

بررسی ارتباط پلی مورفیسم 1082G/A ژن گیرنده استروژن با سقط مکرر جنین توسط روش AS-PCR

سحر دارایی¹، سید عبدالحمید انگجی²، سعید مروتی³، محمد طهماسب²، ندا عساری¹

1. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی گرایش ژنتیک، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم سلولی و مولکولی، کرج، ایران.

2. استادیار، گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی تهران، تهران، ایران.

3. مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران (مؤلف مسؤل)، تلفن ثابت 021-77818888، Morovvati@bmsu.ac.ir.

چکیده

مقدمه: سقط جنین خاتمه غیر ارادی بارداری قبل از هفته بیستم است. سقط جنین اگرچه یک تجربه شایع است، اما این دلیل بر آسان بودن آن نیست و می توان با بررسی دلایل آن به سمت درمان و پیشگیری از این عارضه قدم برداشت. در این میان، زنانی که بیش از سه بار سقط پی در پی را تجربه می کنند دچار سقط مکرر هستند. در سقط مکرر به عنوان یک بیماری چند عاملی مسائل متعددی از جمله اختلالات سیستم ایمنی، آناتومیک، هورمونی و ژنتیکی دخیل می باشند. بیش از 50 درصد موارد، علتی برای سقط مکرر شناسایی نمی شود. چند شکلی های ژنتیکی می تواند یکی از دلایل سقط مکرر باشد. از جمله عوامل کاندیدی که در این تحقیق مورد بررسی قرار می گیرد چند شکلی ژن گیرنده استروژن نوع بتا می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه، 80 زن با سابقه سقط مکرر خود به خودی با علت نامشخص و 80 زن بدون سابقه سقط مکرر و دارای حداقل دو باروری موفق به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. ما در این تحقیق، بررسی این چند شکلی را با روش AS-PCR انجام داده ایم که نسبت به روش های دیگر بررسی SNP روشی آسان تر و کم هزینه تر می باشد.

یافته ها: فراوانی پلی مورفیسم rs1256049 در میان زنان دچار سقط مکرر و زنان گروه کنترل به ترتیب 80% و 62/5% بود. فراوانی ژنوتیپ های دو گروه شاهد و بیمار در جمعیت مورد مطالعه با هم تفاوت معنی داری دارد ($p=0/028$).

نتیجه گیری: بین چند شکلی ژن گیرنده استروژن (rs1256049 G/A) و سقط مکرر در جمعیت مورد مطالعه رابطه آماری معنی داری وجود دارد، بنابراین چند شکلی ژن گیرنده استروژن می تواند به عنوان یک ژن کاندید موثر در سقط مکرر در این جمعیت معرفی گردد.

واژه های کلیدی: پلی مورفیسم 1082G/A، ژن گیرنده استروژن، سقط مکرر

و وصول مقاله: 93/10/23 اصلاحیه نهایی: 94/3/6 پذیرش: 94/3/10

مقدمه

شایع ترین عارضه در سه ماهه اول و دوم حاملگی سقط جنین است. مفهوم سقط جنین به ختم بارداری پیش از هفته بیستم اطلاق می شود. در این میان، زنانی که بیش از سه بار سقط جنین پی در پی را تجربه می کنند دچار سقط مکرر هستند. در سقط مکرر به عنوان یک بیماری چند عاملی مسائل متعددی از جمله اختلالات ساختمانی رحم، مشکلات هورمونی، اختلالات کروموزومی، سندرم تخمدان پلی کیستیک، بیماری های خود ایمنی و اختلالات همراه با افزایش انعقاد پذیری دخیل است و همچنین مسائل ژنتیکی از جمله چند شکلی های ژنتیکی به عنوان یکی دیگر از دلایل سقط مکرر می توانند مطرح باشند (1و2).

