

Research Paper

Association Between the -1031 (T/C) Polymorphism of TNF- $\alpha$  Gene and Biochemical Factors in Women With Polycystic Ovary Syndrome



Mehdi Sahmani<sup>1</sup>, Talaate Dabaghi Ghaleh<sup>2</sup>, Maryam Yargholi<sup>2</sup>, Farshad Foroghi<sup>3</sup>, \*Amir Javadi<sup>4,5</sup>, Khadijeh Taherkhani<sup>6</sup>

1. Department of Biochemistry, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.
2. Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.
3. Department of Immunology, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.
4. Department of Social Sciences, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.
5. Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.
6. Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.



**Citation** Sahmani M, Dabaghi Ghaleh T, Yargholi M, Foroghi F, Javadi A, Taherkhani Kh. Association Between the -1031 T/C Polymorphism of TNF- $\alpha$  Gene and Biochemical Factors in Women With Polycystic Ovary Syndrome. Journal of Inflammatory Diseases. 2021; 24(6):486-497. <https://doi.org/10.32598/IJQUMS.24.6.1>

**doi** <https://doi.org/10.32598/IJQUMS.24.6.1>



**Received:** 23 Jun 2020  
**Accepted:** 11 Nov 2020  
**Available Online:** 01 Feb 2021

**Keywords:**  
Polycystic ovary syndrome, TNF- $\alpha$ , Gene polymorphism

ABSTRACT

**Background** Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) gene, as an inflammatory factor, plays an important role in reproductive physiology, especially in women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS).

**Objective** This study aims to investigate the relationship between the -1031 T/C polymorphism of TNF- $\alpha$  gene and biochemical factors in women with PCOS.

**Methods** In this case-control study, participants were 106 women with PCOS and 114 healthy women referred to Kosar Hospital in Qazvin, Iran. The TNF- $\alpha$  gene's polymorphism was determined using Polymerase Chain Reaction (PCR) technique and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) method. Biochemical factors of serum levels were also measured in two groups. Logistic regression analysis examined the relationship between the frequency of alleles in different states and the risk of PCOS.

**Findings** There were statistically significant difference in the mean levels of total cholesterol, triglycerides, testosterone, two-hour blood glucose and body mass index between the groups, whose values were higher in women with PCOS compared to healthy women ( $P < 0.001$ ). In women with PCOS, the mean serum levels of triglyceride and high-density lipoprotein were significantly different between the three TT, CC, TC genotypes of TNF- $\alpha$  gene polymorphism ( $P < 0.05$ ). The results of regression analysis showed that the TT genotype had significant association with the risk of PCOS (OR=2.43,  $P = 0.006$ , 95%CI: 1.28-2.62).

**Conclusion** It seems that there is a relationship between the -1301 (T/C) polymorphism of TNF- $\alpha$  gene and the risk of PCOS in women.

Extended Abstract

1. Introduction

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is the most common endocrine disorder in women and the most common cause of anovulatory infertility [1] followed by a review of formal guide-

lines, when they exist. The article ends with the authors' clinical recommendations. Stage A 22-year-old woman reports having hirsutism and irregular menses. She describes unpredictable and infrequent menses (five or six per year. Its global prevalence is about 5–10% [2]. This syndrome is characterized by symptoms such as menstrual disorders (especially oligomenorrhea), presence of small cysts in the ovaries on ultrasound images, and the symptoms of hyper-

\* Corresponding Author:

Amir Javadi, PhD.

Address: Department of Social Sciences, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.

Tel: +98 (28) 33336001

E-Mail: javadi\_a@yahoo.com

androgenism such as hirsutism, acne, and hair loss [3, 4]. Although the exact cause of PCOS is still unknown, genetic factors can play an important role in the development of this disease. A number of studies have found some genetic factors associated with PCOS in different populations [4-8]. Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) is an adipokine that plays an important role in systemic inflammation. This inflammatory factor is produced by macrophages, mast cells, lymphocytes and epithelial cells. Moreover, TNF- $\alpha$  is involved in some biological activities such as cell proliferation and differentiation, induction of programmed cell death, cachexia, and tumor regression [9]. It is located in the short arm of chromosome 6 (6p21.2) and consists of 4 exons and 3 introns [9]. Several single-nucleotide polymorphisms have been identified in the promoter region of this gene, one of the most common of which is -1301 (T/C) polymorphism. Various studies have been performed on the effects of this polymorphism of TNF- $\alpha$  gene on some inflammatory diseases such as inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis and breast cancer [11-14] which has been considered as one of pathogenic factors for various diseases. The promoter -1031(T/C). In addition, previous studies have shown that this polymorphism plays an important role in the incidence of endometriosis and preeclampsia in Asian women [11, 15, 16] which has been considered as one of pathogenic factors for various diseases. The promoter -1031(T/C). Given the important role of this polymorphism in the incidence of various diseases, including gynecological diseases, the present study aims to, for the first time, investigate the relationship of this polymorphism and biochemical factors with a susceptibility to PCOS in Iranian women.

## 2. Materials and Methods

In this case-control study, 106 women with PCOS and 114 age-matched apparently healthy control women with normal menstrual cycles were recruited from the Reproductive Center of Kowsar Hospital in Qazvin, Iran. All patients met the diagnostic criteria for PCOS according to the 2003 Rotterdam ESHRE/ASRM PCOS consensus; i.e. the presence of at least two of the following criteria: oligo-ovulation and/or anovulation, clinical and/or biochemical hyperandrogenism, and polycystic ovaries on ultrasound images. Women with hypothyroidism, pregnancy, non-classical congenital adrenal hyperplasia, Cushing's syndrome, and family history of diabetes were excluded from the study. For measuring biochemical parameters, 5 ml of blood was collected in two test tubes, one containing Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) used as anticoagulant for molecular tests and the other one without any anticoagulant for serum preparation. A DNA purification kit (QIAamp, Qiagen, USA) was used

to isolate DNA from the blood leukocytes. For -1301 (T/C) genotype, a 251 bp fragment of DNA was amplified by using a DNA thermal cyclor performing Polymerase Chain Reaction (PCR) by using oligonucleotide primers, including 5'-TATGTGATGGACTCACCAGG-3' (Forward primer) and 5'-CCTCTACATGGCCCTGTCTT-3' (Reverse primer). The PCR product was digested with BbsI restriction enzyme. The fragments underwent electrophoresis by 2%-4% agarose gel and then stained with ethidium bromide. The quantitative data were expressed as Mean $\pm$ Standard Deviation (SD). Chi-square test and logistic regression analysis were carried out to analyze the data. T-test was used to compare the mean values between the two groups.

