

# ارتباط پلی مورفیسم $G>A$ ژن $FSHR$ با ناباروری زنان

هانیه حقیقی (MSc)<sup>۱</sup> - دکتر حمیدرضا وزیری (PhD)<sup>۱</sup> - دکتر زیبا ظهیری (MD)<sup>۲</sup>

\*نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

پست الکترونیک: vaziri@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۹۴/۰۱/۱۹ تاریخ ارسال: ۹۴/۱۰/۰۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۲۷

## چکیده

**مقدمه:** ناباروری زنان بیماری چند عاملی با زمینه ژنتیکی بنیادین است. ژن گیرنده هورمون فولیکولی ( $FSHR$ ) بر بازوی کوتاه کروموزوم شماره دو قرار دارد. این ژن در سلول‌های گرانولوزای تخمدان بیان می‌شود و عاملی بایسته برای هماهنگی فرایش گنادها، بلوغ جنسی و پدیدآوری گامت در دوره‌ی باروری است. رخداد جهش در این ژن می‌تواند سبب کاهش میزان پیوند لیگاند به گیرنده و سطح cAMP شود.

**هدف:** بررسی پیوستگی پلی مورفیسم  $G>A$  ژن  $FSHR$  با ناباروری زنان.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه مورد-شاهدی بر ۷۷ زن نابارور و ۷۴ زن سالم انجام شد. DNA ژنومی از نمونه‌های خون محیطی دو گروه برون آورده شد. بازساخت ژنوتیپ به روش Allele-Specific PCR و آنالیز آماری با نرم افزار MedCalc Ver. 12 انجام شد.

**نتایج:** درصد فراوانی ژنوتیپی Thr/Thr, Ala/Thr, Ala/Ala در گروه کنترل به ترتیب ۱۰/۸۱، ۴۲/۱۰ و ۴۵/۹۴ و در گروه بیمار به ترتیب ۱۵/۵۸، ۶۳/۱۵ و ۲۲/۳۶ بود. فراوانی ژنوتیپی بین دو گروه کنترل و بیمار تفاوت معنی‌دار داشت ( $P=۰/۰۰۸$ ).

**نتیجه‌گیری:** ژنوتیپ Ala/Ala و Ala/Thr در افراد بیمار نسبت به کنترل فراوانی بیشتری داشت. در نتیجه پلی مورفیسم  $G>A$  می‌تواند به عنوان عامل خطر در ناباروری زنان بوده باشد. با این حال ممکن است با نگرش اندازه‌ی جمعیت و خزانه ژنتیکی نتیجه این مطالعه تغییر کند.

**کلید واژه‌ها:** پلی مورفیسم / گیرنده  $FSH$  / ناباروری

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره بیست و پنجم، شماره ۹۹، صفحات: ۲۳-۲۶

## مقدمه

ناباروری بیماری چندعاملی است که با گستره پهنای و چالش‌های اجتماعی، جسمی، روانی و اقتصادی همراه است (۱). برپایه شناسه سازمان بهداشت جهانی، به بارورنشدن یک زوج پس از یک‌سال آمیزش سازماند و بدون پیشگیری ناباروری گفته می‌شود (۲). ناباروری در نزدیک ۸۰ میلیون زوج در سراسر دنیا وجود داشته و میزان آن در کشورهای گوناگون از ۵ تا ۳۰ درصد ناهمسان است (۳). در ایران شیوع ناباروری ۹/۲۱-۱۲ درصد گزارش شد (۴). که ۳۸ درصد موارد در ارتباط با فاکتورهای زنانه است که این میزان تحت تاثیر عوامل محیطی و ژنتیکی قرار می‌گیرد (۵). از عوامل محیطی مهم می‌توان به افزایش سن، نوع تغذیه، سبک زندگی و کاربرد برخی داروها اشاره کرد (۲). از مهم‌ترین عوامل ژنتیکی موثر بر ناباروری زنان می‌توان به ناهنجاری‌های کروموزومی، جهش تک ژنی و پلی مورفیسم ژنی اشاره کرد (۶). به‌طور معمول بیشتر جهش‌های تک ژنی در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد (HPG) رخ می‌دهند. کم‌وبیش همه ژن‌های این نواحی کدکننده عوامل رونویسی، هورمون‌ها و گیرنده‌های هورمونی هستند که در تعیین تمایز جنسی، سیر طبیعی بلوغ و باروری نقش موثری ایفا می‌کنند (۷ و ۸). جهش‌ها و پلی مورفیسم ژنی می‌توانند با تغییر بیوشیمی به‌صورت مستقیم بر فرآورده ژن‌ها اثر گذاشته یا با تغییر در سطح رونویسی فعالیت راه‌انداز ژن را برهم زده و در پایان با تغییر کارکرد پروتئین سبب بروز بیماری‌های گوناگون مانند ناباروری شود (۹). یکی از مهم‌ترین ژن‌های محور HPG ژن گیرنده هورمون محرک فولیکولی ( $FSHR$ ) است (۱۰). ژن  $FSHR$  در جایگاه 2p21 قرار دارد، دربردارنده ۱۰ اگزون و ۹ اینترون است. بخش تراغشایی و داخل سلولی با اگزون ۱۰ و دمین خارج سلولی توسط سایر اگزون‌ها رمزدهی

