

مقایسه مطالعه ارتباط پلی مورفیسم ژن ESR-β در زنان نابارور ایرانی

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۱۰

خلاصه

مقدمه

ناباروری یک بیماری است، هورمون استروژن یکی از هورمون هایی است که نقش مهمی در باروری ایفا می کند. گیرنده استروژن بتا توسط ژن ESR2 کد می شود. انتظار می رود تغییرات ژنتیکی در ژن گیرنده استروژن موجب ناباروری گردد. از این رو این مطالعه با هدف بررسی پلی مورفیسم ژن ESR-β در ناباروری زنان ایرانی انجام شده است.

روش کار

در این مطالعه مورد شاهدهی که در آزمایشگاه های طبی تهران در سال ۱۳۹۴ انجام شده است، از ۵۰ زن نابارور و ۸۰ زن سالم به عنوان کنترل، نمونه خون تهیه شد. بعد از استخراج DNA، جهت تعیین پلی مورفیسم ژن ESR-β، روش PCR-RFLP با آنزیم Rsa1 مورد استفاده قرار گرفت. جهت تعیین معنادار بودن تفاوت ژنوتیپ ها در دو گروه بیمار و کنترل از آزمون کای مربع استفاده شد.

نتایج

فراوانی آللهای A و G در افراد نابارور و سالم، $P=0/5$ بود. که اختلاف معناداری در فراوانی اللی بین افراد نابارور و سالم به دست نیامد. افراد نابارور با فراوانی ژنوتیپ AA و GG $P=0/8$ ارتباط معناداری با بیماری ناباروری نشان ندادند. اما بیمارانی با ژنوتیپ هتروزیگوت AG $P=0/01$ افزایش معناداری با بیماری نشان دادند.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر بیانگر شواهدی مبنی بر همراهی پلی مورفیسم ژن گیرنده استروژن بتا در افرادی با ژنوتیپ AG و ناباروری می باشد.

کلمات کلیدی: استروژن، پلی مورفیسم، ناباروری، PCR-RFLP

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می باشد.

^۱ سوبار ساری*
^۲ گلنار ساری

۱- استادیار، دکتری تخصصی زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه آموزشی علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوریهای نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- کارشناسی ارشد، مهندسی شیمی، گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی واحد تهران مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* تهران - گروه آموزشی علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوریهای نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی
تلفن: ۰۹۱۲۵۸۷۸۱۶۹

Email: sari.s@iaups.ac.ir

مقدمه

ناباروری به ناتوانی زوجین در باروری پس از گذشت یک سال از مقاربت‌های منظم و بدون استفاده از روش‌های پیش‌گیری از بارداری گفته می‌شود (۱،۲). از دلایل عمده ناباروری می‌توان به ناهنجاری‌های ژنتیکی و عوامل محیطی و اختلال در عملکرد هورمونهای جنسی اشاره کرد (۳،۴). استروژن یکی از هورمونهای جنسی می‌باشد که اختلال در ژن کد کننده گیرنده آن می‌تواند باعث ناباروری گردد. گیرنده استروژن بتا (ER-B) یکی از ایزوفرم‌های گیرنده استروژن است. که توسط ژن ESR2 (گیرنده استروژن ۲) کد می‌شود (۵-۷). این ژن روی بازوی بلند کروموزوم ۱۴ واقع شده و ۱۸ اگزون دارد (۸-۱۰). عملکرد هورمون استروژن از طریق اتصال به گیرنده خود می‌باشد در نتیجه هر گونه تغییر در ژن کد کننده گیرنده بتا می‌تواند باعث عدم عملکرد هورمون استروژن و در نهایت منجر به ناباروری شود (۱۱-۱۳). اهمیت این بررسی و توجه ما به پلی‌مورفیسم ژن رسپتور استروژن بتا از یک سو معطوف به نقش مهم آن در ایجاد بیماریهای زنان در ایران، و همچنین عدم وجود مطالعاتی همانند تحقیق حاضر در خصوص ارتباط پلی‌مورفیسم ژن استروژن رسپتور بتا با ناباروری زنان در کشور ضرورت انجام این تحقیق را افزون کرده است. لذا هدف از تحقیق حاضر بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم ژن استروژن رسپتور بتا با ناباروری در زنان ایرانی است.

