ارزیابی نیمه کمّی بیان ژن‌های HOXA10 و BTEB1 در اندومتر در زمان پنجره لانه‌گزینی در بیماران مبتلا به اندومتریوز و میوم

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۳/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۸/۰۲

ناصر شکرزاده،[۱] مسعود سعیدی جم،[۲] آرش دهقان،[۳] فرزانه اثنی عشری،[۴] مرضیه فریمانی سنویی،[۵] مریم بهمن زاده،[۶] زهره علیزاده[۶و۲*]

۱- گروه علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران

۲- مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی
۳- گروه پاتولوژی
۴- گروه پزشکی اجتماعی
۵- گروه زنان
۶- گروه علوم تشریحی

دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

* نویسنده مسئول: همدان، خیابان شهید فهمیده، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات مولکولی تلفن: ۸۳۸۰۵۸۳ -۰۸۱۱
E-mail: alizadeh.zohreh@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: تکنیک‌های کمک باروری در سال‌های اخیر به‌طور قابل ملاحظه پیشرفت کرده است اما هنوز در تعدادی از جنین‌های منتقل شده به رحم لانه‌گزینی انجام نمی‌شود. یکی از دلایل ناباروری، شکست مکرر در لانه‌گزینی و کاهش پذیرش اندومتر می‌باشد. در وضعیت‌های بالینی مانند اندومتریوز و میوم، به دلیل تغییرات اندومتر، کاهش لانه‌گزینی به دنبال انتقال جنین مشاهده می‌شود. در این مطالعه مورد- شاهدی، میزان بیان ژن‌های HOXA10 و BTEB1 در اندومتر افراد مبتلا به اندومتریوز و میوم ارزیابی شدند. ***روش بررسی:*** مبتلایان به اندومتریوز و میوم (هر گروه هشت نفر) به عنوان مورد و هشت فرد بارور و سالم به عنوان کنترل انتخاب شدند. نمونه‌برداری از اندومتر در فاز میانی ترشحی انجام شد. سپس با روش نیمه کمّی RT-PCR میزان بیان ژن‌های مورد نظر بررسی شدند. ***یافته‌ها:*** جزییات مراحل کار برای انجام روش نیمه کمّی بررسی میزان نسبی mRNA های HOXA-10 و BTEB1 توضیح داده شده است. تعداد سیکل مورد نظر برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای ژن‌های HOXA10، BTEB1 و ß-actin به ترتیب ۳۰، ۳۲ و ۲۶ سیکل به‌دست آمد. میانگین شدت بیان ژن HOXA10 و BTEB1 (نرمال شده با ژن ß-actin) در اندومتر مبتلایان به اندومتریوز به طور معنی‌داری کم‌تر از گروه کنترل بود ($P<0/05$). نتایج مشابهی نیز در مورد مبتلایان به میوم برای هر دو ژن HOXA10 و BTEB1 به‌دست آمد ($P<0/05$). ***نتیجه‌گیری:*** به نظر می‌رسد تغییر در بیان تعدادی از ژن‌ها که مقدار آن‌ها به طور طبیعی در زمان لانه‌گزینی افزایش پیدا می‌کند، باعث ایجاد تغییرات اندومتر جهت پذیرش جنین بوده و مسئول کاهش میزان باروری در بیماران مبتلا به اندومتریوز و میوم باشد.

کلمات کلیدی: اندومتریوز، میوم، HOXA10، BTEB1، لانه‌گزینی، بیان ژن.

مقدمه

تکنیک‌های کمک باروری در سال‌های اخیر به‌طور قابل ملاحظه پیشرفت کرده است اما هنوز در درصد زیادی از جنین‌های منتقل شده به رحم لانه‌گزینی انجام نمی‌شود. دلایل شکست مکرر در لانه‌گزینی شامل کاهش پذیرش اندومتر، نقص رشد جنین و یا عوامل چندگانه می‌باشد.[۱و۲] در وضعیت‌های بالینی مانند اندومتریوز و میوم، کاهش لانه‌گزینی به دنبال انتقال جنین مشاهده می‌شود.[۳] اندومتریوزیس یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن در زنان است که به صورت وجود بافت اندومتر در خارج از مکان طبیعی خود بروز می‌کند. این بیماری حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد از زنان را در سن باروری مبتلا می‌سازد. ۲۰ تا ۲۵ درصد افراد نابارور به این بیماری مبتلا هستند. گفته می‌شود که ناهنجاری‌های اندومتر توجیه کننده کاهش باروری در این افراد می‌باشد.[۴] فیبرویید یا فیبروم رحمی، رشد توده‌های خوش‌خیم در دیواره رحم، یکی از بیماری‌های رایج در زنان است که در ۲۰ تا ۵۰ درصد از زنان در سنین باروری دیده می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که میزان لانه‌گزینی به طور معنی‌داری در گروه بیماران با فیبروم داخل جداری و زیر مخاطی کاهش پیدا می‌کند.[۵و۶] در طی سیکل جنسی در زنان، هورمون‌های استروژن و پروژسترون موجب تغییراتی در سطح مولکولی در سلول‌های اندومتر می‌شوند به طوری

