

Association of Exon 1 Variants of NOEY2 Gene with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) and Diabetes

Parichehr Karajibani¹ , Abolhasan Rezaei* 

¹ Dept of Genetics, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:

Received: 10 April 2021
Revised: 11 December 2021
Accepted: 05 April 2022
Published Online: 17 October 2022

* Correspondence to:

Abolhasan Rezaei
Dept of Genetics, Faculty of Basic
Science, Islamic Azad University,
Tonekabon Branch, Tonekabon,
Iran.
Email:
a.rezaei7300@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the cause of 75% of infertility due to lack of ovulation. This study aimed to investigate the possible association between exon 1 polymorphisms of the NOEY2 gene in women with PCOS and diabetes.

Material & Methods: This study was conducted on 240 blood samples (1 cc each) from women in four groups: polycystic, diabetes, polycystic-diabetes, and control. Genomic DNA extraction was performed using the extraction kit, according to the protocol. A primer pair was designed and synthesized for the exon 1 sequence of the NOEY2 gene. After gene amplification by polymerase chain reaction (PCR) and evaluation of band quality, Sanger sequencing was performed on PCR products. Sequencing results were analyzed using Chromas, GeneRunner, and Alignment software, and statistical calculations were performed by SNPalyze, SPSS, and Web-Assotest program. (Ethic code: IR.IAU.TON.REC.137031)

Findings: Sequence analysis confirmed two polymorphisms: 5'UTR c.156G> A polymorphism was observed in exon 1 of NOEY2 and second polymorphism of 5'UTR c.207+76 G>A, 76 nucleotides farther from exon 1 and in the intron region of NOEY2 gene. Statistical analysis showed a statistically significant difference between 5'UTR c.156G> A and susceptibility to PCOS and diabetes.

Discussion & Conclusion: No report on this region was available in genetic databases and this polymorphism was reported for the first time in the present study. Bioinformatics studies showed that this polymorphism can affect the affinity to bind in certain transcription factors by allelic changes due to its location in the CTCF overlapping promoter region.

Keywords: Diabetes, Polymorphism, NOEY2 gene, Polycystic ovary syndrome

➤ How to cite this paper

Karajibani P, Rezaei A. Association of Exon 1 Variants of NOEY2 Gene with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) and Diabetes. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;30(4): 106-116.



بررسی واریانت‌های اگزون ۱ ژن NOEY2 با سندروم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) و دیابت

پریچهر کرچی بانی^۱ ID، ابوالحسن رضایی^{۱*} ID

^۱ گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، تنکابن، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۱

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۱۶

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۰۷/۲۵

نویسنده مسئول:

ابوالحسن رضایی

گروه ژنتیک، دانشکده علوم

زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی،

واحد تنکابن، تنکابن، ایران.

Email:

a.rezaei7300@gmail.com

مقدمه: سندروم تخمدان پلی کیستیک (Polycystic ovary syndrome: PCOS) علت ۷۵ درصد ناباروری‌های ناشی از نداشتن تخمک‌گذاری است. مطالعه حاضر با هدف بررسی ارتباط احتمالی میان پلی مورفیسم‌های اگزون ۱ ژن NOEY2 در زنان مبتلا به PCOS و دیابت انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در این مقاله، تعداد ۲۴۰ نمونه خون زنان (هر کدام به میزان ۱cc) شامل چهار گروه پلی کیستیک، دیابت، پلی کیستیک-دیابت و کنترل مطالعه شدند. استخراج DNA ژنومیک افراد توسط کیت استخراج و بر اساس دستورالعمل صورت گرفت. یک جفت پرایمر برای توالی اگزون ۱ ژن NOEY2 طراحی و سنتز گردید. پس از انجام مراحل تکثیر ژن توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و بررسی کیفیت باندها، توالی‌یابی سانگر روی محصولات PCR صورت گرفت. نتایج توالی‌یابی توسط نرم‌افزارهای Chromas، GeneRunner، Alignment و محاسبات آماری توسط نرم‌افزارهای SPSS، SNPalyze، Web-Assotest و بررسی و محاسبه شدند.

یافته‌ها: تحلیل توالی‌ها وجود دو پلی مورفیسم را تأیید کرد: پلی مورفیسم $5'UTR c.156G>A$ در ناحیه اگزون ۱ ژن NOEY2 و پلی مورفیسم دوم $5'UTR c.156G>A$ ، ۷۶ نوکلئوتید دورتر از اگزون ۱ و در ناحیه اینترون ۱ ژن NOEY2. پس از بررسی‌های آماری، اختلاف معنی‌داری از نظر آماری میان $5'UTR c.156G>A$ و استعداد ابتلا به PCOS و دیابت مشاهده گردید.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نبود گزارش این ناحیه در پایگاه‌های داده ژنتیکی، این پلی مورفیسم اولین بار در مطالعه حاضر گزارش شده است و مطالعات بیوانفورماتیکی نشان داد که این پلی مورفیسم به سبب قرارگیری در ناحیه پروموتوری همپوشان با CTCF می‌تواند تمایل اتصال عامل‌های رونویسی خاصی را با تغییر آللی تحت تأثیر قرار دهد.

واژه‌های کلیدی: پلی مورفیسم، دیابت، سندروم تخمدان پلی کیستیک، ژن NOEY2

استناد: کرچی بانی، پریچهر؛ رضایی، ابوالحسن. بررسی واریانت‌های اگزون ۱ ژن NOEY2 با سندروم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) و دیابت. مجله

علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، آبان ۱۴۰۱؛ ۳۰(۴): ۱۱۶-۱۰۶.