استروژن یکی از دو هورمون جنسی استروئیدی در زنان است که بوسیله تخمدان ترشح می شود. اکثر تنظیم های هیپوفیزی تخمدان با تأثیر دو هورمون استروژن و پروژسترون صورت می گیرد. استروژن در رشد جنینی، بروز صفات ثانویه جنسی، سیکل باروری و نگهداری بارداری نقش مهمی ایفا می کند. علاوه بر این استروژن رشد و تمایز سلول های اندومتر را نیز تنظیم می کند (3). به طور کلی جنبه های مختلف باروری، شکل گیری فولیکولها و بلوغ تخمکها تحت تاثیر استروژن و گنادوتروپین های هیپوفیزی شامل LH و FSH صورت می گیرد (4). برای تنظیم عملکرد فیزیولوژیکی دستگاه تناسلی زنانه، توسط هورمون های استروئیدی وجود گیرنده این هورمون در سلول های هدف ضروری می باشد که بدین منظور این هورمون ها باید به گیرنده های اختصاصی خود متصل شوند. این گیرنده ها به عنوان مولکول های تنظیم کننده ژن در سلول های هدف وجود دارند و به صورت اختصاصی پیوند محکمی با هورمون های استروئیدی برقرار می کنند و پس از اتصال این کمپلکس با اثر بر روی توالی های تنظیم کننده ژن بیان بسیاری از ژنها را تنظیم می کنند (5و6). گیرنده های استروژن به طور اولیه در سلول های رحم، واژن، پستان و مغز و به طور

اختصاصی در تخمک، سلول های گرانولوزا و سلول های اپی تلیال تخمدان وجود دارند. گیرنده استروژن به 2 نوع آلفا ($ER\alpha$) و بتا ($ER\beta$) تقسیم می شود. نوع آلفا در تمام بافت های پاسخ دهنده به استروژن وجود دارد؛ اما گیرنده بتا در بافت های محدودتری یافت شده است (7). تحقیقات جدید نشان می دهند که تغییرات بسیار اندک در سطح استروژن زنان می تواند توجیه کننده 70 درصد جنین های سالمی باشد که در لانه گزینی دچار مشکل می شوند (8). ژن کد کننده $ER\beta$ روی کروموزوم 14 (14q23.2) قرار دارد (9). ژنوم انسان تقریباً شامل 25 تا 40 هزار ژن می باشد که در 3/2 میلیارد نوکلئوتید DNA کد شده است. ژنوم افراد مختلف تقریباً 99/9 درصد مشابه یکدیگر می باشند؛ تفاوت در 0/1 درصد ژنوم باعث 11 میلیون نوع چندشکلی ژنی می گردد (10). پلی مورفیسم و یا تفاوت های ژنتیکی در ژن های کدکننده پروتئین ها ممکن است مسئول بعضی تفاوت های مشاهده شده در زمینه فیزیولوژیک، بیوشیمی و پاسخ به داروها باشد. ژن گیرنده استروژن دارای پلی مورفیسم های مختلفی می باشد. پلی مورفیسم rs1256049 ژن گیرنده استروژن بتا بر روی اگزون شماره 5 ژن قرار دارد و دارای سه نوع ژنوتیپ GG (هموزیگوت طبیعی)، AG (هتروزیگوت) و AA (هموزیگوت جهش یافته) می باشد (11). بر این اساس در این تحقیق رابطه بین پلی مورفیسم rs1256049 ژن گیرنده استروژن با سقط مکرر جنین مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه مورد-شاهدی 80 زن با سابقه ی حداقل سه بار سقط مکرر پیش از هفته بیستم بارداری که به بیمارستان تخصصی الزهرا تبریز در طی سال های 90-92 جهت درمان مراجعه کرده بودند به عنوان گروه بیمار انتخاب شدند. سقط مکرر در این گروه علت مشخصی نداشته و افراد بدون مشکلات سیتوژنتیکی و آناتومی بودند و زنان با اختلالات

