

دراسة التعدد المظهري لجين مستقبل البروجستيرون progesterone receptor gene Polymorphism (PGR) في النساء المصابات بمتلازمة تكيس المبايض المتعدد (PCOS)

1- م.م. لقاء حسون صكبان 2- أ.د. علي حمود السعدي 3- أ.د. ستار جاسم ختروش
(1 و 3) جامعة كربلاء- كلية التربية للعلوم الصرفة 2 جامعة بابل – كلية العلوم
** البحث مستل من أطروحة الدكتوراه للباحث الأول

الخلاصة :

أجريت هذه الدراسة لبيان مدى علاقة التعدد الشكلي لجين مستقبل البروجستيرون Progesterone receptor polymorphism gene (PGR) مع الإصابة بمتلازمة تكيس المبايض المتعدد (PCOS)، إذ أوضحت نتائج الدراسة انخفاض النسبة المئوية للشكل الاليلي T1T1 لدى النساء المصابات بمتلازمة PCOS وبفروقات معنوية ($P \leq 0.001$) مقارنة مع نساء السيطرة، حيث بلغت النسبة (57.69 %) و (92%) على الترتيب. وكان تكرار الاليل T1T2 مرتفعاً لدى نساء الـ PCOS، وبلغت نسبته (38.64%) مقارنة بالسيطرة ($P \leq 0.001$). في حين لم تختلف النسب المئوية لتكرار الشكل الاليلي T2T2 كثيراً في كل من عينات السيطرة والـ PCOS حيث كانت منخفضة في المجموعتين (3.85%) في مجموعة نساء الـ PCOS مقابل (2%) في مجموعة النساء غير المصابات بالـ PCOS. وهذه النتائج بينت ارتباط الطراز الاليلي المتمثل الطافر T2T2 والطراز المتباين T1T2 ونسبة الاليل T2 الكلي مع متلازمة تكيس المبايض المتعدد والتي قد تعود لها إصابة النسبة العالية من نساء الـ PCOS بأمراض السرطان النسائية المختلفة.

Abstract

This study was conducted to demonstrate the relationship between the polymorphism of the progesterone receptor gene with polycystic ovary syndrome (PCOS), the result showed Reduction the Percentage of Allelic form T1T1 in women that Injury with PCOS and With differences In comparison with control women ($P \leq 0.001$)., where the Percentage was amounted 57.69% and 92% respectively , and the allelic frequency for T1T2 was High in PCOS women at 38.64% In comparison with control women that was at 6 % , While the Percentage of allelic frequency of T2T2 was didn't differences in both Samples (control & PCOS) , where were low in both groups at 3.85 % in POS and 2 % in control. This result was showed the Correlation of mutant allelic type T2T2 and differential type T1T2 and the Percentage of all T2 allele with PCOS and that may be the cause of injury the high proportion of women PCOS disease with various cancers women's.

المقدمة : Introduction

تُعرف متلازمة تكيس المبايض المتعدد (PCOS) polycystic ovary syndrome بأنها اضطراب معقد وراثياً غير متجانساً Heterogeneous (1). تتميز المتلازمة بحالة فرط الأندروجينات Hyperandrogenes وانعدام أو قلة الحيض Oligoamenhorrea or Amenhorrea والشعرانية Hirsutism وحب الشباب Acne ، كما وينتج في أغلب الحالات الشائعة العقم بين النساء المصابات في عمر التكاثري الطبيعي ، إذ تُعد من أكثر الأمراض الهرمونية الشائعة في مختلف بلدان العالم (2) ، فضلاً عن العيوب التكاثرية (العقم) للمتلازمة فأنها ترتبط أيضاً مع السمنة obesity ومقاومة الأنسولين Insulin Resistance والسكري من النوع الثاني (Diabetes Mellitus Type2) (3). كذلك الإجهاض المتكرر recurrent Miscarriage (4)، وأمراض القلب الوعائية (CVD) (5) والسرطانات المختلفة (6) والالتهابات المزمنة Chronic Inflammation (7).