مقدمه

سندروم تخمدان پلی کیستیک از شایع ترین اختلالات غدد درون ریز (اندوکرینوپاتی) در زنان است. PCOS با اختلال عملکرد و تخمک گذاری در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تخمدان مشخص شود (۱). این سندروم علت ۷۵ درصد ناباروری های ناشی از نداشتن تخمک گذاری است (۲). علائم این سندروم شامل هیرسوتیسم، الیگومنوره یا آمنوره، آکنه، نداشتن تخمک گذاری (۳)، مقاومت به انسولین و همچنین نقض در ترشح آن (۴) و پوست آکانتوز است. عملکرد توسعه فولیкул تخمدان از طریق افزایش هورمون های LH و انسولین مختل می شود، به این صورت که افزایش انسولین سبب هیپرانسولینمی، کاهش گلوبولین متصل به هورمون جنسی و افزایش تستوسترون می گردد و این روند سبب اختلال در تخمک گذاری می شود. مقاومت به انسولین که در مرحله پیشرفت هیپرانسولینمی رخ می دهد، یک اختلال کاردیومتابولیکی به شمار می آید که همه بافت ها را تحریک می کند و در روند استروئیدوژنیز اختلالاتی را ایجاد می نماید؛ بنابراین، افراد مبتلا به PCOS می توانند در معرض وقوع دیابت نوع ۲، دیس لیپدمی، آترواسکلروزیس و بیماری های قلبی عروقی قرار گیرند؛ همچنین خطر وقوع بیماری های آندومتریال (هیپرپلازی و سرطان) و آپنه نیز در زنان مبتلا بالا است (۵). امینی و همکاران در سال ۲۰۱۲ دریافتند که علائم PCOS باعث کاهش چشمگیر روند کیفیت زندگی زنان مبتلا می شود و از آنجا که این سندروم درمان خاصی هم ندارد، مدیریت سبک زندگی و بهبود کیفیت آن باید در صدر درمان PCOS قرار گیرد (۶). ژن NOEY2 یک ژن سرکوبگر تومور است (۷). ژن NOEY2 به صورت مادری نقش گذاری می شود و یک پروموتور، چهار اگزون و یک اینترون دارد و مکان آن در غشای سلولی لیپید محکم شده به سوی غشای سیتوپلاسمیک است. طول این ژن ۶۸۷ جفت باز و طول اگزون ۱ این ژن ۲۰۷ جفت باز است. ژن NOEY2 یک GTPase متعلق به خانواده

Super rasam است و همولوژی ۵۰ تا ۶۰ درصد را با پروتئین های Ras و Rap نشان می دهد. این ژن همچنین با نام های ARHI و DIRAS3 نیز شناخته می شود. ARHI یک پروتئین ۲۶ کیلودالتونی را رمز گذاری می کند که ۵۵ تا ۶۲ درصد با Ras همولوژی دارد. برخلاف ARHI، Ras به جای تحریک رشد سلول، آن را مهار می کند. این عملکرد بازدارنده رشد به ۳۴ آمینو اسید N ترمینال نسبت داده شده است که مختص ARHI است. ژن NOEY2 روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۱، ناحیه ۳، باند ۱ و ساب باند ۳ قرار دارد (Ip31.3). در بافت های سرطانی که ARHI یا NOEY2 بیان نشده باشد، احتمال متاستاز برای آن توده وجود دارد. پروموتور ژن Cycline D1 ژن NOEY2 یک مهار کننده قوی است و همچنین پروتئینی ضروری در پیشرفت سلول و حفظ سلول های سالم حیاتی از فاز S تا G1 است. هنگامی که این پروموتور از تنظیم و کنترل خود خارج شود و عملکردش را از دست بدهد، احتمال وقوع سرطان پستان و تخمدان وجود دارد. این مسیر سیگنالینگ شامل P21، فعال شدن JNK و کاهش یا از بین رفتن سیگنالینگ Ras/MAP است که اختلال در هر کدام می تواند به سرطان منجر گردد. علاوه بر نقش گذاری ناحیه P31.31، حذف، موتاسیون و متیلاسیون بی رویه در سه ناحیه CPG از پروموتور ژن NOEY2 یا ARHI و از دست رفتن هتروزیگوت از مواردی هستند که این ژن را در حساسیت به جهش و تغییرات اپی ژنتیک قرار داده است، به طوری که ۴۰ درصد از موارد حذف هتروزیگوت در سرطان تخمدان گزارش شده است (۸). یو و همکاران ARHI را به عنوان ژن سرکوب کننده تومور معرفی کرده اند که در بیشتر از ۶۰ درصد موارد سرطان تخمدان گزارش شده است. این موارد شامل از دست رفتن هتروزیگوت، هیپرمتیلاسیون، تنظیم رونویسی و کاهش نیمه عمر mRNA است (۹)؛ همچنین miRNAها و lncRNAها از عناصر تنظیم کننده ژن هستند که بیان

پژوهش به منظور تعیین ژنوتیپ، ۲۴۰ نمونه به روش تعیین توالی سانگر (Sanger Sequencing) توالی یابی شدند. برای این منظور، ابتدا قطعه ۴۶۸ جفت بازی از ژن NOEY2 تکثیر گردید. برای حصول اطمینان از تکثیر، محصولات PCR به ژل آگارز ۲/۵ درصد منتقل و الکتروفورز شدند و پس از عکس برداری از ژل، قطعات ۴۶۸ جفت بازی در قالب باندهایی واضح مشاهده گردیدند (شکل شماره ۱). در مرحله بعد، از این محصولات برای انجام تعیین ژنوتیپ واریانت‌های مشخص در ناحیه مدنظر و همچنین یافتن جهش‌های جدید احتمالی از روش تعیین توالی سانگر استفاده شد. در نهایت، محصولات PCR اگزون ۱ ژن NOEY2 با نرم‌افزارهای Chromas، GeneRunner و Alignment تحلیل و بررسی گردیدند. سطح معنی‌داری آماری $P < 0.05$ توسط نرم‌افزار SPSS و با استفاده از آزمون‌های t-test و آنالیز واریانس (ANOVA) بررسی شدند. DNA ژنومی ۲۴۰ نمونه بررسی شده توسط کیت استخراج PZP Molecular Company صورت گرفت. صحت کیفیت DNAهای استخراج شده به وسیله ژل آگارز ۱ درصد (شکل شماره ۲) و بررسی غلظت

