مقاله پژوهشی

کاهش بیان miRNA451 در آندومتر زنان مبتلا به اندومتریوزیس در فاز ترشحی رحم

سهیلا عباس‌زاده[۱]، صدیقه اسماعیل‌زاده[۲*]، زهرا بصیرت[۳]، پروانه میرابی[۴]،
حمیدرضا نوری[۵]، علی بیژنی[۶]، یاسمن نظری حق[۷]، ناصر شکرزاده[۸*]

تاریخ دریافت ۱۴۰۲/۰۲/۱۷ تاریخ پذیرش ۱۴۰۲/۱۰/۰۶

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: اندومتریوز یک بیماری مزمن و عودکننده اما خوش‌خیم در زنان سنین بارداری است که می‌تواند باعث ناباروری شود. برخی از مارکرهای ژنتیکی موجود در آندومتر در پاتوژنز اندومتریوز تأثیر کلیدی دارند. microRNA ها مولکول‌های کوچکی هستند که در چندین فرآیند بیولوژیکی نقش دارند. هدف از این مطالعه بررسی بیان microRNA ها ازجمله miRNA451 در فاز ترشحی بیماران مبتلا به اندومتریوز بود.

مواد و روش کار: مطالعه حاضر به‌صورت مورد-شاهدی انجام شد که ۲۰ خانم نابارور با اندومتریوز که توسط سونوگرافی یا لاپاراسکوپی یا لاپاراتومی و تشخیص بافت‌شناسی و حذف افراد با سایر علل ناباروری زنانه که به مرکز تحقیقات بهداشت باروری و ناباروری دانشگاه علوم پزشکی بابل و مرکز ناباروری فاطمه الزهرا بابل مراجعه کرده بودند، وارد مطالعه شدند و ۲۰ خانم سالم که ناباروری با عامل زنانه نداشتند به‌عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. سطوح بیان نسبی mir451 در آندومتر زنان در دو گروه با استفاده از Real-time PCR شناسایی شد.

یافته‌ها: میانگین سطح بیان mir451 در آندومتر گروه اندومتریوز ۰/۴۶۳۰۶ ± ۰/۷۱۷۴۰۰ و در گروه کنترل ۲.۱۱۶۲۱ ± ۳.۳۲۵۷۹ بود که در گروه اندومتریوز سطح بیان mir451 به‌طور قابل‌توجهی پایین‌تر از گروه کنترل ($P < 0.001$) بود.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه کاهش بیان mir451 را در گروه اندومتریوز نسبت به گروه کنترل نشان داد و ازلحاظ آماری معنادار بود که می‌تواند به‌عنوان یک عامل مولد یا نشان‌دهنده اندومتریوز موردبررسی قرار گیرد. بنابراین با انجام مطالعات بیشتر ممکن است بتوان از این microRNA ها به‌عنوان بیومارکرهای تشخیصی برای بیماران مبتلا به اندومتریوز استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: اندومتریوز، ناباروری، Mir451، Real-time PCR

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و چهارم، شماره دهم، ص ۵۸۵-۵۷۶، دی ۱۴۰۲

آدرس مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران. تلفن: ۰۹۱۱۱۱۴۱۵۷۷

Email: sesmael2010@gmail.com

مقدمه

عدم آمادگی رحم جهت پذیرش جنین مسئول تقریباً دوسوم نارسایی‌های لانه‌گزینی است (۱). از مواردی که کاهش لانه‌گزینی در آن‌ها دیده می‌شود، می‌توان تعدادی از بیماری‌های رحمی را نام برد که در آن‌ها کاهش ضخامت آندومتر، تغییر در بروز مولکول‌های دخیل در لانه‌گزینی و تغییرات عوامل ایمونولوژیک و در نتیجه کاهش پذیرندگی آندومتر می‌شوند، گزارش شده است (۲). ازجمله این بیماری‌ها می‌توان اندومتریوزیس را نام برد (۳، ۴). اندومتریوز یکی از شایع‌ترین بیماری‌های خوش‌خیم در خانم‌ها است و نوعی بیماری التهابی مزمن و وابسته به هورمون استروژن محسوب می‌گردد. گزارش شده است که اندومتریوزیس ۱۰ درصد از زنان در سن باروری در جهان (۱۹۰ میلیون) را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۵،

[۱] استادیار مرکز تحقیقات ناباروری و بهداشت باروری، بیمارستان فاطمه الزهرا، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران.
[۲] استاد مرکز تحقیقات ناباروری و بهداشت باروری، بیمارستان فاطمه الزهرا، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران (نویسنده مسئول)
[۳] استاد مرکز تحقیقات ناباروری و بهداشت باروری، بیمارستان فاطمه الزهرا، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
[۴] استادیار مرکز تحقیقات ناباروری و بهداشت باروری، بیمارستان فاطمه الزهرا، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
[۵] استادیار مرکز تحقیقات بیلوژی سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
[۶] دانشیار مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
[۷] کارشناسی ارشد گروه علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
[۸] استادیار مرکز تحقیقات بهداشت باروری، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

۶). ناباروری مرتبط با اندومتریوزیس به مکانیسم‌های مختلفی ازجمله اختلال در تخمک‌گذاری، نارسایی فاز لوتئال، سندرم پارگی فولیکول، سقط مکرر، و تغییرات در سیستم ایمنی و التهاب داخل صفاقی نسبت داده شده است (۷). با نگاه به مبنای مولکولی شکل‌گیری اندومتریوزیس و همچنین نارسایی لانه‌گزینی در این بیماران در ۱۰ سال گذشته مشاهده می‌گردد که بیان ژنی نامنظم و متغیری در طی دریچه لانه‌گزینی در زنان دچار این اختلال وجود دارد. به‌هرحال این تغییرات مولکولی به تحقیق بیشتر درباره چگونگی علل آن نیاز دارد.

