

# C29T (Pro10Leu) Polymorphism of Transforming Growth Factor $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ ) gene and unexplained infertility in Iran

Farnaz Marhemati<sup>1</sup>, Anahita Mohseni Meybodi<sup>2</sup>, Robabeh Taheripناه<sup>3</sup>, Davar Amani<sup>3, 4\*</sup>

1. M.Sc. Student of immunology, International Branch, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Department of Genetic at Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran.

3. Department of Gynecology and Obstetrics, Reproductive Health Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4. Department of Immunology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

(Received: 2015/6/16    Accept: 2016/9/30)

## Abstract

**Background:** The increasing incidence of infertility is alarming. About %30-10 of infertilities are classified as unexplained infertility (UI), which is not an absolute clinical condition. TGF- $\beta_1$  is multifunctional cytokine and produced mainly by T regulatory (Treg) lymphocytes. This cytokine plays an important role in physiology of normal pregnancy. The association of single nucleotide Polymorphisms (SNPs) of TGF- $\beta_1$  gene with many immunologic diseases has been reported. In this study, the association of TGF- $\beta_1$  C29T (Pro10Leu) gene polymorphism with unexplained infertility was investigated in Iranian UI patients.

**Materials and Methods:** In this case-control study blood samples were collected from 177 UI patients (142 male and 35 female) and 336 controls (232 male and 104 female) with no history of infertility. DNA was extracted by salting out method. Analysis of the TGF- $\beta_1$  gene polymorphism C29T (Pro10Leu) was performed by PCR and automated sequencing method.

**Results:** The genotype distributions and allele frequencies of TGF- $\beta_1$  gene C29T (Pro10Leu) polymorphism were not statistically significant between different categories of UI patients and control group ( $p > 0.05$ ).

**Conclusion:** The results of this study showed, C29T (Pro10Leu) polymorphism of TGF- $\beta_1$  gene may not be associated with unexplained infertility and further studies are necessary to clarify the association of TGF- $\beta_1$  polymorphisms and susceptibility to unexplained infertility.

**Keywords:** Infertility, Polymorphism, Cytokine, TGF- $\beta_1$  gene, Unexplained infertility

\*Corresponding author: Davar Amani, Tel: 22439970-021, Email: amanid@sbm.ac.ir

# بررسی ارتباط پلی مورفیسم C29T (Pro10Leu) ژن TGF-β1 و ناباروری با علت نامشخص در ایران

فرناز مرحمتی<sup>۱</sup>، آناهیتا محسنی میبدی<sup>۲</sup>، ربابه طاهری پناه<sup>۳</sup>، داور امانی<sup>۴\*</sup>

(۱) دانشجوی کارشناسی ارشد ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، شعبه بین المللی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.  
(۲) پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولیدمثل جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه ژنتیک، تهران، ایران.  
(۳) گروه زنان و زایمان و نازایی، مرکز تحقیقات بهداشت باروری و ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.  
(۴ و ۳) مرکز تحقیقات بهداشت باروری و ناباروری و گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۷/۸

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۳/۲۶

## چکیده

**سابقه و هدف:** ناباروری از جمله بیماری‌هایی محسوب می‌شود که شیوع روزافزون و نگران کننده‌ای دارد. ۱۰ تا ۳۰ درصد از ناباروری‌ها به‌عنوان با علت نامشخص (UI) دسته‌بندی می‌شوند. وضعیت مطلق از لحاظ بالینی نیست، بلکه به ناتوانی در باردارشدن یا زنده‌زایی گفته می‌شود. TGF-β1 سایتوکاینی با عملکرد تنظیم ایمنی قوی است و فرآیند لانه گزینی و اتصال سلول‌های تروفوبلاست به ماتریکس خارج سلولی را تنظیم می‌کند. در این مطالعه ارتباط پلی مورفیسم C29T (Pro10Leu) ژن TGF-β1 و ناباروری با علت نامشخص در بیماران ایرانی بررسی شد. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مورد-شاهد نمونه‌های خون از ۱۴۲ مرد و ۳۵ زن نابارور و ۲۳۲ مرد و ۱۰۴ زن سالم و بدون سابقه ناباروری (گروه کنترل) جمع‌آوری شد. استخراج DNA توسط روش حذف نمک<sup>۲</sup> و تکثیر قطعه حاوی پلی مورفیسم موردنظر توسط روش PCR<sup>۳</sup> انجام شد. برای بررسی پلی مورفیسم C29T (Pro10Leu) ژن TGF-β1 و تعیین ژنوتیپ افراد از روش Automated Sequencing استفاده شد. **یافته‌ها:** اختلاف معناداری در فراوانی توزیع ژنوتیپ‌ها و آلل‌های مختلف پلی مورفیسم C29T (Pro10Leu) در مقایسه بین گروه‌های مختلف بیماران و گروه کنترل و همچنین بررسی زوج‌های نابارور و کنترل مشاهده نشد (P value < ۰/۰۵). **نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان می‌دهد بین ناباروری با علت نامشخص و پلی مورفیسم C29T (Pro10Leu) ژن TGF-β1 ارتباط معناداری وجود ندارد. برای مشخص شدن رابطه این پلی مورفیسم و استعداد ابتلا به ناباروری با علت نامشخص، به مطالعات مرتبط بیشتری نیاز است.