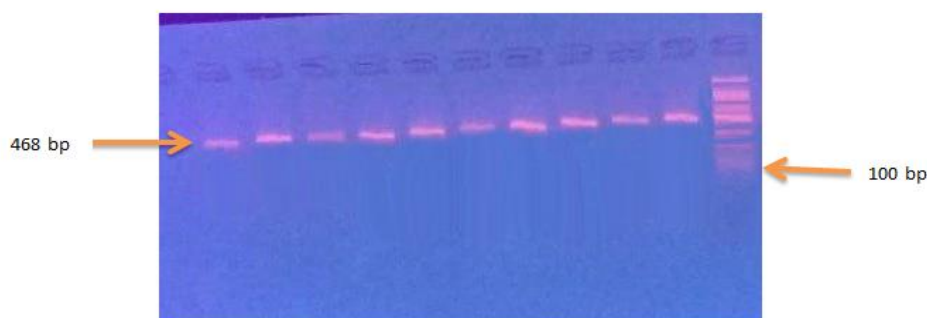
ژن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۱۰). هنگامی که ARHI در سطوح فیزیولوژیکی از پروموتور قابل القایی با داکسی سایکلین (DOX) بیان شود، اتوفازی ایجاد می‌گردد و سلول‌ها در چرخه سلولی متوقف می‌شوند. رشد زنوگرافت پیوند سرطان تخمدان و پستان به طور برگشت پذیر توسط ARHI سرکوب می‌گردد و به نظر می‌رسد که بقای سلول‌های خاموش دست کم تا حدی به اتوفازی بستگی داشته باشد (۱۱). هدف این مطالعه بررسی پلی مورفیسم اگزون ۱ ژن NOEY2 و ارتباط آن با PCOS و بیماری دیابت است.

مواد و روش‌ها

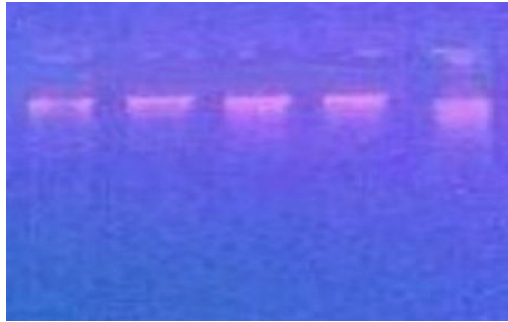
جامعه پژوهش این مطالعه ۲۴۰ نمونه خون شامل چهار گروه دیابت، دیابت- پلی کیستیک، پلی کیستیک و کنترل (تعداد هر کدام ۶۰ نمونه) است که پس از دریافت رضایت‌نامه و مصاحبه رودرو با بیماران بررسی شده است. این مطالعه با کد اخلاق IR.IAU.TON.REC.137031 در کمیته پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن به ثبت رسیده است. در ادامه، اطلاعات افراد سالم و بیمار در جدول شماره ۱ آمده است. در این

جدول شماره ۱. اطلاعات افراد بیمار و سالم حاضر در مطالعه

جنسیت	سن	تعداد نمونه‌ها	نمونه‌ها
خانم	۲۰-۴۷	۶۰	پلی کیستیک
خانم	۲۰-۴۷	۶۰	دیابت- پلی کیستیک
خانم	۲۰-۴۷	۶۰	دیابت
خانم	۲۰-۴۷	۶۰	کنترل



شکل شماره ۱. باندهای محصولات PCR اگزون ۱ ژن NOEY2



شکل شماره ۲. کیفیت باندهای DNA استخراج شده. باندهای شماره ۱ و ۲ نمونه شاهد و باندهای شماره ۳ تا ۵ نمونه بیمار هستند.

بررسی شده به مقدار ۴ میکرومولار، پرایمر فوروارد ۰/۵ میکرومولار، پرایمر ریورس ۰/۵ میکرومولار، مجموعه dNTPها ۱ میکرومولار، بافر ۱۰X به مقدار ۲/۵ میکرومولار، ۲MgCl₂ به مقدار ۲/۵ میکرومولار و آنزیم Taq polymerase به مقدار ۰/۵ میکرومولار و در نهایت، آب مقطر به مقدار ۱۳/۵ میکرومولار تا به حجم کلی ۲۵ میکرومولار برسد.

