مجلة جامعة دمشق للعلوم الطبية
المجلد 39 العدد 4 (2023): 55- 78

Damascus University Journal of Medical Sciences
Vol. 39 No. 4 (2023): 55 - 78

الرنا الصغري ودوره في تنامي الأعراس والالقاح والتنامي الجنيني المبكر

د. ريم ندره ندره[1]

[1] مدرسة – قسم العلوم الأساسية -كلية طب الأسنان – جامعة دمشق .

الملخص:

الحمض النووي الريبي الصغري MicroRNAs هو عبارة عن رنا قصير غير مرمز Small noncoding RNAs يقدر طوله بحوالي 22 نيوكليوتيد، يصطنع حيوياً في النواة بشكل منتسخ بدئي ويتم نضجه في السيتوبلاسما. ومن الممكن إفرازه خارج الخلية على شكل رنا صغري ناضج حيث يعمل بآليات مراقبة ما بعد النسخ على تنظيم التعبير الجيني للخلية الهدف. يمثل الرنا الصغري صفاً جديداً من المنظمات الجزيئية التي تمتلك أدواراً مهمة في أثناء التنامي الجنيني حتى الولادة وما بعد الولادة وعند البالغ. لقد أجرينا مراجعة نظرية في الأدبيات العلمية لتقديم الأدلة المتاحة حاليًا حول الأدوار المحتملة لأنواع الرنا الصغري في تشكل الاعراس وفي الالقاح وفي مراحل التنامي الجنيني المبكر Early development embryo لقد حاولنا هنا بيان تأثير بعض أنواع الرنا الصغري في هذه الحوادث من خلال تعديل المسارات الرئيسة للتأشير الخلوي ومناقشة قابلية استخدامها كمؤشرات حيوية واعدة لتحسين الخصوبة عند المرأة والرجل وضمان جودة الجنين وسلامة تناميه المبكر.

الكلمات المفتاحية: الرنا الصغري، تشكل الاعراس، الالقاح، التنامي الجنيني المبكر، الخصوبة.

تاريخ الايداع:2022/9/15
تاريخ القبول: 2022/10/24

CC BY NC SA

حقوق النشر: جامعة دمشق – سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب CC BY-NC-SA

ISSN: 2789-7214 (online)
http://journal.damascusuniversity.edu.sy

Roles of microRNA in gametogenesis, fertilization and early development embryo

Dr. Reem Nadra Nadra[1]

[1]Teacher in the Department of Basic Science- Faculty of Dentistry- Damascus university

Abstract:

MicroRNAs are small noncoding RNAs of approximately 22 nucleotides in length, biosynthesized in the nucleus as a pre-microRNA, and matured in the cytoplasm. It can be secreted outside the cell as mature microRNA where it acts by post-transcriptional control mechanisms to regulate target cell gene expression. MicroRNAs represent a new class of molecular regulators that have important roles during fetal development until birth, after birth, and in the adult. We conducted a systematic literature review to present the currently available evidence about the possible roles of microRNAs in gametogenesis, fertilization and early development embryo. Here we have tried to show the effect of some types of microRNA on these events by modifying the main pathways of cellular signaling and discussing their applicability as promising biomarkers for improving fertility in women and men, ensuring the quality of the fetus and its safety early development.

KeyWords: Microrna, Gametogenesis, Fertilization, Early Development Embryo, Fertility.

Received: 15/9/2022
Accepted: 24/10/2022

Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a **CC BY- NC-SA**

1. المقدمة Introduction:

تعتبر عائلة الرنا عند حقيقيات النوى RNA family Eukaryotic من وجهة نظر حديثة وعصرية عائلة لها عدداً كبيراً من الأفراد، حيث يرمز 2% من مجموع الرنا المتواجد في الخلية إلى رنا رسول منسوخ يترجم إلى بروتينات أساسية ووظيفية؛ أما 98 % من مجموع الرنا المتبقي فهو عبارة عن رنا غير مرمز non codant RNA، منه ماهو منسوخ غير مترجم مثل الرنا الريبوزومي rRNA والرنا الناقل tRNA ومنه ما هو رنا صغير الحجم small RNA مختزن في السيتوبلاسما مثل الرنا المتداخل interfering RNA والرنا الصغري micro RNA أو رنا صغير الحجم small RNA مختزن في النواة مثل الرنا الصغري النووي small nuclear RNA أو (RNAsn) والرنا الصغري النويوي Small nucleolus RNA أو (RNAsno) والرنا الصغري التضفيري أو Trans-slicing RNA (Green *et al.*, 2016, 125-126; Perkel, 2013, 301). يتواجد الرنا الصغري عند النباتات والحيوانات بشكل رنا غير مرمز صغير الحجم بطول 21–22 نيوكلوتيداً (Bartel, 2004, 281)، وينتَج من قبل جينات مرمز لها في الجينوم البشري، تنتسخ على شكل منتسخ بدئي "pre-miRNA" بطول حوالي 70–100 نيوكلوتيد بوليمراز رقم 2 أو pol II يمتلك هذا المنتسخ البدئي القدرة على تشكيل بنية جذر–عروة stem-loop structure ويعالج لاحقاً بقطعه إلى رنا غير مرمز قصير بوساطة أنزيم نووي لمرة أولى ويقطع بأنزيم آخر مرة ثانية في السيتوبلاسما (Lee *et al.*, 2004, 4055; Axtell *et al.*, 2011, 3). لقد صنف عند الإنسان أكثر من 1100 نوع رنا صغري و 717 نوع عند الفأر و387 نوع الجرذ و186 نوع عند ذبابة الفواكه. يلعب كل نوع من أنواع الرنا الصغري دوراً في تثبيط التعبير لعدة جينات ويُنظِّم عمل حوالي 60% من مجموع الجينات عند الإنسان بوساطة رنا صغير الحجم (Finnegan and Pasquinelli, 2013, 52, Obernosterer *et al.*, 2006, 1126).

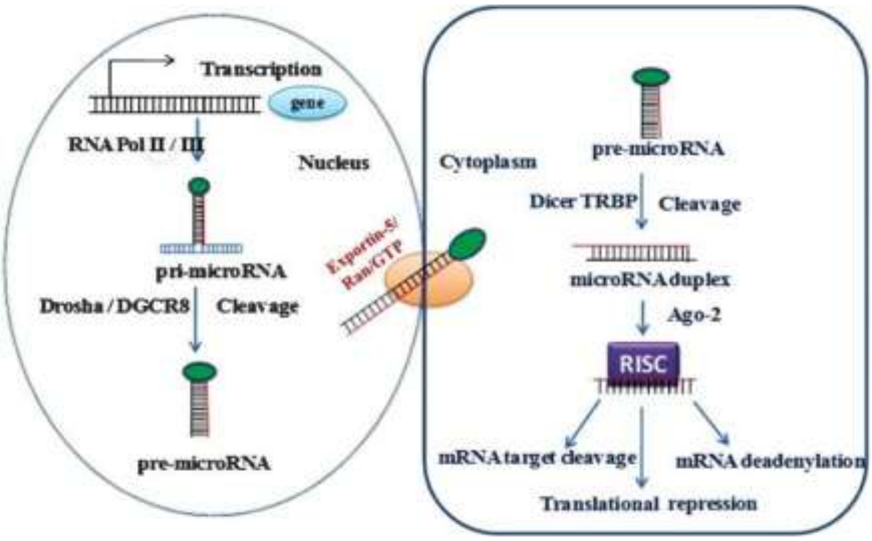
لقد عرف منذ عقود تدخل العديد من العوامل داخلية المنشأ كالذخيرة الجينية الابوية وبعض العضيات السيتوبلاسمية مثل النطاف والمريكزات والمتقدرات وجزيئات أخرى مهمة مثل البروتينات والرنا في حادثة تشكل النطاف ونضجها وإخصاب البيضة وتنامي الجنين. أما حالياً فقد عرف أدوراً للرنا غير المرمز في آليات تنظيم التعبير الجيني المتنوعة، حيث يتم نقله من خلية إلى أخرى من خلال التواصل خارج الخلية على عكس ما كان يُعتقد سابقًا أن الحمض النووي الريبي (RNA) يبقى داخل الخلايا كوسيط بين الجينات والبروتينات في أثناء ترجمة (Belleannée, 2015, 731; Sharma *et al.*, 2016, 391; Alves *et al.*, 2020, 1). لقد اثبتت الدراسات المعاصرة الدور الحيوي المهم للحمض النووي الريبي ولاسيما الرنا الصغري النووي والرنا الصغري المفرز خارج الخلايا في أثناء تنامي السلالة المنشئة ومرحلة تشكل الاعراس والالقاح وفي مراحل التنامي الجنيني المبكر وحتى مرحلة المعيدة والعصيبة (Andronico *et al.*, 2019, 1). تهدف هذه المراجعة النظرية إلى تقديم الدليل المتاح حاليًا لأدوار الرنا الصغري من مرحلة تمايز الأعراس إلى مرحلة تكوين المعيدة والعصيبة بهدف محاولة البرهان على وظائف مهمة لبعض انواع MicroRNA في الأحداث السابقة الذكر من خلال تعديل المسارات الرئيسة للتأشير الخلوي.

2. التركيب الحيوي والنضج وآلية عمل الرنا الصغري MicroRNA Biosynthesis, Maturation and actions:

يرمز الرنا الصغري بواسطة جينات خاصة على الجينوم البشري ويحدد له عدد من الجينات لانتساخه في النواة في موقع معين بوساطة أنزيم رنا بوليميراز 2 إلى رنا صغري بدئي. يختلف الرنا الصغري micro RNA عن الرنا المتداخل RNAsi بالطول والجينات التي ترمزه بالإضافة لنوع أنزيم RNA بوليميراز الذي يقوم بانتساخ الدنا إلى رنا صغري بدئي (Kim

(*et al*., 2009, 127; Winter *et al*., 2009, 228)؛ يعمل أنزيم دروشا Drocha وباشا Pascha النوويين على تقطيع جزء من ساق هذا الرنا ليصبح أصغر حجماً. يَعبر هذا الرنا الصغري البدئي إلى السيتوبلاسما بوساطة بروتينات التصدير المتواجدة في مسام الغشاء النووي مثل Exportin-5 وRan-GTP. يتم نضج الرنا الصغري البدئي ذي الشريط المضاعف الخطي في السيتوبلاسما ليصبح بطول 50−70 نيوكلوتيداً، ويعمل أنزيم دايسر Dicer من نمط RNAHase في السيتوبلاسما على تقطيعه إلى جزيئات أصغر وإزالة العروة منه وتحويله إلى جزيء رنا صغري مضاعف الشريط خطي بطول 25 نيوكلوتيداً. يرتبط الرنا الصغري لاحقاً مع مجموعة بروتينات ليشكل معقداً بروتينياً حاملاً للرنا الصغري الناضج يُعرف بمعقد رايسك RNA Inducing Silencing Complexe (RISC) ؛ يبقى هذا المعقد صامتاً لحين تفعيله بإشارة خلوية ناجمة عن حاجة الخلية (Zhang and Kim, 2006, 888) . تتم عملية نضج الرنا الصغري البدئي Maturation of pre -miRNA في السيتوبلاسما على مراحل؛ تتناول المرحلة الأولى تقطيع الرنا الصغري بأنزيم دايسر، بينما تكون المرحلة الثانية عبارة عن إضافة الفوسفات إلى النهايتين '3 و'5 بأنزيم الفوسفو كيناز، حيث تؤدي إضافة أربع زمر فوسفات على الشريط المضاعف من الرنا الصغري القصير إلى زيادة استقرار الجزيء للرنا الصغري وإعطاء الطاقة الحيوية للرنا الصغري. أما المرحلة الثالثة فهي فصل سلسلتي الرنا الصغري المضاعف عن بعضهما وتضخيم سلاسل الرنا الصغري miRNA المفرد إلى عدة نسخ بوساطة أنزيم RNA-dependent RNA Polymerase amplification أو اختصاراً (RdRP)، بينما تكون المرحلة الأخيرة لنضج الرنا الصغري في السيتوبلاسما هي ارتباط نسخ الرنا الصغري الناضج مفرد السلسلة مع مجموعة بروتينات واختزانها في معقد RISC لحين الحاجة (Schwab and Voinnet, 2010, 14945 ; Creugny *et al*., 2018, 1982).

