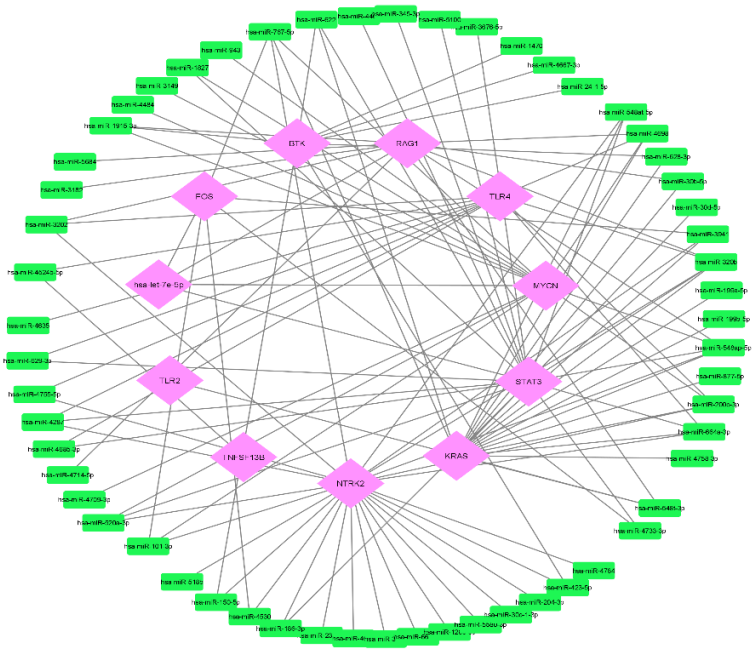


شکل ۴- الف) شبکه PPI مربوط به ژن‌های مشترک به‌دست آمده در مطالعه. ب) ژن‌های کلیدی گزینش شده در مطالعه که توسط افزونه CytoHabba مشخص شده‌اند. ژن‌های کلیدی بر اساس امتیاز از بالاترین امتیاز (رنگ قرمز) تا پایین‌ترین امتیاز (رنگ زرد) مشخص شده‌اند.

شبکه تنظیمی mRNA-miRNA

در مرحله آخر برای مشخص شدن ارتباط میان ژن‌های کلیدی و miRNAهای دارای تغییر بیان، شبکه mRNA-miRNA توسط نرم‌افزار رسم شد. مطابق با نتایج به‌دست آمده از این شبکه، hsa-miR-548ap-5p و hsa-miR-320b دارای بیشترین درجات اتصالی در بین گره‌های شبکه بودند و هر کدام با ۵ ژن از میان ۱۰ ژن کلیدی، دارای تعامل بودند. در میان ژن‌های موجود در شبکه، NTRK2، STAT3 و KRAS دارای بیشترین امتیاز بوده و با تعداد زیادی از miRNAهای موجود در شبکه در ارتباط بودند.

[1] maximum clique centrality



شکل ۵- شبکه تنظیمی mRNA-miRNA که تعامل میان ژن‌های کلیدی و miRNAها را نشان می‌دهد.

بحث

در میان تمامی انواع دلایل RSA، دلایل شناخته شده مانند فاکتورهای ژنتیکی، فاکتورهای اندوکرین، ترومبوزیس، فاکتورهای ایمنی و ناهنجاری‌های ساختاری تنها ۵۰٪ از این علت‌ها را شامل می‌شود و هنوز ۵۰٪ علت‌ها ناشناخته مانده است. این احتمال وجود دارد که بیان ناهنجار ژن‌ها می‌تواند یکی از دلایل مهم برای سقط مکرر ناشناخته و همچنین نشانگر مهمی برای ناهنجاری‌های بارداری باشد. با وجود اینکه تشخیص علت سقط‌های مکرر ساده نیست، اما می‌تواند برای پزشک و بیمار مفید باشد؛ چراکه احتمال موفقیت‌آمیز بودن بارداری بعدی را افزایش می‌دهد. بنابراین یافتن فاکتورهای مؤثر در این مسیر می‌تواند بسیار مفید و کمک‌کننده باشد. در مطالعه حاضر دو مارکر مهم ژن و miRNA با هم سنجیده شده و مسیرها و ژن‌های کلیدی استخراج شدند.

