

بررسی جهش‌های ژن AR در زنان مبتلا به ناباروری

سوپار ساری*

۱- استادیار، دکتری زیست‌شناسی سلولی مولکولی، گروه علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران.

یافته / دوره نوزدهم / شماره ۱ / بهار ۹۶ / مسلسل ۷۱

چکیده

دریافت مقاله: ۹۵/۱۰/۱۸ پذیرش مقاله: ۹۵/۱۲/۲۴

- * مقدمه: ناباروری یک بیماری چند عاملی است. تغییرات و اختلالات هورمونی و ژنتیکی از جمله عوامل مهم در ناباروری زنان محسوب می‌شوند. تکوین و بلوغ تخمک‌گذاری وابسته به مسیرهای پیام‌رسانی مولکولی پاسخ‌دهنده به آندروژن‌ها است. بیش از صدها جهش منجر به مقاومت در عملکرد ژن گیرنده آندروژن (AR) ثبت گردیده است که از بین آنها می‌توان به ناحیه پلی‌مورفیک 5'UTR اشاره نمود. لذا با توجه به نقش گیرنده آندروژن در ناباروری، این مطالعه باهدف بررسی جهش‌های ژن AR در ناباروری زنان ایرانی انجام گردید.
- * مواد و روش‌ها: در این مطالعه از ۵۰ زن نابارور و ۸۰ زن سالم به‌عنوان کنترل، نمونه خون تهیه شد. بعد از استخراج DNA جهت تعیین جهش‌های ژن AR روش PCR مورداستفاده قرار گرفت.
- * یافته‌ها: در مطالعه حاضر در ناحیه 5'UTR ژن گیرنده آندروژن یک حذف نوکلئوتید T در موقعیت ۲۵+ مشاهده شد که این جهش تک نوکلئوتیدی باعث تغییر در بیان ژن گیرنده آندروژن نگردید که این خود نشان‌دهنده عدم ارتباط بین وقوع جهش در ناحیه پروموتوری ۲۳- تا ۲۱۴+ در ژن AR با ناباروری زنان می‌باشد. بر طبق نتایج حاصل از این مطالعه تفاوت معناداری بین دو گروه زنان مبتلا و گروه زنان سالم یافت نشد ($P=0/5$).
- * بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش حاکی از عدم ارتباط جهش ناحیه پروموتوری ۲۳- تا ۲۱۴+ ژن AR با ناباروری زنان در جمعیت مورد مطالعه می‌باشد.
- * واژه‌های کلیدی: ناباروری، گیرنده آندروژن.

* آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، گروه علوم سلولی مولکولی.

پست الکترونیک: sari.s@iaups.ac.ir

مقدمه

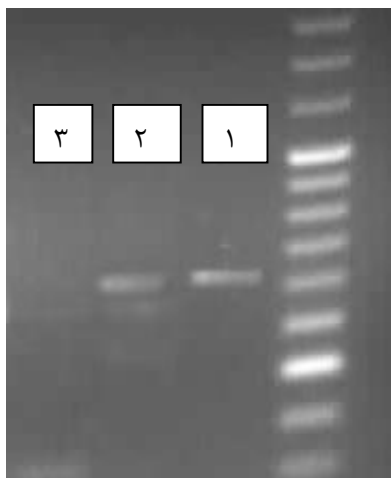
ناباروری به حالتی اطلاق می‌شود که زوجین پس از یک سال مقاربت‌های متوالی، منظم و بدون استفاده از روش‌های پیشگیری، با عدم موفقیت مواجه می‌شوند. بیش از ۱۵ درصد زوج‌ها در جهان نابارور هستند (۱). از دلایل عمده ناباروری می‌توان به ناهنجاری‌های ژنتیکی و عوامل عفونی اشاره کرد (۲،۳). تاکنون نقش جهش در ژن‌هایی از قبیل گیرنده استروژن آلفا و بتا و گیرنده‌های آندروژن در ناباروری صورت گرفته است. ژن گیرنده آندروژن (AR) در بافت‌های آندومتریال و ارگان‌های داخل لگن بیان می‌گردد و مسئول انتقال پیام‌های سلولی و عملکرد مناسب هورمونی در بافت آندومتریوتیک می‌باشد (۴،۵). ژن گیرنده آندروژن بر روی کروموزوم X و در موقعیت Xq11-12 قرار دارد این ژن، ۸ اگزون و 5'UTR نسبتاً طویل دارد (۶-۹). تمایز نهایی اووتیدها وابسته به گیرنده آندروژن است. به نظر می‌رسد که AR در مراحل نهایی تمایز تخمک نقش داشته باشد. از این رو جهش‌هایی که در ژن AR رخ می‌دهند، احتمالاً منجر به ایجاد تخمک‌هایی با اشکال غیرطبیعی می‌شوند. تاکنون بیش از ۵۰۰ جهش در ژن AR در افراد مبتلا به سندرم عدم حساسیت به آندروژن شناسایی شده است. همچنین جهش‌های نقطه‌ای متفاوتی در ناحیه پروموتوری ژن AR در بررسی بیماری‌های مختلف نیز شناسایی شده است. ناحیه 5'UTR ژن AR نیز دارای نواحی پلی‌مورفیک است. با در نظر گرفتن نقش 5'UTR در کنترل ترجمه، بیان ژن گیرنده آندروژن می‌تواند تحت تأثیر جهش در این ناحیه قرار گیرد (۱۰-۱۲). اهمیت این بررسی و توجه ما به جهش‌های ژن آندروژن رسپتور از یک سو معطوف به نقش مهم آن در ایجاد بیماری‌های زنان در ایران و همچنین عدم وجود مطالعاتی همانند تحقیق حاضر در خصوص ارتباط جهش‌های ژن آندروژن رسپتور با ناباروری زنان در کشور ضرورت انجام این تحقیق را افزون کرده