در مطالعات نقش miRNAهای مختلف ازجمله miRNA451 در مرحله لانه‌گزینی جنین و همچنین تغییرات بیان این miRNA در محل لانه‌گزینی دیده شده است. بنابراین در بیمارانی که فرایند لانه‌گزینی با اختلال مواجه است، ازجمله در بیماران مبتلا به اندومتریوزیس، نیاز به بررسی این miRNA ها احساس می‌شود. miRNAها در پاتوژنز و پیشرفت اندومتریوز از طریق تعدیل التهاب، تکثیر و رگزایی نقش دارند به‌گونه‌ای که لانه‌گزینی سلول‌های آندومتر در مکان‌های نابجا را تسهیل می‌کنند. مطالعات نشان دادند که کاهش بیان miR451 در آندومتر یوتوپیک با ترویج تکثیر سلولی و کاهش آپوپتوز به پاتوژنز اندومتریتوز کمک می‌کند و می‌تواند یک نشانگر زیستی جدید برای این بیماری باشد (۸، ۹). بنابراین می‌توان گفت miRNAهای خاص ممکن است به‌عنوان نشانگرهای زیستی غیرتهاجمی در تشخیص مولکولی این بیماری موردبررسی قرار گیرند (۱۰، ۱۱).

درک بهتر از مکانیسم‌های تنظیمی لانه‌گزینی می‌تواند توانایی محققین در یافتن روش‌های درمان نازایی، جلوگیری از بین رفتن حاملگی اولیه و بهبود روش‌های جلوگیری از بارداری را افزایش دهد. مطالعه بیان ژنmiRNA451 در افراد مبتلا به اندومتریوزیس می‌تواند به تشخیص علل زمینه‌ای اندومتریوزیس و همچنین ناباروری و درمان این بیماران کمک کند. به نظر می‌رسد با تکمیل اطلاعات ژنتیکی در مرحله لانه‌گزینی، miRNA ها احتمالاً در تنظیم بیان ژن و مسیرهای مختلف پیام‌رسانی داخل سلولی دخیل در لانه‌گزینی جنین و همچنین پذیرندگی آندومتر رحم نقش داشته باشند و با تنظیم بیان آن‌ها، کلید موفقیت بیشتر در این مرحله را نیز در بیماران نابارور مبتلا به اندومتریوزیس فراهم سازند (۱۲). هدف از انجام این پژوهش، بررسی میزان بیان miRNA451 در بافت آندومتر در فاز ترشحی بیماران مبتلا به اندومتریوزیس بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، ۲۰ نفر از بیمارانی که با تشخیص اندومتریوزیس به مرکز تحقیقات بهداشت باروری و ناباروری دانشگاه علوم پزشکی بابل و مرکز ناباروری فاطمه الزهرا بابل مراجعه کردند، مورد تأیید قرار گرفتند (گروه آزمایش) و ۲۰ نفر از خانم‌های سالمی که مشکل باروری زنانه و اندومتریوزیس نداشتند (گروه کنترل)، وارد مطالعه شدند.

افراد موردمطالعه خانم‌هایی با سیکل‌های قاعدگی منظم (بین ۲۴ تا ۳۵ روز) و سن کمتر از ۳۸ سال بودند. این بیماران به مدت ۳ ماه هیچ‌گونه داروی هورمونی دریافت نکرده بودند و آندومتریوزیس با جراحی، لاپاراسکوپی و یا سونوگرافی که توسط متخصص زنان با دستگاه سونوگرافی Esaote mylab40 در فاز فولیکولار سیکل قاعدگی انجام شده بود، تشخیص داده شد.

پس از تکمیل رضایت‌نامه توسط افراد واجد شرایط، نمونه آندومتر در فاصله زمانی بین هفدهم تا بیست و چهارمین روز سیکل که معادل با زمان ترشحی سیکل قاعدگی و هم‌زمان با آمادگی رحم جهت فرایند لانه‌گزینی است با پایپل گرفته شد. نمونه‌ها بعد از شستشو به دو بخش تقسیم گردید. یک بخش برای بررسی هیستوپاتولوژیک و تأیید مرحله ترشحی آندومتر در فرمالین نگهداری شد و بخش دیگر نمونه‌ها برای انجام آزمایشات مولکولی در ماده ترایزول گذاشته شد و در فریزر ۸۰- قرار گرفت.

استخراج RNA:

برای استخراج RNA از ترایزول (سیگما آلدریچ، آمریکا) استفاده شد. ابتدا نمونه بافت آندومتر از فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد خارج و حدود ۳۰ میلی‌گرم از آن برداشته شد. به میزان ۱۰۰۰ میکرولیتر ترایزول، به میکروتیوپ حاوی نمونه بافتی اضافه گردید و سپس توسط دستگاه هموژنایز، به‌طور کامل هموژن شد.

در مرحله بعد ۳۰۰ میکرولیتر کلروفرم به میکروتیوپ اضافه کرده و به‌خوبی ورتکس شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق (۳۷°C) انکوباسیون شد. سپس نمونه به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شد. فاز رویی را به‌آرامی با سمپلر به میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتر دیگر انتقال داده شد. سپس به میزان حجم انتقال داده شده، محلول ایزوپروپانول داخل میکروتیوپ به جهت شستشو و رسوب‌گذاری اضافه کرده و به‌خوبی ورتکس شد، سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید.۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵ درصد استریل به رسوب اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه با دور ۷۵۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مجدد سانتریفیوژ شد؛ این مرحله دو بار تکرار شد. درنهایت فاز رویی تخلیه گردید و در پایان پس از خشک شدن نمونه ۵۰ میکرولیتر آب Nuclease Free به رسوب انتهای میکروتیوپ اضافه شد و به مدت ۳ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا رسوب کاملاً حل شود.