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-06-28]

که در نهایت اندومتر را آماده پذیرش بلاستوسیست و تثبیت حاملگی می‌نمایند.[۲] اختلال در تمایز اندومتر می‌تواند یکی از فاکتورهای نازایی باشد.[۱] چندین ژن شناسایی شده‌اند که بیان آن‌ها برای آمادگی اندومتر جهت پذیرش جنین ضروری می‌باشد. از جمله این ژن‌ها HOXA10 و BTEB1 می‌باشند.[۷] HOXA10 از اعضای خانواده ژن‌های هومئوباکس است. ژن‌های هومئوباکس برای رشد، تمایز و رسیدگی اندومتر و لانه‌گزینی جنین ضروری می‌باشند.[۸] HOXA10 در سلول‌های اپی‌تلیال و استرومای اندومتر بیان می‌شود و مقدار بیان آن به‌طور قابل توجهی در فاز میانی ترشحی که منطبق با دریچه لانه گزینی و حجم بالای هورمون‌های استروژن و پروژسترون است، افزایش می‌یابد. محصول ژن HOXA10 به عنوان فاکتور رونویسی، بیان تعداد زیادی از ژن‌ها را تنظیم می‌کند. گزارش شده است که در افراد با لانه‌گزینی موفق، مقادیر زیادی از این ژن در مراحل اولیه حاملگی در دسیدوا بیان می‌شود.[۹]

Basic Transcriptional Element Binding Protein1 (BTEB1) یک فاکتور رونویسی اندومتر است که از طریق تنظیم نسخه‌برداری، نقش اساسی در رشد سلول‌های اندومتر ایفا می‌کند. این ژن عضو خانواده ژن‌های Kruppel-like است که به طور مستقیم با گیرنده‌های پروژسترون واکنش نشان داده تا بیان ژن‌های حساس به پروژسترون را در سلول‌های اندومتر تنظیم نماید.[۱۰و۱۱] با توجه به کاهش میزان لانه‌گزینی در افراد مبتلا به اندومتریوز و میوم، مطالعات بافت‌شناسی اندومتر، تغییرات خاصی که توجیه‌کننده عدم لانه‌گزینی در این افراد باشد را نشان نداده است.[۱۰و۱۲] لذا ضروری به نظر می‌رسد که تغییرات مولکولی اندومتر این بیماران در زمان لانه‌گزینی مطالعه شود. به همین منظور در این مطالعه میزان بیان ژن HOXA10 و BTEB1 در اندومتر زنان مبتلا به میوم و اندومتریوز در روزهای میانی سیکل که معادل با زمان ترشحی سیکل قاعدگی و هم زمان با آمادگی رحم جهت فرایند لانه‌گزینی است، با روش مطالعه نیمه کمّی بررسی شد و با گروه کنترل شامل افراد بارور و سالم مقایسه گردید.

روش بررسی

این مطالعه مورد- شاهدی، در سال ۱۳۸۹ در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد در مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی همدان انجام شد. تمامی اعتبارات این طرح توسط معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه مذکور تامین شده است. به منظور اجرای این طرح، پس از تکمیل رضایت‌نامه توسط بیماران و گروه کنترل، نمونه اندومتر از بین افرادی که تمایل به شرکت در مطالعه را داشته و شرایط ورود به مطالعه را دارند به صورت تصادفی انتخاب گردید. گروه میوم، اندومتریوز و کنترل، هر یک شامل هشت مورد بود. شرایط ورود به مطالعه، این موارد را شامل می‌شد: سیکل‌های قاعدگی منظم (بین ۲۶ و ۳۲ روز)، مشخص بودن آخرین دوره قاعدگی، سن کم‌تر از ۳۸ سال و برای مدت سه ماه هیچ‌گونه داروی هورمونی دریافت نکرده باشد، گروه کنترل از افراد بارور انتخاب شدند. نمونه‌گیری در فاصله زمانی بین شانزدهمین تا بیست و پنجمین روز سیکل انجام شد. نمونه‌های اندومتر در شرایط کاملا استریل بیوپسی شده و بعد از شستشو به دو بخش تقسیم گردید. یک بخش در فرمالین ۱۰٪ نگه‌داری شده و برای تایید مرحله ترشحی اندومتر توسط پاتولوژیست به آزمایشگاه فرستاده شد. بخش دیگر نمونه‌ها در ماده RNX (شرکت سینا ژن- ایران) گذاشته و برای انجام آزمایشات تا زمان لازم در فریزر ۸۰- نگه‌داری شد. پس از تایید بافت‌شناسی، نمونه‌ها برای مطالعه میزان بیان ژن با روش RT-PCR استفاده گردید.