R انجام گرفت. تفاوت پرایمر های F1 و F2 در نوکلئوتید انتهایی 3' می باشد که این نوکلئوتید متفاوت همان SNP می باشد. ناحیه ای از پرایمر که باید کاملاً با الگو مطابقت داشته باشد انتهای 3' است. زیرا DNA پلی مر از انتهای 3' پرایمر همانندسازی را آغاز می کند و به همین دلیل انتهای 3' پرایمر نقش عمده ای در تکثیر صحیح توالی هدف به عهده دارد. به طور کلی حداقل سه نوکلئوتید آخر انتهای 3' بایستی کاملاً با توالی DNA الگو مکمل باشند (12). لذا اگر انتهای 3' با DNA الگو مطابقت نداشته باشد واکنش PCR انجام نخواهد گرفت. محصولات PCR سپس بوسیله الکتروفورز روی ژل آگارز 1% جدا و بوسیله رنگ آمیزی برومید اتیدیوم شناسایی شدند. اگر واکنش PCR برای هر فرد در دو آزمایش با پرایمر های F1 و F2 انجام می شد فرد هتروزیگوت بود و اگر تنها در یکی از دو آزمایش واکنش PCR انجام می شد فرد هموزیگوت بود. بنابراین احتمال 3 نوع ژنوتیپ GG، GA و AA وجود داشت. بعد از بررسی تک تک افراد از نظر هتروزیگوتی و هموزیگوتی، داده ها با استفاده از نرم افزار آنالیز آماری SPSS ver.18 بررسی شدند تا وجود یا عدم وجود رابطه بین چند شکلی ژن گیرنده استروژن با سقط مکرر جنین مورد بررسی قرار گیرد. فراوانی سه حالت نرمال، هتروزیگوت و هموزیگوت در دو گروه بیمار و شاهد برای این پلی مورفیسم با استفاده از آزمون χ^2 مورد بررسی قرار گرفت و نتایج بدست آمده با سطح معنی داری کمتر از 0/05 مقایسه شد.

رحمی، کاربوتایپ های غیر طبیعی، عفونت ها و اختلالات ایمنونولوژیکی از جامعه مورد مطالعه ما حذف گردیدند. گروه شاهد نیز شامل 80 زن بدون سابقه سقط مکرر و دارای حداقل دو باروری موفق می باشند. گروه شاهد به صورت همسان سازی جفتی و از میان مراجعه کنندگان به همان بیمارستان انتخاب شدند و از نظر سن و منطقه جغرافیایی با گروه بیمار همسان شده اند.

برای انجام آزمایش از هر فرد 10ml خون محیطی در لوله های حاوی EDTA جهت جلوگیری از انعقاد خون گرفته شد. پس از استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA از خون به روش ستونی محصول شرکت Gene All کره جنوبی DNA حاصل برای تعیین پلی مورفیسم rs1256049 ژن گیرنده استروژن واقع در اکزون 5 در دمای 20- نگهداری شد. غلظت و خلوص DNA استخراج شده از طریق روش اسپکتروفتومتری با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین گردید. برای بررسی پلی مورفیسم در ژن گیرنده استروژن از روش AS-PCR استفاده شد. برای این منظور 1μl از DNA با 1μl از هر پرایمر انتخابی و 9μl Master Mix و 13μl آب مخلوط شد. توالی پرایمرها در جدول 1 آمده است.

مراحل PCR با یک مرحله دناتوراسیون در 94°C برای مدت 5 دقیقه شروع شد. سپس بوسیله 35 دور در 94°C (1 دقیقه) و 58°C (1دقیقه) و 72°C (1دقیقه) و در مرحله پایانی در 72°C برای 5 دقیقه دنبال شد. واکنش PCR برای هر فرد بطور جداگانه 2 بار انجام گرفت. واکنش اول با پرایمر های F1 و R؛ و واکنش دوم با پرایمر های F2 و

جدول 1. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی پلیمورفیسم 1082G/A ژن گیرنده استروژن

اندازه محصول PCR (bp)	توالی پرایمر	پلیمورفیسم
232	F1- 5'-TCAGCCTGTTTCGACCAAGTG-3'	ESR2-1082G/A
	F2- 5'-TCAGCCTGTTTCGACCAAGTA-3'	
	R- 5'-TGACCCAGTGAAGGAGCTG-3'	
	F ₂ : پرایمر پیشرونده جهش یافته	F ₁ : پرایمر پیشرونده وحشی
	R: پرایمر معکوس مشترک	ESR2: ژن گیرنده استروژن نوع بتا

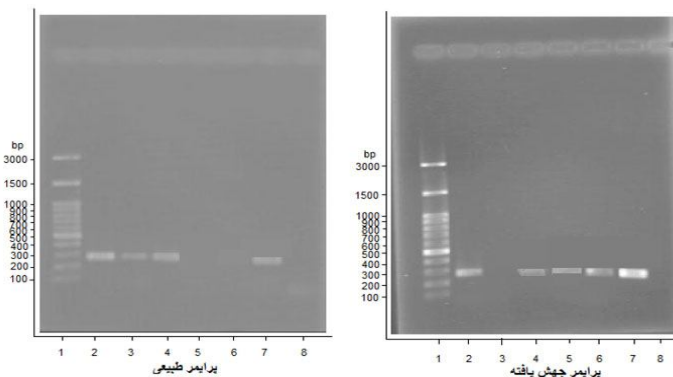
نتایج

در مطالعه حاضر ما تاثیر پلی مورفیسم rs1256049 ژن گیرنده استروژن را با سقط مکرر در 80 زن با سابقه ی حداقل سه بار سقط مکرر و 80 زن بدون سابقه ی سقط مکرر و حداقل با دو بارداری موفق مورد بررسی قرار دادیم. در شکل 1 نمونه ای از نتایج PCR نشان داده شده است. در این شکل ستون دوم چهارم و هفتم افراد با ژنوتیپ هتروزیگوت را نشان می دهند که با هر دو نوع پرایمر طبیعی و جهش یافته واکنش PCR انجام داده اند. ستون سوم یک فرد هموزیگوت طبیعی یا نرمال را نشان می دهد که فقط با پرایمر طبیعی واکنش PCR انجام داده است و ستون پنجم و ششم افراد هموزیگوت جهش یافته را نشان می دهند که تنها به پرایمر جهش یافته پاسخ داده اند.

فراوانی الل و ژنوتیپ پلی مورفیسم rs1256049 برای افراد کنترل و نمونه در جدول 2 آمده است. فراوانی ژنوتیپ های GA، GG و AA برای افراد نمونه به ترتیب 37/5 %، 50 % و 12/5 % و برای افراد کنترل به ترتیب 20 %، 70 % و

10 % بود. ژنوتیپ پلی مورفیسم rs1256049 در آزمون 5 ژن گیرنده استروژن در دو گروه کنترل و نمونه متفاوت بود. با توجه به انجام آزمون χ^2 و $P=0/028$ بین سقط مکرر و این پلی مورفیسم در جمعیت مورد مطالعه رابطه آماری معنی داری وجود داشت.

پراکنش ژنوتیپ و الل ها در افراد کنترل و نمونه با تعادل هاردی واینبرگ بررسی شد (جدول 3). ستون اول مربوط به فراوانی ژنوتیپ های مشاهده شده در هر گروه می باشد. ستون دوم فراوانی الل های مربوطه را نشان می دهد و ستون سوم نیز مربوط به فراوانی ژنوتیپ های مورد انتظار تحت تعادل هاردی واینبرگ در هر گروه می باشد. همانطور که مشاهده می شود فراوانی ژنوتیپ های مشاهده شده با ژنوتیپ های قابل انتظار در تعادل هاردی واینبرگ در نمونه های بیمار ژن گیرنده استروژن بتا انحراف از تعادل هاردی واینبرگ را نشان می دهند ($P=0/03$).



شکل 1. مقایسه الکتروفورز محصول PCR برای جفت پرایمر طبیعی و جهش یافته ژن گیرنده استروژن. 1: شاخص وزن مولکولی (100 bp) DNA، 2، 4 و 7: هتروزیگوت، 3: هموزیگوت طبیعی، 5 و 6: هموزیگوت جهش یافته، 8: کنترل منفی

جدول 2. بررسی ژنوتیپ های rs1256049 با سقط مکرر

P	Df	X2 statistic	ژنوتیپ			بیمار
			AA	GA	GG	
0/028	2	7/15	8(0/1)	56(0/7)	16(0/2)	ژن گیرنده استروژن نوع بتا (ESR2)
			10(0/125)	40(0/5)	30(0/375)	

جدول 3. بررسی تعادل هاردی واینبرگ ژن گیرنده استروژن بتا برای دو گروه کنترل و بیمار

تعداد ژنوتیپ های قابل انتظار در تعادل هاردی واینبرگ						تعداد ژنوتیپ های مشاهده شده					
p	X2 statistic	آل های مشاهده شده			A	G	آل های مشاهده شده			بیمار	
		AA	GA	GG			AA	GA	GG		
0/03	13/27	16/2	40	24/2	72	88	80	8	56	16	بیمار
0/9	0/34	11/25	37/5	31/25	60	100	80	10	40	30	کنترل
0/09	9/27	27/45	77/5	55/45	132	188	80	18	96	46	کل

بحث

ما در این مطالعه رابطه ی بین چندشکلی 1082G/A ژن گیرنده استروژن را با سقط مکرر توسط روش AS-PCR بررسی کردیم که رابطه آماری معنی داری یافت شد ($P=0/028$). استروژن نقش اساسی را در تشکیل و تکامل فولیکول و همچنین نگهداری بارداری در ماه های اول ایفا می کند. طبق مطالعات انجام شده موش های ماده فاقد $ESR1(\alpha)$ نا بارور می باشند و در آن ها جسم زرد تشکیل نمی شود و سطح گنادوتروپین تغییر می کند (13). موش های ماده فاقد $ESR2(\beta)$ نیز دارای فنوتیپ نا بارور با کاهش تعداد تخمک ها می باشد که ممکن است به دلیل کاهش پاسخ تخمدان به گنادوتروپین ها باشد (13). در این مطالعه ارتباط بین موتاسیون rs1256049(G/A) در ژن گیرنده استروژن بتا با سندرم سقط مکرر خود به خودی مورد بررسی قرار گرفت. Pineda و همکاران (14) در سال 2008 دو SNP در $ESR\beta$ در اینترون های 2 و 8 و چهار پلی مورفیسم در $ESR\alpha$ در اینترون های 1، 4 و 8 را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه از 177 بیمار با

تجربه یکبار سقط و 442 زن به عنوان شاهد استفاده گردید. بین دو پلی مورفیسم rs2234693(C>T, defined by restriction enzyme *PvuII*) و rs9340799(A>G, defined by restriction enzyme *XbaI*) در اینترون 1 ژن $ESR\alpha$ با سقط مکرر رابطه ی آماری معنی داری یافت شد اما دو SNP ژن $ESR\beta$ با سقط مکرر جنین رابطه ی نداشتند. جهت بررسی SNP از روش RFLP استفاده شده بود. مطالعه دیگری توسط Courtney Hanna و همکاران (15) در سال 2010 انجام گرفت. در این تحقیق 35 پلی مورفیسم از 20 ژن مختلف از جمله rs1256049 و CA repeat در ژن گیرنده استروژن نوع بتا با روش Sequenom iPLEX مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه از 227 بیمار با سابقه ی بیش از دو بار سقط و 130 فرد در گروه شاهد استفاده گردید. در این مطالعه CA repeat ژن گیرنده استروژن نوع بتا به عنوان یک ژن کاندید موثر در سقط مکرر معرفی گردید ($P=0/026$) یک بررسی هم توسط Jingling HU (16) و همکاران در سال 2012 در جمعیت چین انجام گرفته است که در آن دو پلی مورفیسم مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیستم / آذر و دی 1394

(rs4986938 و rs1256049) توسط روش RFLP با 196 بیمار با سابقه ی دو بار سقط جنین و 182 زن با عنوان کنترل مورد بررسی قرار گرفته اند. تفاوت آماری معنی داری بین این دو پلی مورفیسم با سقط مکرر یافت نشد. نتایج بدست آمده در این پژوهش نشان داد که موتاسیون rs1256049 می تواند در سقط مکرر زنان استان آذربایجان شرقی موثر باشد. یک توضیح برای تناقض مشاهده شده بین مطالعات انجام شده بر روی پلی مورفیسم ژن گیرنده استروژن در کشورهای مختلف می تواند وجود توزیع جغرافیایی و نژادی مختلف این پلی مورفیسم باشد. همچنین در هر یک از این مطالعات معیارهای مختلفی در انتخاب گروه زنان بیمار وجود دارد که این امر می تواند منجر به نتایج ضد و نقیض در بررسی های مختلف گردد. مزیتی که این مطالعه نسبت به دیگر بررسی های انجام شده دارد این است که نمونه های بیمار با دقت و حساسیت بالایی انتخاب شده اند. این افراد دارای حداقل سه بار سقط مکرر می باشند و از نظر آزمایشات سیتوژنتیکی و آناتومی کاملاً نرمال بوده و هیچ مشکل بالینی ندارند و هر فردی که دارای علت احتمالی برای سقط مکرر بود از جامعه آماری ما حذف گردید. لذا در این افراد که هیچگونه دلیل سیتوژنتیکی و آناتومی در آزمایشات آنها مشاهده نشده فرضیه تاثیر پلی مورفیسم های ژنتیکی را بر این روند قوت می بخشد اما باید دقت داشت که جهت ارتباط یک بیماری با یک عامل ژنتیکی به انجام مطالعات زیاد در جمعیت های مختلف نیاز است و نمی توان به راحتی ژنتیکی بودن یک فنوتیپ خاص را با انجام چند مطالعه محدود در جمعیت های خاص نتیجه گرفت. چرخه تولید مثل زنان شامل تمایز جنسی، سیکل قاعدگی و مراحل اولیه بارداری توسط سیستم هیپوتالاموس-هیپوفیز-تخمدان¹ کنترل می شود. این حلقه فیدبک با آزاد شدن هورمون گنادوتروپین از هیپوتالاموس شروع می شود. این

هورمون سبب آزاد شدن LH و FSH از غده هیپوفیز می شود. LH و FSH نیز سبب کنترل ترشح دو هورمون استروژن و پروژسترون از تخمدان می شود (17). هرگونه تغییر در سطح این هورمون ها و دیگر عواملی که روی این سیستم HPO تاثیر می گذارند می تواند اثر منفی روی باروری و بارداری داشته باشد. مطالعات نشان داده است که تغییر در سطح گنادوتروپین و استرادیول با سقط مکرر در ارتباط است (18 و 19). بنابراین ما فرض کردیم که پلی مورفیسم ژنتیکی در ژن هایی که سبب تنظیم سیستم HPO می شوند می توانند با سقط مکرر در ارتباط باشد. استروژن نقش کلیدی در فعالیت تخمدان و عملکرد سلول های گرانولوزا ایفا می کند. استروژن همچنین نقش بسیار مهمی در رشد و نمو جنین، تکامل و بلوغ فولیکول ها، چرخه تولید مثل و نگهداری بارداری دارد. علاوه بر این استروژن دارای یک نقش تنظیمی و نظارتی در رشد و تمایز سلول های آندومتر است (20). این تاثیرات به برهمکنش استروژن با گیرنده اش وابسته است. پلی مورفیسم در گیرنده استروژن می تواند باعث اختلال در عملکرد استروژن گردد. این عمل ممکن است روی تکامل یا رشد فولیکول ها و در نتیجه باعث کاهش اندازه فولیکول ها گردد. این اختلال به شدت پلی مورفیسم وابسته است. طی مطالعه ای نشان داده شده که افراد هموزیگوت بیمار دارای اندازه فولیکول کوچک تری نسبت به افرادی که پلی مورفیسم ندارند هستند (21).

اهمیت عملکردی پلی مورفیسم 1082 G/A هنوز به طور کامل شناخته نشده است. اگرچه که این پلی مورفیسم در ژن ERβ منجر به تغییر اسید آمینه ای در پروتئین ERβ نمی شود اما ممکن است که این پلی مورفیسم در عدم تعادل ارتباط² با دیگر تغییرات توالی تنظیمی که ممکن است بیان ژن را تحت تاثیر قرار دهند باشد (22). علاوه بر این در مطالعات اخیر نشان داده شده ژن هایی که دارای SNP

¹ hypothalamus-pituitary-ovarian (HPO)² Linkage disequilibrium

محترمی که داوطلبانه ما را در این زمینه یاری نمودند کمال تشکر را به عمل آورند.

هستند می‌توانند باعث تفاوت در ساختار تاخوردگی³ mRNA شوند. این mRNA های تغییر یافته ممکن است دارای عملکرد متفاوتی باشند که باعث تداخل در دیگر اجزای سلولی می‌شوند. تغییر در تاخوردگی mRNA باعث تاثیر روی فرایند splicing، پردازش و تنظیم رونویسی می‌شود (23).

نتیجه گیری

نتایج بدست آمده در این پژوهش نشان داد که موتاسیون rs1256049 می‌تواند در سقط مکرر زنان در جمعیت مورد مطالعه موثر باشد و به عنوان یک ژن کاندید موثر در سقط مکرر در این جمعیت معرفی گردد. جهت تایید رابطه ی پلی مورفیسم یک ژن با یک بیماری خاص لازم است که آن ژن در جمعیت ها و مناطق جغرافیایی مختلف مورد بررسی قرار گیرد. لذا پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آتی این پلی مورفیسم در دیگر جمعیت ها نیز مورد بررسی قرار گیرد تا بتوان با اطمینان بیشتری این رابطه را تایید کرد. در پایان در صورتیکه بتوان با انجام مطالعات تکمیلی و تعیین پلی مورفیسم های مختلف ژن گیرنده استروژن بتا و تایید رابطه آن ها با سقط مکرر، می‌توان مراکز را جهت انجام تست های ژنتیکی در کشور راه اندازی نمود و با روش های ژن درمانی به درمان این بیماری که برای بسیاری از زوجین به یک مشکل اساسی تبدیل شده است پرداخت. همچنین انجام این پژوهش ها می‌تواند در اغنای افکار مدیران بیمه های درمانی برای تحت پوشش قرار دادن بیماران مبتلا به سقط مکرر مفید باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از زحمات فراوان پرسنل محترم مرکز خونگیری بیمارستان طالقانی تبریز و آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه بقیه الله تهران به ویژه کارشناس آزمایشگاه خانم احمدی و همچنین بیماران

³ Folding

Reference

1. Aruna M, Reddy BM. Recurrent spontaneous abortions. An overview of the genetic and non-genetic backgrounds. *Int J Hum Genet* 2006; 6: 109-117.
2. Sierra S, Stephenson M. Genetics of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2006; 24: 17-24.
3. Meldrum DR. Female reproductive aging ovarian and uterine factors. *Fertil Steril* 1993; 59: 1-5.
4. Rebar RW. Premature ovarian failure. In: Lobe RA, Kelsey R, Marcus R, editor. *In Biology and pathology*. Academic Press. San Diego 2000; 255.
5. Kovas P, Matyas SZ, Boda K, Kaal SG. The effect of endometrial thickness on IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod* 2003; 18(11): 2337-41.
6. 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.
7. 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: 451-61.
8. 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 USA* 2003; 100: 2963-2968.
9. Enmark E, Pelto-Hukko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, et al. Human estrogen receptor b-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997; 82: 4258-65.
10. Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocrine* 1999; 20: 358-417.
11. Stephanie L, Huang Y, Brian R, Anna M, Huang M, Cox C, et al. Do estrogen receptor β polymorphisms play a role in the pharmacogenetics of estrogen signaling?. *Curr Pharmacogenomics Person Med* 2008; 6: 239-259.
12. Birdsell N, Pearson T, Price P, Hornstra M, Nera D, Stone N, et al. Melt analysis of mismatch amplification mutation assays (Melt-MAMA): A functional study of a cost-effective SNP genotyping assay in bacterial models. *PloS One* 2012; 7: e32866.
13. Emmen JM, Korach KS. Estrogen receptor knockout mice: phenotypes in the female reproductive tract. *Gynecol Endocrinol* 2003; 17: 169-176.
14. Pineda B, Hermenegildo C, Tarín J, Laporta P, Cano A, García-Pérez M. Alleles and haplotypes of the estrogen receptor alpha gene are associated with an increased risk of spontaneous abortion. *Fertility and Sterility* 2010; 1809-1815.
15. Courtney H, Karla B, Liu C, Mary S, Wendy R. Genetic variation within the hypothalamus-pituitary-ovarian axis in women with recurrent miscarriage. *Human Reproduction* 2010; 25: 2664-2671.
16. Hu J, Wang J, Xiang H, Li Z, Wang B, Cao Y, et al. Association of polymorphisms in the estrogen receptor β (ESR2) with unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA) in Chinese population. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25: 1727-9.
17. Djahanbakhch O, Ezzati M, Zosmer A. Reproductive ageing in women. *J Pathol* 2007; 211: 219-231.
18. Gurbuz B, Yalti S, Ozden S, Ficicioglu C. High basal estradiol level and FSH/LH ratio in unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Gynecol Obstet* 2004; 270: 37-39.

19. Li TC, Spuijbroek MD, Tuckerman E, Anstie B, Loxley M, Laird S. Endocrinological and endometrial factors in recurrent miscarriage. *BJOG* 2000; 107: 1471–1479.
20. Saunders PT. Does estrogen receptor beta play a significant role in human reproduction? *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16: 222-7.
21. Albrecht ED, Aberdeen GW, Pepe G. The role of estrogen in the maintenance of primate pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 432–438.
22. Critchley HO, Brenner RM, Henderson TA, Williams K, Nayak NR, Slayden OD, et al. Estrogen receptor beta, but not estrogen receptor alpha, is present in the vascular endothelium of the human and nonhuman primate endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1370-8.
23. Shen L, Basilion J, Stanton VP J. Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7871–7876.