سنتز cDNA با استفاده از روش RT-PCR:

در مطالعه اخیر از پرایمر اختصاصی Stem loop به‌عنوان پرایمر و به‌منظور سنتز cDNA از کیت بیوفک (Biofact) استفاده شد. بعدازاینکه میزان جذب نوری RNA توسط دستگاه نانودراپ خوانده شد، مقدار RNA لازم جهت سنتز، محاسبه گشت (۴۰۰۰ تقسیم بر میزان جذاب نوری). سپس به میکروتیوپ‌ها RNA کل، پرایمر RNase-free, dH_2O, 2XRTperi mix, اضافه و ترکیب شد. در ادامه میکروتیوپ‌ها به‌خوبی اسپین گردید و بر طبق برنامه دمایی و زمانی در دستگاه PCR قرار داده شدند. برای ارزیابی آلودگی احتمالی نمونه‌ها به RNA و اندازه‌گیری کیفیت cDNA های سنتز شده در ویال‌های کنترل مثبت، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پرایمرهای اختصاصی که در جدول ۱ ذکر شده است، انجام شد. سپس محصولات به‌دست‌آمده با الکتروفورز روی ژل آگارز گرفته و درنهایت با ژل قرمز رنگ‌آمیزی شدند.

در این مطالعه از نمونه‌های cDNA به‌عنوان الگو در Real-Time PCR و با استفاده از SYBR Green، PCR Master Mix و Detector System (ABI) انجام گرفت.

۱۸ میکرولیتر از محتویات مستر میکس آماده شده که شامل سایبرگرین، پرایمر و آب است، در هر چاهک منحصربه‌فرد دستگاه Real-Time PCR ریخته شد. سپس ۲ میکرولیتر cDNA ساخته شده به‌طور جداگانه در داخل هر چاهک اضافه شد. پس از آماده شدن ترکیب، نوارها به دستگاه Real-Time PCR منتقل شدند. واکنش PCR در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و سپس ۴۰ سیکل در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه اجرا شد که دمای موردنیاز برای هر آغازگر ژن ۶۳-۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه بود. و سپس از ۶۰-۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه افزایش یافت تا به منحنی ذوب برسد.

جدول (۱): توالی پرایمرها

پرایمر	توالی پرایمر
Mir-451	5'- CCCAAACCGTTACCATTACTGAGTT
Universal	5′-GTGCAGGGTCCGAGGT-3′
U6 (Forward)	5′-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-
U6 (reverse)	5′-CGCTTCACGAATTTGCGTG-

هیستوپاتولوژی:

به‌منظور انجام مطالعات میکروسکوپی، از نمونه‌های خارج شده از آندومتر رحم، لام تهیه شد. هر نمونه بافت به‌طور جداگانه به مدت ۴۸ ساعت در ظرفی حاوی ۱۰ درصد فرمالین (تثبیت‌کننده رایج) قرار گرفت. آبگیری با اتانول انجام شد. نمونه‌های بافت با گذراندن مراحل آبگیری (الکل ۷۰-۱۰۰ درصد)، شفاف‌سازی (گزیلول) و غوطه‌وری در پارافین به مدت ۱۲ ساعت (هر مرحله به‌طور متوسط ۱.۵ ساعت) برای قالب‌گیری آماده شدند و سپس به مدت یک ساعت و نیم در پارافین ذوب‌شده در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و قالب‌گیری شدند. برش‌های ۵ میکرونی از قالب‌های بافت با کمک دستگاه میکروتوم گرفته شد. درنهایت نمونه‌ها بر روی لام قرار داده و خشک شدند.

در این مطالعه برای رنگ‌آمیزی بافت‌ها از دو روش هماتوکسیلین و ائوزین و اسید پریودیک شیف (PAS) استفاده شد. در بررسی بافت‌شناسی رحم افراد مبتلا به اندومتریوز تعداد غدد، نوع اپیتلیوم غددی، اپیتلیوم آندومتر، عروق خونی و ویژگی‌های بافت همبند استروما در مقایسه با افراد سالم بررسی شد. در انتها متغیرهای کمی با استفاده از آزمون‌های ناپارامتریک مانند آزمون‌های U-Mann Whitney و Chi-square مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند. سطح اطمینان ۹۵ درصد و سطح معنی‌داری زیر ۵ درصد تعیین شد ($p < 0.05$). تجزیه‌وتحلیل داده‌های مطالعه با استفاده از نرم‌افزار spss انجام شد. نمودارها به‌وسیله نرم‌افزار Prism تولید شدند.

یافته‌ها

مطابق نتایج به‌دست‌آمده، میانگین سن در گروه کنترل ۵±۷۹۶/ ۲۸/۷۸ و در گروه بیمار ۳/۳۳۴ ± ۳۲/۰۶ بود که مقایسه این دو گروه کاهش معنادار سن در خانم‌های گروه کنترل نسبت به گروه اندومتریوز را نشان داد (P<۰/۰۴۵).

مطابق نتایج به‌دست‌آمده، مقایسه میزان BMI (توده بدنی) در خانم‌های مبتلا به اندومتریوز نسبت به گروه کنترل کاهش جزئی داشت که ازنظر آماری معنادار نبود (P<۰/۶۸۱).

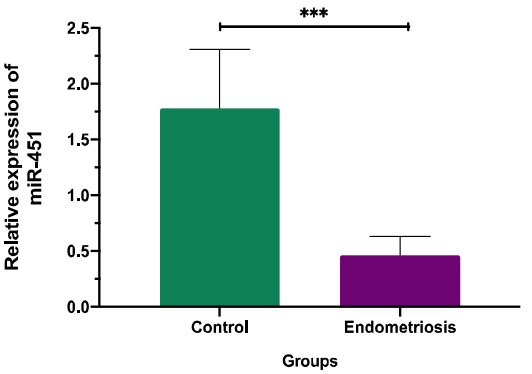
همچنین طبق بررسی‌های به‌عمل‌آمده مدت‌زمان نازایی و میزان FSH (هورمون محرکه فولیکولی) در خانم‌های مبتلا به اندومتریوز

نسبت به گروه کنترل افزایش داشت (به ترتیب (P<۰/۱۸۳) و (P <۰/۲۹۶)).

