# ارتباط پلی مورفیسم G>A ۱۲۵۵ ژن *FSHR* با ناباروری زنان

هانیه حقیقی (MSc) [۱] -*دکتر حمیدرضا وزیری(PhD) [۱]- دکتر زیبا ظهیری (MD)[۲]

*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 پلی‌مورفیسم A >G۱۲۵۵ ژن *FSHR* با ناباروری زنان.**

**مواد و روش‌ها: این مطالعه مورد- شاهدی بر ۷۷ زن نابارور و ۷٤ زن سالم انجام شد. DNA ژنومی از نمونه‌های خون محیطی دو گروه برون آورده شد. بازشناخت 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، ٤۲/۱۰و ٤٥/۹٤ و در گروه بیمار به ترتیب ۱۵/۵۸، ٦۳/۱۵ و ۲۲/۳٦ 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 پلی‌مورفیسم A >G۱۲۵۵ 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: پلی‌مورفیسم/ گیرنده *FSH* / ناباروری**

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره بیست و پنجم، شماره ۹۹، صفحات: ۳۳-۲٦

## مقدمه

ناباروری بیماری چندعاملی است که با گستره پهناوری از چالش‌های اجتماعی، جسمی، روانی و اقتصادی همراه است(۱). برپایه شناسه سازمان بهداشت جهانی، به بارورنشدن یک زوج پس از یک‌سال آمیزش سازمند 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 تا۳۰ درصد ناهمسان است (۳). در ایران شیوع ناباروری ۲۱/۹-۱۲ درصد گزارش شد(٤). 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 پلی‌مورفیسم ژنی اشاره کرد(٦). 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 (۷و۸). جهش‌ها و پلی‌مورفیسم 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

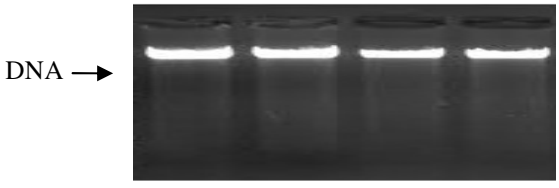
۲. گروه زنان و زایمان، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

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 ٦٩٥ اسید آمینه تشکیل شده‌است، ٣٤٩ اسیدآمینه دمین خارج سلولی، ٢٦٤ اسید آمینه بخش تراغشایی و ٦٥ اسید آمینه 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 (١٤) 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(١٦). همچنین، موش‌های ماده‌ی دارای جهش در *FSH* یا *FSHR* مشکلاتی مانند ناباروری، تخمدان‌های کوچک و ایست فولیکوژنز را نشان می‌دهند (۱۷). اکثر پلی‌مورفیسم‌های ژن *FSHR* در ناحیه اینترون و درصد کمی از آنها در ناحیه کدکننده قرار دارند(١٦). پلی‌مورفیسم بررسی شده در این مطالعه مربوط به نوکلئوتید ۱۲۵۵ واقع در اگزون شماره ۱۰ است که در آن نوکلئوتید گوانین (G) به نوکلئوتید آدنین (A) تبدیل می‌شود. در اثر این جهش اسیدآمینه ترئونین جایگزین اسیدآمینه آلانین می‌شود(۱۸). با توجه به اهمیت نقش ژن *FSHR* در شروع تخمک‌گذاری و باروری زنان، در این مطالعه ارتباط پلی‌مورفیسم G>A ۱۲۵۵ 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 ٧٤ زن بارور، بررسی شدند. نمونه‌گیری از مهر۹۲ 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 ۲۰°C- نگهداری شد.

**استخراج DNA:** استخراج DNA ژنومی با کیت آماده GPP-SOLUTION (ژن پژوهان، ایران) انجام شد و کیفیت DNA استخراج شده بر ژل آگارز ۱درصد 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.




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

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (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 ٤٦٨ 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 آلل G:

'5-TGGAATCTACCTGCTGCTCACTG-3'،

پرایمر پیرو آلل G:

'5-TCACTAGAGGAGGACACGAT-3'،

پرایمر پیشروآلل A:

'5-TGGAATCTACCTGCTGCTCACTA-3'

پرایمر پیرو آلل A:

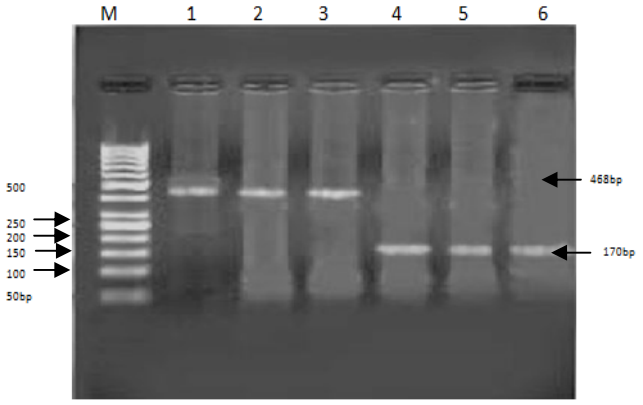
'5-ATCTTTCCAAGGTGATAGCTGT-3'.

