

کاربرد فناوری های اومیکس در درمان سقط مکرر و ناباروری

غلامرضا پورسفی خیمه سری

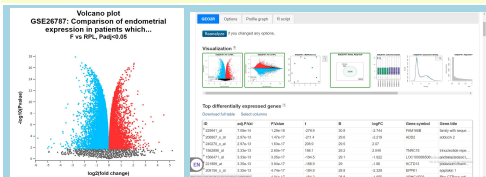
دکتری ژنتیک، مرکز جراحی محدود و درمان ناباروری مهر (بخش ژنتیک و IVF)، رشت، ایمیل:

rp.seifi@gmail.com



چکیده:

امروزه حدود ۱۵ درصد از جمعیت با مشکلات باروری درگیر هستند. فناوری‌های کمک باروری (ART) می‌توانند در حل این مشکلات راه‌گشا باشند. اما میزان اثربخشی این فناوری‌ها هنوز رضایت‌بخش نیست، یکی از دلایل این چالش، نبود دانش کافی از فیزیولوژی سلول‌های اسپرم، تخمک، رویان و اندومتر رحم است که این سه رکن اصلی، تعیین‌کننده نتایج مطلوب درمان ناباروری است. روش‌های درمانی رایج در این موارد تکرار درمان‌های پیشین است که معمولاً بدون کشف ریشه اصلی ناباروری در زوج مورد نظر انجام می‌شود. معیارهای مناسب برای سنجش دست کیفیت اسپرم، تخمک، رویان و اندومتر می‌تواند پیش‌گویی‌کننده احتمال موفقیت در درمان ناباروری باشد. سنجش‌های کنونی عمدتاً بر پایه ریکت‌شناسی اسپرم، تخمک و رویان بوده و اگرچه این استراتژی‌ها نتایج درمان را بهبود می‌بخشند، اما نیاز شدیدی به ابزارهای تشخیصی و درمانی جدید وجود دارد. پیدایش فناوری‌های اومیکس (ای‌ژنومیکس، ژنومیکس، ترانسکرپتومیکس، پروتئومیکس و متابولومیکس)، با حجم بالای اطلاعات دربارۀ فرآیندهای بیولوژیک در موفقیت تولیدمثل نقش دارند، امکان گسترش دانش ما در این زمینه را فراهم کرده و افق دید ما را با هزینه و تلاش نسبتاً اندکی در مورد سیستم‌های بیولوژیک پیچیده گسترش می‌دهد. با استفاده از پلتفرم‌های اومیکس تمامی رده‌ها و اجزای بیولوژیک، از جمله نشانه‌های اپی‌ژنتیک، ژن‌ها، mRNAها، پروتئین‌ها و متابولیت‌ها همگی مورد آنالیز قرار می‌گیرند. به بیان دیگر، ژنومیکس و ترانسکرپتومیکس امکان ارزیابی اطلاعات باقوه را فراهم کرده و پروتئومیکس اجزای ارزیابی پلان‌های درمانی واقعی اجرا شده را داده و متابولومیکس هم عمدتاً نتایج به دست آمده به دنبال اجرای این پلان‌ها را نمایش می‌دهد.



نمودار آتشفشانی رونوشت های افتراقی (نقاط قرمز زن های افزایش بیان، نقاط آبی زن های کاهش بیان و نقاط خاکستری رونوشت های غیرمعنی دار هستند). پس از انجام آنالیز رونوشت‌هایی بیشترین اختلاف را بین نمونه های سقط مکرر و کنترل نشان دادند به منظور انتخاب به عنوان بیومارکر پیش‌گویی‌کننده ی سقط مکرر در بارداری بعدی، در ابزارهای بیوانفورماتیک آنالیز KEGG، CYTOSCAPE، DAVID و ArrayExpress. سایر نرم افزارها مورد پردازش و آنالیز قرار می‌گیرند. در جدول زیر لیستی از ۱۷ رونوشت که بیشترین تفاوت را در میزان بیان در گروه سقط مکرر و گروه کنترل دارند نشان داده شده است. به عنوان مثال ژن FAM166B که در صدر این جدول جای گرفته با مقادیر بیان شده اش در دو تیمار در شکل زیر نشان داده شده است. چنانچه دیده می‌شود با افزایش بیان این ژن از سطح پایه، سقط جنین روی می‌دهد و بدین ترتیب این ژن می‌تواند در صورت بررسی های بعدی جهت معرفی به عنوان یک بیومارکر پیشنهاد شود.



