

**Original Article****Hsa-Mir-1 and Hsa-Mir-1229 expression levels in recurrent miscarriage patients before and after lymphocyte therapy in comparison to control groups**Mortaza Raeisi<sup>1</sup>, Mehdi Yousefi<sup>2</sup>, Javad Ahmadian Haris<sup>3</sup>, Shahla Danaii<sup>4</sup>, Mohammad Tofighifard<sup>5</sup>, Pouya Bahlouli<sup>5</sup>, Leili Aghebati-Maleki<sup>6\*</sup><sup>1</sup>Hematology and Oncology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran<sup>2</sup>Department of Immunology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran<sup>3</sup>Department of Pediatric Diseases, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran<sup>4</sup>Gynecology Department, Eastern Azerbaijan ACECR ART Center, Eastern Azerbaijan Branch of ACECR, Tabriz, Iran<sup>5</sup>Stem Cell Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran<sup>6</sup>Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran**ARTICLE INFO****Article History:**

Received: 31 Jul 2023

Accepted: 23 Sep 2023

ePublished: 26 Feb 2024

**Keywords:**

- Lymphocyte Therapy
- MicroRNA
- Inflammation
- Recurrent Pregnancy Loss

**Abstract**

**Background.** Recurrent pregnancy loss is defined as at least two consecutive clinical pregnancy losses before 20th week of gestation. In this study, we investigated microRNA-1 and microRNA-1229 in recurrent miscarriage patients before and after lymphocyte therapy in comparison to control group.

**Methods.** First, a written and informed consent will be obtained from the target population of this study, who are people with RPL referring to Waliasr International Hospital. According to the standard protocol, the number of  $2 \times 10^7$  is injected subcutaneously to patients. Real-time PCR technique will be used to check the expression level of microRNA-1 and microRNA-1229.

**Results.** The gene expression level of micro-RNA 1 in RPL women before of lymphocyte therapy was  $2.030 \pm 1.445$  and the gene expression level of the same micro-RNA after the lymphocyte therapy of the mother was  $1.101 \pm 0.4780$ . Also, the expression level of micro-RNA 1229 in these women was reported to be  $2.100 \pm 0.6296$  before treatment and  $1.247 \pm 0.9631$  after treatment with lymphocytes. This level of gene expression in control group, for micro-RNA 1 and micro-RNA 1229 genes is  $1.000 \pm 0.08334$  and  $1.000 \pm 0.08091$ , respectively.

**Conclusion.** The results of our study showed a noticeable decrease in the gene expression of microRNAs under study, both microRNAs 1 and 1229, in women with a history of three consecutive injections of the father's subcutaneous lymphocytes.

**Practical Implications.** This study can show the therapeutic effect of lymphocyte for patients with recurrent miscarriage so that this treatment can be used along with other treatment methods.

**How to cite this article:** Raeisi M, Yousefi M, Ahmadian Haris J, Danaii Sh, Tofighifard M, Bahlouli P, Aghebati-Maleki L. Hsa-Mir-1 and Hsa-Mir-1229 expression levels in recurrent miscarriage patients before and after lymphocyte therapy in comparison to control groups. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2024;46(1):. doi: 10.34172/mj.2024.010. Persian.

**Extended Abstract****Background**

At least two successive clinical pregnancies lost before the 20th week of gestation are considered

recurrent pregnancy losses (RPL) or recurrent spontaneous abortions. Early embryos express paternal antigens, which trigger an immunological

\*Corresponding author; Email: [leili\\_aghebati\\_maleki@yahoo.com](mailto:leili_aghebati_maleki@yahoo.com)© 2024 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

response in the mother. As a result, regulatory mechanisms are needed to make the immune system accept the alien antigens. This work aimed to examine how several T-cell functions are influenced by epigenetic variables, particularly microRNAs. In the current study, we looked at microRNA-1 and microRNA-1229 in recurrent miscarriage (RM) patients before and after lymphocyte therapy in comparison to the control group. The effectiveness of treatment options for RM patients has been disputed and is still unknown. Various studies have shown the role of miR-1229 and miR-1 in increasing the death of cancer and endothelial cells.

## Methods

First, participants with RPL who were referred to Waliasr International Hospital were asked to sign a written and informed consent form. Then, 10 mL of heparinized blood samples from patients were used to prepare peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), which were then extracted using Ficol 1.077. A number  $2 \times 10^7$  was administered subcutaneously to patients who experienced RM in accordance with the normal protocol. Overall, the injection was replicated three times at one-month intervals. Next, a real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to determine the expression levels of microRNA-1 and microRNA-1229 molecules. Twenty-five individuals with a history of at least three RMs and who had received more than three cycles of intradermal lymphocyte therapy were chosen to take part in the study after consulting with a reputable gynecologist and obstetrician. In addition, 25 healthy women with a track record of healthy pregnancies comprised the control group. Blood PBMCs were extracted from these subjects' 10 cc of heparinized blood samples at the beginning of the trial using Ficoll 1.077. Before and after receiving lymphocyte therapy, the expression level of microRNAs was assessed in both the group of patients with RM and the healthy control group. RT-PCR was employed to compare the expression levels of immune system-related microRNAs, such as has-miR-1 and has-miR-1229, in the study groups before and after the treatment. First, all the RNAs were extracted from the PBMCs

of individuals who had experienced RMs using a kit made by Qiagen Company. Subsequently, SYBR Green dye (an intercalating dye with double-stranded DNA) and specific gene primers were used to amplify the cDNA synthesized from the aforementioned genes in a thermocycler. It should be mentioned that the *U6* gene was utilized to normalize the measurement of the *microRNA* gene (as an internal control).