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 نهایی۲۰ میکرولیتر شامل ۲۵ نانوگرم DNA الگو، ۵ µl، بافر 1X Taq Premix PCR، ۱۰µl، ۱ µl

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 ٤٦٨bp:** واسرشت‌سازی نخست در ۵ دقیقه در ۹٤°C و پس از آن ۳۵ چرخه دمایی به صورت واسرشت‌سازی ثانویه در ٤۵ ثانیه و دمای۹٤°C، واکنش اتصال آغازگر به رشته الگو در ٤۵ ثانیه و دمای ٦۰، واکنش بسط در ٤۵ ثانیه و دمای۷۲ °C، گسترش نهایی ۵ دقیقه در۷۲ °C برای کامل شدن تکثیر قطعات و مرحله پایانی که طی آن محصول PCR در دمای ٤ °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 ۹٤°C، و پس از آن ۳۵ چرخه دمایی به صورت واسرشت‌سازی ثانویه در ٤۵ ثانیه و دمای۹٤°C، واکنش اتصال آغازگر به رشته الگو در ٤۵ ثانیه و دمای ۵۹°C، واکنش بسط در ٤۵ ثانیه و دمای۷۲ °C، بسط نهایی ۵ دقیقه در۷۲ °C به‌منظور کامل شدن تکثیر قطعات و مرحله پایانی که طی آن محصول PCR در دمای ٤ °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 ٤٦٨ جفت نوکلئوتیدی در شکل ۲ نشان داده شده‌است.




شکل ۲. ژل آگارز ۲٪ جهت بررسی محصولات PCR و اطمینان از تکثیر قطعه‌ی موردنظر در ژن FSHR. M =DNA مارکر ۵۰ جفت بازی است. ستون‌های ٦- ۱ محصولات حاصل از تکثیز PCR را نشان می‌دهد. ستون ۱و۲: ژنوتیپ GG، ستون ۳ و٤: ژنوتیپ GA و ستون ۵ و ٦: ژنوتیپ AA را نشان می‌دهد. قطعات۱۷۰جفت باز و ٤٦٨ جفت باز با فلش نشان داده شده‌است.

**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.

## نتایج

پس از واکنش PCR بر DNA استخراج شده نمونه‌های ۷۷ نفر زن نابارور و ۷٤ نفر زن بارور، فراوانی ژنوتیپی و آللی بدین فرانمود بدست آمد و P-Value و odd ratio با (CI) ۹۵ درصد برای پلی مورفیسم A >۱۲۵۵G در هر یک از موارد برای هر دو گروه زنان نابارور و زنان سالم ارزیابی شد که نتایج آن با فرانمود زیر به دست آمد.

جدول ۱. درصد فراوانی ژنوتیپی و آللی پلی مورفیسم A >۱۲۵۵G ژن FSHR در زنان نابارور و سالم

| | تعداد | ژنوتیپ | | | آلل | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Ala/Ala | Ala/Thr | Thr/Thr | Ala | Thr |
| زنان نابارور | ۷۷ | ۱۷(۲۲/۳۶) | ۴۸ (۶۳/ ۱۵) | ۱۲(۱۵/۵۸) | ۸۲(۵۳/۲۴) | ۷۲(۴۶/۷۵) |
| زنان سالم | ۷۴ | ۳۴(۴۵/۹۴) | ۳۲(۴۲/۱۰) | ۸ (۱۰/۸۱) | ۱۰۰(۶۷/۵۶) | ۴۸ (۳۲/۴۳) |
| نتیجه آزمون$\chi2$ | | $\chi2$=۹/۳۱ P=/۰۰۸ | | | $\chi2$=۵/ ۷ P =۰/۰۱ | |