تزداد مخاطر الإصابة بأمراض السرطانات المختلفة في النساء المصابات بتكيس المبايض المتعدد التي تشمل كل من سرطان بطانة الرحم Endometrial Cancer وسرطان الثدي Breast Cancer وسرطان المبايض Ovarian cancer ، إذ يكون الدور التنظيمي لهرمون البروجستيرون ضعيفاً في نسيج بطانة الرحم في النساء المصابات بالـ PCOS (8).

جين مستقبل البروجستيرون البشري (hPR) Human Progesterone receptor gene من الجينات المرشحة لحدوث متلازمة تكيس المبايض المتعدد وهو جين أحادي النسخة يقع على كروموسوم رقم 11 (11 q22-23) (9)، يقوم بوظائفه عادةً من خلال وجوده بشكله Isoforms هما (PGR –A) و (PGR –B)، التي يتم التعبير عنها من جين أحادي النسخة نتيجة النسخ لاثنتين من المحفزات المختلفة Promoters. يقوم PGR –A بتنشيط فعالية estrogen receptor gene (ER gene) بينما

يقوم PGR –B بتنشيط عمل جين (ER gene) (11) , (10) يعمل جين مستقبل البروجستيرون كمحفز على انقسام نسيج الثدي (Mitogen) ويرتبط مع مخاطر الإصابة بسرطان الثدي (12).
 اتضح في دراسة ارتباط التعدد المظهري لجين مستقبل البروجستيرون PGR مع سرطاني الثدي والمبيض في الولايات المتحدة ، إذ يزداد الاليل (T2T2.homozygous) و (T1T2.heterozygous) في حين لا يوجد هذا الارتباط في كل من اسبانيا وأوربا (13) ، في حين وجد في دراسة أخرى انخفاض مخاطر الإصابة بسرطان الثدي للنساء اللواتي يحملن الشكل الاليلي T2T2 قبل سن اليأس Premenopausal ولا توجد تلك العلاقة في النساء اللواتي تفوق أعمارهن الخمسون سنة أي بعد سن اليأس post menopausal (14). وجد كذلك النساء اللواتي يتعرضن لفقدان الحمل المتكرر (RPL) أن الاليل T2 لا يرتبط مع مخاطر (RPL) بالرغم من قلة البرجسترون الذي يلعب الدور الكبير في مرحلة تكون الجسم الأصفر من الدورة الحيضية وبداية الحمل من خلال نضوج البويضة Oocyst وغرس الجنين والمحافظة على المشيمة في بداية الحمل gestation (15) .

طرائق العمل Methods

جمع عينات الدم من النساء المصابات بالـ PCOS ونساء السيطرة Control

Collection of Blood Samples PCOS patients and Control

تم جمع عينات الدم من مركز الخصوبة في مدينة الصدر التعليمية في محافظة النجف الأشرف ووضع 3 مل في أنابيب مانعة للتخثر EDTA بعد ما تم رجها بلطف لمنع تخثر الدم . شملت الدراسة (130) مريضة راجعت المركز وتمت مقارنتهن مع (100) امرأة من الأصحاء ، وتم استثناء النساء المعالجات بالأدوية والمصابات بالإمراض الأخرى.

• طريقة استخلاص الـ DNA Protocol of DNA Isolation

تم استخلاص الـ DNA من الدم حسب تعليمات العدة (Kit) المجهزة من شركة Geneaid .

الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز

أجريت عملية الترحيل الكهربائي لـ DNA الناتج من الاستخلاص إذ أن تركيز الهلام المناسب لترحيل DNA هو 0.8 % وتمت عملية الترحيل الكهربائي حسب طريقة (16).

اختيار البادئ

تم اختيار البادئ Primer وكما موضح في الجدول رقم (3) لغرض إجراء الكشف الجزيئي ومعرفة التعدد الشكلي للجين والطفرات الموجودة (17).