## 3. Results

The frequency of TT allele was 52.8% in the PCOS group and 41.2% in the control group. The frequency of TC allele was 26.4% in the PCOS group and 19.3% the control group. The frequency of CC allele was 20.8% in the PCOS group and 39.5% in the control group. Statistical test results showed a significant relationship between genotypic dispersion in TNF- $\alpha$  gene promoter resulting from -1301 (T/C) polymorphism of the two groups ( $P < 0.01$ ). Moreover, results showed that TT genotype was associated with an increased risk of PCOS (OR=2.43,  $P=0.006$ , 95%CI: 1.28-2.62).

## 4. Discussion and Conclusion

The present study showed a relationship between -1301 (T/C) polymorphism of TNF- $\alpha$  gene and the risk of developing PCOS, such that with the increase of CC allele, the risk of PCOS decreases. PCOS is a polygenic pathological disorder that can affect several body organs [4, 7, 8]. Obesity and insulin resistance are associated with PCOS [4, 19]. Numerous studies have been performed on the association between the 1301 T/C polymorphism and diseases such as Behcet's syndrome, Crohn's disease and rheumatoid arthritis [11, 26-28] which has been considered as one of pathogenic factors for various diseases. The promoter -1031(T/C). In patients with Behcet's syndrome and Crohn's disease, an increase in allele of -1301 (T/C) polymorphism has been reported compared to healthy people, while in patients with ulcerative colitis and hyperandrogenism, the frequency of this allele was lower than the in healthy people [11, 28-30] which has been considered as one of pathogenic factors for various diseases. The promoter -1031(T/C). In the present study, it was shown that the C allele can have a protective role in people with PCOS; This is consistent with the results of a previous study [11] which has been considered as one of pathogenic factors for various diseases. The promoter -1031(T/C). Our results showed a statistically significant difference between the mean serum triglyceride level, High-

Density Lipoprotein (HDL), and the type of polymorphism in women with PCOS. Women with C allele of -1301 (T/C) polymorphism had lower serum triglyceride levels and higher HDL than other genetic groups. Since the increase in triglyceride level and decrease in HDL are important risk factors for obesity, insulin resistance and body mass index, it can be concluded that the change of these parameters in TT genotypes can play an effective role in development of PCOS in humans. In this study, patients with PCOS had a significant increase in testosterone and a decrease in Luteinizing Hormone (LH) compared to controls, which is consistent with the results of previous studies [4, 31, 32] abnormalities in lipid profile and intrinsic inflammatory status are associated with disease progression. The purpose of this study was to evaluate the effect of the I405V polymorphism of cholesteryl ester transfer protein (CETP). Increased testosterone and decreased LH levels can be important risk factors for developing PCOS. Furthermore, despite significant differences in the levels of sex hormones such as testosterone and LH between PCOS and control groups, but, no difference was found between controls and PCOS patients who had -1301 (T/C) polymorphism of TNF- $\alpha$  gene.

## Ethical Considerations

### Compliance with ethical guidelines

The present study obtained its Ethical Approval from the Research Ethics Committee of Qazvin University of Medical Sciences (Code: IR.QUMS.REC.1396.7). In this study, the principles of ethics in medical research were considered according to the Helsinki Declaration and the National Ethics Committee in Medical Research. All patient information was kept confidential.

### Funding

This study was extracted from the PhD. thesis of the third author at Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin.

### Authors' contributions

Conceptualization: Mehdi Sahmani, Talaate Dabaghi Ghaleh, Farshad Foroghi; Writing, editing & review: Mehdi Sahmani, Maryam Yargholi, Amir Javadi; Methodology and data analysis: Amir Javadi; Laboratory tests: Farshad Foroghi, Khadijah Taherkhani; Project administration: Mehdi Sahmani, Talaate Dabaghi Ghaleh.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Acknowledgments

The authors would like to thank Ms. Zahra Rashvand, an expert from the reference laboratory.

## مقاله پژوهشی

# ارتباط بین پلی مورفیسم 1301 (T/C) پروموتور ژن TNF- $\alpha$ و فاکتورهای بیوشیمیایی در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک

مهدی سهمانی<sup>۱</sup>، طلعت دباغی قلعه<sup>۲</sup>، مریم یارقلی<sup>۳</sup>، فرشاد فروغی<sup>۴</sup>، امیر جوادی<sup>۵</sup>، خدیجه طاهرخانی<sup>۶</sup>

۱. گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.
۲. گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.
۳. گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.
۴. گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.
۵. مرکز تحقیقات میکروپ شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.
۶. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

## چکیده

**مینه:** ژن فاکتور تومور نکروزیس آلفا به عنوان یک فاکتور التهابی نقش مهمی در فیزیولوژی باروری به خصوص در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک دارد.

**هدف:** از این مطالعه، بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم 1301 (T/C) پروموتور ژن TNF- $\alpha$  و فاکتورهای بیوشیمیایی در زنان مبتلا به PCOS بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مورد و شاهدی، ۱۰۶ زن مبتلا به PCOS و ۱۱۴ زن سالم مراجعه کننده به بیمارستان کوثر قزوین مورد بررسی قرار گرفتند. پلی مورفیسم ژن TNF- $\alpha$  با استفاده از تکنیک‌های واکنش زنجیرهای پلیمرز و چندشکلی طول قطعه محدود تعیین شد. سطح سرمی فاکتورهای بیوشیمیایی نیز در دو گروه اندازه گیری شد.