## Results

In this study, the gene expression level of microRNA 1 in RPL women was  $2.030 \pm 1.445$  prior to three cycles of subcutaneous lymphocyte injection, and it was  $1.101 \pm 0.4780$  following the mother's lymphocyte therapy. Additionally, these women's *micro-RNA 1229* gene expression levels were reported to be  $2.100 \pm 0.6296$  prior to treatment and  $1.247 \pm 0.9631$  following three cycles of paternal lymphocyte therapy. For *micro-RNA 1* and *micro-RNA 1229* genes, this level of gene expression in women with a history of successful pregnancies as a control group was  $1.000 \pm 0.08334$  and  $1.000 \pm 0.08091$ , respectively. The findings of this research demonstrated that one of the primary factors contributing to RMs is a problem in the expression of microRNAs associated with inflammation. The mother's immune system is composed of a variety of cell populations and molecules that tolerate a variety of environmental conditions. The balance between the elements that improve immunological tolerance and the ones that reject the fetus has a substantial impact on pregnancy outcomes because it controls the mother's immunity to the fetus during pregnancy and avoids fetus rejection. In this study, it was found that lymphocyte treatment reduces the expression of two miRNAs associated with inflammation and endothelial cell death, which are elevated in individuals who have had multiple abortions.

## Conclusion

Our findings revealed a notable reduction in the gene expression of the target microRNAs, microRNAs 1 and 1229, in females who had previously had three consecutive injections of the father's subcutaneous cells. For individuals who

experience repeated miscarriages, this study can demonstrate the therapeutic value of lymphocytes, allowing for the combination of this therapy with other forms of treatment. This decrease in gene expression and the level of the graph approaching the control group will increase the rate of successful pregnancies in mothers with a history of frequent miscarriages. However, limited studies have sought

to investigate the effect of subcutaneous lymphocyte therapy on improving pregnancy rates in women with RMs. It is suggested that future studies evaluate the effects of subcutaneous lymphocyte therapy on the expression level of other genes involved in the regulation of the immune system in a larger sample size.

## میزان بیان hsa-miR-1229 و hsa-miR-1 در زنان مبتلا به سقط جنین‌های مکرر قبل و بعد از درمان با لنفوسیت در مقایسه با گروه کنترل

مرتضی رئیس<sup>۱</sup>، مهدی یوسفی<sup>۲</sup>، جواد احمدیان هریس<sup>۳</sup>، شهلا دانایی<sup>۴</sup>، محمد توفیقی فرد<sup>۵</sup>، پویا بهلولی<sup>۵</sup>، لیلی عاقبتی ملکی<sup>۶\*</sup>

<sup>۱</sup> مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

<sup>۲</sup> گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

<sup>۳</sup> گروه بیماری‌های کودکان، دانشکده پزشکی، مرکز آموزشی و درمانی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

<sup>۴</sup> مرکز درمان ناباروری سازمان جهاد دانشگاهی استان آذربایجان شرقی، تبریز، ایران

<sup>۵</sup> مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

<sup>۶</sup> مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

### چکیده

**زمینه.** سقط مکرر بارداری به صورت حداقل دو سقط بالینی متوالی قبل از هفته بیستم بارداری تعریف می‌شود. در این مطالعه hsa-miR-1229 و hsa-miR-1 را در بیماران سقط مکرر قبل و بعد از درمان با لنفوسیت در مقایسه با گروه شاهد بررسی کردیم.

**روش کار.** ابتدا رضایت‌نامه کتبی و آگاهانه از جامعه هدف این مطالعه که افراد مبتلا به RPL مراجعه‌کننده به بیمارستان بین‌المللی ولیعصر بودند، اخذ شدند. طبق پروتکل استاندارد، تعداد ۱۰۷×۲ به صورت زیر جلدی به بیماران تزریق گردید. برای بررسی میزان بیان مولکول‌های hsa-miR-1229 و hsa-miR-1 از تکنیک Real-time PCR استفاده شد.

**یافته‌ها.** سطح بیان ژن micro-RNA 1 در زنان RPL قبل از لنفوسیت درمانی  $1/445 \pm 2/03$  و سطح بیان ژن همان micro-RNA پس از لنفوسیت درمانی مادر  $0/478 \pm 1/101$  بود. همچنین میزان بیان micro-RNA 1229 در این زنان قبل از درمان  $2/10 \pm 0/6296$  و بعد از درمان با لنفوسیت  $0/9631 \pm 1/247$  گزارش شد. این میزان بیان ژن در گروه کنترل برای ژن‌های micro-RNA 1229 و micro-RNA 1 به ترتیب  $1/000 \pm 0/08091$  و  $1/000 \pm 0/08334$  است.

**نتیجه‌گیری.** میکرو RNA های hsa-miR-1 و hsa-miR-1229 نقش مهمی در افزایش فاکتورهای التهابی و میزان موفقیت و شکست بارداری را نشان داد. استفاده از درمان لنفوسیت‌تراپی می‌تواند عملکرد سلول‌ها در القای تنظیم سیستم ایمنی از طریق کاهش بیان میکرو RNA های ذکر شده گردد.

**پیامدهای عملی.** این مطالعه می‌تواند اثر درمانی لنفوسیت را برای بیماران دارای سقط مکرر نشان دهد تا در کنار سایر روش‌های درمانی این درمان هم استفاده شود.