از ۷۷ زن نابارور، ۱۷ نفر (۲۲/۳٦٪) ژنوتیپ Ala/Ala، ٤۸ نفر (٦۳/۱۵٪) ژنوتیپ Ala/Thr و ۱۲ نفر (۱۵/۵۸٪) ژنوتیپ Thr/Thr و در ۷٤ نفر زن سالم، ۳٤ نفر (٤۵/۹٤٪) ژنوتیپ Ala/Ala، ۳۲ نفر (٤۲/۱۰٪) 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 به‌دست آمد. همچنین، فراوانی آللی زنان نابارور و سالم نیز بدین‌صورت بود: در ۷۷ زن نابارور، ۸۲ نفر آلل (۵۳/۲٤٪) Ala و ۷۲ نفر (٤٦/۷۵٪) آلل Thr و در ۷٤ زن سالم، ۱۰۰ نفر(٦۷/۵٦٪) آلل Ala و ٤۸ نفر (۳۲/٤۳٪) آلل Thr وجود داشت. طی آنالیز آماری مقدار P =۰/۰۱ و ۷ /۵.=$\chi^2$ به دست آمد (جدول ۱). با توجه به P-value در هریک از موارد فراوانی ژنوتیپی (P=۰/۰۰۸) و فراوانی آللی (P=۰/۰۱) می‌توان نتیجه گرفت که تفاوت معنی‌داری بین دو جمعیت زنان نابارور و زنان سالم وجود داشت. همچنین، نتایج نشان می‌دهد بین دو گروه مورد مطالعه اختلاف آللی وجود داشت و وجود آلل Thr در ایجاد ناباروری نقش دارد. بر همین پایه آزمون OR با CI ۹۵٪ محاسبه شد (جدول ۲).

جدول ۲. نتیجه آزمون Odds-Ratio در دو گروه زنان سالم و زنان نابارور در پلی مورفیسم A >۱۲۵۵G

| | تعداد | ژنوتیپ | | | آلل | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Ala/Ala | Ala/Thr | Thr/Thr | Ala | Thr |
| زنان نابارور | ۷۷ | ۱۷(۲۲/۳۶) | ۴۸ (۶۳/ ۱۵) | ۱۲(۱۵/۵۸) | ۸۲(۵۳/۲۴) | ۷۲(۴۶/۷۵) |
| زنان سالم | ۷۴ | ۳۴(۴۵/۹۴) | ۳۲(۴۲/۱۰) | ۸ (۱۰/۸۱) | ۱۰۰(۶۷/۵۶) | ۴۸ (۳۲/۴۳) |
| نتیجه آزمون$\chi2$ | | $\chi2$=۹/۳۱ P=/۰۰۸ | | | $\chi2$=۵/ ۷ P =۰/۰۱ | |

محاسبه تعادل هاردی- واینبرگ در این جمعیت با نسبت$\chi^2$ بررسی شد. بر همین اساس $\chi^2$=۷/٤۳ به دست آمد. با توجه به جدول کای با درجه آزادی ۱ و احتمال بیولوژی ۰/۰۵، میزان $\chi^2$=۳/۸٤ است. از مقایسه این دو مقدار از ارزش کای ($\chi^2$=۷/٤۳ و $\chi^2$=۳/۸٤) 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 (جدول۳).

جدول ۳. آزمون نسبت هاردی- واینبرگ پلی مورفیسم A >G۱۲۵۵ 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 آللی | | تعداد مورد انتظار | | | O-E |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | بیمار (مشاهده شده) | کنترل (مورد انتظار) | P | q | EDt | E2Ht | ERt | |
| Ala/Ala | ۱۷ | ۳۴ | | | | | | ۴/۱۴ |
| Ala/Thr | ۴۸ | ۳۲ | ۰/۶ | ۰/۴ | ۲۷/۷۲ | ۳/۹۶ | ۱۲/۳۲ | ۳/۲۹ |
| Thr/Thr | ۱۲ | ۸ | | | | | | ۰/۰۰۰۸ |
| نتیجه آزمون$\chi 2$ | df =۱ | | | $\chi 2$=۷/۴۳ | | | | |

