

# بررسی ارتباط پلی مورفیسم ژن گیرنده استروژن آلفا با پاسخ تخمدان به تحریک تخمک گذاری در زنان تحت درمان IVF

محمد حسن شیخها (M.D., Ph.D.)<sup>۱</sup>، سید مهدی کلانتر (Ph.D.)<sup>۱</sup>، عباس افلاطونیان (M.D.)<sup>۲</sup>

۱- گروه ژنتیک، مرکز تحقیقاتی-درمانی ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.

۲- گروه زنان و زایمان، مرکز تحقیقاتی-درمانی ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.

## چکیده

**زمینه و هدف:** استروژن به عنوان یکی از مهمترین هورمون‌های جنسی زنانه در سیکل باروری نقش مهمی داشته و فعالیت آن در بافت‌های هدف از طریق گیرنده‌های استروژن تنظیم می‌شود. انواع مختلفی از پلی‌مورفیسم ژن گیرنده استروژن آلفا در رابطه با وضعیت‌های متعدد پاتولوژیک شناسایی شده است. در این تحقیق فرضیه ارتباط پلی‌مورفیسم ژن گیرنده استروژن آلفا با پاسخ تخمدان به تحریک تخمک‌گذاری در زنان نابارور تحت درمان IVF مورد بررسی قرار گرفت.

**روش بررسی:** انواع ژنوتیپ ژن گیرنده استروژن آلفا در ۱۰۲ زن نابارور کاندیدای IVF شناسایی و ارتباط آن با فاکتورهای مشخص‌کننده پاسخ تخمدان به تحریک تخمک‌گذاری مانند میانگین تعداد فولیکول و تخمک، نسبت فولیکول به تخمک، میزان استروژن سرم و همچنین تعداد جنین‌های بدست آمده سنجیده شد. در هر بیمار برای ژن گیرنده استروژن آلفا، ژنوتیپ‌های PP، Pp و pp با استفاده از تکنیک PCR-RFLP مشخص گردید و تحلیل آماری با استفاده از آزمون  $\chi^2$ ، کروسکال والیس و من‌ویتنی با نرم افزار SPSS ویرایش ۱۳ انجام شد.  $p < 0/05$  به عنوان سطح معنی‌داری تلقی شد.

**نتایج:** براساس نتایج این مطالعه ۳۱/۴٪ افراد دارای پلی‌مورفیسم pp، ۳۹/۲٪ پلی‌مورفیسم Pp و ۲۹/۴٪ دارای پلی‌مورفیسم PP بودند. درصد علل ناباروری زنانه و مردانه، میانگین تعداد فولیکولها، تخمکها و جنینها در سه نوع پلی‌مورفیسم از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت.

**نتیجه‌گیری:** بررسی نقش ژن‌های مختلف در پاسخ بدن به داروهای گوناگون (فارماکوژنتیک) اهمیت زیادی در تعیین روش‌های درمانی مناسب دارد. این تحقیق اهمیت یکی از ژن‌های مؤثر در پاسخ تخمدان به تحریک تخمک‌گذاری در سیکل‌های IVF را نشان داد؛ اما با توجه به نقش انواع فاکتورهای آندوکراین و پاراکراین در تحریک تخمک‌گذاری و بلوغ مناسب تخمک به مطالعات بیشتری جهت یافتن اهمیت دیگر ژن‌های مؤثر در تخمدان و همچنین بررسی جهش‌های دیگر در ژن گیرنده استروژن و تعیین شیوع پلی‌مورفیسم آن در جمعیت خانم‌های بارور نیاز است.

**کلید واژگان:** ژن گیرنده استروژن، پلی‌مورفیسم ژنی، ناباروری، لقاح خارج رحمی، تحریک تخمک‌گذاری، تخمک، جنین، انتقال جنین.

**مسئول مکاتبه:** دکتر محمدحسن شیخها، مرکز تحقیقاتی-درمانی ناباروری، خیابان بوعلی، صفاییه، کدپستی: ۸۹۱۶۸۹۵۴۷۳، یزد، ایران.

پست الکترونیک: sheikhha@yahoo.com

## زمینه و هدف

به طور کلی در یک زوج ناباروری به عنوان عدم توانایی برای بارداری بعد از یکسال مقاربت صحیح از نظر زمانی، تکنیکی و بدون استفاده از روش‌های پیشگیری از بارداری شناخته می‌شود که ۱۰ تا ۱۵٪ زوجها را گرفتار می‌کند (۱). نتایج بررسی‌های اپیدمیولوژیک در آمریکا، نشان می‌دهد که شیوع ناباروری از ۸/۵٪ در سال ۱۹۸۲ به ۷/۴٪ در سال ۲۰۰۲ کاهش یافته است (۲). در کشور ایران، بررسی اپیدمیولوژیک ناباروری در سال ۱۳۷۹ در غرب تهران روی ۱۱۷۴ زن انجام شد که میزان ناباروری کلی ۱۲٪ بود (۳). همچنین در مطالعه‌ای در شهر شیراز در سال ۱۳۷۷ بر روی ۱۴۳۰ زن، شیوع ناباروری ۱۱/۱۲٪ بدست آمد (۴). در حالیکه در تحقیق دکتر افلاطونیان و همکاران در سال ۱۳۸۳ به طور کلی فراوانی شیوع ناباروری در سطح استان یزد ۵/۵۲٪ بود (۵).