**کلیدواژه:** ناباروری، پلی مورفیسم، سایتوکاین، ژن TGF-β1، ناباروری با علت نامشخص

## مقدمه

بالینی معین نیست، بلکه به مجموعه‌ای از شرایط اطلاق می‌شود که به‌وسیله عوامل مختلفی (۹) ایجاد شده و نتیجه تمامی آن‌ها به‌صورت عدم توانایی در انتقال ماده وراثتی به نسل بعد ظهور می‌یابد. ناباروری بدون علت نامشخص را می‌توان به‌صورت یک سندرم چند عاملی تعریف کرد که طیف وسیعی از اختلالات را دربرمی گیرد (۴).

برخی از این زوج‌ها بدون درمان نیز صاحب فرزند می‌شوند و برخی دیگر که توسط روش‌های نوین مانند IVF<sup>۴</sup> و ICSI<sup>۵</sup> باردار می‌شوند نیز نسبت به بارداری‌های طبیعی از سرنوشت موفق بارداری برخوردار خواهند شد (۱۰-۱۲). هیستروسکوپی<sup>۶</sup> و لاپاراسکوپی<sup>۷</sup> و بیوپسی‌های<sup>۸</sup> رحمی باید به‌عنوان روش‌های اصلی و نوین تشخیصی در بررسی بیماران UI استفاده شوند تا عارضه‌های پنهان شناسایی شده و درمان مناسب انجام شود (۱۳-۱۵).

ناباروری از جمله بیماری‌هایی محسوب می‌شود که شیوع روزافزون و نگران کننده‌ای دارد. ناباروری به ناتوانی یک زوج در باردارشدن پس از یک سال رابطه جنسی بدون جلوگیری از بارداری اطلاق می‌شود (۱،۲) که در ۱۰ تا ۱۵ درصد از زوج‌ها دیده می‌شود (۳).

تخمین زده می‌شود در دنیا سالانه ۶۰ تا ۸۰ میلیون زوج از مشکل ناباروری رنج می‌برند (۴). بنا بر یک ارزیابی که در سال ۲۰۱۲ توسط سازمان بهداشت جهانی انجام شد، در کشورهای درحال توسعه یک زوج از هر چهار زوج، از ناباروری رنج می‌برند (۵). در مطالعه‌ای که در سال ۱۳۸۴ در ایران انجام شد، میزان شیوع ناباروری اولیه ۲۴ درصد گزارش شده است (۶).

۱۰ تا ۳۰ درصد از زوجین نابارور به‌عنوان نابارور با علت نامشخص (UI) دسته‌بندی می‌شوند (۱، ۷، ۸). اصطلاح «ناباروری بدون علت مشخص» بیانگر یک سندرم

1- Unexplained Infertility

2- Salting out

3- Polymerase Chain Reaction

4- In vitro fertilization Infertility

5- Intra cytoplasmic sperm injection

6- Hysteroscopy

7- Laparoscopy

8- Biopsy

نویسنده مسئول: داور امانی

پست الکترونیک: amanid@sbmu.ac.ir

تلفن: ۰۲۱ ۲۲۳۳۹۷۰۰

دستگاه اسپکتروفتومتر<sup>۴</sup> استفاده و نسبت OD<sup>5</sup>260/OD280 بررسی شد. مقدار جذب طول موج ۲۶۰ مربوط به DNA و طول موج ۲۸۰ مربوط به پروتئین است. DNAها با نسبت 280OD/260OD حدود ۲-۱/۸ مناسب بوده و فاقد آلودگی‌های پروتئینی و RNA بودند.

قطعه DNA حاوی پلی مورفیسم موردنظر ۴۹۴ bp طول داشته و توسط روش PCR و به کمک پرایمرهای اختصاصی طراحی شده<sup>۶</sup> رفت 5'-TGTTCGCGCTCTCGGCAGTG-3' و برگشت 5'-AGCCAGTTTCTTCTGCCAGT-3' (۲۷) تکثیر شد.

هر میکروتوب واکنش PCR طبق آنچه در جدول شماره یک آمده است، حاوی اجزای واکنش بود.

جدول ۱) اجزای شرکت کننده در واکنش PCR

#	اجزای واکنش PCR	حجم (μl)
۱	2x PCR MASTERMIX	۱۲
۲	پرایمر رفت (۱۰ pM)	۰/۸
۳	پرایمر برگشت (۱۰ pM)	۰/۸
۴	H <sub>2</sub> O (مقطر و دیونیزه) <sup>۹</sup>	۱۰/۴
۵	DNA (۰/۱ - ۰/۳ mg/μl)	۱
۲۵	حجم نهایی	

دستگاه ترموسایکلر<sup>۹</sup> برای تکثیر قطعه DNA موردنظر طبق آنچه در جدول شماره یک آمده است، برنامه‌ریزی شد.