ناباروری بیماری چندعاملی است که با گستره پهنای و چالش‌های اجتماعی، جسمی، روانی و اقتصادی همراه است (۱). برپایه شناسه سازمان بهداشت جهانی، به بارورنشدن یک زوج پس از یک‌سال آمیزش سازماند و بدون پیشگیری ناباروری گفته می‌شود (۲). ناباروری در نزدیک ۸۰ میلیون زوج در سراسر دنیا وجود داشته و میزان آن در کشورهای گوناگون از ۵ تا ۳۰ درصد ناهمسان است (۳). در ایران شیوع ناباروری ۹/۲۱-۱۲ درصد گزارش شد (۴). که ۳۸ درصد موارد در ارتباط با فاکتورهای زنانه است که این میزان تحت تاثیر عوامل محیطی و ژنتیکی قرار می‌گیرد (۵). از عوامل محیطی مهم می‌توان به افزایش سن، نوع تغذیه، سبک زندگی و کاربرد برخی داروها اشاره کرد (۲). از مهم‌ترین عوامل ژنتیکی موثر بر ناباروری زنان می‌توان به ناهنجاری‌های کروموزومی، جهش تک ژنی و پلی مورفیسم ژنی اشاره کرد (۶). به‌طور معمول بیشتر جهش‌های تک ژنی در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد (HPG) رخ می‌دهند. کم‌وبیش همه ژن‌های این نواحی کدکننده عوامل رونویسی، هورمون‌ها و گیرنده‌های هورمونی هستند که در تعیین تمایز جنسی، سیر طبیعی بلوغ و باروری نقش موثری ایفا می‌کنند (۷ و ۸). جهش‌ها و پلی مورفیسم ژنی می‌توانند با تغییر بیوشیمی به‌صورت مستقیم بر فرآورده ژن‌ها اثر گذاشته یا با تغییر در سطح رونویسی فعالیت راه‌انداز ژن را برهم زده و در پایان با تغییر کارکرد پروتئین سبب بروز بیماری‌های گوناگون مانند ناباروری شود (۹). یکی از مهم‌ترین ژن‌های محور HPG ژن گیرنده هورمون محرک فولیکولی ( $FSHR$ ) است (۱۰). ژن  $FSHR$  در جایگاه 2p21 قرار دارد، دربردارنده ۱۰ اگزون و ۹ اینترون است. بخش تراغشایی و داخل سلولی با اگزون ۱۰ و دمین خارج سلولی توسط سایر اگزون‌ها رمزدهی

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲. گروه زنان و زایمان، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

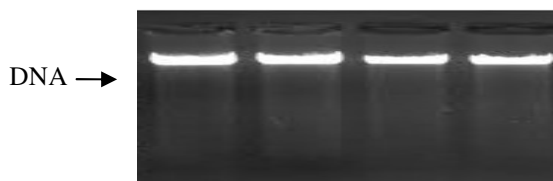
است که در آن نوکلئوتید گوانین (G) به نوکلئوتید آدنین (A) تبدیل می‌شود. در اثر این جهش اسیدآمینو ترئونین جایگزین اسیدآمینو آلانین می‌شود (۱۸). با توجه به اهمیت نقش ژن  $FSHR$  در شروع تخمک‌گذاری و باروری زنان، در این مطالعه ارتباط پلی مورفیسم  $G>A$  ژن  $FSHR$  با ناباروری در آنان بررسی شد.

### مواد و روش‌ها

**ویژگی نمونه‌ها:** در این پژوهش مورد-شاهدی ۱۵۱ زن شامل ۷۷ زن نابارور و ۷۴ زن بارور، بررسی شدند. نمونه‌گیری از مهر ۹۲ تا فروردین ۹۳ از مراجعه‌کنندگان به مرکز درمانی الزهرای رشت و آزمایشگاه تشخیص طبی مهر انجام شد. گستره سنی این افراد ۲۰ تا ۳۵ سالگی بود. هریک از افراد کنترل دست‌کم یک دوره بارداری طبیعی بدون مصرف هرگونه دارو و بدون بهره‌گیری از روش‌های ART گذرانده بودند. هریک از افراد نابارور با نظر پزشک متخصص انتخاب شده و سبب ناباروری آنها، انجام نشدن تخمک‌گذاری به دلیل آمنوره اولیه و ثانویه بود. ۲ میلی‌لیتر خون تام این افراد با قبول آنها نمونه‌گیری و برای پیشگیری از لخته شدن در ونوجکت‌های حاوی EDTA گردآوری شد و تا زمان آغاز آزمایش در  $20^{\circ}\text{C}$ - نگهداری شد.

**استخراج DNA:** اسنخراج DNA ژنومی با کیت آماده GPP-SOLUTION (ژن پژوهان، ایران) انجام شد و کیفیت DNA استخراج شده بر ژل آگارز ۱ درصد با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید بررسی شد. نمونه‌ی DNA استخراج شده از افراد بیمار و سالم بر ژل آگارز ۱٪ در شکل ۱ نشان داده شده‌است.

