

اثر درمان لنفوسیتی بر میزان بیان میکرو RNA ها در زنان مبتلا به سقط جنین

صنم دولتی^۱، محمد صادق سلطانی
زنگبار^۲، جلال اعتمادی خیابوی^۳، مریم
مجاهدی^۴، شهلا دانایی^۴، جواد احمدیان
هریس^۵، مهدی یوسفی^۵

^۱ مرکز تحقیقات طب فیزیکی و توانبخشی،
پژوهشکده سالمندی، دانشگاه علوم
پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۲ مرکز تحقیقات سلول های بنیادی،
دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۳ مرکز تحقیقات کلیه، دانشگاه علوم پزشکی
تبریز، تبریز، ایران
^۴ گروه متخصصین زنان و زایمان، مرکز
ACECR ART / آذربایجان شرقی، واحد
ACECR آذربایجان شرقی، تبریز، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۷/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱/۵

چکیده

زمینه و هدف: سقط مکرر به ۲ یا تعداد بیشتر شکست مکرر بارداری قبل از هفته بیستم گفته می‌شود که در ۵-۲ درصد زنان در سنین بارداری رخ می‌دهد. با در نظر گرفتن نقش قابل توجه سیستم ایمنی در روند یک بارداری موفق، انتظار می‌رود در کنار درمان های رایج و شناخته شده ای که برای بیماران مبتلا به سقط مکرر تا به امروز استفاده شده اند، لنفوسیت تراپی داخل جلدی نیز موثر واقع گردد.

مواد و روش ها: ۳۰ نفر از بیماران مبتلا به سقط مکرر با زمینه اختلالات ایمنولوژیک، و ۳۰ نفر در گروه کنترل متشکل از زنان سالم با سابقه بارداری های موفق وارد مطالعه شدند. بعد از دریافت نمونه خون و بررسی های اولیه، افراد مبتلا به سقط مکرر درمان لنفوسیتی را دریافت کردند. قبل و پس از انجام مداخله میزان بیان میکرو RNA های miR-146a، miR-10a، miR-25، miR-106b، در هر دو گروه مورد مطالعه سنجیده شده و تفاوت های ایجاد شده ناشی از تاثیرات این مداخله مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: میزان بیان میکرو RNA های ضد التهابی miR-146a و miR-10a در زنان مبتلا به سقط مکرر بعد از دریافت درمان لنفوسیتی در مقایسه با قبل از درمان افزایش معنی داری نشان داد. در حالی که میزان بیان میکرو RNA های التهابی miR-106b و miR-25 بعد از دریافت لنفوسیت کاهش معنی داری در مقایسه با قبل از درمان نشان داد.

نتیجه گیری: هدف از لنفوسیت تراپی داخل جلدی افزایش تحمل سیستم ایمنی مادر نسبت به آنتی ژنهای پدری موجود در جنین و تعدیل پاسخ های التهابی در زنان بارداری که مبتلا به سقط مکرر هستند می باشد. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می توان از این روش برای کاهش میزان التهاب در بین زنان مبتلا به سقط مکرر استفاده کرد.

کلمات کلیدی: سقط مکرر، لنفوسیت درمانی، میکرو RNA، التهاب.

نویسنده مسئول:

دانشیار ایمنی شناسی پزشکی، دانشگاه
علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۰۹۱۲۶۷۰۳۹۵۳

Email: mehdi_yusefi@yahoo.com

استادیار ایمنولوژی و آلرژی کودکان،
دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