بروز ناباروری ناشی از عوامل مختلفی می‌باشد که از آن جمله هورمون‌ها و تأثیر آنها در عملکرد دستگاه تناسلی زنان از اهمیت خاصی برخوردار است. استروژن یکی از دو هورمون جنسی استروئیدی در زنان است که بوسیله تخمدان ترشح می‌شود. اکثر تنظیم‌های هیپوفیزی تخمدان با تأثیر دو هورمون استروژن و پروژسترون صورت می‌گیرد. استروژن در رشد جنینی، بروز صفات ثانویه جنسی، سیکل باروری و نگهداری بارداری نقش مهمی ایفا می‌کند. علاوه بر این استروژن رشد و تمایز سلول‌های اندومتر را نیز تنظیم می‌کند (۶). به طور کلی جنبه‌های مختلف باروری، شکل‌گیری فولیکول‌ها و بلوغ تخمکها تحت تأثیر استروژن و گنادوتروپین‌های هیپوفیزی شامل LH، FSH صورت می‌گیرد. پاسخ تخمدان به تحریک

تخمک‌گذاری در سیکل‌های لقاح خارج رحمی IVF<sup>۲</sup> نیز با میزان هورمون استروژن کاملاً مرتبط می‌باشد (۷). برای تنظیم عملکرد فیزیولوژیکی دستگاه تناسلی زنانه، توسط هورمون‌های استروئیدی وجود گیرنده این هورمون در سلول‌های هدف ضروری می‌باشد که بدین منظور این هورمون‌ها باید به گیرنده‌های اختصاصی خود متصل شوند. این گیرنده‌ها به عنوان مولکول‌های تنظیم کننده ژن در سلول‌های هدف وجود دارند و به صورت اختصاصی پیوند محکمی با هورمون‌های استروئیدی برقرار می‌کنند و پس از اتصال این کمپلکس با اثر بر روی توالی‌های تنظیم کننده ژن بیان بسیاری از ژنها را تنظیم می‌کنند (۸،۹). گیرنده‌های استروژن به طور اولیه در سلول‌های رحم، واژن، پستان و مغز و به طور اختصاصی در تخمک، سلول‌های گرانولوزا و سلول‌های اپی‌تلیال تخمدان وجود دارند. گیرنده استروژن به ۲ نوع آلفا (ER $\alpha$ ) و بتا (ER $\beta$ ) تقسیم می‌شود. نوع آلفا در تمام بافت‌های پاسخ دهنده به استروژن وجود دارد؛ اما گیرنده بتا در بافت‌های محدودتری یافت شده است (۱۰).

ارتباط بین این گیرنده‌ها و تولید مثل موضوع مطالعات مختلف بوده است. در مطالعه Couse و همکاران حذف گیرنده‌های آلفا و بتا در موش منجر به ناباروری شد. علاوه بر این بافت‌های تولیدمثلی در موش‌های ماده رشد نکرده و کیست‌های فولیکولی بزرگ بدون پاسخ به استروژن در تخمدان باقی ماند (۱۱).

تحقیقات جدید نشان می‌دهند که تغییرات بسیار اندک در سطح استروژن زنان می‌تواند توجیه‌کننده ۷۰٪ جنین‌های سالمی باشد که در لانه‌گزینی دچار مشکل می‌شوند (۱۲).

ژن کدکننده ER $\alpha$  روی کروموزوم شماره ۶ (6q24-26) وجود دارد. ژنوم انسان تقریباً شامل ۲۵ تا ۴۰ هزار ژن می‌باشد که در ۳/۲ میلیارد نوکلئوتید DNA کد شده

1- Luteinizing Hormone

2- Follicle Stimulating Hormone

3- In Vitro Fertilization

است. ژنوم افراد مختلف تقریباً ۹۹/۹٪ مشابه یکدیگر می‌باشند؛ ولی تفاوت در ۰/۱٪ ژنوم باعث ۱۱ میلیون نوع پلی مورفیسم ژنی می‌گردد (۱۳). پلی مورفیسم و یا تفاوت‌های ژنتیکی در ژن‌های کدکننده پروتئینها ممکن است مسئول بعضی تفاوت‌های مشاهده شده در زمینه فیزیولوژیک، بیوشیمی و پاسخ به داروها باشد.

ژن گیرنده استروژن دارای پلی مورفیسم‌های مختلفی می‌باشد. تاکنون مطالعه خاصی در مورد تفاوت ژنوتیپ‌های مختلف این ژن از نظر عملکرد در اتصال به هورمون انجام نگرفته است. ولی، نوع این پلی مورفیسم در نتایج حاصل از تحریک تخمک‌گذاری تأثیر دارد. به طوریکه وجود یک نوع پلی مورفیسم خاص می‌تواند به پیش‌بینی نتایج حاصل از تحریک تخمک‌گذاری در سیکل IVF کمک نماید. پلی مورفیسم PVUII<sup>۱</sup> از معروفترین پلی مورفیسم‌های ژن گیرنده استروژن آلفا می‌باشد که بر روی اینترون شماره ۱ ژن قرار دارد و دارای سه نوع ژنوتیپ PP، Pp و pp می‌باشد. پلی مورفیسمها و جهش‌های ژنی زیادی از ERα در بیماران با آلزایمر (۱۴، ۱۵)، پوکی استخوان (۱۶)، آسم (۱۷)، ترومبوز وریدی (۱۸)، تنگی عروق کرونر (۱۹) و آندومتریوز (۲۰) گزارش شده است. همچنین جهش‌های این ژن در بروز سرطان‌های آندومتر (۲۱)، پروستات (۲۲) و کارسینوم هپاتوسلولار (۲۳) نقش دارند. مطالعه Al-Hendy و همکاران، ۱۹۸ بیمار زن مبتلا به لیوموم از نظر ژن گیرنده استروژن آلفا با ۲۹۹ زن سالم مقایسه شدند. ژنوتیپ PP، با ۶/۴۲ برابر افزایش خطر وجود لیومیوم در زنان همراه بود (۲۴). در مطالعه Cai و همکاران نیز پلی مورفیسم PVUII با افزایش خطر سرطان پستان در ارتباط بود (۲۵). در مطالعه‌ای مشابه مطالعه حاضر که توسط Georgioa و همکاران در یونان انجام شد ۱۰۰ زن نابارور تحت درمان با IVF با ۱۰۰ زن دارای حداقل یک فرزند سالم از نظر