جدول ۲- برنامه دستگاه ترموسایکلر

مرحله	دما	زمان
First Denaturation	۹۵	۳ دقیقه
Denaturation	۹۴	۴۵ ثانیه
Annealing	۶۳	۴۵ ثانیه
Extension	۷۵	۵۵ ثانیه
مرحله ۲-۴	۳۵ چرخه	
Final Extension	۷۲	۷ دقیقه

## الکتروفورز ژل آگاروز<sup>۱۰</sup>

برای اطمینان از انجام PCR، غلظت مناسب و نبود باندهای غیراختصاصی یا پرایمر-دایمر از الکتروفورز محصول PCR در ژل آگاروز ۱/۵ درصد استفاده شد (شکل شماره ۱).

## تعیین توالی

محصولات PCR به دست آمده به شرکت MacroGene کشور کره فرستاده شدند و برای تعیین توالی از پرایمر اختصاصی برگشت 5'-GCTCCGGTTCTGCACTCT-3' و روش Automated Sequencing استفاده شد (۲۷). برای بررسی فایل‌های الکتروفورگرام مربوط به توالی هر کدام از نمونه‌ها از نرم‌افزار Finch TV نسخه ۱/۴ و برای مطابقت دادن و بررسی توالی نمونه‌ها با توالی مرجع سالم از نرم‌افزار Codon Code Aligner نسخه ۵ استفاده شد (۲۸).

## آنالیزهای آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد. برای

از عوامل ایمنولوژیک مؤثر در یک بارداری موفق می‌توان به TGF-β1 اشاره کرد. TGF-β1 (۱۷، ۱۶) سایتوکاینی چندکاره است که به‌طور عمده توسط سلول‌های T تنظیمی ساخته و ترشح می‌شود. این مولکول سایتوکاینی با عملکرد تنظیم ایمنی قوی است و فرآیند لانه‌گزینی جنین و اتصال سلول‌های تروفوبلاست به ماتریکس خارج سلولی را هدایت می‌کند. همچنین با تحریک تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده، نفوذ تروفوبلاست را به آندومتر مهیا شده تسهیل می‌کند (۱۸-۲۰). مایع منی<sup>۱</sup> حاوی مقادیر زیادی TGF-β1 به فرم فعال و غیرفعال است و از طریق تحریک ساخت سایتوکاین‌های التهاب‌زا و کموکاین‌ها، پاسخ‌های التهابی لانه‌گزینی در بافت رحم را آغاز می‌کند. محیط اسیدی دستگاه تولیدمثل مادر می‌تواند عامل فعال‌سازی TGF-β1 باشد. این سایتوکاین عامل قدرتمند انحراف سیستم ایمنی است و به‌طور احتمال در انحراف پاسخ‌های ایمنی سیستم Th1، تقویت سیستم Th2 و نگهداری بارداری نقش اساسی ایفا می‌کند (۲۱، ۲۲).

در انسان ژن کد کننده TGF-β1 روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۱۹ (۱۹q۱۳،۲-۱۹q۱۳،۱) قرار دارد. طول این ژن حدود ۲۳/۵ Kbp بوده و هفت اگزون دارد. پلی‌مورفیسم C29T (Pro10Leu) در اگزون شماره یک قرار دارد و در کدون شماره ۱۰ آمینواسید پرولین را به لوسین تبدیل می‌کند (۲۳). پلی‌مورفیسم C29T (Pro10Leu) بر میزان تولید TGF-β1 اثر می‌گذارد و گزارش‌های متعددی نیز در این زمینه وجود دارد. آل T در این پلی‌مورفیسم با کاهش سطح سرمی TGF-β1 مرتبط است. بین ژنوتیپ CC و افزایش سطح سرمی TGF-β1 ارتباط مستقیم گزارش شده است (۲۴).

مطالعات مشابه در جوندگان و نخستی‌ها<sup>۲</sup> حاکی از آن است که انتقال سیگنال TGF-β1 در پستانداران یکسان و حفاظت شده<sup>۲</sup> است. در مطالعه‌هایی که روی سلول‌های Hela انجام شد، مشاهده شد سیگنال پپتیدی که در موقعیت شماره ۱۰ دارای آمینواسید پرولین باشد در مقایسه با پروتئینی که دارای آمینواسید لوسین باشد تا میزان ۲/۸ برابر موجب افزایش ترشح TGF-β1 می‌شود (۲۵). این پژوهش برای یافتن ارتباط بین این پلی‌مورفیسم و ناباروری با علت نامشخص طراحی و انجام شد.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری نمونه

در این مطالعه موردی-شاهدی نمونه‌های خون از ۱۴۲ مرد و ۳۵ زن نابارور با میانگین سنی ۳۵/۸±۴/۵ و ۳۱/۹±۴/۹ و ۲۳۲ مرد و ۱۰۴ زن سالم و بدون سابقه ناباروری (گروه شاهد) با میانگین سنی ۳۹±۳ و ۳۲±۳/۷ جمع‌آوری شد. شایان ذکر است ۳۵ زوج نابارور و ۳۵ زوج گروه شاهد در بین افراد شرکت‌کننده در مطالعه حضور داشتند و نمونه‌گیری از هر دو همسر (زن و مرد) انجام شد. افراد مراجعه‌کننده به مرکز ناباروری پژوهشگاه رویان، مرکز تحقیقات بهداشت باروری و ناباروری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و مرکز ناباروری بیمارستان لاله انتخاب شدند. بیماران نابارور و گروه شاهد از سوی پزشکان متخصص زنان و زایمان، اورولوژی و داخلی بررسی شده و افراد با سابقه اختلالات آناتومیک، فیزیولوژیک، هورمونی، عفونی، کروموزومی، ژنتیکی و خودایمنی و همچنین با سابقه زنده‌زایی یا مصرف داروی خاص از مطالعه خارج می‌شوند (به‌طور کلی عامل UI باید ناشناخته باشد).