است. لذا در تحقیق حاضر بر آن شدیم تا به بررسی ارتباط جهش ناحیه 5'UTR (۲۳- تا ۲۱۴+) ژن آندروژن رسپتور با ناباروری در زنان ایرانی پی‌ببریم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، ۱۳۰ خانم ایرانی شامل ۵۰ بیمار نابارور که در بین آنها بیمارانی با سابقه حداقل دو سقط پشت سر هم وجود داشت و ۸۰ فرد کنترل سالم با حداقل سابقه یک تولد زنده و بدون هیچگونه سابقه سقط مورد بررسی قرار گرفتند. بیمارانی که دلیل سقط مکرر آنها عوامل آناتومیک، هورمونی، کروموزومی، عفونت و یا بیماری‌های خود ایمنی بود از گروه مورد مطالعه کنار گذاشته شدند. محدوده سنی بیماران و افراد کنترل بین ۲۵-۳۹ سال بود. همچنین سطح هورمون FSH بیماران توسط Chemiluminescent اندازه‌گیری شد. مبنای اندازه‌گیری هورمون FSH به این دلیل است که هورمون FSH هورمون ضروری برای فعالیت طبیعی گنادها است و برای صحت عملکرد گنادها اندازه‌گیری هورمون FSH انجام گرفت. پس از دادن آگاهی و کسب رضایت نامه، ۴ میلی لیتر خون محیطی از افراد مورد مطالعه در لوله‌های حاوی EDTA گرفته شد. استخراج DNA با روش Salting out صورت گرفت (۱۳). DNA استخراج شده تا زمان تحلیل در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بررسی جهش در ناحیه ۲۳- تا ۲۱۴+ از ژن AR توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) انجام شد. در این مطالعه، به‌منظور بررسی وجود جهش در ناحیه ۲۳- تا ۲۱۴+ از ژن AR، طراحی پرایمرهای مورد نیاز با استفاده از نرم افزار Primer3 انجام گردید و اختصاصیت پرایمرها توسط بلاست موجود در سایت NCBI برای یافتن نواحی دارای همولوژی در ژنوم انسان ارزیابی شدند. توالی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است. تکثیر ناحیه ۲۳- تا ۲۱۴+ در ژن AR توسط جفت پرایمرهای اختصاصی و با تکنیک PCR و با استفاده از دستگاه