سقط مکرر (RM)[1] به معنای از دست دادن ۳ مورد یا بیشتر بارداری متوالی قبل از هفته بیستم بارداری است و تقریباً ۱٪ از زوجین را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۱).

عوامل مختلفی مانند نقص‌های رحمی، ناهنجاری‌های کروموزومی و اختلالات ایمنی در این پدیده نقش دارند. التهاب نیز می‌تواند بر بیوژنز miRNA تأثیر بگذارد. RNAهای مشتق از جفت در پلاسما مادر شناسایی می‌شوند که امکان پروفایل‌سازی بیان ژن جفت را فراهم می‌آورد. miRNAهای جنینی اطلاعات ارزشمندی درباره سلامت جنین ارائه می‌دهند و به تشخیص پیش از زایمان کمک می‌کنند (۱۲). این یافته‌ها نشان می‌دهند که miRNAها نقش حیاتی در تنظیم بیان ژن‌های کلیدی ایفا می‌کنند و ارتباط قوی آن‌ها با ژن‌های کلیدی ممکن است به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اصلی در فرآیندهای بیولوژیکی عمل کند. miRNAها نقش‌های مهمی در تنظیم فرآیندهای بیولوژیکی مانند توسعه، تمایز سلولی و آپوتوز ایفا می‌کنند و همچنین در طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله سرطان، اختلالات مغزی، ناباروری و سقط مکرر دخالت دارند. این مولکول‌ها به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی در مسیرهای بیولوژیکی و بیماری‌های انسانی شناخته شده‌اند (۱۳).

طبق مطالعات قبلی، محققین به نقش پلی‌مورفیسم‌های miR-149T ،miR-146aC > G (rs2910164)

[1] Recurrent miscarriage

miR-(rs11614913) ،(rs2292832)> C
196a2T > C و miR-499A > G (rs3746444)
در سقط‌ها پرداختند. این miRNAها بر اساس ژن‌های هدف آن‌ها انتخاب شده بودند. FAS برای miR-146a، E2F1 برای miR-149، HOXB8 برای miR-196a2 و SOX6 برای miR-499. FAS به‌عنوان یک عامل القاء کننده آپوتوز شناخته شده است؛ E2F1 پیشرفت چرخه سلولی را تنظیم می‌کند؛ HOXB8 در سرکوب تمایز مایلوئید دخالت دارد؛ و SOX6 با ترانس سرکشن فاکتور رشد فیبروبلاست ۳ (FGF-3) مرتبط است که رشد سلول را ترویج می‌کند (۱۱).

در مطالعه پاترونیا و همکاران (۲۰۲۴) که سقط‌های مکرر ایدیوپاتیک و همبستگی بیان miRNAها با این نوع سقط بررسی شد، نشان داده شد که عدم تنظیم این miRNAها به شدت با سقط‌های مکرر مرتبط است. miRNAهای در گردش مانند miR-100-5p و let-7c ممکن است به‌عنوان بیومارکرهای غیرتهاجمی برای پیش‌بینی و تشخیص سقط‌های مکرر عمل کنند. همچنین، در زنان با شکست کاشت مکرر، افزایش بیان miR-22، miR-145 و miR-31 نسبت به زنان با بارداری‌های سالم مشاهده شد. برخی miRNAها مانند miR-184 و miR-100-5p در بیماران مبتلا به سقط مکرر افزایش یافتند، در حالی که miR-126 کاهش معناداری نشان داد. این تغییرات بیان miRNAها می‌تواند به درک بهتر از پاتولوژی‌های سیستم تولید مثل کمک کند (۱۰).

مطالعه جئون و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که پلی‌مورفیسم‌های miRNA (miR-146aC>G، miR-149T>C، miR-196a2T>C و miR-499A>G) با سقط خودبه‌خودی در بیماران کره‌ای مرتبط است و miRNAهای در گردش به‌عنوان بیومارکرهای تشخیصی برای سقط‌های خودبه‌خودی ناشناخته تأیید شدند (۱۴).