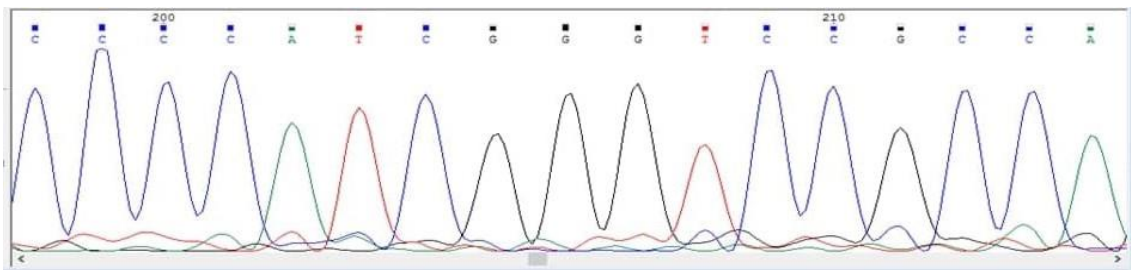
یافته ها

پس از آنالیز کروماتوگرام‌های حاصل از سکانس DNA به روش سانگر، همهٔ اگزون شماره ۱ قابل تشخیص بود. در ناحیهٔ تکثیر شده دو نوع پلی مورفسم مشاهده گردید: یک پلی مورفسم (5'UTR c.156G>A) که در ناحیهٔ اگزون ۱ و یک نوع دیگر پلی مورفسم (5' UTR c.207+76 G>A) که تنها در نمونهٔ کنترل و در اینترون ۱ دیده شد. شکل شماره ۳ کروماتوگرام فرد فاقد پلی مورفسم، شکل شماره ۴ فرد دارای پلی مورفسم و همچنین شکل شماره ۵ نمونهٔ کنترل دارای پلی مورفسم 5'UTR c.207+76 G>A را نشان می‌دهد.

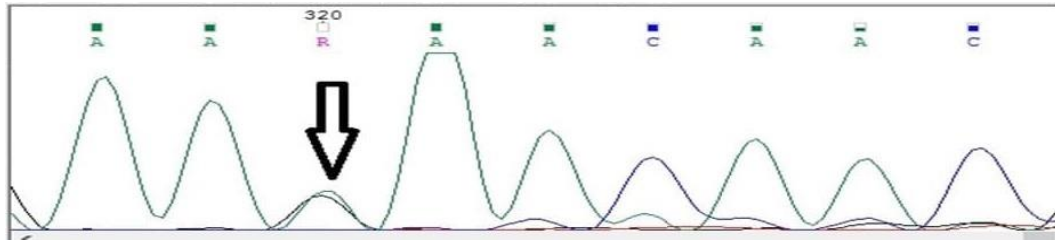
DNAها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر سنجیده شد. یک پرایمر Forward و یک پرایمر Reverse برای توالی اگزون ۱ ژن NOEY2 طراحی و سنتز گردید. پرایمرها به ترتیب شامل نوکلئوتیدهای زیر هستند:

۳' AAA ACC TGC TGC CAA CAA CTT
 ۵' CCA CA
 ۵' GTC AGA AGA CAT AAA CAG ACA
 ۳' CTT CAT TGA AG

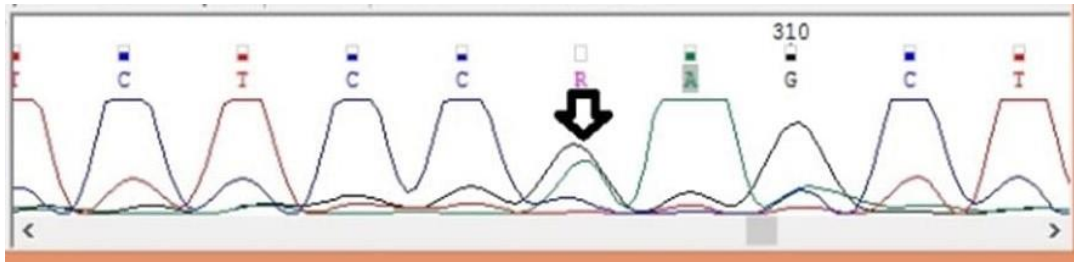
صحت پرایمرهای طراحی شده برای اگزون ۱ ژن NOEY2، توسط نرم افزار Oligo vol.7 و BLAST در NCBI مشخص گردید؛ سپس برنامهٔ PCR برای آن اجرا و محصولات PCR روی ژل الکتروفورز ۲/۵ درصد جهت مشاهدهٔ باندهای باکیفیت و شارپ بارگذاری شدند. پروفایل حرارتی برنامهٔ PCR عبارت بود از: ۹۴ °C به مدت ۵ دقیقه، ۹۴ °C به مدت ۴۵ ثانیه (مرحلهٔ واسرشته شدن)، ۶۶ °C به مدت ۳۰ ثانیه (مرحلهٔ اتصال) و ۷۲ °C به مدت ۴۵ ثانیه (مرحلهٔ گسترش)، سه مرحلهٔ آخر به تعداد ۳۰ سیکل و در نهایت، ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه. اجزای تشکیل دهندهٔ PCR برای انجام واکنش نیز عبارت بودند از: DNA



شکل شماره ۳. کروماتوگرام مربوط به فرد فاقد پلی مورفسم است.



شکل شماره ۴. کروماتوگرام فرد دیابتی که پلی مورفیسم 5'UTR c.156G>A دارد.



شکل شماره ۵. کروماتوگرام فرد کنترل که پلی مورفیسم 5'UTR c.207+76 G>A دارد.

پلی مورفیسم 5' UTR c.156G>A و ایجاد PCOS در سطح آلی مشاهده می‌شود؛ همچنین ۷۵ درصد بیماران مبتلا به PCOS ژنوتیپ هموزیگوت GG، ۱۸ درصد ژنوتیپ هتروزیگوت AG و ۷ درصد ژنوتیپ هموزیگوت AA داشتند. وضعیت ژنوتیپی در گروه شاهد به این صورت بود که ۹۰ درصد افراد ژنوتیپ هموزیگوت GG، ۸ درصد ژنوتیپ هتروزیگوت AG و ۲ درصد ژنوتیپ AA را دارا بودند. جالب توجه است که بررسی‌های آماری بیانگر آن‌اند که هم در مدل وراثتی غالب (P=0.03) و هم در مدل وراثتی هم-غالب (P=0.025) میان دو گروه بررسی شده اختلاف معنی داری وجود دارد که از این میان، مدل وراثتی به سبب