**یافته‌ها:** نتایج این مطالعه نشان داد که متوسط متغیرهای بیوشیمیایی شامل کلسترول تام، تری گلیسیرید، تستوسترون، گلوکز خون دوساعته و شاخص توده بدن در افراد مبتلا به PCOS اختلاف آماری معنی داری با گروه شاهد داشته و مقدار آن در زنان مبتلا به PCOS بیشتر از افراد سالم بود ( $P < 0.001$ ). در زنان مبتلا به PCOS متوسط سطح سرمی تری گلیسیرید و HDL بین سه نوع ژنوتیپ TT، CC، TC پلی مورفیسم ژن TNF- $\alpha$  با یکدیگر اختلاف آماری معنی داری داشتند ( $P < 0.05$ ). همچنین ارتباط آماری معنی داری بین نوع آلل‌ها و شانس ابتلا به PCOS وجود داشت؛ به طوری که ژنوتیپ TT با افزایش خطر ابتلا به PCOS همراه بود ( $P = 0.006$ ،  $OR = 2.43$ ،  $CI = 1.28 - 4.62$ ).

**نتیجه گیری:** با توجه به یافته‌ها به نظر می‌رسد بین پلی مورفیسم 1301 (T/C) پروموتور ژن TNF- $\alpha$  و خطر ابتلا به PCOS ارتباط وجود دارد.

تاریخ دریافت: ۰۳ تیر ۱۳۹۹  
تاریخ پذیرش: ۲۱ آذر ۱۳۹۹  
تاریخ انتشار: ۱۳ بهمن ۱۳۹۹

## کلیدواژه‌ها:

سندرم تخمدان  
پلی کیستیک  
پلی مورفیسم ژن  
TNF- $\alpha$  PCR-RFLP

## مقدمه

(به خصوص اولیگو منوره)، وجود کیست‌های کوچک در تخمدان در تصاویر سونوگرافی، علائم هایپر آندوژنیسم مانند پرمویی، آکنه و ریزش مو ظاهر می‌شود. زنان مبتلا به این سندرم در معرض افزایش خطر بیماری‌های جدی تری از قبیل سرطان آندومتر و پستان، دیس لیپیدمی، فشار خون، افزایش استرس اکسیداتیو، دیابت نوع ۲ و بیماری‌های قلبی عروقی هستند [۳، ۴].

علت قطعی PCOS هنوز ناشناخته است، ولی فاکتورهای

سندرم تخمدان پلی کیستیک<sup>۱</sup> شایع ترین اختلال غده اندوکرین در زنان و شایع ترین علت نازایی ناشی از عدم تخمک گذاری است [۱]. میزان شیوع این بیماری در سنین باروری زنان بین ۵ تا ۱۰ درصد است [۲]. این سندرم با علائمی از قبیل اختلالات قاعدگی

1. Polycystic Ovary Syndrome (PCOS)

## \* نویسنده مسئول:

دکتر امیر جوادی

نشانی: قزوین، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده پزشکی، گروه پزشکی اجتماعی.

تلفن: ۳۳۳۳۶۰۰۱ (۲۸) ۹۸+

رایانامه: javadi\_a@yahoo.com

و وجود تخمدان پلی کیستیک در سونوگرافی به عنوان فرد مبتلا به PCOS معرفی می‌شدند [۴، ۱۷].

بازه سنی افراد ۱۸ تا ۴۵ سال و شاخص توده بدنی بین ۲۵ تا ۳۵ کیلوگرم بر متر مربع در نظر گرفته شد. مواردی مثل هایپرتریئیدیسم، حاملگی، سندرم کوشینگ، هایپرپلازی آدرنال مادرزادی غیرکلاسیک، آندومتریوزیس و سابقه ابتلا به دیابت از جمله معیارهای خروج این مطالعه بود. هیچ‌کدام از مراجعه‌کنندگان مصرف قرص‌های ضدبارداری و همچنین قرص‌های دیگر در طول سه ماه قبل از مطالعه را نداشتند.

به منظور اجتناب از سوگیری انتخاب، نمونه‌های گروه شاهد از نظر متغیر سن با گروه مداخله همسان انتخاب شدند. پس از اخذ رضایت‌نامه آگاهانه، ۵ سی‌سی خون کامل در دو لوله آزمایش، یک لوله آزمایش حاوی ضدانعقاد EDTA<sup>۴</sup> جهت آزمایشات مولکولی و لوله دیگر بدون ضد انعقاد برای تهیه سرم جهت اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده به آزمایشگاه منتقل و در دمای منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمایش نگهداری شدند. ابتدا DNA نمونه‌های مورد مطالعه با استفاده از کیت کیاژن (Qiagen, QIAamp DNA Mini Kit, Germany) استخراج شدند. یک قطعه از DNA ژنومی به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) توسط پرایمرهای مستقیم 5' TATGTGATGGACTCACCAGG 3' و پرایمر معکوس 5' CCTCTACATGGCCCTGTCTT 3' هر یک از پرایمرها به ترتیب ۵۳/۸ و ۵۱/۱ بود. شرایط دمایی ترموسیکلر پس از بهینه‌سازی عبارت بود از: مرحله واسرشت اولیه ۹۶ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل ۹۴ درجه‌ای دناتوراسیون به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۳ درجه سانتی‌گراد اتصال به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد طول‌سازی به مدت یک دقیقه و در نهایت طول‌سازی نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در مدت ۱۰ دقیقه.

به منظور انجام PCR-RFLP، ۱۰ میکرولیتر محصول PCR به مدت یک شبانه‌روز در مجاورت یک میکرولیتر آنزیم Bbs I (تهیه‌شده از شرکت Fermentase آمریکا)، ۱۷ میکرولیتر آب و ۲ میکرولیتر از باز مخصوص آنزیم (۱۰x Fast Digest Buf-fer)، با حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر، بعد از مخلوط کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. محصولات PCR پس از انجام RFLP بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند. پس از برش در ژن، قطعه‌هایی به طول 71bp، 13bp و 180bp حاصل شد. برای تشخیص باندها بر روی ژل از DNA Ladder، ۱۰۰bp استفاده شد که از شرکت Fermentase خریداری شد (شکل شماره ۱).

