Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences

Ostadhasanzadeh Maleki, et al. *Med J Tabriz Uni Med Sciences.* 2022;44(3):232-242
doi: 10.34172/mj.2022.030
https://mj.tbzmed.ac.ir

TUOMS PRESS

Original Article

Evaluation of miR-146a biomarker capability in mothers with recurrent miscarriage

Parisa Ostadhasanzadeh Maleki[1], Jafar Mohseni[*2], Saeid Ghorbian[1], Sedigheh Abdollahi Fard[2], Changiz Ahmadizadeh[3]

[1] Department of Molecular Genetics, Faculty of Basic Sciences, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran
[2] Genetics Research Div, ART Center of ACECR East Azerbaijan Branch, East Azerbaijan ACECR, Tabriz, Iran
[3] Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

ARTICLE INFO

Article History:
Received: 12 Apr 2022
Accepted: 6Jul 2022
ePublished: 2 Aug 2022

Keywords:
- Recurrent miscarriage
- Biomarker
- Diagnostic kit
- miRNA 146a

Abstract

Background. If the pregnancy attempt fails, it may become a stressful event. Therefore, in many cases, problem solving can lead to greater satisfaction and cohesion of couples and prevent psychological and social harm to families. The aim of this study was to determine the significant difference in the expression of miR-146a miRNA in maternal blood between the control and observation groups and to determine whether the miRNA can be used as diagnostic biomarkers or not.

Methods. The present study is a basic and descriptive survey in terms of data analysis. The samples included pregnant women referred to Tabriz University of Jahad from September 2019 to February 2021. We used Exel, Spss v.21 and Roc software for data analysis. Data were prepared in Exel software with reference gene and by calculating CT. Were used in Roc software.

Results. The results showed a difference between the control and observation groups. Early detection of recurrent miscarriage should be used in these mothers.

Conclusion. Through using diagnostic kits of the studied miRNAs, effective steps can be taken for early detection, prevention of abortion, and reducing the heavy psychological, economic, and social burden on families. Therefore, it is suggested that diagnostic kits be made for these biomarkers and used in infertility centers.

Practical Implications. Among the practical implications of this study, we can mention the diagnosis and prevention of abortion, which can reduce the burden on families and society.

How to cite this article: Ostadhasanzadeh Maleki P, Mohseni J, Ghorbian S, Abdollahi Fard S, Ahmadizadeh C. Evaluation of miR-146a biomarker capability in mothers with recurrent miscarriage. *Med J Tabriz Uni Med Sciences.* 2022; 44(3): 232-242. doi: 10.34172/mj.2022.030. Persian.

Extended Abstract

Background

If trying to get pregnant fails, it can become a stressful event. Therefore, solving the existing problems can increase satisfaction and cohesion of couples and prevent emotional, psychological, and social damage. Evidence shows that abortion and infertility have increased in the last decade, leading to health concerns. Some of the causes of abortion are still unknown, but environmental, genetic, and pathological factors can be mentioned among the

*Corresponding author; Email: jmohseni46@gmail.com
© 2022 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

known causes. Although abortion is a useful phenomenon and prevents the birth of abnormal babies, it can become pathological if it is repeated more than two or three times in a row (recurrent abortion); it will also need appropriate investigation and treatment. miRNAs may cause pathological conditions such as preeclampsia, spontaneous abortion, preterm birth, macrosomia, and low birth weight. These molecules regulate gene expression at the post-transcriptional stage by repressing translation or reducing mRNA expression. This miRNA is considered as one of the important risk factors in miscarriage. The excessive proliferation of cells affects the endometrium of pregnant women and the fetus. The importance of miRNA molecules in regulating the natural processes of body cells has been proven. miRNA can be related to frequent spontaneous abortion, miR-146acc in the fetus is one of the possible risk factors of spontaneous abortion, and focusing on genetic factors is important in explaining the causes of spontaneous abortions. To determine the relationship between mir-146a and recurrent early miscarriage and in an attempt to determine the expression level of this miRNA in the blood of mothers with recurrent early miscarriage, the researcher seeks to use them as diagnostic biomarkers in women with recurrent miscarriage.

Considering that fertility is of high value in most cultures and the desire to have a child is one of the most basic human motivations, solving the issue of abortion can lead to greater satisfaction and cohesion of couples and prevent psychological and social damage to families. Therefore, in this research, the researcher seeks to determine the significant difference between the expression level of miR-146a in two groups of mothers with recurrent early miscarriage and mothers with normal pregnancy, so that if there is a significant difference, they can be used as diagnostic biomarkers for recurrent miscarriage with early diagnosis.

Methods

According to the type of research, this study is a basic study, and in terms of data analysis, it is descriptive-correlational. Statistical population included all pregnant women and women with frequent abortions referring to Tabriz University of Jahad from September 2019 to February 2021. Blood samples were collected from 60 women with a history of repeated abortions (a history of at least two previous abortions) and 60 normal pregnant women under 20 weeks in the Molecular Genetics Laboratory of Tabriz University. Patients who had a specific cause for infertility or abortion, such as abnormal parental karyotype (such as translocation), uterine anomalies, hormonal imbalance, immune system disorder (immune intolerance or tolerance), coagulation diseases, reproductive infections, thyroid disorders, and diabetes mellitus were excluded from the study. Only subjects with unknown cause of infertility or abortion remained in the study. In cases of abortion, the karyotype of the aborted fetus was also performed. In case of a chromosomal anomaly, it was excluded from the study. Mothers who had abortions were sampled at most one week after the abortion. The level of miRNA expression of mir-146a in the plasma samples of the studied subjects was evaluated by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) technique, which is a precise and sensitive method for quantitative determination of DNA and RNA.

Results

The average expression of the target genes was compared in the patient and control groups. The results showed a significant difference between the two groups. According to the information obtained from the ROC software for miR-146a, it can be concluded that miR-146a can be a high diagnostic biomarker and researchers can use this RNA as a medium (medium to high) diagnostic biomarker for diagnosis in women with miscarriage.

Conclusion

In line with the results obtained for the research hypothesis, the laboratory results, the analyses performed for miR-146a, and based on the comparison of our results with other studies, it can be reported that the results of the current research are in line with other studies. So, the results can be used to identify factors that can reduce abortion. Considering the important role that miRNAs play in this regard through gene expression, they are considered as an important risk factor in miscarriage and other diseases, and they can be used as diagnostic biomarkers for recurrent miscarriage.