نتایج بررسی ژنوتیپی برای پلی مورفیسم 5'UTR c.156G>A میان دو گروه بیمار (سندروم تخمدان پلی کیستیک) و شاهد در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. فراوانی آلی پلی مورفیسم 5' UTR c.156G>A در نمونه‌های پلی کیستیک و شاهد به این صورت بود: فراوانی آلل وحشی G در افراد سالم ۹۴ درصد و در افراد بیمار ۸۴ درصد مشاهده گردید، درحالی که فراوانی آلل پلی مورف A در افراد سالم ۶ درصد و در افراد بیمار ۱۶ درصد است. نتایج نشان‌دهنده اختلاف معنی دار میان فراوانی‌های آلی پلی مورفیسم 5' UTR c.156G>A میان نمونه‌های PCOS و شاهد است (P=0.012)؛ بنابراین، ارتباط معناداری میان

جدول شماره ۲. بررسی ژنوتیپی پلی مورفیسم 5' UTR c.156G>A در نمونه‌های PCOS و شاهد

پلی مورفیسم	نمونه	فراوانی آلی		آل	مدل‌های وراثتی			مدل‌های وراثتی					
		A	G		مدل مغلوب	مدل مغلوب	مدل مغلوب	مدل مغلوب	مدل مغلوب	مدل مغلوب			
		OR	p-value	OR	p-value	OR	p-value	OR	p-value	p-value			
5'UTR c.156G>A	مورد	0.33-0.133	0.01	0.23-0.025	0.17	2.410-1.5	0.34	0.11	0.03	0.87	AA 4 7%	AG 11 18%	GG 45 75%
	شاهد	0.815	2	2.188	5.55	0.93	0.03	0.03	0.03	0.87	AA 1 2%	AG 5 8%	GG 54 90%

جدول شماره ۳. بررسی ژنوتیپی پلی مورفیسم 5'UTR c.156G>A در افراد مبتلا به PCOS و دیابتی

پلی مورفیسم	نمونه	فراوانی آلی	آل	فراوانی ژنوتیپی		مدل های وراثتی			
				ژنوتیپ	مدل غالب	مدل غالب	مدل هم-غالب	مدل مطلوب	
5'UTR c.156G>A	مورد شاهد	G	p-value 0.015	OR 95% CI 0.35 0.150-0.846	AA	p-value 0.022	OR 95% CI 0.3340.11-0.93	p-value 0.024	OR 95% CI 2.44 1.07-5.59
		AG			AG				
		A			GG				p-value 0.30
									OR 95% CI 0.32030.22-3.187

ارتباط بیشتر به عنوان مدل وراثتی دارای پیوستگی ژنتیکی در بروز PCOS در نظر گرفته می شود.

نتایج تحلیل های آماری روی بررسی احتمالی پیوستگی ژنتیکی میان ابتلا به PCOS و بروز دیابت در صورت وجود آلل یا ژنوتیپ خاص مربوط به پلی مورفیسم 5' UTR c.156G>A در جدول شماره ۳ آمده است. همان طور که از جدول شماره ۳ برمی آید، فراوانی های آلی در نمونه های مورد (در اینجا مبتلایان به PCOS) و نمونه های شاهد (در اینجا افراد دیابتی) برای آلل G به ترتیب عبارت بود از: ۸۳ درصد و ۹۳ درصد و برای آلل A عبارت بود از: ۱۷ درصد و ۷ درصد. بر اساس این، شواهد بیانگر ارتباط معنادار در سطح آلی میان دو گروه پژوهش است ($P=0.015$)، [OR=0.35، [CI95 %] 0.150-0.846]. در سطح ژنوتیپی فراوانی ها در نمونه های PCOS عبارت بودند از: ژنوتیپ GG درصد ۷۱، ژنوتیپ AG درصد ۲۳ و ژنوتیپ AA ۶ درصد. در گروه دیگر، همین ژنوتیپ ها به ترتیب فراوانی های ۸۸ درصد، ۱۰ درصد و ۲ درصد داشتند. با آنکه سطح ژنوتیپی در مرز معناداری بود؛ اما تحلیل های دقیق تر آماری توسط روش ANOVA نشان داد که میان دو گروه مبتلایان به PCOS و افراد دیابتی هم در مدل وراثتی غالب و هم در

مدل وراثتی هم-غالب، ارتباط معنی داری وجود دارد (به ترتیب $P=0.022$ و $P=0.024$). در نهایت، به سبب معنادارتر بودن مدل وراثتی غالب ($P=0.022$)، این مدل در نظر گرفته می شود.

مطابق جدول شماره ۴، فراوانی های آلی و ژنوتیپی پلی مورفیسم 5' UTR c.156G>A در دو گروه دیابتی ها و شاهد ها به این صورت است که در سطح آلی، فراوانی آلل وحشی G برای پلی مورفیسم UTR c.156G>A در نمونه های بیمار (دیابت) ۹۰ درصد و در نمونه های سالم ۹۴ درصد و نیز فراوانی آلل پلی مورف A در نمونه های دیابت ۱۰ درصد و در افراد سالم ۶ درصد بود. گفتنی است که در سطح ژنوتیپی نیز در گروه دیابتی ۸۳ درصد افراد ژنوتیپ GG، ۱۳ درصد ژنوتیپ AG و ۴ درصد ژنوتیپ AA دارند؛ همچنین در گروه شاهد ۹۱ درصد افراد ژنوتیپ GG، ۷ درصد ژنوتیپ AG و ۲ درصد ژنوتیپ AA را نشان دادند. تحلیل های آماری نشان دادند که ارتباط معناداری میان دو گروه دیابتی و گروه شاهد، چه در سطح آلی و چه در سطح ژنوتیپی وجود ندارد (به ترتیب $P=0.141$ و $P=0.38$)؛ در نتیجه، ارتباط معناداری میان پلی مورفیسم 5' UTR c.156G>A و ایجاد بیماری دیابت در میان نمونه های بررسی شده

مغلوب که توسط نرم‌افزارهای مختلف یادشده انجام گرفت، در جدول شماره ۴ آورده شدند.

