

УДК: [618.177+616.697]:575.224.2+615.256.51

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПОЛІМОРФНИХ ЛОКУСІВ С.454–397Т/С ТА С.454–351А/Г ГЕНА РЕЦЕПТОРА ЕСТРОГЕНІВ ESR1 У СІМЕЙНИХ ПАР ІЗ ІДІОПАТИЧНИМ БЕЗПЛІДДЯМ

М. Я. ТИРКУС

ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»
Україна, 79000, м. Львів, вул. Лисенка, 31-а
e-mail: tyrkus.m@ihp.lviv.ua

Мета. Встановити асоціацію поліморфних локусів 397 Т>С та 351 А>Г гена ESR1 з невдалими екстракорпоральними заплідненнями (ЕКЗ) у подружніх пар. **Методи.** Виділення та очищення ДНК проводили методом висолування. Ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro* проводили, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для ідентифікації мутацій генів естрогенового рецептора застосовували метод рестрикційного аналізу продуктів ПЛР відповідних послідовностей. Електрофорез продуктів ПЛР проводили в 2 % агарозному гелі. **Результати.** Проведено молекулярно-генетичне дослідження поліморфних варіантів с.454–397 Т>С (PvuII) та с.454–351 Т>С (XbaI) гена ESR1 у 23 подружніх пар з ідіопатичним безпліддям та невдалими ЕКЗ та 15 подружніх пар у яких двоє і більше дітей і які не мали репродуктивних порушень в анамнезі та випадків ЕКЗ. Встановлено розподіл генотипів та алелів с.454–397 Т>С (PvuII) та с.454–351 Т>С (XbaI) гена ESR1, проведено статистичні обрахунки. Виявлено тенденцію підвищення частоти генотипу ESR1 453–397ТТ (pp) серед подружніх пар з невдалими ЕКЗ (32,6 %) у порівнянні з парами контрольної групи (23,3 %), що збільшує ризик невдалих ЕКЗ у 1,59 рази та генотипу с.454–351 АА(хх) серед подружніх пар з невдалими ЕКЗ (39,1 %) у порівнянні з парами контрольної групи (23,3 %), що збільшує ризик невдалих ЕКЗ у 2,11 рази. Встановлено статистично вірогідні відмінності у частотах алелів G (X) та A (x) локусу с.453–351 А>Г гена ESR1 у досліджуваних групах пацієнтів ($\chi^2=3,72$, $p\leq 0,05$). Обчислення показника відношення шансів виявило асоціацію алеля А(х) із вірогідних зростанням невдалих ЕКЗ у 1,91 рази при довірчому інтервалі 0,99–3,7. **Висновки.** Одним із генетичних чинників, який асоціюється із збільшеним ризиком виникнення невдалих ЕКЗ є наявність в генотипі алелі А(х) поліморфного локусу с.453–351 А>Г гена ESR1.

Ключові слова: ген ESR1, ЕКЗ, естрогеновий рецептор, ідіопатичне безпліддя, молекулярно-генетичне дослідження.

Вступ. Безпліддя – це результат різного спектра фізіологічних порушень, гормональних чи імунних змін в організмі ендо- чи екзогенного ґенезу. Проблеми репродуктивної функції можуть обумовлюватися вродженими чи набутими аномаліями сечостатевої сфери, системними та ендокринними хворобами, інфекційними чинниками, імунними факторами або можуть бути складовою частиною генетичних синдромів [1].

Окрім того, зустрічається ідіопатичне безпліддя незрозумілого ґенезу. До компонентів етіології та патогенезу порушень репродукції належать генетичні фактори схильності, які при взаємодії з чинниками середовища обумовлюють розвиток ряду патологічних станів – ендокринопатії, тромбофілії, імунопатології, вад розвитку статевої сфери, генітального інфантилізму. Таким чином, генетичний механізм виникнення мультифакторних захворювань, зокрема різних форм порушень репродуктивної функції, є найбільш складним, так як в його основі лежать різні комбінації алельних варіантів багатьох генів.

Естрогени – група жіночих статевих гормонів. До природних естрогенів відносять естрон, естрадіол, а також еквіленін та еквілін. Дія естрогенів в клітині опосередкована їхнім зв'язуванням одним із двох специфічних рецепторів α чи β , що є ліганд-залежними транскрипцій-

© М. Я. ТИРКУС, 2015

ними факторами і належать до суперродини ядерних рецепторів. Ці рецептори є продуктами різних генів – *ESR1* та *ESR2*, локалізованих відповідно в ділянках 6q25.1 і 14q23.2 [2]. Ген *ESR1* переважно експресується в ендометрії, клітинах раку молочної залози, стромальних клітинах яєчника та гіпоталамусі, в простаті та яєчках чоловіків, а також у кістках, ендотелії, печінці, гладеньких м'язах судин, очах і нирках. Експресія *ESR2* виявлена в нирках, грудях, яєчниках, серці, легенях, простаті та ендотеліальних клітинах [3, 4]. Найпоширенішим продуктом гена *ESR1* є білок, що містить 595 амінокислотних залишків, молекулярною масою 66кД.

Ген *ESR1* кодує альфа рецептор гормонів естрогенів, які беруть участь в регуляції статевого розвитку, гаметогенезу, зростання і підтримки скелета, функціонуванні серцево-судинної та нервової систем. Рецептором є трансмембранний білок, C-кінець якого містить центр зв'язування з лігандом, а N-кінець містить кілька доменів, що сприяють збільшенню транскрипційної активності ряду генів. Приєднання гормону до рецептора спричиняє дисоціацію комплексу рецептора з білком HSP90. Далі рецептор у вигляді гетеродимера взаємодіє з відповідним естрогеновим елементом (ERE, estrogen response element), збільшуючи експресію певних генів [5].

Цілим рядом дослідників було встановлено роль мононуклеотидних замін T-397C (*PvuII* поліморфізм) та A-351G (*XbaI* поліморфізм), які знаходяться в 1-му інтроні гена *ESR*, у порушенні сперматогенезу, збільшенні ризику невиношування вагітності і порушень кальцієвого обміну, зокрема зниженні щільності кісткової тканини і розвитку остеопорозу, а також при серцево-судинних патологіях [6–9].

При варіанті C-397T (алель T) відзначається знижений рівень продукції альфа рецептора гормонів естрогенів, внаслідок чого у чоловіків можуть спостерігатися знижена рухливість сперматозоїдів, а також знижений рівень глобуліну SHBG, що зв'язує статеві гормони, лютинізувального гормону, підвищений рівень вільного естрадіолу і фолікулостимулюючого гормону в крові. У жінок даний варіант може приводити до репродуктивних порушень, в тому числі даючи несприятливий прогноз для здійснення ЕКЗ, а також до порушень кальцієвого об-

міну, особливо на тлі низького рівня циркулювальних естрогенів в крові [10].

На сьогоднішній день існує можливість коригування безпліддя за допомогою допоміжних репродуктивних технологій. Але актуальним залишається питання невдалих випадків ЕКЗ, особливо коли це стосується подружніх пар з ідіопатичним безпліддям. В цих випадках генетичні дослідження мають особливе значення. Враховуючи, що поліморфізми, які знаходяться в 1-му інтроні гена *ESR*, відіграють роль у порушенні сперматогенезу, збільшення ризику невиношування вагітності і порушень кальцієвого обміну, можна припустити, що невдалі екстракорпоральні запліднення можуть мати асоціацію із певною комбінацією алелів гена *ESR1*.

Тому, метою даної роботи було встановити асоціацію поліморфних локусів 397 T>C та 351 A>G гена *ESR1* з порушеннями, що призводять до невдалих ЕКЗ у подружніх пар.

Матеріали і методи

Досліджувану групу склали 23 подружні пари з ідіопатичним безпліддям та невдалими ЕКЗ. Обстежувані особи скеровувалися у Львівський міжобласний медико-генетичний центр з приводу безплідного шлюбу. Кількість невдалих ЕКЗ серед подружніх пар досліджуваної групи коливалась від одного до восьми. У цих осіб не виявлено порушень зі сторони репродуктивної системи. Вік чоловіків складав від 30 до 58 років, вік жінок – від 27 до 46 років. Контрольну групу склали 15 подружніх пар у яких двоє і більше дітей і які не мали репродуктивних порушень в анамнезі та випадків ЕКЗ. Всі дослідження проводились згідно інформаційної згоди пацієнтів. Слід наголосити, що всі обстежувані індивіди є вихідцями з Західної України і проживають на її території.

Проводили виділення та очищення ДНК з лейкоцитів периферійної крові методом висолювання [11]. Ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro* проводили, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [12]. Специфічність ПЛР-продуктів визначали послідовністю специфічних праймерів, температурою відпалу та складом реакційного буферу. ПЛР проводили в автоматичному режимі на термоциклері «Терцик» (ДНК-технологія, Росія).

Для ідентифікації поліморфних варіантів с.454–397 T>C (PvuII) та с.454–351 A>G (XbaI) гена *ESR1* застосовували метод рестрикційного аналізу продуктів ПЛР відповідних послідовностей [13]. У роботі використовували ендонуклеази рестрикції *PvuII* та *XbaI* виробництва фірми «Fermentas» (Вільнюс). Інкубацію рестрикційних сумішей проводили при температурі 37 °С у термостаті фірми «BIOKOM» (Росія).

Продукти ампліфікації візуалізували шляхом проведення електрофорезу в 2 % агарозному гелі, який містив бромистий етидій, та сканували на ультрафіолетовому транслюмінаторі «ECX-15. M» (VILBER LOURMAT, Франція). Отримані сигнали порівнювали з маркерами довжин, і на основі цього детектували розміри отриманих фрагментів. Результати сканування агарозних гелів знімали цифровою камерою «Gel Imager» (HELICON, Росія). Обробку зображень здійснювали на комп'ютері за допомогою програм Adobe Photoshop CS та Gel Explorer 2.0.

Статистичний аналіз даних проводили за загальноприйнятими методами. Перевірку статистичних гіпотез проводили на рівні значущості $p \leq 0,05$. Частоти мутацій генів та теоретично очікуваний розподіл генотипів розраховували з використанням контингентних таблиць 2x2 обчисленням критерію Пірсона χ^2 . Відношення частоти досліджуваного результату в експериментальній групі до частоти результату в контрольній групі оцінювали за допомогою величини відношення шансів OR (Odds Ratio) при довірчому інтервалі (ДІ).

Результати та обговорення

Проведено молекулярно-генетичне дослідження поліморфних варіантів с.454–397 T>C (PvuII) гена *ESR1* (номер поліморфізму в базі даних NCBI – rs2234693). Однонуклеотидний поліморфізм зумовлений заміною цитозину (алель 2166C) на тимін (алель 2166E). В результаті ПЛР реакції синтезуються T-397C генотипи: CC-генотип 1372 п.н., CT-генотип 1372 п.н., 982 п.н. та 390 п.н., TT-генотип 982 п.н. та 390 п.н. відповідно. Результати молекулярно-генетичного дослідження поліморфізму T-397C гена *ESR1* наведено на рис. 1.

Встановлено розподіл генотипів щодо поліморфного локусу с.453–397T>C гена *ESR1* у 46 осіб дослідної та 30 осіб контрольної груп. Можливі генотипи були: PP, Pp, PP для PvuII, де P позначає відсутність, а p присутність сайту рестрикції.

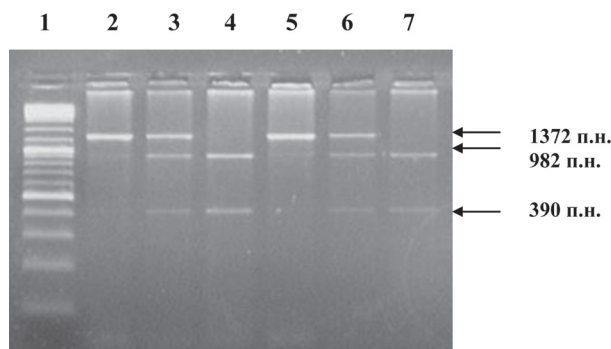


Рис. 1. Електрофореграма рестрикційного аналізу продуктів ПЛР поліморфізму с.454–397 T>C (PvuII) гена *ESR1* (2 % агарозний гель): 1 – маркери молекулярної ваги; 2, 5 – CC-генотип (1372 п.н.); 3, 6 – CT-генотип (1372 п.н., 982п.н., 390п.н.); 4, 7 – TT-генотип (982 п.н., 390 п.н.)

Встановлений розподіл генотипів за поліморфним варіантом с.453–397T>C гена *ESR1* в дослідній та контрольній групах вірогідно не відрізняється від теоретично очікуваного щодо рівноваги Харді-Вайнберга. Результати молекулярно-генетичного аналізу локусу 453–397T>C (PvuII) гена *ESR1* у дослідній групі подружніх пар з невдалими ЕКЗ та контрольній групі наведено у табл. 1.

Таблиця 1. Частота генотипів/алелів поліморфного локусу с.453–397T>C гена *ESR1* у досліджуваних групах

| Генотипи/алелі <i>ESR1</i> с.453–397 (Pvu II) | Частота, % | | χ^2 | p | OR | |
|---|------------------------|--------------------------|----------|------|-------|-----------|
| | дослідна група, n = 46 | контрольна група, n = 30 | | | знач. | 95 % CI |
| CC (PP) | 23,9 | 33,3 | 1,12 | 0,57 | 0,63 | 0,23–1,74 |
| TC (Pp) | 43,5 | 43,3 | | | 1,01 | 0,40–2,54 |
| TT (pp) | 32,6 | 23,3 | | | 1,59 | 0,56–4,53 |
| C (P) | 45,6 | 55 | 1,27 | 0,26 | 0,69 | 0,36–1,32 |
| T (p) | 54,3 | 45 | | | 1,46 | 0,76–2,8 |

Примітка. n – кількість осіб, P– значимість відмінностей між контрольною і дослідною групами, OR (odds ratio) – коефіцієнт відношення шансів.

У результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу та подальших статистичних обчислень встановлено, що відмінності у співвідношенні генотипів гена *ESR1* між подружніми парами з невдалими ЕКЗ у порівнянні з контрольною групою не досягнули статистично вірогідних значень ($p > 0,05$), як і показники відношення шансів OR (табл. 1). Проте, встановлено тенденцію до

підвищення частоти генотипу ESR1 453–397ТТ (pp) серед подружніх пар з невдалими ЕКЗ (32,6 %) у порівнянні з парами контрольної групи (23,3 %), що збільшує ризик невдалих ЕКЗ у 1,59 рази.

Як свідчать результати, наведені у табл.1, частоти нормального Т та низькофункціонального С алелів локусу с.453–397Т>С гена ESR1 у досліджуваних групах пацієнтів не досягнули статистично вірогідних значень. (р>0,05). Обчислення показника відношення шансів показало відсутність зростання ризику чи протективного ефекту для жодного з алелів локусу с.453–397Т>С гена ESR1.

Зважаючи на гендерні особливості щодо функції естрогенів та їх рецепторів в організмі, доцільним є аналіз частоти генотипів локусу с.453–397Т>С гена ESR1 у осіб різної статі з невдалими ЕКЗ та контрольної групи (табл. 2,3).

Згідно даним, наведеним у табл. 2 та табл. 3, у роботі не виявлено статистично вірогідних відмінностей у розподілі генотипів та алелів локусу с.453–397Т>С гена ESR1 в осіб різної статі. Генотип ESR1 453–397ТТ (pp) виявлено у 34,8 % жінок з не-

вдалими ЕКЗ при 23,3 % в контрольній групі. У чоловіків генотип ESR1 453–397ТТ (pp) виявлено у 30,4 % осіб дослідної групи при 20,0 % в контрольній групі. Частота Т алелі с.453–397Т>С гена ESR1 у чоловіків з невдалими ЕКЗ сягнула 52,2 % при 40,0 % у чоловіків контрольної групи.

Аналогічно, проведено молекулярно-генетичне дослідження поліморфних варіантів с.454–351 Т>С (XbaI) гена ESR1 (номер поліморфізму в базі даних NCBI – rs9340799). Досліджувані варіанти гена: Т-397С (заміна нуклеотиду аденіну на гуанін в некодуючій ділянці гена). В результаті ПЛР реакції синтезуються А-351G генотипи: GG-генотип 1372 п.н., GA-генотип 1372 п.н., 936 п.н. та 436 п.н., AA-генотип 936 п.н. та 436 п.н. відповідно.

Встановлено розподіл генотипів щодо поліморфного локусу с.454–351 А>G гена ESR1 у 46 осіб дослідної та 30 осіб контрольної груп. Можливі генотипи були: ХХ, Хх, хх для Хba I, де Х позначає відсутність, а х присутність сайту рестрикції. Встановлений розподіл генотипів за поліморфним варіантом с.454–351 А>G гена ESR1 в дослідній та

Таблиця 2. Розподіл генотипів/алелів поліморфного локусу с.453–397Т>С гена ESR1 серед жінок дослідної та контрольної груп

| Генотипи/алелі ESR 1 с.453–397 (Pvu II) | Частота, % | | χ ² | р | OR | |
|--|---------------------------|-----------------------------|----------------|------|-------|-----------|
| | дослідна група, n = 23 | контрольна група, n = 15 | | | знач. | 95 % CI |
| | | | | | | |
| CC (PP) | 21,7 | 26,7 | 0,30 | 0,86 | 0,76 | 0,17–3,47 |
| TC (Pp) | 43,5 | 46,7 | | | 0,88 | 0,24–3,25 |
| TT (pp) | 34,8 | 26,7 | | | 1,47 | 0,35–6,13 |
| С (P) | 43,5 | 50,0 | 0,31 | 0,58 | 0,77 | 0,31–1,94 |
| Т (p) | 56,5 | 50,0 | | | 1,30 | 0,52–3,27 |

Примітка. n – кількість осіб, P– значимість відмінностей між контрольною і дослідною групами, OR (odds ratio) – коефіцієнт відношення шансів.

Таблиця 3. Розподіл генотипів/алелів поліморфного локусу с.453–397Т>С гена ESR1 серед чоловіків дослідної та контрольної груп

| Генотипи/алелі ESR 1 с.453–397 (Pvu II) | Частота, % | | χ ² | р | OR | |
|--|---------------------------|-----------------------------|----------------|------|-------|-------------|
| | дослідна група, n = 23 | Контрольна група, n = 15 | | | знач. | 95 % CI |
| | | | | | | |
| CC (PP) | 26,1 | 40,0 | 0,96 | 0,62 | 0,53 | 0,13 – 2,13 |
| TC (Pp) | 43,5 | 40,0 | | | 1,15 | 0,31 – 4,33 |
| TT (pp) | 30,4 | 20,0 | | | 1,75 | 0,37 – 8,21 |
| С (P) | 47,8 | 60,0 | 1,08 | 0,3 | 0,61 | 0,24 – 1,55 |
| Т (p) | 52,2 | 40,0 | | | 1,64 | 0,64 – 4,15 |

Примітка. n – кількість осіб, P– значимість відмінностей між контрольною і дослідною групами, OR (odds ratio) – коефіцієнт відношення шансів.

контрольній групі вірогідно не відрізняється від теоретично очікуваного щодо рівноваги Харді-Вайнберга. Результати молекулярно-генетичного аналізу локусу с.454–351 A>G (Xba I) гена *ESR1* у дослідній групі подружніх пар з невдалими ЕКЗ та контрольній групі наведено у табл. 4.

У результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу та подальших статистичних обрахунків встановлено, що відмінності у співвідношенні генотипів гена *ESR1* між подружніми парами з невдалими ЕКЗ у порівнянні з контрольною групою не досягнули статистично вірогідних значень ($p > 0,05$). Проте серед подружніх пар з невдалими ЕКЗ у 39,1 % виявлено гомозиготний генотип AA (xx) поліморфного локусу с.454–351 A>G гена *ESR1*, який в контрольній групі виявлено у 23,3 % осіб, що збільшує ризик невдалих ЕКЗ в 1,91 рази (табл. 4).

Обчислення показника відношення шансів виявило асоціацію алеля A(x) із вірогідним зростанням невдалих ЕКЗ у 1,91 рази при довірчому інтервалі 0,99 – 3,7. Таким чином, отримані дані вказують що можливим генетичним чинником, який асоційований із збільшенням ризику виникнення невдалих ЕКЗ є наявність в генотипі алелю A(x) поліморфного локусу с.453–351 A>G гена *ESR1*.

Провели аналіз частоти генотипів та алелів локусу с.453–351 A>G гена *ESR1* у осіб різної статі з невдалими ЕКЗ та контрольної групи (табл. 5, 6).

Згідно даним, наведеним у табл. 5 і табл. 6, генотип *ESR1* с.454–351 AA(xx) виявлено 43,5 % жінок з невдалими ЕКЗ при 26,7 % в контрольній групі, частота алелі A(x) становить 69,7 % при 56,7 % в контрольній групі. У чоловіків генотип *ESR1* с.454–351 AA(xx) виявлено у 34,8 % дослідної групи при 20,0 % в контрольній групі. Частота A алелі с.454–351 гена *ESR1* у чоловіків з невдалими ЕКЗ сягнула 58,7 % при 40,0 % у чоловіків контрольної групи. Проте вірогідних відмінностей у розподілі генотипів та алелів не виявлено.

Як підсумок, слід зазначити, що в результаті роботи проведено молекулярно-генетичне дослідження поліморфних варіантів с.454–397 T>C (PvuII) та с.454–351 T>C (XbaI) гена *ESR1* серед 23 подружніх пар з ідіопатичним безпліддям та невдалими ЕКЗ та 15 подружніх пар у яких двоє і більше дітей і які не мали репродуктивних порушень в анамнезі та випадків ЕКЗ. Встановлено розподіл генотипів та алелів поліморфних варіантів с.454–397 T>C та с.454–351 T>C гена *ESR1*, проведено статистичні обрахунки. Слід зазначити, що результати щодо

Таблиця 4. Частота генотипів/алелів поліморфного локусу с.454–351 A>G гена *ESR1* у досліджуваних групах

| Генотипи/алелі <i>ESR1</i> с.454–351 (Xba I) | Частота, % | | χ^2 | p | OR | |
|--|------------------------|--------------------------|----------|------|-------|-----------|
| | дослідна група, n = 46 | контрольна група, n = 30 | | | знач. | 95 % CI |
| GG (XX) | 10,9 | 26,7 | 4,03 | 0,13 | 0,34 | 0,10–1,15 |
| GA (Xx) | 50,0 | 50,0 | | | 1,00 | 0,40–2,51 |
| AA (xx) | 39,1 | 23,3 | | | 2,11 | 0,75–5,93 |
| G (X) | 35,9 | 51,7 | 3,72 | 0,05 | 0,52 | 0,27–1,01 |
| A (x) | 64,1 | 48,3 | | | 1,91 | 0,99–3,70 |

Примітка. n – кількість осіб, P – значимість відмінностей між контрольною і дослідною групами, OR (odds ratio) – коефіцієнт відношення шансів.

Таблиця 5. Розподіл генотипів/алелів поліморфного локусу с.453–351A>G гена *ESR1* серед жінок дослідної та контрольної груп

| Генотипи/алелі <i>ESR1</i> с.454–351 (Xba I) | Частота, % | | χ^2 | p | OR | |
|--|------------------------|--------------------------|----------|------|-------|-----------|
| | дослідна група, n = 23 | контрольна група, n = 15 | | | знач. | 95 % CI |
| GG (XX) | 4,3 | 13,3 | 1,73 | 0,42 | 0,30 | 0,02–3,59 |
| GA (Xx) | 52,2 | 60,0 | | | 0,73 | 0,19–2,72 |
| AA (xx) | 43,5 | 26,7 | | | 2,12 | 0,52–8,67 |
| G (X) | 30,4 | 43,3 | 1,32 | 0,25 | 0,57 | 0,22–1,49 |
| A (x) | 69,6 | 56,7 | | | 1,75 | 0,67–4,55 |

Примітка. n – кількість осіб, P – значимість відмінностей між контрольною і дослідною групами, OR (odds ratio) – коефіцієнт відношення шансів.

Таблиця 6. Розподіл генотипів/алелів поліморфного локусу с.453–351A>G гена *ESR1* серед чоловіків дослідної та контрольної груп

| Генотипи/алелі <i>ESR 1</i> с.454–351 (Xba I) | Частота, % | | χ^2 | p | OR | |
|---|---------------------------|-----------------------------|----------|------|-------|-------------|
| | дослідна група, n = 46 | контрольна група, n = 30 | | | знач. | 95 % CI |
| GG (XX) | 17,4 | 40,0 | 2,57 | 0,28 | 0,32 | 0,07 – 1,41 |
| GA (Xx) | 47,8 | 40,0 | | | 1,38 | 0,37 – 5,14 |
| AA (xx) | 34,8 | 20,0 | | | 2,13 | 0,46 – 9,84 |
| G (X) | 41,3 | 60,0 | 2,54 | 0,11 | 0,47 | 0,18 – 1,20 |
| A (x) | 58,7 | 40,0 | | | 2,13 | 0,84 – 5,44 |

Примітка. n – кількість осіб, P – значимість відмінностей між контрольною і дослідною групами, OR (odds ratio) – коефіцієнт відношення шансів.

розподілу генотипів с.454–397 T>C (PvuII) та с.454–351 T>C (XbaI) гена *ESR1* є співмірними з даними Лівшиць Г.Б. та ін., які проводили аналіз алельного поліморфізму гена *ESR1* серед населення України [14]. Встановлено, що генотип TT(pp) поліморфного локусу с.454–397 T>C (PvuII) гена *ESR1* асоціюються із збільшенням ризику виникнення невдалих ЕКЗ у 1,59 рази, а генотип AA(xx) поліморфного локусу с.454–351 T>C (XbaI) гена *ESR1* – у 2,11 рази.

Результати статистичної обробки отриманих даних та визначений показник відношення шансів, який відображає ризик невдалих ЕКЗ, відмінності у частотах алелів G (X) та A (x) поліморфного локусу с.453–351A>G гена *ESR1* досліджуваної та контрольної груп є значимі ($\chi^2=3,72$, $p\leq 0,05$). Обчислення показника відношення шансів виявило асоціацію алеля A(x) із вірогідним зростанням невдалих ЕКЗ у 1,91 рази при довірчому інтервалі 0,99 – 3,7. Таким чином, отримані дані вказують що генетичним чинником, який асоційований із збільшенням ризику виникнення невдалих ЕКЗ є наявність в генотипі алелю A(x) поліморфного локусу с.453–351 A>G гена *ESR1*.

Висновки

Встановлено розподіл генотипів та алелів поліморфних варіантів с.454–397 T>C (PvuII) та с.454–351 T>C (XbaI) гена *ESR1* серед подружніх пар з ідіопатичним безпліддям і невдалими ЕКЗ та подружніх пар у яких двоє і більше дітей і які не мали репродуктивних порушень в анамнезі та випадків ЕКЗ. Генотип TT(pp) поліморфного локусу с.454–397 T>C (PvuII) гена *ESR1* асоційований із збільшенням ризику виникнення невдалих ЕКЗ у 1,59 рази, а генотип AA(xx) поліморфного локусу с.454–

351 T>C (XbaI) гена *ESR1* – у 2,11 рази. Генетичним чинником, який збільшує ризик виникнення невдалих ЕКЗ є наявність в генотипі алелю A(x) поліморфного локусу с.453–351 A>G гена *ESR1*.

Перелік літератури

1. Dohle G.R., Jungwirth A., Colpi G. et al. Guidelines on Male Infertility // European Association of Urology. – 2007. – P. 1–70.
2. Matthews J., Gustafsson J.A. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta // Mol Interv. – 2003. – Vol. 3, № 5. – P. 281–292.
3. Yaghmaie F., Saeed O., Garan S.A. et al. Estrogen receptor-alpha immunoreactivity in the arcuate hypothalamus of young and middle-aged female mice // Neuroendocrinology Letters. – 2010. – Vol. 31, № 1. – P. 15.
4. Shim G.J., Kis L.L., Warner M. et al. Autoimmune glomerulonephritis with spontaneous formation of splenic germinal centers in mice lacking the estrogen receptor alpha gene // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103, № 21. – P. 8298.
5. Meurs J., Schuit S., Weel A. Association of 5-prime estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density, vertebral bone area and fracture risk // Hum. Molec. Genet. – 2003. – Vol. 12. – P. 1745–1754.
6. Kjaergaard A., Ellervik C., Tybjaerg-Hansen A. et al. Estrogen receptor alpha polymorphism and risk of cardiovascular disease, cancer, and hip fracture: cross-sectional, cohort, and case-control studies and a meta-analysis // Circulation. – 2007. – Vol. 115, № 7. – P. 861–871.
7. Lawlor D., Timpson N., Ebrahim S. et al. The association of oestrogen receptor alpha-haplotypes with cardiovascular risk factors in the British Women's Heart and Health Study // Eur. Heart J. – 2006. – Vol. 27, № 13. – P. 1597–1604.
8. Lcazar L., Arakaki P., Godoy-Santos A. et al. Estrogen receptor polymorphism and its relationship to pathological process // Am. J. Med. Sci. – 2010. – Vol. 340. – P. 128–132.
9. Molvarec A., Széplaki G., Kovács M. et al. Estrogen receptor alpha (ESR1) PvuII and XbaI gene polymorphisms in ischemic stroke in a Hungarian population // Clin. Chim. Acta. Eur. Heart J. – 2007. – Vol. 382. – P. 100–105.
10. Safarinejad M., Shafiei N., Safarinejad S. Association of polymorphisms in the estrogen receptors alpha, and beta (ESR1, ESR2) with the occurrence of male infertility and semen parameters // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 2010. – Vol. 122, № 4. – P. 193–203.

11. Макух Г. В., Заставна Д.В., Туркус М. Я. Пат. 32044 UA, МПК G01N33/49 (2006.01) Спосіб виділення ДНК з лейкоцитів периферійної крові / Г. В. Макух, Д.В. Заставна, М.Я. Туркус [та ін.], заявник ДУ «Інститут спадкової патології АМНУ». – № u200801896; заявл. 14.02.2008; опубл. 25.04.2008, Бюл. №8.
12. Mc. Pherson M. J., Quirke P., Taylor G.R. PCR a Practical Approach. – New York: Oxford University press, 1993. – 253 p.
13. Boroumand M., Ghasemi Y., Shiraniet S. et al. Association Between Estrogen Receptor- α PvuII and XbaI Gene Polymorphisms With Extracranial Carotid Stenosis // Labmedicine. – 2011. – Vol. 42, № 11. – P. 663–667.
14. Лівшиць Г.Б., Кучеренко А.М., Подлесна С.С. Аналіз алельного поліморфізму гена ESR1 серед населення України // Цитологія і генетика. – 2012. – Т. 46, № 4. – С. 31–39.

Представлено М.А. Пілінською, Л.Л. Лукаш
Надійшла 13.01.2015

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ C.454–397T/C И C.454– 351A/G ГЕНА РЕЦЕПТОРА ЭСТРОГЕНА ESR1 У СЕМЕЙНЫХ ПАР С ИДИОПАТИЧНИМ БЕСПЛОДИЕМ

М. Я. Туркус

ГУ «Институт наследственной патологии НАМН Украины»
Украина, 79000, г. Львов, ул. Лысенка, 31-а
e-mail: tyrkus.m@ihp.lviv.ua

Цель. установить ассоциацию полиморфных локусов 397 T>C и 351 A>G гена *ESR1* у супружеских пар с неудачными ЭКО. **Методы.** Выделение и очистку ДНК проводили методом высаливания. Амплификацию последовательностей ДНК *in vitro* проводили, используя метод полимеразной цепной реакции. Для идентификации мутаций гена эстрогенового рецептора применяли метод рестрикционного анализа продуктов ПЦР соответствующих последовательностей. Электрофорез продуктов ПЦР проводили в 2 % агарозном геле. **Результаты.** Проведено молекулярно-генетическое исследование полиморфных вариантов с.454–397 T>C (PvuII) и с.454–351 T>C (XbaI) гена *ESR1* в 23 супружеских пар с идиопатическим бесплодием и неудачными ЭКО и 15 супружеских пар, у которых двое и больше детей и не имели репродуктивных нарушений в анамнезе и случаев ЭКО. Установлено распределение генотипов и аллелей с.454–397 T>C и с.454–351 T>C гена *ESR1*, проведена статистическая обработка данных. Установлено более высокую частоту генотипа *ESR1* 453–397TT (pp) среди супружеских пар с неудачными ЭКО (32,6 %) по сравнению с парами контрольной группы (23,3 %), что увеличивает риск неудачных ЭКО в 1,59 раза и генотипа с .454–351 AA (xx) среди супружеских пар с неудачными ЭКО (39,1 %) по сравнению с парами контрольной группы (23,3 %), что увеличивает риск неудачных ЭКО в 2,11 раза. Установлено статистически достоверные различия в частотах аллелей G (X) и A (x) локуса с.453–351 A> G гена *ESR1* в обследуемых группах пациентов ($\chi^2 = 3,72$, $p \leq 0,05$). Вычисление показателя отношения шансов выявило ассоциации аллеля A (x) с вероятным ростом неудачных ЭКО в 1,91 раза при доверитель-

ном интервале 0,99–3,7. **Выводы.** Генетическим фактором, который ассоциирован с увеличением риска возникновения неудачных ЭКО, является наличие в генотипе аллеля A(x) полиморфного локуса с.453–351 A>G гена *ESR1*.

Ключевые слова: ген *ESR1*, ЭКО, эстрогеновый рецептор, идиопатическое бесплодие, молекулярно-генетическое исследование.

MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF POLYMORPHIC LOCI C.454–397T/C AND C.454–351A/G OF THE ESTRO- GEN RECEPTOR GENE ESR1 IN COUPLES WITH IDIO- PATHIC INFERTILITY

M. Tyrkus

Institute of Hereditary Pathology, NAMS of Ukraine
Ukraine, 79000, Lviv, Lysenko str., 31-a
e-mail: tyrkus.m@ihp.lviv.ua

Aim. To establish the association of polymorphic locus 397 T>C and 351 A>G of the gene *ESR1* with unsuccessful attempts of extracorporeal fertilization in couples. **Methods.** DNA from peripheral blood leukocytes was isolated and purified using a modified salting out method. Extracted DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR). To identify the mutations of the estrogen receptor gene the PCR products were subsequently digested with the restriction enzymes. The PCR products were fractionated by electrophoresis in 2 % agarose gel. **Results.** A molecular-genetic study of polymorphic variants of *ESR1* gene c.454–397 T> C (PvuII) and c.454–351 T> C (XbaI) was carried out in 23 couples with idiopathic infertility and failed extracorporeal fertilization and 15 couples without a history of reproductive disorders and cases of extracorporeal fertilization, who have two or more children (as control group). The distribution of genotypes and polymorphic variants of the gene *ESR1* among the subjects was determined and statistical analysis was performed. It was found a slightly higher frequency of genotype *ESR1* 453–397TT (pp) among the couples with unsuccessful attempts of extracorporeal fertilization (32.6 %) compared to the control group pairs (23.3 %), which increases the risk of unsuccessful extracorporeal fertilization by 1.59 times, The genotype c.454–351 AA (xx) was also more frequent among the couples with unsuccessful extracorporeal fertilization (39.1 %) compared to the control group pairs (23.3 %), which increases the risk of unsuccessful extracorporeal fertilization by 2.11 times. Statistically significant differences ($\chi^2 = 3,72$, $r \leq 0,05$) were found between the two groups of subjects by the frequency of alleles of G (X) and A (x) of the locus c.453–351 A> G of *ESR1* gene. Calculation of the odds ratio revealed the association of allele A(x) with probable increase in unsuccessful attempts of extracorporeal fertilization by 1.91 times with confidence interval 0.99–3.7. **Conclusions.** One of the genetic factors associated with the increased risk of unsuccessful extracorporeal fertilization is the presence of allele A(x) of polymorphic locus c.453–351 A> G of *ESR1* gene.

Keywords: gene *ESR1*, extracorporeal fertilization, estrogen receptor, idiopathic infertility, molecular-genetic study.