ژن AR پس از PCR نتایج با ژل آگارز ۲٪ بررسی شدند (شکل ۱). نتایج نشان دادند در ناحیه مورد بررسی، حذف نوکلئوتید T در موقعیت ۲۵+ مشاهده شده است که این جهش باعث تغییر در بیان ژن و پروتئین AR نشد که این خود نشان‌دهنده عدم ارتباط بین وقوع جهش در ناحیه پروموتوری ۲۳- تا ۲۱۴+ در ژن AR با ناباروری زنان می‌باشد. جهت بررسی‌های معنی‌دار بودن تفاوت بین ژنوتیپ‌ها در دو گروه بیمار و کنترل بررسی‌های آماری با نرم افزار SPSS نسخه ۱۹، با استفاده از آزمون t-test انجام شد. مقدار P به دست آمده معادل ۰/۵ بود با توجه به مقدار P می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ارتباطی بین جهش‌های ژن AR در ناحیه پروموتوری ۲۳- تا ۲۱۴+ با ناباروری زنان در جمعیت مورد مطالعه وجود نداشت و ارتباط معناداری بین جهش‌های ژن AR در ناحیه پروموتوری ۲۳- تا ۲۱۴+ با ناباروری زنان در جمعیت مورد مطالعه مشاهده نشد.



شکل ۱. نمونه‌ای از ژل آگارز ۲٪ جهت بررسی وجود جهش در ناحیه ۲۳- تا ۲۱۴+ از ژن AR، قطعه ۲۶۲bp تکثیر شده مربوط به ناحیه پروموتوری در ژن AR در افراد بیمار و سالم را مشخص می‌کند. از سمت راست مارکر ۵۰bp، چاهک شماره ۱ نمونه فرد سالم، چاهک شماره ۲ نمونه فرد بیمار و چاهک شماره ۳ کنترل منفی

(Eppendorf, Master Cyclo Pro, هامبورگ، آلمان) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی DNA الگو، پرایمر، پیشرو و پرایمر پیرو هر کدام ۲۰pmol، کلرید منیزیم ۱/۵mM، dNTP هر کدام ۲۰۰µM و آنزیم Taq پلیمراز ۱ واحد (سیناژن) انجام شد. تکثیر در ۳۰ سیکل و تحت دماهای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه جهت واسرشت شدن رشته الگو انتخاب گردید. پس از گرادیان دمایی برای پرایمرها دمای ۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه به‌عنوان بهینه دمای فعالیت پرایمرها در نظر گرفته شد و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه جهت طویل شدن انجام گرفت. دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و طویل سازی نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. سپس به‌وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۲٪ جدا شدند و قطعه‌ای به طول ۲۶۲bp تکثیر یافت. در ادامه توالی تعدادی از نمونه‌ها جهت تأیید نتایج به روش سنجر به کمپانی ماکروژن ارسال گردید.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جمعیت مورد

مطالعه	
جایگاه	توالی پرایمر
۲۳- تا ۲۱۴+	F:5'-GTTGCATTGCTCTCCACCTCCC-3'
	R:5'-TCACCGAAGAGGAAAGGGCAGCTC-3'

آنالیز آماری

بررسی‌های آماری با نرم افزار SPSS نسخه ۱۹، با استفاده از آزمون t-test انجام شد. در این آزمون $P < 0/05$ نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوت ژنوتیپی بین دو گروه بود.

یافته‌ها

در این مطالعه ۱۳۰ نفر شامل ۵۰ نفر زن مبتلا به ناباروری و ۸۰ زن سالم به‌عنوان کنترل بررسی شدند. در تمام بیماران میزان هورمون FSH در حد طبیعی بود به‌منظور بررسی وجود جهش در ناحیه ۲۳- تا ۲۱۴+ از

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر در ناحیه 5'UTR ژن گیرنده آندروژن یک حذف نوکلئوتید T در موقعیت +۲۵ مشاهده شد که این جهش تک نوکلئوتیدی باعث تغییر در بیان ژن گیرنده آندروژن نشد و این خود نشان‌دهنده عدم ارتباط بین وقوع جهش در ناحیه پروموتوری ۲۳- تا +۲۱۴ در ژن AR با ناباروری زنان در جمعیت مورد مطالعه می‌باشد. نقص عملکردی و جهش در ژن گیرنده آندروژن با بیماری‌های زیادی از قبیل آندومتریوزیس و سندروم تخمدان پلی کیستیک در ارتباط است. علیرغم پیشرفت‌های عظیمی که در زمینه شناخت فیزیولوژی تولید مثل انسان و روش‌های درمان ناباروری صورت گرفته، نرخ وقوع این بیماری همچنان رو به افزایش است. امروزه مطالعه مباحث مولکولی گیرنده‌های آندروژن به عنوان یکی از مهمترین حوزه‌های مرتبط با بیماری ژنتیکی مطرح است. در این مطالعه جهش در ژن AR و ارتباط آن با ناباروری زنان مورد مطالعه قرار گرفت. این ژن روی کروموزوم X قرار دارد و حاوی ۸ اگزون است. ژن گیرنده آندروژن (AR) در بافت‌های آندومتریال و ارگان‌های داخل لگن بیان می‌گردد و مسئول انتقال پیام‌های سلولی و عملکرد مناسب هورمونی در بافت آندومتریوتیک می‌باشد. گیرنده ژن آندروژن یک فاکتور رونویسی است و از طریق تنظیم بیان ژن‌های دخیل در بلوغ و تکامل اندام‌های تولید مثلی در کنترل فرایند مسیره‌های زیستی نقش دارد. ناحیه پروموتوری ژن AR به‌عنوان یکی از نواحی پلی مورفیک شناخته شده است. مطالعه ارتباط میان بیماری‌های ژنتیکی و گیرنده‌های آندروژنی موضوع مهمی است که به ایجاد روش‌های درمانی کارآمد کمک می‌کند. ژن گیرنده آندروژن،

محتوای تکرارهای CAG می‌باشد. به طوری که جهش نقطه‌ای و یا تنوع توالی تکراری CAG در این ژن با ابتلا با بیماری‌های مختلف مرتبط است. ارتباط بین این تنوع پلی مورفیسمی و ابتلا به انواع سرطان‌ها و بیماری‌های زنان به اثبات رسیده است. جهانی‌نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۲ بیان کردند که تنوع پلی مورفیسم G1733A در ژن گیرنده آندروژن باعث ایجاد آندومتریوزیس می‌گردد (۱۴). در مطالعه‌ای توسط نام و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی جهش‌های ژن AR و ارتباط آن با بیماری پلی کیستیک انجام گرفت و نتایج نشان داد ارتباط معنی داری بین جهش در ژن AR با ایجاد بیماری پلی کیستیک وجود دارد (۱۵). بر طبق مطالعات انجام گرفته جهش‌ها و تنوع در توالی تکراری CAG در ژن AR با ابتلا با بیماری‌های مختلف از جمله بیماری آندومتریوزیس مرتبط است و از آنجایی که تاکنون ارتباط جهش در ناحیه پروموتوری ۲۳- تا +۲۱۴ در ژن AR با ناباروری زنان در جمعیت مورد مطالعه انجام نگرفته است و با توجه به ضرورت بررسی جهش‌های ناحیه پروموتوری ژن AR، مطالعه حاضر برای اولین بار به همین منظور در کشور انجام گرفت و در این پژوهش تنها به بررسی یک جنبه از عوامل مؤثر پرداخته شده است. از این رو نیاز است که نقش سایر عوامل ژنتیکی، محیطی و حتی پلی مورفیسم‌های دیگر ژن AR در بروز ناباروری بررسی شود (۱۶). نتایج این پژوهش حاکی از عدم ارتباط جهش ژن AR با ناباروری زنان می‌باشد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر نتیجه حمایت مالی نویسنده می‌باشد و از همکاری کلیه بیماران و افراد سالم داوطلب شرکت‌کننده در این مطالعه به دلیل همکاری‌های لازم برای اجرای این طرح قدردانی می‌گردد.

References

1. Eniola O, Adetola A, Abayomi B. A review of female infertility: important Etiological factors and management. *J Microbiol Biotech Res.* 2012; 2(3): 379-385.
2. Wu CH, Yang JG, Chang YJ, Hsu CC, Kuo PL. Screening of a panel of steroid-related genes showed polymorphisms of aromatase genes confer susceptibility to advanced stage endometriosis in the Taiwanese Han population. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2013; 52(4): 485-492
3. Guo R, Zheng N, Ding S, Zheng Y, Feng L. Associations between estrogen receptor-beta polymorphisms and endometriosis risk a Meta analysis. *Diagn Pathol.* 2014; 9: 184-194.
4. Li TC. Genetic polymorphism and recurrent miscarriage. *Reprod Biomed Online.* 2014; 29(6): 657-658.
5. Mehdipour P, Pirouzpanah S, Kheirollahi M, Atri M. Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism and breast cancer risk in Iranian women a case-control study. *Breast J.* 2011; 17(1): 39-46.
6. Vetsis Y, Khatamis R, Foroughmand A, Azarneushank R. Study of CAG Repeat length of the AR Gene in Infertile Men of Busher Porvlnce of Iran. *Cell J.* 2011; 12(1): 70-71.
7. Kodati V, Hasan Q. Genetic Polymorphisms and Molecular Pathogenesis of Endometriosis. In *Tech Open.* 2012; 2(3): 5-9.
8. Västermark Å, Giwercman YL, Hagströmer O, De-Meyts ER, Eberhard J, Ståhl O, et al. Polymorphic variation in the androgen receptor gene: association with risk of testicular germ cell cancer and metastatic disease. *Eur J Cancer.* 2011; 47(3): 413-419.
9. Su MT, Chen CH, Kuo PH, Hsu CC, Lee IW, Pan HA, et al. Polymorphisms of estrogen related Genes jointly confer susceptibility to human spermatogenic defect. *Fertil Steril.* 2010; 93(1): 141-149.
10. Lin LH, Baracat MC, Maciel GA, Soares JM Jr, Baracat EC. Androgen receptor gene Polymorphism and polycystic ovary syndrome. *Int J Gynaecol Obstet.* 2013; 120(2): 115-118.
11. Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, Paliouras M, Trifiro M. The androgen receptor gene Mutations database: 2012 update. *Hum Mutat.* 2012; 33(5): 887-894.
12. Zhuo FL, Xu W, Wang L, Wu Y, Xu ZL, Zhao JY. Androgen receptor gene polymorphisms and risk for androgenetic alopecia: a metaanalysis. *Clin Exp Dermatol.* 2012; 37(2): 104-111.
13. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16(3): 1215-1216.
14. Jahaninejad T, Ghasemi N, Zaimy M. STU1 Polymorphism on the Androgen Receptor Gene in Women with Endimetriosis. *Int J Fertil Steril.* 2012; 6(1): 123-124.

15. Nam H, Kim C, Cha M, Kim J, Kang B, Yoo H. Polycystic ovary syndrome woman with heterozygous androgen receptor gene mutation who gave birth to a child with androgen insensitivity syndrome. *Obstet Gynecol Sci.* 2015; 58(2): 179-182.
16. Faraji M, Salehi Z, Hamid Madani A, Analysis of androgen receptor gene mutations in men with idiopathic infertility. *journal of Mazandaran university of medical sciences.* 2013; 23(98): 2-9.

Analysis of Androgen Receptor Gene Mutations in female with infertility

Sari S^{*1}

1. Assistant Professor, Department of Molecular and Cellular Sciences, Faculty of Advanced Sciences & Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (IAUPS), sari.s@iaups.ac.ir

Received: 7 Jun 2017 **Accepted:** 14 March 2017

Abstract

Background : Infertility is a multifactorial disease. Hormonal disorders and genetic factors are important in female infertility. Development and maturation of ovulation are depending on the molecular signaling pathways in response to androgens. Over hundreds of mutations leading to resistance gene function in androgen receptor (AR) has been recorded. One of them is polymorphic region 5'UTR. Thus regarding to the role of androgen receptor in infertility, the aim of the present study was to investigate the association between gene mutations AR and infertility in Iranian women

Materials and Methods : In this study of 50 infertile women and 80 healthy women as a control, blood samples were taken. After extraction of DNA, PCR method was used to determine the AR gene mutations.

Results: In the present study in 5'UTR area at position +25 androgen receptor gene a T nucleotide deletion was observed. , therefore single nucleotide mutations did not change in the androgen receptor gene expression, so indicates the lack of communication between the AR gene mutations in the promoter region of 23 to 214+ in women with infertility. According to the results of this study are significant differences between the two groups of patients and healthy women was not found (P=0.5).

Conclusion: Results indicated no correlation between mutations in the promoter region of 23 to 214+ AR genes in the population studied women with infertility

Keywords: Infertility, Androgen receptor

***Citation:** Soyar S. Analysis of Androgen Receptor Gene Mutations in female with infertility. *Yafteh*. 2017;19(1): 1-7