جدول رقم(1) تسلسل البرايمر المستخدم المجهز من قبل شركة Alpha DNA

اسم الجين ومختصره	التسلسل
Progesterone receptorgene gene (PGR)	R-5'-TTC TTG CTA AAT GTC TGT TTT AA-3'
	F- 5'-TAT GAG CTA TTT GAG TAA AGC CT-3'

تخفيف البادئ Primer Dilution

جُهِز البادئ من شركة Bioneer Company/ Korea كمسحوق مجفف Lyophilized product ، تم تحضير محلول التخزين Stock solution ومحلول العمل Working solution بحسب تعليمات شركة Bioneer. إذ حُضِر المحلول التخزين بتركيز (100 picomols/ µl). أما محلول العمل Working solution فحضر بتركيز (10 picomols/ µl) بعد تخفيفه بالماء المزال الأيون Deionized water.

تفاعل أنزيم البلمره المتسلسل (PCR). يوضح الجدول رقم (2) المواد المستخدمة في الكشف الجزيئي باستخدام تفاعل أنزيم البلمره المتسلسل للعينات المدروسة .

جدول (2) المواد المستخدمة في تفاعل أنزيم البلمره المتسلسل

Component	Reaction size 20 reaction
Taq DNA polymerase	1 U
Each: d NTP(d ATP ,d CTP, d GTP, d TTP)	250 μ M
Tris- Hcl (PH 9.0) Kcl	10 mM
Mgcl2 Stabilizer and tracking dye	30 Mm
Template DNA	1.5 Mm
Primer	5-10 ng
H2O	18 μ l

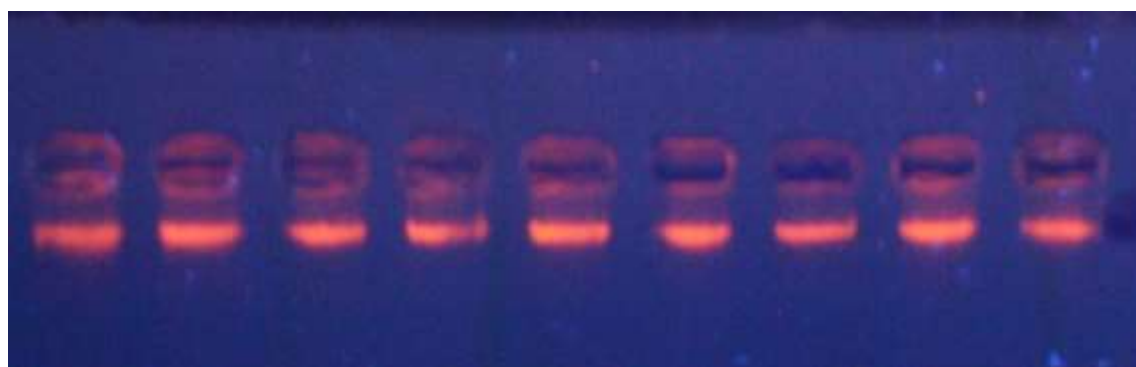
بعد ذلك تم مزج المواد أعلاه بواسطة جهاز المازج vortex ثم نُقلت لأنابيب إلى جهاز الـPCR.

جدول (3) البرنامج المستخدم لدراسة التعدد الشكلي لجين مستقبل البروجستيرون (PGR)

No.	Steps	Temperature	Time	No. of cycles
1	Initial Denaturation	94C°	5min.	1
2	Denaturation	94C°	30 sec.	35
3	Annealing	55C°	60 sec.	
4	Extension	72C°	45 sec	
5	Final Extension	72C°	5 min	1
6	Final hold	4	-	