### اطلاعات مقاله

#### سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۰۹

پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۰۱

انتشار برخط: ۱۴۰۲/۱۲/۰۷

#### کلید واژه‌ها:

- لنفوسیت درمانی
- میکرو RNA
- التهاب
- سقط مکرر

### مقدمه

می‌باشد. تحقیقات زیادی بر اهمیت نقش سیستم ایمنی مادر در فرآیند لانه‌گزینی و نگهداری محصول حاملگی پس از بارداری اشاره کرده‌اند.<sup>۳</sup> جنین با دارا بودن نیمی از آنتی‌ژن‌های پدری به‌عنوان یک سمی آلوگرافت، توانایی تحریک و برانگیختن پاسخ‌های سیستم ایمنی مادر را دارد. بنابراین برای یک بارداری موفق و تولد نوزاد سالم باید نوعی تحمل نسبت به این آنتی‌ژن‌های پدری در بدن مادر پدید آید. هرگونه اختلال و شکست در این مکانیسم‌های تنظیمی منجر به ناباروری و سقط

سقط خودبخودی شایعترین عارضه حاملگی است.<sup>۱</sup> سقط مکرر (RPL) به از دست دادن دو یا تعداد بیشتری از حاملگی‌ها قبل از هفته ۲۰ یا ۲۴ به‌صورت متوالی یا متناوب گفته می‌شود.<sup>۲</sup> علت سقط حتی در بررسی‌های دقیق در نیمی از موارد غیرقابل توجیه باقی می‌ماند. طبق مطالعاتی که در سال‌های اخیر انجام شده یکی از مهمترین مکانیسم‌های احتمالی در شکست لانه‌گزینی سیستم ایمنی مادر می‌باشد زیرا جنین به‌عنوان یک سمی آلوگرافت (Semi allograft) برای مادر

\* نویسنده مسؤول؛ ایمیل: leili\_aghebati\_maleki@yahoo.com

مطالعات نشان داده است که این miR در سرکوب التهاب و افزایش تکثیر سلول‌ها و همچنین در افزایش میزان مرگ سلول‌های اندوتلیال نقش دارند.<sup>۸</sup> مطالعات همچنین نشان داده‌اند که میکرو RNAهای دخیل در تنظیم و کنترل التهاب hsa-miR-1229 و hsa-miR-1 هستند.<sup>۹</sup> در ادامه نشان داده شده است که افزایش بیان has-miR-1 با تأثیر و مختل کردن مسیرهای سیگنالینگ باعث افزایش فراوانی و فعالیت Th17 می‌شود.<sup>۱۰</sup> با در نظر گرفتن نقش قابل توجه سیستم ایمنی در روند یک بارداری موفق و نیز تولد نوزاد زنده، انتظار می‌رود در کنار درمان‌های رایج و شناخته شده‌ای که برای بیماران سقط مکرر تا به امروز استفاده شده‌اند، درمان‌های مرتبط با اختلالات ایمونولوژیک مسؤول سقط مکرر نیز مؤثر واقع گردند. از جمله درمان‌های پیشنهادی در این راستا لنفوسیت‌تراپی است. در این روش به منظور ایجاد تولرانس در برابر آنتی‌ژن‌های جنینی با منشأ پدري که قادر به تحریک و راه‌اندازی پاسخ‌های سیستم ایمنی مادر هستند، از لنفوسیت‌های پدري استفاده می‌شود تا شانس بقای بارداری و تولد نوزاد زنده را افزایش دهد.<sup>۱۱</sup> در این مطالعه تأثیر لنفوسیت‌تراپی را در میزان بیان microRNAهای دخیل در کنترل و تنظیم عملکرد سلول‌های ایمنی مؤثر در روند بارداری و پاسخ‌های التهابی از جمله میکرو RNAهای hsa-miR-1229 و hsa-miR-1 را مورد بررسی قرار دادیم.

### روش کار

ابتدا از افراد مبتلا به سقط مکرر مراجعه‌کننده به بیمارستان بین‌المللی ولیعصر که جمعیت هدف ما در این طرح بودند و نیز گروه کنترل متشکل از زنان سالم و بارور با سابقه بارداری‌های قبلی موفق و تولد نوزاد سالم رضایت‌نامه کتبی و آگاهانه دریافت شد. اصول گایدلاین (SAGER) در این مقاله رعایت شده است. گروه بیمار و گروه کنترل از نظر سن و شرایط فیزیکی، فرهنگی و اقتصادی مؤثر بر سلامت و باروری همسان بودند. تعیین دقیق حجم نمونه با استفاده از شیوع کلی بیماری در دنیا که برابر با ۵ تا ۸ درصد تعداد کل بارداری‌ها و بر اساس فرمول برآورد حجم نمونه Cochrane و همچنین بر پایه مطالعات مشابه و محدودیت در انجام آزمایشات و هزینه‌ها صورت پذیرفت. از آنجاییکه ژنتیک و نژاد هر فرد در اثربخشی درمان مؤثر است بیماران ما فقط از افراد آذری زبان انتخاب شدند. بیمارانی که وارد این مطالعه شدند سن کمتر از ۴۰ سال و BMI زیر ۳۰ داشتند. این بیماران با سیکل‌های قاعدگی منظم و فاقد هرگونه پاتولوژی رحمی بودند. دارای حداقل سه سقط متوالی