استخراج RNA: در این مرحله نمونه‌ها که در یک میلی‌لیتر از محلول استخراج RNA (RNX) قرار داشتند، توسط ورتکس به صورت یکنواخت درآمدند. سپس ۰/۲ml کلروفرم به آن اضافه شده و در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه در ۴° سانتریفوژ شدند. محلول آبی و شفاف بالایی جمع‌آوری و به لوله جدید منتقل گشت. RNA با افزودن ایزوپروپانول و سپس انجام سانتریفوژ رسوب کرده و رسوب به‌دست آمده توسط اتانول ۷۵٪ شستشو داده و سپس در معرض هوا خشک شده و در آب فاقد RNAase حل شد.[۱۳]

ساخت cDNA: cDNA با استفاده از کیت (RivertAid™ First Strand cDNA Synthesis Frementas, Canada) و با روش موجود در کیت با استفاده از ۴µg، RNA تهیه شد. برنامه ساخت cDNA با انکوبه کردن مخلوط به‌دست آمده با برنامه ۶۰ دقیقه در ۴۲° و پنج دقیقه در ۷۰° ادامه یافت.

تعیین سیکل مناسب: مرحله بعد، انجام PCR برای ژن مورد مطالعه بود. با توجه به این‌که جهت اندازه‌گیری نیمه کمّی بیان ژن با استفاده از الکتروفورز، PCR باید در سیکل مناسب و اختصاصی هر

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-06-28]

ژن و در فاز صعودی (Exponential) آن انجام شود،[۱۴] ابتدا تعداد سیکل مناسب تعیین گردید. بدین منظور مخلوط PCR با برنامه خاص آن در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. سپس مقدار ۵µl از هر میکروتیوب در سیکل‌های مشخص (مثلا در سیکل‌های ۲۰، ۲۲، ۲۴، ۲۶، ۲۸، ۳۰) برداشته و الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز انجام شد.[۱۴و۱۵] پس از انجام الکتروفورز شدت باندها با نرم‌افزار TotalLab 2009 اندازه‌گیری شده و منحنی تعیین سیکل ژن مورد مطالعه رسم گردید. لازم به ذکر است که از ژن بتا اکتین در تمام مراحل به عنوان کنترل استفاده گردید.

Polymerase Chain Reaction (PCR): مخلوط PCR شامل Mg 2 (3 mM), Taq-polymerase (2 unit), PCR buffer, dNTP (200 µM) و یک زوج پرایمر اختصاصی (۱۰pmol/µ) بود (جدول ۱). این مخلوط در حجم نهایی ۳۰µl ساخته شد. در ادامه چرخه‌های حرارتی برای β-actin به ترتیب، با برنامه ۹۵° برای دو دقیقه، ۹۵° برای ۳۰ ثانیه، ۴۹° برای ۳۰ ثانیه (۲۶ سیکل)، ۷۲° برای یک دقیقه (۲۶ سیکل) و ۷۲° برای هفت دقیقه انجام شد. این برنامه برای HOXA10 شامل، ۹۵° برای دو دقیقه، ۹۵° برای ۳۰ ثانیه، ۵۳° برای ۳۰ ثانیه (۳۰ سیکل)، ۷۲° برای یک دقیقه (۳۰ سیکل)، ۷۲° برای هفت دقیقه بود. برنامه BETB1 دارای مراحل، ۹۵° برای دو دقیقه، ۹۵° برای ۳۰ ثانیه، ۴۸° برای ۳۰ ثانیه، ۷۲° برای یک دقیقه و ۷۲° برای هفت دقیقه بود. مرحله سه و چهار به میزان ۳۲ سیکل تکرار شد.

الکتروفورز: محصول PCR به‌دست آمده از مرحله قبل در ژل آگارز ۱٪ قرار گرفته و توسط اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد. شدت باندهای به‌دست آمده پس از الکتروفورز با استفاده از نرم‌افزار TotalLAb 2009 اندازه‌گیری شد. از ژن β-actin به عنوان کنترل استفاده شد و شدت باندهای به‌دست آمده مربوط به ژن‌های مورد مطالعه با استفاده شدت باند مربوط به β-actin متعادل و مقایسه گردید. با استفاده از اطلاعات به‌دست آمده از نرم‌افزار، نمودار مربوط به میزان بیان ژن رسم گردید. سپس آنالیز آماری با استفاده از آزمون Student's t-test انجام شد.