NIH National Library of Medicine GEO DataSets. Search results for 'recurrent abortion'. The search results show 3 items, with the top result being 'Comparison of endometrial expression in patients which underwent recurrent abortions...'. The search filters include 'Expression profiling by array' and 'Human gene expression data'.

NCBI GEO Accession Display for GSE26787. The title is 'Comparison of endometrial expression in patients which underwent previous recurrent abortions, implantation failure after IVF/ICSI compared to control fertile'. The overall design section describes the study: 'Total RNA were extracted and used for hybridizing Affymetrix chips (GeneChip Human Genome U133 Plus2.0 Array). Data were normalized by RMA method and raw p-values adjusted by Bonferroni procedure (1%). Endometrial biopsy was performed in non-conceptual cycle in the middle luteal phase (5-7 women were selected in each group)'.

```
# Version info: 3.2.3, Biobase 3.20.0, GEOquery 2.40.0, limma 3.26.8
# Differential expression analysis with limma
library(GEOquery)
library(limma)
library(affy)

# Load series and platform data from GEO
getGE = getGEO("GSE26787", GSEMatrix=TRUE, AnnotGPL=TRUE)
if (length(getGE) > 1) idx <- group("GPL375", attr(get, "name")) else idx <- 1
get <- get[get[idx]]

# Make proper column names to match table
rownames(get) <- make.names(rownames(get))

# Group membership for all samples
get <- addSampleNamesTo(get, get[get, "sample"])

# Filter out excluded samples (marked as "X")
sel <- which(!get[, "X"] == "X")
get <- get[sel, ]

# Log2 transformation
log <- log2(get)

# Fit linear model
fit <- lmFit(log, design)
fit <- eBayes(fit)

# Use an estimate of limited number of non-zero coefficients
fit <- eBayes(fit, method="eBayes")
fit <- contrasts.fit(fit, contrast)
fit <- eBayes(fit)

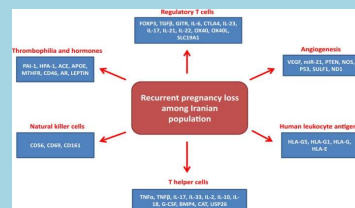
# Create Q-Q plot for t-statistics
plot(log, fit, main="Q-Q plot for t-statistics")

# Create volcano plot for t-statistics
plot(log, fit, main="Volcano plot for t-statistics")

# Create heatmap for t-statistics
heatmap(log, fit, main="Heatmap for t-statistics")
```

مقدمه:

سقط مکرر به سه یا بیشتر سقط در سه ماهه ی اول بارداری (عمدتاً ۸ تا ۱۲ هفتگی) گفته می‌شود. مهمترین دلایل سقط عبارتند از آنومالی های آناتومیک رحم، اشکالات هورمونی، ایمنولوژی (عدم تعادل ایمنی ناشی از سیتوکین های-T helper Th1/Th2/Th17)، عفونت ها، عوامل محیطی، آنومالی های کروموزومی و عوامل تک ژنی. سقط مکرر کامکان به صورت یک چالش پزشکی باقی مانده است. حدود ۵۰ درصد از موارد سقط های مکرر ممکن است ژنتیکی باشند. معمولاً نخستین آزمایش ژنتیک درخواست شده برای سقط مکرر، کاروتایپ خون محیطی از زوجین است. اما بسیاری از بیماران سقط مکرر هیچگونه نقص کروموزومی نشان نمی دهند. بنابراین نیاز به انجام یک پنل تشخیصی مارکرهای ژنتیک در کنار کاروتایپ وجود دارد.



اما در صورت پیدا کردن رونوشت های بیان شده ی ژنهای اصلی دخیل در این پدیده، می‌توان پنل بیومارکرهای پیش‌بینی‌کننده ی وضعیت سقط مکرر را پیشنهاد داد. با این هدف این پژوهش بر روی داده های پایگاه های عمومی GEO2R انجام شد.

مواد و روش‌ها:

یکی از فناوری های مبتنی بر اومیکس که در اینجا ارایه می‌شود، مطالعه ی بیان ژن با ترانسکرپتومیکس است که تفاوت الگوی بیان ژن را در افراد با سابقه ی سقط مکرر و گروه کنترل مقایسه کرده و با اعتبارسنجی و شناخت نقش های بیولوژیک رونوشت های دارای بالاترین تفاوت بین این دو دسته قصد داریم بیومارکرهای پیش‌گویی‌کننده ی وضعیت سقط مکرر را پیشنهاد داده و به عنوان یک پنل پیش‌گویی از وضعیت بارداری بیماری که سابقه ی بیش از دو بار سقط داشته است در بارداری های بعدی ارایه دهیم و به عبارت دیگر موفقیت درمان ناباروری یا وضعیت سقط مکرر را پیش‌بینی کنیم. داده های این مطالعه ی بیوانفورماتیک در پایگاه داده های عمومی www.ncbi.nlm.nih.gov در دسترس عموم قرار دارد. دیتاست های مورد استفاده عبارتند از: GSE26787 و GSE111974.

1. Devesa-Peiro A, Sebastian-Leon P, Pellicer A, Diaz-Gimeno P. Guidelines for biomarker discovery in endometriosis: correcting for menstrual cycle bias reveals new genes associated with uterine disorders. *Mol Hum Reprod*. 2021; Mar 24;27(4):gab011. doi: 10.1093/mhr/gab011. PMID: 33576824; PMCID: PMC80363681.

2. Altmae S, Koel M, Vasa U, Adler P, Suhorutkenko M, Laisk-Podar T, Kukushkina N, Saare M, Velhut-Merkas A, Krjutskov K, Aghajanova L, Lalitkumar P, G, Gemzell-Danielsson K, Giudice L, Simón C, & Salamek A. (2017). Meta-signature of human endometrial receptivity: a meta-analysis and validation study of transcriptomic biomarkers. *Scientific reports*, 7(1), 10077. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10098-3>

3. Teklenburg G, Salter M, Heijnen C, Macklon N, S., & Broens, J. J. (2010). The molecular basis of recurrent pregnancy loss: Impaired natural embryo selection. *Molecular human reproduction*, 16(12), 886-895. <https://doi.org/10.1093/mhr/gaa076>

4. Huang Y, Hao J, Liao Y, Zhou L, Wang K, Zou H, Hu Y, J. J. Transcriptome sequencing identified the ceRNA network associated with recurrent spontaneous abortion. *BMC Med Genomics*. 2021 Nov 23;14(1):278. doi: 10.1186/s12920-021-01125-4. PMID: 34814929; PMCID: PMC83699070.

5. Liu, X., Wu, J., Nie, H., Zhu, X., Song, G., Han, L., & Qin, W. (2022). Comprehensive Analysis of circRNAs, miRNAs, and mRNA Expression Profiles and ceRNA Networks in Decidua of Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion. *Frontiers in Genetics*, 13, 858641. <https://doi.org/10.3389/fgen.2022.858641>

6. Gan, J., Xu, T., Yang, H., Ao, Z., Cai, G., Hong, L., & Wu, Z. (2022). Non-Coding RNAs Regulate Spontaneous Abortion: A Global Network and System Perspective. *International journal of molecular sciences*, 23(8), 4214. <https://doi.org/10.3390/ijms23084214>

7. Gao Y, Tang Y, Sun Q, Guan G, Wu X, Shi F, Zhou Z, Yang W. Circular RNA FOXP1 relieves trophoblastic cell dysfunction in recurrent pregnancy loss via the miR-143-3p/SLMO1 axis. *Bioengineering*. 2021; 12:9081-9093. doi: 10.1089/beng.2021.12.9081. DOI: PMC - Published

8. Jia N, Li J. Noncoding RNAs in Unexplained Recurrent Spontaneous Abortions and Their Diagnostic Potential. *Diagn Biomarkers*. 2019;2019:7090767. doi: 10.1155/2019/7090767. DOI: PMC - Published

9. Regan L, Rai R. Epidemiology and the medical causes of miscarriage. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol*. 2000;14:839-854. doi: 10.1016/S0950-2688(00)01123-1. DOI: - Published

10. Tor-Torres M.H., Garrido-Gimenez C., Aljarcas-Reig J. Genetics of recurrent miscarriage and fetal loss. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol*. 2017;42:11-25. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2017.03.007. DOI: PMC - Published

11. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Electronic address, a.s.o. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: A committee opinion. *Fertil. Steril*. 2010;113:533-535. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.11.025. DOI: PMC - Published