خواهد شد.<sup>۴</sup> علاوه بر این، شواهد فراوانی وجود دارد که نشان می‌دهد سقط مکرر جنین دارای استعداد ژنتیکی است و معمولاً سابقه خانوادگی نشان می‌دهد. عوامل مختلفی مانند عفونت، قرار گرفتن در معرض خطرات محیطی، بی‌نظمی‌های هورمونی، لانه‌گزینی نامناسب تخمک بارور شده و عوامل ژنتیکی از جمله فاکتورهای مؤثر در سقط مکرر است. مطالعات گسترده ژنومی نشان داده است که میکرو RNAها از عوامل ژنتیکی جدید مؤثر در سقط جنین می‌باشند که با تغییرات بیان ژنها نقش خود را ایفا می‌کنند.<sup>۵</sup> نقش تنظیم‌کنندگی ژن میکرو RNAها هم اکنون به خوبی شناسایی شده است و عملکرد میکرو RNAها را برای تکوین سیستم‌های فیزیولوژیکی مختلف و حفظ هومئوستاز سلولی و عملکرد طبیعی آنها ضروری می‌دانند. امروزه موضوع بررسی میکرو RNAها و شناسایی بیان و عملکرد آنها در طیف گسترده‌ای از بیماری‌های انسان شامل انواع مختلف سرطان، عفونت، التهاب‌های مزمن و بیماری‌های خودایمنی مورد توجه قرار گرفته است.<sup>۶</sup> در دو دهه گذشته مشخص شده است که میکرو RNAها در بیمارهای مختلفی مانند بیماری‌های سیستم ایمنی، سیستم عصبی، انواع سرطان و غیره نقش دارند. همچنین مطالعات اخیر نشان داده‌اند که میکرو RNAها در اندومتريوز، پره اکلایمسی و ناباروری دخیل هستند. به علاوه، میکرو RNAهای زیادی چه در حالت بیماری و چه در حالت نرمال در آندومتر شناخته شده‌اند و بیانگر این هستند که احتمالاً برای عملکرد نرمال سیستم تولید مثل ضروری می‌باشند.<sup>۷</sup> لنفوسیت‌های B و T سلول‌های اصلی سیستم ایمنی اکتسابی هستند. اهمیت میکرو RNAها در تنظیم ایمنی اکتسابی در مطالعاتی که بیوسنتز میکرو RNAها را در پیش‌سازهای لنفوسیتی نشان می‌دهند، تأیید می‌کند. به‌عنوان نمونه، نشان داده شده که عدم سنتز میکرو RNA در شرایط نبود آنزیم Dicer در مراحل اولیه تولید لنفوسیت‌های T، سبب نقص در تکوین و کاهش تعداد سلول T در تیموس و اندام‌های لنفوئیدی محیطی، تمایز نابجای سلول‌های T کمکی و تولید سایتوکاین می‌شود. بیان این دسته از میکرو RNAها، با تغییر عملکرد این فاکتور رشد، فعالیت سلول T تنظیمی را تغییر می‌دهد. اطلاعات به دست آمده در رابطه با این میکرو RNAها نشان می‌دهد که miR-1229 در سرکوب مهاجرت و متاستاز سلول‌های سرطانی کبد نقش مهمی ایفا می‌کند و سلول‌های T تنظیمی فعالیت سلول‌های T فعال را به‌منظور حفظ هومئوستاز سیستم ایمنی و تحمل آنتی‌ژن خودی، مهار می‌کنند.<sup>۷</sup> همچنین در رابطه با میکرو RNA-1 هم همین نقش ذکر شده است و

از روی ژن‌های مذکور را در دستگاه ترموسیکلر تکثیر دادیم. لازم به ذکر است که جهت نورمالایز کردن اندازه‌گیری ژن میکرو RNAها از ژن U6 (به‌عنوان کنترل داخلی) استفاده شد. ارزیابی این میکرو RNAها بر اساس میزان فلورسانس تولید شده از رنگ مذکور صورت گرفت. جدول ۱ توالی پرایمر ژن‌ها را نشان می‌دهد.

جدول ۱. توالی پرایمر

نام ژن	نوع پرایمر	توالی ۳' ۵'
Has-miR-1	مستقیم	TGGAATGTAAAGAAGTATGT
	معکوس	GAACATGCTGCGTATCTC
Has-miR-1229	مستقیم	CTCTCACCCTGCCCT
	معکوس	GAACATGCTGCGTATCTC

### درمان سلول‌های تک هسته‌ای (لنفوسیتی)

گروه بیماران مبتلا به سقط مکرر لنفوسیت‌های جدا شده از نمونه‌های خونی همسر خود را دریافت کردند. طبق پروتکل استاندارد تعداد  $10^7 \times 2$  لنفوسیت‌های شوهر به‌صورت زیرجلدی روی ساعد یا بازوها به بیماران مبتلا به سقط مکرر تزریق شد.<sup>۱۲</sup> تعداد دفعات تزریق سه مرتبه و با فواصل زمانی سه هفته بود.

### تجزیه و تحلیل آماری

برای آنالیز داده‌های Real-time PCR از روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  استفاده شد. سپس داده‌ها به‌صورت میانگین با محاسبه میزان خطای استاندارد نمایش داده شدند. تمام تست‌های آمار به وسیله نرم‌افزار GraphPad Prism version 7.00 مورد تأیید قرار گرفتند و نمودارها توسط نرم‌افزار رسم شد. جهت بررسی آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) استفاده شد. سطح معنی‌دار برای محاسبات آماری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

در این مطالعه ۲۵ نفر بیمار مبتلا به سقط مکرر و ۲۵ نفر فرد سالم با سابقه بارداری‌های موفق وارد شدند. جدول ۲ خلاصه‌ای از اطلاعات دموگرافیک و بالینی مربوط به نمونه‌های مورد بررسی را ارائه می‌دهد.