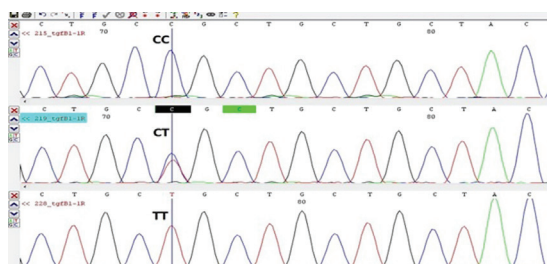
افراد سالم و بارور که دارای فرزند بوده و تاکنون سابقه UI نداشته باشند و از نظر قومیت، سن و جنس و ترجیحاً کیفیت زندگی با گروه بیمار انطباق داشته باشند نیز به‌عنوان گروه شاهد انتخاب می‌شوند. پس از اخذ رضایت‌نامه و تکمیل پرسش‌نامه در ارتباط با شرایط و سوابق بیماران و گروه شاهد، از تمامی افراد شرکت‌کننده در مطالعه مقدار ۱۰ CC خون وریدی جمع‌آوری شد.

### استخراج DNA و انجام PCR

استخراج DNA به روش متداول حذف نمک انجام شد. این روش سریع، مطمئن و ارزان است و به‌جای استفاده از فنل و کلروفرم یا کیت‌های تجاری، از غلظت‌های بالای نمک برای حذف و رسوب کردن پروتئین‌ها استفاده می‌شود (۲۶).

برای بررسی غلظت DNA استخراج‌شده و آلوده نبودن به پروتئین و RNA از

- |                                 |                        |                  |
|---------------------------------|------------------------|------------------|
| 1- Seminal plasma               | 2- Primates            | 3- conserved     |
| 4- Spectrophotometer            | 5- Optical Density     | 6- Forward       |
| 7- Reverse                      | 8- Sterile & Deionized | 9- Thermo cyclor |
| 10- Agarose Gel Electrophoresis | 11- CHI square         |                  |



شکل ۲) توالی خوانش شده از آزمون شماره یک ژن TGF- $\beta$ 1 در جایگاه پلی مورفسم C29T (Pro10Leu) و ژنوتیپ‌های مختلف هموزیگوت و هتروزیگوت با توجه به نتایج آزمون  $\chi^2$  و مقادیر P value محاسبه شده مشخص شد که بین توزیع ژنوتیپ‌های مختلف پلی مورفسم جایگاه C29T (Pro10Leu) ژن TGF- $\beta$ 1 و فراوانی آلل‌های مربوطه در مقایسه بین گروه‌های مختلف بیماران و گروه کنترل، اختلاف معناداری وجود ندارد. به عبارت دیگر توزیع ژنوتیپ‌های مختلف و فراوانی آلل‌های این پلی مورفسم در گروه‌های مورد مطالعه یکسان است. (جدول ۱)

#### مقایسه بین زوج‌های نابارور و زوج‌های گروه کنترل

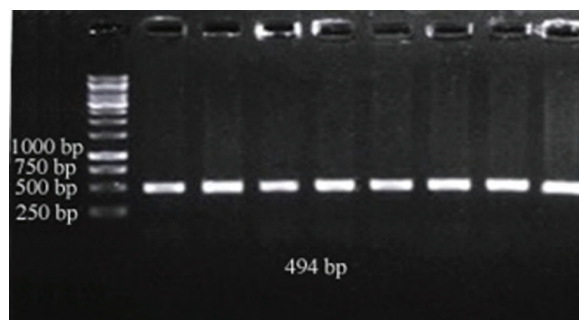
در زوج‌های نابارور ۱۱ نفر از مردان نابارور و شش نفر از مردان کنترل دارای ژنوتیپ هموزیگوت CC، ۱۵ نفر از مردان نابارور و ۲۱ نفر از مردان کنترل دارای ژنوتیپ هتروزیگوت CT و ۹ نفر از مردان نابارور و هشت نفر از مردان کنترل دارای ژنوتیپ هتروزیگوت TT هستند. همچنین ۱۰ نفر از زنان نابارور و پنج نفر از زنان کنترل دارای ژنوتیپ هموزیگوت CC، ۱۶ نفر از زنان نابارور و ۱۷ نفر از زنان کنترل دارای ژنوتیپ هتروزیگوت CT و ۹ نفر از زنان نابارور و ۱۳ نفر از زنان کنترل دارای ژنوتیپ هتروزیگوت TT هستند.