مشاهده نمی‌گردد. خاطرنشان می‌شود که محاسبات آماری روی مدل‌های وراثتی غالب، هم-غالب و

جدول شماره ۴. بررسی ژنوتیپی پلی‌مورفیسم $5' \text{UTR c.156G>A}$ در دو گروه شاهد و دیابتی

پلی‌مورفیسم	نمونه	فراوانی آلی	آل	فراوانی ژنوتیپی		مدل‌های وراثتی											
				AG	AA	مدل غالب	مدل هم-غالب	مدل مغلوب	پ-value	OR 95% CI	پ-value	OR 95% CI					
$5' \text{UTR c.156G>A}$	مورد	G	108 90%	OR 95% CI	0.47170.1-1.306	AG	8 13%	4 7%	مدل غالب	p-value	0.38	مدل هم-غالب	p-value	0.18	مدل مغلوب	p-value	0.55
	شاهد	A	12 10%	6 6%	p-value	0.141	AA	2 4%	1 2%	p-value	0.16	p-value	1.81	OR 95% CI	0.72-4.55	OR 95% CI	0.4900.43-5.57

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه پژوهشی، پس از بررسی DNA ژنومی ۲۴۰ نمونه خون زنان مبتلا به سندروم پلی‌کیستیک تخمدان (PCOS)، دیابتی، پلی‌کیستیک-دیابت و سالم در ناحیه بالادست و پایین دست اگزون ۱ ژن NOEY2، به وجود دو پلی‌مورفیسم $5' \text{UTR c.156G>A}$ و $5' \text{UTR c.207+76 G>A}$ ، ۷۶ نوکلئوتید دورتر از اگزون ۱ و در ناحیه اینترون ۱ ژن NOEY2 پی برده شد. پلی‌مورفیسم اول به علت آنکه در پایگاه‌های داده NCBI (به آدرس: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) و ENSEMBL (به آدرس: <http://asia.ensembl.org/index.html>) شماره شناسایی (ID Number) نداشت، می‌تواند به‌عنوان یک پلی‌مورفیسم جدید شناخته شود. این پلی‌مورفیسم دقیقاً به فاصله یک نوکلئوتید میان دو پلی‌مورفیسم $973348476rs$ و $1257999126rs$ قرار دارد. این پلی‌مورفیسم‌ها همه در ناحیه پرموتری ژن NOEY2 یا DIRAS3 قرار گرفته‌اند که از سوی با ناحیه CTCF (ناحیه مهاری ژن) همپوشانی دارند. پس از تعیین ژنوتیپ همه نمونه‌ها، مشخص گردید که تنها $5' \text{UTR c.156G>A}$ از نظر دارا بودن پیوستگی ژنتیکی با PCOS میان

جمعیت پژوهش قابلیت گزارش دارد. در ادامه، بررسی‌های بیشتر نشان دادند که در جمعیت پژوهش، پلی‌مورفیسم $5' \text{UTR c.156G>A}$ با بروز PCOS تحت مدل هم-غالبی ($P=0.025$) مرتبط است؛ به این معنی که افراد دارای ژنوتیپ AG با احتمال بسیار بالاتری ممکن است که استعداد ابتلا به PCOS را داشته باشند (OR=2.41). بررسی‌های بیشتر میان افراد مبتلا به PCOS، ارتباط این پلی‌مورفیسم را تحت مدل وراثتی غالب با دیابت نیز مشخص کرد ($P=0.022$). از سویی، طی یک بررسی تکمیلی نشان داده شد که میان افراد سالم و افراد دیابتی در جمعیت بررسی شده حاضر، هیچ ارتباط معناداری وجود ندارد ($P=0.16$)، به‌طوری‌که این امر تأییدی است بر ارتباط پلی‌مورفیسم $5' \text{UTR c.156G>A}$ در ابتلا به PCOS مرتبط با دیابت. در سال‌های اخیر، مطالعات متعددی ارتباط میان بیماری دیابت و PCOS را به اثبات رسانده‌اند. گفتنی است که در سال ۲۰۱۱، وانگ و همکاران در تحقیقی، ارتباط میان دیابت ملیتوس و PCOS را در زمان ۱۹ تا ۳۲ سال بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که زنان مبتلا به PCOS در معرض خطر بیشتری برای این نوع از دیابت،

دیس لیپدیمی و فشارخون بالا هستند (۱۲). در سال ۲۰۱۶، رشیدی و همکاران ارتباط میان پروفایل گلوکز ناشتای سرم و مقاومت به انسولین در زنان مبتلا به سندروم تخمدان پلی کیستیک را بررسی کردند. نتیجه آن بود که در زنان چاق مبتلا به پلی کیستیک سطح تری گلیسرید و گلوکز و نیز در زنان غیرچاق مبتلا به پلی کیستیک سطح کلسترول تام بالاتر از زنان سالم است (۱۳).