Email: jahmadian76@yahoo.com

مقدمه

سقط خودبخودی شایعترین عارضه حاملگی است.^۱ سقط مکرر (RPL) به از دست دادن دو یا تعداد بیشتری از حاملگی ها قبل از هفته ۲۰ یا ۲۴ به صورت متوالی یا متناوب گفته می شود.^۲ علت سقط حتی در بررسی های دقیق در نیمی از موارد غیرقابل توجیه باقی می ماند. طبق مطالعاتی که در سال های اخیر انجام شده یکی از مهمترین مکانیسم های احتمالی در شکست لانه گزینی سیستم ایمنی مادر می باشد زیرا جنین به عنوان یک سمی آلوگرافت (Semi allograft) برای مادر می باشد. اختلالات آناتومیکی و کروموزومی، عوامل میکروبی و عفونی، واکنش های خودایمنی، مشکلات رحمی، اختلالات هورمونی و ترومبولیتیک، مشکلات مربوط به جفت و بعضی فاکتورهای محیطی، را می توان مهمترین و عمده ترین دلایل از دست دادن مکرر جنین به شمار آورد.^۳ علاوه بر این، شواهد فراوانی وجود دارد که نشان میدهد سقط مکرر جنین دارای استعداد ژنتیکی است و معمولاً سابقه خانوادگی نشان می دهد. مطالعات گسترده ژنومی نشان داده است که میکرو RNA ها از عوامل ژنتیکی جدید مؤثر در سقط جنین می باشند که با تغییرات بیان ژنها نقش خود را ایفا می کنند.^۴ به مرور زمان نقش مؤثر میکرو RNA ها در فرایندهای متنوع زیستی بیش از پیش ثابت شد به طوری که می توان از میکرو RNA ها به عنوان نشانگرهای زیستی برای تشخیص، پیش بینی بارداری و حتی درمان ناباروری استفاده کرد.^۴ در سال های اخیر مطالعات گسترده ای بر روی نقش میکرو RNA ها، شناسایی بیان و عملکرد آنها در بیماری هایی مانند سرطان ها، عفونت، التهاب های مزمن و بیماری های خود ایمنی انجام شده است. میکرو RNA ها گروه کوچکی از RNA های تک رشته ای غیر کدکننده هستند که ۱۸ تا ۲۴ نوکلئوتید طول دارند و در تنظیم بیان ژن در سطح پس از رونویسی نقش مهمی را ایفاء می کنند.^۵ میکرو RNA ها در وقایع مختلف بارداری از جمله لانه گزینی جنین، حاملگی خارج رحمی، پره اکلامپسی، زایمان زودرس، وزن کم جنین هنگام تولد و سقط خودبخودی، و پاسخ های ضد التهابی نقش بسیار مهمی دارند.^۶ افزایش بیان دسته miR-25- به ویژه miR-106b و miR-25 دو فاکتور مهم مسیر پیام رسانی TGFβ یعنی Bim و CDKN1A/P21

BCL2L11 را خاموش می کنند. فاکتور رشد TGFβ در تمایز و بلوغ سلول های T تنظیمی دخالت دارد. بنابراین اختلال در میزان بیان این دسته از میکرو RNA ها، با تغییر عملکرد این فاکتور رشد، فعالیت سلول T تنظیمی را تغییر می دهد.^۷ اطلاعات به دست آمده در رابطه با این میکرو RNA ها نشان می دهد که miR-146a در ارتباط با سلول های Treg است. در واقع miR-146a در مقادیر بالا در سلول های Treg بیان شده و قادر به تنظیم عملکرد مهای این سلول ها به ویژه در مقابل سلول های Th1 از طریق STAT1 که از فاکتورهای رونویسی مربوط به Th1 است، می باشد.^۸ miR-10a در اکثر پستانداران از جمله انسان وجود دارد و تقریباً در اکثر بافتهای بدن بیان شده و دارای فعالیتهای مختلفی می باشد و با بسیاری از بیماری ها ارتباط دارد. ارتباط برخی از پلی مورفیسم های این میکرو RNA و سقط جنین مورد مطالعه قرار گرفته است. پلی مورفیسم باعث کاهش شکل بالغ این میکرو RNA می شود. یکی از ژن های هدف miR-10a ژن Bim است و پلی مورفیسم باعث افزایش بیان این ژن میشود که باعث کاهش حساسیت سلولها به پروژسترون و آنتاگونیست آن شده و با افزایش سقط خودبخودی همراه است.^۹

با در نظر گرفتن نقش قابل توجه سیستم ایمنی در روند یک بارداری موفق و نیز تولد نوزاد زنده، انتظار می رود در کنار درمان های رایج و شناخته شده ای که برای بیماران سقط مکرر تا به امروز استفاده شده اند، درمان های مرتبط با اختلالات ایمونولوژیک مسئول سقط مکرر نیز موثر واقع گردند. از جمله درمان های پیشنهادی در این راستا لنفوسیت تراپی است. در این روش به منظور ایجاد تولرانس در برابر آنتی ژن های جنینی با منشا پدری که قادر به تحریک و راه اندازی پاسخ های سیستم ایمنی مادر هستند، از لنفوسیت های پدری استفاده می شود تا شانس بقای بارداری و تولد نوزاد زنده را افزایش دهد.^{۱۰}

در این مطالعه تاثیر لنفوسیت تراپی را در میزان بیان microRNA های دخیل در کنترل و تنظیم عملکرد سلول های ایمنی مؤثر در روند بارداری و پاسخ های التهابی از جمله میکرو RNA های miR-146a، miR-10a، miR-106b و miR-25 مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش

بیماران و نمونه های مورد بررسی

ابتدا از افراد مبتلا به سقط مکرر مراجعه کننده به بیمارستان بین المللی ولیعصر که جمعیت هدف ما در این طرح بودند و نیز گروه کنترل متشکل از زنان سالم و بارور با سابقه بارداری های قبلی موفق و تولد نوزاد سالم رضایت نامه کتبی و آگاهانه دریافت شد. گروه بیمار و گروه کنترل از نظر سن و شرایط فیزیکی، فرهنگی و اقتصادی موثر بر سلامت و باروری همسان بودند. از آنجایی که ژنتیک و نژاد هر فرد در اثربخشی درمان موثر است بیماران ما فقط از افراد آذری زبان انتخاب شدند. بیماریانی که وارد این مطالعه شدند سن کمتر از ۴۰ سال و BMI زیر ۳۰ داشتند. این بیماران با سیکل های قاعدگی منظم و فاقد هرگونه پاتولوژی رحمی بودند. دارای حداقل سه سقط متوالی بودند. علاوه بر این سابقه هیچ نوع ایمونوتراپی در پرونده پزشکی خود نداشتند. بیماریانی که خود یا همسر آن ها کاربوتایپ غیر طبیعی یا اختلالات ژنتیکی و کروموزومی داشتند، بیماریانی که دارای بیماری مزمن زمینه ای بوده که مجبور به مصرف دارو های خاص بودند و یا با سابقه بیماری آسم و آلرژی، بیماریانی که دارای آنومالی های داخل رحمی، سندرم تخمک پلی کیستیک بودند، بیماران دارای موتاسیون های درگیر کننده سیستم انعقادی، بیماریانی که نتیجه تست HIV, HCV یا HBV آن ها مثبت بود، از مطالعه خارج شدند. همچنین از آنجایی که اختلال در اسپرم در شکست مکرر لانه گزینی نقش دارد جهت حذف این عامل مخدوش کننده، بیماریانی انتخاب شدند که آنالیز سیمن و تست DNA fragmentation همسر آنها نرمال بود.

جداسازی سلول های تک هسته خون محیطی

۳۰ نفر از مبتلایان به سقط مکرر با زمینه اختلالات ایمونولوژیک و نیز ۳۰ نفر از زنان با سابقه بارداری های موفق به عنوان گروه کنترل سالم وارد این مطالعه شدند. برای شروع مطالعه از این افراد ۱۰ سی سی نمونه خون هپارینه گرفته شده و با استفاده از فایکول ۱/۰۷۷ سلول های تک هسته ای خون (PBMCs) جدا شدند. میزان بیان میکرو RNA ها در گروه کنترل سالم و نیز در گروه بیماران مبتلا به سقط مکرر قبل و بعد از دریافت درمان لنفوسیتی اندازه گیری شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA و بررسی بیان میکرو RNA ها

قبل و پس از دریافت درمان، ارزیابی میزان بیان میکرو RNA های مرتبط با سلول های سیستم ایمنی اعم از میکرو RNA های miR-10a، 146a، miR-25، miR-106b در گروه های مورد مطالعه با استفاده از روش Real-time PCR انجام شد. به گونه ای که ابتدا با استفاده از کیت استخراج RNA ساخت شرکت کیژن اقدام به استخراج تمامی RNA های موجود در سلول های تک هسته ای خون محیطی بیماران مبتلا به سقط مکرر کرده و در ادامه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی اقدام به تولید cDNA از ژن های مورد نظر کردیم. در ادامه با استفاده از پرایمر های اختصاصی ژن و رنگ SYBR Green، که یک رنگ ایترکاله شونده با DNA دو رشته ای است، cDNA سنتز شده از روی ژن های مذکور را در دستگاه ترموسیکلر تکثیر دادیم. لازم به ذکر است که جهت نرمالایز کردن اندازه گیری ژن میکرو RNA ها از ژن U6 (به عنوان کنترل داخلی) استفاده شد. ارزیابی این میکرو RNA ها بر اساس میزان فلورسانس تولید شده از رنگ مذکور صورت گرفت.

درمان لنفوسیتی

گروه بیماران مبتلا به سقط مکرر لنفوسیت های جدا شده از نمونه های خونی همسر خود را دریافت کردند. طبق پروتوکل استاندارد تعداد 2×10^7 لنفوسیت های شوهر به صورت زیرجلدی روی ساعد یا بازوها به بیماران مبتلا به سقط مکرر تزریق شد^{۱۱}. تعداد دفعات تزریق سه مرتبه و با فواصل زمانی سه هفته بود.

تجزیه و تحلیل آماری

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

و miR-106b در بیماران مبتلا به سقط مکرر در مقایسه با گروه کنترل سالم افزایش معنی داری دارد (شکل ۱). بعد از دریافت درمان لنفوسیتی، میزان بیان miR-25 در بیماران مبتلا به سقط مکرر کاهش چشمگیری نشان داد (p=0.024). علاوه بر این، میزان بیان miR-106b نیز بعد از دریافت درمان لنفوسیتی در مقایسه با قبل از درمان به طور چشمگیری کاهش یافته است (p=0.015). اما تفاوت معنی داری در میزان بیان این دو میکرو RNA در مقایسه بین گروه سالم و گروه مبتلا به سقط مکرر بعد از دریافت درمان لنفوسیتی وجود ندارد (شکل ۱).