نقص در فرآیند آنژیوژنز، یکی از علل احتمالی سقط است، زیرا کاهش تأمین مواد مغذی به جنین می‌تواند منجر به سقط شود. در مطالعه کرمی و همکاران (۲۰۱۸) miRNAهای ۱۶ و ۲۱ به‌عنوان مهم‌ترین miRNAهای مرتبط با آنژیوژنز شناخته شدند. نتایج مطالعه مذکور نشان داد که miR-21 تغییرات معناداری را در نمونه‌های پلاسما و سلول‌های تک‌هسته‌ای محیطی نشان می‌دهد که ممکن است با علت‌شناسی و پیشرفت سقط مکرر مرتبط باشد (۱۵).

در مطالعه حاضر، ابتدا مجموعه داده GSE73025 برای شناسایی miRNAهای دارای تغییر بیان مورد تحلیل قرار گرفت. در این آنالیز، تعداد قابل توجهی از miRNAهای با تغییر بیان معنادار شناسایی شدند. به‌طور جداگانه، ژن‌های هدف miRNAهای با کاهش و افزایش بیان پیش‌بینی شدند که به محققان کمک می‌کند تأثیرات مختلف این miRNAها را بر ژن‌های هدف شناسایی کنند. در مجموع، ۶۲۳۲ هدف برای miRNAهای با کاهش بیان و ۱۵۷۵۷ هدف برای miRNAهای با افزایش بیان شناسایی شد که نشان‌دهنده پیچیدگی شبکه‌های تنظیمی مرتبط با miRNAها است. همچنین، آنالیز مجموعه داده GSE22490 برای شناسایی ژن‌های درگیر در سقط مکرر انجام شد و نتایج نشان داد که ۱۳۹ ژن مشترک بین ژن‌های دارای کاهش بیان و اهداف با افزایش بیان وجود دارد. همچنین، ۸۰ ژن مشترک بین ژن‌های با افزایش بیان و اهداف miRNAها با کاهش بیان شناسایی شد. این یافته‌ها می‌توانند به درک بهتر نقش miRNAها در سقط مکرر کمک کنند و راهکارهای جدیدی برای درمان یا پیشگیری از این مشکل ارائه دهند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که miRNAها نقش حیاتی در تنظیم بیان ژن‌های کلیدی ایفا می‌کنند. ارتباط قوی بین hsa-miR-548ap-5p و hsa-miR-320b با چندین ژن کلیدی نشان‌دهنده این است که این miRNAها ممکن است به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اصلی در فرآیندهای بیولوژیکی مرتبط با این ژن‌ها عمل کنند. در نهایت، ارتباط قوی بین miRNAها و ژن‌های کلیدی مانند NTRK2، STAT3 و KRAS نشان‌دهنده اهمیت آن‌ها در فرآیندهای سیگنالینگ و توسعه بیماری‌ها است. این تحلیل شبکه‌ای به ما کمک می‌کند تا تعاملات مولکولی

را بهتر درک کنیم و پتانسیل استفاده از miRNAها به‌عنوان بیومارکرها یا اهداف درمانی را بررسی کنیم.