جدول ۲. اطلاعات دموگرافیک و بالینی افراد مورد مطالعه

متغیر	گروه کنترل (۲۵)	گروه بیماران مبتلا به سقط مکرر (۲۵)	P
سن	۲۷/۳۲±۲/۱	۲۷/۶۴±۲/۸	۰/۰۵<
سقط مکرر	-	۲۵	-
سقط مکرر اولیه	-	۱۰	-
سقط مکرر ثانویه	-	۱۵	-
تعداد سقط	-	۳/۶۵±۰/۸۱	-

بودند. علاوه بر این سابقه‌ی هیچ نوع ایمونوتراپی در پرونده پزشکی خود نداشتند. بیمارانی که خود یا همسر آن‌ها کاربوتایپ غیرطبیعی یا اختلالات ژنتیکی و کروموزومی داشتند، بیمارانی که دارای بیماری مزمن زمینه‌ای بوده که مجبور به مصرف داروهای خاص بودند و یا با سابقه‌ی بیماری آسم و آلرژی، بیمارانی که دارای آنومالی‌های داخل رحمی، سندرم تخمک پلی‌کیستیک بودند، بیماران دارای موتاسیون‌های درگیر کننده سیستم انعقادی، بیمارانی که نتیجه تست HIV, HCV و یا HBV آن‌ها مثبت بود، از مطالعه خارج شدند. همچنین از آنجاییکه اختلال در اسپرم در شکست مکرر لانه‌گزینی نقش دارد جهت حذف این عامل مخدوش کننده، بیمارانی انتخاب شدند که آنالیز اسپرم و تست DNA fragmentation همسر آن‌ها نرمال بود.

### جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی

بعد از انجام مشاوره با متخصص محترم زنان و زایمان، ۲۵ بیمار با سابقه‌ی حداقل سه بار شکست مکرر بارداری و مورد درمان با بیش از سه دوره لنفوسیت تراپی داخل جلدی برای شرکت در طرح مورد مطالعه انتخاب شدند. بیماران قبل از دریافت لنفوسیت برای اندازه‌گیری میزان میکرو RNAها هیچگونه درمان دیگری دریافت نکرده‌اند. همچنین گروه کنترل شامل ۲۵ نفر زنان سالم با سابقه بارداری موفق در نظر گرفته شدند و برای بیماران آزمایش کاربوتایپ انجام نشده است. برای شروع مطالعه از این افراد ۱۰ سی‌سی نمونه خون هیپارینه گرفته شده و با استفاده از فایکول ۱/۰۷۷ سلول‌های تک هسته‌ای خون (PBMCs) جدا شدند. میزان بیان میکرو RNAها در گروه کنترل سالم و نیز در گروه بیماران مبتلا به سقط مکرر قبل و بعد از دریافت درمان لنفوسیتی اندازه‌گیری شد.

### استخراج RNA و سنتز cDNA و بررسی بیان میکرو RNAها

قبل و پس از دریافت درمان، ارزیابی میزان بیان میکروRNAهای مرتبط با سلول‌های سیستم ایمنی اعم از میکرو RNAهای has-miR-1229 و has-miR-1 در گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از روش Real-time PCR انجام شد. به گونه‌ای که ابتدا با استفاده از کیت استخراج RNA ساخت شرکت کیاژن اقدام به استخراج تمامی RNAهای موجود در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به سقط مکرر کرده و در ادامه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی اقدام به تولید cDNA از ژن‌های مورد نظر کردیم. در ادامه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن و رنگ SYBR Green، که یک رنگ اینترکاله شونده با DNAی دو رشته‌ای است، cDNA سنتز شده

ایمنی مادر از جمعیت سلولی و مولکول‌های مختلفی تشکیل شده‌است که تحمل ایمنی مادر به جنین را در طی دوران بارداری تنظیم نموده و از پس زده شدن جنین جلوگیری می‌کند. بنابراین بالانس بین فاکتورهای تقویت‌کننده تحمل ایمنی و فاکتورهای ردکننده جنینی تأثیر بسزایی بر پیامدهای حاملگی دارد. در این مطالعه نشان داده شد که بیان دو میکرو RNA مربوط به التهاب و آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال که در بیماران سقط مکرر دارای بیان افزایش یافته‌ای است، پس از نفوسیت‌تراپی بیان آنها کاهش معنی‌داری یافته است. مطالعات پیشین انجام گرفته در این زمینه، از جمله مطالعه Alex Simon و Neri Lufner علل ایجادکننده سقط مکرر را به دو گروه فاکتورهای مادری و فاکتورهای جنینی تقسیم‌بندی کرده‌اند. از علل مادری می‌توان به مشکلات آناتومیکی (میوم، پولیپ، ضایعات چسبیده و ...)، مشکلات در ضخامت اندومتر و قدرت پذیرش آن، بیماری‌های ترومبوفیلی، بیماری‌های بافت همبند و مشکلات ایمونولوژیک اشاره کرد. ۱۴۱۳

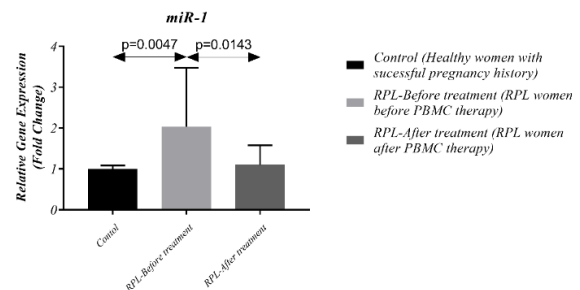
miRNAها در مراحل مختلف بارداری به‌طور گسترده‌ای توسط تروفوبلاست‌های جفت بیان می‌شوند و تمامی مراحل بارداری از جمله بازسازی اندومتر رحم، تکثیر سلول‌ها، رگ‌زایی و تشکیل دسپودا را تحت تأثیر قرار دهند. از این‌رو عدم تنظیم miRNAها می‌تواند با اختلالات بارداری در ارتباط باشد. همچنین مطالعاتی مبنی بر تفاوت این فاکتورها در افراد سالم و افراد مبتلا به انواع اختلالات بارداری وجود دارد که بیان می‌کند الگوی بیان miRNA در زنانی که بارداری نرمال دارند در مقایسه با زنان دچار اختلالات بارداری متفاوت است. همچنین بیان کردند که miRNAهای مربوط به کاهش تعداد سلول‌های Treg و افزایش سلول‌های Th17 با نتایج نامطلوب بارداری در ارتباط است. ۵

