



Evaluation of *miR-223-3p*, *FOXO1* and *TP53* expression in patients with ovarian endometriosis

Shabani chelkasari S^a, Mashayekhi F^a, Zahiri Z^b, Salehi Z^a

^aDepartment of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Postcode 4193833697, Iran

^bDepartment of Obstetrics and Gynaecology, Reproductive Health Research Centre, Alzahra Hospital, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Shabani chelkasari S, Mashayekhi F, Zahiri Z, Salehi Z. Evaluation of miR-223-3p, FOXO1 and TP53 expression in patients with ovarian endometriosis. Journal of Cell and Tissue. 2025; 16(3):291-308

doi <https://doi.org/10.61882/JCT.291>

KEYWORDS

MicroRNAs
TP53
FOXO1
Endometriosis
Real-Time PCR.

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Numerous studies on microRNAs (miRNAs) have indicated that abnormal interactions between miRNAs and mRNAs contribute to the development and worsening of endometriosis. miR-223 influences genes associated with various biological functions such as signaling pathways, gene expression, cellular development, proliferation, angiogenesis, and programmed cell death. Alterations in genes have been demonstrated to be significant in the progression of endometriosis. The p53 gene, recognized as a tumor suppressor, plays a vital role in inhibiting cancer by regulating cell growth and division. Recent investigations suggest a potential connection between the p53 gene and endometriosis. In addition, Forkhead box protein O1 (FOXO1) acts as a cell-specific core transcription factor essential for effective endometrial remodeling throughout the menstrual cycle and may play an important role in the onset of endometriosis.

Aims: This study aimed to explore the expression levels of miR-223-3p and its target genes, *TP53* and *FOXO1*, in cases of ovarian endometriosis through bioinformatic analysis and experimental verification.

Materials and methods: Gene expression data were obtained from the GSE105765 dataset in the Gene Expression Omnibus (GEO) database, which encompasses both normal (eutopic) and ectopic tissue samples from endometriosis patients. Differentially expressed genes were pinpointed using the "limma" package in R

* Corresponding author. Tel: 01332447496

E-mail address: mashayekhi@guilan.ac.ir

DOI: <https://doi.org/10.61882/JCT.291>

Received: 3 May. 2025; Received in revised form: 22 Jun. 2025; Accepted: 25 Jun. 2025

Original Article

© Author



software, with the results visualized as a heat map. Among the various expressed miRNAs, *miR-223-3p* was chosen for further investigation. Subsequently, the target genes of *miR-223-3p* were explored utilizing the miRDB database, leading to the identification of *FOXO1* and *TP53* as target genes. In the experimental component of this study, 40 ectopic tissue samples, 40 eutopic tissue samples from individuals with endometriosis, and 40 normal endometrial samples (control group) were analyzed. Following the extraction of total RNA and synthesis of cDNA, the expression levels of *miR-223-3p*, *TP53*, and *FOXO1* were assessed using Real-Time PCR.

Results: The average relative expression of *miR-223-3p* in the ectopic group was measured at 4.13 ± 0.72 , while in the eutopic group it was 1.10 ± 0.10 , and in the control group it was 1.00 ± 0.09 . The relative expression of *miR-223-3p* was significantly higher in the ectopic group compared to both the eutopic and control groups ($p < 0.0001$), whereas no significant differences were found between the control and eutopic groups ($p = 0.54$). The average expression of *FOXO1* in the ectopic group (0.47 ± 0.12) was significantly lower than that in the eutopic group (1.02 ± 0.06) and the control group (1.001 ± 0.11). One-way ANOVA revealed a significant reduction in *FOXO1* expression in the ectopic group when compared to the eutopic group and the control group ($p < 0.0001$). However, there was no significant difference in *FOXO1* expression between the eutopic and control groups ($p = 0.53$). The relative expression level of the *TP53* gene was analyzed in the ectopic group (0.335 ± 0.14), the eutopic group (1.05 ± 0.09), and the control group (1.01 ± 0.12). Statistical evaluations showed that *TP53* gene expression was significantly lower in the ectopic group compared to both the eutopic and control groups ($p < 0.0001$). Conversely, no significant difference was observed in *TP53* expression between the eutopic and control groups ($p = 0.28$).

Conclusion: The findings indicate that *miR-223-3p* expression in ectopic samples was significantly elevated compared to both the eutopic and the control samples, while the expression of the *FOXO1* and *TP53* genes in the ectopic group was notably reduced relative to the eutopic and control groups. These results suggest that the expressions of *miR-223-3p*, *TP53*, and *FOXO1* genes are changed in the endometrium of individuals with endometriosis, highlighting their potential roles in the disease's pathogenesis and their therapeutic implications.



ارزیابی میزان بیان *TP53* و *FOXO1* در افراد مبتلا به آندومتريوز تخمدانی

سمیه شعبانی چلکاسری، فرهاد مشایخی، زیبا ظهیری، زیور صالحی

^۱ دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

^۲ استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. mashayekhi@guilan.ac.ir

^۳ استاد گروه زنان و زایمان، مرکز تحقیقات بهداشت باروری، بیمارستان الزهراء، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.

^۴ استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان، رشت، ایران. کدپستی ۴۱۹۳۸۳۳۶۹۷، ایران.

واژگان کلیدی	چکیده
MicroRNAs TP53 FOXO1 آندومتريوز RT-PCR	<p>هدف: هدف از این تحقیق، بررسی بیان <i>miR-223-3p</i> و ژنهای هدف <i>FOXO1</i> و <i>TP53</i> در آندومتريوز تخمدانی از طریق تحلیل بیوانفورماتیکی و تایید تجربی می‌باشد. مواد و روش‌ها: پروفایل‌های بیان ژن، از مجموعه داده سری GSE105765 از پایگاه داده Gene Expression Omnibus (GEO) استخراج شدند. ژنهای بیان شده با استفاده از بسته "limma" در نرم‌افزار R شناسایی و نمودار نقشه حرارتی برای ژنهای با بیان متفاوت رسم و در نهایت <i>miR-223-3p</i> برای این تحقیق انتخاب شد. سپس ژنهای <i>TP53</i> و <i>FOXO1</i> نیز به‌عنوان ژنهای هدف <i>miR-223-3p</i> با استفاده از پایگاه داده miRDB انتخاب شدند. در بخش تجربی مجموعاً ۴۰ نمونه بافت نابه‌جا (اکتوپیک)، ۴۰ نمونه بافت یوتوپیک از بیماران مبتلا به آندومتريوز و ۴۰ نمونه آندومتر طبیعی به‌عنوان گروه کنترل مطالعه شد. پس از استخراج RNA کل و سنتز cDNA، میزان بیان <i>TP53</i> و <i>FOXO1</i> <i>miR-223-3p</i> توسط Real Time PCR بررسی شد.</p> <p>نتایج: نتایج نشان داد که افزایش معنی‌داری در بیان <i>miR-223-3p</i> در نمونه‌های بافتی اکتوپیک نسبت به یوتوپیک و کنترل وجود دارد. همچنین کاهش معنی‌داری در بیان ژنهای <i>FOXO1</i> و <i>TP53</i> در گروه اکتوپیک نسبت به گروه‌های یوتوپیک و کنترل مشاهده شد. در حالی‌که اختلاف معنی‌داری در بیان <i>miR-223-3p</i>، <i>FOXO1</i> و <i>TP53</i> در بین گروه یوتوپیک و کنترل مشاهده نشد. نتیجه‌گیری: نتیجه‌گیری می‌شود که بیان <i>miR-223-3p</i>، <i>FOXO1</i> و <i>TP53</i> در بافت آندومتر اکتوپیک بیماران مبتلا به آندومتريوز تغییر می‌کند. همچنین پیشنهاد می‌شود که <i>miR-223-3p</i>، <i>FOXO1</i> و <i>TP53</i> ممکن است کاندیدا برای پاتوژن آندومتريوز و پتانسیل درمانی آن‌ها در آندومتريوز باشد.</p>
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۱۳	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۴/۰۱	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۰۴	

۱-مقدمه

آندومتریوز، یک بیماری مزمن، التهابی و وابسته به استروژن است که ناشی از قرارگیری و رشد بافت آندومتر (شامل غدد اپی تلیالی و سلول‌های استرومایی) در خارج از حفره رحمی می‌باشد. بافت آندومتر نابه‌جا (اکتوپیک) معمولاً در حفره لگن یافت می‌شود، اما ممکن است در تخمدان‌ها، لوله‌های فالوپ، قسمت بالایی شکم و سایر مناطق بدن نیز دیده شود (۱). به‌طور کلی، تخمین زده می‌شود که حدود ۱۰ درصد از زنان در سنین باروری به این بیماری مبتلا هستند (۲). آندومتریوز بر اساس آسیب شناسی بافتی و مکان‌های بروز خود به سه فنوتیپ مختلف تقسیم‌بندی می‌شود که شامل آندومتریوز سطحی صفاقی، آندومتریومای تخمدانی و آندومتریوز عمیق نفوذی می‌باشد (۳). این بیماری منجر به قاعدگی نامنظم، درد مزمن لگنی و ناباروری می‌شود (۴). آندومتریوز به عنوان یک بیماری چند عاملی در نظر گرفته می‌شود زیرا فرایند ایجاد این بیماری (پاتوژنز) شامل طیفی از ویژگی‌ها نظیر وجود بافت آندومتر نابه‌جا، اختلال در سیستم ایمنی، عدم تعادل بین تکثیر سلولی و مرگ سلولی برنامه ریزی شده (آپوپتوزیس)، سیگنال‌دهی غددی غیرطبیعی و عوامل ژنتیکی است (۵). به‌طور کلی، اعتقاد بر این است که بروز و پیشرفت آندومتریوز یک فرآیند بیولوژیکی پیچیده است که در آن عوامل محیطی و ژن‌های زیادی دخیل می‌باشند. در سال‌های اخیر، گروهی از ژن‌ها که محصولات آن‌ها RNAهایی با نقش‌های تنظیمی هستند، مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند. RNAهای غیرکدکننده قطعاتی از RNA هستند که از DNA رونویسی می‌شوند، اما به پروتئین ترجمه نمی‌شوند (۶). میکروRNAها (miRs=miRNAs)، RNAهای غیرکدکننده کوتاهی هستند که طولی در حدود ۲۰ تا ۲۴ نوکلئوتید دارند که بیان ژن را با کاهش ترجمه یا کاهش پایداری mRNA هدف تنظیم می‌کنند (۷). با توجه به این‌که آندومتریوز یک بیماری چند عاملی می‌باشد، نتایج مطالعات حاکی از اهمیت نقش RNAهای غیرکدکننده از جمله miRNAها در طی روند ایجاد و پیشرفت ضایعات آندومتریوزی است. تحقیقات نشان داده‌اند که میزان بیان برخی از miRNAها در بافت آندومتر یوتوپیک (طبیعی) زنان مبتلا به آندومتریوز، در مقایسه با بافت اکتوپیک، دچار تغییراتی می‌شود (۸). miR-223 یک miRNA بسیار حفاظت شده در مهره داران است و ژن آن در جایگاه q12 کروموزوم X قرار دارد. سنتز miR-223 در مرحله اول منجر به ایجاد رشته miR-223-3p می‌شود، که miR-223 نیز نامیده می‌شود (۹). این miRNA، ژن‌هایی که در فرآیندهای بیولوژیکی مختلفی مانند انتقال سیگنال، رونویسی، تکوین سلولی، تکثیر سلولی و آپوپتوزیس دخالت دارند را تنظیم می‌کند (۱۰). مطالعات اخیر همچنین نشان داده‌اند که miR-223 در التهاب، عفونت و پیشرفت سرطان نقش دارد (۱۱). علاوه بر این miR-223 در فرآیند انتقال اپیتلیال به مزانشیمی (Epithelial-mesenchymal transition=EMT) در بیماری‌های مختلف نظیر آندومتریوز دخالت دارد (۱۲ و ۱۳).

miRNAها، بیان ژن را با اتصال به mRNA تنظیم می‌کنند که منجر به تخریب mRNA یا سرکوب ترجمه می‌شود. این فرآیند معمولاً از طریق کمپلکس خاموش‌سازی القا شده (RNA-induced silencing complex =RISC) رخ می‌دهد که miRNA آن را به mRNA هدف خود هدایت می‌کند. در حالی که بیشتر تعاملات در ناحیه ترجمه نشده ۳' UTR (mRNA) رخ می‌دهد، اتصال می‌تواند در 5' UTR، نواحی کدکننده و حتی پروموتورهای ژن نیز رخ دهد. بسته به میزان جفت شدن بازها، نتیجه می‌تواند تخریب mRNA یا کاهش سنتز پروتئین باشد. در برخی موارد، miRNAها همچنین می‌توانند ترجمه را فعال یا رونویسی را تنظیم کنند (۱۴). از آنجایی که عملکرد اصلی miRNAها جلوگیری از بیان ژن‌های هدف از طریق مهار ترجمه mRNA است، می‌تواند با تاثیر روی بیان ژن‌های مختلف در پاتوژنز بیماری‌های مختلف از جمله آندومتریوز موثر باشند.

ژن‌های زیادی در بیماری آندومتريوز نقش دارند که یکی از آن‌ها ژن TP53 می‌باشد، که بر روی کروموزوم ۱۷ قرار دارد و حاوی ۱۱ اگزون است و پروتئین سرکوبگر تومور P53 را کد می‌کند. عملکرد اصلی آن محافظت از یکپارچگی DNA سلول است (۱۵). انواع مختلف استرس‌های سلولی منجر به فعال‌سازی ژن TP53 می‌شود که این استرس‌های سلولی شامل آسیب DNA، فعال شدن انکوژن‌ها، هیپوکسی، استرس اکسیداتیو و تغییرات متابولیک سلولی می‌باشد (۱۶). فرآیندهای زیستی مهمی که نقش P53 در آن‌ها مشخص شده است، توقف چرخه سلولی، پیری، ترمیم DNA، آپوپتوزیس و پیشگیری از سرطان هستند که در میان آن‌ها، شناخته شده ترین مسیرها توقف چرخه سلولی و آپوپتوز است (۱۷). P53 در القای آپوپتوزیس نقش دارد به نحوی که اعضای خانواده پرو آپوپتوزیس مانند Bid, Bak, Bax را فعال می‌کند که منجر به تخریب اعضای خانواده ضد آپوپتوزیس Bcl-2 می‌شود. (۱۸). جهش‌های TP53 می‌توانند فرآیندهای سلولی مختلفی از جمله آپوپتوزیس، کنترل چرخه سلولی ترمیم DNA را مختل کرده و با تمایزدایی اپی‌تلیال مرتبط هستند، فرآیندی که در آن سلول‌ها ویژگی‌های تخصصی خود را از دست می‌دهند که همه آن‌ها با ایجاد و پیشرفت آندومتريوز مرتبط هستند. به‌طور خلاصه، جهش‌های TP53 و عملکرد تغییر یافته p53 با مختل کردن فرآیندهای سلولی مختلف، تاثیر بر بیان ژن و به‌طور بالقوه تاثیرگذاری بر ریزمحیط تومور، در ایجاد و پیشرفت آندومتريوز نقش دارند (۱۹).

یکی دیگر از ژن‌های دخیل در این بیماری، FOXO1 است که عضوی از خانواده FOXO می‌باشد که در استرس اکسیداتیو (۲۰)، آپوپتوزیس سلولی (۲۱)، تنظیم متابولیک و ایمنی (۲۲)، طول عمر و سرطان‌زایی (۲۳) دخالت دارد FOXO1 نقش مهمی در بازسازی آندومتر و هومئوستاز در طول چرخه قاعدگی و اوایل بارداری دارد. در آندومتر، پروتئین‌های FOXO1 به‌دلیل توانایی آن‌ها در تنظیم ژن‌های پروآپوپتوزیس یا ژن‌های دخیل در تمایز، توقف چرخه سلولی، دفاع اکسیداتیو و ترمیم DNA به‌عنوان واسطه‌های کلیدی سرنوشت سلول مطرح شده‌اند. FOXO1 در پایین‌دست مسیر NOTCH عمل می‌کند و کاهش سیگنال‌دهی NOTCH در آندومتريوز می‌تواند منجر به کاهش بیان FOXO1 و اختلال در دسیجیوایی شدن گردد. فسفریله شدن FOXO1 در ناحیه سرین ۱۸۴ باعث مهاجرت سلول‌های استرومایی آندومتر شده و در نتیجه منجر به بیماری آندومتريوزیس می‌شود (۲۴).

به‌طور کلی برای ایجاد آندومتريوز فرایندهایی نظیر تکثیر سلولی، مهاجرت و مرگ سلولی و همچنین ایجاد عروق خونی جدید نقش مهمی بازی می‌کند. لذا مطالعه بیان ژن‌هایی نظیر TP53 و FOXO1 که در فرایندهای فوق نقش دارند به‌همراه بررسی بیان miRNAها که در تنظیم بیان ژن‌ها نقش مهمی بازی می‌کنند، می‌تواند به درک مکانیسم‌های ایجاد بیماری آندومتريوز کمک کند. با توجه به مطالب فوق و نقش تنظیمی miR-223-3p در بیان ژن‌ها و همچنین در فرایند EMT و از طرفی اهمیت ژن‌های TP53 و FOXO1 در فرایندهایی نظیر آپوپتوزیس، تکثیر سلولی و بازسازی آندومتر رحم، لذا در این تحقیق به بررسی بیان miR-223-3p و ژن‌های هدف آن یعنی TP53 و FOXO1 در بافت آندومتريوز تخمدانی از طریق تحلیل بیوانفورماتیکی و تایید تجربی پرداخته شده است.

۲- مواد و روش

پژوهش حاضر در دو بخش بیوانفورماتیک و تجربی صورت گرفت.

بخش بیوانفورماتیک

در این پژوهش، از اصطلاح "اندومتريوز" به عنوان یک کلمه کلیدی در پایگاه داده بیان ژن GEO (Gene Expression Omnibus) به آدرس (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) استفاده شد و مجموعه داده سری GSE105765 انتخاب شد. سری GSE105765 شامل پروفایل بیان microRNA های مختلف در بافت های آندومتر اکتوپیک و یوتوپیک در بیماران مبتلا به آندومتريوز تخمدانی است. این مجموعه داده بر اساس پلتفرم GPL11154 تهیه شده که مبتنی بر ریز آرایه ژنومی انسانی و بر پایه داده های توالی یابی RNA (RNA-seq) می باشد. نمونه ها مربوط به ۸ بیمار مبتلا به آندومتريوز تخمدانی بود و از هر بیمار یک نمونه آندومتر اکتوپیک و یک نمونه آندومتريوتوپیک آنالیز شد.

تجزیه و تحلیل ژن های با بیان افتراقی در دو گروه اکتوپیک و یوتوپیک: فایل های مربوط به مجموعه داده سری GSE105765 از پایگاه داده GEO دانلود شد. تجزیه و تحلیل داده های دانلود شده، بین دو گروه نمونه های اکتوپیک و نمونه های یوتوپیک بیماران مبتلا به آندومتريوز تخمدانی، با استفاده از بسته های آماری limma و voom در محیط RStudio انجام شد. با انجام پردازش های مربوطه، داده های غیر مرتبط حذف و جدول مربوط به ژن های با بیان افتراقی بین دو گروه به دست آمد. در ادامه، نمودارهایی رسم شدند که هر یک به تحلیل و درک بهتر تغییرات بیان ژن ها، بین نمونه های اکتوپیک و یوتوپیک کمک کردند. ابتدا نمودار نقشه حرارتی (Heatmap) رسم شد، این نمودار رایج ترین روش برای تصویرسازی داده ها به شمار می رود و میزان بیان هر ژن در هر نمونه به تفکیک گروه ها را نشان می دهد. در این نمودار، رنگ قرمز نشان دهنده بیان بالای ژن ها و رنگ آبی نشان دهنده بیان پایین ژن ها می باشد. در مرحله بعد نمودار آتشفشانی (Volcano) این ژن ها رسم شد. نمودار آتشفشانی نوعی نمودار پراکنده است که اهمیت سطح معنی داری (P-value) را در مقابل بزرگی تغییر (fold change=fc) نشان می دهد. در نهایت بر اساس نتایج این تحلیل ها، ژن هایی که تفاوت بیان معنی دار و بیشتری در گروه اکتوپیک نسبت به یوتوپیک داشتند و تاکنون به صورت گسترده بررسی نشده بودند، شناسایی و از میان آن ها ژن mir-223-3p انتخاب شد.

پیش بینی اهداف miR-223-3p: به منظور دست یابی به اهداف پیش بینی شده miR-223-3p در انسان، از پایگاه داده معتبر miRDB به آدرس (<https://mirdb.org>) استفاده شد. با وارد کردن miRNA مورد نظر و انتخاب جانور مورد مطالعه یعنی انسان، ژن های مرتبط با miR-223-3p نمایش داده شد و در نهایت، از بین ژن های هدف miR-223-3p با بررسی های صورت گرفته دو ژن FOXO1 و TP53 انتخاب شدند. در مرحله بعدی با بهره گیری از نرم افزار Cytoscape (نسخه ۳.۹.۱) شبکه ای از ژن های مرتبط با miR-223-3p سازماندهی و ترسیم شدند. این شبکه نشان دهنده تعاملات پیش بینی شده بین miR-223-3p و ژن های هدف مختلف آن می باشد.

بخش آزمایشگاهی

روش جمع آوری نمونه ها: جهت تایید یافته های بیوانفورماتیکی در خصوص تغییر بیان miR-223-3p در نمونه های آندومتريوزی، نمونه های بافتی اکتوپیک و یوتوپیک از ۴۰ بیمار مبتلا به آندومتريوز تخمدانی در بیمارستان آریا شهر رشت جمع آوری شد. گروه کنترل نیز شامل ۴۰ بیمار بدون آندومتريوز بوده که به دلیل لاپاراسکوپی تشخیصی تحت جراحی قرار گرفتند. میانگین سنی افراد بیمار در این پژوهش ۳۱/۵±۴ سال و برای گروه کنترل ۳۰/۴±۴ سال بود. معیارهای انتخاب شامل: تشخیص بیماری از طریق لاپاراسکوپی، عدم مصرف دارو طی سه ماه پیش از لاپاراسکوپی و نمونه برداری و ارائه رضایت نامه

کتبی بود. در مقابل، معیارهای عدم انتخاب شامل عدم ارائه رضایت‌نامه کتبی، عدم ابتلا به انواع تومورها، دیابت، بیماری‌های مزمن کبدی، کلیوی و بیماری‌های روماتولوژی نظیر آرتریت روماتوئید در نظر گرفته شد. تشخیص بیماری توسط پزشک متخصص زنان و زایمان بیمارستان آریای شهر رشت در طی لاپاروسکوپی بیماران صورت گرفت و کلیه نمونه‌های دریافت شده از اتاق عمل، بلافاصله توسط ازت مایع فریز شده و سریعاً به فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد در آزمایشگاه تحقیقاتی گروه زیست‌شناسی دانشگاه گیلان منتقل شدند. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه گیلان با شناسه اخلاق IR.GUILAN.REC.1403.006 تایید شد.

استخراج RNA کل از نمونه های بافتی: به منظور استخراج RNA کل از نمونه‌های بافتی، از معرف ترایزول استفاده شد و مطابق با دستورالعمل مربوط به شرکت سازنده ترایزول، استخراج RNA کل صورت گرفت. برای اطمینان از استخراج صحیح RNA از الکتروفورز افقی در حضور ژل ۱/۵ درصد استفاده شد و سپس سطح کمی غلظت RNA، به کمک دستگاه نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت. برای اطمینان از وجود DNA، تمام نمونه‌ها تحت تیمار با DNase محصول شرکت (Thermo Scientific, USA) قرار گرفتند.

طراحی آغازگر و سنتز cDNA: با توجه به ناپایداری و امکان تخریب RNA، لازم است تا به مولکول پایدار cDNA تبدیل شود. بدین منظور ابتدا طراحی آغازگرهای اختصاصی جهت سنتز cDNA توسط نرم افزار Oligo7 انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱: ویژگی آغازگرهای مورد استفاده.

طول محصول (جفت باز)	توالی	آغازگر
۶۳ bp	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACG ACCCCAGCTA 5'- ACGCAGAAGGAGCTTACAATCTA-3' 5'- GTGCAGGGTCCGAGGT-3'	hsa-miR-223-3p-STEM hsa-miR-223-3p-R hsa-miR-223-3p-F
۱۲۲ bp	5'- TCAAGAGCGTGCCCTACTTC-3' 5'- AGTTCCTTCATTCTGCACACGA-3'	FOXO1-F FOXO1-R
۱۲۰ bp	5'- TCCTCAGCATCTTATCCGAGT-3' 5'- GTACAGTCAGAGCCAACCTCA-3'	TP53-F TP53-R
۲۳۵ bp	5'- CATCACCATCTTCCAGGAGCG-3' 5'- GGAGGCATTGCTGATGATCTTG-3'	GAPDH-F GAPDH-R
۹۴ bp	5'- CTCGCTTCGGCAGCAC-3' 5'- AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'	U6-F U6-R

ویژگی‌های پرایمر نظیر طول، درصد GC و دمای ذوب بررسی شدند. برای اطمینان از اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی شده، از پایگاه (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) Blast استفاده شد. نتایج این تحلیل، تاییدکننده اختصاصی بودن محل اتصال پرایمرهای طراحی شده بود.

سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت زیست ویرایش به شماره کاتالوگ ZV06010050، ایران و بر اساس دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده، صورت گرفت. مراحل انکوباسیون شامل ۶۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۰

دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در نهایت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بود. پس از اتمام مراحل، میکروتیوپ‌های حاوی cDNA برای نگهداری طولانی مدت به فریزر با دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

بررسی بیان ژن توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (Real Time PCR): برای ارزیابی بیان ژن‌های miR-223-3p، FOXO1 و TP53 از روش Real Time PCR با استفاده از رنگ SYBR Green (یکتا تجهیز، ایران، شماره کاتالوگ: YT2551) استفاده شد. مخلوط واکنش Real Time PCR با توجه به پروتکل پیشنهاد شده توسط شرکت سازنده SYBR Green تهیه شد و به استریپ‌های مخصوص منتقل شد. به منظور اطمینان از صحت نتایج، هر نمونه در دو تکرار به‌درون استریپ منتقل شد و در نهایت استریپ‌های حاوی نمونه به دستگاه Real Time PCR (Roche, Germany) منتقل و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مطابق شرایط دمایی - زمانی جدول ۲ انجام شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از Gradient PCR، دمای بهینه اتصال برای تمامی ژن‌های مورد مطالعه ۶۰ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. همچنین به‌منظور مقایسه و بررسی درستی بیان ژن‌های هدف، از *GAPDH* به‌عنوان ژن مرجع برای ژن‌های FOXO1، TP53 و ژن مرجع U6 برای *miR-223-3p* استفاده شد.

جدول ۲: برنامه دمایی-زمانی واکنش Real Time PCR

مرحله	زمان (دقیقه)	دمای (درجه سانتی‌گراد)	تعداد چرخه
واسرشت‌سازی اولیه	۵ دقیقه	۹۵°C	۱
واسرشت‌سازی ثانویه	۳۰ ثانیه	۹۵°C	۴۰
اتصال آغازگرها به رشته الگو	۳۵ ثانیه	۶۰°C	
طویل شدن	۴۰ ثانیه	۷۲°C	۱
بسط نهایی	۵ دقیقه	۷۲°C	
نگهداری	نامحدود	۴°C	-

۳-آنالیز آماری

پس از اتمام فرآیند Real-time PCR جهت بررسی بیان نسبی ژن‌های FOXO1، TP53، U6 و miR-223-3p، تمام Ct ها در فایل اکسل جمع‌آوری شده و طبق فرمول‌های زیر مقادیر $\Delta\Delta Ct$ ، ΔCt و Fold change محاسبه شد. سپس آنالیز آماری جهت بررسی میزان تغییرات بیان ژن‌های مربوطه، بررسی معنی‌دار بودن میزان تغییرات بیان و همچنین نمودارها و گراف‌ها توسط نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸ رسم شد.

فرمول‌ها:

$$\Delta Ct = Ct - Ct \text{ (ژن مورد نظر)} \text{ (ژن کنترل داخلی)}$$

$$\Delta Ct = Ct - Ct \text{ (ژن مورد نظر)} \text{ (ژن کنترل داخلی)}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct \text{ (میانگین گروه کنترل)}$$

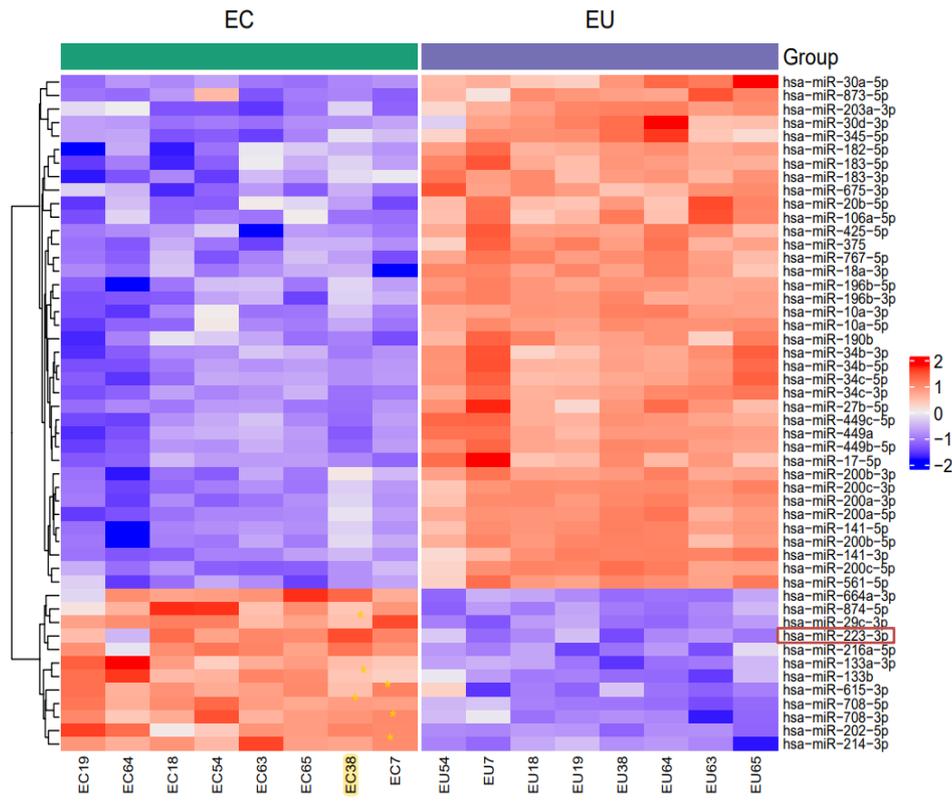
$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

۴- نتایج

بخش بیو انفورماتیک

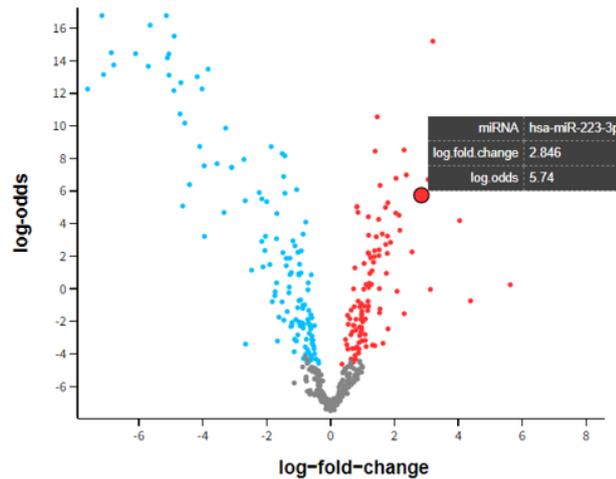
مقایسه بیان *miR-223-3p* در دو گروه اکتوپیک و یوتوپیک

در مجموعه داده سری GSE105765، وضعیت بیان miRNA های مختلف در بافت آندومتر یوتوپیک با بافت اکتوپیک در بیماران مبتلا به آندومتریوز تخمدانی مقایسه شدند. تجزیه و تحلیل ژن‌های با بیان افتراقی از طریق بسته‌های مختلف در نرم افزار Rstudio انجام و نقشه حرارتی این ژن‌ها رسم شد (شکل ۱).



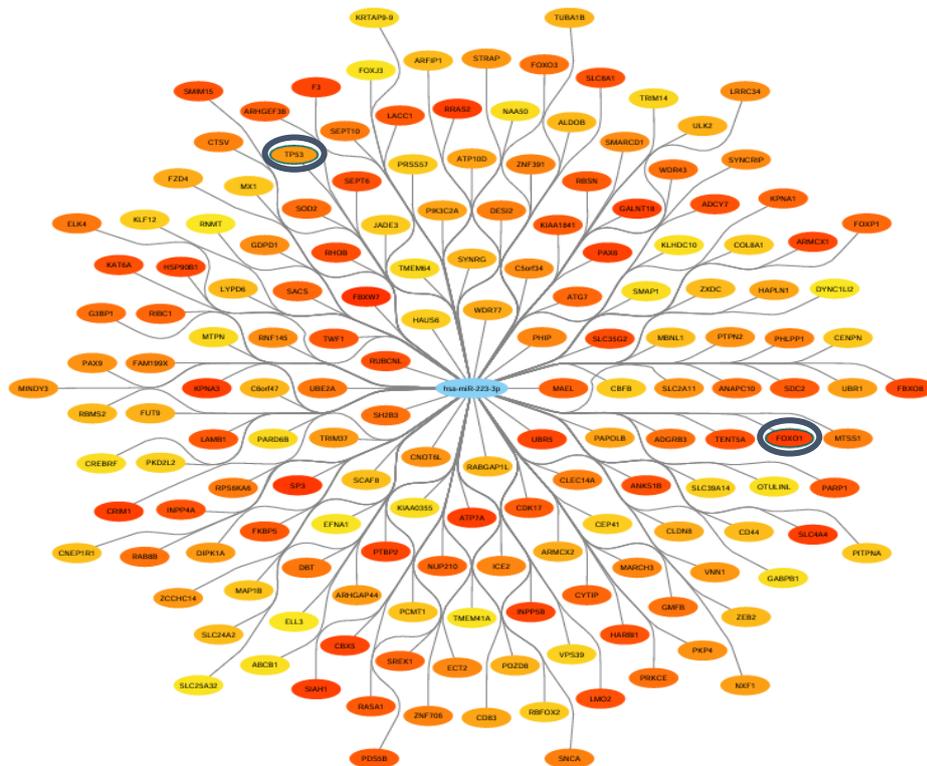
شکل ۱: نقشه حرارتی مربوط به سطوح بیان miRNA های با بیان متفاوت در نمونه‌های بافت اکتوپیک (EC) در مقایسه با نمونه‌های بافت یوتوپیک (EU) در بیماران مبتلا به آندومتریوز تخمدانی. رنگ قرمز بیان‌کننده افزایش بیان و رنگ آبی نشان‌دهنده کاهش بیان miRNA ها است. از میان miRNA های دارای افزایش بیان، *miR-223-3p* انتخاب شد.

مطابق شکل ۱ برخی از miRNA ها در نمونه‌های اکتوپیک نسبت به نمونه‌های یوتوپیک کاهش بیان و برخی از miRNA ها افزایش بیان داشتند. سپس miRNA هایی که در بافت اکتوپیک نسبت به یوتوپیک افزایش بیان داشتند، مورد بررسی قرار گرفتند و در نهایت *miR-223-3p* که تغییرات بیان آن در دو گروه اکتوپیک و یوتوپیک معنی‌دار بود، انتخاب شد. سپس نمودار آتشفشانی (volcano) که نشان‌دهنده معنی‌دار بودن و تفاوت بیان miRNA های مختلف می‌باشد، رسم و miRNA منتخب نیز در آن مشخص شد (شکل ۲).



شکل ۲: نمودار آتشفشانی مربوط به *miR-223-3p*. هر نقطه نشان‌دهنده یک ژن است. نقاط قرمز نشان‌دهنده ژن‌های با افزایش بیان، نقاط آبی نمایانگر ژن‌های با کاهش بیان و نقاط خاکستری ژن‌های بدون تغییر بیان را نشان می‌دهند.

تعیین ژن‌های هدف و رسم شبکه *miR-223-3p*: برای یافتن اهداف پیش‌بینی شده *miR-223-3p* از پایگاه داده miRDB استفاده شد. پس از شناسایی ژن‌های هدف پیش‌بینی شده *miR-223-3p* از این پایگاه داده، با استفاده از نرم افزار Cytoscape (نسخه ۳.۹.۱) برای *miR-223-3p* شبکه‌ای طراحی شد که ارتباط این miRNA با ژن‌های هدف را نشان می‌دهد. در نهایت از بین ژن‌های هدف *miR-223-3p* دو ژن *FOXO1* و *TP53* که در بیماری اندومتزیوز نیز نقش داشتند، انتخاب شدند و در شبکه ترسیم شده نیز نمایش داده شدند (شکل ۳).

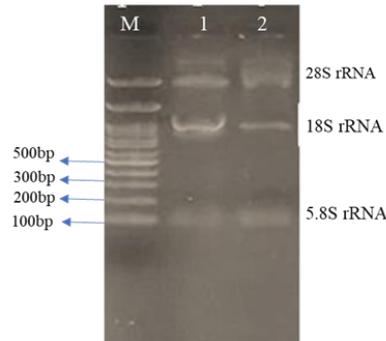


شکل ۳: شبکه ژن‌های هدف *miR-223-3p*. شبکه فوق ژن‌های هدف *miR-223-3p* را نشان می‌دهد که از پایگاه داده miRDB استخراج شده‌اند. *miR-223-3p* با رنگ آبی مشخص شده است. هر گره نمایانگر یک ژن هدف و رنگ آن نشان‌دهنده امتیاز پیش‌بینی شده تعامل است، نقاط پررنگ‌تر بیانگر امتیازات بالاتر در تعامل هستند. از میان ژن‌های هدف *miR-223-3p* دو ژن *FOXO1* و *TP53* انتخاب شدند.

نتایج بخش آزمایشگاهی

نتایج حاصل از بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده

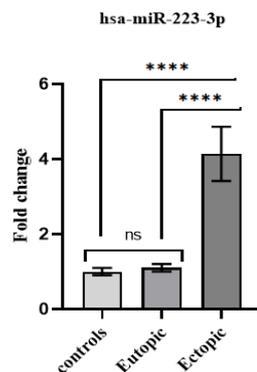
بررسی نمونه‌ها با دستگاه نانودراپ نشان داد که غلظت RNA در محدوده ۶۰۰ تا ۹۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر متغیر بود. همچنین نسبت جذب نوری در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر، در محدوده مطلوب ۱.۸ تا ۲ قرار داشت. برای ارزیابی دقیق تر کیفیت RNA های استخراج شده، از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. مشاهده باندهای مشخص 5.8s rRNA و 28s rRNA، 18s rRNA تاییدکننده کیفیت مناسب RNA های استخراج شده بود (شکل ۴).



شکل ۴: تصویر ژل آگارز ۱/۵ درصد از RNA کل استخراج شده. ستون اول از سمت چپ نشان دهنده مارکر 100 bp و ستون های سمت راست نشان دهنده RNA کل استخراج شده هستند. مشاهده سه باند نشان دهنده کیفیت خوب RNA استخراج شده می باشد. M: مارکر 100 bp.

نتایج بیان miR-223-3p در نمونه های اکتوپیک، یوتوپیک و گروه کنترل

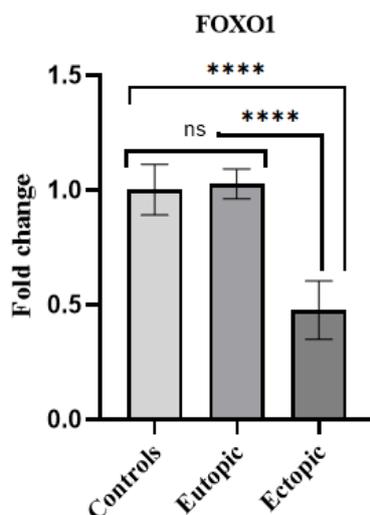
جهت بررسی تغییرات بیان ژن miR-223-3p در نمونه های بافت آندومتریوم اکتوپیک و یوتوپیک افراد مبتلا به آندومتریوز تخمدانی و بافت آندومتر طبیعی افراد سالم، Ct های به دست آمده برای هر نمونه به نرم افزار Excel منتقل و سپس میزان بیان و Fold Change نمونه ها محاسبه شد. میانگین بیان نسبی ژن miR-223-3p در گروه اکتوپیک برابر با $4/13 \pm 0/72$ در گروه یوتوپیک $1/10 \pm 0/10$ و در گروه کنترل برابر با $1/00 \pm 0/09$ محاسبه شد. به عبارت دیگر، بیان نسبی ژن miR-223-3p در گروه اکتوپیک نسبت به گروه یوتوپیک و گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافته است ($p < 0/0001$). در حالی که بین دو گروه کنترل و یوتوپیک تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($p = 0/54$) (شکل ۵).



شکل ۵: میزان بیان نسبی miR-223-3p در سه گروه بافت کنترل (آندومتر طبیعی) و بافت اکتوپیک و یوتوپیک بیماران مبتلا به آندومتریوز تخمدانی. Control: گروه کنترل، Eutopic: بافت یوتوپیک، Ectopic: بافت نابه جا (اکتوپیک)، **** نشان دهنده تفاوت معنی دار بین گروه ها و ns نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار بین گروه ها است. میزان بیان miR-223-3p در گروه اکتوپیک، $4/138 \pm 0/72$ در گروه یوتوپیک، $1/100 \pm 0/10$ و در گروه کنترل، $1/000 \pm 0/09$ است. افزایش معنی داری بین گروه اکتوپیک نسبت به گروه یوتوپیک و گروه کنترل دیده شد ($p < 0/0001$). در حالی که بین دو گروه کنترل و یوتوپیک تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($p = 0/54$).

نتایج بیان FOXO1 در نمونه‌های اکتوپیک و یوتوپیک و گروه کنترل

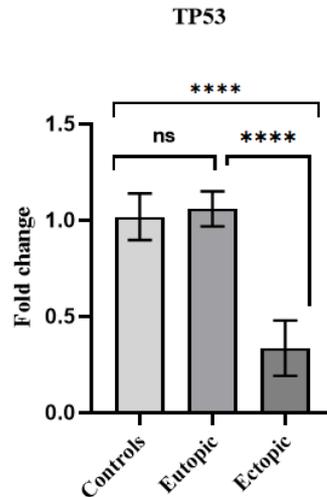
در این مطالعه، میزان بیان نسبی FOXO1 در نمونه‌های بافت اکتوپیک، یوتوپیک بیماران مبتلا به اندومتريوز تخمدانی و گروه کنترل بررسی شد. نتایج نشان داد که میانگین بیان FOXO1 در گروه اکتوپیک (0.47 ± 0.12) به طور قابل توجهی پایین تر از گروه یوتوپیک (1.02 ± 0.06) و گروه کنترل (1.01 ± 0.11) بود. تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) کاهش معنی داری در بیان FOXO1 در گروه اکتوپیک نسبت به گروه یوتوپیک و همچنین نسبت به گروه کنترل نشان داد ($p < 0.001$). از سوی دیگر، مقایسه بین گروه یوتوپیک و گروه کنترل تفاوت معنی داری در میزان بیان FOXO1 نشان نداد ($p = 0.53$) (شکل ۶).



شکل ۶: میزان بیان نسبی FOXO1 در سه گروه کنترل (اندومتر طبیعی) و بافت اکتوپیک و یوتوپیک بیماران مبتلا به اندومتريوز تخمدانی. Control: گروه کنترل، Eutopic: بافت یوتوپیک، Ectopic: بافت نابه‌جا (اکتوپیک)، *** نشان دهنده تفاوت معنی دار بین گروه‌ها و ns نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار بین گروه‌ها است. میزان بیان FOXO1 در گروه اکتوپیک، 0.475 ± 0.12 و در گروه یوتوپیک، 1.026 ± 0.06 و در گروه کنترل، 1.011 ± 0.11 است. کاهش معنی داری بین گروه اکتوپیک نسبت به گروه یوتوپیک و گروه کنترل دیده شد ($p < 0.001$). در حالی که بین دو گروه کنترل و یوتوپیک تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($p = 0.53$).

نتایج بیان TP53 در نمونه‌های اکتوپیک و یوتوپیک و گروه کنترل

میزان بیان نسبی TP53 در گروه اکتوپیک (0.335 ± 0.14)، گروه یوتوپیک (1.059 ± 0.09) و گروه کنترل (1.018 ± 0.12) مورد بررسی قرار گرفت. تحلیل آماری نشان داد که بیان TP53 در گروه اکتوپیک نسبت به گروه یوتوپیک و گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافته است ($p < 0.001$). از سوی دیگر، تفاوت معنی داری بین بیان TP53 در گروه یوتوپیک و گروه کنترل مشاهده نشد ($p = 0.28$) (شکل ۷).



شکل ۷: میزان بیان نسبی TP53 در سه گروه کنترل (آندومتر طبیعی) و بافت اکتوپیک و یوتوپیک بیماران مبتلا به آندومتریوز تخمدانی. Control: گروه کنترل، Eutopic: بافت یوتوپیک، Ectopic: بافت نابه‌جا (اکتوپیک)، **** نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها و ns نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها است. میزان بیان TP53 در گروه اکتوپیک، $0/14 \pm 0/335$ در گروه یوتوپیک، $0/09 \pm 0/059$ و در گروه کنترل، $0/12 \pm 0/018$ است. کاهش معنی‌داری بین گروه اکتوپیک نسبت به گروه یوتوپیک و گروه کنترل دیده شد ($p < 0/0001$). در حالی که بین دو گروه کنترل و یوتوپیک تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p = 0/28$).

۵- بحث

آندومتریوز یکی از بیماری‌های شایع زنان است که حدود ۱۰ درصد زنان در سنین باروری را در سراسر جهان تحت تاثیر قرار می‌دهد (۲۵). اگرچه آندومتریوز به‌طور کلی یک وضعیت خوش‌خیم در نظر گرفته می‌شود، اما خطر تبدیل شدن به بیماری سرطان، از جمله سرطان تخمدان را دارد. شباهت‌های فنوتیپی میان سلول‌های آندومتریوزی و سلول‌های سرطانی، نظیر رشد بی‌رویه سلولی و کاهش فرآیند آپوپتوزیس، نشان‌دهنده ویژگی‌های مولکولی مشترک آن‌ها است (۲۶). miRNA ها گروهی از RNA های کوچک غیرکدکننده هستند که در تنظیم بیان ژن‌ها نقش کلیدی ایفا می‌کنند. این مولکول‌ها با اتصال به ناحیه ۳'-UTR در mRNA های هدف خود باعث کاهش ترجمه یا تخریب mRNA می‌شوند (۲۷) و بدین ترتیب در فرآیندهای سلولی مانند تکثیر، تمایز، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و پاسخ به استرس‌های سلولی نقش دارند (۲۸). تغییر در بیان miRNA ها با بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان‌ها (۲۹) و بیماری‌های التهابی مانند آندومتریوز مرتبط است (۳۰) (miR-223-3p_ یکی از miRNA های کلیدی است که با هدف قرار دادن ژن‌های مختلف، در فرایندهای التهابی، تمایز سلول‌های ایمنی، تنظیم تکثیر سلولی و مرگ سلولی نقش دارد (۳۱). مطالعات متعددی در خصوص بیان miR-223-3p در بیماری‌های مختلف انجام شده است: در مطالعه‌ای Wang و همکاران (۱۳)، نشان دادند که بیان miR-223-3p در بافت‌های سرطان پستان به‌طور چشم‌گیری افزایش می‌یابد و یک رابطه فیزیکی و عملکردی بین miR-223-3p و FBXW7 (F-box and WD repeat domain-containing 7) وجود دارد و miR-223-3p با تنظیم منفی بیان FBXW7، به‌عنوان یک فاکتور محرک تومور عمل کرده و تهاجم و متاستاز سلول‌های سرطان پستان را تقویت می‌کند. Du و همکاران (۳۲) نشان دادند که miR-223 از طریق فعال‌سازی مسیر سیگنال‌دهی Hippo/Yap1 (Yes-associated protein 1) در تکثیر، مهاجرت، تهاجم و EMT سلول‌های سرطان پستان نقش دارد.

مطالعه‌ی Fang و همکاران (۳۳) نشان دادند که بیان miR-223 در رده‌های سلولی سرطان تخمدان شامل SKOV3، OVCAR3، A2780 و ES2 در مقایسه با رده سلولی تخمدانی غیرسرطانی تغییر نشان می‌دهد. بیان نابجای miR-223 در این رده‌های سلولی، سطح پروتئین‌های Ki67 (نشانگر تکثیر سلولی) و PCNA (proliferating cell nuclear antigen) را افزایش می‌دهد. آن‌ها همچنین نشان دادند که مهار اختصاصی miR-223 در سلول‌های سرطان تخمدان، از طریق حذف مهار مستقیم آن بر -SRV (SOX11) box transcription factor 11 منجر به افزایش بیان این پروتئین شده و مهاجرت و تهاجم سلولی را کاهش می‌دهد. Lu و همکاران (۳۴) نشان دادند که در سرطان اپی‌تلیال تخمدان بیان RNA circBNC2 (حلقوی BNC2 (و LARP4) پروتئین مرتبط با La-4 (کاهش یافته، در حالی که بیان miR-223-3p افزایش یافته است. circBNC2 به‌عنوان یک اسفنج مولکولی برای miR-223-3p عمل می‌کند و آن را مهار می‌کند، LARP4 نیز هدف مستقیم miR-223-3p است. به‌طور کلی، کاهش بیان circBNC2/miR-223/LARP4 می‌تواند به‌عنوان یک مکانیسم تنظیمی هدفمند برای درمان سرطان اپی‌تلیال تخمدان مطرح شود. در طی مطالعاتی که Liu و همکاران (۳۵) انجام دادند، نشان داده شد که miR-223 به‌طور مستقیم رونوشت FBXW7 را مورد هدف قرار می‌دهد، که زیر واحد شناسایی سوپسترا در (SKP1/CUL1/F-box protein) SCF است، بنابراین آپوتوزیس را سرکوب کرده و از طریق مسیرهای Notch و Akt/mTOR میزان تکثیر سلولی را تغییر می‌دهد. Cheng و همکاران (۳۶) نشان دادند که miR-223 با دخالت در مکانیسم‌های مرگ سلولی در سلول‌های سرطان روده بزرگ و افزایش تکثیر سلولی از طریق کاهش بیان BCL2-like 11 (BCL2L11/BIM) از طریق fork head box O3 (FOXO3a)، موجب افزایش تکثیر سلولی می‌شود. همچنین Ju و همکاران (۳۷) در مطالعه‌ای نشان دادند که در رده سلولی SW620 مربوط به سرطان کولورکتال، miR-223 سیگنال‌دهی FoxO3a/BIM را به‌طور منفی تنظیم می‌کند و بدین ترتیب تکثیر سلولی افزایش می‌یابد.