استاد حسن زاده ملکی و همکاران. *مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز*. مرداد و شهریور ۱۴۰۱؛ ۴۴(۳):۲۳۲-۲۴۲
doi: 10.34172/mj.2022.030
https://mj.tbzmed.ac.ir

مقاله پژوهشی

بررسی قابلیت بیومارکری miR-146a در مادران با سقط مکرر

پریسا استاد حسن زاده ملکی[۱]، جعفر محسنی[۲*]، سعید قربیان[۱]، صدیقه عبدالهی فرد[۲]، چنگیز احمدی‌زاده[۳]

[۱]گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
[۲]گروه تحقیقات ژنتیک، مرکز جهاد دانشگاهی واحد آذربایجان شرقی، آذربایجان شرقی، تبریز، ایران
[۳]گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:
دریافت: ۱۴۰۱/۱/۲۳
پذیرش: ۱۴۰۱/۴/۱۵
انتشار برخط: ۱۴۰۱/۵/۱۱

کلیدواژه ها:
- سقط مکرر
- بیومارکر،
- کیت تشخیصی
- miRNA 146a

چکیده

زمینه. اگر تلاش برای حاملگی با شکست مواجه شود ممکن است به یک واقعه تنش‌زا تبدیل شود؛ بنابراین حل مسئله می‌تواند در بسیاری از مواقع موجب رضایت و انسجام بیشتر زوجین گردیده و از آسیب‌های روحی، روانی و اجتماعی خانواده‌ها جلوگیری نماید. پژوهش حاضر با هدف تعیین تفاوت معنی‌داری در میزان بیان miRNAی miR-146a در خون مادران و تعیین اینکه آیا miRNAی مذکور می‌تواند به عنوان بیومارکرهای تشخیصی استفاده شوند یا نه، بین دو گروه، کنترل، مشاهده و انجام گردید.

روش کار. مطالعه حاضر از نوع بنیادی بوده، و به لحاظ تجزیه و تحلیل داده‌ها، از نوع توصیفی پیمایشی می‌باشد. نمونه‌های آماری تحقیق را زنان بارداری که در یک سال اخیر به جهاد دانشگاهی تبریز مراجعه کرده‌اند، تشکیل داده‌اند. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزارهای Excel، Spss نسخه ۲۱ و Roc استفاده شد. داده‌ها قبل از ورود به نرم‌افزار Spss نسخه ۲۱ و Roc، در نرم افزار Excel با ژن مرجع و از طریق محاسبه ΔΔCT آماده‌سازی شدند. برای تعیین تفاوت معنی‌داری از آزمون t test و برای تعیین قدرت تشخیص RNAها به عنوان بیومارکر از آزمون‌های موجود در نرم افزار Roc استفاده شد.

یافته‌ها. نتایج نشان دادند که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های کنترل و مشاهده وجود دارد. در انتها با توجه به بررسی‌های انجام شده و نتایج به دست آمده از نرم‌افزار Roc مشخص گردید که miRNA می‌توانند به عنوان بیومارکری تشخیصی (با قدرت متوسط به بالا) در تشخیص زودهنگام سقط مکرر در مادران مبتلا مورد استفاده قرار گیرند.

نتیجه‌گیری. نتایج حاصل از تحقیق حاکی از آن است که از طریق کیت‌های تشخیصی miRNAهای مورد مطالعه می‌توان در تشخیص زودهنگام و جلوگیری از سقط مادران گام‌های موثری برداشت، و بار سنگینی را که خانواده‌ها به لحاظ روانی، اقتصادی و اجتماعی متحمل می‌شوند از دوش آن‌ها برداشت؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود کیت‌های تشخیصی برای این بیومارکرها ساخته شود و در مراکز ناباروری استفاده گردد.

پیامدهای عملی. از جمله پیامدهای عملی این تحقیق می‌توان به تشخیص و پیشگیری از سقط مادران اشاره کرد که می‌تواند باری از دوش خانواده‌ها و جامعه بردارد.

مقدمه

شواهد نشان می‌دهد که در دهه اخیر سقط جنین و ناباروری افزایش یافته، و این موضوع به نگرانی‌هایی در حوزه سلامت منجر شده است.[۱،۲] یک سری از دلایل سقط هنوز ناشناخته می‌باشد، اما از دلایل شناخته‌شده می‌توان به عوامل محیطی، ژنتیکی و پاتولوژیکی اشاره کرد.[۳،۴] اگرچه سقط جنین یک پدیده مفید است و باعث جلوگیری از تولد نوزادان ناهنجار می‌شود، اما در صورتی که بیش از ۲ یا ۳ بار متوالی تکرار گردد، جنبه پاتولوژیک پیدا کرده و سقط مکرر نامیده می‌شود و نیازمند بررسی و درمان مناسب خواهد بود.[۵-۱۰] miRNAها ممکن است باعث شرایط پاتولوژیک مانند پری اکلامپسی، سقط خودبه‌خودی، زایمان زودرس، ماکروزومی یا وزن کم هنگام تولد شوند.[۱۱] این مولکول‌ها بیان ژن را در مرحله بعد از رونویسی توسط سرکوب ترجمه یا کاهش بیان mRNA تنظیم می‌کنند.[۱۲-۱۸] این miRNA از عوامل مهم خطر در سقط جنین به شمار می‌آید. تکثیر بی‌رویه سلول‌ها آندومتر زنان باردار و جنین را تحت تأثیر قرار می‌دهد.[۱۹-۲۱]

اهمیت مولکول‌های miRNA در تنظیم فرآیندهای طبیعی سلول‌های بدن به اثبات رسیده است.[۲۲-۲۴] miRNA می‌تواند با

* نویسنده مسؤول؛ ایمیل: jmohseni46@gmail.com

حق تالیف برای مولفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز CC BY 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