به منظور بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی میزان کلسترول

ژنتیکی می‌توانند به عنوان عامل مهمی در بروز این بیماری نقش داشته باشند. مطالعات متعددی ارتباط بین عوامل ژنتیکی با استعداد ابتلا به بیماری PCOS در افراد جمعیت‌های مختلف را نشان می‌دهند [۴-۸]. سایتوکاین<sup>۲</sup> یک آدیپوکاین<sup>۳</sup> است که نقش مهمی در التهاب سیستمیک دارد. این فاکتور التهابی توسط ماکروفاژها، ماست سل‌ها، لنفوسیت‌ها و سلول‌های پوششی تولید می‌شود. علاوه بر آن، این سایتوکاین در بعضی از فعالیت‌های بیولوژیک از قبیل تکثیر و تمایز سلولی، القای مرگ برنامه ریزی‌شده سلولی، کاشکسی و همچنین در پس‌رفت تومور نیز نقش دارد [۹]. ژن TNF- $\alpha$  روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۶ (6p21.2) قرار دارد. این ژن حاوی چهار اگزون، سه اینترون و دارای طولی حدود ۳ کیلو جفت باز است [۹]. این ژن اولین بار توسط اولد<sup>۴</sup> و همکاران (۱۹۸۵) کلون و بررسی شد [۱۰]. پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی<sup>۵</sup> مختلفی در ناحیه پروموتور این ژن شناسایی شده که یکی از شایع‌ترین آن‌ها پلی‌مورفیسم (T/C) 1301- است. این پلی‌مورفیسم ناشی از جابه‌جایی تک‌نوکلئوتیدی باز آلی تیمین به جای سیتوزین است.

مطالعات مختلفی در مورد اثرات پلی‌مورفیسم (T/C) 1301- ژن TNF- $\alpha$  بر بعضی بیماری‌های التهابی مثل بیماری التهابی روده، آرتريت روماتوئید و همچنین سرطان پستان انجام شده است [۱۱-۱۴]. علاوه بر آن مطالعات قبلی نشان داده است که این پلی‌مورفیسم نقش مهمی در ارتباط با بروز آندومتریوز<sup>۶</sup> و همچنین پره‌اکلامپسی در زنان جمعیت آسیایی دارد [۱۶، ۱۵، ۱۱]. مطالعه جان یون<sup>۷</sup> و همکاران (۲۰۱۱) ارتباط آماری معنی‌داری بین این پلی‌مورفیسم از ژن TNF- $\alpha$  با بیماری PCOS در زنان کره‌ای را نشان داد [۱۱]. با توجه به نقش مهم این پلی‌مورفیسم در بروز بیماری‌های مختلف از جمله بیماری‌های زنان، مطالعه حاضر با هدف ارتباط بین این پلی‌مورفیسم و فاکتورهای بیوشیمیایی با استعداد ابتلا به PCOS در جمعیت زنان ایرانی انجام شد.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه مورد و شاهدی روی ۱۰۶ نفر از زنان مبتلا به PCOS و ۱۱۴ نفر از زنان نابارور انجام شد که در آن‌ها بعد از معاینات بالینی، پاراکلینیک و لاپاروسکوپی هیچ شواهدی دال بر ابتلا به PCOS وجود نداشت. افراد مورد مطالعه از زنان مراجعه‌کننده به مرکز درمانی کوثر استان قزوین انتخاب شدند. تشخیص PCOS بر اساس معیار روتردام ۲۰۰۳ و توسط پزشک متخصص زنان و زایمان انجام گرفت؛ به این صورت که زنان دارای حداقل دو معیار از معیارهای آموره یا الیگومنوره، سطوح افزایش‌یافته آندروژن‌ها

2. Tumour Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ )
3. Adipokine
4. Old
5. Single-Nucleotide Polymorphism (SNP)
6. Endometriosis
7. Jun

8. Ethylenediaminetetra-acetic.Acid
9. Thermal melting

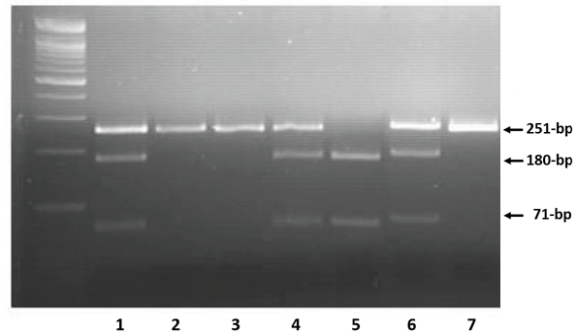
برای محاسبه لیپوپروتئین با دانسیته پایین<sup>۱۳</sup> از فرمول فریدوالد<sup>۱۴</sup> استفاده شد (فرمول شماره ۱) [۱۸].

۱.

$$LDL-c (mg/dL) = TC (mg/dL) - HDL-c (mg/dL) - TG (mg/dL)/5$$

میزان گلوکز سرم با روش گلوکز اکسیداز و با دستگاه آنالیزور هیتاچی اندازه‌گیری شد. سطح سرمی هورمون‌های LH، FSH، پرولاکتین و تستوسترون با استفاده از روش کمی لومینسانس<sup>۱۵</sup> توسط دستگاه Cobas e 411 analyze (ساخت ژاپن) اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها به صورت درصد و فراوانی و میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شد. برای بررسی نرمالیتی داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف<sup>۱۶</sup> استفاده شد. ارتباط بین فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها در بین پلی‌مورفیسم‌ها با آزمون مجذور کای و ارتباط همبستگی بین پیامد و متغیرهای پیش‌بینی‌کننده از آنالیز رگرسیون لجستیک انجام شد. نسبت شانس<sup>۱۷</sup> با فاصله اطمینان ۹۵ درصد



شکل ۱. باندهای حاصل از تأثیر آنزیم Bbs I روی محصول PCR

ردیف سمت چپ سایز مارکر 100bp، ردیف شماره ۲، ۳ و ۷ هموزیگوت TT (قطعات 251bp و 13bp)، ردیف شماره ۱، ۴ و ۶ هتروزیگوت CT (قطعات 251bp، 180bp و 71bp) و ردیف شماره ۵ هموزیگوت CC (قطعات 180bp، 71bp و 13bp) ضمناً باند 13bp در ژل قابل رؤیت نیست.

تام<sup>۱۰</sup>، لیپوپروتئین با دانسیته بالا<sup>۱۱</sup> و تری‌گلیسرید<sup>۱۲</sup> به ترتیب با روش‌های آنزیماتیک استاندارد کلسترول اکسیداز و گلیسرول کیناز با دستگاه آنالیزور هیتاچی (ساخت ژاپن) اندازه‌گیری شد.