خاطر نشان می شود که ارتباط میان PCOS و چاقی در سال های اخیر طی پژوهش های جالبی گزارش شده است. بر اساس مطالعه حری و همکاران در سال ۱۳۸۵، شاخص توده بدنی (BMI) و دور کمر زنان دیابتی مبتلا به PCOS بیشتر از گروه غیرمبتلا به PCOS است. افزایش BMI و دور کمر به عنوان شواهدی است که تأییدکننده مقاومت به انسولین مطرح شده است (۱۴)؛ همچنین در تحقیقی مشابه، شکرزاده و همکاران در سال ۲۰۲۰ دریافتند که چاقی یک فاکتور خطر اصلی برای ابتلا به دیابت نوع دو ملیتوس، سرطان و بیماری کلیوی دیابتی است (۱۵). اردلان و همکاران در سال ۱۳۹۹، روی پلی مورفیسم اگزون های ۲ و ۳ ژن (NOEY2) DIRAS3 در بیماران مبتلا به سرطان پستان مطالعه کردند. نتایج آنان وجود یک پلی مورفیسم در جایگاه c.332-3 T>C یک بیمار مبتلا به سرطان پستان را نشان داد، درحالی که هیچ گونه جهشی در اگزون ۲ گزارش نگردید؛ همچنین وجود یک پلی مورفیسم دیگر G>A c.331 UTRc.5 در ناحیه اینترون ۳ افراد سالم و بیماران سرطانی گزارش شد که با سرطان پستان در ارتباط است (۱۶). در سال ۲۰۱۸، ازیز گزارش کرد که زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک در معرض خطر افزایش تحمل نکردن گلوکز و دیابت نوع ۲، استاتوز کبدی و سندرم متابولیک و بدخیمی های تخمدان هستند (۱۷). همه مطالعات یادشده با مطالعه حاضر همسو بودند و تأییدکننده استعداد ژنتیکی ابتلای به PCOS و دیابت از طریق پلی مورفیسم های

گزارش شده در ژن DIRAS3 هستند. با توجه به اینکه برای اولین ارتباط پلی مورفیسم A>G c.156 UTR⁵ با PCOS و دیابت گزارش می گردد و با نظر به محل قرارگیری این پلی مورفیسم در ناحیه همپوشان پروموتور و CTCF، بررسی های *in Silico* برای یافتن احتمال تغییر تمایل اتصال فاکتورهای رونویسی توسط آلل های وحشی و پلی مورف صورت گرفت. پس از تحلیل های بیوانفورماتیکی توسط پایگاه های داده ENSEMBL و NCBI، اطلاعات توالی مدنظر برای پلی مورفیسم A>G c.156 UTR⁵ در نرم افزار تحت وب TFBIND (به آدرس: <http://tfbind.hgc.jp/>) بررسی شد (۱۸). پس از در نظر گرفتن ۱۰ نوکلئوتید به سوی ۵' و ۱۰ نوکلئوتید به سوی ۳' با مرکزیت پلی مورفیسم A>G c.156 UTR⁵، این ناحیه ۲۱ نوکلئوتیدی توسط تحلیل های بیوانفورماتیکی نشان داد که در صورت وجود آلل وحشی (آلل غالب) دو ناحیه اتصال برای فاکتور رونویسی MYB و یک ناحیه برای MYOD وجود دارد، درحالی که اگر آلل پلی مورف A در این توالی وجود داشته باشد، تمایل اتصال MYOD به این ناحیه ازدست می رود و جالب تر آنکه فاکتورهای رونویسی MEF2، NFY و STAT می توانند به این ناحیه متصل شوند. مطالعات ثابت کرده اند که MEF2 به عنوان یک فاکتور رونویسی سه ایزوفرم دارد و از طریق مسیر AMPK در بیماری PCOS دخیل است که سطح قابل توجه پایین تر MEF2A و فعال شدن آن در PCOS-Insulin می تواند با متفورمین جبران شود (۱۹). مطالعه ژانگ و همکارانش این احتمال را مطرح کرد که NF-Y می تواند یکی از واسطه های پایین دستی cAMP تنظیم کننده متابولیسم گلوکز باشد. نتایج مطالعه شان همچنین نشان داد که بیان NF-Y به طور مؤثر توسط cAMP، گلوکاگون و ناشتا بودن در داخل بدن القا می شود. علاوه بر این، آنان شواهدی را ارائه کردند که نشان می دهد NF-Y بیان ژن گلوکونوژنیک و تولید گلوکز کبدی را تنظیم می کند (۲۰). دیابت نوع ۱ و

بررسی‌های بیشتر قرار بگیرد. ناگفته نماند که مطالعات آتی می‌تواند با پوشش دادن حجم جامعه آماری بالاتر و بررسی ناحیه ژنومی بیشتر، از محدودیت‌های این مطالعه بکاهد و اطلاعات بیشتری را با توجه به مطالعه حاضر ارائه کنند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از کارکنان آزمایشگاه ژنتیک دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن اعلام نمایند که ما را در انجام و ارتقای کیفی این پژوهش یاری دادند.

تعارض منافع

بدین وسیله نویسندگان اعلام می‌نمایند که هیچ گونه تضاد منافی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