سقط مکرر خودبه‌خودی جنین ارتباط داشته باشد، miR-146acc در جنین از عوامل احتمالی خطر سقط خودبه‌خودی هستند، و تمرکز روی فاکتورهای ژنتیکی در توضیح علل سقط‌های خودبه‌خودی مهم می‌باشد.[۲۶،۲۵] ویبینگ کوین و همکاران، در تحقیق خود به این نتیجه رسیدند که میزان بیان این miRNAها در زنان با سقط مکرر در مقایسه با زنان با حاملگی طبیعی متفاوت است، و از این تعداد ۹ miRNA بیان بیش از حد داشته و ۱۶ miRNA کاهش بیان داشته است.[۵] مارتینا بارکیتا و همکاران، در یک مطالعه مروری به این نتیجه رسیدند که miRNAها به عنوان بیومارکرهای مهم زیستی هستند که می‌توان از آن‌ها برای تشخیص و پیشگیری از اختلالات بارداری از جمله سقط مکرر استفاده کرد.[۲۷] کون یانگ و همکاران در تحقیق خود، به این نتیجه رسیدند که میزان بیان microRNAهای (miR- 23a-3p و miR- 29a-3p و miR-100-5p و miR- 127-3p و miR-466-5) ارتباط مستقیمی با سقط مکرر و نتایج انتقال جنین دارد؛ بنابراین می‌توان این‌ها را به عنوان بیومارکرهایی در تشخیص زودهنگام سقط مکرر استفاده کرد که می‌تواند منجر به توسعه ابزارهای جدید تشخیصی غیرتهاجمی برای سقط مکرر گردد.[۲۸] ژاوو و همکاران در تحقیقی که انجام دادند به این نتیجه رسیدند که میزان بیان miR-146-5P در مادران با سقط مکرر در مقایسه با جمعیت کنترل به مقدار زیادی کاهش پیدا کرده است.[۲۹] یانگ و همکاران در تحقیقی با عنوان «ارتباط میزان بیان miRNA های خون محیطی با سقط مکرر خودبه‌خودی و نتایج روند لقاح آزمایشگاهی جنین» به این نتیجه رسیدند که میزان بیان miR–127a-3P و miR- 486-5P در پلاسما می‌تواند به عنوان عوامل پیش‌بینی کننده سقط مکرر به کار گرفته شود.[۳۰] پژوهشگر با هدف تعیین ارتباط بین mir-146a با سقط مکرر زودهنگام و با هدف تعیین میزان بیان این miRNA در خون مادران با سقط مکرر زودهنگام، در پی این است که در صورت وجود ارتباط معنی‌دار، از آن‌ها به‌عنوان بیومارکرهای تشخیصی درخانم‌های دارای سقط مکرر استفاده شود. با توجه به اینکه باروری در اکثر فرهنگ‌ها از ارزش بالایی برخوردار است و آرزوی داشتن فرزند یکی از اساسی‌ترین محرک‌های انسانی است، حل مسئله سقط جنین می‌تواند در بسیاری از مواقع موجب رضایت و انسجام بیشتر زوجین گردیده و از آسیب‌های روحی، روانی و اجتماعی خانواده‌ها جلوگیری نماید؛ بنابراین پژوهشگر در این پژوهش به دنبال تعیین تفاوت معنی‌دار بین میزان بیان miR-146a در دو گروه مادران با سقط مکرر زودهنگام و مادران با حاملگی طبیعی است تا در صورت وجود تفاوت معنی‌دار از آن‌ها به عنوان بیومارکرهای تشخیصی برای سقط مکرر استفاده شود و با تشخیص زودهنگام این گونه سقط‌ها از آسیب‌های روحی، روانی و اجتماعی زوجین جلوگیری گردد.

روش‌کار

این مطالعه با توجه به نوع پژوهش جزء مطالعات بنیادی بوده و به لحاظ تجزیه و تحلیل داده‌ها از نوع توصیفی-همبستگی می‌باشد. جامعه آماری تحقیق زنان باردار و زنان دارای سقط مکرر مراجعه‌کننده به جهاد دانشگاهی تبریز است. جهت نمونه‌گیری از خون آن‌ها در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی جهاد دانشگاهی تبریز، نمونه‌های خون از ٦٠ خانم با سابقه سقط مکرر(سابقه حداقل ۲ مورد سقط قبلی) و٦٠ خانم باردار طبیعی زیر۲۰ هفته، جمع‌آوری شد. قبل از انجام نمونه‌برداری، در مورد هدف تحقیق و کاربرد نتایج به دست آمده، توضیحات جامع و دقیق به آن‌ها ارائه شد و پس از پر کردن فرم رضایت‌نامه و اطمینان از رضایت آگاهانه ایشان برای شرکت در تحقیق، نمونه‌های خون این افراد جمع‌آوری شد. نمونه‌گیری در مرکز تحقیقات ناباروری و سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی تبریز انجام پذیرفت، و از تاریخ مهرماه ۹۸ تا اسفندماه ۹۹ ادامه داشت. بیمارانی که علت مشخصی برای ناباروری یا سقط داشتند، نظیر کاریوتایپ غیرنرمال والدین (نظیر ترانسلوکاسیون)، آنومالی‌های رحمی، عدم تعادل هورمونی، اختلال در سیستم ایمنی (عدم تحمل یا تولرانس ایمنی)، بیماری‌های انعقادی، عفونت‌های تولید مثلی، اختلالات تیروئیدی، دیابت ملیتوس و غیره، از مطالعه حذف شدند و فقط مواردی که علت ناباروری یا سقط آن‌ها ناشناخته بود، برای انجام مراحل بعدی در مطالعه باقی ماندند. در موارد سقط نیز کاریوتایپ جنین سقط شده انجام شده بود، تا درصورت وجود آنومالی کروموزومی از مطالعه حذف شده و فقط جنین‌هایی که نتیجه کاریوتایپ نرمال داشتند، در مطالعه باقی ماندند. شرایط نمونه‌برداری به این صورت بود که افرادی که در آن‌ها سقط اتفاق افتاده بود، حداکثر تا یک هفته بعد از سقط نمونه‌برداری شدند.

بعد از جمع‌آوری نمونه‌های خون در ویال‌های وکیوم EDTAدار(5ml)، در سانتریوفوژ یخچال‌دار، به مدت ۱۰ دقیقه و با دور 12000rpm، سانتریوفوژ کرده و مایع روئی (پلاسما) را به میکروتیوب RNase free منتقل نمودیم. در نهایت تا زمان انجام مراحل بعدی، در فریزر۸۰ – ذخیره نمودیم. برای استخراج RNA تام سلولی، از کیت RNA isolation برند Exiqon vedbaek محصول کشور دانمارک، استفاده شد. استخراج RNA ی تام سلولی (total RNA) براساس پروتکل کیت استخراجی RNA انجام گرفت و سپس سنتز CDNA صورت پذیرفت.

پروتکل استخراج RNAی تام سلولی (total RNA) به این شکل بود که:

۱۰۰ میکرولیتر خون تام (whole blood) را به ۵۰۰ میکرولیتر lysis Buffer در میکروتیوب اضافه کرده و به خوبی ورتکس کردیم، یک دقیقه در دمای اتاق انکوبه شده و سپس مجدداً ورتکس شد.

۳٦۰ میکرولیتر بافر Precipitation اضافه کرده و به خوبی ورتکس نمودیم.

ستون (Spin Column) را در زیر ستون قرار داده و محتویات میکروتیوب را به ستون اضافه کرده و ۳۰ ثانیه در دمای اتاق با دورrpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ کرده و سپس محتویات زیر ستون را خالی نمودیم.

۷۰۰ میکرولیتر Wash Buffer1 اضافه کرده و ۹۰ ثانیه در دمای اتاق با دور rpm۱۲۰۰۰ سانتریفوژ نموده و محتویات زیر ستون را خالی کردیم.

۷۰۰ میکرولیتر Wash Buffer2 اضافه کرده و ۳۰ ثانیه در دمای اتاق با دور rpm۱۲۰۰۰ سانتریفوژ نموده و محتویات زیر ستون را خالی کردیم.

محتویات زیر ستون را خالی کرده و به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق دور rpm۱۲۰۰۰ سانتریفوژ کردیم تا ستون خشک شود و سپس زیر ستون را اوت کردیم.