13. Low-density lipoprotein (LDL-C)

14. Friedewald

15. Chemi. Luminescence

16. Kolmogorov Smirnov

17. Odds Ratio (OR)

10. Total Cholesterol (TC)

11. High-density lipoprotein (HDL-C)

12. Triglycerides (Tri)

جدول ۱. مقایسه خصوصیات جمعیت‌شناختی و بیوشیمیایی در دو گروه شاهد و مبتلا به PCOS

سطح معنی‌داری	میانگین $\pm$ انحراف معیار		متغیر
	مداخله (n=۱۰۶)	شاهد (n=۱۱۴)	
۰/۲۱۹	۳۲/۴۵/۴	۳۱/۵۶/۲	سن* (سال)
<۰/۰۰۱	۳۲/۵۴/۴	۲۶/۱۳/۶	*شاخص توده بدن (kg/m <sup>2</sup> )
<۰/۰۰۱	۲۰۱/۸۳۴/۹	۱۷۷/۵۱۳/۵	کلسترول تام (mg/dL)
<۰/۰۰۱	۱۳۶/۷۳۴/۷	۱۱۴/۳۳۰/۹	تری‌گلیسرید (mg/dL)
۰/۷۸۸	۴۰/۸۲/۸	۴۰/۹۲/۷	HDL-C (mg/dL)
۰/۰۷۱	۱۰۱/۲۳۷/۶	۹۹/۳۳۷/۹	LDL-C (mg/dL)
۰/۱۵۶	۹۲/۱۳۱۰/۳	۹۴/۶۱۵/۱	گلوکز ناشتا (mg/dL)
۰/۱۸۷	۱۶/۲۳۵/۹	۱۵/۲۳۵/۳	LH (IU/L)
۰/۱۵۵	۱۰/۵۴/۹	۹/۵۴/۵	FSH (IU/L)
۰/۶۰۷	۳۶/۴۳۱۰/۷	۳۵/۷۳۹/۵	پرولاکتین (μg/L)
۰/۰۰۹	۶۶/۱۳۳۵/۳	۵۲/۶۳۴۰/۷	تستوسترون (nmol/L)
<۰/۰۰۱	۸۰/۴۳۴/۳	۹۷/۱۳۴/۸	استرادیول (pg/ml)
۰/۰۰۴	۱۵۰/۱۳۳۳/۹	۱۴۲/۰۱۳۵/۵	قند خون ۲ ساعت بعد (mg/dL)

سطح سرمی استرادیول به طور معنی داری در زنان مبتلا به PCOS کمتر از گروه شاهد ( $P < 0/001$ ) است. همچنین آماره ارتباط معنی داری بین پراکندگی ژنوتیپی در پروموتور ژن TNF- $\alpha$  منتج شده از پلی مورفیسم 1301 (T/C) - دو گروه نشان داد؛ به طوری که فراوانی آلل TT در گروه PCOS برابر ۵۲/۸ درصد و در گروه شاهد ۴۱/۲ درصد؛ فراوانی آلل TC در گروه PCOS برابر ۲۶/۴ و در گروه شاهد ۱۹/۳ درصد و فراوانی آلل CC در گروه PCOS برابر ۲۰/۸ و در گروه شاهد ۳۹/۵ درصد بود ( $P < 0/001$ ). همچنین ارتباط بین تنوع آلل‌ها با افزایش خطر ابتلا به PCOS با استفاده از آنالیز رگرسیون لجستیک بررسی شد. نتایج نشان داد ژنوتیپ TT با افزایش خطر ابتلا به PCOS همراه است ( $OR = 2/43, CI = 1/28 -$ ) همراه است ( $P = 0/006, OR = 2/43, CI = 1/28 -$ ) (جدول شماره ۲).

محاسبه شد. برای مقایسه میانگین بین دو گروه از آزمون تی استفاده شد. سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.

### یافته‌ها

یافته‌ها نشان می‌دهد متوسط شاخص توده بدن، سطح سرمی کلسترول تام، تری گلیسیرید و قند خون دوساعته در افراد PCOS به طور معنی داری بیشتر از گروه شاهد است ( $P < 0/001$ ) (جدول شماره ۱).

متوسط سطح سرمی هورمون‌های تستوسترون به طور معنی داری در زنان مبتلا به PCOS بیشتر از گروه شاهد ( $P = 0/009$ ) و متوسط

جدول ۲. مقایسه پراکندگی ژنوتیپی و آنالیز رگرسیون لجستیک در پروموتور ژن TNF- $\alpha$  منتج شده از پلی مورفیسم 1301 (T/C)

ژنوتیپ	تعداد (درصد)		سطح معنی داری
	شاهد (n=114)	مورد (n=106)	
TT	۴۷ (۴۱/۲)	۵۶ (۵۲/۸)	۰/۰۰۶
TC	۲۲ (۱۹/۳)	۲۸ (۲۶/۴)	۰/۰۸۶
CC	۴۵ (۳۹/۵)	۲۲ (۲۰/۸)	-

مجله  
بیماری‌های تنهائی

جدول ۳. مقایسه پارامترهای جمعیت‌شناختی و بیوشیمیایی بین گروه‌های ژنوتیپی مرتبط با پلی مورفیسم 1301 (T/C) - به تفکیک دو گروه