با توجه به نتایج آزمون  $\chi^2$  و مقادیر P value محاسبه شده در این مقایسه نیز بین توزیع ژنوتیپ‌های مختلف پلی مورفسم جایگاه C29T (Pro10Leu) ژن TGF- $\beta$ 1 و فراوانی آلل‌های مربوطه در مقایسه بین گروه‌های مختلف بیماران و گروه کنترل، اختلاف معناداری مشاهده نشد. به عبارت دیگر توزیع ژنوتیپ‌های مختلف و فراوانی آلل‌های این پلی مورفسم در گروه‌های مورد مطالعه یکسان است. (جدول ۲)

مقایسه توزیع فراوانی سه ژنوتیپ مختلف پلی مورفسم کدون ۱۰ در بیماران نابارور و گروه کنترل از آزمون  $\chi^2$  استفاده شد و سطح معناداری بالاتر از ۰/۰۵ تعیین شد ( $P \text{ value} < 0/05$ ).

#### یافته‌ها

برای اطمینان از اختصاصی بودن واکنش PCR و بررسی کیفیت DNAهای تکثیر شده برای واکنش تعیین توالی، محصولات PCR الکتروفورز شدند و همان‌طور که در شکل شماره یک مشاهده می‌کنید، نمونه‌ها از شرایط مطلوبی برخوردار بودند.



شکل ۱) بررسی کیفیت محصولات PCR و عملکرد پرایمرهای اختصاصی روی ژنوم (قطعه DNA به طول ۴۹۴ جفت باز)

#### بررسی توالی

در ناحیه پلی مورفسم C29T (Pro10Leu) ۴۵ نفر از مردان نابارور و ۵۹ نفر از مردان کنترل دارای ژنوتیپ هموزیگوت CC، ۶۰ نفر از مردان نابارور و ۱۱۹ نفر از مردان کنترل دارای ژنوتیپ هتروزیگوت CT و ۳۷ نفر از مردان نابارور و ۵۴ نفر از مردان کنترل دارای ژنوتیپ هتروزیگوت TT هستند. همچنین ۱۰ نفر از زنان نابارور و ۳۰ نفر از زنان کنترل دارای ژنوتیپ هموزیگوت CC، ۱۶ نفر از زنان نابارور و ۴۱ نفر از زنان کنترل دارای ژنوتیپ هتروزیگوت CT و ۹ نفر از زنان نابارور و ۳۳ نفر از زنان کنترل دارای ژنوتیپ هتروزیگوت TT هستند. در شکل شماره دو توالی ژن در محل پلی مورفسم و ژنوتیپ‌های مختلف آن نشان داده شده است.

جدول ۳) توزیع ژنوتیپ‌ها و فراوانی آلل‌های مختلف پلی مورفسم جایگاه C29T (Pro10Leu) ژن TGF- $\beta$ 1 در مقایسه بین گروه‌های مختلف بیماران و گروه کنترل-هیچ اختلاف معناداری مشاهده نشد.

C29T (Pro10Leu) Rs1800470									
Groups	GENOTYPES					ALLELS			
	CC	CT	TT	$\chi^2$	P	C	T	$\chi^2$	P
Male UI	۳۱,۷%	۴۲,۳%	۲۶,۱%	Chi= ۳,۰۲	۰,۲۲	۵۲,۸%	۴۷,۲%	Chi=۰,۲۱۳	۰,۶۴
Male Cont	۲۵,۴%	۵۱,۳%	۲۳,۳%	Df ۲		۵۱%	۴۹%	Df ۱	
Female UI	۲۸,۶%	۴۵,۷%	۲۵,۷%	Chi= ۰,۵۶	۰,۷۵	۵۱,۴%	۴۸,۶%	Chi=۰,۱۷۲	۰,۶۱
Female Cont	۲۸,۸%	۳۹,۴%	۳۱,۷%	Df ۲		۴۸,۶%	۵۱,۴%	Df ۱	
Male UI	۳۱,۷%	۴۲,۳%	۲۶,۱%	Chi=۰,۱۶۷	۰,۹۲	۵۲,۸%	۴۷,۲%	Chi=۰,۰۴	۰,۸۳
Female UI	۲۸,۶%	۴۵,۷%	۲۵,۷%	Df ۲		۵۱,۴%	۴۸,۶%	Df ۱	
All UI	۳۱,۱%	۴۲,۹%	۲۶%	Chi= ۱,۴۲	۰,۴۹	۵۲,۵%	۴۷,۵%	Chi=۰,۴۶	۰,۴۹
All Cont	۲۶,۵%	۴۷,۶%	۲۵,۹%	Df ۲		۵۰,۳%	۴۹,۷%	Df ۱	

1- Degree of freedom



C29T (Pro10Leu) Rs1800470									
In couples									
Groups	GENOTYPES					ALLELS			
	CC	CT	TT	$\chi^2$	P	C	T	$\chi^2$	P
Male UI	۳۱,۴%	۴۲,۸%	۲۵,۸%	Chi=۲,۵۹	۰,۲۸	۵۳%	۴۷%	Chi=۰,۵۵۷	۰,۴۹
Male Cont	۱۷,۲%	۶۰%	۲۲,۸%	Df ۲		۴۷,۱%	۵۲,۹%	Df ۱	
Female UI	۲۸,۶%	۴۵,۷%	۲۵,۷%	Chi=۲,۴۲	۰,۲۹	۵۱,۴%	۴۸,۶%	Chi=۲,۳۳	۰,۱۲
FemaleCont	۱۴,۳%	۴۸,۶%	۳۷,۱%	Df ۲		۳۸,۵%	۶۱,۵%	Df ۱	
Male UI	۳۱,۴%	۴۲,۸%	۲۵,۸%	Chi=۰,۰۸	۰,۹۶	۵۳%	۴۷%	Chi=۰,۰۲	۰,۸۶
Female UI	۲۸,۶%	۴۵,۷%	۲۵,۷%	Df ۲		۵۱,۴%	۴۸,۶%	Df ۱	
All UI	۳۰%	۴۴,۲%	۲۵,۸%	Chi=۴,۰۶	۰,۱۳	۵۲,۱%	۴۷,۹%	Chi=۲,۴۲	۰,۱۱
All Cont	۱۵,۸%	۵۴,۲%	۳۰%	Df ۲		۴۲,۸%	۵۷,۲%	Df ۱	

جدول ۴) توزیع ژنوتیپ‌ها و فراوانی آل‌های مختلف پلی مورفیسم جایگاه C29T (Pro10Leu) ژن TGF-β1 در مقایسه‌ی بین گروه‌های مختلف زوج‌های نابارور و زوج‌های گروه کنترل-هیچ اختلاف معناداری مشاهده نشد.

## بحث

در این مطالعه پلی مورفیسم جایگاه C29T (Pro10Leu) ژن TGF-β1 توسط روش AUTOMATED SEQUENCING بررسی شد. دسته‌بندی‌های مختلفی برای بررسی توزیع ژنوتیپ‌ها و آل‌ها انجام شد. همچنین بررسی زوج‌های نابارور و زوج‌های گروه کنترل در دستور کار قرار گرفت. در هیچ‌کدام از دسته‌بندی‌ها اختلاف آماری معناداری در توزیع ژنوتیپ‌ها و آل‌های مربوط به پلی مورفیسم C29T (Pro10Leu) مشاهده نشد ( $P \text{ value} \geq 0.05$ ).

تاکنون مطالعه‌ای مشابه با این مقاله در ایران و جهان انجام نشده است و تنها به بررسی پلی مورفیسم‌های نواحی مختلف ژن TGF-β1 در سایر اختلالات تولیدمثلی مانند سقط‌های مکرر، پره‌آکلامپسی و عفونت‌های دستگاه تولیدمثلی پرداخته شده است. البته مطالعه‌هایی درباره ارتباط پلی مورفیسم سایر ژن‌ها و سایتوکاین‌ها با UI وجود دارد.

در سال ۲۰۱۳ Magdoud و همکاران، مطالعه‌ای روی زنان دچار سقط مکرر انجام دادند و در توزیع ژنوتیپ‌های این پلی مورفیسم بین بیماران و گروه کنترل تفاوت معناداری مشاهده نشد. (۲۹)

در سال ۲۰۱۵ خانی و همکاران، پلی مورفیسم‌های ناحیه کد شونده ژن TGF-β1 را در بیماران مبتلا به پره‌آکلامپسی بررسی کردند. در این مطالعه ۱۴۳ زن بیمار و ۱۲۸ زن سالم حضور داشتند و روش مطالعه PCR-RFLP بود. در این جایگاه ژنوتیپ‌های TT و CT در بیماران و CC در گروه کنترل بیشترین فراوانی را داشتند هرچند اختلاف آماری معناداری مشاهده نشد. (۳۰)

در سال ۲۰۰۵ امانی و همکاران، پلی مورفیسم‌های ژن TGF-β1 را در بیماران مبتلا به سقط مکرر بررسی کردند. روش بررسی PCR-RFLP بود و پلی مورفیسم جایگاه C29T (Pro10Leu) بررسی شد. ارتباط معناداری بین بیماری سقط مکرر و این پلی مورفیسم مشاهده نشد. (۳۱)

در سال ۲۰۰۲ Sugiura و همکاران، مطالعه‌ای درباره rheumatoid arthritis انجام دادند و مشاهده کردند این بیماری با پلی مورفیسم C29T (Pro10Leu) مرتبط است و فراوانی آل T در بیماران بیش از گروه کنترل است. (۳۲) در سال ۲۰۰۲ Ohtsuka و همکاران، مطالعه‌ای درباره systemic sclerosis انجام دادند و مشاهده کردند فراوانی آل C در بیماران بیشتر از گروه کنترل است. (۳۳)

در سال ۲۰۰۳ Dunning و همکاران، مطالعه‌ای درباره زنان مبتلا به سرطان سینه انجام دادند و با بررسی پلی مورفیسم‌های ژن TGF-β1 در ۳۹۸۷ بیمار مبتلا به سرطان سینه و ۳۸۶۷ نفر کنترل سالم به این نتیجه رسیدند که پلی مورفیسم C29T در سیگنال پپتید، به‌طور معناداری با افزایش بروز سرطان سینه مرتبط هستند و تخمین زده می‌شود حدود ۳ درصد از موارد سرطان سینه مربوط به یک