ستون را در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری استریل قرار داده و به مرکز ستون ۳۵ میکرولیتر Elution Buffer اضافه نمودیم، به مدت ۳ دقیقه در heat Block در دمای ٦۵ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم.

در نهایت به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق با دور 12000 rpm سانتریفوژ کردیم.

تعیین خلوص و میزان RNA استخراج شده توسط دستگاه drop Nano به شرح زیر انجام گرفت:

این کار برای تعیین کمیت و کیفیت RNAی استخراج شده صورت گرفت. این مرحله توسط Nano Drop ND-1000 spectrophotometer (Nano drop technologies, Wilmington, DE, USA) انجام گرفت. در این مرحله رقت ۲/۹۸ از نمونه توسط آب مقطر تهیه شد. ابتدا دستگاه با آب مقطر به عنوان بلنک صفر شد و سپس با وارد کردن نمونه RNA ی تهیه شده در دستگاه، نتایج مربوط به میزان و خلوص به دست آمد (260/280 OD>1.6). در نهایت مقدار ۱ میکرولیتر از RNAی استخراج شده توسط کیت سنتز cDNAی شرکت زیست رویش توسط پرایمرهای stem-loop، براساس پروتکل شرکت، انجام پذیرفت. الکتروفورز RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز جهت کنترل کیفیت با مواد پودر آگارز (Agarose)، بافر TBE، Ladder، Loading dye، DNA safe stain، DEPES water، RNAی استخراج شده انجام گرفت. برای الکتروفورز RNAی استخراج شده بر روی ژل آگارز، از ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد. برای تهیه آن، با استفاده از ترازوی کالیبره، ۰/٤ گرم پودر آگارزرا وزن کرده و به داخل ارلن منتقل کردیم. مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از بافر TBE با غلظت 10X را در استوانه مدرج حجم کرده و به داخل ارلن اضافه نمودیم. ارلن بر روی heater با دمای تقریبی C°۲۰۰ قرار گرفت تا آگارز به طور کامل در داخل بافر TBEحل گردد. بعد از حل شدن کامل و خنک شدن نسبی، رنگ stain safe DNA به اندازه ۲/ ۰میکرولیتر و مقدار ۱۰ میکرولیتر DEPES water به داخل محلول اضافه گشته و بعد از یکنواخت شدن رنگ، ژل به داخل قالب که قبلا شانه‌ها در جایگاه آن قرار گرفته بودند، ریخته شد. بعد از بسته شدن، ژل به داخل تانک منتقل شد و داخل تانک با بافر TBE با غلظت 1X، تا حدی که از سطح ژل بالاتر شود، پر شد. هر نمونه از RNA با مقدار هم حجم خود از Loading dye ترکیب شده و به داخل چاهک مربوطه لود شد. یک چاهک نیز برای ladder در نظر گرفته شد. سپس نمونه‌ها در ولتاژ حدود ۹۰ولت run شدند. بعد از اینکه نمونه‌ها حدود دو سوم از ژل را طی کردند، دستگاه خاموش گشته و ژل به داخل دستگاه ژل داکت منتقل شد تا از حضور باندهای مربوط به RNA اطمینان حاصل گردد. برای سنتز cDNA جهت سنجش بیان miRNA، از کیت اختصاصی سنتز cDNA برای تک تک miRNAها استفاده شد.

مزیت استفاده از این کیت به دلیل استفاده از پرایمرهای اختصاصی miRNAها (پرایمرهای stem-loop به جای پرایمرهای UNIVERSAL)، جهت افزایش اختصاصیت بود. تمامی مراحل روی یخ، در زیر هود و تحت شرایط استریل انجام گرفت. به ازای هرنمونه مورد بررسی، دو میکروتیوب جداگانه تهیه شده و در هرمیکروتیوب ۱ میکروگرم از RNAی تخلیص شده اضافه شد. به میکروتیوب اول ۱/۵ میکرولیتر از پرایمر ۱ پیکومول Mir RT stem-loop primer و به میکروتیوب دوم ۱/۵ میکرولیتر از پرایمر ۱ پیکومول Housee Keeping RT stem-loop اضافه شد.

حجم میکروتیوب‌ها با آب مقطر تا ۱٤/۵ میکرولیتر رسانده شد. درب میکروتیوب‌ها بسته و به مدت ۵ دقیقه در دمای۷۰ درجه سانتیگراد گذاشته شد. سپس تیوب‌ها فورا spin شده، در کولین باکس گذاشته شد. سپس درب میکروتیوب‌ها را بسته، اسپین کرده و طبق پروتکل دمایی (ابتدا در زمان ٦۰ دقیقه و دما ۳۷ و سپس در زمان ۵ دقیقه و دما ۷۰ درجه) در ترماسایکلر قرار می‌دهیم. محصول cDNA به دست آمده حداکثر تا ۳ ماه در فریزر۲۰-درجه سانتیگراد قابل نگهداری بوده و برای نگهداری

طولانی مدت فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. همچنین cDNA سازی اختصاصی برای microRNA و Housee Keeping بصورت همزمان انجام می‌شود. میزان بیان miRNAی mir-146a در نمونه‌های پلاسمای افراد مورد مطالعه، توسط تکنیک qPCR، مورد ارزیابی قرار گرفت. امروزه از این تکنیک به عنوان یک روش دقیق و حساس جهت تعیین کمی DNA و RNA استفاده می‌شود.

یافته‌ها

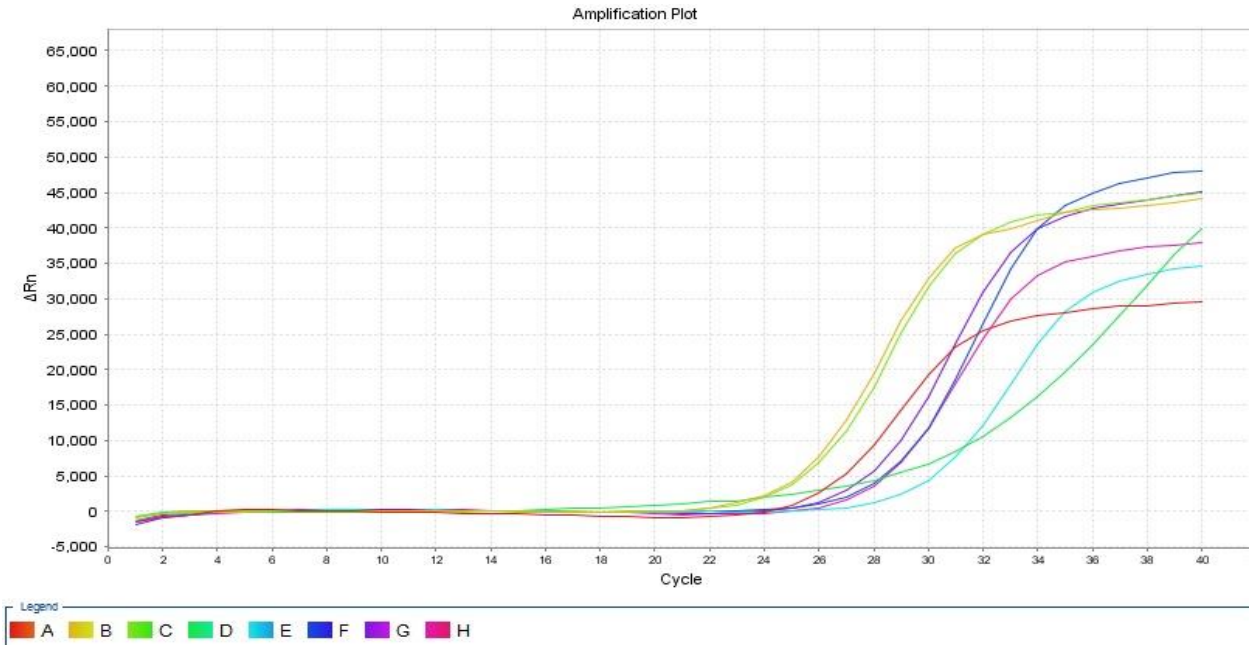
در تحقیق حاضر داده‌های مورد نیاز برای تحقیق در دو قسمت جمع‌آوری گردید. در بخش اول داده‌های دموگرافیک از طریق رضایتنامه و فرم‌های مخصوص جمع‌آوری گردید و در قسمت دوم از نمونه‌های کنترل و مشاهده پس از بررسی‌های لازم در صورت دارا بودن شرایط تحقیق از نمونه‌ها خون‌گیری به عمل آمد و سپس Total RNA استخراج گردید و در ادامه بیان آن‌ها توسط RT PCR در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه تحقیق داده‌ها در دو قسمت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده از طریق نرم‌افزارهای Exel، Spss نسخه ۲۱ و Roc انجام گردید که درادامه به آن‌ها به صورت تفصیلی پرداخته خواهد شد.

در مورد سقط مکرر(تعداد سقطها) نیز که در گروه مشاهده بررسی شده بود در این گروه بیشترین سقط به تعداد ۱۳ و کمترین تعداد ۲ است. برای ارزیابی میزان غلظت و کیفیت RNAی استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. لازم به ذکر است که می‌بایستی ابتدا تنظیمات دستگاه روی خوانش مولکول RNA تنظیم گردد. غلظت‌های استخراج شده در بازه ۸۳ تا ۲۹۳ نانوگرم بر میکرولیتر (ng/ml) بود. بر اساس پروتکل استاندارد، نسبت جذبی RNAهایی که درطول موج ۲۶۰/۲۸۰ خوانده شده در بازه ۱/۷ تا ۲/۲ قرار گرفته بودند؛ برای ادامه مراحل آزمایش مورد بررسی قرار گرفتند.

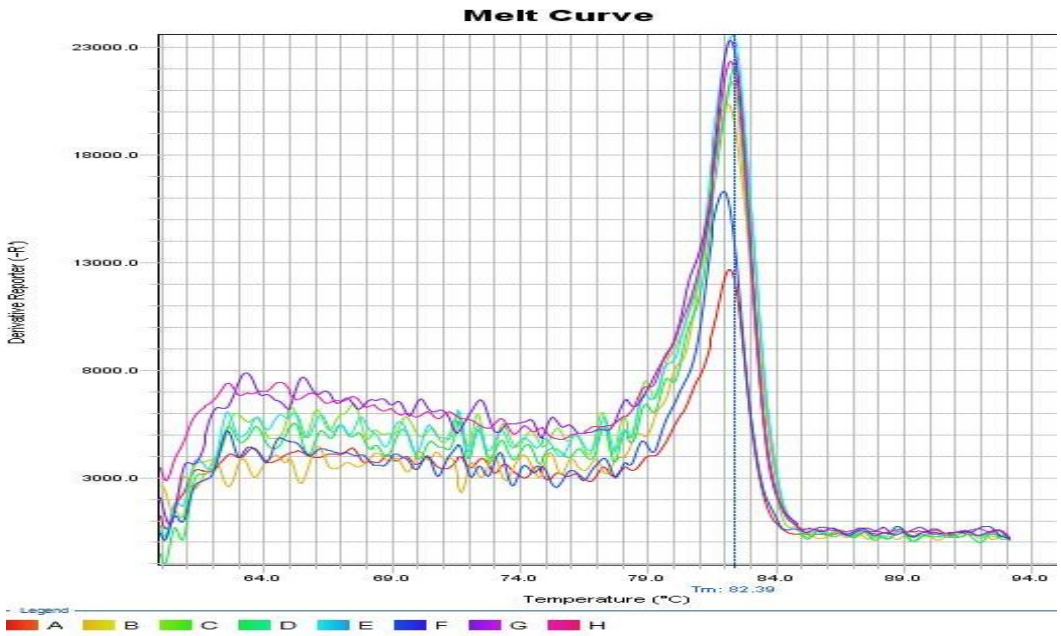
جهت اطمینان از دقت کار و صحت عملکرد تکثیر، محصولات RT PCR مربوط به ژن‌ها و HKها روی ژل آگارز ۲ درصد لود شدند. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، درصورت تکثیر صحیح، قطعه‌هایی با طول ۸۵ و ۷۵ جفت باز به ترتیب برای ژن‌ها و HKها به دست می‌آید که همراه با نمونه‌های فاقد c DNA (NTC) بر روی ژل آگارز ۲ درصد نمایان است.

نقشه تکثیر (Amplification plot) خروجی ازدستگاه برای نمونه مورد مطالعه مربوط به ژن miR-146a در شکل ۱ نشان داده شده است.

منحنی ذوب (Melting Curre) خروجی از دستگاه برای نمونه‌های مورد مطالعه مربوط به ژن‌های miR- 146a (82.39) در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل۱. نقشه تکثیر محصول Real Time PCR ژن miR - 146a برای نمونه‌ها



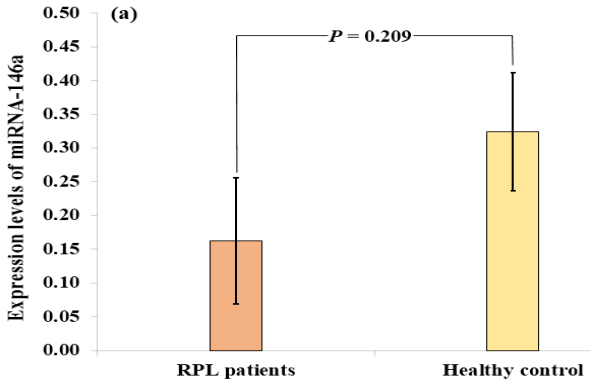
شکل ۲. منحنی ذوب Real Time PCR ژن miR - 146a برای نمونه‌ها

نتایج به دست آمده از RT PCR برای miR-146a در گروه‌های کنترل و مشاهده گردید که شدت بیان آنها در گروه سقط مکرر کمترین شدت بیان ۱۹/۷۶۰، بیشترین بیان ۳۳/۱۶۰، میانگین ۲۷/۳۹۱ و انحراف معیار ۲/۶۵۰ می‌باشد و در گروه کنترل کمترین بیان ۱۵/۱۸۰، بیشترین شدت بیان ۳۳/۱۶۰، میانگین ۲۳/۷۰۶ و انحراف معیار ٤/٥٩٧ است. در شکل ۳ نیز میانگین بیان نسبی ژن مدنظر در نمونه‌های کنترل و مشاهده نشان داده شده است.

با توجه به مطالعه صورت گرفته بر روی خون مادران باردار در دو گروه کنترل و مشاهده (بیمار) شامل ۶۰ نفر مادران باردار بدون سقط مکرر (کنترل) و ۶۰ نفر مادران باردار با سقط مکرر زود هنگام (زیر ۱۲ هفته) که دامنه سنی برای گروه کنترل بین ۲۰ الی ٤۲ قرار داشت و دامنه سنی برای گروه مشاهده بین ۲۲ الی ٤۰ قرار داشت؛ پس از انجام تکنیک Real time PCR که برای همه نمونه‌ها به منظور مقایسه بیان ژن‌ها miR-146a و به دست آمدن CTهای ژن‌های مدنظر مشخص گردید که تفاوت‌های معنی‌داری بین گروه‌های کنترل مشاهده برای این ژن وجود دارد که برای miR-146a تفاوت معنی‌داری در سطح (۰/۰۰۰) مورد تأیید قرار گرفت که مقایسه میانگین CT با ژن‌ها در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است.

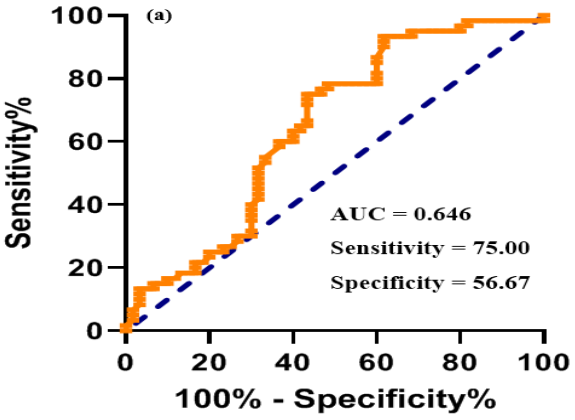
مقایسه میانگین بیان ژن‌ها

مقایسه میانگین بیان ژن‌های مورد نظر در گروه بیمار و کنترل انجام گردید که در شکل‌های ۳ و ٤ برای miRNA مد نظر به صورت جداگانه نشان داده شده است. لازم به ذکر است که مقادیر *P*-valu که در بالای هر نمودار است سطح معنی‌داری اختلاف میانگین بین دو گروه را نشان می‌دهد که اگر کوچکتر از ۰/۰۵ باشد، معنی‌دار است برای مقایسه میانگین از آزمون t استفاده شده است.



شکل ۳. میانگین بیان ژن mir146a در دو گروه بیمار و کنترل

برای miR-146a مقدار Fold Change برابر با عدد ٤/۳۲۱ و *P*= ۰/۱۰۲ که نشان می‌دهد که در miR-146a مقدار کاهش ٤/۳۲۱ برابر می‌باشد.



شکل ۴. نمودار خروجی نرم افزار ROC

اطلاعات به دست آمده از نرم‌افزار ROC برای miR-146a به شرح ذیل است.

miR-146a
- Auc =۰/۶۴۶۸
- PValue =۰/۰۰۵
- 0/95 CI =۰- /۰۷۴۶۸/۵۴۶۸
- Sensivity =۷۵
- Specificity =۵۶/۶۷
- CUT OFF VALUE =<۳/۷۰۵

با توجه به اعداد به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که miR-146a بیومارکر تشخیصی متوسط به بالایی می‌تواند باشد و محققان می‌توانند از این RNA به عنوان یک بیومارکر تشخیصی متوسط (متوسط به بالا) برای تشخیص در زنان با سقط مکرر استفاده نمایند. برای جواب به سوال پژوهش از آزمون t در نرم‌افزار Spss نسخه ۲۱ استفاده گردید که خروجی به دست آمده از تجزیه و تحلیل Ctهای به دست آمده به این شرح بود که میانگین بیان (Mean±SD) بدست آمده در گروه بیمار ۰/۷۲۱ ±۰/۱۶۲۷و در گروه کنترل ۰/۶۷۹ ±۰/۳۲۴۲ است و سطح معنی‌داری (Pvalue) برابر با ۰/۲۰۹است.

با عنایت به اعداد به دست آمده دیده می‌شود که در گروه بیمار میانگین بیان نسبت به گروه کنترل دارای کاهش بوده است و لیکن با عنایت به سطح معنی‌داری (P-value) بدست آمده، این تفاوت در این تحقیق معنی‌دار نمی‌باشد زیرا *P*-value به دست آمده بزرگ‌تر از ۰/۰۵ می‌باشد و در محدوده غیرقابل قبول قرار دارد فلذا فرضیه تحقیق رد و فرض صفر مورد قبول قرار می‌گیرد. البته با عنایت به شرایط تحقیق حاضر و اینکه آیا می‌تواند این miRNA مورد وثوق قرار گرفته باید گفت که می‌تواند بیومارکر تشخیصی می‌تواند استفاده شود.