متغیرها	میانگین $\pm$ انحراف معیار			سطح معنی داری
	مداخله	شاهد		
	TT (n=56)	CC (n=22)	TC (n=28)	
سن (سال)	۳۲/۶ $\pm$ ۵/۲	۳۱/۸ $\pm$ ۶/۷	۳۱/۸ $\pm$ ۵/۱	۰/۱۳۱
شاخص توده بدن ( $kg/m^2$ )	۳۲/۶ $\pm$ ۴/۵	۳۲/۹ $\pm$ ۴/۷	۳۱/۵ $\pm$ ۳/۹	۰/۲۰۸
کلسترول تام (mg/dL)	۲۰۴/۸ $\pm$ ۳۴/۹	۱۹۱/۴ $\pm$ ۲۲/۲	۲۰۴/۱ $\pm$ ۲۶/۹	۰/۲۳۴
تری گلیسیرید (mg/dL)	۱۳۵/۲ $\pm$ ۴۲/۳	۱۵۶/۲ $\pm$ ۴۰/۵	۱۳۴/۳ $\pm$ ۴۱/۱	۰/۸۱۸
HDL-C (mg/dL)	۴۱/۴ $\pm$ ۳/۲	۴۰/۵ $\pm$ ۲/۲	۳۹/۷ $\pm$ ۱/۶	۰/۴۵۰
LDL-C (mg/dL)	۱۰۲/۱ $\pm$ ۸/۳	۹۹/۹ $\pm$ ۷/۲	۹۹/۳ $\pm$ ۵/۰	۰/۱۱۲
گلوکز ناشتا (mg/dL)	۹۳/۳ $\pm$ ۱۱/۳	۹۰/۲ $\pm$ ۱۰/۹	۹۱/۰ $\pm$ ۷/۱	۰/۳۸۸
LH (IU/L)	۱۷/۱ $\pm$ ۶/۳	۱۴/۹ $\pm$ ۳/۹	۱۵/۴ $\pm$ ۳/۶	۰/۱۱۱
FSH (IU/L)	۱۱/۱ $\pm$ ۵/۲	۹/۴ $\pm$ ۵/۱	۱۰/۳ $\pm$ ۴/۸	۰/۴۸۳
پرولاکتین ( $\mu g/L$ )	۳۶/۲ $\pm$ ۱۱/۹	۴۰/۵ $\pm$ ۱۰/۶	۳۳/۴ $\pm$ ۱۰/۵	۰/۱۰۰
تستوسترون (nmol/L)	۶۷/۳ $\pm$ ۳۵/۴	۶۰/۸ $\pm$ ۲۶/۹	۶۷/۷ $\pm$ ۳۹/۴	۰/۰۷۲
استرادیول (pg/ml)	۸۲/۴ $\pm$ ۴/۸	۷۳/۵ $\pm$ ۵/۲	۸۱/۷ $\pm$ ۴/۴	۰/۳۷۴
قند خون ۲ ساعت بعد (mg/dL)	۱۵۲/۸ $\pm$ ۲۷/۳	۱۴۸/۱ $\pm$ ۲۲/۷	۱۴۸/۲ $\pm$ ۱۸/۶	۰/۲۸۷

مجله  
بیماری‌های تنهائی

در این مطالعه بیماران مبتلا به PCOS به طور معنی‌داری افزایش میزان تستوسترون و کاهش میزان LH نسبت به گروه شاهد داشتند که این یافته‌ها با نتایج مطالعات قبلی مشابهت داشت [۳۲، ۳۱، ۴۰]. افزایش میزان تستوسترون و کاهش میزان LH می‌تواند از عوامل خطر مهم در ایجاد PCOS باشد. آنالیز داده‌ها نشان داد علی‌رغم اختلاف معنی‌داری که در سطح هورمون‌های جنسی مثل تستوسترون و LH در بین افراد PCOS و گروه شاهد دیده شد، ولی این اختلاف در بین افراد گروه شاهد و PCOS که دارای پلی‌مورفیسم 1301 (T/C) - $\alpha$  TNF بودند، وجود نداشت که این مسئله مطرح می‌شود که احتمالاً این پلی‌مورفیسم با اختلال اندوکروینی در افراد ارتباط ندارد.

تا به امروز هیچ‌گونه مکانیسمی بین ارتباط پلی‌مورفیسم با بروز PCOS گزارش نشده است؛ هرچند مطالعات مختلفی ارتباط بین پلی‌مورفیسم با بروز PCOS را نشان دادند. از این رو مطالعه روی سایر نشانگرهای ایمونولوژیکی و پلی‌مورفیسم‌های مختلف در آینده ضروری به نظر می‌رسد تا بتوان بهتر در مورد اثرات پلی‌مورفیسم‌های ژنی با بیماری PCOS نظر داد. علاوه بر آن با توجه به تفاوت‌های ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف و همچنین روش زندگی افراد پیشنهاد می‌شود که مطالعاتی در سطوح وسیع‌تر و در نژادهای مختلف انجام شود.

### ملاحظات اخلاقی

#### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی با کُد IR.QUMS.REC.1396.7 مورد تأیید قرار گرفته است. در این مطالعه اصول اخلاق در پژوهش‌های پزشکی طبق بیانیه هلسینکی و کمیته اخلاق ملی در پژوهش‌های پزشکی در نظر گرفته شد. کلیه اطلاعات بیماران به صورت محرمانه حفظ شد.

#### حامی مالی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه نویسنده سوم در گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین است. کلیه مخارج آن بر عهده نویسندگان بوده و هیچ کمک مالی از سازمان‌های تأمین‌کننده در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نشده است.

#### مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی: مهدی سهرمانی، طلعت دباغ قلعه و فرشاد فروغی؛ نگارش: مهدی سهرمانی، مریم یارقلی و امیر جوادی؛ روش‌شناسی و تحلیل داده‌ها: امیر جوادی؛ کارهای آزمایشگاهی: فرشاد فروغی و خدیجه طاهرخانی؛ بازبینی و ویراستاری: مهدی سهرمانی، مریم یارقلی و امیر جوادی؛ مدیریت پروژه: مهدی سهرمانی و طلعت دباغ قلعه.

در گروه شاهد مقایسه پارامترهای جمعیت‌شناختی و بیوشیمیایی بین سه گروه ژنوتیپی اختلاف آماری معنی‌داری بین سه ژنوتیپ نشان نداد (جدول شماره ۳). همچنین در گروه PCOS مقایسه این پارامترها بین سه گروه ژنوتیپی نشان داد که تنها متوسط سطح سرمی تری‌گلیسیرید و HDL با یکدیگر اختلاف آماری معنی‌داری دارند ( $P < 0.05$ ).

### بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که بین پلی‌مورفیسم 1301 (T/C) - $\alpha$  TNF و شانس ابتلا به PCOS ارتباط وجود دارد؛ به نحوی که هر قدر در افراد آلل CC بیشتر باشد، خطر ابتلا به PCOS در آن‌ها کمتر است. مطالعات گذشته نشان می‌دهد که بیماری PCOS یک اختلال پاتولوژیکی پلی‌ژنیک است و می‌تواند چندین ارگان را درگیر کند [۸، ۷، ۴]. فاکتورهای ژنتیکی می‌توانند در فنوتیپ متابولیکی و همچنین در باروری زنان مبتلا به PCOS نقش داشته باشند. در این مطالعه ارتباط بین پلی‌مورفیسم 1301 - $\alpha$  TNF/پروموتور ژن با وضعیت ابتلا به PCOS در زنان ایرانی مورد مطالعه قرار گرفت. مطالعات پیشین نشان داده است که چاقی و مقاومت به انسولین با ابتلا به PCOS ارتباط دارد [۱۹، ۴].  $\alpha$  TNF یک سایتو کاین پیش‌التهابی چندکاره است که نقش مهمی در بروز چندین بیماری دارد. این ژن نه تنها در تخمک و سلول‌های گرانولوزای تخمدان، بلکه در مایع فولیکولی موجود در تخمدان وجود دارد [۲۲-۲۰، ۱۱]. این فاکتور می‌تواند با میزان آپوپتوز تخمدان، افزایش هورمون‌های استروئیدی تخمدانی و میزان تخمک‌گذاری در ارتباط باشد [۲۵-۲۳، ۱۱].

میزان بیان این ژن در مرحله رونویسی و هم بعد از رونویسی تنظیم می‌شود. مطالعات متعددی روی ارتباط بین پلی‌مورفیسم 1301 - $\alpha$  TNF/ (T/C) از ژن و بیماری‌هایی از قبیل سندرم بهجت، بیماری کرون و آرتریت روماتوئید انجام شده است [۲۸-۲۶، ۱۱]. در بیماران مبتلا به سندرم بهجت و بیماری کرون افزایش آلل (T/C) 1301- در مقایسه با گروه شاهد دیده شده است؛ در حالی که در بیماری‌هایی مثل کولیت اولسراتیو و هایپراندرورژنیسم فراوانی این آلل کمتر از گروه شاهد بوده است [۳۰-۲۸، ۱۱]. در مطالعه حاضر نشان داده شد که آلل C می‌تواند نقش حفاظتی در افراد مبتلا به PCOS داشته باشد و نتایج این مطالعه با مطالعه قبلی مطابقت دارد [۱۱]. علاوه بر آن نتایج این مطالعه نشان داد که در زنان مبتلا به PCOS اختلاف آماری معنی‌داری بین متوسط سطح سرمی تری‌گلیسیرید و HDL و نوع پلی‌مورفیسم وجود دارد؛ به طوری که زنان دارای آلل 1301- C سطح سرمی تری‌گلیسیرید پایین‌تر و HDL بالاتر از گروه‌های ژنتیکی دیگر داشتند. از آنجایی که افزایش میزان تری‌گلیسیرید و کاهش HDL به عنوان عوامل خطر مهم در بروز چاقی، مقاومت انسولینی و میزان BMI نقش دارند، می‌توان نتیجه گرفت که افزایش و کاهش میزان این پارامترها در ژنوتیپ‌های TT می‌تواند در بروز PCOS در افراد نقش مؤثر داشته باشد.



### تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این تحقیق هیچ‌گونه تعارض منافی ندارد.

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از کارشناس محترم آزمایشگاه رفرانس، سرکار خانم زهرا رشوند، بابت همکاری صمیمانه در پیشبرد مراحل عملی تحقیق تشکر و قدردانی می‌کنند.