جابه‌جایی در Leu10Pro و ایجاد فرم هموزیگوت پرولین باشد. (۲۴) در سال ۲۰۰۶ Kang و همکاران اعلام کردند ژنوتیپ‌های CC و CT در پلی مورفیسم Pro10Leu با کاهش قابل توجه ریسک ابتلا به کارسینومای ریه همراه هستند (۲۴). آل C در پلی مورفیسم Pro10Leu که آمینواسید پرولین را کد می‌کند با تراکم استخوان زنان بزرگسال و استعداد ژنتیکی به پوکی استخوان و نتیجه درمان با Vitamin D نسبت مستقیمی وجود دارد. (۳۴-۳۷) همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد این مطالعه نخستین از نوع خود بوده و تاکنون مطالعه‌ای مشابه با این مقاله در ایران و جهان انجام نشده است، از طرفی همان‌طور که در مقدمه اشاره شد با پیشرفت ابزار تشخیص پزشکی، آمار ناباروری با علت نامشخص روز به روز در حال کاهش است. به‌نحوی که گفته می‌شود علل ناباروری در زنان تقریباً شناخته شده است ولی درباره‌ی ناباروری مردان به دلیل بررسی‌های کمتر و همین‌طور پیچیدگی‌های دستگاه تولیدمثل، اطلاعات کمتری وجود دارد. چالش دیگری که در این زمینه با آن روبه‌رو هستیم شرایط دشوار و زمان‌بر کار و مطالعه روی نمونه‌ها و اختلالات انسانی است. به طوری که جمع‌آوری نمونه‌های این مطالعه بیش از دو سال زمان برد و نگرانی‌های ناشی از نگرش‌های غلط اجتماعی درباره ناباروری و واکنش‌های متعاقب بیماران از قبیل برخورد نامناسب و همکاری نکردن در مطالعه، ادامه کار را دشوارتر کرد. برای بهبود فضای مطالعه و بررسی در زمینه ناباروری به همکاری هرچه بیشتر مراکز تحقیقات ناباروری و همکاران بخش‌های بالینی و متخصصان ناباروری نیاز است.

## نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده درباره توزیع ژنوتیپ و فراوانی آل‌ها، بین ناباروری با علت نامشخص در زنان و مردان و پلی مورفیسم C29T (Pro10Leu) ارتباط معناداری مشاهده نشد. برای مشخص شدن رابطه این پلی مورفیسم و استعداد ابتلا به ناباروری با علت نامشخص، به مطالعات بیشتری نیاز است. پیشنهاد می‌شود در طراحی مطالعات آینده از این نکات استفاده بهینه صورت پذیرد.

## تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد ایمونولوژی شعبه بین‌الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، خانم فرزانه مرحمتی با عنوان «بررسی پلی مورفیسم‌های اگزون‌های شماره ۱ و ۲ ژن TGF-β1 با ناباروری بدون علت مشخص» است. از زحمات بی‌دریغ اساتید عالی‌قدر سرکار خانم دکتر فروزان کریمی و جناب آقای دکتر فرشید یگانه و جناب آقای حسن دربندی کارشناس ارشد آزمایشگاه گروه ایمونولوژی صمیمانه سپاسگزاریم. بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی و کارکنان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و پژوهشگاه رویان تقدیر و تشکر به عمل می‌آید. این طرح از نظر مالی از سوی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی پشتیبانی شده است. (قرارداد شماره ۱۶۶۳)