می‌شود (۱۱). سلول‌های گرانولوزای تخمدان و سرتولی بیضه مهم‌ترین نواحی بیان این ژن هستند. سطوح پایین‌تر بیان این ژن را می‌توان در بافت اندومتر رحم، پروستات، استخوان و سلول‌های اپی‌تلیال تخمدان مشاهده کرد (۱۲). ژن  $FSHR$  محصول پروتئینی به همین نام را رمزدهی می‌کند. گیرنده‌ی هورمون محرک فولیکولی عضوی از خانواده‌ی گیرنده‌های پیوسته به G-Protein بوده و از ۶۹۵ اسید آمینو تشکیل شده‌است، ۳۴۹ اسید آمینو دمین خارج سلولی، ۲۶۴ اسید آمینو بخش تراغشایی و ۶۵ اسید آمینو دمین داخل سلولی را تشکیل می‌دهند (۱۱). اتصال هورمون محرک فولیکولی (FSH) به بخش خارج سلولی گیرنده، سبب فعال‌سازی گیرنده و القای مسیر سیگنالی متعارف  $G\alpha_s$  /cAMP/Protein Kinase A (PKA) می‌شود. در پی القای این مسیر و افزایش سطح cAMP، ژن‌های حاوی عناصر پاسخ به cAMP (CRE) بیان می‌شوند (۱۳). بیان این ژن‌ها در سلول‌های گرانولوزای تخمدان در زنان منجر به تولید ترکیب استروئیدی شامل آروماتاز، بلوغ فولیکول‌ها، اووسیت و آغاز تخمک‌گذاری (۱۴) و در سلول‌های سرتولی بیضه در مردان سبب افزون کردن این سلول‌ها و تکامل اسپرماتوگونی طی میتوز می‌شود (۱۵). بررسی‌ها نشان می‌دهد جهش در ژن  $FSHR$  در بسیاری از گونه‌های پستانداران موجب کاستی‌های چشمگیر در باروری هر دو جنس می‌شود (۱۶). همچنین، موش‌های ماده‌ی دارای جهش در  $FSHR$  یا  $FSH$  مشکلاتی مانند ناباروری، تخمدان‌های کوچک و ایست فولیکوژنز را نشان می‌دهند (۱۷). اکثر پلی مورفیسم‌های ژن  $FSHR$  در ناحیه اینترون و درصد کمی از آنها در ناحیه کدکننده قرار دارند (۱۶). پلی مورفیسم بررسی شده در این مطالعه مربوط به نوکلئوتید ۱۲۵۵ واقع در اگزون شماره ۱۰



شکل ۱: نمونه‌ی DNA استخراج شده از افراد بیمار و سالم روی ژل آگارز ۱٪

از هر یک از پرایمرهای پیرو و پیشرو و ۵ μl آب مقطر استریل برای تکثیر قطعات مورد نظر بکار رفت.

**برنامه تکثیر محصول PCR با طول قطعه‌ی ۴۶۸bp:** واسرشت‌سازی نخست در ۵ دقیقه در ۹۴°C و پس از آن ۳۵ چرخه دمایی به صورت واسرشت‌سازی ثانویه در ۴۵ ثانیه و دمای ۹۴°C، واکنش اتصال آغازگر به رشته الگو در ۴۵ ثانیه و دمای ۶۰°C، واکنش بسط در ۴۵ ثانیه و دمای ۷۲°C، گسترش نهایی ۵ دقیقه در ۷۲°C برای کامل شدن تکثیر قطعات و مرحله پایانی که طی آن محصول PCR در دمای ۴°C به مدت بی‌نهایت قابل نگهداری است، انجام شد.

**برنامه تکثیر محصول PCR با طول قطعه‌ی ۱۷۰ bp:** واسرشت‌سازی اولیه در مدت ۵ دقیقه در ۹۴°C، و پس از آن ۳۵ چرخه دمایی به صورت واسرشت‌سازی ثانویه در ۴۵ ثانیه و دمای ۹۴°C، واکنش اتصال آغازگر به رشته الگو در ۴۵ ثانیه و دمای ۵۹°C، واکنش بسط در ۴۵ ثانیه و دمای ۷۲°C، بسط نهایی ۵ دقیقه در ۷۲°C به منظور کامل شدن تکثیر قطعات و مرحله پایانی که طی آن محصول PCR در دمای ۴°C به مدت بی‌نهایت قابل نگهداری است، انجام شد. درستی واکنش PCR انجام شده توسط ژل آگارز ۲ درصد ارزیابی شد. نمونه محصول PCR قطعات ۱۷۰ و ۴۶۸ جفت نوکلئوتیدی در شکل ۲ نشان داده شده‌است.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) دو جفت پرایمرهای ویژه پیشرو (F) و پرایمر پیرو (R) با برنامه oligo و NCBI primer BLAST طراحی شد. با این نگرش برای بررسی نوکلئوتید دارای گوانین یک پرایمر پیشرو و یک پرایمر پیرو طراحی شد که محصول PCR آن قطعه‌ای به طول ۴۶۸ جفت نوکلئوتید بود. همچنین در بررسی وجود نوکلئوتید دارای آدنین یک پرایمر پیشرو و یک پرایمر پیرو طراحی شد که محصول PCR آن بخشی به طول ۱۷۰ جفت باز بود.