روش کار

در این مطالعه مورد-شاهدی، ۱۳۰ خانم ایرانی شامل ۵۰ خانم نابارور که فاقد فرزند بوده و پس از گذشت یک سال از مقاربت‌های منظم و بدون استفاده از روش‌های پیش‌گیری قادر به باروری نبودند و ۸۰ خانم به عنوان کنترل سالم با حداقل سابقه یک فرزند که نمونه‌های خون آنها در سال ۱۳۹۴ در آزمایشگاههای تشخیص طبی در شهر تهران که کاملاً مجهز به تکنیک ملکولی بودند، مورد بررسی قرار گرفت. همچنین سطح هورمون محرک فولیکول (FSH^۱) بیماران توسط chemiluminescent اندازه‌گیری شد. مبنای اندازه‌گیری

هورمون محرک فولیکول به دلیل این است که این هورمون ضروری برای فعالیت طبیعی گنادهاست و برای صحت عملکرد گنادها اندازه‌گیری این هورمون انجام گرفت. پس از دادن آگاهی و کسب رضایت نامه، ۴ میلی لیتر خون محیطی از افراد مورد مطالعه در لوله‌های حاوی EDTA گرفته شد. استخراج DNA با روش نمک زدن صورت گرفت. DNA استخراج شده تا زمان تحلیل در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۴،۱۵).

تعیین ژنوتیپ ERB

پلی‌مورفیسم (G>A ۱۰۸۲) در ژن گیرنده استروژن بتا به وسیله واکنش زنجیره پلیمرز (PCR^۲) و هضم آنزیم محدودگر RsaI rs=۱۲۵۶۰۴۹ مشخص شد. واکنش زنجیره پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط واکنش زنجیره پلیمرز (Master mix PCR)، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر پیشرو و پیرو و ۲ میکرولیتر از DNA الگو صورت گرفت. تکثیر در ۳۰ سیکل و تحت دماهای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و طویل سازی نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. محصولات واکنش زنجیره پلیمرز به وسیله آنزیم محدود کننده RsaI در دمای ۳۷ درجه هضم شدند و سپس به وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۲٪ جدا شدند (جدول ۱ توالی پرایمر نشان داده شده است) (۱۶). تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد جهت تعیین معنی دار بودن ژنوتیپ‌ها در ۲ گروه بیمار و سالم از آزمون کای مربع استفاده شد در این آزمون $P < 0.05$ نشان دهنده معنی دار بودن تفاوت ژنوتیپی بین گروهها در نظر گرفته شد.

نتایج

در این مطالعه ۱۳۰ نفر شامل ۵۰ نفر زن مبتلا به ناباروری و

² Polymerase chain reaction¹ Follicle-Stimulating Hormone

جدول ۱- والی پرایمرها و آنزیم محدودگر

آنزیم محدودگر	توالی پرایمر	هضم آنزیم (bp)
RsaI	F:5'-TCTTGCTTTCCCCAGGCTTT-3' R:5'-ACCTGTCCAGACAAGATCT-3'	G=۱۵۶ A=۱۲۵+۳۱

محصول این ژن ایزوفرم B از ایزوفرم های معروف گیرنده های استروژن است. (۲۲-۲۴). در مطالعه ای لیاکات^۲ و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی ۷۴ زن نابارور و ۵۰ زن سالم در کشور پاکستان آنالیزهای ملکولی برای شناسایی پلی مورفیسم در ژن ESR2 برای هر دو گروه انجام شد. اما هیچ پلی مورفیسمی شناسایی نشد. تمام افراد مورد مطالعه برای ال GG هموزیگوت بودند. که این نشان دهنده عدم وجود پلی مورفیسم در جمعیت مورد مطالعه بود (۲۵). در مطالعه حاضر ارتباط بین سن و سطح سرمی هورمون محرک فولیکول بیماران و افراد سالم محاسبه شد. اما هیچ ارتباطی بین سن بیماران و سطح اندوکراین آنها یافت نشد. که می توان بیان کرد که سطح گنادوتروپین ها رابطه مستقیمی با ناباروری ندارند. تاکنون هیچ مطالعه ای در مورد رابطه بین پلی مورفیسم ژن ESR2 در زنان ایرانی نابارور انجام نشده است. لذا در این مطالعه برای نخستین بار به بررسی تاثیر پلی مورفیسم ژن ESR2 در ناباروری زنان ایرانی پرداخته شده است با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه که بر روی ۵۰ زن نابارور و ۸۰ زن سالم به عنوان کنترل صورت گرفت، می توان گفت به احتمال زیاد ژنوتیپ های AG پلی مورفیسم ژن ESR2 می تواند در استعداد ابتلای به ناباروری در زنان موثر باشد. ناباروری یک بیماری مولتی فاکتوریال می باشد از این رو لازم است که نقش سایر عوامل ژنتیکی در بروز ناباروری بررسی شود.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش حاکی از ارتباط پلی مورفیسم ESR2 با ناباروری زنان می باشد. (P=۰/۰۰۱) و افراد دارای ژنوتیپ AG احتمالاً بیشتر به ناباروری مبتلا می شوند.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر نتیجه حمایت مالی نویسندگان می باشد و از همکاری

۸۰ زن سالم به عنوان کنترل بررسی شدند. جهت تعیین پلی مورفیسم از روش پلی مورفیسم قطعات طولی محدود (RFLP^۱) استفاده گردید و سپس نتایج به دست آمده با ژل آگارز ۲٪ بررسی شد.

بررسی پلی مورفیسم ESRB G>A انحراف از تعادل هاردی - واینبرگ را برای هر دو گروه بیمار $x^2=28/32$ و $P<0/001$ گروه سالم $x^2=11/59$ و $P=0/02$ را نشان داد. بر طبق نتایج حاصل از این مطالعه، تفاوت معناداری در فراوانی ال A و ال G $P=0/5$ بین دو گروه زنان نابارور و گروه زنان سالم یافت نشد. افراد نابارور با فراوانی ژنوتیپ AA و GG ارتباط معناداری با بیماری ناباروری نشان ندادند ($P=0/8$). اما بیمارانی با ژنوتیپ هتروزیگوت AG افزایش معناداری با بیماری نشان دادند ($P=0/001$). و این در حالی است که افراد نابارور با ژنوتیپ AG، با افراد سالم با ژنوتیپ هموزیگوت AA و هموزیگوت GG مقایسه شده بودند و همچنین ارتباطی بین سن بیماران و سطح سرمی هورمون محرک فولیکول مشاهده نشد.

بحث

در مطالعه حاضر ارتباط پلی مورفیسم ژن ESRB با ناباروری در زنان ایرانی مورد بررسی قرار گرفت. بر طبق نتایج حاصل از این مطالعه، بین فراوانی ژنوتیپی AG، با ناباروری زنان ارتباط معناداری وجود دارد ($P=0/001$). و افراد با ژنوتیپ AG احتمال بیشتری برای ابتلا به ناباروری دارند. امروزه مطالعه مباحث ملکولی گیرنده های استروئیدی به عنوان یکی از مباحث مهم مطرح است (۱۷-۱۹). در این مطالعه پلی مورفیسم در ژن ESR2 و ارتباط آن با ناباروری زنان مورد مطالعه قرار گرفت. این ژن روی بازوی بلند کروموزوم ۱۴ قرار دارد. و حاوی ۸ اگزون است (۲۰، ۲۱).

² Liaqat¹ Restriction Fragment Length Polymorphism

کلیه بیماران و افراد سالم داوطلب، شرکت کننده در این مطالعه به دلیل همکاری های لازم برای اجرای این طرح قدردانی می گردد.

References

- Guo R, Zheng N, Ding S, Zheng Y, Feng L. Associations between estrogen receptor-beta polymorphisms and endometriosis risk. *Diagn Pathol* 2014; 26:184.
- Mahdavi-pour M, Rajaei F, Idali F, Zarei S, Talebi S, Fatemi R, *et al.* Investigation on estrogen receptor alpha gene polymorphisms in Iranian women with recurrent pregnancy loss. *Iran J Reprod Med* 2014; 12:395-400.
- Jodeiry S, Vaziri H, Zahiri Z. Analysis of ESR1 rs104893956 Polymorphism with Infertility in Guilanian. *Arak Med Univ J (AMUJ)* 2016; 18:19-26.
- Kumar R, Zakharov MN, Khan SH, Miki R, Jang H, Toraldo G, *et al.* The dynamic structure of the estrogen receptor. *J Amino Acids* 2011; 2011:1-7.
- Lee HR, Kim TH, Choi KC. Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ESR- α and ESR- β , identified by estrogen receptor knockout mouse. *Lab Anim Res* 2012; 28:71-76.
- WeiDU J, RongTao X, Yixu K, Lanqi X. Polymorphisms in estrogen receptor α are associated with idiopathic female infertility. *Mol Med Rep* 2011; 4:1239-1242.
- Osz J, Brélivet Y, Peluso-Iltis C, Cura V, Eiler S, Ruff M, *et al.* Structural basis for a molecular allosteric control mechanism of cofactor binding to nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci* 2012; 109:588-594.
- Anousha N, Hossein-Nezhad A, Biramijamal F, Rahmani A, Maghbooli Z, Aghababaei E, *et al.* Association study of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with spontaneous abortion: is this a possible reason for unexplained spontaneous abortion?. *Biomed Res Int* 2013; 2013:1-7.
- Quaynor SD, Stradtman EW, Kim HG, Shen Y, Chorich L, Schreihof D. Delayed puberty and estrogen resistance in a woman with estrogen receptor α variant. *N Engl J Med* 2013; 369:164-171.
- Liu L, Tan R, Cui Y, Liu J, Wu J. Estrogen receptor α gene (ESR1) polymorphisms associated with idiopathic premature ovarian failure in Chinese women. *Gynecol Endocrinol* 2013; 29:182-185.
- Wasiu O, Adebayo A, Taiwo B. A review of female infertility: important Etiological factors and management. *J Microbiol Biotech Res* 2012; 2:379-385.
- Zulli K, Bianco B, Mafra FA, Teles JS, Christofolini DM, Barbosa CP. Polymorphism of the estrogen receptor beta gene is related to infertility and infertility-associated endometriosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2010; 54:567-571.
- Pineda B, Hermenegildo C, Tarin JJ, Laporta P, Cano A, Garcia-Perez MA. Alleles and haplotypes of the estrogen receptor alpha gene are associated with an increased risk of spontaneous abortion. *Fertil Steril* 2010; 93:1809-1815.
- Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S. Association of polymorphisms in the estrogen receptors alpha, and beta (ESR1, ESR2) with the occurrence of male infertility and semen parameters. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 122:193-203.
- Zulli K, Bianco B, Mafra FA, Teles J, Christofolini D, Barbosa C. Polymorphism of the estrogen receptor β gene is related to infertility and infertility associated endometriosis. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2010; 54:567-571.
- Lee GH, Kim SH, Choi YM, Suh CS, Kim JG, Moon SY. Estrogen receptor beta gene +1730 G/A polymorphism in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2007; 88:785-788.
- Christofolini DM, Vilarino FL, Mafra FA, André GM, Bianco B, Barbosa CP. Combination of polymorphisms in luteinizing hormone β , estrogen receptor β and progesterone receptor and susceptibility to infertility and endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; 158:260-264.
- Wu CH, Yang JG, Chang YJ, Hsu CC, Kuo PL. Screening of a panel of steroid-related genes showed polymorphisms of aromatase genes confer susceptibility to advanced stage endometriosis in the Taiwanese Han population. *Taiwanese J Obstet Gynecol* 2013; 52:485-492.
- Silva RC, Costa IR, Bordin BM, Silva CT, Souza SR, Júnior CL, *et al.* RsaI polymorphism of the ER β gene in women with endometriosis. *Genet Mol Res* 2011; 10:465-470.
- Ge YZ, Xu LW, Jia RP, Xu Z, Li WC, Wu R, *et al.* Association of polymorphisms in estrogen receptors (ESR1 and ESR2) with male infertility: a meta-analysis and systematic review. *J Assist Reprod Genet* 2014; 31:601-611.
- Gao Z, Fu HJ, Xue JJ, Wu ZX, Zhao LB. Genetic polymorphisms in VDR, ESR1 and ESR2 genes may contribute to susceptibility to Parkinson's disease: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2014; 41:4463-4474.
- Kerkhof HJ, Meulenbelt I, Carr A, Gonzalez A, Hart D, Hofman A, *et al.* Common genetic variation in the Estrogen Receptor Beta (ESR2) gene and osteoarthritis: results of a meta-analysis. *BMC Med Genet* 2010; 16:164.
- Yu KD, Rao NY, Chen AX, Fan L, Yang C, Shao ZM. A systematic review of The relationship between polymorphic sites in the estrogen receptor-beta (ESR2) gene and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 126:37-45.
- Guo R, Zheng N, Ding S, Zheng Y, Feng L. Associations between estrogen receptor - beta polymorphisms and endometriosis risk a meta - analysis. *Diagn Pathol* 2014; 9:184.
- Liaqat S, Hasnain SH, Muzammil Sa, Hayat Su. Polymorphism analysis in estrogen receptors alpha and beta genes and their association with infertile population in Pakistan. *Excli J* 2015; 14:1085-1094.

Original Article

Association of estrogen receptor-β Gene polymorphism with infertility in Iranian women

Received: 10 Jul 2016 - Accepted: 31 Aug 2016

¹ Soyar Sari*

² Golnar Sari

1- Department of Molecular and Cellular Sciences, Faculty of Advanced Sciences & Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (IAUPS)

2- Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, central Tehran Branch Islamic Azad University, Tehran, Iran

* Department of Molecular and Cellular Sciences, Faculty of Advanced Sciences & Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (IAUPS)
Tel: 09125878169
Email: sari.s@iaups.ac.ir

Abstract

Introduction: Infertility is a disease. Estrogen is a hormone that plays an important role in the fertility. Estrogen receptor beta gene codes ESR2. expected that some genetic variations in estrogen receptor Infertility can be caused. The aim of the present study was to investigate the association between ESR-β gene polymorphism and infertility in Iranian women.

Methods: In this study blood samples were collected from 50 infertile women and 80 healthy women and genomic DNA was extracted. PCR-RFLP method with RsaI was used to identify in ESR-β gene. In addition, Allelic compounds and allele frequency in the population were determined, and the relationship between the polymorphisms and infertility in the population were examined using the chi-square test.

Results: The results of this study indicated that there was no significant difference in the frequency of alleles A and G ($P=0/5$) between infertile and healthy women. Infertile patients with genotypes of AA and GG ($P=0/8$) did not show any significant association with infertility. However, the patients with AG genotype ($P=0/001$) demonstrated a strong association with the risk of infertility.

Conclusion: Our findings indicated that ESR-β gene polymorphism are more likely related to women with AG genotype as well as with infertility.

Key words: Estrogen, Infertility, Polymorphism, PCR-RFLP

Acknowledgement: There is no conflict of interest