کد اخلاق: IR.IAU.TON.REC.137031

References

- Rocha AL, Oliveira FR, Azevedo RC, Silva VA, Peres TM, Candido AL, et al. Recent advances in the understanding and management of polycystic ovary syndrome. *F1000Res* 2019;8. doi.10.12688/f1000research.15318.1
- Yu Y, Xu F, Peng H, Fang X, Zhao S, Li Y, et al. NOEY2 (ARHI), an imprinted putative tumor suppressor gene in ovarian and breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ;96:214-9. doi. 10.1073/pnas.96.1.214
- Parseh S, Shakerian S, Alizadeh AA. Effect of Chronic Aerobic/Resistive Exercises with Supplementation of Cinnamon on Insulin Resistance in Women with Polycystic Ovary Syndrome in Ahvaz City in 2017. *J Arak Uni Med Sci* 2019;22:15-26.
- Bentley-Lewis R, Seely E, Dunaif A. Ovarian hypertension: polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2011;40:433-49. doi. 10.1016/j.ecl.2011.01.009.
- Zangeneh FZ, Naghizadeh MM, Bagheri M. Comparing life style of patients with polycystic ovary syndrome and normal women. *Tehran Uni Med J* 2018;76:58-66.
- Amini L, Ghorbani B, Montazeri A. Iranian version of Health-related Quality of Life for women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOSQ): translation, reliability and validity. *Payesh* 2012;11:227-33.
- Badgwell DB, Lu Z, Le K, Gao F, Yang M, Suh GK, et al. The tumor-suppressor gene ARHI (DIRAS3) suppresses ovarian cancer cell migration through inhibition of the Stat3 and FAK/Rho signaling pathways. *Oncogene* 2012;31:68-79. doi.10.1038/onc.2011.213
- Luo RZ, Fang X, Marquez R, Liu SY, Mills GB, Liao WS, et al. ARHI is a Ras-related small G-protein with a novel N-terminal extension that inhibits growth of ovarian and breast cancers. *Oncogene* 2003;22:2897-909. doi.10.1038/sj.onc.1206380
- Yu Y, Luo R, Lu Z, Feng WW, Badgwell D, Issa JP, et al. Biochemistry and biology of ARHI (DIRAS3), an imprinted tumor suppressor gene whose expression is lost in ovarian and breast cancers. *Methods Enzymol* 2006;407:455-68. doi.10.1016/S0076-6879(05)07037-0
- Shabgah AG, Salmaninejad A, Thangavelu L, Alexander M, Yumashev AV, Goleij P, et al. The role of non-coding genome in the behavior of infiltrated myeloid-derived suppressor cells in tumor microenvironment; a perspective and state-of-the-art in cancer targeted therapy. *Prog Biophys Mol Biol* 2021;161:17-26. doi.10.1016/j.pbiomolbio.2020.11.006
- Lu Z, Luo RZ, Lu Y, Zhang X, Yu Q, Khare S, et al. The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian

دیابت نوع ۲ با نقص سلول β در پانکراس مشخص می‌شود. علل اختلال عملکرد و مرگ سلول‌های β در هر دو نوع دیابت بسیار متفاوت است؛ اما سیگنالینگ JAK / STAT در روند پیشرفت هر دو شکل دخیل است (۲۱). با توجه به مطالعات و شواهد یادشده، این امکان وجود دارد که پلی‌مورفیسم $5' \text{UTR } c.156G>A$ با تغییر آللی، باعث ایجاد تغییر تمایل اتصال فاکتورهای رونویسی و بنابراین توجیه ارتباط ژنتیکی PCOS و دیابت در جمعیت پژوهش حاضر در میان زنان ایرانی شود. در مجموع، مطالعه حاضر با گزارش‌های قابل توجه و یافته‌های جدید خود در زمینه پیوستگی ژنتیکی از طریق پلی‌مورفیسم‌های ژن NOEY2 (DIRAS3) پیشنهاد می‌کند که پلی‌مورفیسم $5' \text{UTR } c.156G>A$ در جمعیت‌های دیگر با حجم جامعه بزرگ‌تر بررسی گردند؛ همچنین خاطرنشان می‌شود که با توجه به بررسی‌های بیوانفورماتیکی انجام شده، بیان فاکتورهای یادشده به همراه تعیین ژنوتیپ هم‌زمان پلی‌مورفیسم مذکور در بیماران دیابتی مبتلا به PCOS مورد

- cancer cells. *J Clin Invest* 2008;118:3917-29. doi.10.1172/JCI35512
12. Wang ET, Calderon-Margalit R, Cedars MI, Daviglus ML, Merkin SS, Schreiner PJ, et al. Polycystic ovary syndrome and risk for long-term diabetes and dyslipidemia. *Obstet Gynecol* 2011;117:6. doi.10.1097/AOG.0b013e31820209bb
 13. Rashidi H, Tafazoli M, Jalali MT. Relationship between serum lipids and insulin resistance among women with polycystic ovary syndrome. *Armaghane danesh* 2016;21:939-49.
 14. Horri N, Farmani M, Haghighi S, Sattari G, Pournaghshband Z, Amini M. The prevalence of polycystic ovary syndrome (pcos) in type 2 diabetic women in reproductive ages. *Iran J Diabet Metabol* 2006;5:257-63.
 15. Shokrzadeh M, Goleij P, Behravan E, Ghassemi-Barghi N, Salehabadi Y, Rezaei A. Association between diabetics and intestinal cancer with the risk of mutation in CD38 gene in Iranian population. *Arq Gastroenterol* 2020;57:137-43. doi. 10.1590/S0004-2803.202000000-25
 16. Ardalan Moghadam F, Rezaei A. Investigation of the presence of polymorphism in exons 2 and 3 of the DIRAS3 gene in women with breast cancer and diabetes. *Cell Mol Res* 2022; 35: 272-90.
 17. Azziz R. Polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol* 2018;132:321-36. doi.10.1097/aog.0000000000002698
 18. Tsunoda T, Takagi T. Estimating transcription factor bindability on DNA. *Bioinformatics* 1999 Jul 1;15:622-30. doi.org/10.1093/bioinformatics/15.7.622.
 19. Holmes BF, Sparling DP, Olson AL, Winder WW, Dohm GL. Regulation of muscle GLUT4 enhancer factor and myocyte enhancer factor 2 by AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;289:E1071-6. doi.org/10.1152/ajpendo.00606.2004
 20. Zhang Y, Guan Q, Liu Y, Zhang Y, Chen Y, Chen J, et al. Regulation of hepatic gluconeogenesis by nuclear factor Y transcription factor in mice. *J Biol Chem* 2018;293:7894-904. doi.10.1074/jbc.RA117.000508
 21. Gurzov EN, Stanley WJ, Pappas EG, Thomas HE, Gough DJ. The JAK/STAT pathway in obesity and diabetes. *FEBS J* 2016;283:3002-15. doi.10.1111/febs.13709.