میزان بیان میکرو RNA های ضد التهابی

بر اساس نتایج حاصل از بررسی های بیان ژن، میزان بیان میکرو RNA های ضد التهابی miR-10a و miR-146a در بیماران مبتلا به سقط مکرر کاهش معنی داری در مقایسه با گروه سالم نشان می دهد (p<0.0001) (شکل ۲). میزان بیان miR-10a بعد از دریافت درمان لنفوسیتی در مقایسه با قبل از درمان به طور چشمگیری افزایش نشان داد (p=0.022) ولی هیچ تفاوت معنی داری در مقایسه با گروه سالم وجود نداشت. میزان بیان miR-146a نیز در مقایسه با قبل از درمان به طرز چشمگیری افزایش نشان داد (p=0.006) (شکل ۲).

شد.

$$2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-(\Delta CT_{\text{sample}} - \Delta CT_{\text{control}})}$$

$$= \frac{2^{-(\Delta CT)_{\text{sample}}}}{2^{-(\Delta CT)_{\text{control}}}}$$

ملاحظات اخلاقی

مطالعه انجام شده در کمیته پژوهشی و اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز به شماره IR.TBZMED.REC.1400.293 مورد تصویب قرار گرفت.

نتایج

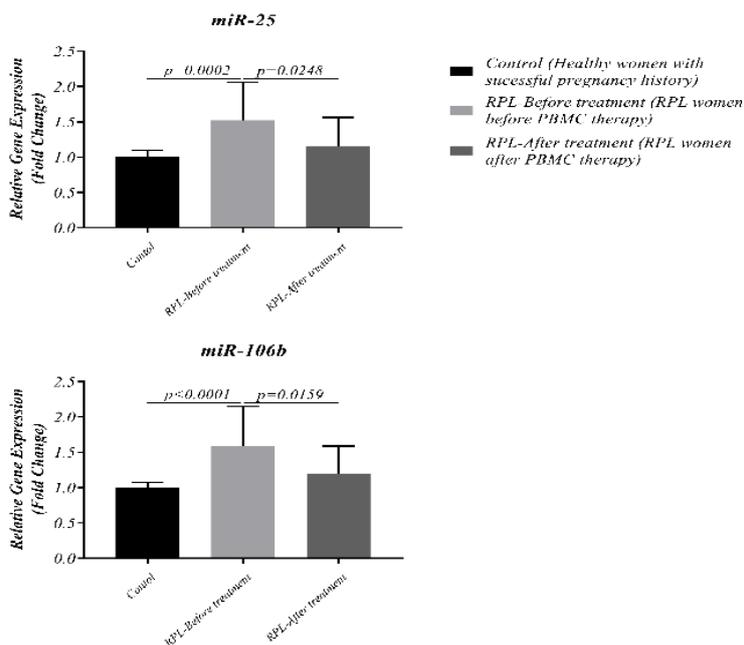
در این مطالعه ۳۰ نفر بیمار مبتلا به سقط مکرر و ۳۰ نفر فرد سالم با سابقه بارداری های موفق وارد شدند. میانگین سنی نمونه های مورد بررسی به ترتیب در گروه کنترل 27.22±3.16 سال و در گروه سقط مکرر 27.84±4.22 سال بود. جدول شماره ۱ خلاصه ای اطلاعات دموگرافیک و بالینی مربوط به نمونه های مورد بررسی را ارائه می دهد.

میزان بیان میکرو RNA های التهابی

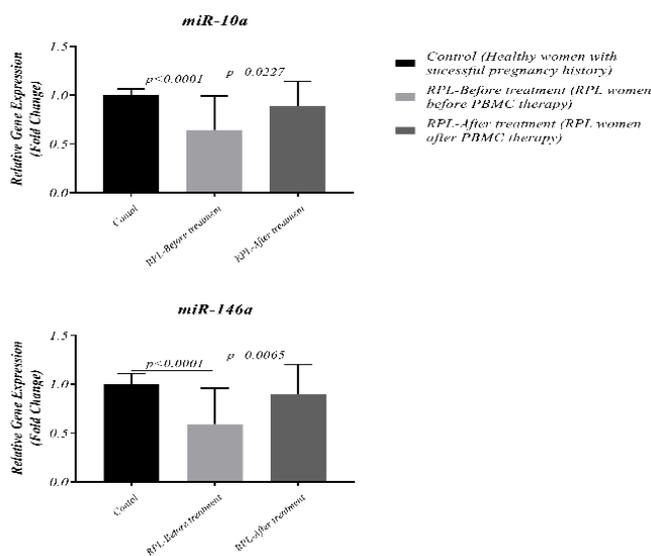
نتایج حاصل از بررسی های بیان ژن توسط Real-time PCR حاکی از این است که میزان بیان میکرو RNA های التهابی miR-25