مسیرهای پیام‌رسان مختلفی ممکن است در سقط خودبه‌خودی نقش داشته باشند. یکی از این مسیرها، مسیر JAK-STAT است. سیتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد، JAKها را فعال کرده و به فراخور آن STATها هم فسفریله می‌شوند و نقش مهمی را در رشد سلول، تمایز و مهاجرت سلول‌ها ایفا می‌کنند. STAT3 یکی از ژن‌های این مسیر می‌باشد که کاهش بیان این ژن در تهاجم تروفوبلاست و بیان و فعالیت اسیدامینه‌ها در آزمایشگاهی نقش دارد، اما هنوز نقش آن در نمونه‌های انسانی نیازمند مطالعات بیشتر است (۱۶). پروتئین این ژن نقش میانجی‌گری را در پاسخ به تحریک‌های محیطی بازی می‌کند. مسیر مورد مطالعه بعدی مربوط به هورمون اکسی‌توسین (OT) می‌باشد. گیرنده‌های اکسی‌توسین در چندین قسمت بدن از جمله تخمدان‌ها بیان می‌شوند. اکثر مطالعات حاکی از آن است که سطوح پایه OT در زنان PCOS با کاهش سطح سرمی OT همراه است. می‌توان حدس زد که OT در همکاری با FSH برای ارتقاء رشد فولیکولی به سمت تخمک‌گذاری و سطوح پایین OT در PCOS عمل می‌کند که همراه با سطوح پایین FSH ممکن است به عدم تخمک‌گذاری که نوعی PCOS است، کمک کند. تداخل احتمالی دیگر بین سطوح OT و افزایش LH تخمک‌گذاری رخ می‌دهد که نشان‌دهنده هم‌افزایی در تخمک‌گذاری است. این همچنین ممکن است توضیح دهد که چرا موارد PCOS که سطوح پایین OT دارند، نرخ طبیعی تخمک‌گذاری ندارند (۱۷). مسیر سیگنالینگ cAMP مسیر بعدی است که از دو طریق مورد بررسی قرار می‌گیرد. به‌طور خلاصه، تشکیل دسیدوا شامل تمایز مورفولوژیکی و عملکردی سلول‌های استرومایی آندومتر انسان و همچنین سلول‌های ایمنی آندومتر است که به نوبه خود، بازسازی ماتریکس خارج سلولی، رگ‌زایی، تقویت تحمل ایمنی و تهاجم بافت را تنظیم می‌کند. این فرآیندهای پیچیده عمدتاً توسط پروژسترون تنظیم می‌شوند که به‌طور هم‌افزایی با آدنوزین مونوفسفات حلقوی (cAMP) عمل می‌کند و الگوهای بیان چندین پروتئین تنظیم کننده اصلی و فاکتورهای رونویسی را کنترل می‌کند، از جمله homeobox A10، FOXO1، مبدل‌های سیگنال و فعال‌کننده‌های رونویسی (STAT) و مشتقات قلب و تاج عصبی رونوشت ۲ (HAND2) را تنظیم می‌کنند. این مولکول‌ها یک شبکه گیج کننده ایجاد می‌کنند که برای جداسازی مناسب و در نتیجه برای کاشت موفق جنین ضروری است (۱۸، ۱۹).

سیتوکاین‌ها و کموکاین‌ها خصوصاً اینترلوکین‌ها که بخش مهمی از ریزمحیط رحم را ایجاد می‌کنند، ارتباط بین جنین و مادر را شکل می‌دهند. اینترلوکین‌ها (IL) به‌طور قابل توجهی بر روند لانه‌گزینی جنین، از تشکیل دسیدوا و پذیرش جنین تا تهاجم تروفوبلاست و تشکیل جفت تأثیر می‌گذارند (۲۰). تولید غیرطبیعی IL ممکن است بر لانه‌گزینی تأثیر مخربی بگذارد، علی رغم اینکه جنین‌ها از کیفیت خوب و پویایی رشد بالایی برخوردار باشند، که متعاقباً منجر به سقط مکرر می‌شود. این مشخصات غیرطبیعی ایمنی آندومتر با وجود سطوح بالایی از سایتوکین‌های پیش‌التهابی مشخص می‌شود که ناشی از اختلال در تعادل زیرگروه‌های غیرطبیعی سلول‌های ایمنی با سیتوتوکسیک بالا و کاهش عناصر سلولی تنظیم‌کننده است. رویداد مولکولی شبیه رد پیوند آلوی ایمنی در صورت آسیب دیدن ریزمحیط ایمنی آندومتر سیتوتوکسیک می‌شود و منجر به رد جنین و نارسایی حاملگی می‌شود. با این‌حال، نقش دقیق ILها در پاتوفیزیولوژی سقط مکرر به‌خوبی درک نشده و هنوز قابل بحث است (۲۱). سیتوکین‌ها برای استقرار و پایداری بارداری ضروری هستند و نقش‌های تنظیم کننده ایمنی حیاتی از تشکیل دسیدو و جفت تا القای زایمان را ایفا می‌کنند. به‌نظر می‌رسد که سیتوکین‌ها، تعادل ایمونولوژیک بین پاسخ‌های التهابی و ضدالتهابی را تنظیم می‌کنند و برای ایجاد تحمل مادر نسبت به جنین نیمه‌آلوژنیک و همچنین برای محافظت از مادر و جنین از عفونت‌ها در طول بارداری لازم هستند (۲۲، ۲۳). اینترلوکین ۶ (IL-6) یک سیتوکین چند