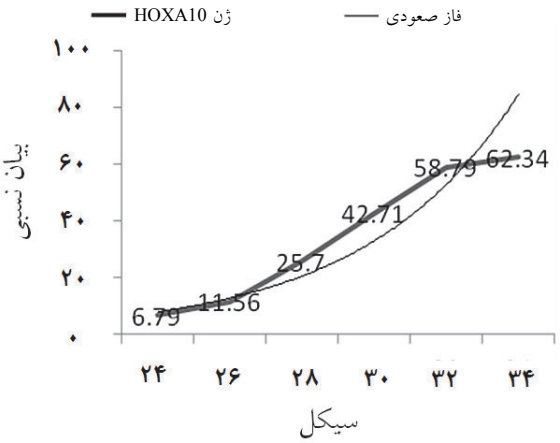
یافته‌ها

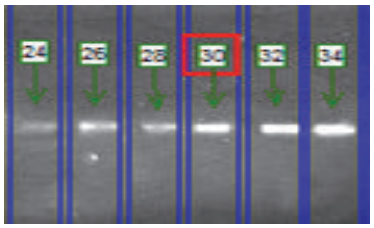
نمونه‌های به‌دست آمده از اندومتر مورد ارزیابی بافت‌شناسی قرار گرفته و نمونه‌هایی که فاز ترشحی آن‌ها تایید شد، برای مطالعه بیان ژن مورد استفاده قرار گرفته و میزان بیان ژن‌های BTEB1 و HOXA10 در اندومتر بررسی گردید. برای بررسی بیان ژن به صورت نیمه کمّی، لازم است که PCR در فاز صعودی متوقف و بررسی شود. به این منظور باید سیکل مناسب تعیین می‌گردید. تعیین سیکل بهینه برای انجام PCR برای ژن‌های HOXA10، BTEB1 و β-actin به‌ترتیب ۳۰، ۳۲ و ۲۶ سیکل به‌دست آمد (شکل ۱). با استفاده از روش RT-PCR میزان بیان نسبی ژن‌های مورد نظر اندازه‌گیری شد. نتایج نشان می‌دهد که میانگین نسبی بیان ژن HOXA10 در گروه میوم به‌طور معنی‌داری کم‌تر از گروه کنترل است (P<۰/۰۵ ۴۴/۵۴۷۵ در مقایسه با ۸۲/۲۰۱۴). (شکل ۲). میانگین نسبی بیان ژن HOXA10 در گروه اندومتریوز به طور معنی‌داری کم‌تر از گروه کنترل است (P<۰/۰۵ ۱۷/۰۱۱ در مقایسه با ۸۲/۲۰۱۴) (شکل ۲). میانگین نسبی بیان ژن BTEB1 در گروه میوم کم‌تر از گروه کنترل می‌باشد. (۲۲/۲۹۵ در مقایسه با ۵۰/۵۷۲). نتایج آماری نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در شدت بیان این ژن در این دو گروه است (P<۰/۰۵) (شکل ۲). میانگین نسبی بیان ژن BTEB1 در گروه اندومتریوز نیز کم‌تر از گروه کنترل می‌باشد. (۱۱/۰۶۱۲ در مقایسه با ۵۰/۵۷۲). نتایج آماری نشان

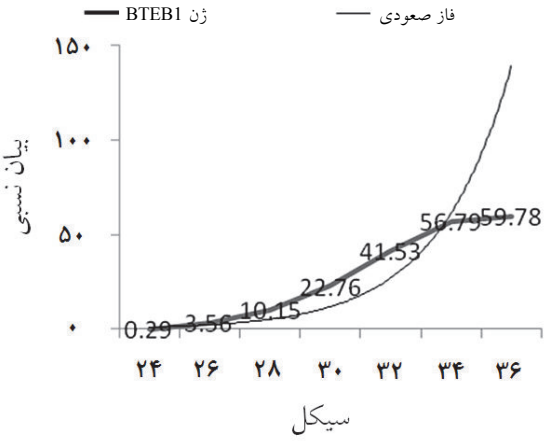
جدول- ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده

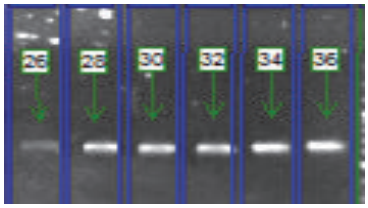
ژن	اندازه محصول (جفت باز)	توالی پرایمر	شماره دسترسی
HOXA10	۳۸۹	Sense: 5′-TGACAAGCACACCACAATTCTCC-3′ Anti-sense: 5-TTCCACGCACAGCAGCAATAC-3	NM_021192.2
BTEB1	۶۳۸	Sense: 5′-TGGTCTCCTTCCTGTGTTC-3 ′ Anti-sense: 5′-TAGTGATGGCTGTTGTATTGG-3′	NM_001206.2
β-actin	۳۶۰	Sense: 5′-CGTACCACTGGCATCGTGAT-3′ Anti-sense: 5′-GTGTTGGCGTACAGGTCTTTG-3′	NM_001198842