بحث

بر اساس تحقیقات انجام شده سقط مکرر جنین می‌تواند آسیب‌های روحی روانی و اجتماعی به خانواده‌ها وارد نماید لذا پرداختن به این امر مهم و شناسائی عواملی که بتواند آن را کاهش دهد امری خطیر می‌باشد و این مسئله در حال حاضر به یکی از نگرانی‌های حوزه بهداشت و سلامت است. با توجه به نقش مهمی که miRNAها از طریق بیان ژن در این خصوص دارند به عنوان ریسک فاکتوری مهم در سقط جنین و دیگر بیماری‌ها به شمار می‌آیند. به همین علت محقق به اندازه‌گیری بیان miRNAی مدنظر جهت تعیین تفاوت معنی‌داری در دو گروه مادران با سقط مکرر زودهنگام و مادران با حاملگی طبیعی پرداخته است تا در صورت وجود تفاوت معنی‌دار از آن‌ها به عنوان بیومارکرهای تشخیصی برای سقط مکرر استفاده شود. در راستای نتایج به دست آمده برای فرضیه تحقیق و نتایج آزمایشگاهی به دست آمده و تحلیل‌های انجام شده برای miR-146a، تحقیق یانگ‌جو و همکاران که ارتباط پلی‌مورفیسم miR- 196a2T > C و miR 14, T > C و miR- 146a > G و miR- 499A > G را با ریسک خودبه‌خودی بررسی نمودند و به این نتیجه رسیدند که miR-146a با سقط مکرر خودبه‌خودی جنین ارتباط و همسویی دارد.[۲۸] و همسویی به این دلیل است که در تحقیق حاضر miR- 146a در بیماران نسبت به گروه کنترل کاهش بیان دارد فلذا می‌تواند ارتباط معنی‌داری بین بیان این miRNA و سقط مکرر وجود داشته باشد. همچنین تحقیق حاضر به لحاظ تفاوت در میزان بیان با تحقیق دانگ و همکاران همسویی دارد.[۲۷] همچنین تحقیق بارکیتا و همکاران نیز با تحقیق حاضر همسو بود زیرا آن‌ها هم به این نتیجه رسیدند که miRNAها به عنوان بیومارکرهای مهم زیستی هستند که از آن‌ها می‌توان برای تشخیص و پیشگیری از اختلالات بارداری از جمله سقط مکرر استفاده کرد.[۲۷] تحقیق ژاوو و همکاران نیز همسو با تحقیق حاضر بود. آن‌ها نیز در تحقیق خود به این نتیجه رسیدند که میزان بیان miR-146a درمادران با سقط مکرر در مقایسه با جمعیت کنترل به مقدار زیادی کاهش داشته است.[۲۸] تحقیق یانگ و همکاران که با عنوان ارتباط میزان بیان miRNAهای خون محیطی با سقط مکرر خودبه‌خودی انجام شد نیز با تحقیق و نتایج فرضیه اول تحقیق همسو بود زیرا در این تحقیق نیز محققان به این نتیجه رسیدند که miRNAهای مورد بررسی می‌توانند به عنوان فاکتورهای پیش‌بینی کننده سقط مکرر به کار گرفته شوند همچنین در تحقیقات انجام شده توسط هوآن‌چو و همکاران و تحقیق انجام شده توسط چنکن و همکاران نتایج مشابهی با تحقیق حاضر به دست آمد، به‌ویژه در تحقیق هوآن چو و

همکاران به این نتیجه رسیدند که miR-146a در گروه بیمار دارای کاهش بیان بود. نتایج تحقیق بارکیتا به همکاران نیز نتایج تحقیق حاضر را تأیید نمود و miRNAها را به عنوان بیومارکرهای تشخیصی برای تشخیص و پیشگیری از اختلالات بارداری از جمله سقط مکرر معرفی نمود.[۲۷] همچنین نتایج تحقیق کون‌یانگ و همکاران نیز با نتایج این تحقیق همسو بود، آن‌ها نیز در تحقیق خود ارتباط مستقیمی با سقط مکرر و نتایج انتقال جنین پیدا کردند و miRNAها را به عنوان ابزارهای جدید تشخیصی غیرتهاجمی برای سقط مکرر معرفی نمودند.[۲۸] همچنین نتایج تحقیقات عبدالمحمدی و همکاران که در سلول‌های خون محیطی انجام گردید نشان داد که miR-146a و miR-155 در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل کاهش بیان داشته‌اند و این نتایج تحقیق نیز با نتایج تحقیق ما همسو بود و نتایج به دست آمده ما را تأیید می‌کرد. در تحقیق مارتینا بارکیتا و همکاران نیز نقش miRNAها به عنوان بیومارکرهایی در نتایج حاملگی مطالعه شد که نتایج تحقیقات آن‌ها حاکی از این بود که miRNAها می‌توانند بیومارکرهای مهم زیستی برای تشخیص و پیشگیری از اختلالات بارداری از جمله سقط مکرر باشند که این نتایج نیز با نتایج تحقیق حاضر همسو بود.[۲۷] نهایتاً درتحقیقات عبدالمحمدی و همکاران و محمدکاظم حسینی و همکاران نیز نتایج مشابه و همسو با تحقیق ما دیده شد؛ آن‌ها نیز تفاوت در میزان بیان miRNAی مورد بررسی را مشاهده نموده و به این نتیجه رسیدند که miRNAها می‌توانند به عنوان بیومارکرهای تشخیصی در رابطه با بیماری سقط مکرر زودهنگام مورد استفاده باشند.[۳]

نتیجه‌گیری

باید در نظر داشت که داشتن فرزند یکی از اساسی‌ترین محرک‌های انسانی است و اگر تلاش برای حاملگی با شکست مواجه شود می‌تواند به یک مسئله تنش‌زا تبدیل شده و باعث اختلال در سلامت روانی زوجین شود وآسیب‌های روحی، روانی و اجتماعی به خانواده‌ها و جامعه وارد کند. بنابراین راه‌های تشخیص زود هنگام سقط مکرر می‌تواند تأثیر قابل ملاحظه‌ای در درمان و پیشگیری داشته باشد. با توجه به نتایج به دست آمده از نرم‌افزار ROC پیشنهاد می‌شود با عنایت به کاهش بیان miR-146a در بیماران با سقط مکرر از این miRNA به عنوان بیومارکر تشخیصی جهت شناسایی و درمان در زنان با سقط مکرر استفاده شود تا با شناسایی غیرتهاجمی از این طریق بتوان به درمان و سلامت جنین کمک نموده و با موفقیت حاملگی و با داشتن فرزند بتوان امید را در دل زوجین وخانواده‌ها زنده کرد وکمک شایانی به انگیزه و کیفیت زندگی این عزیزان نمود.

قدردانی

پژوهش حاضر برگرفته از رساله دکتری پریسا استاد حسن‌زاده ملکی در رشته ژنتیک است. از تمامی افرادی که در این پژوهش شرکت کردند و همچنین از ریاست و پرسنل محترم جهاد دانشگاهی تبریز کمال تشکر را می‌نماییم.

مشارکت پدیدآوران

پریسا استاد حسن زاده ملکی و جعفر محسنی طراحی، اجرای پژوهش و تحلیل نتایج مطالعه، سعید قربیان ایده‌پردازی و نقد و بررسی مطالعه را بر عهده داشتند. همچنین صدیقه عبدالهی فرد و چنگیز احمدی‌زاده در ایده‌پردازی مطالعه نقش داشته و مطالعه را خوانده و تأیید کرده‌اند.

منابع مالی

حمایت مالی ندارد.

دسترس‌پذیری داده‌ها

داده‌های مطالعه حاضر در صورت درخواست معقول از پدیدآور رابط ارائه می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه درکمیته سازمانی اخلاق در پژوهش‌های زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز با شناسه IR.IAU.TABRIZ.REC.1398.084 در تاریخ ۱۳۹۸/۰۹/۰۵ به تصویب رسیده است.

تعارض منافع

مؤلفان اظهار می‌دارند که منافع متقابلی از تألیف و انتشار این مقاله وجود ندارد.