پرایمر پیشرو آل G:

5'-TGGAATCTACCTGCTGCTCACTG-3'

پرایمر پیرو آل G:

5'-TCACTAGAGGAGGACACGAT-3'

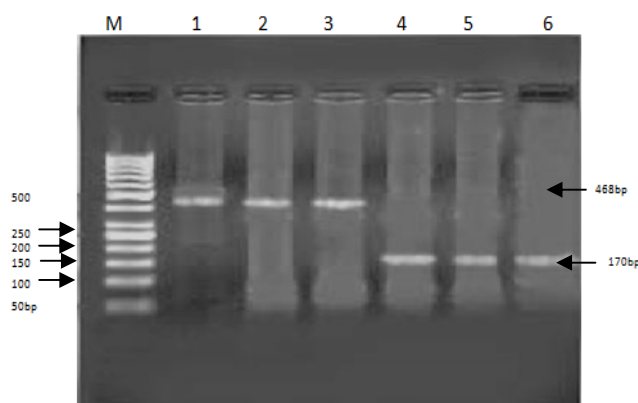
پرایمر پیشرو آل A:

5'-TGGAATCTACCTGCTGCTCACTA-3'

پرایمر پیرو آل A:

5'-ATCTTTCCAAGGTGATAGCTGT-3'

انجام PCR بر روی نمونه‌های DNA ژنومی برپایه شرایط بهینه انجام شد. روش در این مرحله AS-PCR بود که با دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad و در میکروتیوپ‌های ۰/۲ میکرولیتر با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۲۵ نانوگرم DNA الگو، ۵ μl، ۱۰ μl، ۱X Taq Premix PCR بافر



شکل ۲. ژل آگارز ۲٪ جهت بررسی محصولات PCR و اطمینان از تکثیر قطعه‌ی موردنظر در ژن FSHR. DNA = M. ۵۰ جفت بازی است. ستون‌های ۱-۶ محصولات حاصل از تکثیر PCR را نشان می‌دهد. ستون ۱: ژنوتیپ GG، ستون ۲ و ۳: ژنوتیپ GA و ستون ۴ و ۵: ژنوتیپ AA را نشان می‌دهد. قطعات ۱۷۰ جفت باز و ۴۶۸ جفت باز با فلش نشان داده شده‌است.

## نتایج

پس از واکنش PCR بر DNA استخراج شده نمونه‌های ۷۷ نفر زن نابارور و ۷۴ نفر زن بارور، فراوانی ژنوتیپی و آللی بدین فرامود بدست آمد و P-Value و odd ratio با (CI) ۹۵ درصد برای پلی مورفیسم  $G>A$  در هر یک از موارد برای هر دو گروه زنان نابارور و زنان سالم ارزیابی شد که نتایج آن با فرامود زیر به دست آمد.

جدول ۱. درصد فراوانی ژنوتیپی و آللی پلی مورفیسم  $G>A$  ژن  $FSHR$  در زنان نابارور و سالم

تعداد	ژنوتیپ			آلل		
	Ala/Ala	Ala/Thr	Thr/Thr	Ala	Thr	
۷۷	۱۷ (۲۲/۳۶)	۴۸ (۶۳/۱۵)	۱۲ (۱۵/۵۸)	۸۲ (۵۳/۲۴)	۷۲ (۴۶/۷۵)	زنان نابارور
۷۴	۳۴ (۴۵/۹۴)	۳۲ (۴۲/۱۰)	۸ (۱۰/۸۱)	۱۰۰ (۶۷/۵۶)	۴۸ (۳۲/۴۳)	زنان سالم
نتیجه آزمون $\chi^2$	$\chi^2=۹/۳۱$ P=۰/۰۸			$\chi^2=۵/۷$ P=۰/۰۱		

از ۷۷ زن نابارور، ۱۷ نفر (۲۲/۳۶٪) ژنوتیپ Ala/Ala، ۴۸ نفر (۶۳/۱۵٪) ژنوتیپ Ala/Thr و ۱۲ نفر (۱۵/۵۸٪) ژنوتیپ Thr/Thr و در ۷۴ نفر زن سالم، ۳۴ نفر (۴۵/۹۴٪) ژنوتیپ Ala/Ala، ۳۲ نفر (۴۲/۱۰٪) ژنوتیپ Ala/Thr و ۸ نفر (۱۰/۸۱٪) ژنوتیپ Thr/Thr داشتند. برای بررسی معنی‌دار بودن نتایج P-value با آزمون Chi-square محاسبه شد.  $\chi^2=۹/۳۱$  و P=۰/۰۰۸ به دست آمد. همچنین، فراوانی آللی زنان نابارور و سالم نیز بدین صورت بود: در ۷۷ زن نابارور، ۸۲ نفر آلل (۵۳/۲۴٪) Ala و ۷۲ نفر آلل (۴۶/۷۵٪) Thr و در ۷۴ زن سالم، ۱۰۰ نفر (۶۷/۵۶٪) آلل Ala و ۴۸ نفر (۳۲/۴۳٪) آلل Thr داشتند. برای بررسی معنی‌دار بودن نتایج P-value با آزمون Chi-square محاسبه شد.  $\chi^2=۵/۷$  و P=۰/۰۰۱ به دست آمد. همچنین، فراوانی آللی زنان نابارور و سالم نیز بدین صورت بود: در ۷۷ زن نابارور، ۸۲ نفر آلل (۵۳/۲۴٪) Ala و ۷۲ نفر آلل (۴۶/۷۵٪) Thr و در ۷۴ زن سالم، ۱۰۰ نفر (۶۷/۵۶٪) آلل Ala و ۴۸ نفر (۳۲/۴۳٪) آلل Thr داشتند.