## بحث و نتیجه‌گیری

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 (۱۹و۲۰). توالی‌یابی ژنوم انسان و بررسی جهش‌ها در شرایط پاتوفیزیولوژی مختلف نشان می‌دهد که تغییر ژنتیکی در غالب پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی به صورت پیاپی در سطح هورمون‌ها و گیرنده‌های آنها در محور HPG رخ می‌دهد (۲۱و۲۲). 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 پلی‌مورف 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 پلی‌مورفیسم اگزون شماره ۱۰ مربوط به جایگزینی اسیدآمینه آلانین با اسیدآمینه ترئونین در کدون ۳۰۷ و جایگزینی اسیدآمینه سرین با اسیدآمینه آسپارژین در کدون ۶۸۰ است. بررسی‌ها نشان می‌هد این دو پلی‌مورفیسم در زنان ناباروری که تحت درمان با مقادیر متفاوت FSH قرار می‌گیرند، عامل خطری در ایجاد نشانگان تخمدان پرتحریک و کاهش ذخیره تخمدانی است (۲۴و۲۵). Montanelli و همکاران در مطالعه‌ای بر ۲۶۶ زن (۳۷ زن با نشانگان تخمدان پرتحریک پس از IVF و ۹۹ زن بارور و ۱۳۰ زن بدون نشانگان تخمدان پرتحریک پس از IVF) نشان دادند که فراوانی آلل S۶۸۰ در زنان نابارور بدون نشانگان تخمدان پرتحریک 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 با نشانگان تخمدان پرتحریک نسبت به زنان بارور بیشتر است (۶۸۰ N ۴۳٪، ۶۸۰ S 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 پرتحریک را در زنانی که تحت درمان ناباروری با مقادیر مختلف FSH هستند، افزایش دهد. همچنین، وجود آلل A۶۸۰ شدت نشانگان تخمدان پر تحریک 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 پلی‌مورفیسم Ser۶۸۰Asn با خطر ابتلای به اندومتریوز، نشان داده شد که آلل A۶۸۰ خطر ابتلای به اندومتریوز را کاهش می‌دهد (۲۷). سایر مطالعات بر نواحی پلی‌مورف ژن *FSHR* نشان می‌دهد که پلی‌مورفیسم G/A ۲۹- در ناحیه UTR-۵' با تغییر در اتصال عوامل رونویسی بر راه‌انداز به‌عنوان عامل خطری در

رابطه با پرفشاری زنان است. به‌راستی وجود آلل A به عنوان عامل خطری در زنان با سابقه پرفشاری شناخته شده‌است (۲۸). در مطالعه‌ای دیگر بر این پلی‌مورفیسم، ژنوتیپ AA با فراوانی بالایی در زنانی با آمنوره اولیه و ثانویه دیده شده‌است (۲۹). این پژوهش با هدف بررسی پلی‌مورفیسم A >G۱۲۵۵ ژن *FSHR* و تاثیر آن در ناباروری زنان انجام شد. این پلی‌مورفیسم 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 اسیدآمینه آلانین به اسیدآمینه ترئونین در کدون ٤١٩ می‌شود (A٤١٩T). 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 شده‌است و نقش مهمی در کارکرد گیرنده و شناسایی لیگاند ایفا می‌کند (۱۸و۳۰). نتایج این پژوهش تفاوت معنی‌داری در توزیع فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی جایگاه G>A ۱۲۵۵ نشان دادند (به‌ترتیب P=۰/۰۰۸ و P=۰/۰۱). به طوری‌که 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= ۰/۰۰۳, ۶/۲۵-۱/٤۳ OR=۳,CI= و ۸/۷, P=۰/۰٤ -۱/۰۳۷ =CI, ۳=OR). همچنین، با توجه به مقدار فراوانی آلل Thr در افراد بیمار نسبت به افراد سالم، این آلل به عنوان عامل خطر دررابطه با ناباروری زنان تعیین می‌شود (P=۰/۰۱۱, ۲/۹-۱/۱٤ CI, =۱/۸۲ OR). در نتیجه می‌توان گفت که ناحیه پلی‌مورف 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، اثر فنوتیپی متفاوت مانند آمنوره، الیگومنوره یا انجام نشدن تخمک‌گذاری در زنان ایجاد می‌کند. تاکنون مطالعات کمی در ارتباط با نقش پلی‌مورفیسم 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 پلی‌مورفیسم با نارسایی زودرس تخمدان در زنان فنلاندی دیده شده‌است (۱۸).

به‌طور کلی در این تحقیق ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم 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 پلی‌مورفیسم‌های ژنی همواره توسط سایر عوامل ژنتیکی و محیطی کاهش می‌یابد و میانکش سایر ژن‌ها در مسیر بلوغ و تولید مثل ممکن است اثر پلی مورفیسم‌های ژن *FSHR* را تغییر دهد. همچنین، ارزیابی این پلی‌مورفیسم ممکن است در سایر جوامع به علت تغییر اندازه جمعیت مورد مطالعه، روش مورد استفاده در بررسی پلی‌مورفیسم 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 برخود 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 منافعی ندارند.

## منابع

1. Greil AL, Slauson-Blevins K, McQuillan J. The experience of infertility: a review of recent literature. Sociol 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. Shastry 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)[1]-*Vaziri H R (PhD)[1]- Zahiri Z (MD)[2]

***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 74controls were enrolled. Genomic DNA was extracted from peripheral blood. Genotypes were determined by Allele-Spesific 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