عملکردی است که در تنظیم پاسخ‌های ایمنی و التهاب نقش دارد. IL-6 باعث تمایز سلول‌های B و تکثیر سلول‌های T می‌شود (۲۴). در بررسی رابطه بین بیان IL-6 در بافت‌های آندومتر انسان در مورد از دست دادن بارداری مکرر با علت غیرقابل توضیح، نشان داده شد که افزایش بیان این اینترلوکین نقشی در پاتوژنز بیماری داشته باشد (۲۵). IL-6 یک سیتوکین است که اثر پلیوتروپیک بر تمایز سلول‌های T دارد و نقش مهمی در پاسخ التهابی دارد. منابع اولیه تولید آن ماکروفاژها، لنفوسیت‌های T و مونوسیت‌ها هستند و بیان ژن آن در بافت‌های آندومتر انسان مشاهده می‌شود (۲۶). در طول دوره لانه‌گزینی و قاعدگی، سطوح تولید IL-6 بالاترین میزان است و برعکس در مرحله تکثیر، میزان آن نسبتاً پایین است و در تمام فاز ترشحی ثابت می‌ماند (۲۷).

تمایز لکوسیتی، مسیر بعدی در روند سقط مکرر می‌باشد. سقط مکرر، به‌ویژه سقط مکرر غیرقابل توضیح، با اختلال در تحمل ایمنی مادر همراه است (۲۸). در زنان با سقط مکرر، فرکانس کل ماکروفاژهای CCR2−CD11 افزایش می‌یابد، در حالی که سلول‌های کشنده طبیعی و ماکروفاژهای CCR2 و CCR2−CD11 به‌طور قابل‌توجهی در آنها در مقایسه با گروه شاهد کاهش می‌یابد. با این‌حال، سلول‌های کشنده طبیعی و T CD8 + تنها در سقط مکرر با کروموزوم طبیعی افزایش یافته، در حالی که سلول‌های T + CD4 غیرفعال و ساده تنها در سقط مکرر با انحرافات کروموزومی غنی شدند. التهاب در دسیدوای افراد با سقط مکرر مشاهده می‌شود. با این‌حال، تفاوت مشخصی بین سقط مکرر با و بدون ناهنجاری‌های کروموزومی وجود دارد (۲۹). مشاهده شده است که در زنان با سقط مکرر غیرقابل توضیح با سن کمتر از ۳۵ سال، نسبت آنوپلوئیدی بلاستوسیست افزایش یافته است، اما میزان سقط جنین بالینی زمانی که جنین‌های اوپلوئید با آزمایش ژنتیکی قبل از لانه‌گزینی (PGT) منتقل می‌شود، بیشتر از زنان مبتلا برای نقص‌های تک‌ژنی است. در زنان بالای ۳۵ سال، میزان آنوپلوئیدی نه در جنین و نه در بلاستوسیت تفاوت معنی‌داری بین سقط جنین پراکنده و سقط مکرر یا سقط مکرر ایدیوپاتیک ندارد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ناهنجاری‌های کروموزومی جنینی تنها علت سقط مکرر نیستند و صرف‌نظر از سن زنان ممکن است رخ دهند.

برای سال‌ها حدس زده می‌شد که نقص در پاسخ ایمنی مادر به پیوند نیمه‌آلوژنیک جنین می‌تواند در مکانیسم سقط مکرر دخیل باشد. ایمن‌سازی زنان مبتلا به سقط مکرر با لکوسیت‌های پدری یا شخص ثالث، یا تزریق‌های مکرر گاماگلوبولین‌ها، قبل از بارداری بعدی، در تلاشی برای تکرار سازگاری بافتی متناقض والدین، برای حفظ بارداری، انجام شده است. با این وجود، تحقیقات حاکی از آن بوده که استفاده از ایمونوتراپی در زنان مبتلا به سقط مکرر هیچ سود قابل توجهی ندارد (۳۰، ۳۱).

همچنین آندومتر زنان غیر باردار با سابقه سقط مکرر حاوی نسبت زیادی از سلول‌های کشنده طبیعی رحم CD16+ و CD56 در مقایسه با زنان بارور طبیعی که سلول‌های کشنده طبیعی رحمی CD16- و CD56 در آنها غالب است. افزایش تعداد CD56+ سلول‌های کشنده طبیعی رحم نیز در آندومتر قبل از لانه‌گزینی در بیماران سقط مکرر در مقایسه با گروه شاهد یافت شد. علاوه بر این، لکوسیت‌های CD56+ در آندومتر بیمارانی که متعاقباً سقط جنین کردند نسبت به افرادی که زایمان زنده داشتند، بیشتر بود (۳۲).

با توجه به بررسی انجام شده، استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی و آنالیز داده‌های موجود در پایگاه داده ژنی می‌توانند به دست یافتن سریع و کم‌هزینه بیومارکرهای تشخیصی و یا درمانی منجر شود، اما با این وجود، تأیید یا اعتبارسنجی چنین بیومارکرهایی ضروری بوده و هنوز نیازمند بررسی آزمایشگاهی است.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر در مجموع با هدف استفاده از ابزارها و روش‌های بیوانفورماتیکی برای شناسایی فاکتورهای مهم در شبکه تنظیمی عملکردی miRNA-mRNA

در پرزهای جفتی در ناهنجاری سقط مکرر بدون علت انجام شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از مطالعه، تعدادی از miRNAها و ژن‌های جدید مشخص شدند که می‌توان به‌عنوان بیومارکرهای تشخیصی برای ردیابی یا مشخص کردن دلایل مربوط به سقط مکرر از آنها استفاده کرد. با این وجود برای تأیید بیشتر نتایج مطالعه، بررسی آزمایشگاهی بیومارکرهای گزارش شده نیاز است و برای مطالعات بعدی پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد، بابت حمایت از اجرای این مطالعه تقدیر و تشکر می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

در این مطالعه از نمونه‌های انسانی و یا حیوانی استفاده نشده است و به‌صورت یک مطالعه بیوانفورماتیکی است. ملاحظات اخلاقی و استانداردهای عمومی برای انتشار مقاله، از جمله اجتناب از سرقت ادبی، جعل، ساخت داده‌ها یا تحریف داده‌ها و عدم ارسال همزمان مقاله به چندین مجله، به‌طور کامل توسط نویسندگان رعایت شده است.

حمایت مالی

کمک مالی جهت آماده‌سازی این مطالعه، دریافت نشده است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی با هم ندارند.

مشارکت نویسندگان

نویسندگان مقاله در طراحی مطالعه، طراحی روش انجام تحلیل داده‌ها و نگارش مقاله، مشارکت داشته‌اند. همچنین متن کامل مقاله مورد تأیید نویسندگان است.

منابع

1. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. Fertility and sterility 2012; 98(5):1103-11.
2. Guo H, Gao H, Li J, Cong Y, Chen Q, Wang Y, et al. Impacts of medroxyprogesterone acetate on oocytes and embryos: matched case-control study in women with stage III–IV ovarian endometriosis undergoing controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. Annals of translational medicine 2020; 8(6).
3. Baek KH, Lee EJ, Kim YS. Recurrent pregnancy loss: the key potential mechanisms. Trends in molecular medicine 2007; 13(7):310-7.
4. El Hachem H, Crepaux V, May-Panloup P, Descamps P, Legendre G, Bouet PE. Recurrent pregnancy loss: current perspectives. International journal of women's health 2017: 331-45.
5. Sham AK, Yiu MG, Ho WY. Psychiatric morbidity following miscarriage in Hong Kong. General hospital psychiatry 2010; 32(3):284-93.
6. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, et al. miRNAs as biomarkers in disease: latest findings regarding their role in diagnosis and prognosis. Cells 2020; 9(2):276.
7. Li L, Peng M, Xue W, Fan Z, Wang T, Lian J, et al. Integrated analysis of dysregulated long non-coding RNAs/microRNAs/mRNAs in metastasis of lung adenocarcinoma. Journal of translational medicine 2018; 16:1-14.
8. Li Y, Kowdley KV. MicroRNAs in common human diseases. Genomics, Proteomics and Bioinformatics 2012; 10(5):246-53.
9. Li D, Li J. Association of miR-34a-3p/5p, miR-141-3p/5p, and miR-24 in decidual natural killer cells with unexplained recurrent spontaneous abortion. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research 2016; 22:922.
10. Patronia MM, Potiris A, Mavrogianni D, Drakaki E, Karampitsakos T, Machairoudias P, et al. The Expression of microRNAs and Their Involvement in Recurrent Pregnancy Loss. Journal of Clinical Medicine 2024; 13(12):3361.
11. Parveen F, Agrawal S. Recurrent miscarriage and micro-RNA among north Indian women. Reproductive Sciences 2015; 22(4):410-5.
12. Ladomery MR, Maddocks DG, Wilson ID. MicroRNAs: their discovery, biogenesis, function and potential use as biomarkers in non-invasive prenatal diagnostics. International journal of molecular epidemiology and genetics 2011; 2(3):253.

13. Kefas B, Godlewski J, Comeau L, Li Y, Abounader R, Hawkinson M, et al. microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. Cancer research 2008; 68(10):3566-72.
14. Jeon YJ, Choi YS, Rah H, Kim SY, Choi DH, Cha SH, et al. Association study of microRNA polymorphisms with risk of idiopathic recurrent spontaneous abortion in Korean women. Gene 2012; 494(2):168-73.
15. Karami N, Mirabutalebi SH, Montazeri F, Kalantar SM, Sheikhha MH, Eftekhar M. Aberrant expression of microRNAs 16 and 21 and gene targets in women with unexplained recurrent miscarriage: A case-control study. International journal of reproductive biomedicine 2018; 16(10):617.
16. Fang Y, Feng X, Xue N, Cao Y, Zhou P, Wei Z. STAT3 signaling pathway is involved in the pathogenesis of miscarriage. Placenta 2020; 101:30-8.
17. Cera N, Pinto J, Pignatelli D. The Role of Oxytocin in Polycystic Ovary Syndrome: A Systematic Review. Current Issues in Molecular Biology 2024; 46(6):5223-41.
18. Ng SW, Norwitz GA, Pavlicev M, Tilburgs T, Simón C, Norwitz ER. Endometrial decidualization: the primary driver of pregnancy health. International journal of molecular sciences 2020; 21(11):4092.
19. Gellersen B, Brosens IA, Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. InSeminars in reproductive medicine 2007; 25(06):445-453. © Thieme Medical Publishers.
20. Pantos K, Grigoriadis S, Maziotis E, Pistola K, Xystra P, Pantou A, et al. The role of interleukins in recurrent implantation failure: a comprehensive review of the literature. International journal of molecular sciences 2022; 23(4):2198.
21. Ma J, Gao W, Li D. Recurrent implantation failure: A comprehensive summary from etiology to treatment. Frontiers in Endocrinology 2023; 13:1061766.
22. Warning JC, McCracken SA, Morris JM. A balancing act: mechanisms by which the fetus avoids rejection by the maternal immune system. Reproduction 2011; 141(6):715-24.
23. Bert S, Ward EJ, Nadkarni S. Neutrophils in pregnancy: New insights into innate and adaptive immune regulation. Immunology 2021; 164(4):665-76.
24. Banerjee M, Saxena M. Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: role in type 2 diabetes. Clinica chimica acta 2012; 413(15-16):1163-70.
25. Papamitsou T, Toumpa O, Dimou T, Kavvadas D, Papanastasiou A, Anastasiadou P, et al. Immunohistochemical study of the immunological markers IL-1β and IL-6 in placental tissues in recurrent pregnancy loss. Archives of Hellenic Medicine/Arheia Ellenikes Iatrikes 2022; 39(6).
26. Tabibzadeh S, Sun XZ. Cytokine expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. Human Reproduction 1992; 7(9):1214-21.
27. Van Mourik MS, Macklon NS, Heijnen CJ. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. Journal of Leucocyte Biology 2009; 85(1):4-19.
28. Wu Z, Wang M, Liang G, Jin P, Wang P, Xu Y, et al. Pro-inflammatory signature in decidua of recurrent pregnancy loss regardless of embryonic chromosomal abnormalities. Frontiers in immunology 2021; 12:772729.
29. Alecsandru D, Klimczak AM, Velasco JA, Pirtea P, Franasiak JM. Immunologic causes and thrombophilia in recurrent pregnancy loss. Fertility and sterility 2021; 115(3):561-6.
30. Liu XY, Fan Q, Wang J, Li R, Xu Y, Guo J, et al. Higher chromosomal abnormality rate in blastocysts from young patients with idiopathic recurrent pregnancy loss. Fertility and Sterility 2020; 113(4):853-64.
31. Coomarasamy A, Dhillon-Smith RK, Papadopoulou A, Al-Memar M, Brewin J, Abrahams VM, et al. Recurrent miscarriage: evidence to accelerate action. The Lancet 2021; 397(10285):1675-82.
32. Garrido-Gimenez C, Alijotas-Reig J. Recurrent miscarriage: causes, evaluation and management. Postgraduate medical journal 2015; 91(1073):151-62.

Identification of a functional miRNA–mRNA regulatory network in recurrent miscarriage: bioinformatics analysis of human chorionic villi

Yass Rohani[1], Somayeh Raeisi[2*]

1. M.Sc. Student, Department of Genetics, School of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
2. Associate Professor, Department of Genetics, School of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

Received: Sep 25, 2024 **Accepted:** Dec 28, 2024

Abstract

Introduction: Recurrent spontaneous abortion (RSA) is a reproductive disorder that makes an unresolved issue in women. miRNAs may play a role in regulating embryonic growth and sustaining pregnancy. The present study was conducted with aim to investigate the miRNA profile in the chorionic villi of women with recurrent abortion using bioinformatics studies.

Methods: In this study, the expression profiles of mRNA and miRNA from chorionic villi cells were obtained from the GEO database. After identifying the differentially expressed miRNAs, the overlap between miRNA targets and the upregulated/downregulated mRNAs was determined. Gene Ontology (GO) analysis and KEGG pathways were then conducted for the overlapped genes. Protein-protein interaction networks and key genes were analyzed. Finally, the miRNA-mRNA regulatory network was constructed.

Results: A total of 123 miRNAs with differential expression (16 downregulated and 107 upregulated) and 670 genes with differential expression (including 269 downregulated and 366 upregulated) were analyzed. After making the overlap between the miRNA targets and differentially expressed genes, 219 overlap genes were identified. The results of KEGG and GO analysis indicated that these genes are involved in prolactin, oxytocin, B cell receptor pathways, interleukin-6 production processes, and leukocyte differentiation. Additionally, in the miRNA-mRNA network, miR-548ap-5p and miR-320b were identified with the highest scores.

Conclusion: The present study identified differentially expressed miRNAs and mRNAs, as well as key genes in the chorionic villi cells associated with RSA. This study may suggest new biomarkers for the potential diagnosis or treatment of RSA.

Keywords: miRNA-mRNA network, Recurrent spontaneous abortion (RSA), Signaling pathway

► **Please cite this article as:**
Rohani Y, Raeisi S. Identification of a functional miRNA–mRNA regulatory network in recurrent miscarriage: bioinformatics analysis of human chorionic villi. **Iran J Obstet Gynecol Infertil** 2024; 27(10):63-76. **DOI:** 10.22038/ijogi.2025.82344.6191