تحلیل آماری: آنالیز آماری با نرم‌افزار Medcalc Ver12 انجام شد و میزان معنی‌دار بودن تفاوت ژنوتیپ‌های گروه بیمار و کنترل با آزمون  $\chi^2$  بررسی شد در این آزمون  $P<۰/۵$  بیانگر معنی‌دار بودن تفاوت ژنوتیپی دو گروه است. همچنین، بررسی تعادل هاردی-واینبرگ در این جمعیت با آزمون  $\chi^2$  انجام شد.

نتیجه آزمون  $\chi^2$  در زنان نابارور و سالم نیز بدین صورت بود: در ۷۷ زن نابارور، ۸۲ نفر آلل (۵۳/۲۴٪) Ala و ۷۲ نفر آلل (۴۶/۷۵٪) Thr و در ۷۴ زن سالم، ۱۰۰ نفر (۶۷/۵۶٪) آلل Ala و ۴۸ نفر (۳۲/۴۳٪) آلل Thr داشتند.

جدول ۲. نتیجه آزمون Odds-Ratio در دو گروه زنان سالم و زنان نابارور در پلی مورفیسم  $G>A$ 

تعداد	ژنوتیپ			آلل		
	Ala/Ala	Ala/Thr	Thr/Thr	Ala	Thr	
۷۷	۱۷ (۲۲/۳۶)	۴۸ (۶۳/۱۵)	۱۲ (۱۵/۵۸)	۸۲ (۵۳/۲۴)	۷۲ (۴۶/۷۵)	زنان نابارور
۷۴	۳۴ (۴۵/۹۴)	۳۲ (۴۲/۱۰)	۸ (۱۰/۸۱)	۱۰۰ (۶۷/۵۶)	۴۸ (۳۲/۴۳)	زنان سالم
نتیجه آزمون $\chi^2$	$\chi^2=۹/۳۱$ P=۰/۰۸			$\chi^2=۵/۷$ P=۰/۰۱		

محاسبه تعادل هاردی-واینبرگ در این جمعیت با نسبت  $\chi^2$  بررسی شد. بر همین اساس  $\chi^2=۷/۴۳$  به دست آمد. با توجه به جدول کای با درجه آزادی ۱ و احتمال بیولوژی ۰/۰۵، میزان  $\chi^2=۳/۸۴$  است. از مقایسه این دو مقدار از ارزش کای

به دلیل بزرگ‌تر بودن ارزش کای نمونه از ارزش کای جدول، انحراف بین مورد انتظار و مشاهده شده در این جمعیت معنی‌دار بود. به عبارت دیگر در این جمعیت تعادل برقرار نیست (جدول ۳).

جدول ۳. آزمون نسبت هاردی-واینبرگ پلی مورفیسم A >G ۱۲۵۵ ژن FSHR در زنان نابارور و سالم. O=مقادیر مشاهده شده در گروه بیمار و E=مقادیر مورد

انتظار بر اساس p و q بدست آمده از جمعیت کل

ژنوتیپ	تعداد		برآورد فراوانی آلی		تعداد مورد انتظار		O-E
	بیمار (مشاهده شده)	کنترل (مورد انتظار)	q	P	ERT	E2Ht	
Ala/Ala	۱۷	۳۴					۴/۱۴
Ala/Thr	۴۸	۳۲	۰/۴	۰/۶	۲۷/۷۲	۳/۹۶	۳/۲۹
Thr/Thr	۱۲	۸					۰/۰۰۸
نتیجه آزمون $\chi^2$		df=۱	$\chi^2=۷/۴۳$				

## بحث و نتیجه گیری

اسیدآمینه آلانین با اسیدآمینه ترئونین در کدون ۳۰۷ و جایگزینی اسیدآمینه سرین با اسیدآمینه آسپارژین در کدون ۶۸۰ است. بررسی‌ها نشان می‌دهد این دو پلی مورفیسم در زنان ناباروری که تحت درمان با مقادیر متفاوت FSH قرار می‌گیرند، عامل خطری در ایجاد نشانگان تخمدان پرتحرک و کاهش ذخیره تخمدانی است (۲۴ و ۲۵). Montanelli و همکاران در مطالعه‌ای بر ۲۶۶ زن (۳۷ زن با نشانگان تخمدان پرتحرک پس از IVF و ۹۹ زن بارور و ۱۳۰ زن بدون نشانگان تخمدان پرتحرک پس از IVF) نشان دادند که فراوانی آلل S۶۸۰ در زنان نابارور بدون نشانگان تخمدان پرتحرک در مقایسه با گروه زنان سالم بیشتر است و تفاوت معنی‌داری بین وجود ژنوتیپ Ser۶۸۰Ser در زنان نابارور و بارور وجود دارد. علاوه بر این فراوانی آلل S۶۸۰ در زنان نشانگان تخمدان پرتحرک نسبت به زنان بارور بیشتر است (N ۶۸۰، ۴۳٪؛ S ۶۸۰، ۵۷٪؛ P=۰/۰۱) این جستار نشان می‌دهد که وجود آلل S۶۸۰ افزون بر این‌که به عنوان عامل خطری در ناباروری زنان محسوب می‌شود، بلکه می‌تواند خطر نشانگان تخمدان پرتحرک را در زنانی که تحت درمان ناباروری با مقادیر مختلف FSH هستند، افزایش دهد. همچنین، وجود آلل A۶۸۰ شدت نشانگان تخمدان پرتحرک را در زنانی که تحت درمان با محرک‌های بالای FSH قرار می‌گیرند، افزایش می‌دهد (۲۶). در مطالعه Wang و همکاران بر زنان تایوانی در رابطه با تاثیر پلی مورفیسم Ser۶۸۰Asn با خطر ابتلای به اندومتریوز، نشان داده شد که آلل A۶۸۰ خطر ابتلای به اندومتریوز را کاهش می‌دهد (۲۷). سایر مطالعات بر نواحی پلی مورف ژن FSHR نشان می‌دهد که پلی مورفیسم G/A ۲۹- در ناحیه ۵'-UTR با تغییر در اتصال عوامل رونویسی بر راه‌انداز به‌عنوان عامل خطری در