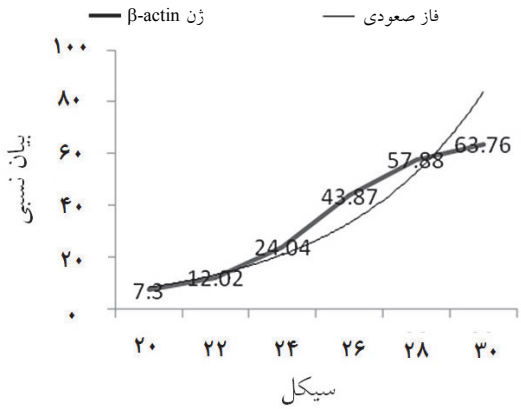
[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-06-28]

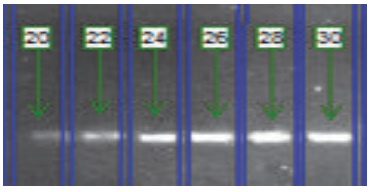






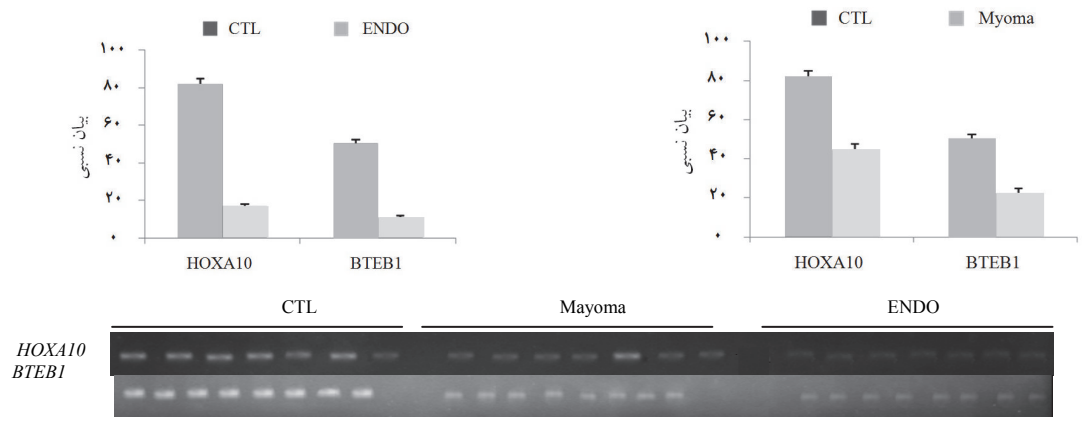






شکل- ۱: منحنی تعیین سیکل در بخش صعودی (Exponential) منحنی PCR. تصویر ژل‌های مورد نظر در کنار منحنی مربوطه نشان داده شده است.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-06-28]



شکل- ۲: متوسط بیان mRNA های HOXA10 و BTEB1 (نرمال‌شده با β-actin) در بیماران مبتلا به Myoma و اندومتریوز (ENDO) و مقایسه با گروه کنترل (CTL). تصویر الکتروفورز در پایین شکل نمایش داده شده است.

دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در شدت بیان این ژن در این دو گروه است (P<۰/۰۵) (شکل ۲).

بحث

اندازه‌گیری کمّی بیان ژن‌های اختصاصی ابزار بسیار مهمی برای درک مکانیسم‌های مولکولی و تاثیر عوامل گوناگون بر روی عملکرد سلول می‌باشد. RT-PCR تکنیک مناسبی برای اندازه‌گیری حجم mRNA بیان شده می‌باشد.[۱۴و۱۵] برای انجام این تکنیک و اندازه‌گیری RNA باید هر دو ژن هدف و کنترل (که یک ژن Housekeeping است) اندازه‌گیری شوند و مقدار ژن هدف با ژن کنترل نرمال شود. سه روش برای اندازه‌گیری مقدار بیان ژن بر پایه PCR وجود دارد. یکی از این روش‌ها، تکنیک PCR نیمه کمّی (semi-quantitative PCR) است که در آن مقدار محصول PCR در مرحله صعودی و قبل از این‌که به مرحله مسطح برسد، اندازه‌گیری می‌شود. این روش هم برای ژن کنترل و هم ژن هدف انجام می‌شود. روش‌های دیگر شامل PCR رقابتی (Competitive PCR) و Real-Time PCR می‌باشد.[۱۵] در مطالعه‌ای که Breljak انجام داد، ثابت کرد که نتایج به‌دست آمده از هر سه تکنیک برای اندازه‌گیری کمّی بیان ژن، قابل اطمینان می‌باشد و تفاوت چندانی با هم نداشته و تکنیک اندازه‌گیری نیمه کمّی (semi-quantitive PCR) علی‌رغم وقت‌گیر بودن، ارزان بوده و تکنیک مناسبی برای اندازه‌گیری بیان ژن در مواردی که تعداد نمونه مورد آزمایش کم است، می‌باشد.[۱۶] در مطالعه حاضر از روش اندازه‌گیری نیمه کمّی برای محاسبه مقدار بیان ژنی در اندومتر دو نوع بیماری مرتبط با نازایی یعنی اندومتریوزیس و میوم و مقایسه آن‌ها با گروه کنترل، استفاده شد. اندومتریوزیس و میوم از بیماری‌های شایع در زنان می‌باشند. ۳۰ تا ۴۰ درصد از افراد مبتلا به اندومتریوز نابارور هستند.[۱۷] ناباروری در تعداد زیادی از افراد مبتلا به میوم نیز گزارش شده است.[۱۸] مطالعات نشان می‌دهد که از تخمک این افراد جنین‌های سالم به‌دست آمده و در بدن میزبان دیگر رشد می‌کند. بنابراین علت نازایی در این افراد عدم لانه‌گزینی جنین است. مطالعات بافت‌شناسی تغییرات خاصی را در اندومتر مبتلایان به این بیماری‌ها در مقایسه با افراد سالم و بارور نشان نداده است.[۱۲] بنابراین ارزیابی‌های مولکولی جهت تشخیص علت ناباروری در این افراد ضروری می‌باشد. طبق مطالعات انجام شده، ژن HOXA10 از ژن‌هایی است که به عنوان بیومارکر دریچه لانه‌گزینی معرفی شده است.[۱۲] بیان این ژن در مرحله ترشحی سیکل جنسی که معادل با زمان لانه‌گزینی است و هم زمان با افزایش پروژسترون، افزایش می‌یابد و نقش مهمی در آماده‌سازی اندومتر برای لانه‌گزینی جنین دارد. علاوه بر آن در تنظیم ژن‌هایی مانند integrin b3, EMX2, IGFBP-1, BTEB1 که در لانه‌گزینی دخیل هستند، شرکت دارد.[۱۹] در مطالعه کنونی، میانگین شدت بیان ژن HOXA10 در هر دو گروه اندومتریوزیس و میوم کم‌تر از گروه کنترل

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-06-28]

می‌باشد. در مورد بیان HOXA10 در اندومتریوز، مطالعه Taylor،[۲۰] Kim[۲۱] و Matsuzaki[۲۲] با مطالعه حاضر مطابقت دارد. آن‌ها نیز در مطالعه خود نشان دادند که میزان بیان این ژن در بیماران مبتلا به اندومتریوز کاهش می‌یابد. با توجه به تفاوت موجود در روش کار جهت ارزیابی میزان بیان ژن مطالعه حاضر نتایج مشابهی را نشان می‌دهد. مطالعه بیان ژن HOXA10 در میوم نیز توسط Matsuzaki[۲۲] انجام شده است که نشان داد این ژن در سلول‌های استرومایی اندومتر بیان می‌شود و میزان بیان آن در افراد مبتلا به میوم در فاز ترشحی سیکل کاهش می‌یابد. Rackow نیز چند مارکر لانه‌گزینی از جمله HOXA10 را مورد مطالعه قرار دادند.

در مطالعه آن‌ها مقدار بیان ژن HOXA10 در بیماران مبتلا به میوم کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشت. البته تفاوت مطالعه Rackow با مطالعه حاضر در این بود که در فاز تکثیری انجام شده بود[۱۲] و نشان‌دهنده این مطلب است که بیان ژن HOXA10 در هر دو مرحله تکثیری و ترشحی در مقایسه با افراد بارور کم‌تر است. ژن BTEB1 نیز از ژن‌هایی است که به عنوان بیومارکر دریچه لانه‌گزینی معرفی شده است.[۲۳و۱۰] بیان این ژن در مرحله ترشحی سیکل جنسی که معادل با زمان لانه‌گزینی است هم زمان با افزایش پروژسترون افزایش می‌یابد و نقش مهمی در آماده‌سازی اندومتر برای لانه‌گزینی جنین دارد.[۲۴] Lee and Taylor به طور تجربی اندومتریوز را در موش ایجاد کرده و میزان بیان این ژن را در آن مطالعه کرده، نتایج آن‌ها نشان‌دهنده کاهش بیان این ژن در مرحله ترشحی بود.[۲۵] نتایج به‌دست آمده در این مطالعه بر روی موش به‌دست آمده است. به دلیل این‌که مطالعات حیوانی را نمی‌توان به راحتی برای انسان تعمیم داد. لذا در مطالعه حاضر، نمونه اندومتر که از بیماران مبتلا به اندومتریوز به‌دست آمده بود برای مطالعه میزان بیان این ژن انتخاب شد. نتایج نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار بیان این ژن در مقایسه با افراد سالم بود. در ارتباط با افراد مبتلا به میوم نیز نتایج مشابهی به‌دست آمد. Rackow ژن BTEB1 را در بیماران مبتلا به میوم مورد مطالعه قرار داد.[۱۲] در مطالعه آن‌ها مقدار بیان ژن BTEB1 در این بیماران کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشت. البته تفاوت مطالعه Rackow با مطالعه حاضر در این بود که در فاز تکثیری انجام شده بود. BTEB1 یک فاکتور نسخه‌برداری است و با گیرنده‌های پروژسترونی A و B (Pgr-A, Pgr- B) (B واکنش نشان می‌دهد تا بیان ژنی وابسته به پروژسترون را فعال کند.[۲۵] در موش‌هایی که به طور هدفمند بیان این ژن آن‌ها مهار شده است، تعداد لانه‌گزینی کاهش می‌یابد در این موش‌ها بیان ژن HOXA10 نیز کم می‌شود.[۲۶]

در مطالعه حاضر کاهش بیان هر دو ژن BTEB1 و HOXA10 در بیماران مبتلا به اندومتریوز و میوم که بارداری موفقیت‌آمیز نداشتند، مشاهده شد. این نتیجه تایید کننده نتایج مطالعه‌ای است[۲۵] که به طور تجربی در موش‌ها اندومتریوز ایجاد شده بود. به نظر می‌رسد که بیان متغیر ژن‌های HOXA10 و BTEB1 در فاز ترشحی که با زمان لانه‌گزینی مصادف است، می‌تواند از عوامل کم باروری و ناباروری در بیماران اندومتریوز و میوم باشد. به هر حال این دو ژن تنها ژن‌های مسئول برای لانه‌گزینی موفق نیستند و ژن‌های بسیاری در امر لانه‌گزینی و آماده‌سازی اندومتر برای پذیرش جنین شرکت دارند لذا برای درک بهتر علت کاهش یا عدم لانه‌گزینی در این دسته از بیماران، مطالعه بر روی دیگر ژن‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "تعیین نسبی میزان بیان ژن‌های HOXA10، HOXA11، LIF و BTEB1، در هنگام لانه‌گزینی در بیماران مبتلا به اندومتریوزیس و میوما" در مقطع کارشناسی‌ارشد در سال ۱۳۸۹ و شماره ثبت ۱۶/۳۵/۲۵۸۵۹/پ، می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان اجرا شده است.

References

1. Sharkey AM, Smith SK. The endometrium as a cause of implantation failure. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003;17(2):289-307.
2. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, et al. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 2004;25(3):341-73.
3. Urman B, Yakin K, Balaban B. Recurrent implantation failure in assisted reproduction: how to counsel and manage. A. General considerations and treatment options that may benefit the couple. *Reprod Biomed Online* 2005;11(3):371-81.
4. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004;364(9447):1789-99.
5. Horne AW, Critchley HO. The effect of uterine fibroids on embryo implantation. *Semin Reprod Med* 2007;25(6):483-9.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-06-28]

6. Manyonda I, Sinthamoney E, Belli AM. Controversies and challenges in the modern management of uterine fibroids. *BJOG* 2004;111(2):95-102.
7. Haouzi D, Mahmoud K, Fourar M, Bendhaou K, Dechaud H, De Vos J, et al. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Hum Reprod* 2009;24(1):198-205.
8. Magnusson M, Brun AC, Miyake N, Larsson J, Ehinger M, Bjornsson JM, et al. HOXA10 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and erythroid/megakaryocyte development. *Blood* 2007;109(9):3687-96.
9. Modi D, Godbole G. HOXA10 signals on the highway through pregnancy. *J Reprod Immunol* 2009;83(1-2):72-8.
10. Du H, Sarno J, Taylor HS. Basic transcription element binding protein [BTEB1] is regulated by HOXA10 in endometrial cells. *J Soc Gynecol Invest* 2006;13:71A-2A.
11. Kao LC, Germeyer A, Tulac S, Lobo S, Yang JP, Taylor RN, et al. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology* 2003;144(7):2870-81.
12. Rackow BW, Taylor HS. Submucosal uterine leiomyomas have a global effect on molecular determinants of endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2010;93(6):2027-34.
13. Alizadeh Z, Pasbakhsh P, Sobhani A, Barbarestani M, Ghafari M, Etesam F. Time course of degradation and deadenylation of maternal c-mos and cyclin A2 mRNA during early development of one-cell embryo in mouse. *Iran Biomed J* 2004;8(4):179-83.
14. Rey JM, Pujol P, Callier P, Cavailles V, Freiss G, Maudelonde T, et al. Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to evaluate the expression patterns of genes involved in the oestrogen pathway. *J Mol Endocrinol* 2000;24(3):433-40.
15. Marone M, Mozzetti S, De Ritis D, Pierelli L, Scambia G. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biol Proced Online* 2001;3:19-25.
16. Breljak D, Ambriović-Ristov A, Kapitanović S, Čačev T, Gabrilovac J. Comparison of three RT-PCR based methods for relative quantification of mRNA. *Food Technol Biotechnol* 2005;43(4):379-88.
17. Selam B, Arici A. Implantation defect in endometriosis: endometrium or peritoneal fluid. *J Reprod Fertil Suppl* 2000;55:121-8.
18. Manyonda I, Sinthamoney E, Belli AM. Controversies and challenges in the modern management of uterine fibroids. *BJOG* 2004;111(2):95-102.
19. Cermik D, Selam B, Taylor HS. Regulation of HOXA-10 expression by testosterone in vitro and in the endometrium of patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(1):238-43.
20. Taylor HS, Bagot C, Kardana A, Olive D, Arici A. HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod* 1999;14(5):1328-31.
21. Kim JJ, Taylor HS, Lu Z, Ladhani O, Hastings JM, Jackson KS, et al. Altered expression of HOXA10 in endometriosis: potential role in decidualization. *Mol Hum Reprod* 2007;13(5):323-32.
22. Matsuzaki S, Canis M, Darcha C, Pouly JL, Mage G. HOXA-10 expression in the mid-secretory endometrium of infertile patients with either endometriosis, uterine fibromas or unexplained infertility. *Hum Reprod* 2009;24(12):3180-7.
23. Zhang XL, Simmen FA, Michel FJ, Simmen RC. Increased expression of the Zn-finger transcription factor BTEB1 in human endometrial cells is correlated with distinct cell phenotype, gene expression patterns, and proliferative responsiveness to serum and TGF-beta1. *Mol Cell Endocrinol* 2001;181(1-2):81-96.
24. Simmen RC, Eason RR, McQuown JR, Linz AL, Kang TJ, Chatman L Jr, et al. Subfertility, uterine hypoplasia, and partial progesterone resistance in mice lacking the Kruppel-like factor 9/basic transcription element-binding protein-1 (Bteb1) gene. *J Biol Chem* 2004;279(28):29286-94.
25. Lee B, Du H, Taylor HS. Experimental murine endometriosis induces DNA methylation and altered gene expression in eutopic endometrium. *Biol Reprod* 2009;80(1):79-85.
26. Zhang XL, Zhang D, Michel FJ, Blum JL, Simmen FA, Simmen RC. Selective interactions of Kruppel-like factor 9/basic transcription element-binding protein with progesterone receptor isoforms A and B determine transcriptional activity of progesterone-responsive genes in endometrial epithelial cells. *J Biol Chem* 2003;278(24):21474-82.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-06-28]

