View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Sabzevar University of Medical Sciences Electronic Publications

مقـالـه پـژوهشی

بررسی تنوع ژنتیکی GLN223ARG گیرندۀ لپتین در زنان دارای ناباروری غیرقابل‌توجیه و زنان بارور

شمیم اشرفی مهابادی، فرزانه تفویضی*

گروه زیست‌شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۲/۰۶
تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۸/۲۸

چکیده

زمینه و هدف ناباروری غیرقابل‌توجیه نوعی ناباروری است که با روش‌های تشخیصی استانداردهای موجود نمی‌توان هیچ علت مشخصی برای آن یافت. پلی‌مورفیسم Gln223Arg در ژن گیرندۀ لپتین با افزایش میزان لپتین و به‌تبع آن با موارد متعددی از جمله چاقی، تخمدان پلی‌کیستیک و ناباروری در ارتباط است. هدف از این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی ژن گیرندۀ لپتین در ناباروری غیرقابل‌توجیه در زنان است.

مواد و روش‌ها این مطالعه به‌صورت موردی- شاهدی در فاصلۀ ۱۳۹۴-۱۳۹۵ انجام شد. افراد مورد مطالعه در این تحقیق، ۱۰۲ زن مبتلا به ناباروری غیرقابل‌توجیه و ۱۱۲ زن بارور با پروفایل هورمونی نرمال بودند. به‌منظور تعیین ژنوتیپ افراد در بررسی پلی‌مورفیسم Gln223Arg از تکنیک PCR-RFLP استفاده شد.

یافته‌ها ارتباط معناداری بین پلی‌مورفیسم Gln223Arg با ناباروری غیرقابل‌توجیه در زنان مشاهده نشد. با محاسبۀ تعادل هاردی- واینبرگ مشخص شد که جمعیت افراد بیمار نابارور و سالم برای جایگاه ژنی (Gln223Arg) در تعادل است. لذا، می‌توان دریافت که عوامل برهم‌زنندۀ تعادل، در جمعیت‌های مورد مطالعه این پژوهش، وجود ندارد.

نتیجه‌گیری در مطالعۀ حاضر، پلی‌مورفیسم Gln223Arg در ژن گیرندۀ لپتین، فاکتور خطری در بروز ناباروری غیرقابل‌توجیه در زنان نیست. با وجود این، مطالعات بیشتر در جمعیت‌های بزرگ‌تر و بررسی سایر پلی‌مورفیسم‌های گیرندۀ لپتین به‌منظور درک نقش پلی‌مورفیسم‌ها در ناباروری غیرقابل‌توجیه پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها:
پلی‌مورفیسم **Gln223Arg**، ناباروری ناشناخته.

مقدمه

ناباروری همواره یکی از مسائل مهم، جدی و پرهزینۀ مربوط به سلامت در جوامع مختلف مطرح بوده است. بر اساس مطالعات قبلی در کشورهای دیگر، در حدود ۱۰-۱۵ درصد از زوج‌های مبتلا به ناباروری همواره از این ناتوانی به‌عنوان بدترین تجربه در زندگی خود یادمی‌کنند. در حال حاضر، در ایران، حدود ۳ میلیون زوج از ناباروری زنج می‌برند. در ۷ درصد از جمعیت زوج‌های نابارور، علت ناباروری ناشناخته است [۱]. ناباروری ناشناخته نوعی ناباروری است که با روش‌های تشخیصی استانداردهای موجود، نمی‌توان هیچ علت مشخصی برای آن یافت [۲].

تغییرات خفیف در شرایط هورمونی به ناباروری می‌انجامد. از جمله عوامل هورمونی مؤثر بر تخمک‌گذاری، هورمون لپتین است که هم به‌صورت پاراکرین و هم به‌صورت اندوکرین روی تخمدان اثرمی‌گذارد و نقش کلیدی در هموستاز انرژی و وزن

* نویسندۀ مسئول: فرزانه تفویضی
نشانی: اتوبان تهران ساوه- شهر جدید پرند- دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند
تلفن: ۵۶۷۳۳۰۴۹ دورنگار: ۵۶۷۳۳۱۵۸
رایانه: farzanehTafvizi54@gmail.com
شناسه ORCID: فرزانه تفویضی 0000-0002-3595-5021
شمیم اشرفی مهابادی 0000-0001-8109-8166

مجلۀ علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورۀ ۲۵، شمارۀ ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۷، ص ۱۲۷-۱۳۴
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۷۴۸۷-۱۶۰۶

بدن ایفا می‌کند [۳].

لپتین انسانی پروتئینی ۱۶۷ آمینواسیدی است. این پروتئین نخست در سلول‌های چربی بافت چربی سفید ساخته می‌شود و سطح لپتین در گردش خون، به‌طور مستقیم با مقدار چربی کل بدن تناسب دارد. این بافت دیگر بافت بی‌حرکتی در نظر گرفته نمی‌شود که فقط ذخیرهٔ چربی را انجام می‌دهد. لپتین نقش مهم در فیزیولوژی انسان دارد [۴].

بیان لپتین و ایزوفرم‌های گیرندهٔ آن در فولیکول‌های پیش از تخمک‌گذاری انسان و حضور لپتین در اووسیت بالغ پیشنهاد می‌کند که این فاکتور در فرایند تولیدمثل در سطح تخمدان عمل می‌کند [۵].

لپتین اثر خود را از طریق گیرنده‌هایی اعمال می‌کند که از گروه گیرنده‌های سایتوکین‌هاست. با توجه به حضور گیرنده‌های لپتین در همهٔ سطوح محور هیپوتالاموس- هیپوفیز گنادی ملاحظه می‌شود که آثار تنظیمی لپتین بر تولیدمثل و بر ارگان‌های هدف از قبیل، جفت و غدد پستانی مؤثر است و تأثیرات فیزیولوژیکی مهمی دارد، از جمله بلوغ، سیکل قاعدگی، بارداری، شیردهی و مراحل اولیهٔ رشد جنین [۶].

شش گیرندهٔ لپتین شکل یکسانی دارند (Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rf Rd, Ob-Re). در سراسر سیستم عصبی مرکزی و بافت‌های مختلف یافت می‌شوند و قسمت داخلی انواع گیرنده‌ها طول متفاوتی دارند، ولی در قسمت خارجی، مشابه هم هستند [۷]. دومین خارج سلولی بیش از ۸۰۰ اسید آمینه دارد، ولی دومین داخل سلولی در هر کدام از این ایزوفرم‌ها متغیر است [۸].

ژن گیرندهٔ لپتین (LEPR) برای یافتن واریانت‌های ژنی دارای ارتباط احتمالی با پاتوفیزیولوژی چاقی، (T2DM) Type2 diabetes mellitus و عواقب مرتبط آن مطالعه شده است؛ براین مثال، single nucleotide polymorphism (SNP) مهم در ژن گیرندهٔ لپتین واقع در لوکوس 1p31.3 شامل جابه‌جایی Q به R در اگزون۶ در نوکلئوتید ۶۶۸ کدون آغازی است (Gln223Arg, rs1137101) با سطوح بالای لپتین و برخی انواع سرطان‌ها در ارتباط است [۹]. ارتباط معناداری بین پلی‌مورفیسم Gln223Arg و خطر ابتلا به سندروم تخمدان پلی‌کیستیک گزارش شده است [۱۰]. همچنین، در مطالعهٔ دیگری، ژنوتیپ GG در پلی‌مورفیسم Gln223Arg فاکتور خطری برای بیماران مبتلا به سندروم تخمدان پلی‌کیستیک معرفی شده است [۴].

لذا، هدف از این مطالعه بررسی پلی‌مورفیسم GLN223ARGو بررسی فرکانس اللی و پیش‌بینی احتمال خطر ابتلا به ناباروری ناشناخته در زنان است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

این مطالعه به‌صورت موردی- شاهدی انجام شد. گروه مورد از ۱۰۲ بیمار با ناباروری ناشناخته و گروه شاهد از ۱۱۲ فرد نرمال (افراد بارور کاندید اهدای تخمک به بیماران نابارور)، مراجعه‌کننده به کلینیک ناباروری بیمارستان امام خمینی و بیمارستان دی شهر تهران انتخاب شد. پس از کسب رضایتنامه، افراد واجد شرایط به مطالعه وارد شدند.

بیماران با ناباروری ناشناخته زنانی بودند که حداقل یک سال از ناباروری آن‌ها گذشته بود، در بررسی‌های انجام‌شده سیکل‌های منظم داشتند و در هیستروسالپنگوگرافی، لوله‌ها باز و کاویتهٔ رحم نرمال بود. همچنین، همسران آن‌ها اسپرموگرام نرمال داشتند. گروه کنترل، شامل ۱۱۲ خانم نرمال با حداقل یک فرزند سالم بود. در هر دو گروه در فاز فولیکولار (روز ۳ سیکل) سونوگرافی ترانس واژینال انجام شد و در صورت رویت حداقل پنج فولیکول آنترال (AFC) در هر تخمدان، سنجش پروفایل هورمونی Follicle, Lutin hormone (LH) stimulating hormone (FSH), Thyroid stimulating hormone (TSH) Prolactin (PRL), Anti-Mullerian hormone در همین روز به‌روش دستی و با استفاده از روش الایزا (monobind kit, USA) در آزمایشگاه انجام شد و بیماران با پروفایل هورمونی نرمال (FSH<10، AMH>1، TSH<4 و PRL<19) وارد مطالعه شدند.

معیارهای ورود به مطالعه عبارت بود از سن زیر ۴۰ سال، سیکل‌های قاعدگی منظم، عکس رنگی رحم نرمال، اسپرموگرام نرمال، سونوگرافی ترانس واژینال نرمال، پروفایل هورمونی نرمال، عدم وجود بیماری سیستمی.

افراد دارای سابقهٔ بیماری قلبی- عروقی، بیماری مغزی، فشارخون بالا، دیابت، ترومبو آمبولی، یا سابقهٔ هر گونه بیماری سیستماتیکی مشخص، اختلالات ژنیکولوژیکی مثل میوم رحمی، اندومتریوزیس، پولیپ‌های رحمی، نمای تخمدان‌های پلی‌کیستیک در سونوگرافی، عفونت‌های حاد یا مزمن، سابقهٔ فامیلی چربی خون بالا، عکس رنگی رحم غیرطبیعی، سیکل‌های قاعدگی نامنظم، دارودرمانی، سابقهٔ سقط مکرر، مصرف سیگار، توده‌های تخمدانی، اسپرموگرام غیرطبیعی، پروفایل هورمونی غیرطبیعی و استفاده از داروی هورمونی در ۲ ماه گذشته از مطالعه خارج شدند [۱۱].

اطلاعاتی مانند سن، طول مدت ناباروری، سابقهٔ سیکل‌های قاعدگی، سابقهٔ انجام ورزش در سه ماه گذشته (به‌معنای انجام ورزش در سالن‌های ورزشی یا در منزل به‌مدت حداقل نیم‌ساعت و سه روز در هفته) وضعیت عکس رنگی رحم و

اسـپرموگرام همسـر بیمار، همچنین پارامترهای بیوشـیمیایی خون شـامل (FSH,LH,PRL,TSH,AMH) در پرسشنامه درج شـد. در سومین روز از سیکل قاعدگی بعدی، بین ساعت ۸-۹ صـبح خون‌گیری در آزمـایشـگـاه ولی انجـام شـد. بعد از خون‌گیری، نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه با دورg ۳۰۰۰ سـانترفیوژ و سـرم آن جدا شـد. خون به‌دسـت‌آمده در فریزر ۷۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج DNA

کل DNA سـلولی طبق دسـتورالعمل کیت استخراج DNA از خون (شرکت زیست‌دانش یاران) استخراج شد. ۳۰۰ میکرولیتر از نمونهٔ خون مورد بررسـی درون میکروتیوپ ۱/۵ سـی‌سـی ریخته و با بافر۹۰۰ میکرولیتر (RBC lysis solution 1) و ۵۰ مـاکرولیتر از بـافر (RBC lysis solution 2) مخلوط شـد. مخلوط به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شـد. پس از انکوباسـیون در ۱۲۰۰۰ rpm به‌مدت ۲ دقیقه سانتریوفوژ و فاز رویی دور ریخته شد. این مرحله سه بار تکرار شـد تا یک پلیت سفید رنگ در انتهای میکروتیوپ باقی بماند. به میکروتیوپ ۳۰۰ میکرولیتر از بافر cell lysis solution 1 و ۴۰ میکرولیتر از بافر cell lysis solution2 اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سـانتی‌گراد انکوبه شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از بـافرcell lysis solution3 بـه مخلوط اضـافه و نمونه‌ها در rpm ۱۲۰۰۰ به‌مدت ۲ دقیقه سانتریوفیوژ شد. فاز رویی به میکروتیوپ جدید منتقل شـد. DNA با اسـتفاده از ایزوپروپانل رسوب داده سپس، رسوب DNA با الکل ۸۰ درصد شستشو داده شد. رسوب DNA در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد خشـک شـد. در بافر DNA hydration حل و تا زمان اسـتفاده در فریزر ۲۰- نگهداری شد.

بررسی کیفیت و کمیت DNA

برای بررسی کیفیت DNAهای استخراج‌شده با دو روش، از ژل آگـارز ۱ درصـد رنـگ‌آمیزی‌شـده بـا DNA safe stain خریداری‌شده از شرکت سیناژن استفاده شد. در تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده از نانودراپ NanoDrop™ ND-1000 بـا انـدازه‌گـیری میزان جـذب نوری 260/230 nm و 260/280 nm غلظت DNA، خلوص و آلودگی پروتئینی DNA استخراج و تعیین شد.

واکنش PCR-RFLP

به‌منظور تکثیر قطعهٔ تقریباً ۴۱۶bp ناحیهٔ ژنی (rs1137101) GLN223ARG از پرایمر تهیه‌شـده از شـرکت تکاپو زیسـت ایران استفاده شد به توالی زیر.