ناباروری یک نشانگان چندعاملی با زمینه محیطی و ژنتیکی است. میزان ناباروری به دلایل گوناگون مانند افزایش سن ازدواج، آلودگی‌های محیط زیست، بیماری‌های مقاربتی و مشکلات اجتماعی حتی در جوامع پیشرفته رو به افزایش است (۱۹ و ۲۰). توالی‌یابی ژنوم انسان و بررسی جهش‌ها در شرایط پاتوفیزیولوژی مختلف نشان می‌دهد که تغییر ژنتیکی در غالب پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی به صورت پیاپی در سطح هورمون‌ها و گیرنده‌های آنها در محور HPG رخ می‌دهد (۲۱ و ۲۲). وقوع این تغییرات ژنتیکی تنظیم سیستم بازخورد منفی غدد درون ریز، عملکرد هورمون‌ها و گیرنده‌های آنها را تغییر می‌دهد و در نهایت با تاثیر بر سیستم تولید مثل انسان و ایجاد اختلال در مراحل گامتوژنز منجر به وقوع ناباروری در هر دو جنس می‌شود (۲۳). ژن FSHR یکی از ژن‌های ناحیه گنادی است (۱۶). نخستین جهش ژن FSHR در سال ۱۹۹۵ در زنان فنلاندی با نارسایی زودرس تخمدان دیده شد. طی این بررسی ۳۰ مورد از ۵۲ نفر یک جهش دگر معنی هموزیگوس را در بخش خارج سلولی اگزون شماره ۷ ژن FSHR نشان دادند. وقوع این جهش سبب جایگزینی اسیدآمینه آلانین در موقعیت ۱۸۹ با اسیدآمینه والین می‌شود. این جهش بر گنجایش اتصال لیگاند به گیرنده تاثیر می‌گذارد و سبب کاهش سطح cAMP و اختلال در پیشبرد مسیر سیگنالی می‌شود. تاکنون نواحی پلی مورف متعددی در ژن FSHR شناسایی شده ولی چون ناحیه‌ی انتهایی بخش خارج سلولی و کل بخش تراغشایی و بخش داخل سلولی توسط اگزون شماره ۱۰ کد می‌شود بررسی جهش‌های این ناحیه همواره اهمیت دارد. بیشترین بررسی پلی مورفیسم اگزون شماره ۱۰ مربوط به جایگزینی

اثر فنوتیپی متفاوت مانند آمنوره، الیگومنوره یا انجام نشدن تخمک‌گذاری در زنان ایجاد می‌کند. تاکنون مطالعات کمی در ارتباط با نقش پلی مورفیسم  $G>A$  ۱۲۵۵ ژن  $FSHR$  با ناباروری زنان صورت گرفته است. Doherty و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که افراد هتروزیگوت  $Ala/Thr$  در خطر بیشتری برای ابتلای به آمنوره اولیه هستند. همچنین، در بررسی جداگانه‌ای نبودن ارتباط این پلی مورفیسم با نارسایی زودرس تخمدان در زنان فنلاندی دیده شده است (۱۸).

به‌طور کلی در این تحقیق ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم ژن  $FSHR$  با ناباروری زنان وجود داشت. حضور آلل  $Thr$  در ناحیه اگزون ۱۰ ژن  $FSHR$  می‌تواند به عنوان عامل خطر در ناباروری زنان مطرح شود. هرچند با توجه به این‌که ناباروری بیماری چند عاملی است، تعیین نقش عوامل ژنتیکی و محیطی و تاثیر آنها بر یکدیگر نیازمند مطالعه در جمعیت‌ها و نژادهای مختلف است. اثر فنوتیپی پلی مورفیسم‌های ژنی همواره توسط سایر عوامل ژنتیکی و محیطی کاهش می‌یابد و میانکشی سایر ژن‌ها در مسیر بلوغ و تولید مثل ممکن است اثر پلی مورفیسم‌های ژن  $FSHR$  را تغییر دهد. همچنین، ارزیابی این پلی مورفیسم ممکن است در سایر جوامع به علت تغییر اندازه جمعیت مورد مطالعه، روش مورد استفاده در بررسی پلی مورفیسم و خزانه‌ی ژنتیکی متفاوت، نتایج دیگری داشته باشد.

**تشکر و قدردانی:** نویسندگان از همه افراد شرکت کننده در این تحقیق نهایت تشکر را داشته و مراتب سپاسداری خود را از دانشگاه گیلان که با پشتیبانی علمی خود شرایط مناسب برای انجام این پژوهش را فراهم ساخت، اعلام می‌نمایند. همچنین بر خود لازم می‌دانند از همکاری بخش ناباروری و آزمایشگاه بیمارستان الزهرا و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گیلان که زمینه لازم جهت گردآوری اطلاعات را فراهم کردند سپاسگزاری کنند.