تتضمن آلية عمل الرنا الصغري عدة مراحل ، تبدأ بارتباط معقد RISC مع رنا صغري متداخل siRNA بإشارة خلوية ما وذلك عند الحاجة، يحفز هذا الارتباط على تنشيط معقدRISC ويدفعه للارتباط بالرنا الرسول الهدف. يعمل معقدRISC كأنزيم له فاعلية القص الداخلي للنيوكلوتيدات أي Endonuclease activity فيُحطِّم الرنا الرسول الهدف أولاً في المنتصف، ولاحقاً يعمل معقد RISC كأنزيم ذي فاعلية قص خارجي للنيوكلوتيدات ليحطم ما تبقى من الرنا الرسول في النهايتين '3 و'5. في المرحلة الأولى يعمل معقد ال Risc على تثبيت الرنا الصغري في منتصف الرنا الرسول الهدف كونه يحمل تسلسلاً معاكساً ومتمماً له فيتثبت عليه ويمنع ترجمته ، بعد ذلك يقوم الرنا الصغري بتحطيم كامل وإيقاف ترجمة البروتين للجين الهدف في الخلية. يعمل معظم الرنا الصغري على تنظيم عمل جينات بارتباطه بتتالٍ متمم له على الجين الهدف وقد يكون التتام كاملاً Perfect complementarity ويؤدي إلى تحطيم الرنا الرسول للجين الهدف، أو يكون التآثر الفيزيائي منقوصاً بين تتالي الرنا الصغري وتتالي الرنا الرسول الهدف مؤدياً إلى تثبيط ترجمة الرنا الرسول إلى بروتين؛ أو قد يحدث اسكات فعال لعملية بدء الانتساخ عند بعض الكائنات الحية بتداخل معقد بروتيني يحمل رنا قصير يدعى RNA-induced initiation of transcriptional silencing أو اختصاراً (RITS) بآلية ما فوق جينية تؤدي إلى تشكل كروماتين متغاير (Pratt and MacRae, 2009,17898; Bhattacharjee *et al*., 2019, 1135).



الشكل (A 1): مراحل الاصطناع الحيوي الرنا الصغري وآلية عمله إما في تحطيم الرنا الرسول الهدف أو في تثبيط ترجمة الرنا الرسول الهدف إلى بروتين. B. المراحل الأربع لعملية نضج الرنا الصغري البدئي. Ahmad J. *et al*, 2013

3. الرنا الصغري وتشكل الأعراس الوظيفية والالقاح microRNNA Gametogenesis and Fertilization:

تعتبر الاعراس النمط الخلوي الوحيد الذي ينقل المعلومات عبر الأجيال في الكائنات الحية المتكاثرة جنسياً. لقد أظهرت الدراسات أن العديد من أنواع الرنا الصغري غير المرمز مثل الرنا: الصغري microRNAs أو اختصاراً (miRNAs) والرنا الصغري المتداخل داخلي المنشأ small endogenous interfering RNAs أو اختصاراً (endo-siRNAs) ولاسيما تلك المكتشفة في البيوض، والرنا الصغري المتآثر Piwi-interacting RNAs أو اختصاراً (piRNAs) منظمات حاسمة لتنامي الخلايا المنشئة للأعراس، إذ يؤدي نقص الإنزيمات الضرورية لاصطناعها حيوياً إلى العقم (Watanabe *et al*., 2008, 540; Zhu *et al*., 2021, 7). ينظم الرنا الصغري النووي sncRNAs تنامي الخلايا المنشئة للأعراس بآليات ما فوق جينية وانتساخية وما بعد انتساخية (Gou *et al*., 2014, 733; Dai *et al*., 2019, 1566)، ويُراقب انتاج طلائع الخلايا الجنسية الانثوية والذكرية الى خلايا متمايزة الشكل والوظيفة؛ فعلى سبيل المثال يلعب الرنا الصغري المتآثر piRNAs دوراً رئيساً في تنامي الخلايا المنشئة الذكرية ويبدو أنه ضروري جداً في حادثة تشكل البيوض وفي عملية نضجها (Lim *et al*., 2013, 3820; Taborska *et al*., 2019, 3). تشير دراسات أخرى إلى أن الرنا الصغري النووي sncRNAs خارج الخلية يعمل كوسيط للتواصل ما بين خلايا السلالة المنشئة ؛ بينما تلعب أنواع أخرى من الرنا الصغري المتداخل داخلي المنشأ endo-siRNAs دوراً داعماً لحوادث ما قبل التعشيش (Gilchrist *et al*., 2008, 160).

1.3. دور الرنا الصغري في تشكل البيوض الناضجة:

لوحظ اختلاف كبير في وظيفة وزمن التعبير الجيني للفئات الثلاث من الرنا الصغري، فمثلاً يتم التعبير عن الرنا الصغري المتداخل piRNAs في أثناء تكوين الأعراس الذكرية ، في حين يكون الرنا الصغري المتداخل داخلي المنشأ endo-siRNAs ضرورياً لانجاز الانقسام المنصف للمنسلية البيضية؛ وعلى العكس من ذلك ، يلاحظ التعبير الجيني للرنا الصغري miRNAs في كل الخلايا الجنسية ويعمل بشكل فعال في حوادث ما بعد التعشيش (Suh and Blelloch, 2011, 1655). هدفت دراسة حديثة باستخدام تقانة مصفوفة الرنا الصغري miRNA عند الانسان وتقانة تفاعل بوليمراز التسلسلي

اللحظي–الكمي للناسخة العكسية (RT-qPCR) إلى مسح كمية الرنا الصغري عند مجموعات من النساء ومقارنتها مع مخزونات المبيض المختلفة لديهم وتوصيف الدور المحتمل لها كمؤشرات حيوية مهمة. تم التحقق من وفرة كل من الرنا miR100-5p و miR21-5p في عينات الفحص وكذلك في مجموعة مستقلة من العينات الشاهدة. أشارت النتائج إلى أن وفرة كمية نوعي الرنا الصغري المتواجد مرتبطة بشكل كبير بمستوى الهرمون المبيضي AMH زيادةً أو نقصاناً مما يؤكد إمكانية استخدام نوعي الرنا الصغري في تحديد المخزون المبيضي عند النساء (Abu-Halima *et al.*, 2021, 3).

كثر اهتمام الباحثين في السنوات الأخيرة بآليات التواصل الخلوي ، مع زيادة المعارف العلمية حول إمكانية مساهمة أنواع الرنا وعلى الأخص أنواع الرنا الصغري المتنوعة بعمليات فيزيولوجية مقعدة ، بما في ذلك تنظيم التكاثر والتمايز الخلوي والالقاح والتنامي الجنيني المبكر والتنامي العام ما قبل وما بعد الولادة. إن جميع الحوادث البيولوجية السابقة الذكر هي عمليات معقدة متعددة الخطوات تعتمد بشكل كبير على تواصل خلوي ضمن الأعضاء يستمر لعقود عند الإنسان. رُكزت جهود الباحثين الأخيرة على كشف وسائط جديدة للتواصل الخلوي وخاصةً تلك المتعلقة بتحديد هوية الحويصلات خارج الخلية extracellular vesicles (EVs)؛ فمثلاً تتضمن حادثة تشكل البيوض تآثرات خلوية بين الخلايا البيضية المتنامية والخلايا الركامية cumulus والحبيبية granulosa cells التي تحيط بها ضمن الجريب. برهنت النتائج أن الاتصالات بين خلوية تسهل عملية ارتباط وانصهار النطفة الناضجة (التي أنجزت عملية التفعيل النهائي وتفاعل الجسيم الطرفي) ، وبالتالي تمكين حدوث الإلقاح وتنامي الجنين في الرحم وتعشيش الكيسة الأريمية (الاصيلة) ببطانة الرحم مترافقة مع غزو الخلايا الجنينية للمدمج الارومي المغذي لرحم الام وبالتالي نجاح التعشيش (Cuman *et al.*, 2015, 1530). لقد أنجز حديثاً في هذا المضمار مراجعة نظرية مهمة حول دور حويصلات خارج الخلية (EVs) كتجمعات نانوية الحجم محاطة بأغشية، إذ تم تحديد هويتها كأداة للتواصل بين الخلايا والأنسجة في كل من الظروف الفيزيولوجية والمرضية. لوحظ احتواء هذه الحويصلات على العديد من الجزيئات المشاركة في نقل الإشارة من الخلايا المفرزة لها (بما في ذلك الرنا الصغري microRNAs والرنا المرسال mRNAs والحمض النووي والبروتينات والليبيدات والسيتوكينات) إلى الخلايا المستقبلة للإشارة مؤثرةً بسلوكها ؛ فعلى سبيل المثال يعتمد التكاثر عند الأنثى على تنظيم دقيق للغاية بين خلايا الغدد الصم المفرزة للهرمونات الجنسية وبين حويصلات النقل خارج الخلية. أشارت النتائج إلى تواجد وفير لأنواع عديدة من الرنا الصغري مثل miR-766-3p و-miR 663bو miR-132-3p و miR-16-5p و miR-888 و -miR 214 و miR-454 ضمن السائل الجريبي والمحضض على تنامي الجريبات المبيضية Andronico *et al.*, 2019, 6; Machtinger *et al.*, 2021, 551; Machtinger *et al.*, 2016, 187).

يراقب الهرمون الستروئيدي تنامي الخلايا المنشئة في المناسل وحادثة تشكيل البيوض، واقترحت العديد من الدراسات وجود دورًا تنظيميًا مهمًا للرنا الصغري في نضج خلايا الركام المحيطة بالبيضة في أثناء تكوين الجريبات، حيث تتمايز هذه الأخيرة إلى خلايا الإكليل المشعة corona radiata cells أو اختصاراً (CRCs) وخلايا البوق الركامية cumulus oophorus cells أو اختصاراً (COCs). أكدت هذه الدراسة مشاركة أنواع من الرنا الصغري في اصطناع أنزيمات نضج المنتسخ البدئي مثل دايسر وفي تمايز خلايا الركام وفي تنامي السلالة المنشئة والجريبات المبيضية في مستوى ما بعد الانتساخ (Murchison *et al.*, 2007, 685; Lei *et al.*, 2006, 6; Tong *et al.*, 2014, 4). تم مؤخراً تحديد هوية أنواع الرنا الصغري في خلايا الركام CRCs و COCs باستخدام تقانة سلسلة النيوكلوتيدات للجيل التالي next generation sequencing أو

اختصاراً (NGS) ؛ إذ تم الكشف عن مستويات عالية من ستة أنواع جديدة من الرنا الصغري في خلايا الركام وذلك عند مجموعة من النساء اللواتي يخضعن لتحفيز المبيض المراقب من أجل الاخصاب الاصطناعي. تم التحقق من صحة ملف التعبير الجيني لأنماط مختلفة من الرنا الصغري بتقانة تفاعل البوليمراز اللحظي الكمي في الزمن الحقيقي أو اختصاراً (qRT-PCR) ؛ وكشف عن وجود مجموعة واسعة من الرنا الصغري من عائلة let-7 متورطة في تنظيم عمليات بيولوجية ومسؤولة عن تمايز تجمعات الخلايا الركامية. أظهر التحليل المعلوماتي الحيوي أن مستوى الحموض الأمينية واستقلاب الطاقة في خلايا CRCs و COCs تم استهدافهما بشكل كبير بواسطة الرنا الصغري let-7 (Gregory *et al.*, 1994, 1308; Tong *et al.*, 2014, 5; Assou *et al.*, 2006, 1710).