Primer Forward: ACC CTT TAA GCT GGG TGT CCC AAA TAG

Primer Reverse: AGC TAG CAA ATA TTT TTG TAA GCA ATT

در مرحلـهٔ بعـد فراینـد PCR بـه‌منظور تکثیر ژن گیرنـدهٔ لپتین برای بررسی پلی‌مورفیسم GLN223ARG (rs1137101) با اسـتفاده از پرایمرهای اختصـاصـی بهینه‌سـازی شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر عبارت بود از ۲/۵میکرولیتر بـافـر آمـپلیکون، ۰/۵میکرولیتر (۰/۴ میکرومولار) از پرایمر اختصـاصـی ژن GLN223ARG، و ۵۰ نـانوگرم از DNA نمونه‌های اسـتخراج‌شده و تا حجم ۲۵ میکرولیتر از آب مقطر اسـتریل آماده شـد. تکثیر DNA با اسـتفاده از دسـتگاه ترموسـایکلر (Bio Rad PCR System, USA) مطابق برنامهٔ دمایی صورت گرفت (مرحلهٔ دناتوراسیون ابتدایی در ۹۵ درجه به‌مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخهٔ اتصـال پرایمر شـامل اعمال دمای ۹۵ درجـهٔ سـانتی گراد بـه‌مـدت ۳۰ ثانیه، دمای ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۴۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه به‌مدت ۱ دقیقه صـورت گرفت. در پایان مرحله ی گسـترش نهایی پرایمر با اعمال دمای۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه). محصولات PCR پس از رنگ‌آمیزی با DNA safe stain روی ژل آگارز ۲ درصـد در تـانک الکتروفورز حاوی بافر TBE (Tris Base, Boric acid, Na EDTA, Deionized Water) با ولتاژ ۱۰۰ ولت به‌مدت ۱ سـاعت بررسـی کیفی شـد. نتایج با دستگاه ژل داک و با اشعهٔ UV مشاهده شد.

در انجـام واکنش آنزیمی، در ویـالی حـدود ۱۰ میکروگرم DNA، ۲ میکرولیتر از بافر 10 X TangoTM و ۱ میکرولیتر از آنزیم محدودالاثر MSPI اضـافه شد. حجم کلی با آب مقطر به ۳۱ میکرولیتر رسـانده شـد. نمونه‌ها به‌مدت ۱۶ سـاعت در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سـانتی‌گراد برای تأثیر آنزیم محدودکنندهٔ MSP1 و ۲۰ دقیقـه در انکوباتور ۶۵ درجهٔ سـانتی‌گراد برای غیرفعـال‌کردن آنزیم قرارگرفت. نمونه‌های حاصـل از تکثیر با اسـتفاده از آنزیم محدودکنندهٔ MSP1 در جایگاه، C^CG_G دارای سـایت برش، هضـم آنزیمی شد. هموزیگوت وحشی آلل A (Gln/Gln) بـا تـک باند ۴۱۶bp جفت باز، هموزیگوت‌های موتـانت آلل G (Arg/Arg) با ۲ باند ۲۹۱bp و ۱۲۵bp جفت بـازی و هتروزیگوت‌هـای AG (Gln/Arg) بـا ۳ بـاند ۴۱۶bp، ۲۹۱bp، ۱۲۵bp مشخص می‌شود. برای مشاهدهٔ نتایج کار ۱۸ میکرولیتر از محصـول واکنش RFLP به‌همراه 6X Loading dye روی ژل آگارز ۳ درصد در کنار ۲ میکرولیتر مارکر ۵۰ bp الکتروفورز شد.

آنالیزهای آماری

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با اسـتفاده از POP GENE

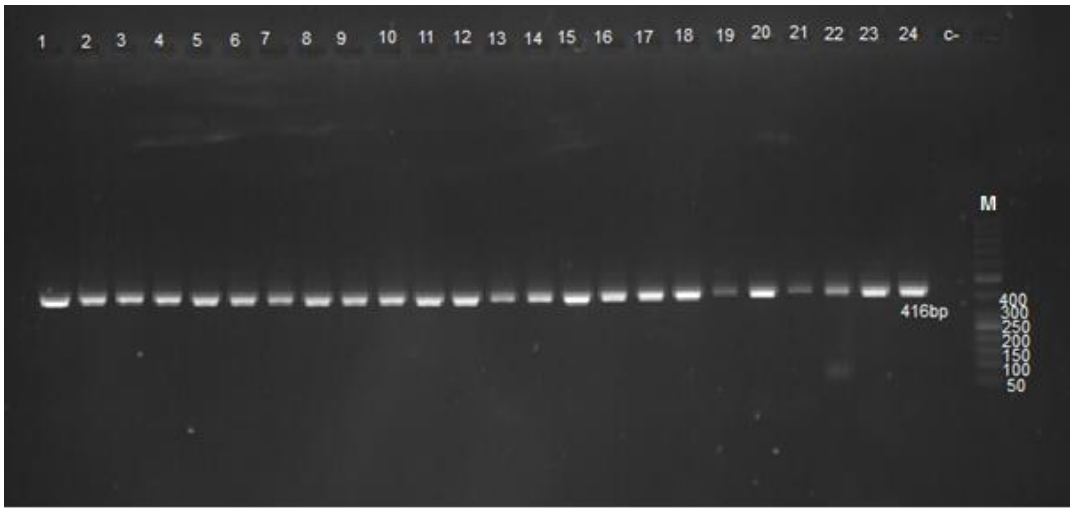
ver.1,32 و SPSS ver.20 انجام شد. ارتباط ژنوتیپ‌ها با خطر ابتلا به ناباروری در زنان مورد بررسی با آزمون chi-square به‌دست آمد. نسبت شانس (OR) و فاصلهٔ اطمینان ۹۵ درصد (CL) برای تمامی ژنوتیپ‌ها در مقایسه با گروه کنترل محاسبه شد. برای مقایسهٔ میانگین پروفایل هورمونی از آزمون t-test استفاده شد.

یافته‌ها

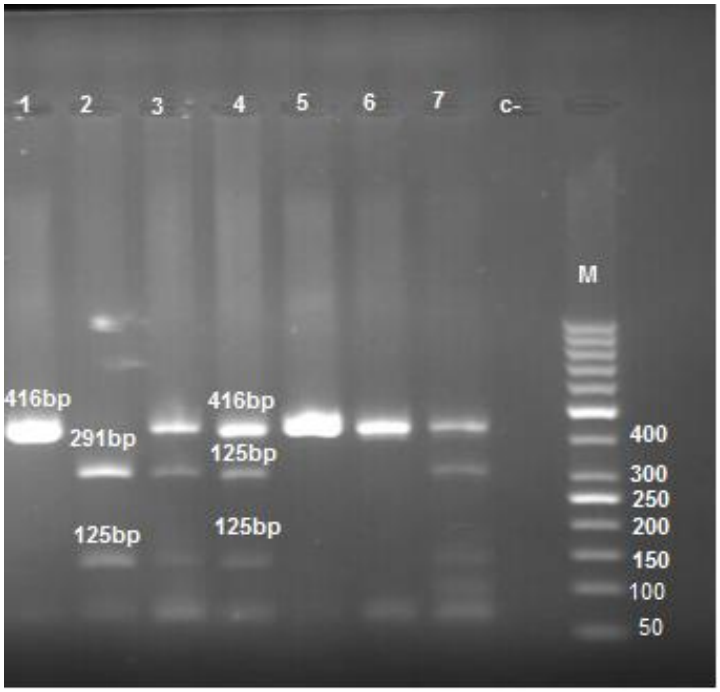
در این تحقیق در مجموع ۲۱۴ نفر، شامل ۱۰۲ زن نابارور و ۱۱۲ زن سالم به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. نتایج بررسی سنجش هورمون‌های LH،FSH، AMH، PRL، TSH و تعداد فولیکول‌های آنترال بین دو گروه نابارور و کنترل در جدول ۱ ارائه شده است. اختلاف آماری معناداری بین دو گروه دیده نشد. بعد از حصول اطمینان از همگن‌بودن دو گروه، آنالیز مولکولی برای بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت مورد مطالعه انجام گرفت.

تصاویر مربوط به واکنش PCR و آنالیز RFLP به‌ترتیب در شکل ۱ و ۲ آمده است. با محاسبهٔ تعادل هاردی- واینبرگ مشخص شد که جمعیت مورد مطالعه برای جایگاه ژنی Gln223Arg در تعادل است و عوامل برهم‌زنندهٔ تعادل در جمعیت وجود ندارد. بررسی نتایج نشان داد که از ۱۰۲ فرد بیمار، ۴۱ نفر (۴۰/۱۹ درصد) دارای ژنوتیپ AA، ۴۴ نفر (۴۳/۱۳ درصد) دارای ژنوتیپ AG و ۱۷ نفر (۱۶/۶۶ درصد) دارای ژنوتیپ GG بود. در گروه کنترل، ژنوتیپ AA در ۴۷ فرد (۴۱/۹۶ درصد)، ژنوتیپ AG در ۵۳ نفر (۴۷/۳۲ درصد) و ژنوتیپ GG در ۱۲ نفر (۱۰/۷۱ درصد) مشاهده شد.

برای بررسی معنادار بودن تفاوت بین ژنوتیپ‌ها در دو گروه فوق از آزمون Chi-Square استفاده شد. بر اساس این محاسبه، مقدار p برای تفاوت فراوانی ژنوتیپی در دو گروه بیمار و کنترل ۰/۴۴ است. با بررسی فراوانی آللی در جمعیت مورد مطالعه مشخص شد که در گروه بیمار، فراوانی آلل A و G به‌ترتیب ۶۱/۷۶ درصد و ۳۸/۲۴ درصد بود. همچنین، در گروه کنترل، آلل A دارای فراوانی ۶۵/۶۲ درصد و آلل G، دارای فراوانی ۳۴/۳۸ درصد بود. تفاوت معناداری در فراوانی آللی این دو گروه مشاهده نشد (p = ۰/۴۱). ارتباطی بین پلی‌مورفیسم Gln223Arg ژن گیرندهٔ لپتین با ناباروری زنان در جمعیت مورد مطالعه دیده نشد. محاسبهٔ Odds ratio در فاصلهٔ اطمینان ۹۵ درصد نشان داد که پلی‌مورفیسم Gln223Arg در ژن گیرندهٔ لپتین، فاکتور خطری در بروز ناباروری نامشخص در زنان نیست. نتایج به ترتیب در جدول ۲ آمده است.



شکل ۱. نمونهٔ ژل مربوط به الکتروفور محصول PCR پلی‌مورفیسم GLN223ARG (با استفاده از مارکر ۵۰ جفت بازی، نشان دادیم نمونه‌ها با ۴۱۶ جفت باز تکثیر شده‌اند. چاهک ۲۵ کنترل منفی فاقد نمونه است).



شکل ۲. نمونه‌های RFLP در این مطالعه (نمونه‌های ۱، ۵ و۶ با قرارگرفتن در جایگاه ۴۱۶ جفت بازی نمایانگر ژنوتیپ هموزیگوت Gln/Gln(AA) و نمونهٔ ۲ با قرارگرفتن در جایگاه ۲۹۱ و ۱۲۵جفت بازی نمایانگر ژنوتیپ هموزیگوت موتانت Arg/Arg (GG) و نمونه‌های ۳ و۷ با قرارگرفتن در جایگاه ۴۱۶، ۲۹۱ و ۱۲۵ جفت بازی نمایانگر ژنوتیپ هتروزیگوت Gln/Arg (AG) است).

جدول ۱. مقایسهٔ متغیرهای مورد بررسی (دموگرافیک و پارامترهای بیوشیمیایی خون) در دو گروه مورد و کنترل

Variables	Cases Mean ± SD	Control Mean ± SD	P value
AMH	2.38 ± 1.08	2.44 ± 0.79	0.607
TSH	2.65 ± 1.42	2.71 ± 1.28	0.724
Prolactin	11.12 ± 4.82	11.08 ± 4.57	0.952
LH	4.34 ± 1.52	3.96 ± 1.63	0.081
FSH	5.18 ± 1.64	4.77 ± 1.63	0.071

جدول ۲. ارتباط ژنوتیپ‌ها با خطر ابتلا به Unexplained Infertility

Genotype	Case	Control	OR (% 95 CI)	P value
Gln/Gln (AA)	41	47	1 (Reference)	-
Gln/Arg (AG)	44	53	0.95 (0.53 – 1.7)	0.87
Arg/Arg (GG)	17	12	1.62 (0.69 – 3.8)	0.26
Gln/Arg + Arg/Arg	61	65	1.07 (0.62 – 1.85)	0.79
Allele				
A allele	126	147	1 (Reference)	P value
G allele	78	77	1.18 (0.79 – 1.75)	0.41

بحث

در تحقیق حاضر، پلی‌مورفیسم Gln223Arg در ژن گیرندهٔ لپتین از طریق PCR-RFLP در افراد بیمار و کنترل بررسی شد. جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی- واینبرگ بود. تفاوت معناداری در توزیع آللی و ژنوتیپی پلی‌مورفیسم کدون ۲۲۳ ژن گیرندهٔ لپتین در زنان نابارور ناشناخته و گروه کنترل مشاهده نشد. بنابراین، احتمالاً این پلی‌مورفیسم در ناباروری غیرقابل‌توجیه زنان در جمعیت مورد مطالعه نقشی ندارد.

ناباروری همواره مسئله‌ای مهم و پرهزینه برای حفظ سلامت در جوامع مختلف شناخته شده است [۱]. برای تشخیص ناباروری ناشناخته وجود معیارهای زیر ضرورت دارد: طبیعی‌بودن آنالیز مایع منی، وجود عملکرد تخمک‌گذاری، طبیعی‌بودن حفرهٔ رحم و بازبودن دوطرفهٔ لولهٔ فالوپ [۱۲]. در ایجاد ناباروری ناشناخته، علل‌های مختلفی مانند اشکالات خفیف در اسپرموگرام، تغییرات خفیف در شرایط هورمونی، همچنین سازوکارهای پاتوفیزیولوژیکی تحت زمینه‌ای دخیل است [۱۱]. ژن Db، گیرندهٔ لپتین را کدمی‌کند [۱۳]. ژن گیرندهٔ لپتین انسانی روی کروموزوم 1p31 قراردارد [۴]. طول ژن گیرندهٔ لپتین انسانی 70kb و شامل ۲۰ اگزون کشف‌شده است [۹]. پیشنهاد شده است که تغییر آمینواسید گلوتامین (Gln or Q) با آرژنین (Arg or R) در بخش خارج سلولی گیرنده، باعث تغییر بار الکتریکی از خنثی به مثبت و منجر به تغییر اتصال لپتین به گیرنده و بنابراین، دایمرشدن گیرنده و تغییر ظرفیت سیگنال‌دهی گیرندهٔ لپتین می‌شود. پلی‌مورفیسم Gln223Arg در مورد ارتباط آن با چاقی در جمعیت‌های مختلف مطالعه شده است که خود عاملی برای ناباروری است. تجزیه‌وتحلیل‌های متعددی از SNPs مرتبط با LEPR در دههٔ گذشته و ارتباط آن با انواع ناباروری منتشر شده است [۱۴].

لی و همکاران در سال ۲۰۱۳، ارتباط معناداری بین پلی‌مورفیسم Gln223Arg و خطر ابتلا به سندروم تخمدان پلی‌کیستیک پیدا کردند [۱۰].

همچنین، اسمایسم در سال ۲۰۱۶، ارتباط معناداری بین پلی‌مورفیسم Gln223Arg و خطر ابتلا به سندروم تخمدان پلی‌کیستیک پیدا کرد [۴].

در مطالعهٔ دیگری سوریاپروم و همکارانش در سال ۲۰۱۴، ارتباط معناداری بین پلی‌مورفیسم Gln223Arg ژن گیرندهٔ لپتین و سطوح لپتین و گلوکز مشاهده کردند ($P < ۰/۰۵$). بر اساس نتایج این مطالعه، پلی‌مورفیسم مذکور غلظت لپتین و خطر سندروم متابولیکی را در جمعیت تحت تأثیر قرارمی‌دهد [۱۵].

ارتباط ژنوتیپ GG در پلی‌مورفیسم Gln233Arg ژن LEPR با افزایش لیپیدهای سرمی و لپتین نیز در ارتباط بوده است و عامل افزایش خطر چاقی است [۱۶]. این در حالی بود که در مطالعهٔ ۴۷۰ نفر، ارتباطی بین پلی‌مورفیسم Gln223Arg ژن LEPR و افزایش فشارخون مشاهده نشد [۱۷].

در مطالعهٔ لینجاوی و همکاران نیز مشخص شد که پلی‌مورفیسم Gln223Arg ژن گیرندهٔ لپتین است که در شیوع چاقی در کودکان و نوجوانان نقش دارد [۱۴]. اگرچه ارتباط پلی‌مورفیسم‌های ژن لپتین با خطر ناباروری مردان مشخص شده است، در پلی‌مورفیسم‌های ژن گیرندهٔ لپتین با ناباروری مردان ارتباطی دیده نشده است [۱۸].

تا کنون مطالعه‌ای در ایران در رابطه با پلی‌مورفیسم ژنتیکی Gln223Arg و ناباروری غیرقابل‌توجیه در زنان منتشر نشده است. علت تفاوت در نتایج مطالعات پلی‌مورفیسم ژنی ممکن است ناشی از اختلافات نژادی، جغرافیایی و ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه باشد. نتایج حاصل از این مطالعه ارتباط معناداری بین پلی‌مورفیسم مورد مطالعه و ناباروری غیرقابل‌توجیه نشان نداد.

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه تمام پلی‌مورفیسم‌های دیگر ژن LEPR در این تحقیق بررسی نشده است، بررسی‌های گسترده‌تری مورد نیاز است. با توجه به اینکه ناباروری زنان وضعیتی چند عاملی است، بررسی نقش عوامل ژنتیکی و محیطی مختلف در ایجاد آن ضروری است. همچنین، لازم است تا در مطالعات مربوط به ناباروری زنان، سایر ژن‌ها و تأثیر متقابل آن‌ها را بر یکدیگر نیز بررسی کرد.

تشکر و قدردانی

از پرسنل بیمارستان دی و بیمارستان امام خمینی در مراحل جمع‌آوری نمونه و آزمایشگاه علوم تحقیقات تهران به‌دلیل در اختیار گذاشتن فضای تحقیقاتی کمال تشکر را داریم. این پروژه در کمیتهٔ اخلاق و پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی پرند با شمارهٔ ۲۹۸۳۰۵۱۷۹۴۲۰۰۱ به ثبت رسیده است.

References

[1]. Kamyabi Z, Gholamalizade T. A comparative study of serum and follicular fluid leptin concentrations among explained infertility, unexplained infertile and fertile women. Int J Fertil Steril. 2015; 9(2): 150-156.
[1]. Akbarian A, Haghighi L. Update on unexplained infertility. RJMS. 1995;2(3):165-72. [in Persian]
[2]. Ajala O, Ogunro P, Elusanmi G, Ogunyemi O, Bolarinde A. Changes in serum during phases of menstrual cycle of fertile women: relationship to age group and fertility. Int J Endocrinol Metab. 2013; 11(1): 27-33.
[3]. Smaism MF. Assessment of leptin levels in the different genotypes and leptin receptor genes in the women with polycystic ovary syndrome and diabetes mellitus type 2 in Iraq population. Int J PharmTech Res. 2016; 9(5): 269-276.
[4]. [5] Cioffi J, Blekom J, Antczak M, Shafer A, Wiimer S, Sandgrass H. Mol Hum Reprod. Molecular Human Reproduction. 1997; 467-472.
[5]. Funahashi H, Yada T, Suzuki R, Shioda S. Distribution, function, and properties of leptin receptors in the brain. Tochigi. 2003; 329-0498.
[6]. Aslaminejad A, Tahmorespour M, Alshokani A. Study of the polemorphism in the exon 20 leptin receptor Iin ative cow beeds of Sistani, Golpayegani, Najdi and Sarabi. Animal Sciences Journal (Pajouhesh & Sazandegi). 2010; 24(91): 44-50. [in Persian]
[7]. Fruhbeck G. Intracellular signaling pathways activated by leptin. Biochem. 2006; 393: 7-20.
[8]. Avila E, Mercado M, Banuelos E, Quezada S, Albarran J, Lopez L, et al. The impact of LEP G-2548A and LEPR GLN223ARG polymorphisms on adiposity, leptin and leptin-receptor serum levels in a Mexican Mestizo population. Biomed Res Int. 2015; 2015: 539408
[9]. Li L, Lee KJ, Choi BC, Baek KH. Relationship between leptin receptor and polycystic ovary syndrome. Gene. 2013; 527: 71-74.
[10]. Demir B, Guven S, Guven ES, Atamer Y, Gunalp GS. Serum leptin level in women with unexplained infertility. J Reprod Immunol. 2007; 75(2): 145-9.
[11]. Kamath M, Bhattacharya S. Demographics of infertility and management of unexplained infertility. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2012; 729-738.
[12]. Margiotta D, Vadacca M, Navarini L, Basta F, Afeltra A. The complex role of leptin in SLE: Is leptin a key link between metabolic syndrome. Accelerated atherosclerosis and autoimmunuty? Lupus Open Access. 2016, 1: 1.
[13]. Linjawi SA, Hussain NA. Impact of leptin receptor gene Gln223Arg polymorphism on obesity in Jeddah city. Life Sci J. 2012; 9(4).
[14]. Suriyaprom K, Tungtrongchitr R, Thawnasom K. Measurement of the levels of leptin, BDNF associated with polymorphisms LEP G2548A, LEPR Gln223Arg and BDNF Val66Met in Thai with metabolic syndrome. Diabetol Metab Syndr. 2014; 6:6.
[15]. Oliveira R, Cerda A, Genvigir FDV, Sampaio MF, Armaganijan D, Bernik MMS, et al. Leptin receptor gene polymorphisms are associated with adiposity and metabolic alterations in Brazilian individuals. Arq Bras Endocrinol Metab. 2013; 3: 57-59.
[16]. Pena GG, Guimarães ALS, Veloso RR, Reis TC, Gomes CS, Neto JFR, et al. Leptin receptor gene Gln223Arg polymorphism is not associated with hypertension: a preliminary population-based cross-sectional study. Cardiol Res Pract. 2014; 879037.
[17]. Hodzic A, Ristanovic M, Zorn B, Tulc C, Maver A, Novakovic I, et al. Genetic variation in leptin and leptin receptor genes as a risk factor for idiopathic male infertility. Andrology, 2017; 5(1): 70-74.

.

GLN223ARG leptin receptor genetic variation in women with unexplained infertility and fertile women

Shamim Ashrafi Mahabadi, FarzanehTafvizi*

Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran

Abstract

Background Unexplained infertility refers to cases in which the standard diagnostic procedures available do not lead to a specific cause for the infertility. Gln223Arg polymorphism was associated with high serum leptin and consequently obesity, polycystic ovarian syndrome and infertility. The aim of this study was to investigate genetic variation of leptin receptor gene in unexplained infertile women.

Materials and Methods This case-control study was performed in 2015-2016. The subjects were 102 women with unexplained infertility and 112 fertile women with normal hormone profile. All participants gave their signature in consent document. After an overnight fasting, 5 CC blood sample was drawn from all subjects in the day 3 of menstruation. Genotyping of Gln223Arg polymorphism was performed using RFLP-PCR technique.

Results No significant association was observed between Gln223Arg polymorphism and unexplained infertility. The studied population was in Hardy-Weinberg equilibrium for Gln223Arg polymorphism. Therefore, there were not disturbing factors of Hardy-Weinberg equilibrium in the population.

Conclusion In present study, LEPR Gln223Arg polymorphism is not a risk factor for women with unexplained infertility. However, more studies on larger populations and the other leptin receptor polymorphism are suggested to understand the role of this polymorphism in women with unexplained infertility.

Received: 2017/04/26
Accepted:2017/11/19

Keywords: Gln223Arg polymorphism, unexplained Infertility.