جدول ۱: اطلاعات دموگرافیک و بالینی افراد مورد مطالعه

متغیر	گروه کنترل (۳۰)	گروه بیماران مبتلا به سقط مکرر (۳۰)	ارزش P
سن	27.22±3.16	27.84±4.22	غیر معنی دار
سقط مکرر	-	30	-
سقط مکرر اولیه	-	19	-
سقط مکرر ثانویه	-	11	-
تعداد سقط	-	3.64±0.68	-
فشار خون سیستولیک	112.4±9.82	11.8±16.44	غیر معنی دار
فشار خون دیاستولیک	74.5±6.94	73.36±12.32	غیر معنی دار
شاخص توده بدنی	26.43±3	27.69±3.46	غیر معنی دار
قند خون ناشتا	97.43±11.12	96.81±13.45	غیر معنی دار
کلسترول تام	154.5±21.34	165.6±31.83	غیر معنی دار
لیپوپروتئین با چگالی بالا	54.72±6.84	48.68±6.12	غیر معنی دار
لیپوپروتئین با چگالی کم	66.7±10.84	64.86±12.18	غیر معنی دار
تری گلیسرید	134.6±23.1	141.5±24.8	غیر معنی دار



شکل ۱: میزان بیان میکرو RNA های التهابی در گروه کنترل و زنان مبتلا به RPL قبل و بعد از درمان لنفوسیتی



شکل ۲: میزان بیان میکرو RNA های ضدالتهابی در گروه کنترل و زنان مبتلا به RPL قبل و بعد از درمان لنفوسیتی

بحث

و در نتیجه سبب بهبودیافتن رشد جنینی قبل و بعد از لانه گزینی خواهد شد و همین امر موجب استفاده و رواج این نوع درمان در پیشگیری از سقط های مکرر جنینی گردید. چنانکه Koji Nakagawa و همکارانش طی مطالعه ای نشان دادند که ۶۰٪ بیماران

بر اساس یافته های پیشین، به نظر می رسد تزریق لکوسیت ها همراه با ساختار آنتی ژنیک مشابه سلول های تروفوبلاست، موجب فعال شدن سلول های سیستم ایمنی مادر برای تحمل در مقابل جنین

احتمال سقط خواهد شد.^{۱۸}

مطالعه دیگر در راستای بررسی اثرات لنفوسیت تراپی در درمان بیماران مبتلا به سقط مکرر، که مربوط به Yang و همکاران می باشد بیان می کند جمعیت سلول های CD4⁺CD25^{bright} پس از لنفوسیت تراپی در خون محیطی زنان مبتلا به سقط مکرر به طور قابل توجهی افزایش می یابد. بنابراین سلول های T تنظیمی می توانند به طور بالقوه به عنوان بیومارکری جدید در ارزیابی اثرات لنفوسیت تراپی آلورژیک در بیماران سقط مکرر مورد استفاده قرار گیرند.^{۱۹}

بررسی های انجام شده به منظور ارزیابی اثرات لنفوسیت تراپی با دوز اندک در بیماران سقط مکرر توسط Liu et. al. نشان داد که این روش درمانی قادر به کاهش جمعیت سلول های Th1 در حین افزایش جمعیت سلول های Th2 بوده و نیز میزان سرمی سایتوکاین TGF- β را پس از درمان افزایش دهد. بنابراین گفته می شود این تکنیک قادر به برقراری مجدد بالانس Th1/Th2/Treg در این بیماران و نیز بهبود نتایج بارداری می باشد.^{۲۰}

دیگر مطالعه مشابه انجام شده توسط Wu و همکاران نشان می دهد لنفوسیت تراپی قادر به افزایش بیان ژن FoxP3 و کاهش بیان ژن ROR γ t بوده، جمعیت سلول های Treg را افزایش و جمعیت سلول های Th17 را در زنان مبتلا به سقط مکرر کاهش می دهد. همچنین تولید سایتوکاین های مرتبط با سلول های Treg و Th2 را افزایش داده و تولید سایتوکاین های Th1 و Th17 را کاهش می دهد. این نوع از ایمونوتراپی قادر به کاهش قابل توجه نسبت Th1/Th2 و نیز Th17/Treg در این زنان بوده و لنفوسیت های مشتق شده از پدر به عنوان یک بالانس کننده پاسخ های سیستم ایمنی عمل کرده و در درمان سقط مکرر مفید واقع می شود.^{۲۱}

miR-25 و miR-106b می توانند به ترتیب با مهار ترجمه Bcl2L11/Bim و CDKN1A/P21 موجب کاهش بیان TGF- β شوند. با توجه به اینکه سایتوکاین TGF- β در تمایز و بلوغ سلول های Treg نقش دارد، بنابراین miR-25 و miR-106b باعث کاهش بیان سلول های بیان کننده Foxp3 و کاهش تولید TGF- β که نقش کلیدی در کنترل التهاب دارند می شوند. در نتیجه کاهش Treg و متعاقباً TGF- β ، التهاب گسترش یافته و منجر به پیشرفت روند التهاب می شود.^{۲۲}