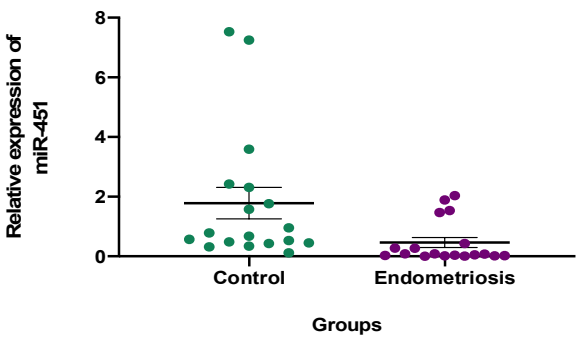
جدول (۲): متغیرها

متغیرها	کنترل	اندومتریوزیس	P-Value
BMI	۴/۲۶۶۸۲± ۲۴/۶۶۵۰	۳/۲۸۹۶۷± ۲۴/۱۳۷۸	۰/۶۸۱
مدت نازایی (سال)	۳/۳۰۰۰± ۴/۴۱۷	۲/۳۹۸۳± ۳/۱۱۱	۰/۱۸۳
FSH	۱/۶۷۶۹± ۵/۴۵۶	۳/۶۳۴۶± ۶/۴۵۸	۰/۲۹۶

طبق نتایج کمی به‌دست‌آمده، میزان بیان miR451 در فاز ترشحی چرخه قاعدگی در بافت آندومتر خانم‌های مبتلا به اندومتریوز نسبت به آندومتر گروه کنترل به‌طور معنادار کاهش داشت (P < 0.000).

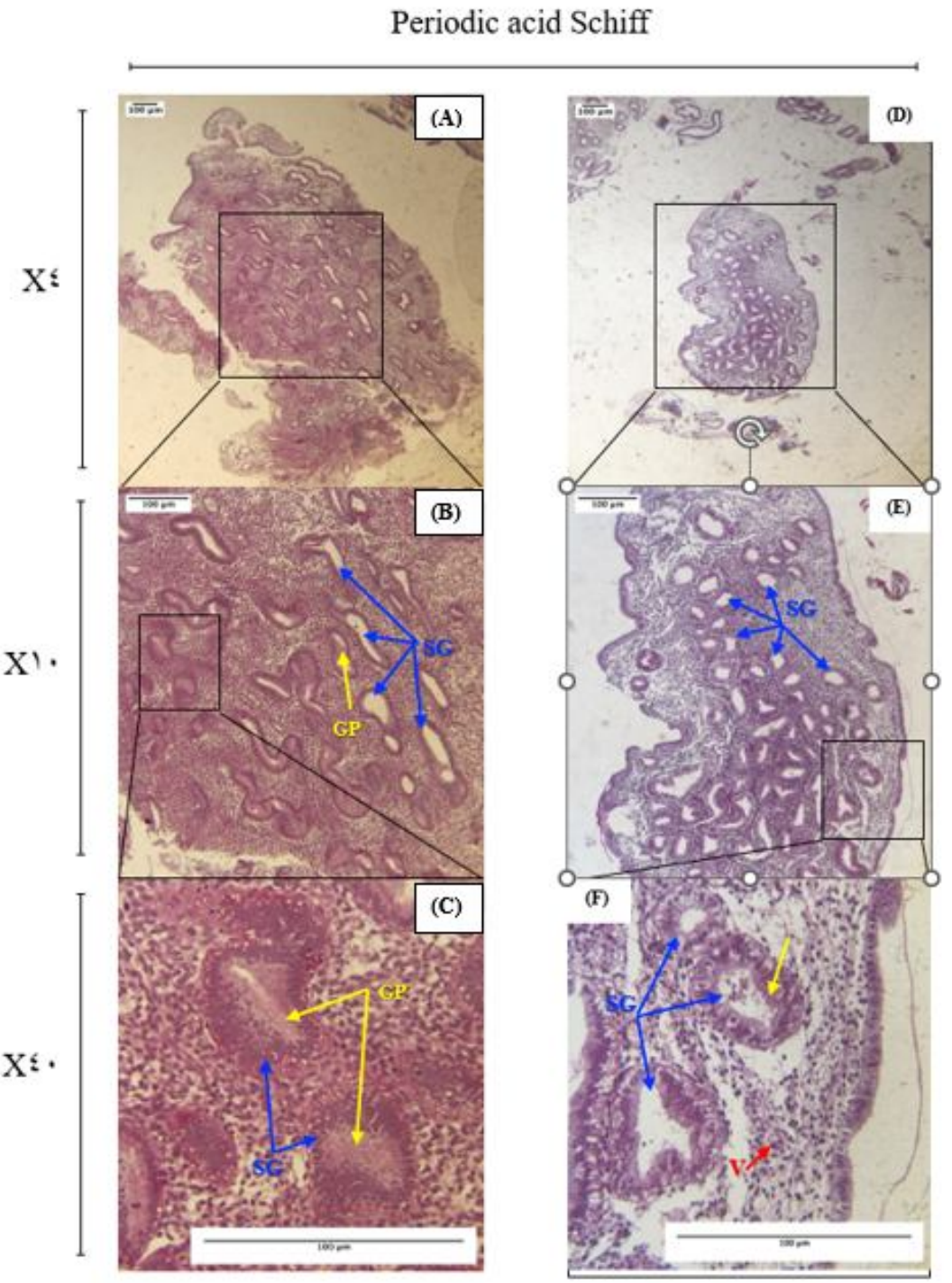


نمودار (۱): نمودار ستونی، مقایسه میزان بیان miR451 در آندومتر دو گروه کنترل و بیماران مبتلا به اندومتریوز را نشان می‌دهد. (علامت سه ستاره روی نمودار بیانگر P < 0/001 می‌باشد).

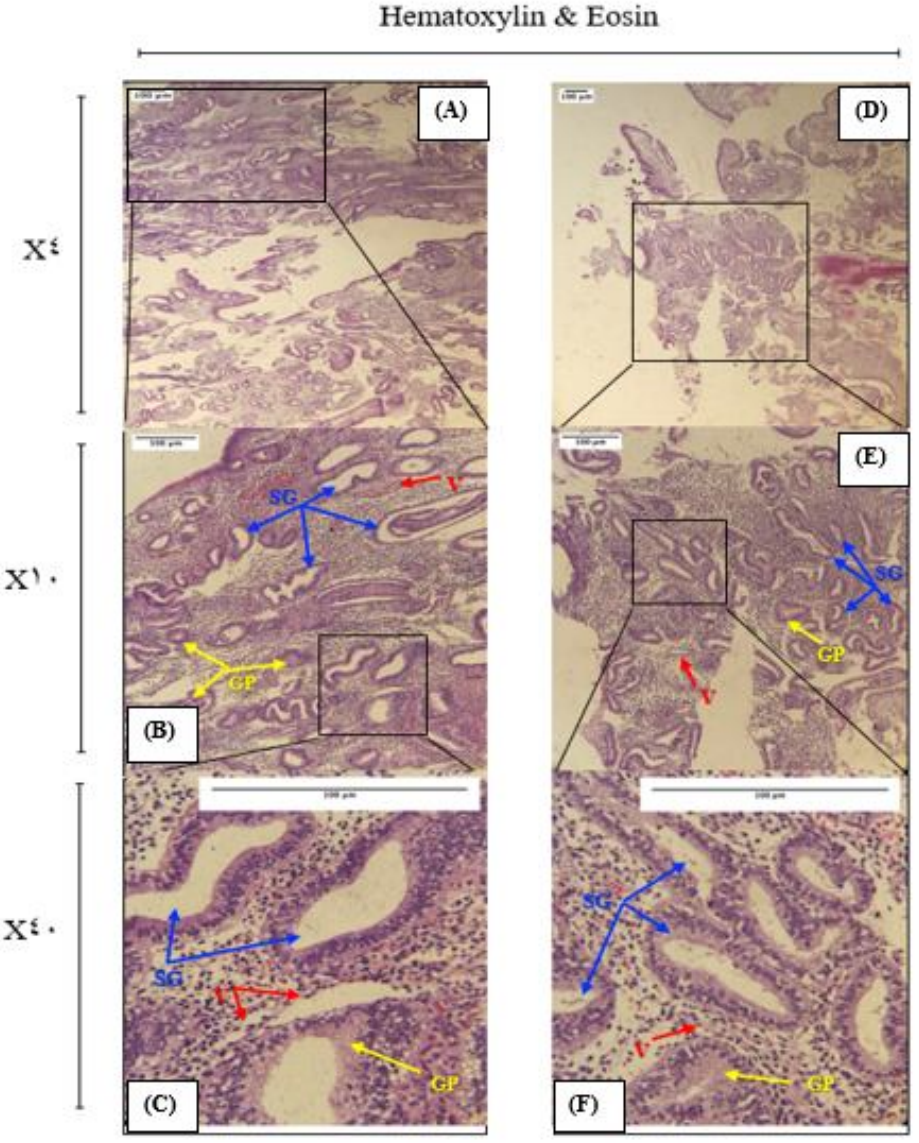


نمودار (۲): نمودار پراکندگی میزان بیان miR451 در دو گروه کنترل و بیماران مبتلا به اندومتریوز را نشان می‌دهد.

ازآنجایی‌که لانه گزینی در مرحله ترشحی چرخه قاعدگی رخ می‌دهد، نمونه‌های مطالعه حاضر نیز در این مرحله گرفته شد و به‌منظور تأیید صحت زمان نمونه‌برداری، از فن‌های بافت‌شناسی استفاده شد. جهت بررسی هیستوپاتولوژیک نمونه‌های بافتی، تصاویر میکروسکوپی تهیه و مطالعه شد. در گروه اندومتریوز و کنترل، ساختار بافتی مشاهده‌شده جهت تشخیص مرحله ترشحی چرخه قاعدگی شامل اپیتلیوم نرمال آندومتر رحم، همراه با غدد متسع و پیچ‌خورده در استروما و ترشحات گلیکوژن در غدد و آدم بافتی بود که تأییدکننده مرحله ترشحی چرخه قاعدگی است.



شکل (۱): تصاویر طبیعی از بافت آندومتر رحم در گروه کنترل (A-C) و گروه بیمار (D-F)، در مرحله ترشحی رحم (بزرگنمایی X۴۰، رنگ‌آمیزی PAS). اپیتلیوم سطحی استوانه‌ای ساده رحم، همراه با افزایش تعداد غدد متسع و پیچ‌خورده در استروما با اپیتلیوم استوانه‌ای ساده غدد که حاوی ترشحات گلیکوژن می‌باشند، همچنین افزایش عروق خونی در استرومای آندومتر و آدم بافتی دیده می‌شود که تأییدکننده مرحله ترشحی چرخه قاعدگی است.



شکل (۲): تصاویر طبیعی از بافت آندومتر رحم در گروه کنترل (A-C) و گروه بیمار (D-F)، در مرحله ترشحی رحم (بزرگنمایی X۴۰، رنگ‌آمیزی H&E). اپیتلیوم مکعبی آندومتر، همراه با افزایش تعداد غدد متسع و پیچ‌خورده در استروما با اپیتلیوم استوانه‌ای ساده غدد که حاوی ترشحات گلیکوژن می‌باشند؛ همچنین افزایش عروق خونی در استومای آندومتر و آدم بافتی دیده می‌شود که تأییدکننده مرحله ترشحی چرخه قاعدگی است.

