

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

Parichehr Karajibani¹ , Abolhasan Rezaei^{1*} 

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

A B S T R A C T

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 SNPAlzye, 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.



© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

بررسی واریانتهای اگزون ۱ زن NOEY2 با سندروم تخدمان پلی کیستیک (PCOS) و دیابت

پریچهر کرجی بانی^۱، ابوالحسن رضایی^{*}

^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

مقدمه: سندروم تخدمان 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 زن 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 ۱۰۰ µl) شامل چهار گروه پلی کیستیک، دیابت، پلی کیستیک-دیابت و کنترل مطالعه شدند. استخراج DNA ژئومیک افراد توسط کیت استخراج و بر اساس دستورالعمل صورت گرفت. یک جفت پرایمر برای توالی اگزون ۱ زن NOEY2 طراحی و سنتز گردید. پس از انجام مراحل تکثیر زن توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و بررسی کیفیت باندها، توالی یابی سانگر روی محصولات PCR صورت گرفت. نتایج توالی یابی توسط نرم‌افزارهای Chromas، GeneRunner و Alignment نرم‌افزارهای Chromas، GeneRunner و Alignment نرم‌افزارهای SPSS و SNPAllyze Web-Assotest بررسی و محاسبه شدند.

یافته‌ها: تحلیل توالی‌ها وجود دو پلی مورفیسم را تأیید کرد: پلی مورفیسم ۱ زن NOEY2 و پلی مورفیسم دوم ۷۶ UTR c.156G>A و ۵'UTR c.156G>A تأثیرگذار از اگزون ۱ زن NOEY2 پس از بررسی‌های آماری، اختلاف معنی‌داری از نظر آماری میان ۱ زن NOEY2 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 به‌سبب قرارگیری در ناحیه پرموتری همپوشان با CTCF می‌تواند تمایل اتصال عامل‌های رونویسی خاصی را با تغییر آللی تحت تأثیر قرار دهد.

نویسنده مسئول:

ابوالحسن رضایی
گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، تنکابن، ایران.

Email:
a.rezaei7300@gmail.com

واژه‌های کلیدی:

استناد: کرجی بانی، پریچهر؛ رضایی، ابوالحسن. بررسی واریانتهای اگزون ۱ زن NOEY2 با سندروم تخدمان پلی کیستیک (PCOS) و دیابت. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، آبان ۱۴۰۱(۳۰):۱۱۶-۱۰۶.



است و همولوژی Super rasam 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 کیلو دالتونی را رمزگذاری 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 آمینواسید 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 (1p31.3). در بافت های سرطانی که ARHI یا NOEY2 بیان نشده باشد، احتمال متاستاز برای آن توده وجود دارد. پرموتر ژن D1 Cycline 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 پرموتر از تنظیم و کنترل خود خارج شود و عملکردش را از دست بدهد، احتمال وقوع سرطان پستان و تخدمان 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 پرموتر ژن NOEY2 یا ARHI و از دست رفتن هتروزیگوت از مواردی هستند که این ژن را در حساسیت به جهش و تغییرات اپیژنیک قرار داده است، به طوری که ۴۰ درصد از موارد حذف هتروزیگوت در سرطان تخدمان 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 تخدمان گزارش شده است. این موارد شامل از دست رفتن هتروزیگوت، هیپر متیلاسیون، تنظیم رونویسی و کاهش نیمه عمر mRNA است (۹)؛ همچنین miRNAها و IncRNAها از عناصر تنظیم کننده ژن هستند که بیان

سندروم تخدمان پلی کیستیک از شایع ترین اختلالات خدد درون ریز (اندو کریونپاتی) در زنان است. PCOS با اختلال عملکرد و تخمک گذاری در محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - تخدمان مشخص شود (۱). این سندروم علت ۷۵ درصد نایاروری 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 نقص در ترشح آن (۴) و پوست آکانتوز است. عملکرد توسعه فولیکول تخدمان از طریق افزایش هورمون های LH و انسولین مختل می شود، به این صورت که افزایش انسولین سبب هیپرانسولینیمی، 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 هیپرانسولینیمی رخ می دهد، یک اختلال کار迪ومتابولیکی به شمار می آید که همه بافت ها را تحریک می کند و در روند استروئیدوژنریس اختلالاتی را ایجاد می نماید؛ بنابراین، افراد مبتلا به PCOS می توانند در معرض وقوع دیابت نوع ۲، دیس لیپیدمی، 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). اینی و همکاران در سال ۲۰۱۲ دریافتند که علائم PCOS باعث کاهش چشمگیر روند کیفیت زندگی زنان مبتلا می شود و از آنجاکه 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 پرموتر، چهار اگزون و یک اینtron دارد و مکان آن در غشای سلولی لپید 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