النتائج والمناقشة Results and Dissection

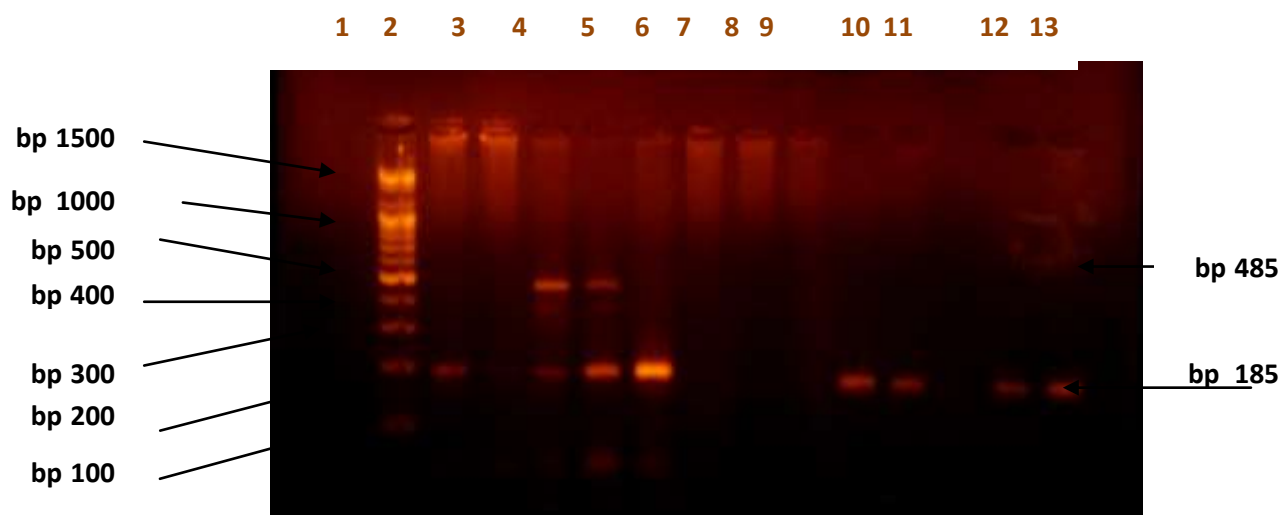
تم استخلاص الـ DNA من عينات الدم قيد الدراسة جميعها ، بعدها أجري الترحيل الكهربائي لها للتأكد من وجود حزم الـ DNA على هلام الاكاروزو بتركيز (0.8 %) بأستخدام فرق جهد 70 فولت/ سم وتيار 40 ملي فولت ولمدة ساعة واحدة وشوهدت الحزم تحت جهاز Photo documentation بعد صبغها بصبغة أنثيديوم يرومايد شكل (1) .



شكل (1) الترحيل الكهربائي لحزم الـ DNA لعينات النساء المصابات بالـPCOS على هلام الأكاروز المحضر بتركيز 0.8 (70 فولت – تيار 40 ملي أمبير) .

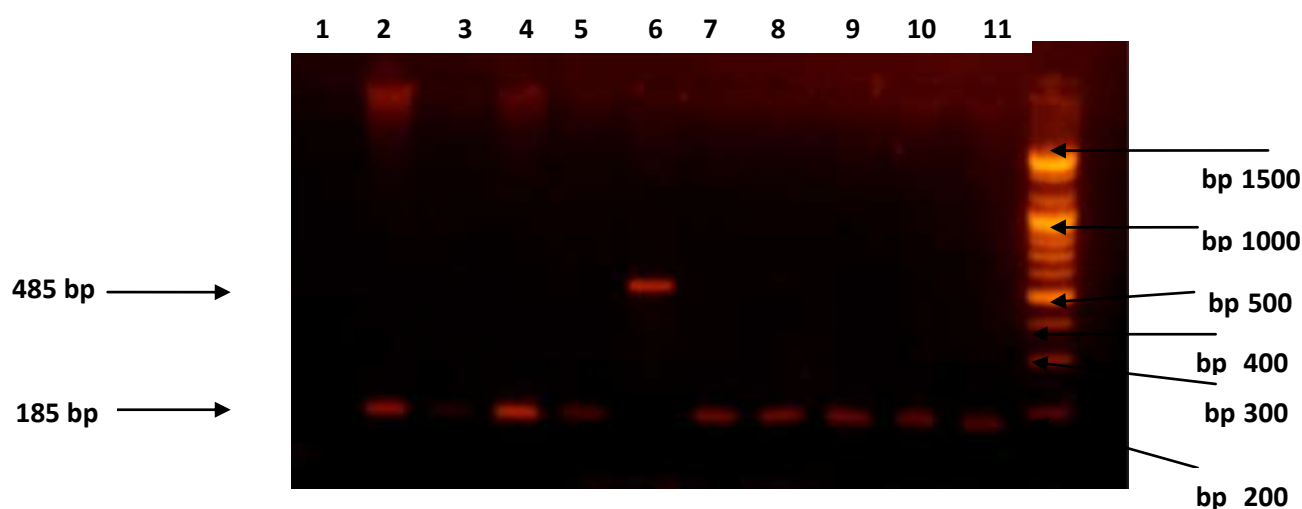
التوصيف الجزيئي للتعدد المظهري لجين PGR.