2.3. دور الرنا الصغري في تشكل النطاف المؤهلة:

تشكل النطاف:

تتطلب حادثة تشكل النطاف وجود خلايا سيرتولي سليمة وكلية القدرة. تم التحري عند الفأر عن ضرورة أنزيم دايسر Dicer وأنزيمات نازعات الرنا الداخلية من نمط RNaseIII في الاصطناع الحيوي للرنا الصغري والرنا المتداخل وفي أداء خلايا سرتولي لوظيفتها. لقد أدى الحذف الانتقائي لأنزيم دايسر في خلايا سرتولي عند فئران التجربة إلى العقم بسبب غياب كامل لحادثة تشكل النطاف وتنكس الخصيتين تدريجياً؛ حيث ظهرت التغييرات المورفولوجية للخصيتين في اليوم الخامس بعد الولادة وترافقت بضعف شديد لتشكل النطاف في أثناء البلوغ ، وذلك بسبب خلل في نضج خلايا سيرتولي وعدم قدرتها على دعم الانقسام المنصف ومراقبة تشكل النطاف بشكل صحيح. أبدت خلايا سيرتولي أيضاً في خصيتي فأر حديث الولادة عدم قدرتها على التعبير الجيني لعديد من الجينات الرئيسة وخاصة تلك المرمزة لأنزيم دايسر (Papaioannou *et al.*, 2009, 5). إن الفهم الأساسي لبنية جينوم النطاف جنبًا إلى جنب مع آلية عمل مجموع الرنا، وعلى الأخص الرنا الصغري والرنا مضاد المعنى ذي المصدر الأبوي، الذي يسلم للبيضة بعد الاخصاب له أهمية كبيرة من الممكن مقارنتها مع الرنا المختزن في البيضة ودوره المحتمل في نمذجة الجنين في المراحل الأولى من الحمل (Martins and Krawetz, 2005, 117). إن حادثة تشكل النطاف هي عملية دورية ومنظمة للغاية تتحول خلالها المنسليات المنوية ثنائية الصيغة إلى منسليات منوية أحادية الصيغة الصبغية وخاصة في مستوى ما بعد الانتساخ. علاوة على ذلك، كشفت النتائج إلى أن تواجد الرنا miR-34c في المناسل الذكرية يكون مستقلاً إلى حد كبير عن مواقع تواجد الجين p53 ، على عكس الدراسات السابقة التي أشارت إلى أن التعبير الجيني للرنا الصغري miR-34c في الخلايا الجسدية مرتبط مباشرة بالبروتينات المثبطة للورم مثل p53. أوضحت البيانات أن التعبير الجيني للرنا الصغري miR-34c في خلايا السلالة المنشئة كان مرتفعاً، مما يؤكد على الدور المهم له في أثناء تشكيل النطاف وربما في تحسين النمط الظاهر للخلايا المنشئة التي التزمت مسبقاً في هذا المصير الخلوي (Bouhallier *et al.*, 2010, 725). أُنجزت تجارب عديدة لتحديد الدور الفيزيولوجي للرنا الصغري والرنا المتداخل في حادثة تشكل النطاف، حيث تم مقارنة النمط الظاهر لخلايا السلالة المنشئة الذكرية في خصية فئران طافرة لأنزيم دايسر أو لأنزيم دروشا Dgcr8. أظهرت الفئران الطافرة في أنزيم دروشا Dgcr8 خللاً في مسار الرنا الصغري مع الاحتفاظ بمسار سليم للرنا المتداخل endo-siRNA، وأبدت عقماً وعيوبًا جسدية مماثلة ؛ بينما لوحظ أن عيوب الفئران الطافرة لأنزيم دايسر كانت أقل شدة، إذ شملت أخطاءاً تراكمية في مراحل الانقسام المنصف مما أدى إلى قلة النطاف وتشوهها وأحياناً إلى فقدانها (Zimmermann *et al.*, Oligo-terato and azoospermia 2014, 4-5).

نضج النطاف في البربخ:

تشارك أيضاً في حادثة نضج النطاف حويصلات غشائية صغيرة الحجم تفرزها الخلايا الظهارية للبربخ، بالإضافة إلى دورها المعروف في نقل البروتينات إلى الغشاء وقدرتها على نقل الرنا الصغري كمنظمات للتعبير الجيني ما بعد الانتساخ. تم الكشف عن دور التعديلات ما فوق جينية لحوالي 115 رنا صغري مسؤولة عن نضج النطاف في البربخ، تم الكشف عنها بتقانة تفاعل البوليمراز التسلسلي اللحظي الكمي Quantitative Real-Time PCR أو اختصاراً qRt- PCR وتم تحديد تسلسل النيوكلوتيدات بالجيل الثاني-miRNA Next Generation Sequencing أو اختصاراً (NGS) (Nixon *et al.*, 2015, 5-6). لقد تم البرهان باستخدام مصفوفة الرنا الصغري وتقانة microperfusion معاً أن عضو البربخ يمتلك بصمتين مختلفتين من الرنا الصغري في كل منطقتي الرأس والذنب. لقد بيَن قياس معدل التدفق الخلوي لبروتين المعلم DilC12 labeled المرتبط بالحويصلات الغشائية البربخية epididymosomes ، في خلايا ظهارة البربخ المزروعة في الزجاج، قدرة هذه الحويصلات الحاوية الرنا الصغري في المنطقة الوسطى من رأس البربخ على الاندماج في الخلايا الظهارية البربخية البعيدة من الرأس. تكشف هذه النتائج عن تحرير أنواع خاصة من الرنا الصغري في السائل البربخي داخل اللمعة، وفي منطقة خاصة تشارك في دعم آليات التواصل بين الخلايا في جميع أنحاء البربخ عبر ما يسمى الحويصلات الغشائية البربخية epididymosomes (Belleannée *et al.*, 2013, 4-5). أظهرت دراسات تجريبية لنماذج من الفئران الطافرة أنه يتم التعبير عن مجموعات مختلفة من الرنا الصغري في مناطق متميزة من البربخ عند الانسان، والتي تعمل على تنظم التعبير للجينات المستهدفة، ولا سيما تلك التي تشارك في التحكم في نضج النطاف عند الذكور؛ فمثلاً يعبر الرنا الصغري miR-888 حصريًا في الجهاز التناسلي عند الانسان وعند جميع أنواع الرئيسيات، حيث يتم إطلاقها خارج الخلية مع السائل المحيط بالنطاف في عضو البربخ بوساطة الحويصلات البربخية. تتواصل الحويصلات البربخية المفرزة خارج الخلية والحاوية على جزيئات الرنا الصغري مع الغشاء السيتوبلاسمي للنطاف الناضجة ومع الخلايا الظهارية الواقعة نزلاً من مواقع تحريرها، مما يشير إلى الدور المراقب لها في انتاج مفرازات في لمعة البربخ (Belleannée, 2015, 732) .

أهمية آليات نضج النطاف ما فوق جيني:

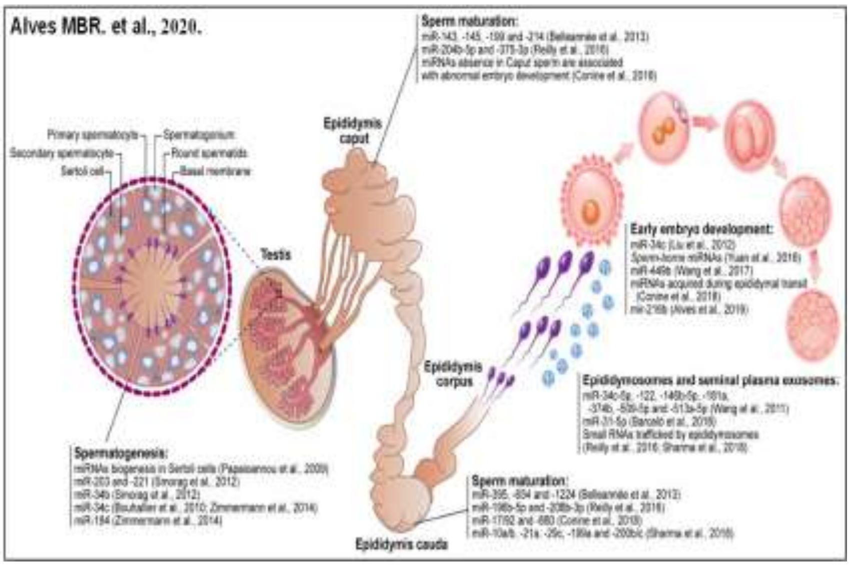
أظهرت الأدلة الحديثة أن التوريث ما فوق الجيني للنطاف عرضة لتعديلات ديناميكية ناجمة عن تغيرات متنوعة في البيئة الأبوية، حيث يعتبر هذا النمط من الوراثة محدداً هاماً للتوريث عبر الأجيال. بينت دراسات سابقة أن عملية نضج النطاف تحدث في عدة أجزاء من البربخ عبر نقل رنا صغري غير المرمز للبروتين ومحمول في حويصلات غشائية بربخية صغيرة مفرزة من خلايا الجهاز التناسلي الذكري (البربخ). برهنت دراسات حديثة أن خلايا البربخ عند الفأر تنتج كمية كبيرة من الرنا الصغري مهمة في التنامي وتقدر بأكثر من 350 نوعاً، معظمها أي حوالي 60٪ متواجدة في النطاف والحويصلات البربخية على حد سواء. أخيرًا ، تم البرهان المباشر عند الفأر بوساطة تقانة NGS على نقل العديد من أنواع الرنا الصغري بين البربخ والنطاف، حيث يوفر هذا النقل رؤية جديدة لآلية للتواصل بين هذه الخلايا، تُمكن النطاف الناضجة من تعديل انتقائي لحمولتها من الرنا الصغري بعد خروجها من الخصيتين (Reilly *et al.*, 2016, 5). تخضع حمولة النطاف من الرنا الصغري عند الثدييات لعملية تعديل مثيرة للدهشة في أثناء حوادث التنامي الجنيني المبكر. أثبتت التجارب في هذا السياق أهمية أنواع خاصة من الرنا الصغري، محملة تجريبياً بالنطاف في أثناء نضجها في البربخ مأخوذة من البربخ القريب (الرأس)

أو البربخ البعيد (الذنب) في دعم حادثة التعشيش للأجنة الناتجة عن بيوض ملحقة بالزجاج بتقانة حقن النطاف داخل سيتوبلاسما البيضة الناضجة intracytoplasmic sperm injection (ICSI). أشارت نتائج هذه الدراسة إلى فشل تعشيش الأجنة تلك الناجمة عن استخدام نطاف مقتطفة من رأس البربخ بعد وقت قصير من الزرع بسبب تعبيرها المفرط عن أنواع الرنا الصغري المدروسة ؛ على العكس من ذلك فإن عملية الحقن المجهري لأنواع الرنا الصغري المستخلصة والخاصة بمنطقة الذنب في الأجنة السابقة المشتقة من رأس البربخ، قد أدى إلى غياب تام للعيوب الجزيئية الخاصة بمرحلة ما قبل التعشيش ومنع تنامي أنماط ظاهرة من الأجنة قابلة للموت بعد التعشيش. تكشف هذه النتائج عن دور أساسي للرنا الصغري عند للثدييات في أثناء نضج النطفة بعد خروجها من الخصيتين، عبر آلية نقل تبادلي لأنواع من رنا صغري غير مرمز يتوسطها البربخ بوساطة حويصلات صغيرة ملتصقة بالغشاء مفرزة في االسبيل التناسلي الذكري (البربخ) وأيضاً عن إمكانية تحديد برنامج معين للتعبير الجيني ما قبل التعشيش (مخزون من الرنا الصغري متوارث عبر الاجيال) المتوافق مع أنواع الرنا الصغري المحقونة في النطاف (Conine *et al.*, 2018, 6; Conine *et al.*, 2019, 7).

الكشف عن العيوب في تشكل ونضج النطاف:

إن عملية الاصطناع الحيوي للذخيرة الحمض النووي الريبي (مجموع الرنا) للنطاف الناضجة له أهمية كبيرة، بسبب تأثيره المؤكد في حوادث الالقاح والتنامي الجنيني المبكر. حيث تم البرهان تجريبياً على الفرضية القائلة بأن الرنا الصغري عند الثدييات يتم نقله إلى النطاف في أثناء عملية النضج بعد الخصية (في البربخ). تم توصيف حركية الرنا الصغري أثناء نضج الخلايا المنشئة عند الفئران، وتم التأكيد تجريبياً في الزجاج، بحضن النطاف في الخصية مع حويصلات رأس البربخ caput epididymosomes، والتجارب النسيجية باستخدام مسابر نوعية مشعة للرنا على أن مجموع التعديلات التي تخضع لها النطاف في البربخ تؤدي إلى تغير كبير في محتواها من أنواع الرنا الصغري وبعد خروجها من الخصيتين ودخولها أقسام البربخ المكان الحقيقي الذي تم ضمنه اصطناعها حيوياً وبالتالي إلى نضجها (Sharma *et al.*, 2018, 7). أكدت دراسات سابقة على الدور الرئيس للرنا الصغري في حوادث تشكل النطاف ونضجها، ففي دراسة نوعية تم تقييم التغييرات الجزيئية المتغيرة للرنا الصغري في البلازما المنوية باستخدام تقانة تفاعل البوليميراز التسلسلي اللحظي الكمي للناسخة العكسية (RT-qPCR) في حالات العقم لدى الرجال المصابين بفقد النطاف غير الانسدادي azoospermia nonobstructive واستسقاء النطاف asthenozoospermia وفي نقص النطاف ومن قلة النطاف oligospermia ومقارنتها مع عينة شاهدة من الرجال الأسوياء. أظهرت النتائج استقرار كمية الرنا الصغري في البلازما المنوية في العينة الشاهدة، بينما كشف تحليل تسلسل Solexa للرنا الصغري وجود 19 رنا متغير بشكل ملحوظ في العينة التجريبية المدروسة (المرضى) مقارنة بمجموعة العينة الشاهدة. بين تحليل RT-qPCR وجود 7 أنواع متغيرة الكمية من الرنا الصغري وهي :miR-34c-5p و miR-122 وmiR-146b-5p وmiR-181a وmiR-374b وmiR-509-5p وmiR-513a-5؛ انخفضت كميتها بشكل ملحوظ في حالات فقدان النطاف لكنها زادت في حالات استسقاء النطاف (Wang *et al.*, 2011, 1728). أظهرت دراسة مشابهة إمكانية استخدام العديد من أنواع الرنا الصغري عالية القدرة، وموجودة ضمن الحويصلات الصغيرة خارج الخلية (sEVs) في السائل المنوي عند الرجال الذين يعانون من فقد النطاف. تم دراسة التعبير الجيني التفاضلي لأنواع الرنا الصغري عند الافراد الذين يعانون من فقدان النطاف نتيجة انسداد في السبيل التناسلي (أي الحفاظ على تكوين الحيوانات المنوية في مواقعها) وعند

الافراد الذين يعانون نقص النطاف الناجم عن فشل تكوين الحيوانات المنوية. وتم التحقق من قيم التعبير الجيني للرنا الصغري واحد هو (miR-31-5p) متواجد في الحويصلات الغشائية ضمن السائل المنوي، والذي يمكن استخدامه كمؤشر حيوي تنبؤي لاختبار المنشأ البيولوجي لفقدان النطاف وبحساسية أعلى من 90٪. علاوة على ذلك ، وصفت الدراسة نفسها أن قيم التعبير الجيني للرنا الصغري miR-539-5p و miR-941 مفيدة للتنبؤ والتشخيص بدقة عن وجود نطاف متبقية عند الأفراد الذين يعانون من اضطرابات شديدة في تشكل النطاف (Barceló *et al*., 2018, 1093 -1094).