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 باندهای واضح مشاهده گردیدند (شکل شماره ۱). در مرحله بعد، از این محصولات برای انجام تعیین ژنوتیپ واریانت های مشخص در ناحیه مدنظر و همچنین یافتن جهش های جدید احتمالی از روش تعیین توالی سانگر استفاده شد. درنهایت، محصولات PCR اگزون ۱ ژن ۲ با NOEY2 نرم افزارهای GeneRunner، Chromas Alignment و تحلیل و بررسی گردیدند. سطح معنی داری آماری $P < 0.05$ توسط نرم افزار SPSS و با استفاده از آزمون های t-test و آنالیز واریانس (ANOVA) بررسی شدند.

DNA ژنومی ۲۴۰ نمونه بررسی شده توسط کیت استخراج PZP Molecular Company PZP صورت گرفت. صحت کیفیت DNA های استخراج شده به وسیله ژل آگارز ۱ درصد (شکل شماره ۲) و بررسی غلظت

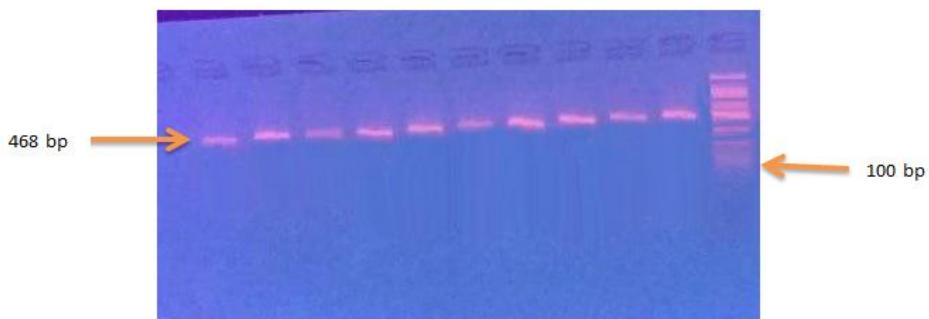
ژن ها را تحت تأثیر قرار می دهند (۱۰). هنگامی که ARHI در سطوح فیزیولوژیکی از پرومودر قابل القایی با داکسی سایکلین (DOX) بیان شود، اتوفارژی ایجاد می گردد و سلول ها در چرخه سلولی متوقف می شوند. رشد زنوگرافت پیوند سرطان تخمدان و پستان به طور برگشت پذیر توسط ARHI سرکوب می گردد و به نظر می رسد که بقای سلول های خاموش دست کم تا حدی به اتوفارژی بستگی داشته باشد (۱۱). هدف این مطالعه بررسی پلی مورفیسم اگزون ۱ ژن ۲ NOEY2 و ارتباط آن با PCOS و بیماری دیابت است.

مواد و روش ها

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 رضایت نامه و مصاحبه رو دررو با بیماران بررسی شده است. این مطالعه با کد اخلاق 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

جنسيت	سن	تعداد نمونه ها	نمونه ها
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 ۲ 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 X^{۱۰} به مقدار ۲/۵ میکرومولار، ۲MgCl₂ به مقدار ۲/۵ میکرومولار، آنزیم Taq polymerase به مقدار ۰/۵ میکرومولار و درنهایت، آب مقطر به مقدار ۱۳/۵ میکرومولار تا به حجم کلی ۲۵ میکرومولار برسد.

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

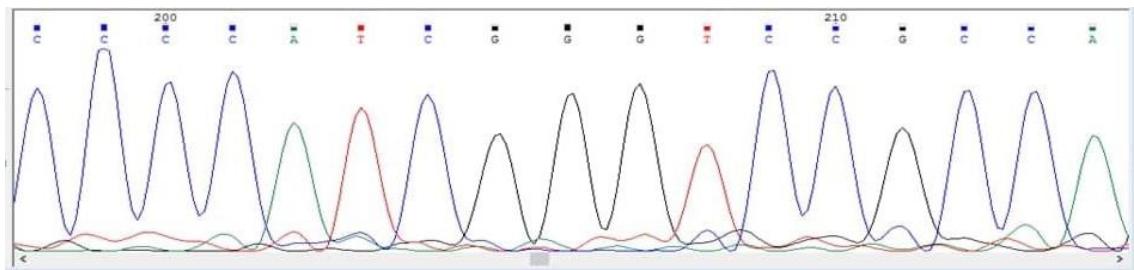
```

        AAA ACC TGC TGC CAA CAA CTT 3'
        5' CCA CA
        GTC AGA AGA CAT AAA CAG ACA 5'
        3' CTT CAT TGA AG
    
```