به‌عنوان مثال، miR-223 علاوه بر عملکرد برجسته آن در گسترش پلی مورفونوکلوئریک و نیز تنظیم فعالیت آنها، پاسخ‌های التهابی فاگوسیت‌های تک هسته‌ای را با تعدیل کردن واکنش مهارکننده  $\alpha$  کیناز NF- $\kappa$ B (IKK $\alpha$ ) در طول توسعه منوسیت به ماکروفاژ، کنترل می‌کند. نتایج مطالعه ما نشان داد که سطح بیان has-miR-1 در گروه RPL به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود. همچنین سطح بیان has-miR-1229 در بیماران RPL به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرده بود. بر اساس یافته‌های پیشین، به نظر می‌رسد تزریق لکوسیت‌ها همراه با ساختار آنتی‌ژنیک مشابه سلول‌های تروفوبلاست، موجب فعال شدن سلول‌های سیستم ایمنی مادر برای تحمل در مقابل جنین و در نتیجه سبب بهبود یافتن رشد جنینی قبل و بعد از لانه‌گزینی خواهد شد و همین امر موجب استفاده و رواج این نوع

فشار خون سیستولیک	۱۱۵/۲±۱۲/۸	۱۲۹/۴±۱۴/۸	۰/۰۰۰۹
فشارخون دیاستولیک	۷۴/۱±۶/۴	۸۳/۳±۱۰/۲	۰/۰۰۷۴
شاخص توده بدنی	۲۷/۳۴±۳/۱۱	۲۷/۸۹±۲/۱۴	۰/۰۰۵۰
قند خون ناشتا	۱۰۴/۶±۱۰/۵۵	۱۴/۸۲±۱۱۶/۶	۰/۰۰۱۹
کلسترول تام	۱۴۹/۳±۲۸/۸	۲۰۹/۷±۳۵/۴	<۰/۰۰۰۱
لیپوپروتئین با چگالی بالا	۵۱/۸۲±۵/۹۴	۴۸/۹۱±۶/۳۶	۰/۰۰۵۰
لیپوپروتئین با چگالی کم	۷۱/۲۹±۷/۶۵	۹۵/۱۶±۲۱/۰۳	<۰/۰۰۰۱
تری‌گلیسرید	۱۵۶/۴±۴۱/۲	۲۲۴/۳±۴۸/۱	<۰/۰۰۰۱

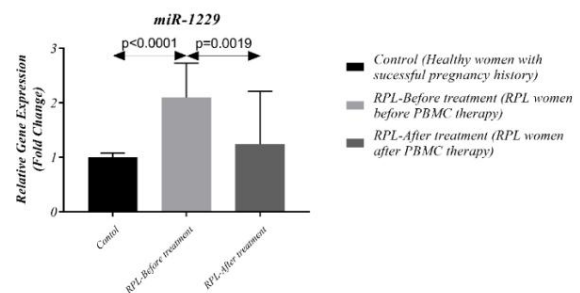
میزان بیان has-miR-1

میزان بیان has-miR-1 در گروه RPL نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرده بود ( $P=۰/۰۰۴$ ) در حالیکه شاهد کاهش میزان بیان این میکرو RNA ( $P=۰/۰۱۴$ ) در گروه RPL بعد از نفوسیت‌تراپی نسبت به قبل از نفوسیت‌تراپی بودیم (شکل ۱).



شکل ۱. میزان بیان has-miR-1 در گروه کنترل و زنان مبتلا به RPL قبل و بعد از درمان نفوسیتی

میزان بیان has-miR-1229 در گروه RPL نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرده بود ( $P<۰/۰۰۰۱$ ) در حالیکه شاهد کاهش میزان بیان این میکرو RNA ( $P=۰/۰۰۱۹$ ) در گروه RPL بعد از نفوسیت‌تراپی نسبت به قبل از نفوسیت‌تراپی بودیم (شکل ۲).



شکل ۲. میزان بیان has-miR-1229 در گروه کنترل و زنان مبتلا به RPL قبل و بعد از درمان نفوسیتی

## بحث

نتیجه بررسی‌های انجام گرفته در این تحقیق، نشان می‌دهد که اختلال در بیان میکرو RNAهای مرتبط با التهاب از جمله اصلی‌ترین عوامل ایجاد سقط مکرر به شمار می‌روند، سیستم

حاکی از افزایش میزان بیان میکرو RNAهای التهابی miR-1 و miR-1229 در زنان مبتلا به سقط مکرر است که به دنبال دریافت درمان لنفوسیتی موجب کاهش میزان بیان این دو میکرو RNA و در نتیجه التهاب شد. کاهش میزان بیان این دو میکرو RNA می‌تواند منجر به افزایش تعداد سلول‌های T تنظیمی و در نهایت بهبود نتایج بارداری شود.