نتایج مطالعه ما، حاکی از افزایش میزان بیان میکرو RNA های

مبتلا به شکست مکرر لانه گزینی به دنبال ایمونوتراپی مناسب نوزاد زنده به دنیا آورده اند.^{۱۲} مویرای و همکارانش در سال ۱۹۸۵ اولین مطالعه تصادفی، دوسوکور را که اثربخشی درمان لنفوسیتی را در زوجین مبتلا به سقط مکرر ارزیابی می کرد، منتشر کردند. در این مطالعه $10^6 \times 900 - 100$ لنفوسیت همسر فرد مبتلا به سقط مکرر در ۵ میلی لیتر محیط آماده شده و به صورت داخل وریدی، داخل جلدی و زیر پوستی تزریق شد.^{۱۳} ۱۷ نفر از ۲۲ مادری که سلول های پدیری به آنها داده شده بود، بارداری های موفقیت آمیزی داشتند.^{۱۳} پاندی و همکارانش مروری گسترده بر روی ۵۳ مطالعه (۱۴ مورد تصادفی و ۳۹ مورد غیر تصادفی) در مورد اثربخشی لنفوسیت درمانی انجام دادند. نتایج نشان داد که تفاوت معنی داری در اثربخشی بین گروه تحت درمان (۶۷٪ میزان موفقیت) و گروه کنترل (۳۶٪) وجود دارد.^{۱۴}

در مطالعه متاآنالیز به روز رسانی شده در سال ۲۰۱۴ که شامل ۱۲ مطالعه بود و ایمونوتراپی را با لنفوسیت های پدیری انجام داده بودند، در مجموع ۶۴۱ شرکت کننده، از جمله ۳۱۶ زن تحت درمان و ۳۲۵ نفر در گروه کنترل وجود داشتند. نتایج این مطالعه نشان داد که اثر این درمان بر میزان تولد زنده معنی دار نبود.^{۱۵}

اوبر و همکارانش اثرات منفی تأثیر ایمونوتراپی را مشاهده کرده بودند^{۱۱}، در حالی که سایر مطالعات تأثیر مثبت یا تفاوت غیر معنی داری بین گروه درمان شده و گروه های کنترل نشان داده اند.^{۱۶}

در سال ۲۰۱۶، لیو و همکارانش یک مطالعه متاآنالیز جدید از ۱۸ مطالعه، شامل ۱۷۳۸ بیمار (۷۳۹ بیمار در گروه درمان و ۹۹۹ بیمار در گروه کنترل) منتشر کردند. آنها میزان تولد زنده بیشتری را در گروه دریافت کننده درمان لنفوسیتی (۷۷/۸ درصد) نسبت به گروه کنترل (۴۶/۱ درصد) مشاهده کردند.^{۱۷} 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 می یابد.^{۱۷}

در زمینه اختلالات ایمونولوژیک دخیل در بروز سقط مکرر نشان می دهد که سلول های Treg نقش اساسی در تعدیل پاسخ های سیستم ایمنی مادر نسبت به آلوگرافت جنین درون رحم دارند و تنظیم کاهشی این سلول ها منجر به از بین رفتن محافظت جنین و ایجاد یک محیط و شرایط نامناسب برای بارداری موفق و افزایش

بارداری موفق و نیز تولد نوزاد زنده، انتظار می رود در کنار درمان های رایج و شناخته شده ای که برای بیماران مبتلا به سقط مکرر تا به امروز استفاده شده اند، درمان های مرتبط با اختلالات ایمنولوژیک مسئول سقط مکرر نیز موثر واقع گردند. از جمله درمان های پیشنهادی در این راستا لنفوسیت تراپی است. لازم به ذکر است که هدف از لنفوسیت تراپی زیر جلدی نیز افزایش تحمل سیستم ایمنی مادر نسبت به آنتی ژن های پدری موجود در جنین و تعدیل پاسخ های التهابی در زنان بارداری که مبتلا به سقط مکرر هستند می باشد تا شانس بقای بارداری و تولد نوزاد زنده را افزایش دهد. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می توان از این روش برای کاهش میزان التهاب در بین زنان مبتلا به سقط مکرر استفاده کرد.

با این وجود مطالعات محدودی به بررسی اثر لنفوسیت تراپی زیر جلدی در بهبود نرخ بارداری در زنان مبتلا به سقط های جنین مکرر اختصاص دارد. پیشنهاد می گردد مطالعات آینده به بررسی اثرات لنفوسیت تراپی زیر جلدی بر میزان بیان سایر ژن های دخیل در تنظیم سیستم ایمنی در حجم نمونه بیشتر پردازد.

سپاسگزاری

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

تعارض در منافع

نویسندگان مقاله اظهار می دارند که هیچ گونه تعارضی در منافع وجود ندارد.

التهابی miR-106b و miR-25 در زنان مبتلا به سقط مکرر است که به دنبال دریافت درمان لنفوسیتی شاهد کاهش میزان بیان این دو میکرو RNA و در نتیجه التهاب بودیم. کاهش میزان بیان این دو میکرو RNA می تواند منجر به افزایش تعداد سلول های T تنظیمی و در نهایت بهبود نتایج بارداری شود.

بیان miR-146a بیان ژن Fas را تنظیم می کند. بیان miR-146a توسط مسیر NF- κ B تنظیم می شود. مطالعات زیادی به بررسی ارتباط miR-146a، miR-149، miR-196a2 با سقط جنین پرداخته اند^{۲۵}. در مطالعات متعددی که در زنان هندی و کره ای انجام شده ارتباط miR-146a و miR-196a2 با افزایش سقط جنین مشخص شده است^{۲۶، ۲۷}. miR-146a در مقادیر بالا در سلول های Treg بیان شده و قادر به تنظیم عملکرد مهاری این سلول ها است. یکی از ژن های هدف miR-10a ژن Bim است و پلی مورفسم این میکرو RNA باعث افزایش بیان این ژن می شود^۹. بر اساس نتایج حاصل از مطالعه ما، میزان بیان miR-10a و miR-146a در زنان مبتلا به سقط جنین کاهش می یابد. در حالی که لنفوسیت درمانی باعث افزایش معنی دار این دو میکرو RNA در زنان مبتلا به سقط مکرر می گردد. این افزایش می تواند همراه با افزایش فعالیت تنظیمی سلول های Treg منجر به تنظیم پاسخ سیستم ایمنی مادر و در نهایت جلوگیری از سقط مکرر گردد. تفاوت معنی داری در میزان بیان میکرو RNA ها در مقایسه بین گروه سالم و گروه مبتلا به سقط مکرر بعد از دریافت درمان لنفوسیتی وجود نداشت. این نتایج نشان می دهد که دریافت درمان لنفوسیتی می تواند منجر به تغییر سطوح بیانی میکرو RNA ها تا سطوح نرمال مشاهده شده در افراد سالم شود.

نتیجه گیری

با در نظر گرفتن نقش قابل توجه سیستم ایمنی در روند یک

References

1. 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.
2. Azizi R, Ahmadi M, Danaii S, et al. Cyclosporine A improves pregnancy outcomes in women with recurrent pregnancy loss and elevated Th1/Th2 ratio. 2019;234(10): 19039-47.

3. Agenor A, Bhattacharya S. Infertility and miscarriage: common pathways in manifestation and management. *Women's health* 2015;11(4): 527-41.
4. 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.
5. Dolati S, Aghebati-Maleki L, Ahmadi M, et al. Nanocurcumin restores aberrant miRNA expression profile in multiple sclerosis, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. 2018;233(7): 5222-30.
6. Barchitta M, Maugeri A, Quattrocchi A, et al. The role of miRNAs as biomarkers for pregnancy outcomes: a comprehensive review. 2017;2017.
7. Dolati S, Babaloo Z, Ayromlou H, et al. Nanocurcumin improves regulatory T-cell frequency and function in patients with multiple sclerosis. 2019;327: 15-21.
8. Lu L-F, Boldin MP, Chaudhry A, et al. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell* 2010;142(6): 914-29.
9. Li Y, Wang X-Q, Zhang L, et al. A SNP in pri-miR-10a is associated with recurrent spontaneous abortion in a Han-Chinese population. 2016;7:8208.
10. Jin L-P, Li D-J, Zhang J-P, 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.
11. Ober C, Karrison T, Odem RR, et al. Mononuclear-cell immunisation in prevention of recurrent miscarriages: a randomised trial. 1999;354(9176): 365-9.
12. 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*: Springer; 2018: 45-60.
13. Mowbray J, Liddell H, Underwood J, et al. Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunisation with paternal cells. 1985;325(8435): 941-3.
14. Pandey MK, Thakur S, Agrawal SJAog, obstetrics. Lymphocyte immunotherapy and its probable mechanism in the maintenance of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion. 2004;269(3):162-78.
15. Cavalcante MB, Sarno M, Barini RJAJoRI. Lymphocyte immunotherapy in recurrent miscarriage and recurrent implantation failure. 2021;85(4): e13408.
16. Wong LF, Porter TF, Scott JRJCDoSr. Immunotherapy for recurrent miscarriage. 2014;10.
17. Liu Z, Xu H, Kang X, et al. Allogenic lymphocyte immunotherapy for unexplained recurrent spontaneous abortion: a meta-analysis. 2016;76(6): 443-53.
18. Jin L-P, Chen Q-Y, Zhang T, et al. The CD4+ CD25bright regulatory T cells and CTLA-4 expression in peripheral and decidual lymphocytes are down-regulated in human miscarriage. *Clinical immunology* 2009;133(3): 402-10.
19. Yang H, Qiu L, Di W, 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.
20. Liu M, Zhen X, Song H, et al. Low-dose lymphocyte immunotherapy rebalances the peripheral blood Th1/Th2/Treg paradigm in patients with unexplained recurrent miscarriage. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2017;15(1): 1-7.
21. Wu L, Luo L-H, Zhang Y-X, 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.
22. Mycko MP, Weiner HL, Selmaj KW. Insights into multiple sclerosis provided by non-coding RNAs: meeting summary from the symposium 'Non-coding RNAs in autoimmune disorders of the central nervous system' on 5 April 2013 in Warsaw, Poland. *Multiple Sclerosis Journal* 2014;20(11): 1439-42.
23. Liu Y, Zhang Y, Wen J, et al. A genetic variant in the promoter region of miR-106b-25 cluster and risk of HBV infection and hepatocellular carcinoma. 2012.
24. Sievers C, Meira M, Hoffmann F, et al. Altered microRNA expression in B lymphocytes in multiple sclerosis: towards a better understanding of treatment effects. *Clinical immunology* 2012;144(1): 70-9.
25. Parveen F, Agrawal SJRS. Recurrent miscarriage and micro-RNA among north Indian women. 2015;22(4): 410-5.
26. Jeon YJ, Kim SY, Rah H, 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. 2012;68(5): 408-17.
27. Cho SH, Chung KW, Kim JO, et al. Association of miR-146aC> G, miR-149C> T, miR-196a2T> C, and miR-499A> G polymorphisms with risk of recurrent implantation failure in Korean women. 2016;202: 14-9.

Sanam Dolati¹, Mohammad Sadegh Soltani-Zangbar², Jalal Etemadi Khiavi³, Maryam Mojahedi², Shahla Danaei⁴, Javad Ahmadian heris^{2*}, Mehdi Yousefi^{2*}

¹ Physical Medicine and Rehabilitation Research Center, Aging Research Institute, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

² Stem Cell Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³ Kidney Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴ Gynecology Department, Eastern Azerbaijan ACECR ART Center, Eastern Azerbaijan Branch of ACECR, Tabriz, Iran

The Effect of Lymphocyte Therapy on the Expression of MicroRNAs in Women with Recurrent Pregnancy Loss

Received: 12 Oct 2021 ; Accepted: 25 Mar 2022

Abstract

Background: Recurrent Pregnancy Loss (RPL) is 2 or more recurrent miscarriages before the twentieth week, which occurs in 2-5% of women of gestational age. Considering the significant role of the immune system in the process of a successful pregnancy, it is expected that in addition to the common and well-known treatments used for patients with recurrent miscarriage to date, intracutaneous lymphocyte therapy will also be effective.

Methods: 30 patients with RPL with immunological disorders, and 30 patients in a control group consisting of healthy women with a history of successful pregnancies were included in the study. After receiving blood samples and initial examinations, people with RPL received lymphocytic treatment. Before and after the intervention, the expression levels of miR-146a, miR-10a, miR-106b, and miR-25 were measured in both groups and the differences caused by the effects of this intervention were examined.

Results: The expression of anti-inflammatory miR-146a and miR-10a, in women with RPL showed a significant increase after receiving lymphocyte treatment compared to before treatment. While the expression of pro-inflammatory miR-106b and miR-25 showed a significant decrease after receiving lymphocytes compared to before treatment.

Conclusion: The aim of intradermal lymphocyte therapy is to increase the maternal immune system's tolerance to paternal antigens in the fetus and to modulate inflammatory responses in pregnant women with RPL. According to the results of this study, this method can be used to reduce inflammation in women with recurrent miscarriage.

Keywords: Recurrent Pregnancy Loss, Lymphocyte therapy, MicroRNA, Inflammation.

*Corresponding Authors:

Mehdi Yousefi, PhD, Associated Professor of Immunology Stem Cell Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Tel: 04133364665
Email: yousefime@tbzmed.ac.ir

Assistant Professor Stem Cell Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Email: jahmadian76@yahoo.com