پلی مورفیسم PVUII مقایسه شدند. در گروه نابارور در زنان دارای نوع پلی مورفیسم PP میزان بارداری به صورت معنی‌داری کمتر بود (۲۶). در مطالعه Sundarrajan و همکاران نیز ۲۰۰ زن نابارور چینی تحت درمان با IVF مطالعه شدند که درصد بارداری، اندازه فولیکولها، تعداد جنینها، تعداد تخمکها و تعداد متوسط فولیکولها در بیماران با پلی مورفیسم PP به طور معنی‌داری پایین‌تر بود (۲۷). براین اساس و با این فرض که وجود نوع خاصی از پلی مورفیسم ژن گیرنده استروژن آلفا در زنان نابارور در سرانجام درمان ناباروری آنان مؤثر است، در این تحقیق، رابطه بین پلی مورفیسم PVUII ژن گیرنده استروژن و نتایج حاصل از تحریک تخمک‌گذاری در تخمدانها برای سیکل‌های ART<sup>۲</sup> بررسی شد.

### روش بررسی

این مطالعه از نوع تحلیلی بود و به روش مقطعی<sup>۳</sup> انجام شد. ۱۰۲ نمونه واجد شرایط از بین زنانی که از ۱۵ فروردین تا پایان اسفند ۱۳۸۴ برای درمان ناباروری اولیه به مرکز تحقیقاتی- درمانی ناباروری یزد مراجعه نموده بودند به روش متوالی انتخاب شد. معیارهای انتخاب زنان مورد مطالعه، وجود ناباروری با علت مردانه در همسران آنها و یا وجود ناباروری با علت زنانه به جز مشکلات تخمدانی، آندومتریوز بود. زنان دارای مشکلات پاتولوژی مؤثر در پاسخ تخمدان به درمان مانند آندومتریوز و تخمدان پلی‌کیستیک از مطالعه حذف شدند. از هر فرد اطلاعات فردی مورد نیاز بوسیله مصاحبه پرسیده شد و در پرسشنامه از پیش تعیین شده ثبت گردید. کلیه افراد مورد بررسی تحت درمان برای تخمک‌گذاری به روش پروتکل طولانی مدت<sup>۴</sup> به صورت تجویز بوسرلین<sup>۵</sup> ( Superfact، )

2- Assisted Reproductive Technology

3- Cross-sectional

4- Long protocol

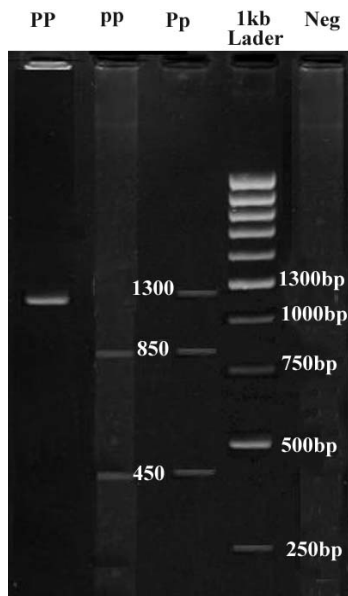
5- Buserelin (Suprefact TM)

1- Proteus vulgaris

محصولات بوسیله حرف کوچک p و عدم وجود هضم با حرف بزرگ P نشان داده شد و ژنوتیپ‌های Pp، pp (هتروزیگوت) و PP (مشخص گردید). در صورت وجود سایت هضم قطعه DNA به ۲ قطعه ۰/۸۵Kbp و ۰/۴۵Kbp بریده می‌شد (شکل ۱). اطلاعات حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۳ به کامپیوتر وارد شد. برای مقایسه تعداد فولیکولها، تعداد تخمکها، نسبت فولیکول به تخمک، تعداد جنین و میزان استروژن بین ژنوتیپ‌های مختلف از آزمون‌های کروسکال والیس و من‌ویتنی، برای مقایسه میزان بارداری بین ژنوتیپ‌های مختلف از آزمون  $\chi^2$  و برای حذف اثر متغیرهای احتمالاً مداخله‌گر از آزمون منتل‌هانتزل استفاده و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ انتخاب شد.

### نتایج

براساس نتایج حاصله محدوده سنی نمونه‌های مورد بررسی از ۲۱ تا ۴۵ سال با میانگین  $30/70 \pm 5/62$  سال بود و طول مدت ناباروری از ۲ تا ۲۵ سال با میانگین  $10/11 \pm 5/85$  سال بدست آمد. بیشترین شکل



شکل ۱- ژل آگاروز ۲/۵٪ نشان‌دهنده محصولات PCR که بوسیله آنزیم محدود کننده PVUII در دمای  $37^{\circ}C$  هضم و سپس بوسیله الکتروفورز جدا و بوسیله رنگ‌آمیزی برومید اتیدیوم شناسایی شده‌اند. وجود سایت هضم در محصولات بوسیله حرف کوچک p و عدم وجود هضم با حرف بزرگ P نشان داده شده و ژنوتیپ‌های Pp، pp (هتروزیگوت) و PP مشخص گردیده است. در صورت وجود سایت هضم قطعه DNA به ۲ قطعه ۸۵۰bp و ۴۵۰bp بریده شده است.