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

رابطه با پرفشاری زنان است. به‌راستی وجود آلل  $A$  به عنوان عامل خطری در زنان با سابقه پرفشاری شناخته شده است (۲۸). در مطالعه‌ای دیگر بر این پلی مورفیسم، ژنوتیپ  $AA$  با فراوانی بالایی در زنانی با آمنوره اولیه و ثانویه دیده شده است (۲۹). این پژوهش با هدف بررسی پلی مورفیسم  $G>A$  ۱۲۵۵ ژن  $FSHR$  و تاثیر آن در ناباروری زنان انجام شد. این پلی مورفیسم در دومین لوپ داخل سلولی اگزون شماره ۱۰ رخ می‌دهد و سبب تبدیل نوکلئوتید گوانین به نوکلئوتید آدنین می‌شود. وقوع این تغییر منجر به جایگزینی اسیدآمینو آلانین به اسیدآمینو ترئونین در کدون ۴۱۹ می‌شود ( $A\epsilon 19T$ ). مطالعات نشان می‌دهد که این جهش بر میزان تمایل اتصال لیگاند به گیرنده تاثیرگذار است و بر انتقال سیگنال از مسیر  $cAMP/PKA$  تاثیر زیادی ندارد. این جهش سبب تغییر آمینواسید غیرقطبی به آمینواسید قطبی بدون بار در دومین لوپ داخل سلولی در اگزون ۱۰ می‌شود که این ناحیه در خانواده‌ی گیرنده‌های هورمون‌های گلیکوپروتئینی به شدت حفاظت شده است و نقش مهمی در کارکرد گیرنده و شناسایی لیگاند ایفا می‌کند (۱۸ و ۳۰). نتایج این پژوهش تفاوت معنی‌داری در توزیع فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی جایگاه  $G>A$  ۱۲۵۵ نشان دادند (به ترتیب  $P=0/01$  و  $P=0/008$ ). به طوری که فراوانی ژنوتیپ‌های  $Ala/Thr$  و  $Thr/Thr$  در افراد بیمار بیشتر از افراد سالم بوده و سبب افزایش ۳ برابری ناباروری زنان می‌شود (به ترتیب  $P=0/003$ ,  $P=0/003$ ,  $OR=3$ ,  $CI=1/037-8/7$ ,  $P=0/04$  و  $OR=3$ ,  $CI=1/014-2/9$ ,  $P=0/011$ ). همچنین، با توجه به مقدار فراوانی آلل  $Thr$  در افراد بیمار نسبت به افراد سالم، این آلل به عنوان عامل خطر در رابطه با ناباروری زنان تعیین می‌شود ( $P=0/011$ ,  $OR=1/82$ ). در نتیجه می‌توان گفت که ناحیه پلی مورف  $G>A$  ۱۲۵۵ در ژن  $FSHR$  استعداد ابتلا به ناباروری را در زنان افزایش می‌دهد. با توجه به اینکه این جهش در دمین تراغشایی گیرنده  $FSH$  رخ می‌دهد، با تاثیر بر کارکرد گیرنده،

## منابع

1. Greil AL, Slauson-Blevins K, McQuillan J. The experience of infertility: a review of recent literature. *Social Health Illness* 2010;32(1):140-62.

2. Olooto WE, Amballi AA, Banjo TA. A review of Female Infertility; important etiological factors and management. *J Microbiol Biotech Res* 2012;2(3):379-85.