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لنتائج الـ PCR ثلاثة أنواع من الطرز الوراثية للمجموعتين ، طراز وراثي متمثل (T1T1) Homozygous (Wild Type) يتمثل بالحزمة ذات الحجم الجزيئي 185 bp ، طراز وراثي متمثل (T1T2) Homozygous (representing) يتمثل بالحزمة 485 bp وطراز وراثي غير متمثل (T1T2) Heterozygous يتمثل بالحزمتين (485,185) bp (الشكلين 2 و 3).



شكل (2) نتائج الترحيل الكهربائي الـ PCR لجين مستقبل البروجستيرون (PGR) لتوصيف التعدد المظهري على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% عند فرق جهد 70 فولت/سم وتيار 40 ملي أمبير ولمدة ساعتين.

- المجال 1 DNA Ladder (bp 1500- bp 100) .
- المجال (2,3,6,10,11,12,13) الشكل الاليلي (T1T1)(Homozygous-Wild Typ) (bp 185)
- المجال (4,5) الشكل الاليلي (T1T2 (Heterozygous) (bp 485, bp 185)



شكل (3) نتائج الترحيل الكهربائي الـ PCR لجين مستقبل البروجستيرون (PGR) لتوصيف التعدد المظهري مع انخفاض الشكل الاليلي (T2T2) في المجموعتين على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% عند فرق جهد 70 فولت/سم وتيار 40 ملي أمبير ولمدة ساعتين.

- المجال 11 DNA Ladder (bp 1500-100) .
- المجال (1,2,3,4,6,7,8,9,10) الشكل الاليلي (T1T1)(Homozygous(Wild Type) (bp 185)
- المجال (5) الشكل الاليلي (T2T2 (representing) (bp 485)

يوضح الجدول (4) وجود فروق معنوية عالية ($P \leq 0.001$) في الأعداد والنسب المئوية لتكرار الاليلات (T1T1, T1T2, T2T2) والنسبة لمئوية لكل من T1 و T2 لجين PGR عند المقارنة بين مجموعة النساء المصابات بالـ PCOS ومجموعة السيطرة. فضلاً عن ظهور ارتفاع في تكرار الاليل T1T1 في المجموعتين فقد بلغت (57.69 %) و (92 %) على التوالي ($P \leq 0.001$). كما ارتفعت النسبة المئوية وبفارق معنوي كبير ($P \leq 0.001$) لتكرار الاليل المتباين T1T2 في النساء المصابات بالـ PCOS (38.46%) مقارنة مع السيطرة (6%) ، بينما كانت النسبة المئوية لتكرار الاليل T2T2 منخفضة في كل من مجموعة السيطرة ومجموعة نساء الـ PCOS (2 %) و (3.85 %) ($P \leq 0.001$) وظهر فرق معنوي عالي ($P \leq 0.001$) كذلك عند مقارنة الاليلات الثلاثة في كل مجموعة.

جدول (4) النسب المئوية للتعدد المظهري لتوصيف جين (PGR) في النساء المصابات بالـ PCOS والسيطرة .

الطرز المظهرية لجين PGR	التعدد المظهري لجين PGR في نساء الـ PCOS % (N)	التعدد المظهري لجين PGR في نساء السيطرة % (N)
T1T1	57.69 % (75) a A	92% (92) b A
T1T2	38.46% (50) a B	6 % (6) b B
T2T2	3.85% (5) a C	2% (2) b B
$P \leq$	0.001	0.001
T1 (Total)	76.92 % (100) a A	95 % (95) b A
T2 (Total)	23.08 % (30) a B	5 % (5) b B
$P \leq$	0.001	0.001

% (N): (العدد) و النسبة المئوية
المتوسطات التي تحمل حروف كبيرة مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنوياً.
المتوسطات التي تحمل حروف صغيرة مختلفة ضمن السطر الواحد تختلف معنوياً.

أن النساء المصابات بالـ PCOS تكون أكثر عرضة للإصابة بالأمراض السرطانية النسائية ، ويساهم في ذلك النقصان الحاصل في هرمونات الأستروجين والبروجسترون مع زيادة الهرمونات الذكرية (8) ، إذ يرتبط جين PGR مع الفعالية التكاثرية للمرأة (18),(19),(20) كما تعتمد الفعالية والتأثيرات الفسيولوجية للبروجسترون تماماً على وجود التعدد المظهري للجين PGR وكذلك الغشاء السنيروبيدي للمستقبلات النووي (21).
أن نتائج الدراسة الحالية كانت مطابقة لما توصلت إليه دراسة (17) الذي بحث فيها التعدد المظهري لجين PGR في المجتمع التركي بحيث كانت فيه نسبة تكرار الاليل البري T1T1 مرتفعة مقارنة مع بقية الطرز الوراثية الأخرى لكل من نساء الـ PCOS والسيطرة في حين انخفضت النسبة المئوية للشكل الاليلي T2T2 في المجموعتين وبلغت (3.2%) للنساء المصابات بالـ PCOS و (3.6 %) والسيطرة .

ساهمت ارتفاع السنيروبيدات في زيادة مخاطر الإصابة بسرطان الرحم ، فقد أثبت في دراسة أن (Single nucleotide polymorphisms (PNPs متعددة ارتباط الطفرة rs 11224561 في المنطقة غير المترجمة في جين PGR في المجتمع الآسيوي (22) في حين دراسة أخرى وجدت ارتباط الطفرة (rs1042838) مع زيادة المخاطر بالإصابة بسرطان الثدي (23).
وقد وجد انخفاض تكرار الشكل الاليلي المتغاير T2T2 عند النساء المصابات بسرطان المبيض بعد سن 50 سنة مقارنة بالنساء السليمات ، إذ وصلت نسبته إلى (0.9 %) عند النساء المصابات بسرطان المبيض و (3.1%) عند نساء السيطرة (14).

Reference:

- 1-Moshdy, HM. (2010). The effect of Agnucaston and Metformin on the chromosomes of pregnant females and their embryos. *Nature and science*, 8(7).
- 2-Yarak, S.; Bagatin, E.; Hassun, K.; Parada, MOAB, and Filho, ST. (2005). Hyperandrogenism and skin: polycystic ovary syndrome and peripheral insulin resistance., *An Bras Dermatol.*, 80(4):395-410.
- 3-Lee, H.; Oh, J-Y.; Sung Y-A and Chung, H. (2013). Is Insulin Resistance an Intrinsic Defect in Asian Polycystic Ovary Syndrome. *Yonsei Med J* .,54(3):609-614.
- 4- Su, W-H.; Lee, F-K. and Wang, P-H.(2013). Recurrent pregnancy loss and thrombophilia in women with PCOS. *Journal of the Chinese Medical Association* ,76: 243-244.
- 5-Cussons,AJ.;Stucket,B.G.A and Watts,G.F.(2006). Cardiovascular disease in the polycystic ovary syndrome: New insights and perspectives. *Atherosclerosis* .185 (2): 227-239.
- 6-Balen,A.(2001).Polycystic ovary syndrome and cancer.*Human Reproduction Update*.7(6):522-525.
- 7-Repaci, A.; Gambineri ,A. and Pasquali, R. (2011). The role of low-grade inflammation in the polycystic ovary syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology* . , 335: 30-41.
- 8-Spritzer, PM.; Morsch, DM. and Wiltgen, D.(2005). Polycystic ovary syndrome associated neoplasms. *Arq Bras Endocrinol Metabol.*, 49 (5):805-10.
- 9-Rousseau,Merck.;MF.;Misrahi, M.; Loosfelt, H.; Milgrom, E. and Berger, R. (1987). Localization of the human progesterone receptor gene to chromosome 11q22-q23. *Hum Genet*, 77:280-282.
- 10-Punyadeera, C.; Verboost, P. and Groothuis, P.(2003). Oestrogen and progestin responses in human endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 84(4):393-410 .
- 11-Shimada, M.; Yamashita, Y.; Ito, J.; Okazaki, T.; Kawahata, K. and Nishibori, M. (2004). Expression of two progesterone receptor isoforms in cumulus cells and their roles during meiotic resumption of porcine oocytes. *Journal of Molecular Endocrinology* .33(1): 209-225.
- 12-Greendale GA, Reboussin BA, Sie A, Singh HR, Olson LK, Gatewood O, Bassett LW, Wasilauskas C, Bush T, Barrett-Connor E. (1999) . Effects of estrogen and estrogen-progestin on mammographic parenchymal density. Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Investigators. *Ann Intern Med*, 130:262-9 .
- 13-Lancaster, JM.; Berchuck, A.; Carney, ME.; Wiseman, R. and Taylor, JA. (1998). Progesterone receptor gene polymorphism and risk for breast and ovarian cancer. *Br J Cancer*, 78:277.
- 14-Wang- Gohrke, S.; Chang-Claude,J.; Becher, H.; Kieback,DG and Runnebaum, I B.(2000). Progesterone Receptor Gene Polymorphism Is Associated with Decreased Risk for Breast Cancer by Age 50. *CANCER RESEARCH* . , 60: 2348-2350.
- 15-Aruna, M.; Nagaraja, T.; Andal, S.; Tarakeswari, S.; Sirisha, PVS.; Reddy, AG.; Thangaraj,K.; Singh,L and Reddy, B.M. (2010). Role of Progesterone Receptor Polymorphisms in the Recurrent Spontaneous Abortions : Indian Case. *PLos ONE* ,5(1):e 8712.
- 16-Sambrook,J. ; Fritsch,E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual . 2nd edition, Cold spring harbor laboratory press,cold spring Harbor, New York.
- 17-Karadeniz, M.; Erdogan, M.; Berdeli, A.; Tamsel , S.; Saygili, F and Yilmaz, C.(2007). The progesterone receptor PROGINS polymorphism is not related to oxidative stress factors in women with polycystic ovary syndrome. *Cardiovascular Diabetology*, 6:29.
- 18-Pepe, GJ. And Albrecht ED. (1995). Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. *Endocrine Reviews.*, 16:608–648.
- 19-Bouchard, P. (1999). Progesterone and the progesterone receptor. *J Reprod Med.*, 44: 153–157.
- 20-Szekeres-Bartho, J.; Barakonyi, A.; Miko, E.; Polgar, B. and Palkovics, T. (2001). The role of gamma/delta T cells in the feto-maternal relationship. *Semin Immunol* ., 13: 229–233 .
- 21-Rowe, S. M., Coughlan, S. J., McKenna, N. J., Garrett, E., Kieback, D. G., Carney, D. N. and Headon, D. R. (1995). Ovarian carcinoma-associated TaqI restriction fragment length polymorphism in intron G of the progesterone receptor gene is due to an Alu sequence insertion. *Cancer Res.*,
- 22-O'Mara, TA .; Fahey, P.; Ferguson, K.; Marquart, L.; Lambrechts, D.; Despierre, E.; Vergote, I.; Amant, F.; Hall, P.; Liu, J.; Czene, K.; SASBAC.; Rebbeck, TR.; WISE Study Group.; AOCs Management Group.; SEARCH.; Ahmed, S.; Dunning, AM.; Gregory, CS.; Shah, M.; ANECS, Webb, PM and Spurdle, B. (2011). Progesterone receptor gene variants and risk of endometrial cancer. *Carcinogenesis*. 32(3): 331-335.
- 23-Johnatty, SE.; Spurdle, AB.; Beesley, J.; Chen, X, Hopper, JL.; Duffy, DL. And Chenevix-Trench, G. (2008). Progesterone receptor polymorphisms and risk of breast cancer: results from two Australian breast cancer studies. *Breast Cancer Res Treat* ., (2008) 109:91–99.