به میزان  $0/5ml$  از روز ۲۱ سیکل قاعدگی و ادامه آن با گونادوتروپین یائسگی انسانی (HMG) (Ferring, Kiel, Germany) از روز دوم سیکل بعدی قرار گرفتند. اطلاعات دیگر مانند میزان استروژن سرم (در روز نهم سیکل قاعدگی)، تعداد فولیکول و تخمک (در روز برداشت آن)، تعداد جنین (دو روز پس از برداشت تخمک) و نتیجه بارداری شیمیایی پس از ثبت توسط متخصص مربوطه از پرونده بیمار استخراج گردید. برای انجام آزمایش‌های ژنتیکی در روز دریافت تخمک از بیماران  $10ml$  خون محیطی در لوله حاوی EDTA<sup>۲</sup> گرفته شد، پس از استخراج DNA از خون به روش کلروفورم، DNA حاصل برای تعیین پلی مورفیسزم PVUII در دمای  $20^{\circ}C$  - نگهداری شد. ژنوتیپ پلی مورفیسزم PVUII در اینترون یک upstream kb  $0/4$  از اگزون ۲<sup>۳</sup> گیرنده استروژن آلفا با تکنیک PCR-RFLP<sup>۴</sup> شناسایی شد. برای این منظور  $100ng$  از DNA با  $0/5\mu M$  از هر پرایمر انتخابی از مطالعات قبلی (۲۵، ۲۸، ۲۹) با توالی زیر و  $250mmol/L$  dNTPs و  $1/25$  واحد Taq polymerase در  $50\mu l$  از بافر PCR مخلوط شد.

F-5'-CTGCCACCCTATCTGTATCTTTTCTATTCTCC-3'  
R-5'-TCTTTCTCTGCCACCCTGGCGTCGATTATCTGA-3'

این پرایمرها یک قطعه  $1/3Kbp$  تولید می‌کردند. مراحل PCR با یک مرحله دناتوراسیون در  $95^{\circ}C$  برای مدت ۵ دقیقه شروع شد، سپس بوسیله ۳۰ دور در  $94^{\circ}C$ ،  $62^{\circ}C$  و  $72^{\circ}C$  هر کدام برای مدت ۱ دقیقه و در مرحله پایانی در  $76^{\circ}C$  برای ۶ دقیقه دنبال شد. محصولات PCR بوسیله آنزیم محدود کننده PVUII در دمای  $37^{\circ}C$  هضم و سپس بوسیله الکتروفورز روی ژل آگاروز ۲/۵٪ جدا و بوسیله رنگ‌آمیزی برومید اتیدیوم شناسایی شدند. وجود سایت هضم در

- 1- Human Menopausal Gonadotropin
- 2- Ethylen diamine Tetra acetic Acid
- 3- Exon
- 4- Polymerase Chain Reaction
- 5- Restriction enzyme

جدول ۱- بررسی ارتباط متغیرهای پاسخ تخمدان با پلی مورفیسم PVUII و انتقال داده شده در زنان نابارور مورد مطالعه

* p-Value	PP (M±SD)	Pp (M±SD)	pp (M±SD)	نوع ژنوتیپ
				متغیر
۰/۶۸۶	۱۰/۷۳±۴/۸۵	۱۰/۶۵±۷/۰۱	۱۰/۱۶±۶/۲۳	تعداد فولیکول
۰/۷۵۱	۷/۹۳±۴/۵۴	۷/۶۷±۶/۲۵	۷/۵۳±۴/۹۸	تعداد تخمک
۰/۹۱۵	۱/۵۶±۰/۶۴	۲/۱۳±۲/۴۵	۱/۵۵±۰/۸۲	نسبت فولیکول به تخمک
۰/۶۳۵	۱۰۱۰/۰۲±۸۴۲/۵۶	۱۴۲۱/۸۲±۱۸۷۴/۲۸	۸۵۶/۱۶±۷۹۷/۶۷	استروژن سرم (pg/ml)
۰/۰۸۶	۶±۳/۶۱	۴/۳۲±۴/۳۲	۴/۷۴±۳/۶۰	تعداد جنین

\* آزمون کروسکال والیس

مردانه و زنانه تقسیم شدند. تعداد موارد مثبت بارداری در دو گروه ناباروری با علت زنانه و مردانه مشابه بود (۳۰/۳٪ در مقابل ۳۰/۴٪). در گروه با علت ناباروری زنانه، موارد مثبت در گروه با پلی مورفیسم Pp به صورت معنی داری بیش از دو گروه دیگر پلی مورفیسم بود. این ارتباط بوسیله آزمون دقیق فیشر آزمون گردید و با  $p=۰/۰۰۷$  از نظر آماری معنی دار بود. به عبارت دیگر اگر بیمارانی که با علت ناباروری زنانه تحت درمان ناباروری قرار می گیرند دارای ژنوتیپ Pp باشند، بطور معنی داری احتمال بارداری آنها بیشتر از افراد با ژنوتیپهای PP و pp می باشد.

در گروه بیماران با علت ناباروری مردانه موارد مثبت در گروه با ژنوتیپ Pp و گروه pp تقریباً یکسان بود و در گروه با ژنوتیپ PP تعداد کمتری (۲۷/۸٪) بارداری رخ داده بود. بین نتیجه بارداری و پلی مورفیسم PVUII در بیماران با علت ناباروری مردانه تفاوت معنی دار آماری وجود نداشت ( $p=۰/۹۲۱$ ) (جدول ۳).

از نظر تعداد فولیکول، تخمک، نسبت فولیکول به تخمک، سطح استروژن سرم و تعداد جنین بدست آمده نیز

جدول ۲- توزیع فراوانی نتیجه بارداری برحسب پلی مورفیسم PVUII در زنان نابارور مورد مطالعه

جمع	نتیجه بارداری				نوع ژنوتیپ	علت ناباروری
	منفی		مثبت			
درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۱۰۰	۸	۸۷/۵	۷	۱۲/۵	۱	pp
۱۰۰	۱۳	۳۸/۵	۵	۶۱/۵	۸	Pp
۱۰۰	۱۲	۹۱/۷	۱۱	۸/۳	۱	PP
۱۰۰	۲۴	۶۶/۷	۱۶	۳۳/۳	۸	pp
۱۰۰	۱۸	۷۰/۴	۱۹	۲۹/۶	۸	Pp
۱۰۰	۲۷	۷۲/۲	۱۳	۲۷/۸	۵	PP

پلی مورفیسم، نوع Pp با فراوانی ۳۹/۲٪ بود، در حالیکه ژنوتیپ PP در ۲۹/۴٪ افراد وجود داشت و ۳۱/۴٪ آنان ژنوتیپ pp را داشتند. بیشترین فراوانی علت ناباروری مردانه در پلی مورفیسم نوع pp (۷۵٪) و کمترین آن در نوع PP (۶۰٪) وجود داشت. همچنین بیشترین فراوانی علت ناباروری زنانه در پلی مورفیسم نوع PP (۴۰٪) و کمترین آن در نوع pp (۲۵٪) گزارش شد. با توجه به انجام آزمون  $\chi^2$  و  $p=۰/۴۵۱$  بین علت ناباروری زنانه و مردانه و وضعیت پلی مورفیسم تفاوت معنی دار آماری وجود نداشت. در هر یک از سیکل های ART، تعداد فولیکول، تخمک، نسبت فولیکول به تخمک، سطح استروژن سرم، تعداد جنین حاصل و انتقال داده شده محاسبه شد که بین وضعیت پلی مورفیسم با هیچ یک از این متغیرها ارتباطی بدست نیامد (جدول ۱). بیشترین میزان بارداری در گروه با پلی مورفیسم Pp، ۴۰٪ و کمترین آن در گروه PP، ۲۰٪ بود اما علیرغم وجود اختلاف بین این دو گروه با توجه به رابطه معنی دار آماری بین نوع پلی مورفیسم و نتیجه بارداری بدست نیامد (جدول ۲).

به طور کلی بیماران از نظر علت ناباروری به دو گروه

جدول ۲- توزیع فراوانی نتیجه بارداری برحسب پلی مورفیسم PVUII در زنان نابارور مورد مطالعه

جمع	نتیجه بارداری				تعداد جنین انتقال داده شده	نوع ژنوتیپ
	منفی		مثبت			
درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۱۰۰	۳۲	۷۱/۹	۲۳	۲۸/۱	۹	pp
۱۰۰	۴۰	۶۰	۲۴	۴۰	۱۶	Pp
۱۰۰	۳۰	۸۰	۲۴	۲۰	۶	PP
۱۰۰	۱۰۲	۶۹/۶	۷۱	۳۰/۴	۳۱	جمع

جدول ۴- ارتباط بین متغیرهای پاسخ تخمدان و با علت ناباروری در زنان نابارور  
مراجعه کننده به مرکز تحقیقاتی- درمانی ناباروری شهید صدوقی یزد، ۱۳۸۴

متغیر	مردانه (M±SD)	زنانه (M±SD)	* p-value
تعداد فولیکول	۱۰/۵۰±۶/۰۲	۱۰/۵۸±۶/۴۸	۰/۹۱۳
تعداد تخمک	۷/۵۷±۴/۸۵	۸/۰۰±۶/۳۸	۰/۸۳۸
نسبت فولیکول به تخمک	۱/۸۷±۱/۹۲	۱/۵۸±۰/۸۳	۰/۴۶۳
استروژن سرم (pg/ml)	۱۱۰۶/۸۷±۱۴۰۹/۲۹	۱۱۶۰/۰۹±۱۳۳۶/۱۸	۰/۹۰۲
تعداد جنین بدست آمده	۴/۵۸±۳/۰۱	۵/۹۰±۵/۳۲	۰/۶۰۳

\* آزمون من ویتنی

نتایج در دو گروه با علت مردانه یا زنانه مورد مقایسه قرار گرفت و اختلاف معنی داری بین این دو گروه بدست نیامد (جدول ۴). همچنین بررسی‌های بیشتر با استفاده از آزمون منتل هانتزل نشان داد که با حذف اثر متغیر علت باروری (مردانه- زنانه) بین سه گروه Pp، PP و pp تفاوت معنی داری از نظر وقوع بارداری وجود نداشته است.

### بحث

برای تحریک تخمک‌گذاری و بدست آوردن تخمک مناسب جهت لقاح خارج رحمی در سیکل‌های ART، از پروتکل‌های درمانی خاص و معمولاً مشابه استفاده می‌شود. در انتخاب روش‌های درمانی و دوز داروها معمولاً عواملی مانند سن و وزن بیمار در نظر گرفته می‌شود (۳۰ و ۳۱)؛ در صورتیکه عوامل ژنتیکی نیز می‌توانند بر این موضوع تأثیرگذار باشند.

همانطوری که امروزه در درمان بسیاری از بیماریها فارماکوژنتیک بیمار در نظر گرفته می‌شود و بسته به متابولیسم داروها در بدن افراد مختلف و پاسخ آنها به دارو، نوع دارو و دوز آن تعیین می‌شود (۳۲)، در درمان ناباروری نیز تأثیر ژنها در پاسخ به درمان بیماران باید در نظر گرفته شود. با وجود هزینه بالای داروهای مصرفی در سیکل‌های ART، عوارض تزریق آنها و همچنین نتایج عاطفی شکست درمان به ویژه در خانواده‌هایی با فرهنگ و نگرش خاص، توجه به نحوه مصرف دارو در درمان ناباروری اهمیت بیشتری

می‌یابد. شاید بتوان با پیشگویی پاسخ به درمان قبل از شروع مصرف دارو، هم نوع دارو و دوز مؤثر آن را تعیین نمود و هم افرادی را که از نظر ژنتیکی شانس کمتری برای پاسخ به درمان دارند از نظر روحی آماده ساخت تا فشار مالی و روانی وارد شده بر زوج‌های نابارور در حد امکان کاهش و همزمان موفقیت درمان افزایش یابد. برای مطالعه نقش ژنتیک در پاسخ به درمان در بیماران نابارور در این بررسی ژن گیرنده آلفا و نقش پلی مورفیسم‌های آن در پاسخ به درمان ۱۰۲ زوج نابارور بررسی شد. با توجه به اینکه جهت مطالعه اثر ژنتیک بر روی پاسخ به درمان نیاز به حذف عوامل مداخله‌گر در درمان بود، بیمارانی که مشکلات تخمدانی مانند سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCO) و آندومتریوز داشتند از مطالعه حذف شدند.

به طور کلی در مطالعه حاضر ۶۹٪ علت ناباروریها در جامعه مورد بررسی فاکتور مردانه بود و با توجه به اینکه فاکتور مردانه معمولاً مسئول ۴۰٪ موارد ناباروری است (۳۳) علت درصد بیشتر فاکتور مردانه در این مطالعه خروج بیماران با اختلالات تخمدانی و آندومتریوز از مطالعه بود که باعث کاهش درصد فاکتورهای زنانه شده است. قابل ذکر است که در این مطالعه فاکتور مردانه مداخله‌گر نیست چرا که تا قبل از لقاح فاکتور مردانه هیچگونه دخالتی در پاسخ تخمدان به داروهای تحریک کننده تخمک‌گذاری ندارد.

چون هدف از این مطالعه بررسی پاسخ به درمان پلی مورفیسم‌های مختلف در افراد نابارور بود، جامعه طبیعی در نظر گرفته نشد. در طرح دیگری که محققین این مقاله در دست اجرا دارند توزیع فراوانی انواع پلی مورفیسم‌های ژن گیرنده استروژن آلفا در افراد طبیعی بررسی می‌شود و با مقایسه نتایج آن با این طرح می‌توان در مورد ارتباط این پلی مورفیسما و ناباروری اظهار نظر نمود.

در بررسی Georgiou و همکاران همانند مطالعه حاضر ژنوتیپ نوع Pp در گروه نابارور و کنترل بیش از سایر ژنوتیپها و ژنوتیپ PP از همه کمتر بود. اما تفاوت معنی‌داری بین گروه بارور و نابارور وجود نداشت (۲۶). در حالیکه در مطالعه Sundarrajan و همکاران در افراد نابارور، پلی مورفیسم PP از انواع دیگر بیشتر بود (۲۷). این اختلاف می‌تواند براساس تفاوت‌های نژادی در دو گروه مورد مطالعه و یا در تعداد نمونه باشد.

برای ارزیابی پاسخ به درمان بیماران در مطالعه حاضر تعداد فولیکول، تعداد تخمک حاصل پس از تحریک تخمک‌گذاری و همچنین نسبت فولیکول به تخمک در نظر گرفته شد. این نسبت از این نظر مهم است که تعدادی از فولیکولها ممکن است خالی باشند و تخمک از آنها بدست نیاید. در نتایج حاصل تعداد فولیکول و تخمک در هر سه گروه تقریباً مساوی بود و در نتیجه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در حالیکه در مطالعه‌ای مشابه که توسط Sundarrajan و همکاران در چین انجام شد، میانگین فولیکول در گروه PP به صورت معنی‌داری بیش از دو گروه Pp و pp بود و بین نسبت فولیکول به تخمک در هر سه گروه تفاوت معنی‌داری وجود داشت (۲۷). در ضمن در بررسی Georgiou و همکاران میانگین فولیکول و تخمک در هر سه گروه تقریباً مساوی بود؛ اما نسبت فولیکول به تخمک در گروه Pp به طور معنی‌داری از دو گروه دیگر بیشتر گزارش شد (۲۶). به طور مشابه، نسبت فولیکول به تخمک در مطالعه حاضر در گروه Pp بیشتر بود؛ هرچند این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود؛ اما نشان داد که گروه Pp بهتر به درمان پاسخ داده است. به طور کلی این نسبت در ارزیابی پاسخ به درمان مهمتر از فولیکول به تنهایی یا تخمک به تنهایی است.

سطح استروژن سرم نیز از معیارهای مهم در نظر گرفته شده در این مطالعه بود که در گروه Pp نسبت به دو گروه دیگر بیشتر بود. در حالیکه در مطالعه

Sundarrajan و همکاران میزان استروژن سرم در گروه pp حداقل و در گروه PP حداکثر و تفاوت بین آنها معنی‌دار بود (۲۷). همچنین در مطالعه حاضر تعداد جنین بدست آمده در آزمایشگاه در گروه PP بیشتر از دو گروه دیگر بود؛ اما تفاوت معنی‌داری نسبت به دو گروه دیگر نداشت. در حالیکه در مطالعه Sundarrajan و همکاران تعداد جنین حاصل و همچنین منتقل شده با نوع پلی مورفیسم در ارتباط بود. بیشترین تعداد جنین در گروه pp و کمترین آن در گروه PP بدست آمد (۲۷). به‌طورکلی اختلافات مشاهده شده در مورد تعداد تخمک فولیکول، نسبت آنها و تعداد جنین بین مطالعه حاضر و مطالعات دیگر می‌تواند ناشی از تفاوت‌های نژادی و ژنتیکی گروه‌های مورد مطالعه باشد. در ضمن عوامل دیگری مانند پروتکل درمانی، مشخصات بیماران مراجعه کننده، سن آنها و ... می‌تواند مؤثر باشد.

به طور کلی، در مطالعه حاضر گروه Pp با ۴۰٪ بیشترین درصد بارداری و گروه PP با ۲۰٪ کمترین درصد بارداری را داشتند؛ به این ترتیب بیشترین پاسخ به درمان در ژنوتیپ Pp وجود داشته است. علت این امر می‌تواند این باشد که برای موفقیت IVF میزان استروژن باید در حد معینی باشد به طوریکه مقادیر کمتر و بیشتر از آن نتیجه منفی در پاسخ به درمان خواهد داشت (۱۲).

همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در زنان ناباروری که با علت ناباروری زنانه مراجعه می‌کردند، بیشترین بارداریها در گروه با ژنوتیپ Pp (۶۱/۵٪) بود؛ در صورتیکه در زنانی که به علت وجود ناباروری در همسرانشان مراجعه می‌نمودند، درصد بارداری در سه نوع پلی مورفیسم تقریباً یکسان بود. این نکته بیانگر این مطلب است که پلی مورفیسم ژن گیرنده استروژن در بیماران با علت ناباروری زنانه نقش مهم‌تری ایفا می‌کند.

## نتیجه گیری

با توجه به اهمیت فارماکوژنتیک در درمان بسیاری از بیماریها و همینطور درصد نسبتاً کم پاسخ به درمان در سیکل های IVF به نظر می رسد که لازم باشد توجه بیشتری به فارماکوژنتیک و پاسخ فردی بیماران به داروها معطوف گردد.

بررسی حاضر اهمیت یکی از ژن های مؤثر در تولیدمثل را نشان داد. برای بررسی بیشتر نقش پلی مورفیسم ژن گیرنده استروژن آلفا در ناباروری لازم است که شیوع این پلی مورفیسم در جمعیت طبیعی نیز بررسی گردد. به علاوه برای حذف دیگر فاکتورهای مؤثر در درمان و بررسی منفرد نقش پلی مورفیسم ژن گیرنده استروژن آلفا در نحوه پاسخ به درمان باید مطالعه در گروه خاصی از بیماران (مثلاً بیماران با علت ناشناخته و یا بیماران با علت زنانه) که تمام عوامل مخدوش کننده دیگر در آنها حذف شده باشد انجام شود. در پایان، در صورتیکه بتوان با انجام مطالعات تکمیلی و

تعیین پلی مورفیسم ژن های مختلف تفاوت های موجود در زنان نابارور از نظر پاسخ به درمان را تعیین نمود، می توان برنامه ریزی مناسب برای درمان دارویی مؤثر در هر فرد را با توجه به زمینه ژنتیکی انجام داد تا هم میزان بارداری در بیماران نابارور افزایش یابد و هم از مصرف بیهوده دارو و دادن امید کاذب به بیماران خودداری شود.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می دانند از زحمات فراوان پرسنل محترم آزمایشگاه ART و ژنتیک مرکز تحقیقاتی- درمانی ناباروری یزد به ویژه آقایان مهرداد سلیمانی و حسین فضلی و خانها دکتر نسیم طبیب نژاد و حبیبه قیصری کمال تشکر را به عمل آورند. حمایت کننده مالی تحقیق حاضر مرکز تحقیقاتی- درمانی ناباروری یزد بوده است.

## References

- 1- Berek JS, Novak's Gynecology. 13<sup>th</sup> Edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2002;pp:973-1065.
- 2- Stephen EH, Chandra A. Declining estimates of infertility in the United States: 1982-2002. *Fertile Steril.* 2006;86(3):516-523.
- 3- Nojomi M. Epidemiology of infertility in the west of Tehran in 2000. *J Am Med Women's Assoc.* 2002;57(4):219.
- 4- پارسا نژاد محمد ابراهیم، البرزی سعید. بررسی جنبه های اپیدمیولوژیک و اتیولوژیک ناباروری در شیراز، مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، زمیماه شماره ۱، سال ششم، تابستان ۱۳۷۷، صفحه ۵۸.
- 5- افلاطونیان عباس، سیدحسینی سید محمد. بررسی جنبه های اپیدمیولوژیک و اتیولوژیک ناباروری در یزد. طرح تحقیقاتی، مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، ۱۳۸۳، صفحه ۵۴.
- 6- Meldrum DR. Female reproductive aging ovarian and uterine factors. *Fertil. Steril.* 1993;59:1-5
- 7- Rebar RW. Premature ovarian failure. In: Lobe RA., Kelsey R., Marcus R, editor. In *Biology and pathology.* Academic Press. San Diego. 2000;pp:255.
- 8- Kovas P., Matyas SZ., Boda K., Kaal SG. The effect of endometrial thickness on IVF/ICSI outcome, *Hum. Reprod.* 2003;18,11;2337-41.
- 9- Duffy DM, Chaffin CL, Stouffeo RL. Expression of estrogen receptor alpha & beta in the rhesus monkey corpus luteum during the menstrual cycle: regulation by luteinizing hormone & progesterone. *Endocrinol.* 2000;141;1711-17.
- 10- Chaffin CL. Estrogen receptor a and b polymorphism: Is there any an association with bone mineral density, plasma lipids, & response to postmenopausal hormone therapy? *Menopause.* 2006; 13(3):451-61.
- 11- Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocrine.* 1999;20(3):358-417.



- 12- Ma WG, Song H, Das SK, Paria BC, Dey SK. Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(5):2963-2968.
- 13- Frazier ME., Johnson GM, Thomassen DG, Oliver CE, Patrinos A. Realizing the Potential of the Genome Revolution: The Genomes to Life Program. *Science*. 2003;300:290-3.
- 14- Monastero R, Cefalu AB, Camarda C, Noto D, Camar-da LK, Caldarella R, et al. Association of estrogen receptor alpha gene with Alzheimer's disease: a case-control study. *J Alzheimers Dis*. 2006;9(3):273-278.
- 15- Porrello E, Monti MC, Sinfioriani E, Cairati M, Guaita A, Montomoli C, et al. Estrogen receptor alpha and APOE epsilon4 polymorphisms interact to increase risk for sporadic AD in Italian females. *Eur J Neurol*. 2006;13(6):639-644.
- 16- Greendale GA, Chu J, Ferrell R, Randolph JF Jr, Johnston JM, Sowers MR. The association of bone mineral density with estrogen receptor gene polymorphisms. *Am J Med*. 2006;119(9 Suppl 1):S79-86.
- 17- Dijkstra A, Howard TD, Vonk JM, Ampleford EJ, Lange LA, Bleecker ER, et al. Estrogen receptor 1 polymorphisms are associated with airway hyper-responsiveness and lung function decline, particularly in female subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(3):604-611.
- 18- Lussana F, Faioni EM, Mavilia C, Bucciarelli P, Brandi ML, Cattaneo M. Association of estrogen receptor-alpha gene polymorphisms with venous thrombosis. *Haematologica*. 2006;91(2):279-280.
- 19- Almeida S, Hutz MH. Estrogen receptor 1 gene polymorphisms and coronary artery disease in the Brazilian population. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39(4):447-454.
- 20- Luisi S, Galleri L, Marini F, Ambrosini G, Brandi ML, Petraglia F. Estrogen receptor gene polymorphisms are associated with recurrence of endometriosis. *Fertil Steril*. 2006;85(3):764-766.
- 21- Kang S, Roh JW, Kim JW. Single nucleotide polymorphism: a new risk factor for endometrial cancer? *Future Oncol*. 2005;1(3):323-330.
- 22- Hernandez J, Balic I, Johnson-Pais TL, Higgins BA, Torkko KC, Thompson IM, Leach RJ. Association between an estrogen receptor alpha gene polymorphism and the risk of prostate cancer in black men. *J Urol*. 2006;175(2):523-527.
- 23- Zhai Y, Zhou G, Deng G, Xie W, Dong X, Zhang X, et al. Estrogen receptor alpha polymorphisms associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus carriers. *Gastroenterology*. 2006;130(7):2001-2009.
- 24- Al-Hendy A, Salama SA. Ethnic distribution of estrogen receptor-alpha polymorphism is associated with a higher prevalence of uterine leiomyomas in black Americans. *Fertil Steril*. 2006;86(3):686-693.
- 25- Cai Q, Shu X O, Jin F, Dai Q, Wen W, Cheng J R, et al. Genetic polymorphism in the estrogen receptor  $\alpha$  gene and risk of breast cancer. *Cancer Epid Biom Prev*. 2003;12:853-859.
- 26- Georgiou I, Konstantelli M, Syrrou M, Messinis IE, Lolis DE. Oestrogen receptor polymorphisms and ovarian stimulation for in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1997;12(7):1430-1433.
- 27- Sundarrajan C, Liao WX, Roy AC, Ng SC. Association of oestrogen receptor gene polymorphism with outcome of ovarian stimulation in patients undergoing IVF. *Mol Hum Reprod*. 1999;5(9):797-802.
- 28- Stavrou I, Zois C, Ioannidis JPA, Tsatsoulis A. Association of polymorphisms of the estrogen receptor  $\alpha$  gene with the age of menarche. *Hum Reprod*. 2002;17:1101-05.
- 29- Kitawaki J, Obayashi H, Ishihara H, Koshiba h, Kusu-ki I, Kado N, et al. Oestrogen receptor-alpha gene polymorphism is associated with endometriosis, adenomyosis and leiomyomata. *Hum Reprod*. 2001;16:51-5.
- 30- Derman SG, Seifer DB. In vitro fertilization in the older patient. *Curr Women's Health Rep*. 2003;3(5):375-83.
- 31- Popovic-Todorovic B, Loft A, Lindhard A, Bangsboll S, Andersson AM, Andersen AN. A prospective study of predictive factors of ovarian response in 'standard' IVF/ICSI patients treated with recombinant FSH. A suggestion for a recombinant FSH dosage normogram. *Hum Reprod*. 2003;18(4):781-7.
- 32- Goldstein DB, Need AC, Singh R, Sisodiya SM. Potential genetic causes of heterogeneity of treatment effects. *Am J Med*. 2007;120(4 Suppl 1):S21-5.
- 33- Speroff L, Fritz MA. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, 7<sup>th</sup> Edition, Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins. 2005;pp:1135-73.