3. Poongothai J, Gopenath T, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. *Singapore Med J* 2009;50(4):336-47.
4. Rohani Z, Naroienejad M. Evaluation of the prevalence of fallopian tube abnormality in primary and secondary infertility based on hysterosalpingography findings. *RJMS* 2007;13(53):105-11.
5. Bretveld R, Brouwers M, Ebisch I, Roeleveld N. Influence of pesticides on male fertility. *Scand J Work Environ Health* 2007;13:28.
6. Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempest H, Griffin DK. The genetic basis of infertility. *Reproduction* 2003;126(1):13-25.
7. Achermann JC, Ozisik G, Meeks JJ, Jameson JL. Genetic causes of human reproductive disease. *J Clin Endocrinol Metabol* 2002;87(6):2447-54.
8. Seminara SB, Crowley Jr WF. Perspective: the importance of genetic defects in humans in elucidating the complexities of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Endocrinology* 2001;142(6):2173-7.
9. Shastri BS. SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet* 2002;47(11):0561-6.
10. Heckert L, Daley I, Griswold M. Structural organization of the follicle-stimulating hormone receptor gene. *J Mol Endocrinol* 1992;6(1):70-80.
11. Simoni M, Gromoll Jr, Nieschlag E. The Follicle-Stimulating Hormone Receptor: Biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev* 1997;18(6):739-73.
12. Radu A, Pichon C, Camparo P, Antoine M, Allory Y, Couvelard A, et al. Expression of follicle-stimulating hormone receptor in tumor blood vessels. *New Engl J Med* 2010;363(17):1621-30.
13. Gloaguen P, Crépieux P, Heitzler D, Poupon A, Reiter E. Mapping the follicle-stimulating hormone-induced signaling networks. *Front Endocrinol* 2011;2:112-8.
14. Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev* 2009;30(6):624-712.
15. Ruwanpura SM, McLachlan RI, Meachem SJ. Hormonal regulation of male germ cell development. *J Endocrinol* 2010;205(2):117-31.
16. Laan M, Grigorova M, Huhtaniemi IT. Pharmacogenetics of FSH action. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2012;19(3):220.
17. Huhtaniemi I. Mutations along the pituitary-gonadal axis affecting sexual maturation: novel information from transgenic and knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 2006;254:84-90.
18. Doherty E, Pakarinen P, Tiitinen A, Kiilavuori A, Huhtaniemi I, Forrest S, et al. A novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metabol* 2002;87(3):1151-5.
19. Stephen EH, Chandra A. Declining estimates of infertility in the United States: 1982-2002. *Fertil Steril* 2006;86(3):516-23.
20. Macaluso M, Wright-Schnapp TJ, Chandra A, Johnson R, Satterwhite CL, Pulver A, et al. A public health focus on infertility prevention, detection, and management. *Fertil Steril* 2010;93(1):16. e1- e0.
21. Huhtaniemi I. Mutations affecting gonadotropin secretion and action. *Horm Res* 2004;60(Suppl. 3):21-30.
22. Simoni M, Nieschlag E, Gromoll J. Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. *Hum Reprod Update* 2002;8(5):413-21.
23. Gromoll J, Simoni M. Genetic complexity of FSH receptor function. *Trends Endocrinol Metabol* 2005;16(8):368-73.
24. de Castro F, Morón FJ, Montoro L, Galán JJ, Pérez-Hernández D, Padilla ES-C, et al. Human controlled ovarian hyperstimulation outcome is a polygenic trait. *Pharmacogenetics Genom* 2004;14(5):285-93.
25. Sharara FI, Scott Jr RT, Seifer DB. The detection of diminished ovarian reserve in infertile women. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179(3):804-12.
26. Daelemans C, Smits G, De Maertelaer V, Costagliola S, Englert Y, Vassart G, et al. Prediction of severity of symptoms in iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome by follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism. *J Clin Endocrinol Metabol* 2004;89(12):6310-5.
27. Wang H-S, Cheng B-H, Wu H-M, Yen C-F, Liu C-T, Chao A, et al. A mutant single nucleotide polymorphism of follicle-stimulating hormone receptor is associated with a lower risk of endometriosis. *Fertil Steril* 2011;95(1):455-7.
28. Nakayama T, Kuroi N, Sano M, Tabara Y, Katsuya T, Ogihara T, et al. Mutation of the follicle-stimulating hormone receptor gene 5'-untranslated region associated with female hypertension. *Hypertension* 2006;48(3):512-8.
29. Achrekar SK, Modi DN, Meherji PK, Patel ZM, Mahale SD. Follicle stimulating hormone receptor gene variants in women with primary and secondary amenorrhea. *J Assist Reprod Genet* 2010;27(6):317-26.
30. Allen LA, Achermann JC, Pakarinen P, Kotlar TJ, Huhtaniemi IT, Jameson JL, et al. A novel loss of function mutation in exon 10 of the FSH receptor gene causing hypergonadotrophic hypogonadism: clinical and molecular characteristics. *Hum Reprod* 2003;18(2):251-6.

# Analysis of Association of *FSHR* 1255G>A Polymorphism with Infertility in Women

Haghighi H (MSc)<sup>1</sup> - \*Vaziri H R (PhD)<sup>1</sup> - Zahiri Z (MD)<sup>2</sup>

\*Corresponding Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Email: vaziri@guilan.ac.ir

Received: 08/Apr/2015 Revised: 26/Dec/2015 Accepted: 16/Feb/2016

## Abstract

**Introduction:** Female infertility is one of the multifactorial diseases with a substantial genetic basis. Follicle stimulating hormone receptor (*FSHR*) encoding gene was mapped to the short arm of chromosome 2. The *FSHR* gene is expressed by granulosa cells in the ovary and it is an essential factor for regular gonadal development, sexual maturation at puberty and gamet production during the fertile period. The mutation in the *FSHR* gene leads to decrease in ligand binding to receptor and cAMP levels.

**Objective:** The aim of this study was to evaluate the association between 1255G>A polymorphism at *FSHR* gene with female infertility.

**Materials and Methods:** In this case-control study, 50 infertile women and 74 controls were enrolled. Genomic DNA was extracted from peripheral blood. Genotypes were determined by Allele-Specific PCR. Statistical analysis was performed using the Medcalc program (Ver 12.1).

**Results:** The results of this study revealed that the frequencies of Ala/Ala, Ala/ Thr and Thr/Thr genotypes in the controls were 45.94%, 42.10% and 10.81%, respectively; while in infertile females they were 22.36%, 63.15% and 15.58%, respectively. A significant difference in genotypes frequencies was found between healthy and patient groups (P=0.008).

**Conclusion:** The prevalence rates of Ala/Ala and Ala/Thr genotypes were observed to be significantly higher in patients group, compared to control group. Our findings suggest that the 1255G>A polymorphism maybe associated with females infertility. However, the results may be different when selecting different genetic pools or target population size.

**Conflict of interest:** none declared

**Key words:** Infertility \ polymorphism \ Receptors *FSH*

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 99, Pages: 26-33

**Please cite this article as:** Haghighi H, Vaziri H R, Zahiri Z. Analysis of Association of *FSHR* 1255G>A Polymorphism with Infertility in Women. J of Guilan Univ of Med Sci 2016; 25(99):26-33. [Text in Persian]

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

2. Department of Obstetrics and Gynecology, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran