

Investigating the Role of ACVR2A Gene Expression in Preeclamptic Placentas

Asal Honarpour¹, Ahmad Majd^{2*}, Reza Mirfakhraie³, Sayedhamid Jamaldini⁴, Maryam Rahim⁵, Sina Saliminasab⁶

1. Department of Genetics, North Tehran Branch, Iran Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Biology, North Tehran Branch, Iran Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. Departments of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4. Medical Genomics Research Center, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
5. Department of Gynecology and Obstetrics, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
6. Department of Plastic and Reconstructive Surgery, 15th Khordad Hospital, Tehran, Iran.

Received: August 10, 2024; Accepted: October 28, 2024

Abstract

Background and Aim: Preeclampsia is a significant condition during pregnancy, and if left untreated, it increases the risk of maternal and fetal mortality. Abnormal placentation is widely recognized as the primary cause of this disorder. Increased expression of Activin A, which plays a crucial role in placental and fetal development, has been confirmed in patients with preeclampsia. However, the mechanism of action of the Activin A receptor (ACVR2A) remains unclear. Therefore, this study examined the expression of the ACVR2A gene in the placentas of women with preeclampsia compared to those of healthy pregnant women.

Methods: In this case- control study, the expression of the ACVR2A gene in 40 placental samples, including 20 from women with preeclampsia and 20 from healthy pregnant women, was analyzed using quantitative Real- Time PCR (qPCR). The expression changes between the two groups were assessed with REST software, and the expression variation charts were plotted using T-test and Mann- Whitney statistical tests in GraphPad Prism software.

Results: increased expression of the ACVR2A gene was observed in the placentas of women with preeclampsia compared to normal placentas . The placenta in the preeclampsia group showed a 5.5-fold increase in gene expression compared to the control group.

Conclusion: It appears that the upregulation of ACVR2A gene expression plays a role in the development of preeclampsia.

Keywords: Preeclampsia; ACVR2A gene; expression; placenta; pregnancy; hypertension

Please cite this article as: Honarpour A, Majd A, Mirfakhraie R, Jamaldini S, Rahim M, Saliminasab S. Investigating the Role of ACVR2A Gene Expression in Preeclamptic Placentas. *Pejouhesh dar Pezeshki*. 2024;48(3):1-8.

*Corresponding Author: Ahmad Majd; Email: Ahmad_majd2005@yahoo.com
Department of Biology, North Tehran Branch, Iran Islamic Azad University, Tehran, Iran.



بررسی نقش بیان ژن ACVR2A با جفت پره اکلامپسی

عسل هنرپور^۱، احمد مجد^{۲*}، رضا میرفخرایی^۳، سیدحمید جمال‌الدینی^۴، مریم رحیمی^۵، سینا سلیمی‌نسب^۶

۱- گروه زیست‌شناسی ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

۳- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۴- مرکز تحقیقات ژنومیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران.

۵- گروه زنان و زایمان دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۶- گروه جراح پلاستیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۰۷

چکیده

سابقه و هدف: پره‌اکلامپسی یکی از بیماری‌های مهم در زمان بارداری است و در صورت عدم رسیدگی، احتمال مرگ مادر و جنین افزایش می‌یابد. جفت غیرطبیعی به‌طور کلی به‌عنوان دلیل اولیه این اختلال پذیرفته شده است. افزایش بیان اکتوین A که نقش مهمی در رشد و ایجاد جفت و جنین ایفا می‌کند در بیماران پره اکلامپسی تأیید شده است، اما مکانیسم عمل گیرنده اکتوین A (ACVR2A) ناشناخته است؛ به همین دلیل در این مطالعه بیان ژن ACVR2A در جفت زنان مبتلا به پره اکلامپسی در مقایسه با جفت زنان باردار سالم بررسی شد.

روش کار: در این مطالعه مورد-شاهد، بیان ژن ACVR2A در ۴۰ نمونه جفت، شامل ۲۰ نمونه جفت از زنان باردار مبتلا به پره‌اکلامپسی و ۲۰ نمونه جفت از خانم‌های باردار سالم با استفاده از روش Q Real- Time PCR، توسط نرم‌افزار REST تغییرهای بیان بین دو گروه بررسی شد و نمودار تغییرهای بیان با استفاده از آزمون آماری T-test و Mann-Whitney در نرم‌افزار GraphPad Prism رسم شد.

یافته‌ها: افزایش بیان ژن ACVR2A در جفت زنان مبتلا به پره اکلامپسی نسبت به جفت طبیعی مشاهده شد. جفت گروه پره اکلامپسی ۵/۵ برابر افزایش بیان در مقایسه با گروه کنترل نشان داد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که افزایش بیان ژن ACVR2A با بروز پره اکلامپسی نقش دارد.

واژگان کلیدی: پره‌اکلامپسی؛ ژن ACVR2A؛ بیان؛ جفت؛ بارداری؛ فشارخون

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Honarpour A, Majd A, Mirfakhraie R, Jamaldini S, Rahim M, Saliminasab S. Investigating the Role of ACVR2A Gene Expression in Preeclamptic Placentas. *Pejouhesh dar Pezeshki*. 2024;48(3):1-8.

*نویسنده مسئول مکاتبات: احمد مجد؛ آدرس پست الکترونیکی: Ahmad_majd2005@yahoo.com

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

مقدمه

پره‌اکلامپسی (PE)^۱ یک عارضه مهم بارداری است که عمدتاً سبب آسیب به رگ‌های خونی و کلیه‌ها و همچنین صدمه‌های طولانی‌مدت می‌شود و مهم‌ترین دلیل مرگ مادر و نوزاد است (۱). بیماری پره‌اکلامپسی با درگیر کردن اندام‌های متنوع و شیوع بیش از ۵ درصد، یکی از بیماری‌های مهم در زمان بارداری است (۲). پره‌اکلامپسی به فشارخون سیستولیک ≥ 140 میلی‌متر جیوه برابر یا بالاتر و دیاستولیک ≥ 90 میلی‌متر جیوه برابر یا بالاتر همراه با پروتئینوری بعد هفته ۲۰ بارداری گفته می‌شود (۳-۶). دلیل بروز PE نامشخص است (۷) و گفته‌شده عواملی مانند اختلال در تهاجم سلولی تروفوبلاست، عملکرد غیرطبیعی سیستم ایمنی، جفت غیرطبیعی، آسیب سلول‌های اندوتلیال و فاکتورهای ژنتیکی تأثیرگذار هستند (۸-۱۰). این بیماری با خطر بالای زایمان زودرس، محدودیت رشد داخل رحمی، وزن کم نوزاد، نارس بودن نوزاد، سقط‌جنین، همراه است (۱۱) و تنها راه درمان آن خارج کردن جفت است (۶، ۱۲). بنابراین به نظر می‌رسد بررسی‌های ژنتیکی در جهت یافتن ژن‌ها و مسیرهای مؤثر در بیماری‌زایی و درک مکانیسم‌های دخیل در ایجاد پیشرفت بیماری برای تعیین پیش‌آگهی و نوع درمان بیماران بالارزش است. یکی از این مسیرها گیرنده پروتئینی ACVR2A است. ژن ACVR2A در مطالعه‌های پیشین به‌عنوان یکی از ژن‌های مهم مستعدکننده پره‌اکلامپسی از طریق مطالعه‌های GWAS شناخته‌شده است (۸، ۱۳). محل قرارگیری این ژن کروموزوم 2q22 است (۱۴، ۱۵) و گیرنده پروتئین‌های ActivinA، ActivinB و InhibinA است (۳). اکتیوین A، عضوی از خانواده TGF-B بوده و نقش مهمی در رشد و ایجاد جفت و جنین ایفا می‌کند (۳). گیرنده‌های اکتیوین A، ACVR1 و ACVR2A از همان اوایل بارداری در آندومتر، جفت، سلول‌های اندوتلیال عروقی و تروفوبلاست بیان می‌شوند (۱۶، ۱۷). مطالعه‌های مختلف نشان داده‌اند که سطح سرم مادر اکتیوین A در زنان مبتلا به پره‌اکلامپسی به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافته است (۲۰-۱۸) همچنین تغییر بیان اکتیوین A در

آماده‌سازی و حمایت از بارداری سالم تأیید شده است. از آنجاکه جفت منبع اصلی اکتیوین در بارداری طبیعی است بنابراین می‌توان گفت تغییر در بیان ACVR2A می‌تواند آثار مشابهی را مانند تغییر در بیان اکتیوین A داشته باشد (۳) و ممکن است تأثیر در تهاجم تروفوبلاست و بیماری پره‌اکلامپسی بگذارد. در مطالعه حاضر بیان گیرنده پروتئینی اکتیوین A در جفت بیماران مبتلا به پره‌اکلامپسی و جفت طبیعی بررسی شده است. مطالعه حاضر، باهدف انجام تحلیل الگوی بیان mRNA ACVR2A در بافت جفت مورد-شاهد و تأثیر آن در ریسک خطر ابتلا به PE طراحی شده است. یافته‌های این مطالعه می‌تواند منجر به شناسایی بيو مارکر یا هدف درمانی برای مدیریت و درمان بهتر PE شود. این مطالعه در سال ۱۴۰۰ در آزمایشگاه فخر رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال انجام شد.

روش کار

مطالعه مورد/شاهدی حاضر به‌طور کلی شامل ۴۰ بافت جفت، تشکیل‌شده از ۲۰ نمونه جفت بیماران PE و ۲۰ نمونه جفت زنان باردار با حاملگی طبیعی پس از زایمان از بیمارستان اکبرآبادی جمع‌آوری شد. نمونه‌برداری‌های کوچک جفت از cotyledons (بخش‌های لوبولار جفت) به عمق کمتر از ۰/۵ سانتی‌متر انجام شد، سپس تمام نمونه‌ها با محلول نرمال سالین، برای حذف ضایعات و خون شسته شد، سپس نمونه‌ها بافت در محلول RNA Later (پارس توس، ایران) تا زمان استخراج RNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جامعه مورد مطالعه

معیار ورود بیماران به مطالعه مطابق با آخرین دستورالعمل‌های کالج آمریکایی متخصصان زنان و زایمان مبنی بر تشخیص پره‌اکلامپسی، شامل فشارخون بالا (سیستولیک ≤ 140 میلی‌متر جیوه و دیاستولیک ≤ 90 میلی‌متر جیوه)، همراه پروتئینوری تعیین شد (۲۱). گروه کنترل شامل زن باردار با زایمان طبیعی یا سزارین بود که هیچ سابقه‌ای از بیماری پره‌اکلامپسی، دیابت بارداری یا سایر بیماری‌های مزمن را در برنمی‌گرفت.

^۱ preeclampsia

ملاحظات اخلاقی

این پژوهش به تأیید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال کد اخلاقی (IR.IAU.TNB.REC.1401.029) رسیده است. رضایت‌نامه کتبی آگاهانه از همه شرکت‌کنندگان گرفته شد.

استخراج RNA

نمونه‌های جفت با استفاده از محلول Trizol شرکت (GeneAll، کره) استخراج و غلظت آن توسط NanoDrop برای تعیین کیفیت کمی مشخص شد. پرایمرهای موردنیاز برای بررسی بیان با استفاده از داده پایگاه Primer-BLAST طراحی شد (۲۳) مطابق جدول ۱ سنتز cDNA با استفاده از کیت پارس توس

انجام شد. quantitative Real-time PCR به روش نسبی (relative) به شرح زیر انجام شد: Pre-incubation در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰۰ ثانیه، سپس سه مرحله denaturation در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، annealing در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و extension در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و همچنین ترکیب و مقدار مواد لازم برای انجام واکنش quantitative Real-Time PCR برای ژن ACVR2A و B2M مطابق با جدول‌های ۲ و ۳ است. در آخر تجزیه و تحلیل منحنی ذوب (Tm melting) الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد برای ارزیابی اختصاصیت محصولات PCR انجام شد.

جدول ۱- پرایمرهای طراحی شده برای انجام qRT-PCR برای ژن ACVR2 و B2M

ژن	پرایمر	توالی پرایمر	سایز محصول
B2M	F	TGTCTTTCAGCAAGGACTGGT	143bp
	R	TGCTTACATGTCTCGATCCCAC	
ACVR2A	F	TGGCCAGCATCCATCTCTTG	104bp
	R	GCATTGCCATTCCAGCATGT	

جدول ۲- ترکیب و مقدار مواد لازم برای انجام واکنش Real-Time PCR برای ژن B2M

مواد موردنیاز	غلظت و حجم
آب فاقد نوکلئاز	7 µl
Master Mix	2X, 10 µl
پرایمر Forward	10 pm, 0.5µl
پرایمر Reverse	10 pm, 0.5µl
cDNA	2µl
حجم نهایی	20 µl

جدول ۳- ترکیب و مقدار مواد لازم برای انجام واکنش Real-Time PCR برای ژن ACVR2A

مواد موردنیاز	حجم
آب فاقد نوکلئاز	6.5µl
Master Mix	2X, 10 µl
پرایمر Forward	10 pm, 0.75µl
پرایمر Reverse	10 pm, 0.75µl
cDNA	2µl
حجم نهایی	20 µl

بررسی آماری داده‌های بالینی گروه‌های مورد/ شاهد

اطلاعات موجود در پرسش‌نامه‌های افراد بیمار و سالم موجود در مطالعه حاضر شامل اطلاعات مادر است. از جمله این اطلاعات سن مادر، BMI مادر، فشارخون سیستولی و فشارخون دیاستولی مادر، سابقه خانوادگی فشارخون و نوع زایمان است. این اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار Graphpad (Prism) مورد آنالیز قرار گرفتند. در ابتدا توزیع نرمال داده‌ها بررسی شد و در ادامه باتوجه به نرمال بودن یا نبودن توزیع داده‌ها (پارامتریک و نان پارامتریک) در هر یک از موارد مذکور، اطلاعات دموگرافیک نمونه‌های بیمار و سالم با استفاده از آزمون آماری T-test یا Mann-Whitney مورد مقایسه قرار گرفتند. P-value معنادار کمتر از ۵ درصد در نظر گرفته شد.

بررسی آماری داده‌های Real-Time PCR

داده‌های حاصل از RT-PCR توسط نرم‌افزار LinReg نرمال

شد، سپس داده‌های نرمال شده توسط نرم‌افزار REST نسخه ۲۰۰۹ به روش نسبی بررسی شد و نمودار مقایسه تغییرهای بیان با استفاده از آزمون آماری Mann-Whitney (nonparametric) در نرم‌افزار GraphPad Prism رسم شد. مقادیر کمتر از ۵ درصد معنادار، در نظر گرفته شد.

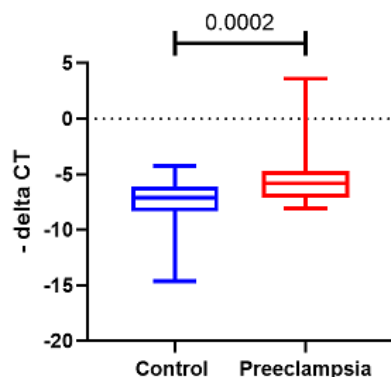
یافته‌ها

اطلاعات دموگرافیک و بالینی بیماران PE و افراد کنترل در جدول ۴ ارائه شده است. همان‌طور که انتظار می‌رفت مقادیر فشارخون سیستولیک و دیاستولیک در بیماران PE در مقایسه با گروه کنترل به‌طور قابل‌توجهی بالاتر بود ($P\text{-value} < 0.0001$). شاخص توده بدنی (BMI) نیز به‌طور قابل‌توجهی در بیماران PE بالاتر از گروه کنترل بود ($P\text{-value} < 0.0001$).

جدول ۴- اطلاعات بالینی بیماران PE و افراد کنترل

متغیرها	means $\pm$ SD کنترل	means $\pm$ SD بیمار	P-value
سن مادر	۲۹/۹ ($\pm 5/7$)	۳۰/۵ ($\pm 5/5$)	۰/۷۳۳۰
سن حاملگی هنگام زایمان، هفته	۳۷/۸ ($\pm 2/5$)	۳۴/۲ ($\pm 5/0$)	۰/۰۰۱۴
mmHg فشارخون سیستولیک	۱۱/۲ ($\pm 0/8$)	۱۴/۶ ($\pm 1/1$)	<۰۰۰۱*
mmHg فشارخون دیاستولیک	۶/۶ ($\pm 0/8$)	۸/۶۴ ($\pm 1/8$)	<۰۰۰۱*
شاخص توده بدنی	۲۳/۳ ($\pm 3/2$)	۲۸/۹ ($\pm 5/0$)	۰/۰۰۰۱*

برای متغیرهای پیوسته، میانگین ($\pm$ SD) برآورد شد. برای مقایسه میانگین توزیع متغیرهای از آزمون t-test استفاده شد.



نمودار ۱- بیان ژن ACVR2A در جفت گروه پره‌اکلامپسی در مقایسه با گروه کنترل افزایش بیان نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از نرم‌افزار REST حاکی از آن است که بیان ژن ACVR2A در جفت گروه پره‌اکلامپسی ۵/۵ برابر افزایش در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. P-value نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار prism توسط آزمون آماری Mann-Whitney معادل ۰.۰۰۰۲ (P-value 0.0002) است. مطابق با نمودار ۱.

بحث

در مطالعه حاضر ژن ACVR2A افزایش بیان در بافت جفت PE نسبت به افراد سالم نشان داد. این نتیجه همسو با مطالعه Bai است که به افزایش بیان ژن ACVR2A در بیماران PE و نقش ژن مذکور در ایجاد بیماری PE اشاره دارد (۲۵). نتایج مطالعه‌های پیشین در زمینه بررسی ارتباط بیان ژن ACVR2A با بیماری PE متفاوت بوده است و مطالعه‌های معدودی بیان این ژن را در سطح mRNA یا پروتئین بررسی کرده‌اند. در سال ۲۰۰۱ Manuelpilla و همکاران کاهش بیان ژن ACVR2A را در گروه PE مشاهده کردند و برای نخستین بار لوکالیزیشن پروتئین‌های گیرنده اکتیوین نوع I و II را در جفت و غشای جنین گزارش کردند (۱۸). Moses همکارانش نیز کاهش بیان ژن ACVR2A را دریافت دسیدوا گزارش کردند (۳). Casagerandi و همکارانش تغییری در بیان ژن مذکور در بافت جفت مشاهده نکردند (۲۶). Yong و همکارانش بیان ژن ACVR1 را در حاملگی طبیعی و (SPE) Sever preeclampsia بررسی کردند. نتایج نشان داد ژن گیرنده اکتوین ACVR1 افزایش بیان ۲۲/۹ برابری در بیماران SPE پیدا کرده است (۲۷). افزایش سطح بیان mRNA ACVR1، بیماران SPE با دو ژن گیرنده اکتیوین دیگر، ACVR1C و ACVR2A که قبلاً در SPE کاهش یافته بود، در تضاد است (۳). به نظر می‌رسد که افزایش بیان ACVR1 می‌تواند یک مکانیسم جبرانی برای مقابله با کاهش بیان ACVR1C و ACVR2A باشد (۲۷). این مشاهدات نشان می‌دهد که بیان کافی ACVR2A در عملکرد بهتر دسیدوا برای بارداری نقش دارد. در مقابل، اختلال بیان ACVR2A ممکن است منجر به decidualisation کمتر از حد مطلوب شود و به ایجاد پره‌اکلامپسی کمک کند. همچنین مطالعه‌های in vitro نشان داد کاهش بیان ACVR2A می‌تواند منجر به تکثیر و نفوذپذیری اندوتلیال عروقی ناکارآمد شود (۲۸).

نقش ACVR2A در پاتوفیزیولوژی PE توسط مطالعه‌های MicroRNA جفت اثبات شده است مطالعه اخیر نشان داد که miR-195، microRNA با اتصال به ناحیه 3'-UTR ترجمه این mRNA را مهار می‌کند. کاهش سطح miR-195 در جفت بیماران مبتلا به پره‌اکلامپسی منجر به افزایش بیان پروتئین ACVR2A می‌شود. افزایش بیان ACVR2A به‌نوبه خود با مهار تهاجم سلولی تروفوبلاست و ایجاد

اختلال در شکل‌گیری عروق جفتی مرتبط است. این یافته‌ها نشان می‌دهند که محور miR-195/ ACVR2A می‌تواند یک هدف درمانی بالقوه برای پیشگیری و درمان پره‌اکلامپسی باشد (۲۵).

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر حاکی از آن است که بیان ژن ACVR2A در جفت زنان مبتلا به پره‌اکلامپسی متفاوت از زنان با بارداری سالم است. همچنین افزایش بیان ژن ACVR2A در جفت زنان مبتلا به پره‌اکلامپسی، ممکن است به‌عنوان یک مکانیسم جبرانی برای مقابله با اختلال‌های ایجادشده در جفت در نظر گرفته شود. با این حال، مکانیسم دقیق این افزایش بیان و نقش آن در پاتوفیزیولوژی پره‌اکلامپسی هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است. یکی دیگر از یافته‌های مهم و با ارزش مطالعه حاضر این بود که در گروه شاهد variation این ژن تمایل زیادی به سمت پایین میانگین دارد و برعکس در گروه مورد تمایل زیادی نسبت به بالا دارد. از سوی دیگر، نتایج مطالعه‌ها در مورد نقش ژن ACVR2A در پره‌اکلامپسی متناقض بوده است، برخی مطالعه‌ها کاهش بیان این ژن را در جفت پره‌اکلامپسی و برخی دیگر افزایش بیان ژن ACVR2A را در جفت پره‌اکلامپسی گزارش کرده‌اند و می‌توان عنوان کرد با توجه به اینکه بیان ژن در قسمت‌های مختلف جفت متفاوت است (۱۰، ۲۹) نمونه‌برداری از مناطق مختلف جفت می‌تواند بر نتایج تأثیرگذار باشد. با این حال برای درک بهتر نقش این ژن در پره‌اکلامپسی، نیاز به انجام مطالعه‌های بیشتر است.

ملاحظات اخلاقی

این پژوهش به تأیید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال کد اخلاقی (IR.IAU.TNB.REC.1401.029) رسیده است. رضایت‌نامه کتبی آگاهانه از همه شرکت‌کنندگان گرفته شد.

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافی را گزارش نکرده‌اند.

References

1. Phipps E, Prasanna D, Brima W, Jim B. Preeclampsia: Updates in Pathogenesis, Definitions, and Guidelines. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016;11(6):1102-13.
2. Fitzpatrick E, Johnson MP, Dyer TD, Forrest S, Elliott K, Blangero J, et al. Genetic association of the activin A receptor gene (ACVR2A) and pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod*. 2009;15(3):195-204.
3. Moses EK, Fitzpatrick E, Freed KA, Dyer TD, Forrest S, Elliott K, et al. Objective prioritization of positional candidate genes at a quantitative trait locus for pre-eclampsia on 2q22. *Mol Hum Reprod*. 2006;12(8):505-12.
4. Mendelova A, Holubekova V, Grendar M, Zubor P, Svecova I, Loderer D, et al. Association between 3'UTR polymorphisms in genes ACVR2A, AGTR1 and RGS2 and preeclampsia. *Gen Physiol Biophys*. 2018;37(2):185-92.
5. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*. 2005;308(5728):1592-4.
6. Admati I, Skarbianskis N, Hochgerner H, Ophir O, Weiner Z, Yagel S, et al. Two distinct molecular faces of preeclampsia revealed by single-cell transcriptomics. *Med*. 2023;4(10):687-709.e7.
7. Rana S, Lemoine E, Granger JP, Karumanchi SA. Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives. *Circ Res*. 2019;124(7):1094-112.
8. Yong HEJ, Murthi P, Brennecke SP, Moses EK. Genetic Approaches in Preeclampsia. *Methods Mol Biol*. 2018;1710:53-72.
9. Yong HEJ, Murthi P, Kalionis B, Keogh RJ, Brennecke SP. Decidual ACVR2A regulates extravillous trophoblast functions of adhesion, proliferation, migration and invasion in vitro. *Pregnancy Hypertens*. 2018;12:189-93.
10. Amin-Beidokhti M, Sadeghi H, Pirjani R, Gachkar L, Gholami M, Mirfakhraie R. Differential expression of Hsa-miR-517a/b in placental tissue may contribute to the pathogenesis of preeclampsia. *J Turk Ger Gynecol Assoc*. 2021;22(4):273.
11. Ashraf UM, Hall DL, Rawls AZ, Alexander BT. Epigenetic processes during preeclampsia and effects on fetal development and chronic health. *Clin Sci (Lond)*. 2021;135(19):2307-27.
12. Azimi-Nezhad M, Teymoori A, Ebrahimzadeh-Vesal R. Association of CYP11B2 gene polymorphism with preeclampsia in north east of Iran (Khorasan province). *Gene*. 2020;733:144358.
13. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K. [Genetic background of preeclampsia]. *Ginek Pol*. 2007;78(10):802-6.
14. Amosco MD, Tavera GR, Villar VAM, Naniong JMA, David-Bustamante LMG, Williams SM, et al. Non-additive effects of ACVR2A in preeclampsia in a Philippine population. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2019;19(1):11.
15. Thulluru HK, Michel OJ, Oudejans CB, van Dijk M. ACVR2A promoter polymorphism rs1424954 in the Activin-A signaling pathway in trophoblasts. *Placenta*. 2015;36(4):345-9.
16. Lokki AI, Klemetti MM, Heino S, Hiltunen L, Heinonen S, Laivuori H. Association of the rs1424954 polymorphism of the ACVR2A gene with the risk of pre-eclampsia is not replicated in a Finnish study population. *BMC Res Notes*. 2011;4:545.
17. Glotov AS, Kazakov SV, Vashukova ES, Pakin VS, Danilova MM, Nasykhova YA, et al. Targeted sequencing analysis of ACVR2A gene identifies novel risk variants associated with preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2019;32(17):2790-6.
18. Manuelpillai U, Schneider-Kolsky M, Dole A, Wallace EM. Activin A and activin receptors in gestational tissue from preeclamptic pregnancies. *J Endocrinol*. 2001;171(1):57-64.
19. D'Antona D, Reis FM, Benedetto C, Evans LW, Groome NP, de Kretser DM, et al. Increased maternal serum activin A but not follistatin levels in pregnant women with hypertensive disorders. *J Endocrinol*. 2000;165(1):157-62.
20. Muttukrishna S, Knight PG, Groome NP, Redman CW, Ledger WL. Activin A and inhibin A as possible endocrine markers for pre-eclampsia. *Lancet*. 1997;349(9061):1285-8.
21. Gestational Hypertension and Preeclampsia: ACOG Practice Bulletin, Number 222. *Obstet Gynecol*. 2020;135(6):e237-e60.
22. Libus J, Storchová H. Quantification of cDNA generated by reverse transcription of total RNA provides a simple alternative tool for quantitative RT-PCR normalization. *Biotechniques*. 2006;41(2):156, 8, 60 passim.
23. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:134.

24. Song X, Luo X, Gao Q, Wang Y, Gao Q, Long W. Dysregulation of LncRNAs in placenta and pathogenesis of preeclampsia. *Current Drug Targets*. 2017;18(10):1165-70.
25. Bai Y, Yang W, Yang HX, Liao Q, Ye G, Fu G, et al. Downregulated miR-195 detected in preeclamptic placenta affects trophoblast cell invasion via modulating ActRIIA expression. *PLoS One*. 2012;7(6):e38875.
26. Casagrandi D, Bearfield C, Geary J, Redman CW, Muttukrishna S. Inhibin, activin, follistatin, activin receptors and beta-glycan gene expression in the placental tissue of patients with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod*. 2003;9(4):199-203.
27. Yong HE, Murthi P, Borg A, Kalionis B, Moses EK, Brennecke SP, et al. Increased decidual mRNA expression levels of candidate maternal pre-eclampsia susceptibility genes are associated with clinical severity. *Placenta*. 2014;35(2):117-24.
28. Brennecke S, Yong H, Murthi P, Kalionis B, Cartwright J, Keogh R. 52 Altered ACVR2A expression modifies the response of vascular endothelial cells to normotensive and preeclamptic activin concentrations: Endothelial dysfunction, anti-angiogenic factors. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*. 2016;6(3):161.
29. Sahay AS, Jadhav AT, Sundrani DP, Wagh GN, Mehendale SS, Chavan-Gautam P, et al. VEGF and VEGFR1 levels in different regions of the normal and preeclampsia placentae. *Mol Cell Biochem*. 2018;438(1-2):141-52.