الشكل (2): صورة تمثيلية تبين مشاركة أنواع الرنا الصغري في حادثة تشكل النطاف في الخصيتين ونضجها في أقسام البربخ، وفي تآثر النطاف مع البلازما المنوية عبر الحويصلات البربخية وفي التنامي الجنيني المبكر(Alves MBR *et al*., 2020).

3.3. دور الرنا الصغري في حادثة الالقاح:

لقد تم تنميط ستة جزيئات من الرنا الصغري تشارك بشكل رئيس بحادثة الالقاح ومتواجدة في النطاف والبيوض الملقحة (وغير المتواجدة في البيوض والأجنة ما قبل التعشيش)، واحتوت النطاف على كل من طلائع الرنا الصغري وأشكاله الناضجة ولا سيما الرنا الصغري miR-34c. تقدم نتائج الدراسة دليلاً على أهمية الرنا الصغري miR-34c الذي تنقله النطاف الى البيضة في أثناء الالقاح والضروري للانقسام الأول للبيضة الملقحة إذ يعمل هذا الرنا على تعديل التعبير الجيني (Liu *et al*., 2012, 491). يعتبر الرنا الصغري microRNA-135b من الناحية الطبية المتعلقة بالصحة الانجابية معلماً بيولوجياً دقيقاً لتقييم جودة الأجنة القابلة للحياة. تمثل حالياً هذه الطريقة غير الباضعة معياراً مهماً وتحديًا لتحسين فرص نجاح الالقاح في الزجاج (IVF)؛ حيث لوحظ علاقة إحصائية ذات مغزى لتأثير معدل العمر الزمني للرنا الصغري microRNA-135b في أوساط الزرع في اليوم الخامس وجودة الأجنة، وذلك باستخدام تقانة qPCR متبوعاً بتحليل للبيانات باستخدام البرنامج الاحصائي IBM SPSS_{25} (Azzahra *et al*., 2022, 80).

4. دور الرنا الصغري في مراحل التنامي الجنيني المبكر:

يعتبر الرنا النووي غير المشفر (ncRNAs) منظماً رئيسياً للتنامي الجنيني المبكر، إذ يتحكم بعدة حوادث بيولوجية هامة وفي التعبير الجيني بعدة آليات بدءًا من تحطم الرنا المرسال للـ mRNAs إلى التعديل ببنية الكروماتين (الميتلة والأستلة)، بما في ذلك الانتقال بين الأم والبيضة الملقحة maternal-zygotic transition، والحفاظ على تعدد الاستطاعة للخلايا الجنينية الأصل ونمذجة محاور جسم الجنين وتحديد المصير الخلوي لأنواع الخلايا الجنينية المختلفة وتمايزها وتشكل الأعضاء (Pauli *et al.*, 2011, 137).

1.4. مرحلة تشكل الكيسة الاريمية:

أكدت دراسة انتساخ الرنا المرمز للبروتين وحركيته على أدوار مهمة للرنا القصير غير المشفر والمراقب للتنامي الجنيني المبكر في أثناء انتقال البيضة الملقحة إلى الجنين (oocyte to embryo transition) أو اختصاراً (OET) ، وعلى الأخص في إعادة برمجة النمط الظاهري للأم وتفعيل جينوم الجنين تدريجيًا. بين تحليل تسلسل النيوكلوتيدات للرنا في البيوض الملحقة وجود تعبير جيني مسيطر للرنا المتداخل (os-piRNAs) في حين يُفعل التعبير الجيني للرنا الصغري (microRNA) في مراحل مبكرة من الانقسامات الخيطية الاولى. لوحظ أيضاً زيادة في كمية الرنا الصغري miRNAs في البيوض الملقحة، حيث يعمل جزءاً منه على تعديل وظيفة أو استقرار الرنا المرسال mRNAs عند الأم ، بينما يتم الاحتفاظ بالجزء الآخر في الخلايا الأصل الجنينية ذات الانقسامات الأولى تمهيداً لاستخدامها في مراحل تالية (Paloviita *et al.*, 2021, 1480).

تنظم أنواع من الرنا الصغري microRNAs غير المرمزة التغيرات الاستقلابية الغذائية للأم خلال فترة الحمل في صالح دعم تنامي الجنين، ويتم ذلك عبر آليات تثبيط التعبير الجيني ما بعد الانتساخ؛ ومن الممكن لبعض الأعضاء مثل المشيمة أن تفرز الرنا الصغري الجائل في الدورة الدموية. تم توصيف بعض أنواع الرنا الصغري في مصول النساء الحوامل والمنتسخة تحديداً من الصبغي 14 (C14MC) والصبغي 19 (C19MC و miR-371-3) والخاصة بالأشهر الثلاثة الأولى من الحمل ؛ ودُرست تغيراتها الكمية والنوعية ما بين الأسبوع 14–16 من الحمل ومقارنتها مع عينة شاهدة من النساء غير الحوامل وذلك باستخدام منصة تسلسل الجيل التالي (Illumina HiSeq next-generation sequencing platform). أشارت النتائج إلى وجود 2101 رنا صغري في مجموعات الدراسة، 191 رنا صغري كانت وفيرة بشكل تفاضلي بين النساء الحوامل وغير الحوامل. بالإضافة إلى ذلك ، تباينت وفرة 57 رنا صغري وفقًا لعمر الجنين في الثلث الأول من الحمل؛ حيث ارتبط الرنا الصغري C19MC بشكل إيجابي مع وجود الحمل ومع اختلاف عمر الحمل أثناء الأشهر الثلاثة الأولى. كشف تحليل التنميط الانتساخي الصغري في المصل plasmatic microtranscriptome أن أنواع الرنا الصغري الخاصة بوجود الحمل (عددها 191) والرنا الصغري الخاص بعمر الحمل (عددها 57) كانت هدفاً لجينات مسؤولة عن استقلاب الحموض الدسمة ومستقبلات التآثر مع بروتينات الأمهة خارج خلوية ECM وسبيل عامل النمو TGF-beta (Légaré *et al.*, 2022, 7-8). تشير دراسة تجريبية إلى وجود الرنا الصغري miR-449b بكمية كبيرة في النطاف والذي يكون هدفاً لجينات مرتبطة بالتنامي الجنيني مثل CDK6 وc-MYC وHDAC1 و BCL-2. أشارت نتائج زراعة أجنة في الزجاج بعد 48 ساعة من التنشيط إلى الدور الوظيفي للرنا miR-449b في تعزيز معدل الانقسام ومستويات أنزيم أسيتيل H3K9 في مراحل جنينية مبكرة 2 إلى 8 خلايا جنينية أصل، وفي تثبيط معدل الموت الخلوي المبرمج في مرحلة الكيسية الاريمية (Wang *et al.*, 2017, 4). أثبتت تجارب الفئران الطافرة لأنزيم دايسر (أحد الانزيمات الهامة في الاصطناع الحيوي للرنا الصغري) في

الخلايا الجذعية الجنينية للفأر Dicer-null ES في الزجاج، عن أهمية الرنا الصغري في مرحلة الأصيلة وعن دوره في دفع الخلايا الجذعية الجنينية ES المشتقة من الكتلة الجنينية الداخلية نحو التمايز بآلية الحفاظ على بنية الكروماتين المتغاير في المريكز وإيقاف عمله (Kanellopoulou *et al*., 2005, 492-493).

2.4. مرحلة التعشيش:

من المعلوم أن الخلايا الجنينية للأرومة المغذية تلعب دوراً مهماً في حادثة التعشيش وفي تشكل عضو المشيمة وبالتالي نجاح الحمل. يلعب الرنا الصغري دوراً مهماً في تكاثر خلايا الأرومة المغذية لجنين الانسان، حيث أثبتت تجارب في الزجاج بأن حقن الرنا الصغري miR-514a-3p ذي التعبير المفرط في خلايا مشيمية مأخوذة من جنين بمرحلة مبكرة، يؤدي إلى إضعاف تكاثر الأرومة الجنينية الغازية وذلك بتعطيل مسار عامل النمو الانسوليني IGF-I وبالتحديد من خلال تعديل تعبير أنزيم Src homology-2 الحاوي على مجال تيروزين فوسفاتاز 2 أو اختصاراً (SHP2). يتدخل أنزيم (SHP2) أحد أهم الجزيئات الرئيسة في سبيل عامل النمو الانسوليني؛ لذا يعتبر حالياً الرنا الصغري miR-514a-3p منظماً جديداً لإشارات IGF وتكاثر خلايا الارومة المغذية للجنين والتي تساهم لاحقاً في تشكل المشيمة عند جنين الانسان في اليوم 40 من الحمل (Quilang *et al*., 2022, 103-105).

يلعب الرنا الصغري دورًا مهمًا في تنظيم تعدد القدرات في الخلايا الجذعية الجنينية في مرحلة الاصيلة (Melton *et al*., 2010, 622)؛ فعلى سبيل المثال يراقب الرنا الصغري (C19MC) التنامي الجنيني المبكر عند الانسان وفي تحديد تعدد الاستطاعة للخلايا الجنينية المتقسمة. أشارت المعارف الحالية عند الثدييات أن خلايا الكتلة الجنينية الداخلية inner cell mass أو (INC) وخلايا الأديم الظاهر المغذية تلتزم مبكراً بمسار تمايزي محدد المصير ؛ ويكون الالتزام بهذا المصير الخلوي غير قابل للعكس ومراقباً بآلية ما فوق جينية. لوحظ تجريبياً عند الانسان مقدرة الخلايا الجذعية الجنينية (hES) الساذجة (أي غير الملتزمة بمسار تمايزي) على التمايز إلى خلايا جذعية للأرومة المغذية (hTS) لكن العكس غير صحيح؛ حيث أظهرت دراسة تحليل مجموع مواقع الانتساخ transcriptome ومواقع الميتلة methylome في الخلايا الجذعية الجنينية الساذجة وجود قطاع نوعي مفعّل لرنا صغري يقع على الصبغي رقم 19 هو (C19MC)؛ في حين يكون هذا الرنا الصغري نفسه مثبطاً بآلية فوق جينية في الخلايا الجذعية للأرومة المغذية hTS. تم البرهان تجريبياً وباستخدام نظام CRISPR/Cas على الدور المهم للرنا الصغري (C19MC) في الحفاظ على المقدرة التمايزية لخلايا hTS في حين يدفع هذا الرنا الخلايا الجذعية الجنينية (hES) نحو التمايز إلى سلالات من خلايا الأرومة المغذية (Kobayashi *et al*., 2022, 6-7).

يلعب الرنا الصغري miR125b-5p دوراً مهماً في أداء خلايا الأرومة المغذية لوظائفها مثل التكاثر والهجرة والغزو وبالتالي نجاح التعشيش واستمرار الحمل عند المرأة. تم البرهان حديثاً على مساهمة أحد ملوثات البيئة الجزيئية (PM10) في تعديل التعبير الجيني للرنا الصغري miR125b-5p وفي إيقاف التنامي الجنيني مبكراً عند الانسان؛ حيث أظهرت الدراسة التأثير المباشر لجزيئات PM10 على عيوشية ووظائف خلايا الأرومة المغذية المزروعة في الزجاج من نمط HTR-8/SVneo. أدى استخدام تراكيز عالية من الملوث البيئي PM10 في أوساط الزرع لخلايا الأرومة الغازية HTR-8/SVneo إلى: زيادة تعبيرية الرنا الصغري miR-125b-5p بشكل كبير والتي ترافقت مع انخفاض القدرة التعبيرية للجين الهدف TXNRD1، وإلى تفعيل الموت الخلوي المبرمج ، وإلى التحريض على الالتهاب الناجم عن زيادة التعبير الجيني للوسائط اللالتهابية IL-1β و IL-6 و TNF-α (Chaiwangyen *et al*., 2022, 4-5).

تلعب العديد من أنواع الرنا الجائل circular RNAs أو (circRNAs) دوراً مقيداً لنمو خلايا الجنين (FGR) في عضو

المشـيمة. فعلـى سـبيل المثـال يـنظم الرنـا الجائـل hsa_circ_0081343 حـوادث الهجـرة والغـزو (بتعـديل فعاليـة أنزيم MMP2 وMMP9) والموت الخلوي المبرمج (بتعديل أنزيم كاسباز 3 و9) في خلايا الأرومة المغذية البشرية HTR-8 المزروعة في الزجاج. كشفت دراسة معاصرة عن انخفاض مستوى التعبير hsa_circ_0081343 في أنسجة المشيمة مقيدة النمو مقارنة بالأنسجة المشيمية الطبيعية، وذلك باستخدام تقانة تفاعـل بـوليمراز التسلسـلي اللحظـي والكمـي للناسـخة العكسية qRT-PCR، وعن قدرة هذا الرنا الجائل على تنظيم حوادث الهجرة والغزو والموت الخلوي المبرمج لخلايا الأرومة المغذيـة البشـرية HTR-8 وذلـك عبرسـبيل hsa-miR210-5p/DLX3 وعبـر مسـار hsa_circ_0038383/miR196b-5p/HOXA9. أكدت هذه الدراسات وجود العديد من أنواع الرنا الصـغري (miRNAs) المفـرزة مـن بطانـة الـرحم فـي السـائل الرحمي 111 للنساء المصابات بفشل التعشيش المتكرر (RIF) في أثناء الاخصاب الاصطناعي ونقل الأجنة (Wang *et al*., 2021, 4-6; Zhao *et al*., 2021, 6083-6085; von Grothusen *et al*., 2022, 738). كشفت دراسة معاصرة شكلية–حركية لأجنة ناتجة عن الاخصاب التقليدي في الزجاج IVF وعن طريقة حقن النطاف داخل سيتوبلاسما البيضة ICSI عن تحرير أنـواع الرنـا الصـغري ذات أدوار فـي تنـامي الجنـين وإيصاله إلى مرحلة الكيسة الاريمية والتعشيش. تم جمع نتائج هذه الدراسة من إجمالي 172 كيسة أريمية قابلة للحياة، وحللت البيانـات بطريقـة إحصـائية بتطبيـق العديـد مـن الاختبـارات الاحصائية التي أكدت وجود معامل ملائم للعلاقة بين أنواع الرنـا الصـغري miR-20a وmiR-30c وsHLA-G ومقـدرة الجنين على التنامي اللاحق (Coticchio *et al*., 2021, 1739).

3.4. مرحلة المعيدة:

تتنامى محاور جسم الجنين والأدمات الثلاثة في مرحلة المعيدة ، وتراقب هذه الحوادث عند جنين الثدييات بعدة جينات عبر سبل ومسارات مختلفة. تعبر أفراد عائلة microRNA-17 أو(miRNA-17 و miR-17-5p و miR-20a وmiR-93 وmiR-106a بشـكل تفاضلي في أجنة الفئران وتعمل على مراقبة تمايز جمهرات من الخلايا الجذعية الجنينية. كشفت تجارب التهجين المفلور في الموقعFluorescent in situ hybridization أو اختصاراً (FIH) عن مشاركة أنواع الرنا السابقة في أثناء حوادث هامة لمرحلة المعيدة، وبالتحديد خلال تشكل الخط البدائي الأوسط/الخلفي (ps) وفي جمهرات محددة من الأديم الظاهر البدائي والأديم المتوسط. تم تحديد هوية مستقبل عامل نمو التكون العظمي Bmpr2 (أحد أفراد عائلة عامل النمو التحولي) على أنه هدفاً لأنواع الرنا الصغري السابقة، وأيضاً عن مشاركته في تغيرات نوعية في مرحلة المعيدة؛ حيث تم البرهان مؤخراً على دور هذا المستقبل عامل Bmpr2 في تنظيم ديناميكية بروتينات الهيكل الخلوي ومراقبة حركة الخلية وقدرتها على الغزو. أشارت بيانات الدراسات السابقة والحالية إلى فرضية تأثير أفراد عائلة miR-17 على مرحلة المعيدة، عن طريق منع تعبير Bmpr2 في الخط البدائي؛ مما يحرض الخلايا على اتخاذ على قرارات تحديد مصيرها الخلوي من خلال التأثير على الجين BMPR2 نزلاً من موقع انتساخها ؛ وكذلك منع خلايا الأديم المتوسط من الغزو عبر تنظيم تقلص وتمدد ألياف الأكتين (Larabee *et al*., 2015, 354). هذا وتلعب بعض أنواع الرنا كالرنا الطويل غير المشفر والرنا النووي (ncRNAs) والرنا الصغري (miRNAs) دوراً حاسماً في حوادث المعيدة والتعشيش؛ إذ تعمل على تنظيم العمليـات الخلويـة التـي تشـارك فـي الانتقـال الظهـاري–الميزانشيمي (اللحمة المتوسطة) أو اختصاراً (EMT) لخلايا الأرومة العلوية epiblast للجنين ثنائي الطبقة ولا سيما عائلة الرنا miR-200 **والرنا** miR-205. يسمح الرنا الصغري miR-124a بهذا الانتقال (EMT)، وذلك بإنجاز العديد من التعديلات الكيميائية الحيوية التي تسمح للخلايا الظهارية بامتلاك صفات الخلايا المتوسطية مثل: القدرة العالية على الهجرة وصفات الغزو ومقاومة الموت الخلوي المبرمج والمقدرة العالية لإفراز

بروتينات الأمهة خارج خلوية كما هو الحال في الخلايا الظهارية الجنينية في مرحلة المعيدة وحتى في الخلايا السرطانية كالرئة (Gregory *et al.*, 2008, 3113; Lee *et al.*, 2010, 1557; Hussen *et al.*, 2021, 3).

ينشأ مخطط جسم الجنين عند الفقاريات في أثناء مرحلة المعيدة، عبر سلسلة من حركات مورفولوجية معقدة تؤدي إلى تشكل الأدمات الثلاثة والمحاور الرئيسية (أمامي/خلفي- بطني/ظهري). من أبرز هذه الحركات في أثناء مرحلة المعيدة عند الأنواع ذات السلى amniotes هي دخول الخلايا الظهارية لخلايا الأرومة العلوية للجنين عبر الخط البدائي لتشكل خلايا الأديم المتوسط وخلايا الأديم الباطن (Dondua, 2006, 258; Nakaya and Sheng, 2009, 161). في هذا السياق لوحظ في البدء محافظة خلايا الأديم المتوسط على النمط الظاهري للخلايا المهاجرة ، في حين أن خلايا الأديم الباطن أعادت تأسيس الاتصالات بين الخلوية وشكلت طبقة مجاورة لقاعدة الخط البدائي. أكد ملف تنميط الانتساخ مراقبة آلاف الجينات المعبرة عن نفسها بشكل مختلف لحوادث مرحلة المعيدة وتشكل الأدمات الثلاثة (Alev *et al.*, 2010, 2869; Hardy *et al.*, 2011, 70,71). من أهم الجينات المنظمة لتشكيل الخط البدائي والهجرات الخلوية عبره عند جنين الدجاج هي عوامل النمو FGF و NOTCH و PDGF و EPH ومسارات ونت (Chuai *et al.*, 2006, 142; Hardy *et al.*, 2008, 394; Yang *et al.*, 2008, 3524; Chuai and Weijer, 2008, 343). تعتبر إشارات عامل النمو FGF ضرورية لتفعيل كل المسارات السابقة ، مما يدل إلى أنها تحتل موقعاً في أعلى التسلسل الهرمي لهذه الشلالات الإشارية.

ينظم الرنا الصغري miRNAs هذه العمليات الحاسمة في أثناء تشكل المعيدة والتي تنتهي بظهور الجنين ثلاثي الوريقات في الاسبوع 3 من الحمل. تم التأكيد على أهميتها عند إيقاف اصطناع الرنا الصغري عبر تعطيلها في النماذج التجريبية المستخدمة؛ حيث أظهرت الأجنة الطافرة أنماطاً ظاهرية مشوهة وتوقف تناميها بشكل مبكر في مرحلة المعيدة وذلك بسبب تعطيل أنزيم دايسر من منشأ زيغوتي- أمي-maternal-zygotic dicer أو اختصاراً (MZdicer) والضروري لمرحلة الاصطناع الأخيرة للرنا الصغري miR-430، حيث أدى النقص في التعبير الجنيني لهذا الرنا الصغري إلى سوء في التشكل المورفولوجي للقلب والقطع الظهرية وفي تنامي الانبوب العصبي. بينما اظهرت الاجنة الطافرة لأنزيمي Drosha أو Dicer تغيرات في المعلمات البيولوجية الخاصة بالأديم الباطن والأديم المتوسط وبالتالي ظهور خلل لاحق في تنامي السلالة المنشئة وتشوهات جنينية وفشل تشكل المعيدة (Giraldez *et al.*, 2005, 833; Song *et al.*, 2012, 106). تم إصلاح هذه العيوب من خلال حقن أربعة أنواع من الرنا الصغري، أما الفئران الطافرة Dicer وDGRC8 فأبدت حجماً صغيراً وفشلت في التعبير عن المعلمات الخاصة بالأديم المتوسط وأظهرت خطأً في تنامي خلايا الجذعية للكتلة الجنينية الداخلية في مرحلة الأصيلة (Bernstein *et al.*, 2003, 216; Wang *et al.*, 2007, 381). تلعب إشارات عامل نمو الأرومة الليفية أو FGF دورًا محوريًا في أثناء مرحلة المعيدة، وحدد حوالي 44 رنا صغري مسؤول عن تنظيم حركات هجرة الخلايا وعمليات التحريض بين السلالات الجسدية المنشئة والمعبر عنها بوفرة في منطقة الخط البدائي لأجنة الدجاج. لقد تم التأكيد على كفاءة عامل النمو FGF في تنظيم التعبير الجيني سلبياً لعدة أنواع من الرنا الصغري نذكر من أهمها miR-let-7b و miR -9 وmiR -19b وmiR -107 وmiR -130b و miR -21؛ حيث يعتقد أن الرنا المرسال الهدف لأنواع الرنا الصغري السابقة والمراقبة بعامل النمو FGF هي مستقبلات تيروزين كيناز وسيرين/تريونين كيناز مثل مستقبلات TGFBR1 وTGFBR3 و PDGFRA وACVR2B وACVR1 (Bobbs *et al.*, 2012, 38512).

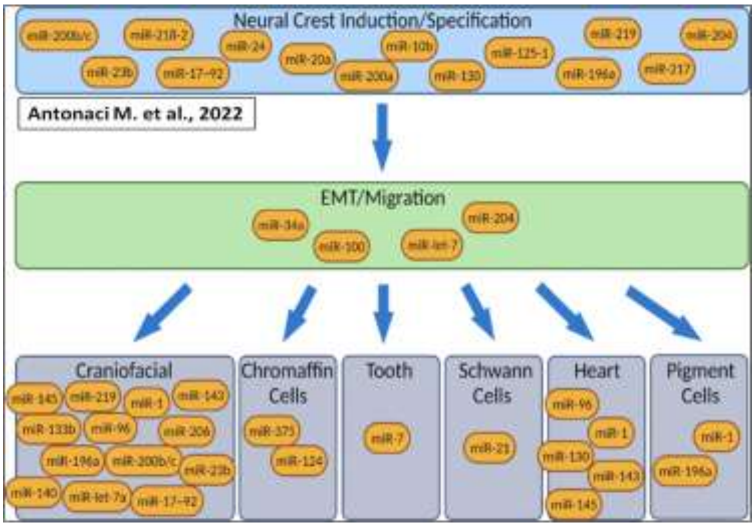
4.4.مرحلة العصيبة:

تتطلب مرحلة العصيبة تعبيرًا جيناً دقيقًا في المكان والزمان وتآثراً منسقاً للنقل الإشاري وشبكة من الجينات المنظمة، حيث يؤدي تعطيل أحدها إلى تشوهات في الأنبوب العصبي. أنجزت ملفات التعبير الجنيي بتقانة مصفوفة الرنا الصغري miRXplore microarrays في خلايا الانبوب العصبي المتنامي وقورنت بأزمنة مختلفة لجنين فأر في اليوم 8.5 و9 و9.5 من الحمل. تم التحقق عن التغيرات الكمية للتعبير الجيني الصغري للرنا الصغري بتفاعل بوليمراز التسلسلي اللحظي الكميTaqMan MicroRNA RT ؛ وحَددت هذه الدراسة بصمة فريدة للتعبير الجيني لمجموعة من الرنا الصغري في أثناء هذه الفترة الحرجة من التشكل المورفولوجي للأنبوب العصبي وهي : MiR-124 وMiR-638 وMiR-663 وMiR-762 و MiR-199a-5 و miR-199a-3p وMiR-17~92 و miR-106b~25 وmiR-106a~363 وMiR-126 وmiR-103 وmiR-107 وMiR-19a وmiR-19b وMiR-16 وmiR-15 . كشف تحليل الجينات ومسارات التأشير المستهدفة من قبل الرنا الصغري miRNA أنها تراقب التعبير لعدة الجينات مشفرة لبروتينات ضرورية لانجاز مرحلة العصيبة بشكل طبيعي (Mukhopadhyay *et al*., 2011, 8-12).

يعتبر الرنا الصغري MicroRNAs منظمات هامة للتعبير الجيني، حيث تم البرهان على دوره في توقيت التنامي وبالتالي في مراقبة مجموعة واسعة من الوظائف الخلوية كتحديد هوية الخلايا وعمليات الهجرة والتأشير الخلوي؛ فمثلاً يتدخل الرنا miRNA-430 في التنامي الحنيني المبكر عند بعض الأنواع ، وفي حوادث التكون الشكلي ومراقبة ترجمة الرنا المرسال الأمي وسبيل التأشير Nodal وهجرة الخلايا المنشئة إلى مواقعها. أكدت الدراسات مقدرة الرنا miR-430 على مراقبة التشكل المورفولوجي للأنبوب العصبي وعلى توجيه الخلايا المنقسمة في الانثناء العصبي والضرورية لتشكيل الخط العصبي المتوسط. يؤدي فقدان وظيفة miR-430 إلى سوء توجيه مغزل الانقسام في هذه المنطقة ، وفشل تماسك الظهارة العصبية بعد انقسام الخلايا ، وتراكمها خارجاً في الأنبوب العصبي الظهري (Takacs and Giraldez, 2016, 443). لوحظ تراكم الرنا الصغري miRNA let-7 خلال تنامي الجهاز العصبي المركزي (CNS)؛ حيث تتكاثر طلائع الخلايا العصبية المتنامية بشكل دقيق ومنسق مع قرارات التي تأخذها هذه الطلائع في تحديد مصيرها الخلوي؛ إذ تنقسم سريعاً ثم يطول زمن الدورة الخلوية تدريجياً مع تقدم عمر الجنين، لتؤدي في النهاية إلى ظهور نسيج عصبي طبيعي الحجم والمحتوى الخلوي. سمحت تقانة التهجين في موقعه وتحليل مشعر الرنا الصغري المفلور بالكشف عن التغيرات الكمية miRNA let-7 ومستوى نشاطه مع تقدم طلائع الخلايا العصبية في الدورة الخلوية. تم التأكيد على تواسط الرنا let-7 في أثناء انتقال طلائع الخلايا العصبية في أطوار الدارة ؛ فمثلاً تعزز زيادة كمية let-7 الخروج من دورة الخلوية وإطالة زمن الطورين S /G2، بينما يؤدي انخفاض الرنا Let-7 إلى تقصير زمن الدورة الخلوية في طلائع هذه الخلايا. تشير نتائج هذه الدراسة إلى الدور المنوط بالرنا let-7 على ربط معدل تكاثر طلائع الخلايا العصبية بمرحلة التنامي عاملاً على إطالة زمن الدورة الخلية وتقدمها في أثناء تنامي الجهاز العصبي المركزي (Fairchild *et al*., 2019, 2). تنغلق المنافذ العصبية للأنبوب العصبي في مرحلة العصيبة في الامام والخلف (اليوم 27 و 28 من الحمل على التوالي)، وتتطلب هذه العملية المبكرة والحاسمة في تنامي الجهاز العصبي المركزي تحكمًا دقيقًا في عملية استقلاب الغذائي لضمان التكاثر والتمايز الخلوي الطبيعي. لوحظ ارتباط اضطراب تنظيم استقلاب السكر عند الأم الحامل المصابة بداء السكري مع تشوهات في الأنبوب العصبي(NTDs) عند الانسان، مما يشير إلى تأثر تنامي الظهارة العصبية بالتغيرات الاستقلابية. كشفت دراسة نماذج وراثية تجريبية لأجنة فئران تعاني من نقص في كمية الرنا الصغري miR-302 عن وجود تشوهات في الأنبوب العصبي. تم تحديد المسارات الاستقلابية

الخاطئة وكُشف عن ارتفاع كبير في التعبير الجيني لجينات تحلل السكر في الأجنة المشوهة، مما يشير إلى علاقة تحلل السكر بعملية التكاثر الخلوي المناسب لضمان حادثة إنغلاق الأنبوب العصبي في الزمن المحدد. في السياق التجريبي نفسه أكد تحديد التسلسل النيوكلوتيدي للرنا المرسال أحادي الطاق single-cell mRNA-sequencing للظهارة العصبية المتنامية عن دور لجينات متورطة في عملية استقلاب الكربون والدسم والفيتامينات ومضادات الأكسدة في أثناء مرحلة العصبية عند الفئران. أشارت نتائج مقياس الطيف الكتلي mass spectrometry المعتمد على تنميط ملف الاستقلاب إلى وجود زيادة في تحلل السكر وانخفاض في معدل استقلاب الدسم عند الأجنة المشوهة NTD ، التي تعاني من نقص في كمية الرنا الصغري miR-302. كما لُوحظ أيضاً ارتفاعاً في التعبير الجيني للجينات الهدف وهي : Pfkp و Pfkfb3 و Hk1 تبعاً لدرجة تشوه الأجنة NTD والناجم عن زيادة معدل التكاثر وقصر الدارة الخلوية (Keuls *et al*., 2020, 5-6).

تتشكل خلايا العرف العصبي الجذعية (NC) المتعددة القدرات في نهاية مرحلة المعيدة عند الفقاريات بتحريض خلايا الحبل الظهري على البشرة العصبية المنتظرة . تهاجر جمهرات (NC) المتشكلة في جميع أنحاء الجنين وتختلط في خلايا النسيج المتوسط الجنيني لتتمايز إلى أنماط كثيرة من الخلايا مثل: الخلايا الميلانينية في الجلد والعصبونات والخلايا الغضروفية والعظمية وغيرها، لذا تعتبر أديماً جنينياً رابعاً. لقد عرف العديد من التناذرات العصبية في نماذج تجريبية المترافقة مع خلل في تحريض تشكل خلايا (NC) وتكاثرها وهجرتها وتمايزها، والناجمة عن تغييرات في التعبير الجيني لمجموعة جينات مرمزة مسؤولة عن تناميها، وأيضاً عن جينات غير المرمزة مثل الرنا الصغري المتورطة في مراقبة التعبير الجيني للجينات المرمزة للبروتينات مثل miR-130a و miR-219 و miR-23b و miR-200b و miR-96 و miR-196a. وبالتالي يسمح هذا التوجه البحثي الجديد بدراسة العديد من التناذرات عند الانسان (Antonaci and Wheeler, 2022, 968).



الشكل (3): أنواع الرنا الصغري المسؤولة عن تنامي خلايا العرف العصبي من التحريض وحتى التمايز (Antonaci M. *et al*., 2022).

4. التوجهات المستقبلية للتشخيص والمعالجة
Future directions of diagnostic and therapy

وخلاصة القول أن حوادث التكاثر عند الثدييات تتطلب تواصل أنماط مختلفة من الخلايا والأنسجة والأعضاء من خلال إطلاقها واستقبالها العديد من جزيئات التأشير، التي تعمل على تنسق أحداث مختلفة مثل تشكيل الاعراس والالقاح والتنامي الجنيني المبكر والمتأخر. تسمح هذه التآثرات بين خلوية بتنامي المتعضيات كثيرات الخلايا التي لا تستطيع الخلايا العيش بمفردها ويتوجب عليها أن تستجيب لتأشيرات خلوية عديدة تضمن سلامة الكائن الحي ككل؛ يضاف إليها التأشيرات الخلوية المباشرة مثل الموصلات الفضوية والصمية ونظيرة الصمية والذاتية (Alves *et al*., 2020, 8).

حالياً يمكن استخدام الرنا الصغري النووي sncRNAs المفرز خارج الخلية كمؤشر حيوي لجودة البيوض والنطاف؛ حيث يعمل كوسيط للتواصل ما بين خلايا السلالة المنشئة ؛ بينما تلعب أنواع أخرى من الرنا الصغري المتداخل داخلي المنشأ endo-siRNAs دوراً داعماً لحوادث ما قبل التعشيش (Zhu *et al*., 2021, 16; Gilchrist *et al*., 2008, 171). توفر بعض المعطيات التجريبية معلمات حيوية جزيئية كالرنا الصغري وغيرها من العوامل المسؤولة عن تشكل الجريبات المبيضية عند المرأة كأدوات جديدة في معالجة العقم الناجم عن قلة فرص الالقاح وعن فشل التعشيش (Tong *et al*., 2014, 8; Assou *et al*., 2006, 1713)؛ وأيضاً إلى إمكانية تحديد أنماط النساء ذوات المحزون المبيضي المتغاير بمقارنة وفرة كمية نوعي الرنا الصغري المتواجدة لديهن والمرتبطة بشكل كبير بمستوى الهرمون المبيضي AMH زيادةً أو نقصاناً (Abu-Halima *et al*., 2021, 6). في الحقيقة أتاح الفهم المعمق لآليات التواصل الخلوي عبر عضيات سيتوبلاسمية مثل الحويصلات خارج الخلية (EVs) في كل من الحالات الطبيعية والمرضية من تطوير أدوات قيّمة للنهوض بالصحة الإنجابية وتحديد الدور المهم لها في مراقبة سلسلة الأحداث البيولوجية بدءًا من تشكل الاعراس (البيوض) إلى الإلقاح والتعشيش (Machtinger *et al*., 2021, 553). لذا يعتبر التحري المستقبلي عن وجود أدوار لأنواع عديدة من الرنا الصغري ضمن السائل الجريبي مثل (miR-766-3p و miR-663b و miR-132-3p و miR-16-5p و miR-888 و miR-214 و miR-454) ضرورة تؤكد على التنامي الصحيح للجريبات المبيضية عند المرأة، وأيضاً في السوائل الفيزيولوجية الأخرى كالسائل المنوي وسوائل لمعة الرحم وفي الحويصلات الصغرية ضمن السائل الجريبي (Andronico *et al*., 2019, 8; Machtinger *et al*., 2016,190).

لقد برهن الباحث Bouhallier وزملائه 2010 على تورط أنواع من الرنا الصغري في حادثة تشكل النطاف وقدرتها على تنظيم العديد من المسارات البيولوجية المهمة مثل التكاثر والتمايز والموت الخلوي المبرمج؛ وعلى الدور المهم للسبيل المعتمد على أنزيم دايسر في أداء خلايا سرتولي لوظيفتها في حادثة تشكل النطاف عند الثدييات، وبالتالي تمهد الطريق لرؤى جديدة حول معالجة العقم عند الإنسان (Papaioannou *et al*., 2009, 9-10). أشارت الدراسات الحديثة إلى اعتبار الرنا الصغري مؤشراً حيوياً للنطاف القابلة للحياة وحالة خصوبة الرجل، وقدرته على تنظم عمليات الإنجاب والتنامي المبكر الصحيح للأجنة، ومن الممكن أن تكون معلماً رئيساً لتشخيص حالات العقم مجهولة السبب (Alves *et al*., 2020, 10). توفر المعطيات المستجدة طريقة حديثة وغير باضعة لتشخيص العقم لدى الرجال المصابين: بفقد النطاف غير الانسدادي nonobstructive azoospermia واستسقاء النطاف asthenozoospermia وفي حالات نقص النطاف أو قلتها oligospermia وذلك بمعايرة كمية الرنا الصغري بتقانة (RT-qPCR) في الحويصلات البربخية أو الموجودة ضمن الحويصلات الصغيرة خارج الخلية (sEVs) في السائل المنوي وفي البلازما المنوية (Belleannée, 2015, 733; Wang *et al*., 2011, 1726-1727). كما يمكن استخدامها كمؤشرات حيوية حساسة ومحددة لتشخيص الرجال

الذين يعانون من فقد النطاف مع فرص حقيقية لمعالجة العقم والحصول على نطاف بخزعة من الخصية (Barceló *et al*., 2018, 1097). يتوافر حالياً إمكانات علاجية لبعض حالات الحمل المعقدة الناجمة عن أخطاء في تنامي المشيمة المتغاير عند النساء بقياس مستوى التعبير الجيني للرنا الصغري miR-514a-3p كمنظم جديد لإشارات IGF وتكاثر خلايا الارومة المعذية للجنين والتي تساهم لاحقاً في تشكل المشيمة عند جنين الإنسان في اليوم 40 من الحمل (Quilang *et al*., 2022, 108). وبالتالي من الممكن معالجة التوقف المبكر للتنامي الجنيني بقياس فعالية الوظائف الحيوية لخلايا الأرومة المغذية للجنين عن طريق مؤشر حيوي آخر كالرنا الصغري miR125b-5p وإيجاد أساليب علاجية أو وقاية مستقبلية تفيد في حال وجود تعقيدات في أثناء الحمل ناجمة عن تلوث الهواء (Chaiwangyen *et al*., 2022, 8).

بين الباحث Azzahra وزملائه 2022 والعاملين في مجال الاخصاب في الزجاج إلى أهمية الرنا الصغري في تحديد جودة الأجنة وحادثة التعشيش وإمكانية مراقبة حالات الفشل المتكرر للتعشيش RIF واستمرار الحمل عند النساء وتحسين الصحة الانجابية لديهن. إذ تعتبر ثباتية التعبير الجيني للرنا الصغري miR-20a و miR-30c في أوساط الزرع المستخدمة في الالقاح في الزجاج مؤشراً حيوياً لنوعية للأجنة القادرة على التعشيش؛ تشير بيانات الخوارزميات إلى إمكانية التنبأ عن تنامي الجنين حتى مرحلة الكيسة الأريمية، وإلى تحديد نوعية الأجنة ذات ملامح خلوية وجزيئية أكثر اتساقًا مع الوظائف الطبيعية للجنين المتنامي عن طريق تحري أنواع الرنا الصغري ذات مقدرة عالية لإيصال الاجنة المرحلة التعشيش وذلك اعتماداً على الدراسة المورفولوجية للأجنة الناتجة عن الاخصاب التقليدي في الزجاج IVF وعن طريقة حقن النطاف داخل سيتوبلاسما البيضة (Coticchio *et al*., 2021, 1741). يعد حالياً الفشل المتكرر للتعشيش RIF عند للنساء في أثناء التحضير للاخصاب الاصطناعي ونقل الأجنة مع غياب علامات تشخيصية أو خيارات علاج فعالة ومتاحة تحديًا كبيرًا، لقد سمح تحديد العديد من أنواع الرنا ولأول مرة على نطاق واسع سواء الرنا الصغري في سوائل الرحم UF لكل من النساء الأصحاء ذوات الخصوبة المؤكدة والنساء المصابات بـ RIF أو التحري عن بعض أنواع الرنا الجائل circRNAs في خزعات مأخوذة من أنسجة المشيمة، من تسليط الضوء على الآليات الجزيئية التي تمكن وراء RIF، ومن دراسة المؤشرات الحيوية المرافقة وإمكانية العلاج السريري في المستقبل (Wang *et al*., 2021, 2 ; Zhao *et al*., 2021, 6081-6083 ; von Grothusen *et al*., 2022, 744).

بناءاً على ما قدمته هذه المراجعة النظرية من الممكن أن يتوجه الأطباء الممارسين والعاملين في مجال الوراثة الطبية والبيولوجيا الجزيئية إلى الكشف عن تغييرات تفاضلية في بصمة التعبير الجيني للرنا الصغري ذات مغزى عند البشر الاسوياء والمرضى؛ ولا سيما تلك المتواجدة في الأعراس الناضجة والبيوض الملحقة وفي الأجنة بمراحل جنينية باكرة، وذلك باستخدام العديد من التقانات الحيوية مثل تقانة تفاعل البوليمراز التسلسلي اللحظي الكمي Quantitative Real-Time PCR أو اختصاراً qRt- PCR وتقانة تحديد تسلسل النيوكلوتيدات بالجيل الثاني miRNA Next-Generation Sequencing أو اختصاراً (NGS) وتقانة مصفوفة الرنا الصغري RNAmicroarray وتقانة التدفق الخلوي السائل Flew cytometry ومتبوعةً بتحليل للبيانات باستخدام برامج احصائية متطورة Bio-informatic. كما تسمح مراجعة الأدبيات العلمية هذه بتسليط الضوء على التوجهات البحثية العالمية المعاصرة لدراسة أنواع مختلفة للرنا الصغري المتورطة في مراقبة التعبير الجيني لجينات التنامي المرمزة للبروتينات، ولإعطاء المزيد من الفرص لاستخدام العديد من الأدوات البيولوجية للفهم الدقيق لآلية عمل الرنا الصغري المتواجد في البيوض والنطاف وزيادة فرص الحمل والتعشيش عند المرأة، وربما لتدبير علاج المرضى المصابين بالتناذرات القحفية–الوجهية وغيرها من التشوهات الناجمة عن

أخطاء في تنامي الجملة العصبية المركزية متعددة الأسباب الجينية في المستقبل القريب.

إذن تعتبر أنواع الرنا الصغري المكتشفة خلال الأعوام العشرين الماضية عبارة منظمات ريبية riboregulators صغيرة جدًا ولكنها في غاية الأهمية على اعتبار أنها تشارك في جميع العمليات الحيوية الأساسية في الخلايا الجنينية أو في الخلايا البالغة مثل: التكاثر والتمايز والهجرة والموت الخلوي المبرمج. بالرغم من أن الطرق الحاسوبية المطبقة اليوم تساعد افتراضياً في تسريع تحديد هوية أنواع مختلفة للرنا الصغري المكتشفة على مستوى الجينوم البشري، فإن طرق الكشف التجريبية الحساسة والفعالة وقليلة التكلفة ضرورية للتحقق وبدقة عن وظيفية وكمية الرنا الصغري miRNAs والمعبر عنها تفاضليًا في الخلايا البشرية. بناءاً على ما سبق يمكن استخدام أنواع عديدة من الرنا الصغري كمؤشرات حيوية ذات معنى للتنامي الجنيني الطبيعي والخاطىء؛ حيث أقر المجتمع العلمي في السنوات الأخيرة أن جزيئات الرنا الصغري miRNAs عبارة عن منظمات مهمة للتنامي الجنيني غير قابلة للنقاش قادرة على التورط في جميع مراحله ابتداءاً من تشكل الاعراس والالقاح وتنامي الجنين المبكر، وقادرة على تعديل سبل التأشير الخلوي مؤدية إلى تفعيل أو تثبيط الاستجابات الانتساخية في الخلايا الجنينية. تُمكّن التحاليل المنجزة عند الأفراد البالغين من القياس الكمي التفاضلي للتعبير الجيني لأنواع متعددة من الرنا الصغري المتواجدة في الأنسجة المختلفة وذلك في كل من الحالات الطبيعية والمرضية. يؤدي التغيير في القدرة التعبيرية لهذه المنظمات الجزيئية داخل وخارج الخلايا وحتى في السوائل البيولوجية إلى تغييرات في مجموعة الجينات المتورطة في العديد من العمليات البيولوجية المهمة، وبالتالي إلى ظهور العديد من الاضطرابات المرضية عند الإنسان؛ لذا تُعتبر المعايرة الكمية للرنا الصغري في الدورة الدموية مؤشرات حيوية واعدة لتشخيص الأمراض البشرية وكفيلة بتطوير تجارب سريرية علاجية معتمدة على الرنا الصغري.

التمويل : هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (501100020595).

References:

1. Green D, Dalmay T, Chapman T. Microguards and micromessengers of the genome. Heredity (Edinb).; 116(2): 125–134. (2016).
2. Perkel JM. Visiting “Noncodarnia.” Biotechniques; 54(6): 301, 303–304. (2013).
3. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297. (2004).
4. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. EMBO J. 13;23(20):4051-60. (2004).
5. Axtell MJ, Westholm JO, Lai EC. Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. Genome Biol 12: 221. (2011).
6. Finnegan EF, Pasquinelli AE. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. Crit Rev Biochem Mol Biol 48: 51–68. (2013).
7. Obernosterer, G., Leuschner, P. J., Alenius, M. & Martinez, J. Post-transcriptional regulation of microRNA expression. *RNA* 12, 1161–1167. (2006).
8. Belleannée, C. Extracellular microRNAs from the epididymis as potential mediators of cell-to-cell communication. Asian J. Androl. 17, 730–736. (2015).
9. Sharma, U., Conine, C.C., Shea, J.M., Boskovic, A., Derr, A.G., Bing, X.Y., Belleannee, C.,Kucukural, A., Serra, R.W., Sun, F., et al. Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. Science 351, 391–396. (2016).
10. Alves MBR, Celeghini ECC, Belleannée C. From Sperm Motility to Sperm-Borne microRNA Signatures: New Approaches to Predict Male Fertility Potential. Front Cell Dev Biol. 21;8:791. (2020).
11. Andronico F, Battaglia R, Ragusa M, Barbagallo D, Purrello M, Di Pietro C. Extracellular Vesicles in Human Oogenesis and Implantation. Int J Mol Sci. 1;20(9):2162. (2019).
12. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. Nat Rev Mol Cell Biol 10: 126–139.(2009).
13. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. Nat Cell Biol.;11(3):228-234. (2009).
14. Zhang BT, Kim VN. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. Cell 125:887–901. (2006).
15. Schwab R, Voinnet O. RNA silencing amplification in plants: size matters. Proc Natl Acad Sci U S A. 24;107(34):14945-6. (2010).
16. Creugny A, Fender A, Pfeffer S. Regulation of primary microRNA processing. FEBS Lett.;592(12):1980-1996. (2018).
17. Pratt AJ, MacRae IJ. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. J Biol Chem. 3;284(27):17897-901.(2009).
18. Bhattacharjee S, Roche B, Martienssen RA. RNA-induced initiation of transcriptional silencing (RITS) complex structure and function. RNA Biol.;16(9):1133-1146.(2019).
19. Hayashi K.; Chuva de Sousa Lopes, S.M.; Kaneda, M.; Tang, F.; Hajkova, P.; Lao, K.; O’Carroll, D.; Das, P.P.; Tarakhovsky, A.; Miska, E.A.; et al. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. PLos ONE, 3, e1738. (2008).
20. Watanabe, T.; Totoki, Y.; Toyoda, A.; Kaneda, M.; Kuramochi-Miyagawa, S.; Obata, Y.; Chiba, H.; Kohara, Y.; Kono, T.; Nakano, T.; et al. Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. Nature, 453, 539–543. (2008).
21. Zhu Q, Kirby JA, Chu C, Gou LT. Small Noncoding RNAs in Reproduction and Infertility. Biomedicines. 12;9(12):1884. (2021).
22. Gou LT, Dai P, Liu MF. Small noncoding RNAs and male infertility. Wiley Interdiscip Rev RNA.;5(6):733-45. (2014).

23. Dai P, Wang X, Gou LT, Li ZT, Wen Z, Chen ZG, Hua MM, Zhong A, Wang L, Su H, Wan H, Qian K, Liao L, Li J, Tian B, Li D, Fu XD, Shi HJ, Zhou Y, Liu MF. A Translation-Activating Function of MIWI/piRNA during Mouse Spermiogenesis. Cell. 12;179(7):1566-1581.e16. (2019).
24. Lim, A.K.; Lorthongpanich, C.; Chew, T.G.; Tan, C.W.G.; Shue, Y.T.; Balu, S.; Gounko, N.; Kuramochi-Miyagawa, S.; Matzuk, M.M.; Chuma, S.; et al. The nuage mediates retrotransposon silencing in mouse primordial ovarian follicles. Development ;140(18):3819-25. (2013).
25. Taborska, E.; Pasulka, J.; Malik, R.; Horvat, F.; Jenickova, I.; Matoševi´c, Z.J.; Svoboda, P. Restricted and non-essential redundancy of RNAi and piRNA pathways in mouse oocytes. PLoS Genet., 15, e1008261. (2019).
26. Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. Hum Reprod Update 14: 159–177. (2008).
27. Suh N, Blelloch R. Small RNAs in early mammalian development: from gametes to gastrulation. Development.;138(9):1653-61. (2011).
28. Abu-Halima M, Becker LS, Ayesh BM, Baus SL, Hamza A, Fischer U, Hammadeh M, Keller A, Meese E. Characterization of micro-RNA in women with different ovarian reserve. Sci Rep. 25;11(1):13351. (2021).
29. Cuman C, Van Sinderen M, Gantier MP, Rainczuk K, Sorby K, Rombauts L, Osianlis T, Dimitriadis E. Human secreted microRNA Regulate Endometrial Epithelial Cell Adhesion. E. BioMedicine. 11;2(10):1528-35. (2015).
30. Machtinger R, Baccarelli AA, Wu H. Extracellular vesicles and female reproduction. J Assist Reprod Genet.;38(3):549-557. (2021).
31. Machtinger R, Laurent LC, Baccarelli AA. Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. Hum Reprod Update.;22(2):182-93. (2016).
32. Murchison EP, Stein P, Xuan Z, Pan H, Zhang MQ, et al. Critical roles for Dicer in the female germline. Genes Dev 21(6): 682–693.(2007).
33. Lei L, Jin S, Gonzalez G, Behringer RR, Woodruff TK. The regulatory role of Dicer in folliculogenesis in mice. Mol Cell Endocrinol 315: 63–73. (2010).
34. Tong XH, Xu B, Zhang YW, Liu YS, Ma CH. Research resources: comparative microRNA profiles in human corona radiata cells and cumulus oophorus cells detected by next-generation small RNA sequencing. .PLoS One. 4;9(9):e106706. (2014).
35. Gregory L, Booth AD, Wells C, Walker SM. A study of the cumulus-corona cell complex in in-vitro fertilization and embryo transfer; a prognostic indicator of the failure of implantation. Hum Reprod 9: 1308–1317. (1994).
36. Assou S, Anahory T, Pantesco V, Le Carrour T, Pellestor F. The human cumulus–oocyte complex gene-expression profile. Hum Reprod 21: 1705–1719. (2006).
37. Papaioannou, M. D., Pitetti, J. L., Ro, S., Park, C., Aubry, F., Schaad, O., et al. Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. Dev. Biol. 326, 250–259. (2009).
38. Martins RP, Krawetz SA. RNA in human sperm. Asian J Androl.;7(2):115-20. (2005).
39. Bouhallier, F., Allioli, N., Lavial, F., Chalmel, F., Perrard, M.-H., Durand, P., et al. Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis. RNA 16, 720–731. (2010).
40. Zimmermann, C., Romero, Y., Warnefors, M., Bilican, A., Borel, C., Smith, L. B., et al. Germ cell-specific targeting of DICER or DGCR8 reveals a novel role for endo-siRNAs in the progression of mammalian spermatogenesis and male fertility. PLoS One. 2014 Sep 22;9(9):e107023. (2014).
41. Nixon, B., Stanger, S.J., Mihalas, B.P., Reilly, J.N.,Anderson, A.L., Tyagi, S., Holt, J.E., and McLaughlin, E.A. The microRNA signature of mouse spermatozoa is substantially modified during epididymal maturation. Biol. Reprod. 93, 91, 1–20. (2015).
42. Belleannée, C., Calvo, É, Caballero, J., and Sullivan, R. Epididymosomes convey different repertoires of microRNAs throughout the bovine epididymis. Biol. Reprod.. 89(2):30, 1–11. (2013).

43. Reilly, J. N., McLaughlin, E. A., Stanger, S. J., Anderson, A. L., Hutcheon, K.,Church, K., et al. Characterisation of mouse epididymosomes reveals a complex profile of microRNAs and a potential mechanism for modification of the sperm epigenome. Sci. Rep. 6, 1–15. (2016).
44. Conine, C. C., Sun, F., Song, L., Rivera-Pérez, J. A., and Rando, O. J. Small RNAs gained during epididymal transit of sperm are essential for embryonic development in mice. Dev. Cell 46, 470.e3–480.e3. (2018).
45. Conine, C. C., Sun, F., Song, L., Rivera-Pérez, J. A., and Rando, O. J. MicroRNAs absent in caput sperm are required for normal embryonic development. Dev. Cell 50, 7–8. (2019).
46. Sharma, U., Sun, F., Conine, C. C., Reichholf, B., Kukreja, S., Herzog, V. A., et al. Small RNAs are trafficked from the epididymis to developing mammalian sperm. Dev. Cell 46, 481–494. (2018).
47. Wang C., Yang, C., Chen, X., Yao, B., Yang, C., Zhu, C., et al. Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. Clin. Chem. 57, 1722–1731. (2011).
48. Barceló, M., Mata, A., Bassas, L., and Larriba, S. Exosomal microRNAs in seminal plasma are markers of the origin of azoospermia and can predict the presence of sperm in testicular tissue. Hum. Reprod. 33, 1087–1098. (2018).-
49. Liu, W., Pang, R. T. K., Chiu, P. C. N., Wong, B. P. C., Lao, K., and Lee, K. Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, 490–494. (2012).
50. Azzahra TB, Febri RR, Iffanolida PA, Mutia K, Wiweko B. The Correlation of Chronological Age and Micro Ribonucleic Acid-135b Expression in Spent Culture Media of *In vitro* Fertilisation Patient. J Hum Reprod Sci. Jan-Mar;15(1):78-81.(2022).
51. Pauli A, Rinn JL, Schier AF. Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis. Nat Rev Genet.;12(2):136-49. (2011).
52. Paloviita P, Hydén-Granskog C, Yohannes DA, Paluoja P, Kere J, Tapanainen JS, Krjutškov K, Tuuri T, Võsa U, Vuoristo S. Small RNA expression and miRNA modification dynamics in human oocytes and early embryos. Genome Res.;31(8):1474-1485. (2021).
53. Légaré C, Clément AA, Desgagné V, Thibeault K, White F, Guay SP, Arsenault BJ, Scott MS, Jacques PÉ, Perron P, Guérin R, Hivert MF, Bouchard L. Human plasma pregnancy-associated miRNAs and their temporal variation within the first trimester of pregnancy. Reprod Biol Endocrinol. 14;20(1):14. (2022).
54. Wang M, Gao Y, Qu P, Qing S, Qiao F, Zhang Y, Mager J, Wang Y. Sperm-borne miR-449b influences cleavage, epigenetic reprogramming and apoptosis of SCNT embryos in bovine. Sci Rep. 17;7(1):13403. (2017).
55. Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, et al. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. Genes Dev 19 (4): 489–501(2005).
56. Quilang RC, Lui S, Forbes K. miR-514a-3p: a novel SHP-2 regulatory miRNA that modulates human cytotrophoblast proliferation. J Mol Endocrinol. 20; 68 (2):99-110. (2022).
57. Melton, C., Judson, R. L., and Blelloch, R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature* 463,621–626. (2010).
58. Kobayashi N, Okae H, Hiura H, Kubota N, Kobayashi EH, Shibata S, Oike A, Hori T, Kikutake C, Hamada H, Kaji H, Suyama M, Bortolin-Cavaillé ML, Cavaillé J, Arima T. The microRNA cluster C19MC confers differentiation potential into trophoblast lineages upon human pluripotent stem cells. Nat Commun. 2;13(1):3071. (2022).
59. Chaiwangyen W, Pintha K, Tantipaiboonwong P, Nuntaboon P, Khantamat O, Pereira de Sousa FL. PM10 Alters Trophoblast Cell Function and Modulates miR-125b-5p Expression. Biomed Res Int. 7;2022:3697944. (2022).
60. Wang H, Luo C, Wu X, Zhang J, Xu Z, Liu Y, Li B, Li J, Xie J. Circular RNA hsa_circ_0081343 promotes trophoblast cell migration and invasion and inhibits trophoblast apoptosis by regulating miR-210-5p/DLX3 axis. Reprod Biol Endocrinol. 9;19(1):123. (2021).

61. Zhao H, Chen L, Shan Y, Chen G, Chu Y, Dai H, Liu X, Bao H. Hsa_circ_0038383-mediated competitive endogenous RNA network in recurrent implantation failure. Aging (Albany NY). 20;13(4):6076-6090. (2021).
62. 62. von Grothusen C, Frisendahl C, Modhukur V, Lalitkumar PG, Peters M, Faridani OR, Salumets A, Boggavarapu NR, Gemzell-Danielsson K. Uterine fluid microRNAs are dysregulated in women with recurrent implantation failure. Hum Reprod.1;37(4):734-746. (2022).
63. Coticchio G, Pennetta F, Rizzo R, Tarozzi N, Nadalini M, Orlando G, Centonze C, Gioacchini G, Borini A. Embryo morphokinetic score is associated with biomarkers of developmental competence and implantation. J Assist Reprod Genet.;38(7):1737-1743. (2021).
64. Larabee SM, Coia H, Jones S, Cheung E, Gallicano GI. miRNA-17 members that target Bmpr2 influence signaling mechanisms important for embryonic stem cell differentiation in vitro and gastrulation in embryos. Stem Cells Dev. 1;24(3):354-71. (2015).
65. Gregory, P. A., Bracken, C. P., Bert, A. G., and Goodall, G. J. MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* 7,3112–3118. (2008).
66. Lee MR, Kim JS, Kim KS.miR-124a is important for migratory cell fate transition during gastrulation of human embryonic stem cells. Stem Cells.;28(9):1550-9. (2010).
67. Hussen BM, Shoorei H, Mohaqiq M, Dinger ME, Hidayat HJ, Taheri M, Ghafouri-Fard S. The Impact of Non-coding RNAs in the Epithelial to Mesenchymal Transition. .Front Mol Biosci. 26;8:665199. (2021).
68. Dondua A. K. *Gastrulation: From Cells to Embryo*. Russian Journal of Developmental Biology, 37(4):257-258. (2006).
69. Nakaya, Y., and Sheng, G. An amicable separation: Chick's way of doing EMT. *Cell Adh. Migr.* 3, 160–163. (2009).
70. Alev, C., Wu, Y., Kasukawa, T., Jakt, L. M., Ueda, H. R., and Sheng, G. Transcriptomic landscape of the primitive streak. *Development* 137, 2863–2874; (2010).
71. Hardy, K. M., Yatskievych, T. A., Konieczka, J., Bobbs, A. S., and Antin,P. B. FGF signalling through RAS/MAPK and PI3K pathways regulatescell movement and gene expression in the chicken primitive streak without affecting E-cadherin expression. *BMC Dev. Biol.* 11:20. (2011).
72. Chuai, M., Zeng, W., Yang, X., Boychenko, V., Glazier, J. A., and Weijer,C. J. Cell movement during chick primitive streak formation. *Dev. Biol.* 296, 137–149.(2006).
73. Hardy, K. M., Garriock, R. J., Yatskievych, T. A., D'Agostino, S. L., Antin, P. B., and Krieg, P. A. Non-canonical Wnt signaling through Wnt5a/b and a novel Wnt11 gene, Wnt11b, regulates cell migration during avian gastrulation. *Dev. Biol.* 320, 391–401. (2008).
74. Yang, X., Chrisman, H., and Weijer, C. J. PDGF signalling controls the migration of mesoderm cells during chick gastrulation by regulating N-cadherin expression. *Development* 135, 3521–3530). (2008).
75. Chuai, M., and Weijer, C. J. Regulation of cell migration during chick gastrulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 343–349. (2009).
76. Giraldez, A. J., Cinalli, R. M., Glasner, M. E., Enright, A. J., Thomson, J. M., Baskerville, S., Hammond, S. M., Bartel, D. P., and Schier, A. F. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 308, 833–838). (2005).
77. Song, J. L., Stoeckius, M., Maaskola, J., Friedländer, M., Stepicheva, N.,Juliano, C., Lebedeva, S., Thompson, W., Rajewsky, N., and Wessel, G. M. Select microRNAs are essential for early development in the sea urchin. *Dev. Biol.* 362, 104–113. (2012).
78. Bernstein, E., Kim, S. Y., Carmell, M. A., Murchison, E. P., Alcorn, H., Li, M. Z., Mills, A. A., Elledge, S. J., Anderson, K. V., and Hannon, G. J. Dicer is essential for mouse development. *Nat. Genet.* 35, 215–217. (2003).
79. Wang, Y., Medvid, R., Melton, C., Jaenisch, R., and Blelloch, R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat. Genet.* 39, 380–385. (2007).

80. Bobbs AS, Saarela AV, Yatskievych TA, Antin PB. Fibroblast growth factor (FGF) signaling during gastrulation negatively modulates the abundance of microRNAs that regulate proteins required for cell migration and embryo patterning. J Biol Chem. 9;287(46):38505-14. (2012) .
81. Mukhopadhyay P, Brock G, Appana S, Webb C, Greene RM, Pisano MM. MicroRNA gene expression signatures in the developing neural tube. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.;91(8):744-762 (2011).
82. Takacs CM, Giraldez AJ.miR-430 regulates oriented cell division during neural tube development in zebrafish. Dev Biol. 15;409(2):442-50.(2016).
83. Fairchild CLA, Cheema SK, Wong J, Hino K, Simó S, La Torre A. Let-7 regulates cell cycle dynamics in the developing cerebral cortex and retina. Sci Rep. 25;9(1):15336. (2019).
84. Keuls RA., Kojima K., Lozzi B, Steele JW, Chen Q, Gross SS, Finnell RH, Parchem RJ. MiR-302 Regulates Glycolysis to Control Cell-Cycle during Neural Tube Closure. Int J Mol Sci. 13;21(20):7534. (2020).
85. 85.Antonaci M., Wheeler GN. MicroRNAs in neural crest development and neurocristopathies. Biochem Soc Trans. 29;50(2):965-974. (2022).
86. 86. Ahmad J, Hasnain SE, Siddiqui MA, Ahamed M, Musarrat J, Al-Khedhairy AA. MicroRNA in carcinogenesis & cancer diagnostics: a new paradigm. Indian J Med Res.;137(4):680-94. (2013).