### نتیجه‌گیری

با در نظر گرفتن نقش قابل توجه سیستم ایمنی در روند یک بارداری موفق و نیز تولد نوزاد زنده، انتظار می‌رود در کنار درمان‌های رایج و شناخته شده‌ای که برای بیماران مبتلا به سقط مکرر تا به امروز استفاده شده‌اند، درمان‌های مرتبط با اختلالات ایمنولوژیک مسؤوّل سقط مکرر نیز مؤثر واقع گردند. از جمله درمان‌های پیشنهادی در این راستا لنفوسیت‌تراپی است. یافته‌های حاصل از مطالعه ما کاهش محسوس میزان بیان ژن میکرو RNAهای مورد پژوهش، هر دو میکرو RNA شامل has-miR-1 و has-miR-1229 را در زنان با سابقه سه تزریق متوالی لنفوسیت‌های داخل جلدی والد پدر، نشان داد. این کاهش بیان ژن و نزدیک شدن سطح نمودار به گروه کنترل سبب افزایش نرخ بارداری‌های موفق در مادران دارای سابقه سقط مکرر خواهد شد. با این وجود، مطالعات محدودی به بررسی اثر لنفوسیت‌تراپی زیرجلدی در بهبود نرخ بارداری در زنان مبتلا به سقط‌های جنین مکرر اختصاص دارد. مطابق با یافته‌های بدست آمده از مطالعه حاضر، پیشنهاد می‌گردد مطالعات آینده به بررسی اثرات لنفوسیت‌تراپی زیرجلدی بر میزان بیان سایر ژن‌های دخیل در تنظیم سیستم ایمنی در حجم نمونه بیشتر بپردازد.

### قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از تمامی کسانی که در به انجام رساندن این مطالعه، حمایت نموده و از کمک‌های خود دریغ نکردند، ابراز می‌دارند.

### مشارکت پدیدآوران

مرتضی رئیس و مهدی یوسفی و لیلی عاقبتی‌ملکی ایده‌پردازی و طراحی اثر، محمد توفیقی‌فرد و پویا بهلولی اجرای آزمایش‌ها و جواد احمدیان‌هریس و شهلا دانایی مشارکت در طراحی و اجرای آزمایش‌ها و تحلیل نتایج را عهده داشتند. همچنین تمام نویسندگان در نگارش مقاله مشارکت داشته و نسخه نهایی را خوانده و تأیید کرده‌اند.

درمان در پیشگیری از سقط‌های مکرر جنینی گردید. چنانکه کوچی ناکاگاوا و همکاران طی مطالعه‌ای نشان دادند که ۶۰ درصد بیماران مبتلا به شکست مکرر لانه‌گزینی به دنبال ایمونوتراپی مناسب نوزاد زنده به دنیا آورده‌اند.<sup>۱۵</sup> مویرای و همکاران در سال ۱۹۸۵ اولین مطالعه تصادفی، دوسوکور را که اثربخشی درمان لنفوسیتی را در زوجین مبتلا به سقط مکرر ارزیابی می‌کرد، منتشر کردند. در این مطالعه  $10^6 \times 900-1000$  لنفوسیت همسر فرد مبتلا به سقط مکرر در ۵ میلی‌لیتر محیط آماده شده و به صورت داخل وریدی، داخل جلدی و زیرپوستی تزریق شد.<sup>۱۶</sup> هفده نفر از ۲۲ مادری که سلول‌های پدري به آنها داده شده بود، بارداری موفقیت‌آمیزی داشتند.<sup>۱۶</sup> اوبر و همکاران اثرات منفی تأثیر ایمونوتراپی را مشاهده کرده بودند،<sup>۱۷</sup> در حالی که سایر مطالعات تأثیر مثبت یا تفاوت غیر معنی‌داری بین گروه درمان شده و گروه‌های کنترل نشان دادند. در سال ۲۰۱۶، ليو و همکاران یک مطالعه متاآنالیز جدید از ۱۸ مطالعه، شامل ۱۷۳۸ بیمار (۷۳۹ بیماران در گروه درمان و ۹۹۹ بیمار در گروه کنترل) منتشر کردند. آنها میزان تولد زنده بیشتری را در گروه دریافت‌کننده درمان لنفوسیتی (۷۷/۸ درصد) نسبت به گروه کنترل (۴۶/۱ درصد) را گزارش کردند.<sup>۱۸</sup> آنها همچنین مشاهده کردند که اثر درمان لنفوسیتی هنگامی که غلظت سلولی بیشتر از  $10^6 \times 100$  لنفوسیت باشد در مقایسه با غلظت کمتر از  $10^6 \times 100$  لنفوسیت، کاهش می‌یابد.<sup>۱۸</sup> مطالعه دیگر در راستای بررسی اثرات لنفوسیت‌تراپی در درمان بیماران مبتلا به سقط مکرر، که مربوط به یانگ و همکاران می‌باشد، نشان داد جمعیت سلول‌های  $CD4^+CD25^{bright}$  پس از لنفوسیت‌تراپی در خون محیطی زنان مبتلا به سقط مکرر به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. بنابراین سلول‌های T تنظیمی می‌توانند به‌طور بالقوه به‌عنوان بیومارکری جدید در ارزیابی اثرات لنفوسیت‌تراپی آلوتزیک در بیماران سقط مکرر مورد استفاده قرار گیرند.<sup>۱۹</sup> مطالعه مشابه دیگری که توسط Wu و همکاران انجام شده است، نشان دادند که لنفوسیت‌تراپی قادر به افزایش بیان ژن FoxP3 و کاهش بیان ژن ROR $\gamma$ t بوده، جمعیت سلول‌های Th17 را افزایش و جمعیت سلول‌های Th17 را در زنان مبتلا به سقط مکرر کاهش می‌دهد. همچنین لنفوسیت‌تراپی می‌تواند تولید سایتوکاین‌های مرتبط با سلول‌های Treg و Th2 را افزایش و تولید سایتوکاین‌های Th17 و Th1 را کاهش دهد. این نوع از ایمونوتراپی قادر به کاهش قابل توجه نسبت Th1/Th2 و نیز Th17/Treg در این زنان بوده و لنفوسیت‌های مشتق شده از پدر به‌عنوان یک بالانس‌کننده پاسخ‌های سیستم ایمنی عمل کرده و در درمان سقط مکرر مفید واقع می‌شود.<sup>۲۰</sup> نتایج مطالعه ما،



## منابع مالی

این طرح با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شده است.

## ملاحظات اخلاقی

این طرح در کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز با کد اخلاق IR.TBZMED.REC.1400.915 تأیید شده است.

## دسترس پذیری داده‌ها

داده‌های ایجاد شده در این مطالعه در صورت درخواست معقول از پدیدآور رابط ارائه می‌شود.

## تعارض منافع

نویسندگان مقاله اظهار می‌دارند که هیچ‌گونه تعارضی در منافع وجود ندارد.

## References

- Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human reproduction update*. 2015;21(4):411-26. doi: 10.1093/humupd/dmv016
- Azizi R, Ahmadi M, Danaii S, Abdollahi-Fard S, Mosapour P, Eghbal-Fard S, et al. Cyclosporine A improves pregnancy outcomes in women with recurrent pregnancy loss and elevated Th1/Th2 ratio. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(10):19039-47. doi: 10.1002/jcp.28543
- Singh M, Chaudhry P, Asselin E. Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. *The Journal of endocrinology*. 2011;210(1):5-14. doi: 10.1530/joe-10-0461
- 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. doi: 10.1530/rep-10-0360
- Winger EE, Reed JL, Ji X. First-trimester maternal cell microRNA is a superior pregnancy marker to immunological testing for predicting adverse pregnancy outcome. *Journal of reproductive immunology*. 2015;110:22-35. doi: 10.1016/j.jri.2015.03.005
- Zhang Y, Diao Z, Su L, Sun H, Li R, Cui H, et al. MicroRNA-155 contributes to preeclampsia by down-regulating CYR61. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2010;202(5):466.
- Zhang C, Zhang Q, Li H, Wu Y. miR-1229-3p as a Prognostic Predictor Facilitates Cell Viability, Migration, and Invasion of Hepatocellular Carcinoma. *Hormone and Metabolic Research*. 2021;53(11):759-66. doi: 10.1055/a-1646-8415
- Gao M, Yu T, Liu D, Shi Y, Yang P, Zhang J, et al. Sepsis plasma-derived exosomal miR-1-3p induces endothelial cell dysfunction by targeting SERP1. *Clinical Science*. 2021;135(2):347-65. doi: 10.1042/cs20200573.
- Salas-Huetos A, Blanco J, Vidal F, Anton E. Analysis of the expression of four microRNAs in spermatozoa and their role in male fertility. *Revista Internacional de Andrologia*. 2012;10:92-7. doi: 10.1016/s1698-031x(12)70061-4
- Li Y, Wang XQ, Zhang L, Lv XD, Su X, Tian S, et al. A SNP in pri-miR-10a is associated with recurrent spontaneous abortion in a Han-Chinese population. *Oncotarget*. 2016;7(7):8208. doi: 10.18632/oncotarget.7002
- Jin LP, Li DJ, Zhang JP, Wang MY, Zhu XY, Zhu Y, et al. Adoptive transfer of paternal antigen-hyporesponsive T cells induces maternal tolerance to the allogeneic fetus in abortion-prone matings. *The Journal of Immunology*. 2004;173(6):3612-9. doi: 10.4049/jimmunol.173.6.3612
- Ober C, Karrison T, Odem RR, Barnes RB, Branch DW, Stephenson MD, et al. Mononuclear-cell immunisation in prevention of recurrent miscarriages: a randomised trial. *The Lancet*. 1999 Jul 31;354(9176):365-9. doi: 10.1016/s0140-6736(98)12055-x
- Laufer N, Simon A. Recurrent implantation failure: current update and clinical approach to an ongoing challenge. *Fertility and sterility*. 2012;97(5):1019-20. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.03.033
- Simon A, Laufer N. Repeated implantation failure: clinical approach. *Fertility and sterility*. 2012;97(5):1039-43. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.03.010
- Nakagawa K, Sugiyama R. Implantation Failure 2: Immunomodulating Treatment for the Patients with Repeated Implantation Failures Caused by Immunological Rejection. *Treatment Strategy for Unexplained Infertility and Recurrent Miscarriage*. 2018;1:45-60. doi: 10.1007/978-981-10-8690-8\_5

16. Mowbray JF, Liddell H, Underwood J, Gibbings C, Reginald PW, Beard RW. Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunisation with paternal cells. *The Lancet*. 1985;325(8435):941-3. doi: 10.1016/s0140-6736(85)91723-4
17. Wong LF, Porter TF, Scott JR. Immunotherapy for recurrent miscarriage. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014;10:000112. doi: 10.1002/14651858.CD000112.pub3.
18. Liu Z, Xu H, Kang X, Wang T, He L, Zhao A. Allogenic lymphocyte immunotherapy for unexplained recurrent spontaneous abortion: a meta-analysis. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2016;76(6):443-53.
19. Yang H, Qiu L, Di W, Zhao A, Chen G, Hu K, et al. Proportional change of CD4+ CD25+ regulatory T cells after lymphocyte therapy in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertility and sterility*. 2009;92(1):301-5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.04.068
20. Wu L, Luo LH, Zhang YX, Li Q, Xu B, Zhou GX, et al. Alteration of Th17 and Treg cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion before and after lymphocyte immunization therapy. *Reproductive biology and endocrinology*. 2014;12(1):1-9. doi: 10.1186/1477-7827-12-74