## References

- [1] McCartney CR, Marshall JC. Clinical practice. Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med*. 2016; 375(1):54-64. [DOI:10.1056/NEJMc1514916] [PMID] [PMCID]
- [2] Yildiz BO, Bozdogan G, Yapici Z, Esinler I, Yarali H. Prevalence, phenotype and cardiometabolic risk of polycystic ovary syndrome under different diagnostic criteria. *Hum Reprod*. 2012; 27(10):3067-73. [DOI:10.1093/humrep/des232] [PMID]
- [3] Li S, Zhu D, Duan H, Tan Q. The epigenomics of polycystic ovarian syndrome: From pathogenesis to clinical manifestations. *Gynecol Endocrinol*. 2016; 32(12):942-6. [DOI:10.1080/09513590.2016.1203409] [PMID]
- [4] Sahmani M, Dabbaghi Ghaleh T, Darabi M, Darabi M, Rashvand Z, Najafipour R. I405V polymorphism of CETP gene and lipid profile in women with endometriosis. *Gynecol Endocrinol*. 2013; 29(7):712-5. [DOI:10.3109/09513590.2013.797396] [PMID]
- [5] Ajmal N, Khan SZ, Shaikh R. Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) and genetic predisposition: A review article. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol X*. 2019; 3:100060. [DOI:10.1016/j.eurox.2019.100060] [PMID] [PMCID]
- [6] Franks S, McCarthy M. Genetics of ovarian disorders: Polycystic ovary syndrome. *Rev Endocr Metab Disord*. 2004; 5(1):69-76. [DOI:10.1023/B:REMD.0000016125.05878.96] [PMID]
- [7] De Leo V, Musacchio MC, Cappelli V, Massaro MG, Morgante G, Petraglia F. Genetic, hormonal and metabolic aspects of PCOS: An update. *Reprod Biol Endocrinol*. 2016; 14(1):38. [DOI:10.1186/s12958-016-0173-x] [PMID] [PMCID]
- [8] Joseph Sh, Barai RS, Bhujbalrao R, Idicula-Thomas S. PCOSKB: A KnowledgeBase on genes, diseases, ontology terms and biochemical pathways associated with Polycystic Ovary Syndrome. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44(D1):D1032-5. [DOI:10.1093/nar/gkv1146] [PMID] [PMCID]
- [9] Willrich MA, Murray DL, Snyder MR. Tumor necrosis factor inhibitors: Clinical utility in autoimmune diseases. *Transl Res*. 2015; 165(2):270-82. [DOI:10.1016/j.trsl.2014.09.006] [PMID]
- [10] Saha P, Smith A. TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018; 38(11):2542-3. [DOI:10.1161/ATVBAHA.118.311660] [PMID]
- [11] Yun JH, Choi JW, Lee KJ, Shin JS, Baek KH. The promoter -1031(T/C) polymorphism in tumor necrosis factor-alpha associated with polycystic ovary syndrome. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011; 9:131. [DOI:10.1186/1477-7827-9-131] [PMID] [PMCID]
- [12] Japur CC, Diez-Garcia RW, de Oliveira Penaforte FR, das Graças Pena G, de Araújo LB, de Sá MFS. Insulin, ghrelin and early return of hunger in women with obesity and polycystic ovary syndrome. *Physiol Behav*. 2019; 206:252-8. [DOI:10.1016/j.physbeh.2019.03.013] [PMID]
- [13] Panidis D, Farmakiotis D, Koliakos G, Rousso D, Kourtis A, Katsikis I, et al. Comparative study of plasma ghrelin levels in women with polycystic ovary syndrome, in hyperandrogenic women and in normal controls. *Hum Reprod*. 2005; 20(8):2127-32. [DOI:10.1093/humrep/dei055] [PMID]
- [14] Choi HJ, Cho YM, Moon MK, Choi HH, Shin HD, Jang HC, et al. Polymorphisms in the ghrelin gene are associated with serum high-density lipoprotein cholesterol level and not with type 2 diabetes mellitus in Koreans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91(11):4657-63. [DOI:10.1210/jc.2005-2549] [PMID]
- [15] Rosenfield RL, Ehrmann DA. The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The hypothesis of PCOS as functional ovarian hyperandrogenism revisited. *Endocr Rev*. 2016; 37(5):467-520. [DOI:10.1210/er.2015-1104] [PMID] [PMCID]
- [16] Brynskov J, Foegh P, Pedersen G, Ellervik C, Kirkegaard T, Bingham A, et al. Tumour necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) activity in the colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2002; 51(1):37-43. [DOI:10.1136/gut.51.1.37] [PMID] [PMCID]
- [17] Zore T, Joshi NV, Lizneva D, Azziz R. Polycystic Ovarian Syndrome: Long-term health consequences. *Semin Reprod Med*. 2017; 35(3):271-81. [DOI:10.1055/s-0037-1603096] [PMID]
- [18] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972; 18(6):499-502. [DOI:10.1093/clinchem/18.6.499] [PMID]
- [19] St-Pierre DH, Karelis AD, Coderre L, Malita F, Fontaine J, Mignault D, et al. Association of acylated and nonacylated ghrelin with insulin sensitivity in overweight and obese postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92(1):264-9. [DOI:10.1210/jc.2006-1603] [PMID]
- [20] Drakou A, Mavrogianni D, Ntzeros K, Protopapas A, Drakakis P, Loutradis D. Association between tumor necrosis factor- $\alpha$  gene-1031T/C promoter polymorphism and endometriosis in a European population. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2019; 40(2):20190033. [DOI:10.1515/hmbci-2019-0033] [PMID]
- [21] Milner CR, Craig JE, Hussey ND, Norman RJ. No association between the -308 polymorphism in the Tumour Necrosis Factor alpha (TNFalpha) promoter region and polycystic ovaries. *Mol Hum Reprod*. 1999; 5(1):5-9. [DOI:10.1093/molehr/5.1.5] [PMID]
- [22] Abutorabi R, Baradaran A, Sadat Mostafavi F, Zarrin Y, Mardanian F. Evaluation of tumor necrosis factor alpha polymorphism frequencies in endometriosis. *Int J Fertil Steril*. 2015; 9(3):329-37. [DOI:10.22074/ijfs.2015.4548] [PMID] [PMCID]
- [23] Lizneva D, Suturina L, Walker W, Brakta S, Gavrilova-Jordan L, Azziz R. Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2016; 106(1):6-15. [DOI:10.1016/j.fertnstert.2016.05.003] [PMID]
- [24] Kenigsberg LE, Agarwal C, Sin S, Shifteh K, Isasi CR, Crespi R, et al. Clinical utility of magnetic resonance imaging and ultrasonography for diagnosis of polycystic ovary syndrome in adolescent girls. *Fertil Steril*. 2015; 104(5):1302-9.e1-4. [DOI:10.1016/j.fertnstert.2015.08.002] [PMID] [PMCID]
- [25] Taghavi SA, Bazarganipour F, Allan H, Khashavi Z, Reisi N, Doshan N, et al. Pelvic floor dysfunction and polycystic ovary syndrome. *Hum Fertil*. 2017; 20(4):262-7. [DOI:10.1080/14647273.2017.1292003] [PMID]

- [26] Baptiste CG, Battista MC, Trottier A, Baillargeon JP. Insulin and hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010; 122(1-3):42-52. [DOI:10.1016/j.jsbmb.2009.12.010] [PMID] [PMCID]
- [27] Joham AE, Palomba S, Hart R. Polycystic Ovary Syndrome, obesity, and pregnancy. *Semin Reprod Med.* 2016; 34(2):93-101. [DOI:10.1055/s-0035-1571195] [PMID]
- [28] Ando T, Ichimaru Y, Konjiki F, Shoji M, Komaki G. Variations in the preproghrelin gene correlate with higher body mass index, fat mass, and body dissatisfaction in young Japanese women. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86(1):25-32. [DOI:10.1093/ajcn/86.1.25] [PMID]
- [29] Glueck CJ, Goldenberg N. Characteristics of obesity in polycystic ovary syndrome: Etiology, treatment, and genetics. *Metabolism.* 2019; 92:108-20. [DOI:10.1016/j.metabol.2018.11.002] [PMID]
- [30] Dumesic DA, Oberfield SE, Stener-Victorin E, Marshall JC, Laven JS, Legro RS. Scientific statement on the diagnostic criteria, epidemiology, pathophysiology, and molecular genetics of polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev.* 2015; 36(5):487-525. [DOI:10.1210/er.2015-1018] [PMID] [PMCID]
- [31] Gu HF, Mou M, Liang ZG, Sun C, Ren XY, Xiao YB. The association between paraoxonase 1 gene polymorphisms and polycystic ovarian syndrome. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2016; 62(14):44-7. [PMID]
- [32] Giandalia A, Pappalardo MA, Russo GT, Romeo EL, Alibrandi A, Di Bari F, et al. Influence of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  exon 2 and exon 6 and Insulin Receptor Substrate (IRS)-1 Gly972Arg polymorphisms on insulin resistance and beta-cell function in Southern Mediterranean women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Transl Endocrinol.* 2018; 13:1-8. [DOI:10.1016/j.jcte.2018.05.002] [PMID] [PMCID]

This Page Intentionally Left Blank

---