References

1. Deyhoul N, Mohamadd St T, Hosseini M. Infertility-related risk factors: a Systematic review. International Journal of Women's Health and Reproduction Sciences 2017;5(1):24-9.
2. De Pol A, Vaccina F, Forabosco A, Cavazzuti E, Marzona L. Apoptosis of germ cells during human prenatal oogenesis. Human reproduction (Oxford,

England). 1997 Oct 1;12(10):2235-41. doi: 10.1093/humrep/12. 10.2235
3. Qin W, Tang Y, Yang N, Wei X, Wu J. Potential role of circulating microRNAs as a biomarker for unexplained recurrent spontaneous abortion. Fertility and sterility. 2016 May 1;105(5):1247-54. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.01 .028
4. Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case–control study. Human reproduction. 2002 Feb 1;17(2):446-51. doi: 10.1093/humrep/17.2.446
5. Song T, Liang Y, Cao Z, Du W, Li Y. Computational analysis of specific MicroRNA biomarkers for noninvasive early cancer detection. BioMed Research International. 2017;2017: 4680650. doi: 10.1155/2017/4 680650
6. Kaser D. The status of genetic screening in recurrent pregnancy loss. Obstetrics and Gynecology Clinics. 2018 Mar 1;45(1):143-54. doi: 10.1016/j.ogc.2017.10.007
7. Hosseini MK, Gunel T, Gumusoglu E, Benian A, Aydinli K. MicroRNA expression profiling in placenta and maternal plasma in early pregnancy loss. Molecular medicine reports. 2018 Apr 1;17(4):4941-52. doi: 10.3892/mmr.2018.8530
8. Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case–control study. Human reproduction. 2002 Feb 1;17(2):446-51. doi: 10.1093/humrep/17.2.446
9. Lee YH, Kim JH, Song GG. Meta-analyses of associations between interleukin-10 polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2016 May 1;200:51-7. doi: 10.1016/j.ejogrb.2016.02.032
10. Elovitz MA, Anton L, Bastek J, Brown AG. Can microRNA profiling in maternal blood identify women at risk for preterm birth?. American journal of obstetrics and gynecology. 2015 Jun 1;212(6):782-e1. doi: 10.1016/j.ajog. 2015.01.023
11. Li H, Ge Q, Guo L, Lu Z. Maternal plasma miRNAs expression in preeclamptic pregnancies. Biomed Res Int. 2013;2013:970265. doi: 10.1155/2013/970265
12. Schaefer A, Jung M, Kristiansen G, Lein M, Schrader M, Miller K, Stephan C, Jung K. MicroRNAs and cancer: current state and future perspectives in urologic oncology. Urol Oncol. 2010 Jan-Feb;28(1):4-13. doi: 10.1016/j.urolonc. 2008.10.021
13. Iorio MV, Casalini P, Piovan C, Braccioli L, Tagliabue E. Breast cancer and microRNAs: therapeutic impact. The Breast. 2011 Oct 1;20:S63-70. doi: 10.1016/s0960-9776(11)70297-1
14. Tomari Y, Zamore PD. Perspective: machines for RNAi. Genes & development. 2005 Mar 1;19(5):517-29. doi: 10.1101/gad.1284105
15. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2004 Mar 2;101(9):2999-3004.doi: 10.1073/pnas.0307323101
16. Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, et al. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2006 Jun 13;103(24):9136-41. doi: 10.1073/pnas.05088 89103
17. Gottwein E, Mukherjee N, Sachse C, Frenzel C, Majoros WH, Chi JT, et al. A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. Nature. 2007 Dec 13;450(7172):1096-9. doi: 10.1038/nature059 92
18. Jeon YJ, Kim SY, Rah H, Choi DH, Cha SH, Yoon TK, et al. Association of the mi R-146a C> G, mi R-149T> C, mi R-196a2 T> C, and mi R-499 A> G Polymorphisms with Risk of Spontaneously Aborted Fetuses. American Journal of Reproductive Immunology. 2012 Nov;68(5):408-17. doi: 10.1111/aji.12005
19. Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. Nature reviews cancer. 2010 Jun;10(6):389-402. doi: 10.1038/nrc2867
20. MW Z, MJ J, SC Z. Associations of lifestyle-related factors, hsa-miR-149 and hsa-miR-605 gene polymorphisms with gastrointestinal cancer risk. Molecular Carcinogenesis. 2012 Oct;51(S1):E21-31. doi: 10.1002/mc.20863
21. Suzuki Y, Kim HW, Ashraf M, Haider HK. Diazoxide potentiates mesenchymal stem cell survival via NF-κB-dependent miR-146a expression by targeting Fas. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2010 Oct;299(4):H1077-82
22. Avery S, Zafarana G, Gokhale PJ, Andrews PW. The role of SMAD4 in human embryonic stem cell self-renewal and stem cell fate. Stem Cells. 2010 May;28(5):863-73. doi: 10.1002/stem.409
23. Zhong H, Wang HR, Yang S, Zhong JH, Wang T, Wang C, et al. Targeting Smad4 links microRNA-146a to the TGF-β pathway during retinoid acid induction in acute promyelocytic leukemia cell line. International

journal of hematology. 2010 Jul;92(1):129-35. doi: 10.1007/s12185-010-0626-5

24. Sun G, Li H, Rossi JJ. Sequence context outside the target region influences the effectiveness of miR-223 target sites in the RhoB 3′ UTR. Nucleic acids research. 2010 Jan 1;38(1):239-52. doi: 10.1093/nar/gkp870
25. Rah H, Jeon YJ, Shim SH, Cha SH, Choi DH, Kwon H, et al. Association of miR-146aC> G, miR-196a2T> C, and miR-499A> G polymorphisms with risk of premature ovarian failure in Korean women. Reproductive sciences. 2013 Jan;20(1):60-8. doi: 10.1177/1933719112 450341
26. Anwar S, Anwar A. Infertility: A review on causes, treatment and management. Womens Health Gynecol. 2016;5:2-5.
27. Barchitta M, Maugeri A, Quattrocchi A, Agrifoglio O, Agodi A. The role of miRNAs as biomarkers for pregnancy outcomes: a comprehensive review. International Journal of Genomics. 2017 Oct;2017. doi: 10.1155/ 2017/8067972
28. YYZhen YQ. XXWang JMYang JShi HJZhang X, 2018 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. Journal of Translational Medicine. 2018;16:186. doi: 10.1186/s12967-018-1556-x
29. Zhao L, Li J, Huang S. Patients with unexplained recurrent spontaneous abortion show decreased levels of microrna-146a-5p in the deciduae. Annals of Clinical & Laboratory Science. 2018 Mar 1;48(2):177-82.
30. Palihawadana TS, Wijesinghe PS, Seneviratne HR. Aetiology of infertility among females seeking treatment at a tertiary care hospital in Sri Lanka. Ceylon Medical Journal. 2012 Jun 30;57(2):79-83. doi: 10.4038/cmj.v57i2.4461