FOXO1 و TP53 از مهم‌ترین اهداف miR-223-3p هستند که نقش‌های حیاتی در تنظیم فعالیت‌های سلولی دارند Wang و همکاران (۳۸)، نشان دادند که بیان NEK2 در آندومتر اکتوپیک بیماران مبتلا به آندومتريوز افزایش یافته است. در عین حال، NEK2 با FOXO1 تعامل دارد و FOXO1 را در موقعیت Ser184 فسفریله می‌کند، که باعث کاهش پایداری پروتئین FOXO1 می‌شود. فسفریلاسیون FOXO1 توسط NEK2 موجب افزایش تکثیر سلولی، مهاجرت، تهاجم و اختلال در واکنش دسیدوایی می‌شود. همچنین Li و همکاران (۳۹)، نشان دادند که (methyltransferase- توسط تنظیم شده m6A (N6-methyladenosine) FOXO1 mRNA از طریق YTHDF2 می‌شود و به این ترتیب بر واکنش دسیدوایی سلولی، کاشت جنین و قدرت باروری زنان مبتلا به آندومتريوز تاثیر می‌گذارد. Shan و همکاران (۴۰)، در طی مطالعه‌ای نشان دادند که سطوح بیان Rab27b، در ضایعات آندومتريوزی به‌طور قابل توجهی بالاتر از آندومتر طبیعی می‌باشد و از طرفی استروژن سطوح FOXO1 فسفریله شده را در ضایعات آندومتريوزی افزایش می‌دهد و باعث افزایش بیان Rab27b می‌شود. Rab27b یکی از اعضای خانواده GTPase های Rab است و ارتباط قوی با رشد، تهاجم و متاستاز انواع تومورها دارد. در مطالعه‌ی Rezak و همکاران (۴۱) دریافتند که miR-34a ممکن است از طریق SIRT-1 بیان FOXO1 را در بافت آندومتريوزی تنظیم کند و به این ترتیب می‌تواند با کاهش آپوتوزیس طبیعی در آندومتر به پاتوژنز آندومتريوز کمک کند. ژن TP53 پروتئین p53 را کد می‌کند که می‌تواند به‌طور موثر باعث توقف چرخه سلولی، ترمیم DNA، پیری سلولی، آپوتوزیس و اتوفازی شود. جهش‌های TP53 تقریباً در ۵۰ درصد از تومورها مشاهده می‌شود (۴۲). Ghafouri- Fard و همکاران (۴۳)، کاهش غیرطبیعی بیان TP53 و lncRNA های مرتبط با آن را در بافت‌های سرطان پستان نشان دادند که با نقش حیاتی این ژن سرکوب‌کننده تومور در پیشگیری از سرطان همخوانی دارد. همچنین Guo و همکاران (۴۴) نشان دادند که TRIM31 به‌عنوان یک E3 ubiquitin ligase

می‌تواند با تثبیت و جلوگیری از تخریب p53 از پیشرفت سرطان پستان جلوگیری کند و شاید در آینده به‌عنوان یک روش درمانی جدید برای درمان این نوع سرطان مورد استفاده قرار بگیرد. در مطالعه‌ای که توسط Guo و همکاران (۴۵) انجام شد، مشخص گردید که بیان LEMD1-AS1 (RNA آنتی‌سنس LEMD1) در بافت‌های سرطان تخمدان و رده‌های سلولی آن کاهش یافته است و نتایج این تحقیق نشان داد که LEMD1-AS1 می‌تواند مستقیماً با miR-183-5p و پروتئین p53 تعامل داشته باشد. نقش ضدتوموری LEMD1-AS1 در پیشرفت سرطان تخمدان، وابسته به بیان TP53 توسط miR-183-5p است. Duan و همکاران (۴۶)، به بررسی بیان و اهمیت بالینی کیناز دی فسفات نوکلئوتیداً (Nm23-H1)، p53 و اینتگرین $\beta 1$ در آندومتریوز، بافت‌های آندومتر نرمال و اکتوپیک پرداختند و دریافتند که در مقایسه با بافت آندومتر نرمال، سطح پروتئین‌های nm23-H1 و p53 به طور قابل توجهی در بافت‌های آندومتر اکتوپیک کاهش یافته، در حالی که پروتئین اینتگرین $\beta 1$ افزایش یافته است. بنابراین-Nm23-H1 و p53 ممکن است پیشرفت آندومتریوز را مهار کنند، در حالی که اینتگرین $\beta 1$ اثر ترویجی دارد. Ma و همکاران (۴۷)، نشان دادند که ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم ژن p53 و میزان شیوع آندومتریوز در زنان وجود دارد. به‌طوری که کاهش فراوانی ژن GG و افزایش آلل C ممکن است خطر ابتلا به این بیماری‌ها را افزایش دهد. نتایج این مطالعه نشان داد که بیان miR-223-3p در نمونه‌های اکتوپیک بیماران مبتلا به آندومتریوز تخمدانی نسبت به نمونه‌های یوتوپیک و کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است، در حالی که بیان ژن‌های FOXO1 و TP53 در نمونه‌های اکتوپیک بیماران مبتلا به آندومتریوز تخمدانی نسبت به نمونه‌های یوتوپیک و کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است. از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: این تحقیق منحصراً روی miR-223-3p و دو ژن هدف آن یعنی FOXO1 و TP53 متمرکز شد. یک miRNA منفرد می‌تواند چندین ژن را هدف قرار دهد، در حالی که یک ژن می‌تواند تحت تاثیر RNA های تنظیمی مختلف مانند microRNA ها و RNA های حلقوی (circRNAs) قرار گیرد. بنابراین، سایر RNA های طولانی غیر کد کننده (lncRNA) و ژن‌های هدف آن‌ها نیز ممکن است در ایجاد آندومتریوز نقش داشته باشند. این مطالعه نشان داد که سطح بیان miR-223-3p در نمونه‌های بافتی از بیماران مبتلا به آندومتریوز تخمدان بیشتر از گروه کنترل بود. برعکس در بیمارانی که با آندومتریوز تخمدان تشخیص داده شدند، سطوح FOXO1 و TP53 به‌طور قابل توجهی کاهش نشان داد. کاهش سطوح FOXO1 و TP53 ممکن است نتیجه افزایش بیان miR-223-3p باشد، زیرا هر دو هدف این miRNA خاص هستند، همان‌طور که توسط تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک پیشنهاد شده است. لذا بررسی تعداد بیشتری از miRNA ها و ژن‌های دخیل در این بیماری می‌تواند به نتیجه‌گیری صحیح‌تر کمک کند.

۶- نتیجه گیری

نتیجه‌گیری می‌شود که بیان ژن‌های miR-223-3p، FOXO1 و TP53 در بافت آندومتر بیماران مبتلا به آندومتریوز تغییر می‌کند. همچنین، این نتایج نشان می‌دهد که این ژن‌ها ممکن است به‌عنوان عوامل بالقوه در پاتوژنز (بیماری‌زایی) آندومتریوز تخمدانی مطرح شوند و دارای پتانسیل درمانی برای این بیماری باشند.

۷- تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان رشت جهت حمایت و تامین منابع مالی این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

1. Saunders PT, Horne AW. Endometriosis: Etiology, pathobiology, and therapeutic prospects. *Cell*. 2021 May 27;184(11):2807-24.
2. Zondervan KT, Becker CM, Missmer SA. Endometriosis. *New England Journal of Medicine*. 2020 Mar 26;382(13):1244-56.
3. Kovács Z, Glover L, Reidy F, MacSharry J, Saldova R. Novel diagnostic options for endometriosis—Based on the glycome and microbiome. *Journal of advanced research*. 2021;33:167-81.
4. Ben-Meir LC, Soriano D, Zajicek M, Yulzari V, Bouaziz J, Beer-Gabel M, et al. The association between gastrointestinal symptoms and transvaginal ultrasound findings in women referred for endometriosis evaluation: a prospective pilot study. *Ultraschall in der Medizin-European Journal of Ultrasound*. 2022;43(05):e81-9.
5. Taylor HS, Kotlyar AM, Flores VA. Endometriosis is a chronic systemic disease: clinical challenges and novel innovations. *The Lancet*. 2021;397(10276):839-52.
6. Adams BD, Parsons C, Walker L, Zhang WC, Slack FJ. Targeting noncoding RNAs in disease. *The Journal of clinical investigation*. 2017;127(3):761-71.
7. Moran Y, Agron M, Praher D, Technau U. The evolutionary origin of plant and animal microRNAs. *Nature ecology & evolution*. 2017;1(3):0027.
8. Panir K, Schjenken JE, Robertson SA, Hull ML. Non-coding RNAs in endometriosis: a narrative review. *Human reproduction update*. 2018;24(4):497-515.
9. Gu J, Xu H, Chen Y, Li N, Hou X. MiR-223 as a regulator and therapeutic target in liver diseases. *Frontiers in immunology*. 2022;13:860661.
10. Ma J, Cao T, Cui Y, Zhang F, Shi Y, Xia J, Wang ZP. miR-223 regulates cell proliferation and invasion via targeting PDS5B in pancreatic cancer cells. *Molecular Therapy Nucleic Acids*. 2019;14:583-92.
11. Zhang J, Luo X, Li H, Yue X, Deng L, Cui Y, Lu Y. MicroRNA-223 functions as an oncogene in human colorectal cancer cells. *Oncology Reports*. 2014;32(1):115-20.
12. Haneklaus M, Gerlic M, O'Neill LA, Masters SL. miR-223: infection, inflammation and cancer. *Journal of internal medicine*. 2013;274(3):215-26.
13. Wang Y, Shi S, Wang Y, Zhang X, Liu X, Li J, Li P, Du L, Wang C. miR-223-3p targets FBXW7 to promote epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer. *Thoracic Cancer*. 2022;13(3):474-82.
14. Sadakierska-Chudy A. MicroRNAs: Diverse Mechanisms of Action and Their Potential Applications as Cancer Epi-Therapeutics. *Biomolecules*. 2020;19:1285
15. Kasthuber ER, Lowe SW. Putting p53 in context. *Cell*. 2017;170(6):1062-78.
16. Sabapathy K, Lane DP. Therapeutic targeting of p53: all mutants are equal, but some mutants are more equal than others. *Nature reviews Clinical oncology*. 2018;15(1):13-30.
17. Williams AB, Schumacher B. p53 in the DNA-damage-repair process. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2016;6(5):a026070.
18. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression?. *Cell death & differentiation*. 2018;25(1):104-13.
19. Paskulin, D., Cunha-Filho, J., Souza, C. Bortolini MC, Hainaut P, Ashton-Prolla P. P53 PIN3 and PEX4 polymorphisms and infertility associated with endometriosis or with post-in vitro fertilization implantation failure. *Cell Death Dis* 2012;3; e392.

20. Kyriazis ID, Hoffman M, Gaignebet L, Lucchese AM, Markopoulou E, Palioura D, et al. KLF5 is induced by FOXO1 and causes oxidative stress and diabetic cardiomyopathy. *Circulation research*. 2021;128(3):335-57.
21. Shi G, Liao PY, Cai XL, Pi XX, Zhang MF, Li SJ, Quan JH, Fan YM. FoxO1 enhances differentiation and apoptosis in human primary keratinocytes. *Experimental Dermatology*. 2018;27(11):1254-60.
22. Graves DT, Milovanova TN. Mucosal immunity and the FOXO1 transcription factors. *Frontiers in immunology*. 2019;10:2530.
23. Hornsveld M, Smits LM, Meerlo M, Van Amersfoort M, Groot Koerkamp MJ, van Leenen D, et al. FOXO transcription factors both suppress and support breast cancer progression. *Cancer research*. 2018;78(9):2356-69.
24. Kang N, Shan H, Wang J, Mei J, Jiang Y, Zhou J, et al. Calpain7 negatively regulates human endometrial stromal cell decidualization in EMs by promoting FoxO1 nuclear exclusion via hydrolyzing AKT1. *Biology of Reproduction*. 2022;106(6):1112-25.
25. Allaire C, Bedaiwy MA, Yong PJ. Diagnosis and management of endometriosis. *Cmaj*. 2023;195(10):E363-71.
26. Gaia-Oltean AI, Braicu C, Gulei D, Ciortea R, Miha D, Roman H, et al. Ovarian endometriosis, a precursor of ovarian cancer: Histological aspects, gene expression and microRNA alterations. *Experimental and therapeutic medicine*. 2021;21(3):1-1.
27. Chipman LB, Pasquinelli AE. miRNA targeting: growing beyond the seed. *Trends in genetics*. 2019;35(3):215-22.
28. MacFarlane LA, R Murphy P. MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer. *Current genomics*. 2010;11(7):537-61.
29. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal transduction and targeted therapy*. 2016;1(1):1-9.
30. Dai L, Lou W, Zhu J, Zhou X, Di W. MiR-199a inhibits the angiogenic potential of endometrial stromal cells under hypoxia by targeting HIF-1 α /VEGF pathway. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(5):4735.
31. Barbagallo D, Ponti D, Bassani B, Bruno A, Pulze L, Akkihal SA, et al. MiR-223-3p in cancer development and cancer drug resistance: same coin, different faces. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(15):8191.
32. Du T, Wang D, Wan X, Xu J, Xiao Q, Liu B. Regulatory effect of microRNA-223-3p on breast cancer cell processes via the Hippo/Yap signaling pathway. *Oncology Letters*. 2021;22(1):516.
33. Fang G, Liu J, Wang Q, Huang X, Yang R, Pang Y, et al. MicroRNA-223-3p regulates ovarian cancer cell proliferation and invasion by targeting SOX11 expression. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(6):1208.
34. Lu M, Gong B, Wang Y, Li J. CircBNC2 affects epithelial ovarian cancer progression through the miR-223-3p/LARP4 axis. *Anti-Cancer Drugs*. 2023;34(3):384-94.
35. Liu Z, Ma T, Duan J, Liu X, Liu L. MicroRNA-223-induced inhibition of the FBXW7 gene affects the proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells via the Notch and Akt/mTOR pathways. *Molecular medicine reports*. 2021;23(2):154.
36. Cheng Z, Cao Y, Ni Q, Qin J. miR-223 Promotes Proliferation of Colon Cancer Cells by Down-Regulating Bcl-2-Like Protein 11 (BIM) Expression. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*. 2019;9(10):1424-8.
37. Ju H, Tan JY, Cao B, Song MQ, Tian ZB. Effects of miR-223 on colorectal cancer cell proliferation and apoptosis through regulating FoxO3a/BIM. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*. 2018;22(12).

38. Wang M, Sun F, Zhang S, Zhang X, Sun Y, Yu T, et al. NEK2 promotes the development of ovarian endometriosis and impairs decidualization by phosphorylating FOXO1. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2024;81(1):237.
39. Li X, Jin J, Long X, Weng R, Xiong W, Liang J, et al. METTL3-regulated m6A modification impairs the decidualization of endometrial stromal cells by regulating YTHDF2-mediated degradation of FOXO1 mRNA in endometriosis-related infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2023;21(1):99.
40. Shan J, Chang LY, Li DJ, Wang XQ. Rab27b promotes endometriosis by enhancing invasiveness of ESCs and promoting angiogenesis. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2023;90(3):e13762.
41. Rezk NA, Lashin MB, Sabbah NA. MiRNA 34-a regulate SIRT-1 and Foxo-1 expression in endometriosis. *Non-coding RNA research*. 2021;6(1):35-41.
42. Mogi A, Kuwano H. TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *BioMed Research International*. 2011;2011(1):583929.
43. Ghafouri-Fard S, Sohrabi B, Hussen BM, Mehravaran E, Jamali E, Arsang-Jang S, et al. Down-regulation of MEG3, PANDA and CASC2 as p53-related lncRNAs in breast cancer. *Breast Disease*. 2022;41(1):137-43.
44. Guo Y, Li Q, Zhao G, Zhang J, Yuan H, Feng T, et al. Loss of TRIM31 promotes breast cancer progression through regulating K48-and K63-linked ubiquitination of p53. *Cell death & disease*. 2021;12(10):945.
45. Guo R, Qin Y. LEMD1-AS1 suppresses ovarian cancer progression through regulating miR-183-5p/TP53 axis. *OncoTargets and therapy*. 2020:7387-98.
46. Duan R, Wang Y, Lin A, Lian L, Cao H, Gu W, et al. Expression of nm23-H1, p53, and integrin $\beta 1$ in endometriosis and their clinical significance. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2020 May 1;13(5):1024.
47. Ma X, Jin X, Shao X, Hu W, Jin H, Wang Y. Artificial Intelligence Based Study Association between p53 Gene Polymorphism and Endometriosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Computational Intelligence and Neuroscience*. 2022;2022(1):8568820.