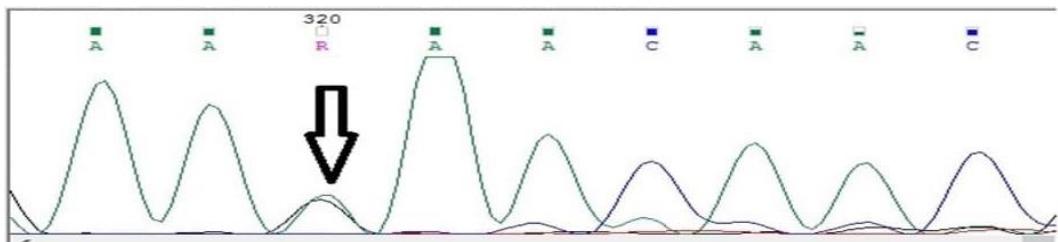
صحت پرایمرهای طراحی شده برای اگزون ۱ ژن NOEY2، توسط نرم افزار Oligo vol.7 و BLAST در NCBI مشخص گردید؛ سپس برنامه PCR برای آن اجرا و محصولات PCR روی ژل الکتروفورز ۲/۵ درصد جهت مشاهده باندهای باکیفیت و شارب بارگذاری شدند. پروفایل حرارتی برنامه PCR عبارت بود از: ۹۴ °C به مدت ۵ دقیقه، ۹۴ °C به مدت ۴۵ ثانیه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

یافته ها

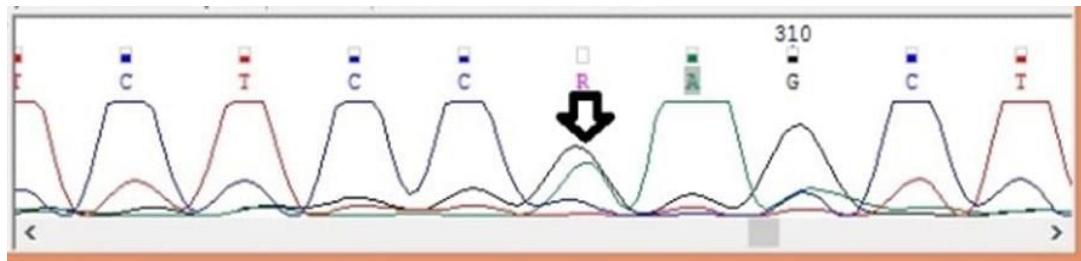
پس از آنالیز کروماتوگرام های حاصل از سکانس DNA به روش سانگر، همه اگزون شماره ۱ قابل تشخیص بود. در ناحیه تکثیرشده دو نوع پلی مورفیسم مشاهده گردید: یک پلی مورفیسم ۵'UTR c.156G>A) که در ناحیه اگزون ۱ و یک نوع دیگر پلی مورفیسم (c.207+76 G>A) که تنها در نمونه کنترل و در اینtronون ۱ دیده شد. شکل شماره ۳ کروماتوگرام فرد فاقد پلی مورفیسم، شکل شماره ۴ فرد دارای پلی مورفیسم و همچنین شکل شماره ۵ نمونه کنترل دارای پلی مورفیسم ۵'UTR c.207+76 G>A را نشان می دهد.



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



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



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

پلی مورفیسم PCOS در سطح UTR c.156G>A⁵ و ایجاد آللی مشاهده می شود؛ 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 بررسی های آماری یانگر آن اند 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 UTR c.156G>A 5' میان دو گروه بیمار (سندروم تخدمان پلی کیستیک) و شاهد در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. فراوانی آللی پلی مورفیسم UTR c.156G>A ۵' در نمونه های پلی کیستیک و شاهد به این صورت بود: فراوانی آلل وحشی G در افراد سالم ۹۴ درصد و در افراد بیمار A درصد مشاهده گردید، درحالی که فراوانی آلل پلی مورف A در افراد سالم ۶ درصد و در افراد بیمار ۱۶ درصد است. نتایج در افراد دهنده اختلاف معنی دار میان فراوانی های آللی نشان دهنده است (P=0.012)، بنابراین، ارتباط معناداری میان پلی مورفیسم UTR c.156G>A 5' میان نمونه های PCOS و شاهد است (P=0.012).

جدول شماره ۲. بررسی ژنوتیپی پلی مورفیسم UTR c.156G>A⁵ در نمونه‌های PCOS و شاهد

مدل های وراثتی												پلی مورفیسم		
مدل غلوب			مدل غلوب			مدل های وراثتی			مدل های وراثتی			فرآنک آلتی		
OR 95%CI	p-value	OR 95%CI	p-value	OR 95%CI	p-value	AA	AG	GG	OR 95%CI	p-value	A	G	5'UTR	c.156 G>A
0.23- 0.025 2.188	0.17	2.410- 1.5 5.55	0.025	0.34 0.11 0.93	0.03 0.87	4 7% 1 2%	11 18% 5 8%	45 75% 54 90%	0.33- 0.133 0.815	0.01 2	19 16% 7 6%	101 84% 113 94%	مورد شامل	

جدول شماره ۳. بررسی ژنوتیپی پلی مورفیسم c.156G>A^۵ در افراد مبتلا به PCOS و دیابتی

متغیر	۵UTR c.156 G>A	مورد	شاهد
جنس	G	100 83%	112 93%
عمر	A	20 17%	8 7%
p-value	0.015		
OR 95%CI	0.35 0.150-0.846		
GG	43 71%	53 88%	
AG	14 23%	6 10%	
AA	3 6%	1 2%	
p-value	0.07		
OR 95%CI	0.33340.11-0.93		
p-value	0.024		
OR 95%CI	2.44 1.07-5.59		
p-value	0.30		
OR 95%CI	0.32030.22-3.187		

مدل وراثتی هم-غالب، ارتباط معنی‌داری وجود دارد (به ترتیب $P=0.022$ و $P=0.024$ و $P=0.022$). درنهایت، به سبب معنادارتر بودن مدل وراثتی غالب ($P=0.022$)، این مدل در نظر گرفته می‌شود.

مطابق جدول شماره ۴، فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی پلی مورفیسم UTR c.156G>A^۵ در دو گروه دیابتی‌ها و شاهدها به این صورت است که در سطح آللی، فراوانی آلل وحشی G برای پلی مورفیسم UTR c.156G>A^۵ در نمونه‌های بیمار (دیابت) ۹۰ درصد و در نمونه‌های سالم ۹۴ درصد و نیز فراوانی آلل در گروه دیابتی A در نمونه‌های دیابت ۱۰ درصد و در افراد پلی مورف A در نمونه‌های دیابت ۶ درصد بود. گفتنی است که در سطح ژنوتیپی نیز سالم ۶ درصد بود. همچنین در گروه دیابتی ۸۳ درصد افراد ژنوتیپ GG، ۱۳ درصد ژنوتیپ AG و ۴ درصد ژنوتیپ AA دارند؛ درصد ژنوتیپ AG و ۲ درصد ژنوتیپ AA را نشان دادند. تحلیل‌های آماری نشان دادند که ارتباط معناداری میان دو گروه دیابتی و گروه شاهد، چه در سطح آللی و چه در سطح ژنوتیپی وجود ندارد (به ترتیب $P=0.141$ و $P=0.38$ ؛ درنتیجه، ارتباط معناداری میان پلی مورفیسم UTR c.156G>A^۵ و ایجاد بیماری دیابت در میان نمونه‌های بررسی شده

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

نتایج تحلیل‌های آماری روی بررسی احتمالی پیوستگی ژنتیکی میان ابتلا به PCOS و بروز دیابت در صورت وجود آلل یا ژنوتیپ خاص مربوط به پلی مورفیسم UTR c.156G>A^۵ در جدول شماره ۳ آمده است. همان‌طور که از جدول شماره ۳ برمی‌آید، فراوانی‌های آللی در نمونه‌های مورد (در اینجا مبتلایان به PCOS) و نمونه‌های 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 آللی میان دو گروه پژوهش است ($P=-0.015$)، سطح ژنوتیپی فراوانی‌ها در نمونه‌های PCOS عبارت بودند از: ژنوتیپ GG درصد ۷۱، ژنوتیپ AG درصد ۲۲ و ژنوتیپ AA درصد ۶ درصد. در گروه دیگر، همین ژنوتیپ‌ها به ترتیب فراوانی‌های ۸۸ درصد، ۱۰ درصد و ۲ درصد داشتند. با آنکه سطح ژنوتیپی در مرز معناداری (P=0.07) بود؛ اما تحلیل‌های دقیق‌تر آماری توسط روش ANOVA نشان داد که میان دو گروه مبتلایان به PCOS و افراد دیابتی هم در مدل وراثتی غالب و هم در

مغلوب که توسط نرم افزارهای مختلف یادشده انجام گرفت، در جدول شماره ۴ آورده شدن.

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

جدول شماره ۴. بررسی ژنتیکی پلیمورفیسم A^{c.156G}UTR در دو گروه شاهد و دیابتی

مود	مشاهد	نیزه‌ها	مدل‌های وراثتی
G	108 90%	114 94%	دسته‌بندی
A	12 10%	6 6%	جی
p-value	0.141		
OR 95%CI	0.471701.1-3.06		
GG	50.83%	55.91%	گردنی روزانه
AG	8.13%	4.7%	
AA	2.4%	1.2%	
p-value	0.38		
p-value	0.16		آنچه این نتیجه
OR 95%CI	0.541045-1.421		آنچه این نتیجه
p-value	0.18		
OR 95%CI	1.81 0.724-5.5		
p-value	0.55		
OR 95%CI	0.4900-43.5-5.7		

جمعیت پژوهش قابلیت گزارش دارد. در ادامه، بررسی‌های بیشتر نشان دادند که در جمعیت پژوهش، پلی‌مورفیسم UTR c.156G>A⁵ با بروز PCOS تحت مدل هم-غالبی ($P=0.025$) مرتبط است؛ به این معنی که افراد دارای ژنتیپ 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 ($P=0.16$ ، به طوری که این امر تأییدی است بر ارتباط پلی‌مورفیسم UTR c.156G>A⁵ 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،

پہنچ و نتیجہ گیری

در این مطالعه پژوهشی، پس از بررسی DNA ژنومی ۲۴۰ نمونه خون زنان مبتلا به سندروم پلی کیستیک تخدمان (PCOS)، دیابتی، پلی کیستیک-دیابت و سالم در ناحیه بالادست و پایین دست اگزون ۱ ژن NOEY2 به وجود دو پلی مورفیسم UTR c.156G>A^{5'} و c.207+76 G>A^{5'} ۷۶ نوکلتوتید دورتر از اگزون ۱ و در ناحیه ایترون ۱ ژن NOEY2 پی برد شد. پلی مورفیسم اول به علت آنکه در پایگاه‌های داده NCBI (به آدرس: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) و http://asia.ensembl.org/ ENSEMBL (به آدرس: <http://asia.ensembl.org/>) نداشت، می‌تواند به عنوان یک پلی مورفیسم جدید شناخته شود. این پلی مورفیسم دقیقاً به فاصله یک نوکلتوتید میان دو پلی مورفیسم ۹۷۳۳۴۸۴۷۶rs و ۱۲۵۷۹۹۹۱۲۶rs قرار دارد. این پلی مورفیسم‌ها همه در ناحیه پرموتری ژن NOEY2 یا DIRAS3 قرار گرفته‌اند که از سویی با ناحیه CTCF (ناحیه مهاری ژن) همپوشانی دارند. پس از تعیین ژنوتیپ همه نمونه‌ها، مشخص گردید که تنها UTR c.156G>A^{5'} از نظر دارا بودن پیوستگی ژنتیکی با PCOS میان

گزارش شده در ژن DIRAS3 هستند. با توجه به اینکه برای اولین ارتباط پلی‌مورفیسم c.156G>A^۵ با PCOS و دیابت گزارش می‌گردد و با نظر به محل قرارگیری این پلی‌مورفیسم در ناحیه همپوشان پرومومتر و CTCF، بررسی‌های *in Silico* برای یافتن احتمال تغییر تمایل اتصال فاکتورهای رونویسی توسط آلل‌های وحشی و پلی‌مورف صورت گرفت. پس از تحلیل‌های بیوانفورماتیکی توسط پایگاه‌های داده ENSEMBL و NCBI، اطلاعات توالی مدنظر برای پلی‌مورفیسم UTR c.156G>A^۵ در نرم‌افزار 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 پلی‌مورفیسم c.156G>A^۵ این ناحیه ۲۱ نوکلئوتیدی توسط تحلیل‌های بیوانفورماتیکی نشان داد که در صورت وجود آلل وحشی G (آلل غالب) دو ناحیه اتصالی برای فاکتور رونویسی MYB و یک ناحیه برای MYOD وجود دارد، در حالی که اگر آلل پلی‌مورف A در این توالی وجود داشته باشد، تمایل اتصال MYOD به این ناحیه ازدست می‌رود و جالب‌تر آنکه فاکتورهای رونویسی MEF2، NFY و STAT می‌توانند به این ناحیه متصل شوند. مطالعات ثابت کرده‌اند که MEF2 به عنوان یک فاکتور رونویسی سه ایزوفرم دارد و از طریق مسیر AMPK در بیماری PCOS دخیل است که سطح قابل توجه پایین‌تر MEF2A و فعال شدن آن در PCOS-Insulin می‌تواند با متفورمین جبران شود (۱۹). مطالعه ژانگ و همکارانش این احتمال را مطرح کرد که Y-NF-Y می‌تواند یکی از واسطه‌های پایین‌دستی cAMP تنظیم کننده متابولیسم گلوکز باشد. نتایج مطالعه‌شان همچنین نشان داد که بیان Y-NF-Y به طور مؤثر توسط cAMP، گلوکاگون و ناشتا بودن در داخل بدن القا می‌شود. علاوه بر این، آنان شواهدی را ارائه کردند که نشان می‌دهد NF-Y بیان ژن گلوکونوژنیک و تولید گلوکز کبدی را تنظیم می‌کند (۲۰). دیابت نوع ۱ و

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

خاطر نشان می‌شود که ارتباط میان PCOS و چاقی در سال‌های اخیر طی پژوهش‌های جالبی گزارش شده است. بر اساس مطالعه حری و همکاران در سال ۱۳۸۵، شاخص توده بدنی (BMI) و دور کمرزنان دیابتی مبتلا به PCOS بیشتر از گروه غیرمبتلا به PCOS است. افزایش BMI و دور کمر به عنوان شواهدی است که تأیید کننده 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 پلی‌مورفیسم اگزون‌های ۲ و ۳ ژن (NOEY2) در بیماران مبتلا به سرطان پستان در جایگاه DIRAS3 کردند. نتایج آنان وجود یک پلی‌مورفیسم در ۳.332-۳ T>C یک بیمار مبتلا به سرطان پستان را نشان داد، در حالی که هیچ گونه جهشی در اگزون ۲ گزارش نگردید؛ همچنین وجود یک پلی‌مورفیسم دیگر ۵ در ناحیه اینtron 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 سندروم تخمدان پلی‌کیستیک در معرض خطر افزایش تحمل نکردن گلوکز و دیابت نوع ۲، استناتوز کبدی و سندروم متابولیک و بدخیمی‌های تخمدان هستند (۱۷). همه مطالعات یادشده با مطالعه حاضر همسو بودند و تأیید کننده استعداد ژنتیکی ابتلای به PCOS و دیابت از طریق پلی‌مورفیسم‌های

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

تشکر و قدردانی

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

تعارض منافع

بدین وسیله نویسنده‌گان اعلام می‌نمایند که هیچ گونه تضاد منافعی 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
- Shabghah 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' UTR c.156G>A با تغییر آلتی، باعث ایجاد تغییر تمایل اتصال فاکتورهای رونویسی و بنابراین توجیه ارتباط ژنتیکی PCOS و دیابت در جمعیت پژوهش حاضر در میان زنان ایرانی شود. درمجموع، مطالعه حاضر با گزارش‌های قابل توجه و یافه‌های جدید خود در زمینه پیوستگی ژنتیکی از NOEY2 (DIRAS3) طریق پلی‌مورفیسم‌های ژن 5' UTR c.156G>A پیشنهاد می‌کند که پلی‌مورفیسم در جمعیت‌های دیگر با حجم جامعه بزرگ‌تر بررسی گردد؛ همچنین خاطرنشان می‌شود که با توجه به بررسی‌های بیوانفورماتیکی انجام شده، بیان فاکتورهای یادشده به همراه تعیین ژنتیپ 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, Haghghi 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.