بحث و نتیجه‌گیری

اندومتریوزیس بیماری مزمن خوش‌خیم و شایع در زنان است که با حضور سلول‌های استرومایی و اپیتلیال آندومتر در خارج از حفره رحم و با شیوع حدود ۱۰ تا ۱۵ درصدی بین زنان در سنین باروری شناخته می‌شود که منجر به ناباروری ۳۰ تا ۵۰ درصد از آنان می‌شود (۶). شواهدی مبنی بر تأثیر مکانیسم‌های اپی ژنتیکی مانند نقش میکرو RNAها در پاتوژنز بیماری وجود دارد. میکرو RNA ها امید بزرگی به‌عنوان مارکرهای تشخیصی برای بیماران اندومتریوز هستند. آن‌ها به‌سرعت توسط انزیم‌های تجزیه‌کننده RNA از بین نمی‌روند و برای بررسی شرایط فیزیولوژیک و

پاتوفیزیولوژیک استفاده از پروفایل میکرو RNAها بسیار دقیق‌تر از پروفایل‌های فراوان mRNAها است. همچنین الگوی بیان مشخص و خاصی از این بیومارکرها در بیماری‌های مختلفی چون سرطان‌ها شناسایی شده است. علاوه بر این در طی لانه گزینی که شامل ارتباط دقیق بین آندومتر رحم و بلاستوسیست است میکرو RNAها هم از بلاستوسیست و هم از آندومتر ترشح می‌شوند و در سیگنال دهی برای تغییر بیان ژن عمل می‌کنند (۱۳، ۱۴).

در مطالعه حاضر نتایج مربوط به بررسی هیستولوژیک در دو گروه کنترل و بیمار نشان داد که مرحله ترشحی در چرخه قاعدگی موجب تغییراتی در بافت آندومتر رحم می‌شود؛ که این تغییرات شامل تغییر سلول‌های اپیتلیوم استوانه‌ای به مکعبی، افزایش تعداد غدد آندومتر رحم، تغییر اپیتلیوم غدد از استوانه‌ای به مکعبی همچنین پرخونی و افزایش تعداد غدد و وجود ترشحات گلیکوژن در غدد آندومتر رحم تأییدکننده فاز ترشحی رحم (زمان موردنظر) در زمان نمونه‌برداری بود. با توجه به اینکه نمونه‌های بافتی رحم در فاز ترشحی چرخه قاعدگی گرفته شده است کاهش گلیکوپروتئین‌ها و موسین‌های سطحی نیز در بررسی بافت‌شناسی تأیید شد.

در مطالعه حاضر ما نشان دادیم که بیان miR451 در بافت آندومتر یوتوپیک بیماران مبتلا به اندومتریوز نسبت به بافت آندومتر گروه کنترل کاهش بیان معناداری داشته است ($P < 0.000$).

مطالعات انجام شده بر روی سرم و بافت آندومتر بیماران مبتلا به اندومتریوز نیز کاهش بیان miR451 را در این بیماران تأیید می‌کند به‌عنوان‌مثال طبق مطالعه Joshi و همکاران (۲۰۱۵)، بر روی Baboons گونه‌ای از میمون که مبتلا به اندومتریوزیس هستند انجام شد، نمونه‌های این مطالعه از آندومتر این حیوانات در طول پنجره لانه‌گزینی گرفته شده است. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که بیان miR451 در این بیماران کاهش می‌یابد و این microRNAs باهدف قرار دادن ژن هدف خود یعنی YWHAZ و افزایش بیان این ژن موجب شکست لانه‌گزینی می‌شود (۱۵).

در مطالعه‌ای که Gao و همکارانش (۲۰۱۹) بر روی بافت آندومتر یوتوپیک ۴۰ خانم مبتلا به اندومتریوز و ۲۰ خانم سالم انجام دادند شواهدی ارائه کردند مبنی بر اینکه miR451 در آندومتر یوتوپیک بیماران مبتلا اندومتریوز کاهش بیان دارد. آن‌ها نشان دادند که کاهش بیان miR451 می‌تواند با کاهش آپوپتوز و ترویج تکثیر سلولی در آندومتر یوتوپیک به پاتوژنز بیماری کمک کند (۸).

همچنین Xiong Li و همکارانش (۲۰۱۹) نشان دادند که میزان بیان miR451 در مایع فولیکولار بیماران مبتلا به اندومتریوز در مقایسه افراد سالم کاهش می‌یابد که با سرکوب مسیر سیگنالینگ Wnt در تخمک‌های موش و انسان می‌تواند بر تشکیل جنین قبل از لانه‌گزینی اثر منفی بگذارد (۱۶).

Graham و همکاران (۲۰۱۵) نیز با مطالعه‌ای که بر روی ۳۰ نمونه بافت آندومتر یوتوپیک و ۴۳ نمونه بافت آندومتر اکتوپیک خانم‌های مبتلا به اندومتریوز داشتند نشان دادند که miR451 در آندومتر یوتوپیک کمتر از آندومتر اکتوپیک بیان می‌شود که در مقابل در این هنگام میزان بیان ژن MIF در یوتوپیک زیاد است (۱۲). در مطالعه‌ای دیگر نیز Lei wang و همکاران (۲۰۲۱) جهت بررسی میزان بیان miR451 و MIF بر روی بافت و سرم آندومتر ۸۰ بیمار مبتلا به اندومتریوزیس و نابارور و ۶۶ فرد سالم، نشان دادند که میزان بیان miR451 در سرم و بافت این بیماران نسبت به گروه کنترل کمتر است و در مقابل میزان بیان ژن MIF در این بیماران در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشته است (۱۷). Akoum و همکاران (۲۰۰۶) نیز با مطالعه‌ای بر روی بافت آندومتر ۵۵ فرد مبتلا به اندومتریوز و ۲۵ فرد نرمال با تکنیک الایزا (The enzyme-linked immunosorbent assay) نشان داد که میزان MIF در فاز ترشحی چرخه قاعدگی به‌خصوص در خانم‌های نابارور بیشتر از افراد نرمال است که تأییدی بر مطالعات دیگر است (۱۸).

فاکتور مهاری مهاجرت ماکروفاژها (MIF) یک سیتوکین است که در انواع مختلف سلول‌ها ازجمله سلول‌های خون‌ساز، اپیتلیال، اندوتلیال، مزانشیمی و سلول‌های عصبی بیان می‌شود. MIF به روش اتوکراین و پاراکراین از طریق اتصال و فعال کردن گیرنده‌های CXCR4، CXCR2، CD74/CD44 و CXCR7 عمل می‌کند. پس از اتصال گیرنده، چندین مسیر سیگنال‌دهی در داخل بدن ازجمله: AMPK، ERK1/2 و AKT فعال می‌شوند (۸). در تحقیقات نیز نشان داده که فعال شدن CD44 باعث تأخیر در لانه‌گزینی می‌شود. همچنین مشخص شده است که میزان بیان CD74 در بیماران مبتلا به اندومتریوز افزایش می‌یابد. که این افزایش بیان در پاتوژنز بیماری اندومتریوز نقش دارد (۱۹).

پس با توجه به نتایج مطالعات گذشته و مقایسه آن با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً کاهش بیان miR451 در بیماران مبتلا به اندومتریوز باهدف قراردادن مسیر سیگنالینگ MIF مانع لانه‌گزینی موفق و در نتیجه ناباروری در این بیماران می‌شود.

با توجه به مطالعات قبلی و نیز نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر می‌توان از miR451 در تشخیص زود هنگام بیماری اندومتریوزیس و بهبود فرایند لانه‌گزینی در این بیماران استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

اندومتریوزیس یکی از بیماری‌های وابسته به استروژن و شایع زنان است که با حضور سلول‌های استرومایی و غدد اپیتلیوم در خارج

از حفره رحمی تشخیص داده می‌شود و در حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد از زنان در سنین باروری دیده می‌شود. شواهد مبنی بر وجود مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی مانند نقش miRNA ها در پاتوژنز و شکست لانه‌گزینی و در نتیجه ناباروری ناشی از این بیماری وجود دارد. میکرو RNA ها از مولکول‌های تنظیم کننده پس از رونویسی هستند که به‌طور بالقوه نقش مهمی در پیشرفت ضایعات اندومتریک دارند. این مولکول‌های کوچک امید بزرگی به‌عنوان بیومارکرهای تشخیصی برای بیماران اندومتریوزی هستند. حال با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه به نظر می‌رسد میزان بیان miR451 در بافت آندومتر یوتوپیک خانم‌های مبتلا به اندومتریوز در فاز ترشحی نسبت به گروه کنترل کاهش بیان معنی‌داری ازلحاظ اماری داشته است که می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً کاهش بیان miR451 در بیماران مبتلا به اندومتریوز باهدف قراردادن برخی مسیرسیگنالینگ مانع لانه‌گزینی موفق و در نتیجه ناباروری در این بیماران می‌شود. بنابراین با انجام مطالعات بیشتر می‌توان از این miRNA ها به‌عنوان بیومارکرهای تشخیصی برای بیماران مبتلا به اندومتریوز استفاده کرد. اکنون لازم است در مطالعات بعدی بر نقش و عملکرد این میکرو RNAها در ناباروری ناشی از بیماری اندومتریوز پرداخته شود.

تشکر و قدردانی

از تمامی بیمارانی که با مهربانی در مطالعه حاضر شرکت کردند نهایت تشکر را داریم.

حمایت مالی

این پژوهش توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بابل تأمین شده است.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافع وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه توسط کمیته ملی اخلاق در تحقیقات پزشکی ایران با کد اخلاق (IR.MUBABOL.REC.1400.009) تأیید شد و همه شرکت‌کنندگان رضایت کتبی ارائه کردند.

References:

1. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. Hum Reprod Update 2006;12(6):731–46. http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dml004
2. Akoum A, Metz CN, Al-Akoum M, Kats R. Macrophage migration inhibitory factor expression in the intrauterine endometrium of women with endometriosis varies with disease stage, infertility status, and pelvic pain. Fertil Steril 2006;85(5):1379–85. http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.10.073
3. Cho S, Mutlu L, Grechukhina O, Taylor HS. Circulating microRNAs as potential biomarkers for endometriosis. Fertil Steril 2015;103(5):1252-60.e1. http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.02.013
4. Danforth DN. Danforth's obstetrics and gynecology: Lippincott williams & wilkins. Lippincott williams & wilkins; 2008.
5. Gao S, Liu S, Gao ZM, Deng P, Wang DB. Reduced microRNA-451 expression in eutopic endometrium contributes to the pathogenesis of endometriosis. World J Clin Cases 2019;7(16):2155–64. http://dx.doi.org/10.12998/wjcc.v7.i16.2155
6. Graham A, Falcone T, Nothnick WB. The expression of microRNA-451 in human endometriotic lesions is inversely related to that of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and regulates MIF expression and modulation of epithelial cell survival. Hum Reprod 2015;30(3):642–52. http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dev005
7. Gruenwald P. Origin of endometriosis from the mesenchyme of the celomic walls. Am J Obstet Gynecol 1942;44(3):470–4. http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9378(42)90484-8
8. Han SJ, O'Malley BW. The dynamics of nuclear receptors and nuclear receptor coregulators in the pathogenesis of endometriosis. Hum Reprod Update 2014;20(4):467–84. http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmu002
9. Ishikawa H, Reierstad S, Demura M, Rademaker AW, Kasai T, Inoue M, et al. High aromatase

expression in uterine leiomyoma tissues of African-American women. J Clin Endocrinol Metab 2009;94(5):1752–6. http://dx.doi.org/10.1210/jc.2008-2327

10. Joshi NR, Su RW, Chandramouli GVR, Khoo SK, Jeong JW, Young SL, et al. Altered expression of microRNA-451 in eutopic endometrium of baboons (Papio anubis) with endometriosis. Hum Reprod 2015;30(12):2881 91. http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dev229
11. Lessey BA, Kim JJ. Endometrial receptivity in the eutopic endometrium of women with endometriosis: it is affected, and let me show you why. Fertil Steril 2017;108(1):19 27. http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.05.031
12. Li X, Zhang W, Fu J, Xu Y, Gu R, Qu R, et al. MicroRNA-451 is downregulated in the follicular fluid of women with endometriosis and influences mouse and human embryonic potential. Reprod Biol Endocrinol 2019;17(1):96. http://dx.doi.org/10.1186/s12958-019-0538-z
13. Liu Y, Chen J, Zhu X, Tang L, Luo X, Shi Y. Role of miR 449b 3p in endometriosis via effects on endometrial stromal cell proliferation and angiogenesis. Molecular Medicine Reports. 2018;18(3):3359 65.
14. Moradi Y, Shams-Beyranvand M, Khateri S, Gharahjeh S, Tehrani S, Varse F, et al. A systematic review on the prevalence of endometriosis in women. Indian J Med Res 2021;154(3):446–54. http://dx.doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_817_18
15. Moustafa S, Burn M, Mamillapalli R, Nematian S, Flores V, Taylor HS. Accurate diagnosis of endometriosis using serum microRNAs. Am J Obstet Gynecol 2020;223(4):557.e1-557.e11. http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2020.02.050
16. Nothnick WB, Falcone T, Olson MR, Fazleabas AT, Tawfik OW, Graham A. Macrophage migration inhibitory factor receptor, CD74, is overexpressed in human and baboon (Papio Anubis) endometriotic lesions and modulates endometriotic epithelial cell survival and interleukin 8 expression. Reprod Sci 2018;25:1557–66.
17. Shokrzadeh N, Alivand MR, Abedelahi A, Hessam Shariati MB, Niknafs B. Calcitonin administration improves endometrial receptivity via regulation of LIF, Muc-1 and microRNA Let-7a in mice. J Cell Physiol 2019;234(8):12989–3000. http://dx.doi.org/10.1002/jcp.27969
18. Wang L, Zhang J, Sun H, Ji X, Zhang S. Effect of miR-451 on IVF/ICSI-ET outcome in patient with endometriosis and infertility. Am J Transl Res 2021;13(11):13051–8.
19. Wilczynski M, Danielska J, Dzieniecka M, Szymanska B, Wojciechowski M, Malinowski A. Prognostic and clinical significance of miRNA-205 in endometrioid endometrial cancer. PLoS One 2016;11(10):e0164687. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0164687

Original Article

DECREASED EXPRESSION OF MIRNA451 IN THE ENDOMETRIUM OF WOMEN WITH ENDOMETRIOSIS IN THE SECRETORY PHASE OF THE UTERUS

Soheila Abbaszadeh[1], Sadigheh Esmaelzadeh[2], Zahra Basirat[3], Parvaneh Mirabi[4], Hamid Reza Nouri[5], Ali Bijani[6], Yasaman Nazari Hagh[7], Naser Shokrzadeh[8]*

Received: 07 May, 2023; Accepted: 27 December, 2023

Abstract

Background & Aims: Endometriosis is a chronic and promising yet benign disease in women of reproductive age. Some genetic markers in endometrial have a key effect in the pathogenesis of endometriosis. MicroRNAs are small molecules involved in several biological processes. The aim of this study was to investigate the differential expression of microRNAs, including miRNA451, during the secretory phase in patients with endometriosis.

Materials & Methods: The present study was conducted as a case-control study. Twenty infertile women with endometriosis who were referred to the Center for Research on Reproductive Health and Infertility of Babol University of Medical Sciences and Fatima Al-Zahra Infertility Specialized Treatment Center in Babol and were diagnosed by sonography or laparoscopy or laparotomy and tissue histology and after exclusion of individuals with other causes of female infertility were included in this study. Also 20 healthy women who had no female factor infertility were selected as the control group. The relative expression levels of mir451 in the endometrium of women in both groups were identified using Real-time PCR.

Results: The mean level of mir451 expression in the endometrium of the endometriosis group was 0.46306 ± 0.71740 and in the control group it was 2.11621 ± 3.32579, which was significantly lower in the endometriosis group ($P < 0.001$).

Conclusion: The results of this study showed a significant reduction in the expression of mir451 in the endometriosis group compared to the control group. This could be investigated as a potential causative factor or indicator of endometriosis. Therefore, with further studies, it may be possible to use these microRNAs as diagnostic biomarkers for patients with endometriosis.

Keywords: Endometriosis, Infertility, Mir451, Real-time PCR

Address: Babol University of Medical Science, Babol, Iran
Tel: +989111141577
Email: sesmael2010@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2024: 34(10): 585 ISSN: 2717-008X

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

[1] *Assistant Professor, Infertility and Reproductive Health Research Center, Fatemeh Al-Zahra Hospital, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran*
[2] *Professor, Infertility and Reproductive Health Research Center, Fatemeh Al-Zahra Hospital, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran (Corresponding Author)*
[3] *Professor, Infertility and Reproductive Health Research Center, Fatemeh Al-Zahra Hospital, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran*
[4] *Assistant Professor, Infertility and Reproductive Health Research Center, Fatemeh Al-Zahra Hospital, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran*
[5] *Assistant Professor, Cellular and Molecular Biology Research Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran*
[6] *Associate Professor, Social Determinants of Health Research Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran*
[7] *MSc Department of Anatomical Sciences, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran*
[8] *Assistant Professor, Reproductive Health Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran (Corresponding Author)*