Tehran University Medical Journal; Vol. 69, No. 10, January 2012: 605-612

Semi-quantitative analysis of endometrial HOXA10 and BTEB1 mRNA expressions in the implantation window of patients with endometriosis and myoma

Naser Shokrzadeh M.Sc.[1]
Mssoud Saidijam Ph.D.[2]
Arash Dehghan M.D.[3]
Farzaneh Esna-Ashari M.D.Mph[4]
Marzieh Farimani Sanoee M.D[5]
Maryam Bahmanzadeh M.Sc.[6]
Zohreh Alizadeh Ph.D.[2,6*]

1- Department of Basic Sciences, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Khorasan Razavi Province, Gonabad, Iran.
2- Research Center for Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.
3- Department of Pathology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.
4- Department of Community Medicine, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.
5- Department of obstetric and Gynecology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.
6- Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

[*] Corresponding author: Research center for Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Shahid Fahmideh St., P.O.Box. 65178-518. Hamedan. Iran.
Tel: +98- 811-8380583
E-mail: alizadeh.zohreh@gmail.com

Received: May 29, 2011 Accepted: October 24, 2011

Abstract

***Background*:** The techniques used in assisted reproductive technologies have progressed considerably, but many embryos do not implant after transfer upon the use of these techniques. One of the causes of infertility is repeated implantation failure due to decreased endometrial receptivity. Furthermore, in clinical conditions such as endometriosis and myoma, implantation decreases after embryo transfer. In this case-control study the expression patterns of HOXA-10 and BTEB1 mRNAs were evaluated at the time of implantation in patients with myoma and endometriosis.

***Methods*:** In this study performed in Hamadan University of Medical Sciences during 1389, the cases included 16 patients with endometriosis and myoma (8 in each group) and the control group consisted of 8 fertile women. Endometrial sampling was performed at mid-secretory phase. Later, the expression patterns of HOXA-10 and BTEB1 mRNAs were evaluated using a semi-quantitative RT-PCR method.

***Results*:** The optimal PCR cycles determined were 30, 32 and 26 for HOXA10, BTEB1 and β-actin, respectively. Endometrial HOXA-10 and BTEB1 mRNA expression levels (normalized to ß-actin expression) at the time of implantation were significantly decreased in the endometrium of infertile patients with endometriosis compared with that of healthy fertile controls ($P<0.05$). A similar pattern was seen in patients with myomas for both HOXA10 and BTEB1 genes, ($P<0.05$).

Conclusion: It seems that lower expression of HOXA-10 and BTEB1 mRNAs in the implantation window of endometrium that increase normally, could account for some aspects of infertility in patients with endometriosis and myoma.

Keywords: BTEB1, endometriosis, HOXA10, implantation, gene expression, myoma.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-06-28]