## منابع

- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertil Steril*. 2009;92(5):1520-4.
- Gibbs RS KB, Danforth DN, AF H. *Danforth's Obstetrics and Gynecology*. Lippincott Williams & Wilkins; 2008. p. 705.
- Mahmoudzadeh P, Tousi A, Ramezani A, Soheilian R, Soheilian M. Uveitis profile and treatment response in Iranian patients with sarcoidosis. *Int Ophthalmol*. 2014;1-8.
- Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. *Singapore medical journal*. 2009;50(4):336-47.
- Global prevalence of infertility, infecundity and childlessness [Internet]. 2014. Available from: <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/burden/en/>.
- Vahidi S, Ardalan A, Mohammad K. Prevalence of primary infertility in the Islamic Republic of Iran in 2004-2005. *Asia Pac J Public Health*. 2009;21(3):287-93.
- Quaas A, Dokras A. Diagnosis and treatment of unexplained infertility. *Rev Obstet Gynecol*. 2008;1(2):69-76.
- Ray A, Shah A, Gudi A, Homburg R. Unexplained infertility: an update and review of practice. *Reprod Biomed Online*. 2012;24(6):591-602.
- Krausz C, Giachini C. Genetic risk factors in male infertility. *Archives of andrology*. 2007;53(3):125-33.
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Human Reproduction*. 2009;24(11):2683-7.
- Isaksson R, Tiitinen A. Present concept of unexplained infertility. *Gynecol Endocrinol*. 2004;1278-90.
- Kennedy R, Kingsland C, Rutherford A, Hamilton M, Ledger W. Implementation of the NICE guideline - recommendations from the British Fertility Society for national criteria for NHS funding of assisted conception. *Hum Fertil (Camb)*. 2006;9(3):181-9.
- Gocmen A, Atak T. Diagnostic laparoscopy findings in unexplained infertility cases. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2012;39(4):452-3.
- Bosteels J, Kasius J, Weyers S, Broekmans FJ, Mol BW, D'Hooghe TM. Treating suspected uterine cavity abnormalities by hysteroscopy to improve reproductive outcome in women with unexplained infertility or prior to IUI, IVF, or ICSI. *Gynecol Surg*. 2013;10(3):165-7.
- Makled AK, Farghali MM, Shenouda DS. Role of hysteroscopy and endometrial biopsy in women with unexplained infertility. *Arch Gynecol Obstet*. 2013.
- Ogasawara MS, Aoki K, Aoyama T, Katano K, Iinuma Y, Ozaki Y, et al. Elevation of transforming growth factor-beta1 is associated with recurrent miscarriage. *J Clin Immunol*. 2000;20(6):453-7.
- Muy-Rivera M, Sanchez SE, Vadachkoria S, Qiu C, Bazul V, Williams MA. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in plasma is associated with preeclampsia risk in Peruvian women with systemic inflammation. *Am J Hypertens*. 2004;17(4):334-8.
- Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Taylor HS. The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions. *Semin Reprod Med*. 2009;27(1):62-79.
- Singh M, Chaudhry P, Asselin E. Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. *J Endocrinol*. 2011;210(1):5-14.
- Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):601-10.
- Robertson SA, Bromfield JJ, Tremellen KP. Seminal 'priming' for protection from pre-eclampsia-a unifying hypothesis. *Journal of reproductive immunology*. 2003;59(2):253-65.
- Loras B, Vetele F, El Malki A, Rollet J, Soufir JC, Benahmed M. Seminal transforming growth factor-beta in normal and infertile men. *Human reproduction*. 1999;14(6):1534-9.
- Naini AS, Ghorbani J, Mazloom E. Comparative Study of Apo-Cetirizine Single Therapy and Intermittent Sequential Therapy with Cetirizine, Loratadine and Chlorpheniramine in Allergic Rhinitis. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014;1-5.
- Kang HG, Chae MH, Park JM, Kim EJ, Park JH, Kam S, et al. Polymorphisms in TGF-beta1 gene and the risk of lung cancer. *Lung cancer*. 2006;52(1):1-7.
- Hamaguchi T, Okino S, Sodeyama N, Itoh Y, Takahashi A, Otomo E, et al. Association of a polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with cerebral amyloid angiopathy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2005;76(5):696-9.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
- Amani D, Farjadian S, Ghaderi A. The frequency of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms in a normal southern Iranian population. *International journal of immunogenetics*. 2008;35(2):145-51.
- codon code aligner: CodonCode Corp., Dedham, MA; 2014. Available from: <http://www.codoncode.com/aligner/>.
- Magdoud K, Granados Herbepin V, Messaoudi S, Hizem S, Bouafia N, Almawi WY, et al. Genetic variation in TGFBI gene and risk of idiopathic recurrent pregnancy loss. *Molecular human reproduction*. 2013;19(7):438-43.
- Khani M, Amani D, Taheripana R, Sanadgol N, Feizollahzadeh S, Rahmani Z. Transforming growth factor beta-1 (TGF-β1) gene single nucleotide polymorphisms (SNPs) and susceptibility to pre-eclampsia in Iranian women: A case-control study. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*. (0).
- Amani D, Dehaghani AS, Zolghadri J, Ravangard F, Niikawa N, Yoshiura K, et al. Lack of association between the TGF-beta1 gene polymorphisms and recurrent spontaneous abortion. *Journal of reproductive immunology*. 2005;68(1-2):91-103.
- Sugiura Y, Niimi T, Sato S, Yoshinouchi T, Banno S, Naniwa T, et al. Transforming growth factor beta1 gene polymorphism in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2002;61(9):826-8.
- Ohtsuka T, Yamakage A, Yamazaki S. The polymorphism of transforming growth factor-beta1 gene in Japanese patients with systemic sclerosis. *The British journal of dermatology*. 2002;147(3):458-63.
- Yamada Y, Okuizumi H, Miyauchi A, Takagi Y, Ikeda K, Harada A. Association of transforming growth factor beta1 genotype with spinal osteophytosis in Japanese women. *Arthritis and rheumatism*. 2000;43(2):452-60.
- Yamada Y, Miyauchi A, Goto J, Takagi Y, Okuizumi H, Kanematsu M, et al. Association of a polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Japanese women. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1998;13(10):1569-76.
- Yokota M, Ichihara S, Lin TL, Nakashima N, Yamada Y. Association of a T29-->C polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Circulation*. 2000;101(24):2783-7.
- Dunning AM, Ellis PD, McBride S, Kirschenlohr HL, Healey CS, Kemp PR, et al. A transforming growth factorbeta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast