



جمهورية العراق  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة ميسان - كلية العلوم  
قسم علوم الحياة

دراسة تعدد أشكال النيوكليوتيدات المنفردة في الجينات  $FSH\beta$  و  $FSHR$  و  $CYP17$  وعلاقتها بالعقم عند النساء في محافظة ميسان

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية العلوم / جامعة ميسان

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة

من قبل

رغد جبار عبد الصاحب

بكالوريوس تربية - علوم الحياة (2008)

بإشراف

أ.م.د. صلاح حسن فرج

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

لِلَّهِ مُلْكُ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ يَخْلُقُ مَا يَشَاءُ يَهَبُ لِمَنْ يَشَاءُ إِنَاءً وَيَهَبُ لِمَنْ يَشَاءُ الذُّكُورَ (49) أَوْ يُزَوِّجُهُمْ ذُكْرَانًا وَإِنَاءً وَيَجْعَلُ مَنْ يَشَاءُ عَقِيمًا (50)

صَدَقَ اللَّهُ الْعَلِيُّ الْعَظِيمُ

## الأهداء

الى... من قاد قلوب البشرية وعقولهم الى مرفأ الأمان، معلم البشرية  
الأول محمد صلى الله عليه وآله وسلم.

الى... من شرفني بحمل أسمه والدي رحمه الله.

الى... حلوة اللبن التي ما خالط لبنها يوماً سكر المصالح الى الشامخة  
التي علمتني معنى الإصرار وان لا شيء مستحيل في الحياة الى من  
أفتقد حنينها وحرارة تصفيقها لي فرحاً بأنجازي في هذه اللحظة ولا أفتقد  
دعواتها التي اجني ثمارها كل لحظة الى أمي رحمها الله.

الى... زوجي ماجد حسن الذي كان سندي وخير عون لي في مسيرتي  
ولم يبخل علي بوقت أو جهد للوصول لدرجة علمية عالية.

الى... السند والعضد والساعد أخي عبد الأمير وألى جميع أخوتي  
وأخواتي أذف لكم الأهداء حباً ورفعةً وكرامةً.

الى... بناتي العزيزات حوراء وغدير ونبأ.

الى... كل هؤلاء أهدي هذه الدراسة، راجيةً من الله أن تكون نافذة علم  
وبطاقة معرفة، وأن تنفعنا وينتفع بنا.

رغد جبار عبد الصاحب

## الشكر والتقدير

قال الله تعالى في كتابه الكريم: "ومن يشكر فإنما يشكر لنفسه".

ومن قول الرسول الكريم صلى الله عليه وآله وسلم: "من لم يشكرِ النَّاسَ لم يشكرِ اللَّهَ".

بدايةً لا بدّ لي من أتوجه أولاً بالشكر لله عزّ وجلّ الذي وفقني للوصول الى هذه المرحلة العلمية العالية. ومهد لي الطريق لأن أكون بينكم اليوم لأناقش رسالتي في الماجستير.

وأتقدم بالشكر والعرفان لكل من مد يد العون والمساعدة. وفي مقدمتهم الأستاذ الفاضل المشرف على رسالتي الأستاذ المساعد الدكتور صلاح حسن فرج حيث لم يبخل علي بوقته ولا بجهده لإنجاح هذه الرسالة ونيلي هذه الدرجة. كما أتقدم بالشكر والتقدير الى عمادة كلية العلوم جامعة ميسان وجميع كادر قسم علوم الحياة في كلية العلوم وبالأخص الأستاذ المساعد الدكتور ميثم عبد الكاظم دراغ رئيس قسم علوم الحياة وعضو لجنة المناقشة وأتقدم بالشكر الى لجنة المناقشة المحترمة متمثلة برئيسها الأستاذ الدكتور حسن ريسان مبارك والأستاذ المساعد الدكتور هشام فياض محمد لما قدموه لي من ملاحظات قيمه. وأتقدم بالشكر للدكتورة النسائية علا حسين لما قدمته لي من مساعدة في جمع العينات. ولجميع زميلاتي وأهلي وبالأخص زوجي ماجد. كما أتقدم بجزيل الشكر والعرفان لكل من ساهم وساعد على إنجاز وإتمام هذه الدراسة.



## الخلاصة

أُجريت هذه الدراسة في مختبر الوراثة الجزيئية والهندسة الوراثية، قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة ميسان للفترة من 2021/10/20 الى 2022 /3/25 وهدفت الدراسة الى تحديد التباين الوراثي للنساء المصابات بالعقم في محافظة ميسان. جمعت عينات الدم من العيادات الخاصة بعدد 90 امرأة (60 امرأة مصابة بالعقم و30 سليمة). أخذت معايير بعض العلامات السريرية للعينات، إذ تم قياس مؤشر كتلة الجسم (BMI) والعمر والأضطراب الهرموني والأسقاطات والتاريخ العائلي. أجري التفاعل السلسلي للبوليميريز PCR لجينات *FSHR* و *FSHβ* و *CYP17* وبعد التأكد من تضخيم منتج PCR بالترحيل الكهربائي أرسلت العينات إلى شركة Macrogen الكورية لتحليل تسلسل DNA. استخدمت بعض برامج المعلوماتية الحيوية لغرض أصطاف Alignment التسلسلات للنساء المصابات بالعقم ومجموعة المقارنة ومحاذاتها مع التسلسلات التتابعية القياسية المنشورة في المركز الوطني لمعلومات التقانات الأحيائية NCBI بإستخدام برنامج (BioEdit) وكشف التشكل الوراثي وتنوع النيوكليوتيدات بإستخدام برنامج (Geneious 2020.0.4) وكذلك الكشف عن التغيرات على مستوى الاحماض الامينية ورسم البروتين ثلاثي الابعاد (Three dimensional structural) بإستخدام برنامج (Phyre2 V.2.0). وتلخصت النتائج بما يلي:

1- تبين وجود طفرتين هما طفرة الأنتقالات (transitions mutation) وطفرة الحذف (deletion mutation) في المنطقة المدروسة في الأكسون العاشر من جين *FSHR* وكانت هذه المنطقة غنية بمحتواها من القواعد النيتروجينية السايتوسين C والثايمين T وأثرت إحدى هاتين الطفرتين (طفرة الأنتقالات) في تغيير إنتاج الأحماض الأمينية حيث تغير الحامض الأميني الأسبارجين الى الحامض الأميني السيرين، وبالتالي أدت الى أختلاف نسب القواعد النيتروجينية في تتابعات جين *FSHR* لدى مجموعة المقارنة والنساء المصابات بالعقم وذلك من خلال تقانة تسلسل الاحماض النووية

(DNA Sequencing). كما وتبين وجود ثلاثة تراكيب وراثية (AA و AG و GG) في الموقع المدروس A>G 2039 من جين مستقبل الهرمون المحفز لنمو الحويصلات (FSHR) والمسجلة في NCBI بالرقم (Accession Number: KR711781) ولم تكن هناك أي فروق معنوية لهذه التراكيب وبلغت نسب توزيع هذه التراكيب (25.0 % و 62.5 % و 12.5 %) على التوالي للنساء العقيمات ويتكرر أليلي بلغ للأليل A (56.3) و (62.5) في النساء العقيمات والمقارنة أما تكرار الأليل الطافر G فكانت نسبته أقل أذ بلغ (37.5) في عينات المقارنة و(43.7) في النساء العقيمات .

2- تم الكشف عن تغير في تركيب البروتين ثلاثي الأبعاد لجين *FSHR* والنتائج عن تغير في الأحماض الأمينية التي تم الحصول عليها من عينات العقم المدروسة.

3- أظهرت النتائج وجود طفرة تحولات transversions واحدة في المنطقة المدروسة لجين *FSHβ* التي كانت غنية بمحتواها من القواعد النيتروجينية الأدينين A والكوانين G وكان موقع الأستبدال في منطقة المحفز أذ أستبدلت القواعد النيتروجينية في الموقع 211-، حيث حدث أستبدال القاعدة النيتروجينية الكوانين G بالقاعدة النيتروجينية الثايمين T وتبين وجود ثلاثة تراكيب وراثية (GG و GT و TT) في الموقع المدروس G>T 211- من جين بيتا الهرمون المحفز لنمو الحويصلات *FSHβ* والمسجلة في NCBI بالرقم (Accession Number: AH003599)، كانت الفروق ذات دلالة غير احصائية وبلغت نسبة توزيع هذه التراكيب (87.5 % و 6.25 % و 6.25 %) على التوالي للنساء العقيمات بالنسبة الى تكرار الأليل G في مجموعة المقارنة وعينة النساء العقيمات كان 90.6% و 87.5% على التوالي أما تكرار الأليل T فكانت نسبته 12.5% في عينة النساء العقيمات و 9.4% في مجموعة المقارنة .

4- تبين أن عدد طفرات التحولات الكلية طفرة واحدة في جين *CYP17* والذي كان غني بمحتواه من القواعد النيتروجينية السايوسين C وتم أستبدال القواعد النيتروجينية في الموقع 34- من منطقة

المحفز، إذ حدث استبدال القاعدة النيتروجينية الثايمين T بالقاعدة النيتروجينية السايروسين C، بنوعيه كما وتبين وجود ثلاثة تراكيب وراثية (TT و TC و CC) في الموقع المدروس  $34T>C$  - من جين *CYP17* والمسجلة في NCBI بالرقم (Accession Number: EU322845)، ولم تكن هناك أي فروق معنوية لهذه التراكيب وبلغت نسب توزيع هذه التراكيب (50.0 % و 37.5 % و 12.5 %) على التوالي للنساء العقيمت، وكان تكرار الأليل T في عينات النساء العقيمت وعينات المقارنة (68.7) و(1.0) على التوالي. أما تكرار الأليل C فكانت نسبته (31.3) في النساء العقيمت وعدم وجود أي تكرار في عينات المقارنة التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة.

5- تبين وجود علاقة بين التراكيب الوراثية للجينات المدروسة ومؤشر كتلة الجسم والعمر فكان هناك فرقاً معنوي بالنسبة لجين *FSHR* بالنسبة للنساء العقيمت. وبينت نتائج التراكيب الوراثية لجين *FSHβ* مع مؤشر كتلة الجسم وجود فرقاً معنوي ولم تلاحظ أي فروق معنوية للجين نفسه مع العمر، أما نتائج التراكيب الوراثية لجين *CYP17* مع مؤشر كتلة الجسم والعمر فلم تكن هناك فروق معنوية تذكر.

## قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع
أ- ج	الخلاصة
3-1	الفصل الاول : المقدمة
3-1	1.1: المقدمة
45-4	الفصل الثاني : مراجعة المصادر
4	1-2: العقم Infertility
5	2-2: أنواع العقم Types of infertility
6	3-2: اسباب عقم النساء Causes of female Infertility
9	4-2: الأسس الوراثية لبعض حالات العقم في النساء
11	5-2: التباين والتنوع الوراثي Genetic variation and diversity
12	6-2: تعدد الأشكال النيوكليوتيدات المنفردة
13	7-2: التقانات الحياتية Biotechnology
15	8-2: تقنية تسلسل الاحماض النووي DNA Sequencing
16	9-2: المعلوماتية الحيوية Bioinformatics
19	10-2: المرفقات الجزيئية Molecular Chaperone
20	11-2: طي البروتين Protein Folding
21	12-2: أنواع المعلومات وقواعد البيانات Types of information and databases
22	13-2: جين مستقبل الهرمون المحفز للحويصلات (FSHR gene)
25	14-2: التشكل الوراثي لجين FSHR
27	15-2: جين الهرمون المحفز للحويصلات نوع بيتا FSH $\beta$
29	16-2: التشكل الوراثي في جين FSH $\beta$

31	17-2: جين الساييتوكروم (CYP17)
32	18-2: دور إنزيم الأروماتيز في تصنيع الاندروجين
34	19-2: التشكل الوراثي في جين CYP17
51-36	الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل
36	3 - 1 : الأجهزة والأدوات و المواد المستعملة
38	3 - 2: عينات الدراسة
39	3-3: طريقة جمع عينات الدم
39	3-4: حساب مؤشر كتلة الجسم (BMI)
39	3-5: الدراسة الوراثية
40	3-6: القياسات والمحاليل المختبرية
40	3-6-1: محلول Phosphate Buffered Saline (PBS)
40	3-6-2: محلول دارى Tris-Borate-EDTA buffer (TBE)
41	3-6-3: إنزيم Proteinase K
41	3-6-4: هلام الأكاروز Agarose gel
41	3-6-5: المعلم الجزيئي الحجمي للدنا DNA molecular size markers
41	3-6-6: البوادئ Primers
42	3-7: عملية استخلاص الحامض النووي DNA من الدم
45	3-7-1: التحري عن وجود الحامض النووي المستخلص Extracted DNA
45	3-7-2: المواد المستخدمة في الترحيل الكهربائي
46	3-7-3: خطوات عملية الترحيل الكهربائي
47	3-8: التفاعل السلسلي للبوليمريز (PCR)
49	3-8-1: الكشف عن منتج تضخيم القطع الجينية DNA product detection

50	9-3: تحديد التسلسل المتتابعي للدنا DNA Sequencing
50	1-9-3: التنوع الوراثي Genetic diversity
50	2-9-3: التراكيب الوراثية Genotypes
51	10-3: رسم البروتين ثلاثي الابعاد
51	11-3: التحليل الإحصائي
94-52	الفصل الرابع : النتائج والمناقشة
52	1-4: العلامات السريرية للنساء المصابات بالعمق
52	1-1-4: مؤشر كتلة الجسم (BMI) Body Mass Index
53	2-1-4: التاريخ العائلي للعمق Family History of infertility
53	3-1-4: الاضطرابات الهرمونية Hormonal disorders
54	4-1-4: الاجهاض Abortion
55	2-4: التوصيف الوراثي Genetic characterization
55	1-2-4: استخلاص وتضخيم DNA
57	2-2-4: التنوع الوراثي Genetic diversity
58	1-2-2-4: مقياس التنوع الوراثي لجين <i>FSHR</i>
59	2-2-2-4: مقياس التنوع الوراثي لجين <i>FSHβ</i>
60	3-2-2-4: مقياس التنوع الوراثي لجين <i>CYP17</i>
61	3-4: محاذاة التسلسل المتعدد Multiple Sequence Alignment
61	1-3-4: جين <i>FSHR</i>
64	2-3-4: جين <i>FSHβ</i>
65	3-3-4: جين <i>CYP17</i>
68	4-4: الاحماض الأمينية لبروتين <i>FSHR</i>
72	5-4: التركيب ثلاثي الابعاد لبروتين <i>FSHR</i>

76	6-4: التراكيب الوراثية
76	1-6-4: توزيع التراكيب الوراثية لجين <i>FSHR</i> (2039 A>G) في عينات المرضى والسيطرة
81	2-6-4: توزيع التراكيب الوراثية لجين <i>FSHβ</i> (-211 G>T) في عينات المرضى والسيطرة
86	3-6-4: توزيع التراكيب الوراثية لجين <i>CYP17</i> (-34 T>C) في عينات المرضى والسيطرة
92	7-4: العلاقة بين التراكيب الوراثية للجينات المدروسة ومؤشر كتلة الجسم والعمر
92	1-7-4: جين <i>FSHR</i>
93	2-7-4: جين <i>FSHβ</i>
94	3-7-4: جين <i>CYP17</i>
96-95	الفصل الخامس : الاستنتاجات والتوصيات
95	1-5: الاستنتاجات
96	2-5: التوصيات
119-97	الفصل السادس : المصادر
122-120	الملاحق
A-C	الخلاصة الانكليزية

## قائمة الجداول

الرقم	العنوان	الصفحة
1	الأجهزة المخبرية والادوات المستخدمة في استخلاص ومضاعفة الـDNA	36
2	المواد الكيميائية المستخدمة في استخلاص المادة الوراثية ومضاعفة القطع الجينية	37
3	تتابع البادئات المستعملة في الدراسة	42
4	مكونات عدة استخلاص الدنا	45
5	كميات المواد المستعملة في تقنية PCR-DNA	47
6	البرنامج الخاص ببادئات تقنية PCR-DNA لجين <i>FSHR</i>	48
7	البرنامج الخاص ببادئات تقنية PCR-DNA لجين <i>FSHB</i>	48
8	البرنامج الخاص ببادئات تقنية PCR-DNA لجين <i>CYP17</i>	49
9	مقارنة مؤشر كتلة الجسم في النساء العقيمت والمقارنة	52
10	بعض العلامات السريرية ونسبها المؤية في النساء المصابات بالعم	53
11	بعض المقاييس الوراثية لجين <i>FSHR</i> في النساء العقيمت والمقارنة	58
12	بعض المقاييس الوراثية لجين <i>FSHβ</i> في النساء العقيمت والمقارنة	59
13	بعض المقاييس الوراثية لجين <i>CYP17</i> في النساء العقيمت والمقارنة	60
14	تكرار التراكيب الوراثية والأليلات لجين <i>FSHR</i> في النساء العقيمت والمقارنة	77
15	توزيع التراكيب الوراثية لجين <i>FSHR</i> في النساء العقيمت والمقارنة.	79
16	التراكيب الوراثية لجين <i>FSHR</i> واعدادها المشاهدة والمتوقعة وقيمة اتران هاردي- واينبيرغ في النساء العقيمت والمقارنة	80
17	تكرار التراكيب الوراثية والأليلات لجين <i>FSHβ</i> في النساء العقيمت والمقارنة.	82
18	توزيع التراكيب الوراثية لجين <i>FSHβ</i> في النساء العقيمت والسليمات(المقارنة).	84
19	التراكيب الوراثية لجين <i>FSHβ</i> وأعدادها المشاهدة والمتوقعة وقيمة اتران هاردي- واينبيرغ في النساء العقيمت والمقارنة	85
20	تكرار التراكيب الوراثية والأليلات لجين <i>CYP17</i> في النساء العقيمت والمقارنة.	87
21	توزيع التراكيب الوراثية لجين <i>CYP17</i> في النساء العقيمت والسليمات(المقارنة)	89



90	التركيب الوراثية والاليات لجين <i>CYP17</i> وأعدادها المشاهدة والمتوقعة وقيمة اتزان هاردي-واينبرغ في النساء العقيمات والمقارنة	22
92	علاقة مؤشر كتلة الجسم (BMI) والعمر مع التركيبي الوراثية لجين <i>FSHR</i>	23
93	علاقة مؤشر كتلة الجسم (BMI) والعمر مع التركيبي الوراثية لجين <i>FSHβ</i>	24
93	علاقة مؤشر كتلة الجسم (BMI) والعمر مع التركيبي الوراثية لجين <i>CYP17</i>	25

## قائمة الاشكال

الرقم	العنوان	الصفحة
1	تركيب DNA مع الأزواج القاعدية	10
2	تصنيفات التقنيات الحيوية	14
3	تطبيقات المعلوماتية الحيوية في مختلف التخصصات	17
4	خطوات عمل برنامج البلاست	18
5	تركيب جين <i>FSHR</i>	23
6	أشكال مستقبل الهرمون المحفز للحويصلات <i>FSHR</i>	24
7	توزيع الطفرات الوراثية في جين <i>FSHR</i>	27
8	تركيب جين <i>FSHβ</i> والمحفز (promotor)	29
9	تركيب جين <i>CYP17</i>	32
10	مخطط لعملية تصنيع الاندروجين في الانسان ويظهر فيه دور أنزيم الأروماتيز	34
11	منتج التضخيم لجين <i>FSHR</i> على هلام الأكاروز 2%.	56
12	منتج التضخيم لجين <i>FSHβ</i> على هلام الأكاروز 2%.	56

57	منتج التضخيم لجين <i>CYP17</i> على هلام الأكاروز 2%.	13
63	مقارنة تتابعات القواعد النيتروجينية لجين <i>FSHR</i> في النساء العقيمات والمقارنة ورقم الانضمام (KR711781.1)	14
65	مقارنة تتابعات القواعد النيتروجينية لجين <i>FSHβ</i> في النساء العقيمات والمقارنة ورقم الانضمام (AH003599.2).	15
67	مقارنة تتابعات القواعد النيتروجينية لجين <i>CYP17</i> في النساء العقيمات والمقارنة ورقم الانضمام (EU332845.1).	16
69	مقارنة تتابعات الأحماض الأمينية لبروتين <i>FSHR</i> بين تتابعات الأحماض الأمينية في النساء العقيمات ورقم الانضمام (KR711781.1)	17
70 71	التركيب الثانوي لبروتين <i>FSHR</i> ونسبة حلزون ألفا وصفائح بيتا للنساء العقيمات ورقم الأنضمام (KR711781.1)	18
73	الأشكال الثلاثية لبروتين <i>FSHR</i>	19
75-74	موقع حلزون الفا (A) في النساء العقيمات (B) في رقم الأنضمام (KR711781.1)	20
76	التراكيب الوراثية في الموقع A2039G لجين <i>FSHR</i>	21
79	نسبة توزيع الأليلين A و G للجين <i>FSHR</i> في عينة النساء العقيمات والمقارنة	22
82	التراكيب الوراثية في الموقع G>T-211 لجين <i>FSHβ</i>	23
85	نسبة توزيع الأليلين T و G لجين <i>FSHβ</i> في عينة النساء العقيمات والمقارنة	24
87	التراكيب الوراثية في الموقع C>T-34 لجين <i>CYP17</i>	25
90	نسبة توزيع الأليلين T و C للجين <i>CYP17</i> في عينة النساء العقيمات والمقارنة	26

## قائمة المصطلحات

المختصر	المصطلح
A	Adenine
Ala	Alanine
Asn	Asparagine
ATP	Adenosine triphosphate
Bp	base pair
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMI	Body Mass Index
C	Cytosine
C-terminal	Carboxyl terminal end of protein
CYP17	cytochrome P450 family 17
Camp	Cyclic adenosine monophosphate
DDBJ	The DNA Data Bank of Japan
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNTPs	Dideoxynucleotide phosphate
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
et al.	et alli (and others)
FSH	Follicle-stimulating hormone
FSHR	Follicle-stimulating hormone receptor
FSH $\beta$	Follicle-stimulating hormone beta
G	Guanine
HCG	Human chorionic gonadotropin
HPC	High-performance computing
HPOA	Hypothalamus- pituitary- ovarian Axis
H.W.E	Hardy Weinberg Equilibrium

INSDC	International Nucleotide Sequence Database Collaboration
IVF	In vitro fertilization
LH	Luteinizing Hormone
Kb	Kilobase
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
MSA	Multiple Sequence Alignment
NH	Number of polymorphic
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate cytochrome reductase
NHRS	Nuclear hormone receptors
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next-generation sequencing
N-terminal	Amino-terminal end of protein
OR	Odds ratio
QTL	Quantitative trait loci
PDB	Protein Data Bank
PIR	Protein Information Resource
P	Probare (P-value)
Phyre2	Protein Homology analogy Recognition engine V.2.0
PDB	Protein Data Bank
PCR	Polymerase chain reaction
PCOS	Polycystic Ovary Syndrome
PRL	Prolactin
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	restriction fragment length polymorphism
SCOP	Structural Classification of Proteins database

Ser	Serine
SNPs	Single nucleotide polymorphisms
SSCP	single strand conformation polymorphism
SSRs	Simple Sequence Repeats
STD	Sexually Transmitted Diseases
T	Thymine
TBE	Tris Borate EDTA
Thr	Threonine
TSH	Thyroid stimulating hormone
UV	Ultra violet radiation
UTR	un-translated region
3D	Three Dimension
$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta
$^{\circ}\text{C}$	degree Celsius
%	Percent

## أولاً - المقدمة

## Introduction

يعاني حوالي 72.4 مليون من الأزواج حالة العقم Infertility في جميع أنحاء العالم وقد تم أنجاب ثلاثة ملايين طفل من خلال العلاج الإنجابي المساعد (Sindiani *et al.*, 2021). العقم هو عدم القدرة على الحمل بعد 12 شهراً أو أكثر من الجماع المنتظم ويؤثر العقم على 15% من الأزواج حول العالم حسب تقدير منظمة الصحة العالمية WHO (Rai *et al.*, 2019). كذلك تعد بعض النساء عقيمات كاللواتي يستطعن الحمل ولكن تعاني من كثرة الأسقاطات والذي يحدث غالباً للنساء بأعمار 35 سنة فما فوق (Sathiyarayanan *et al.*, 2014). وهناك نوعان من العقم: العقم الأولي Primary Infertility وهو العقم الذي يصيب المرأة منذ بدأ حياتها الزوجية بمعنى عدم حدوث أي حمل للمرأة بصورة مطلقة، أما النوع الآخر فهو العقم الثانوي Secondary Infertility وهو العقم الذي يصيب المرأة بعد إنجاب طفل واحد أو أكثر (Olooto *et al.*, 2012).

وهناك العقم غير المفسر Unexplained infertility الذي يعد أكثر غموضاً من أي نوع آخر للعقم وهو المصطلح الذي يطلق على الأزواج الذين لا يمتلكون القدرة على الأنجاب بعد إتمام كافة فحوصات العقم والتأكد من سلامتها (Hatasaka, 2011). وتم وصف العقم على أنه اضطرابات في توازن هرمونات الغدد الصماء والمناعة وبعض الجينات ذات العلاقة بالعقم لدى النساء (Ray *et al.*, 2012). وربما تكمن أسباب العقم للاضطرابات الفسلجية الهرمونية أو أسباب وراثية أو مناعية (Edward, 2008).

أصبحت الاستشارة الوراثية أداة مهمة لنظام الرعاية الصحية التي توفر المعلومات والدعم للأسر المعرضة لخطر الإصابة باضطراب وراثي (Silva, 2019). يعتقد أن الأسباب الجينية تكمن وراء حوالي نصف حالات العقم ومن أجل فهم الأسس الوراثية لتلك الحالات استخدمت أدوات الوراثة الجزيئية الحديثة على استكشاف أكثر تعقيداً للأسباب الجينية للعقم من خلال الدراسات السكانية والعائلية والفردية (Ding and Schimenti, 2021). يعد العامل الوراثي من العوامل المهمة الذي يسبب حدوث حالة العقم أو حدوث الأسقاطات المتكررة وبالنتيجة حدوث العقم ولكن المعلومات المتوفرة عن الجينات ذات العلاقة بالعقم قليلة، إذ يؤدي التغير الذي يحصل على مستوى الجين الى خلل أو نقص في مستويات الهرمونات ذات العلاقة بالخصوبة مما يؤدي الى العقم Layman, (2002). يمكن أن يؤثر تعدد الأشكال الوراثي أو الاختلاف في الحامض النووي على القابلية للإصابة بالأمراض والأستجابة للعقار (Sukhumsirichart, 2018).

وبالتالي فإن تعدد الاشكال الوراثية للجينات المشاركة في محور تحت المهاد- النخامية- المبييض (HPOA) Hypothalamus- pituitary- ovarian Axis يعتبر من أهداف الدراسات الوراثية الجزيئية في الوقت الحاضر كونها تلعب دوراً رئيساً في التسبب في بعض أشكال العقم لدى النساء ومن بين تلك الجينات الجين المشفر للهرمون المحفز لنمو الحويصلات Follicle-stimulating hormone (FSH) والذي يرمز له بالرمز  $FSH\beta$  gene وهو الجين المسؤول عن إنتاج سلسلة بيتا  $\beta$ -chain (Trevisan et al., 2019) ، وهذا الجين من أهم الجينات ذات العلاقة بالخصوبة لدى النساء (Bianco et al., 2021) . وجين  $FSHR$  وهو الجين المسؤول عن تشفير مستقبلات الهرمون المحفز لنمو الحويصلات (Laven, 2019). وكذلك يعد جين  $CYP17$  من الجينات ذات العلاقة بالعقم من خلال ارتباطه بمتلازمة المبيض المتعدد الكيسات (PCOS) التي

تصيب 4-20% من النساء في سن الإنجاب. تبلغ مساهمة العوامل الوراثية في مسببات متلازمة تكيس المبايض 79%، ومساهمة البيئة ونمط الحياة والتاريخ الفردي تبلغ 21%. يُعتقد أن زيادة إنتاج الأندروجين في متلازمة تكيس المبايض هي نتيجة لخلل في تنظيم الجينات المختلفة المشاركة في تخليق هرمونات الستيرويد مثل *CYP11* و *CYP17* و *CYP19* (Ali et al., 2022). أن التطورات التي شهدتها علم الجينوم هي على مستوى عالي عبر وضع التسلسلات الخاصة بالحامض النووي DNA وتقنيات التعبير الجيني والتطور الحاصل في المعلوماتية الحيوية ساهمت جميعاً في تحسين ودعم الاجراء الخاص في عملية رسم الخرائط الجينية التي لها دور رئيسي وفعال في البحوث ذات العلاقة بالجينات وكذلك البروتين الناشئ (Hood and Rowen, 2013). نظراً لدور جينات *FSHR* و *CYP17* و *FSHβ* وتأثيرها على بعض حالات العقم لدى النساء التي تعد في وقتنا الحاضر من الحالات الشائعة عند النساء المتزوجات ولأسباب مجهولة ومن أجل الوقوف على الأسباب المؤدية للعقم تهدف هذه الدراسة الى:

1. الكشف عن تعدد الاشكال الوراثية للجينات ذات العلاقة بالعقم *FSHR* و *FSHβ* و *CYP17* باستعمال تقانة تتابع القواعد النيتروجينية (DNA Sequencing) وبعض برامج المعلوماتية الحيوية (Bioinformatics) في النساء العقيمت ومجموعة المقارنة في محافظة ميسان ومقارنتها بما هو موجود عالمياً.
2. الكشف عن التغيرات على مستوى الاحماض الامينية ودراسة التركيب الثانوي للبروتين ورسم البروتين ثلاثي الابعاد (3D).
3. دراسة العلاقة بين التركيب الوراثية للجينات المدروسة وبعض العلامات السريرية كمؤشر كتلة الجسم (BMI) والعمر.



**Review of Literature****ثانياً - مراجعة المصادر****1-2: العقم Infertility**

العقم هو حالة طبية يمكن أن تسبب أضراراً نفسية وجسدية للمريض، أذ يعد مشكلة صحية عالمية ويعتبر من المشاكل الرئيسية في الكثير من بلدان العالم بما في ذلك بلدان الشرق الأوسط التي بدأت في الأزدیاد في الآونة الاخيرة، حيث شهد العالم ارتفاعاً في معدلات العقم ولاسيما العقم عن النساء (Mascarenhas *et al.*, 2012). ولفهم العقم يجب على المرء أن يدرك الخصوبة الطبيعية وأحتمال حدوث الحمل في دورة شهرية واحدة (Walker and Tobler, 2022).

يعتبر العقم حاجزاً عالمياً يؤثر على الناس في جميع أنحاء العالم وقد تختلف أسبابه وأهميته حسب الموقع الجغرافي والظروف الاجتماعية والاقتصادية، حيث أن الوعي بالعقم هو الخطوة الأولى في الحفاظ على قوة الحمل في تعديل نمط الحياة (Deyhoul *et al.*, 2017). العقم هو حالة عند الزوجين اللذين يعانون عدم الحمل بما يزيد عن 12 شهراً من الجماع المنتظم وبشرط أن يكون لدى الشريك الذكر المعايير الطبيعية للحيوانات المنوية ولا توجد لدى المرأة أي من مسببات العقم المعروفة (Garolla *et al.*, 2021). يظهر أحتياطي المبيض عند النساء المتقدمات بالعمر انخفاضاً أكبر في مرضى العقم مقارنة بالنساء الخصبات (Garolla *et al.*, 2021 ; Iliodromiti *et al.*, 2016). ويعد العقم مرضاً معقداً متعدد العوامل ومتعدد الجينات مرتبطاً بعوامل وراثية تلعب دوراً أساسياً في تكوين وتطور الجريب ونضج البويضات وتنظيم تكوين الستيرويد في المبيض (Rai *et al.*, 2019). ولإيجاد الحلول لحالات العقم تنتشر التقنيات المساعدة على الإنجاب عالمياً، وتشكل العلاج المفضل

لأضطرابات الخصوبة المعقدة حيث أنها تشير إلى جميع التدخلات بما في ذلك المعالجة في المختبر للبيضات والحيوانات المنوية والأجنة لغرض التكاثر (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017).

## 2-2: أنواع العقم Types of infertility

1. **العقم الأولي Primary infertility**: وهو عدم قدرة الزوجين على إحداث الحمل وهنا لم يسبق للحمل أن حدث بتاتاً، ويعني ان المرأة تصاب به منذ بدأ حياتها الزوجية، أي انها لا تحمل مطلقاً (Olooto *et al.*, 2012). كذلك عرّف العقم الأولي بأنه الزوجين الذين لم يتم تشخيص الحمل لديهما سريرياً (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017).

2. **العقم الثانوي Secondary infertility**: وهو فقدان القدرة على أحداث الحمل على الرغم من حدوث حمل واحد على الأقل في فترة سابقة (Larsen, 2005). ويمكن تعريف العقم الثانوي بأنه عدم القدرة على الإنجاب عند الزوجين اللذين كان لهما على الأقل حملاً واحداً ناجحاً في الماضي (Benksim *et al.*, 2018). كما عرّف العقم الثانوي على أنه المرأة الغير القادرة على إثبات الحمل السريري والتي تم تشخيصها بحمل سابق (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017).

يعد العقم الغير المفسر Unexplained infertility أكثر غموضاً ويقصد به عدم القدرة على حدوث الحمل على الرغم من استمرار العلاقة الزوجية المنتظمة ودون العثور على سبب واضح ومحدد للعقم (Isaksson, 2002). يمكن أن يتحول عدم الإنجاب لفترة طويلة إلى حالة لا إرادية من العقم لأن الخصوبة تتناقص مع تقدم العمر وخاصة المرأة (Luciano *et al.*, 2013).

**3-2: أسباب عقم النساء Causes of female infertility**

تتعدد أسباب العقم مثل العوامل الهرمونية والتشريحية والبيئية والوراثية وعوامل أخرى كذلك تتنوع مسببات انتشار العقم وأنماط أسبابه في مناطق مختلفة من العالم (Singh, 2020). كما ويمكن تقسيم أسباب العقم إلى تشوهات خلوية وعيوب جينية (Rai et al., 2019). تؤدي جميع الحالات مثل اضطرابات التبويض وأنتباذ بطانة الرحم وتشوهات الكروموسومات وأمراض قناة فالوب والعقم غير المبرر والعوامل المرتبطة بالحيوانات المنوية إلى العقم (Kalima-Munalula et al., 2017). ومن أسباب العقم ما يلي:

**1. العوامل الهرمونية:** السبب الأكثر شيوعاً لعقم النساء هو اضطرابات الإباضة وتليها متلازمة تكيس المبايض PCOS (Moridi et al., 2019). أشار (Jurczewska et al., 2022) بأن سبب العقم عند النساء هو اضطرابات التبويض وقد ترتبط في الغالب بمتلازمة تكيس المبايض المتعدد والتي يُنظر إليها حالياً على أنها واحدة من أكثر اضطرابات الغدد الصماء شيوعاً لدى النساء في سن الإنجاب. فقد بينت دراسة أجريت في أربيل أن عامل الاضطراب الهرموني هو المسبب الأكبر للإصابة بالعقم بنوعيه الأولي والثانوي لدى النساء (Taha and Rashid, 2013). وفي دراسة أخرى لانتشار عقم النساء في إيران أوضحت أن اضطراب التبويض هو السبب الرئيس للعقم الأولي ومن الضروري معرفة أسباب العقم عند النساء لمساعدتهن على اتخاذ قرارات واضحة بشأن توقيت حدوث الحمل (Kazemijalish et al., 2015). ومن بين العوامل الهرمونية أيضاً اضطرابات الدورة الشهرية وأمراض معينة (كالمسمنة وأمراض الغدة الدرقية والسكري) (Singh, 2020). حيث تلعب العوامل المرتبطة بالنظام الغذائي دوراً مهماً في تنظيم التبويض ويشمل النظام الغذائي ذو التأثير السلبي في الغالب على الكربوهيدرات ذات نسبة السكر المرتفع وكميات كبيرة من البروتين الحيواني

والأحماض الدهنية المشبعة والأحماض الدهنية غير المشبعة (Jurczewska *et al.*, 2022). كما توصلت العديد من الدراسات المتعلقة بتناول العناصر الغذائية وتأثيراتها على خصوبة الإناث الى وجود ارتباطاً واضح بين العقم ومؤشر كتلة الجسم (Body Mass Index-BMI) (Fontana and Della Torre, 2016). فالسمنة أو BMI هي تراكم غير طبيعي أو مفرط للدهون قد يضر بالصحة الإنجابية حيث تسبب للنساء زيادة التمثيل الغذائي للدهون وتغير الهرمونات التناسلية وهذا يشمل الرجال أيضاً الذين يعانون من زيادة الوزن والسمنة (Mena *et al.*, 2020). وأشار كل من Segal and Giudice, (2019) الى الدور المؤثر للسمنة في بعض حالات العقم.

**2. العوامل البيئية:** يعتبر العقم مشكلة تتطلب رعاية صحية رئيسية للمجتمعات المختلفة وقد ضاعف الانتشار الواسع لهذه القضية من أهميتها، ترتبط نسبة كبيرة من العقم بالظروف البيئية وكذلك عوامل الخطر المكتسبة (Masoumi *et al.*, 2015). إذ تؤثر العديد من العوامل البيئية والعوامل المكتسبة أيضاً على الخصوبة وقد تؤدي إلى العقم وهذا يتمثل باختلافات في الظروف البيئية المرتبطة بالسلوك الإنجابي، مثل العمر عند الزواج والتلوث البيئي والتدخين وتعاطي الكحول والتغيير في نمط الحياة والنظام الغذائي والإجهاد والنشاط البدني (Jurczewska *et al.*, 2022). وقد يكون التعرض للملوثات والسموم البيئية ساماً بشكل مباشر للأشجار (البويضات والحيوانات المنوية) مما يؤدي إلى انخفاض أعدادها وضعف جودتها، وبالتالي يؤدي إلى العقم (Segal and Giudice, 2019).

**3. العوامل التشريحية:** تشمل هذه العوامل كل ما يتعلق بالرحم من جدار الرحم، قناتي فالوب وعنق الرحم حيث لها أعلى نسبة أنتشار في بعض حالات العقم (Singh, 2020). أن لبطانة الرحم المهاجرة وأورام بطانة الرحم المبيضية ضعف واضح في الخصوبة (Šalamun *et al.*, 2018). وقد يكون العقم بسبب التهابات الأعضاء التناسلية لدى كلا الجنسين (Benksim *et al.*, 2018).

كذلك يعد التهاب بطانة الرحم من الأمراض المرتبطة بالعقم الذي يصيب 5-10% من النساء في سن الإنجاب (Laganà et al., 2019).

**4. العوامل الوراثية:** يعد العامل الوراثي من العوامل المهمة التي تسبب حدوث حالة منع الحمل او حدوث الأسقاطات المتكررة وبالنتيجة حدوث العقم أذ يؤدي التغير الذي يحصل على مستوى الجين الى خلل او نقص في مستويات الهرمونات ذات العلاقة بالخصوبة مما يؤدي الى العقم ( Layman, 2002). فقد أشار Edward, (2008) الى أن بعض مسببات العقم تعود لأسباب وراثية او مناعية. حيث يسمح التاريخ العائلي للأزواج بالتعرف على المخاطر الجينية قبل الحمل بالنسبة لبعض الأزواج حيث يوفر معلومات حول أسباب العقم وهنا قد يختار الأزواج المعرضون لخطر نقل الأمراض الوراثية الاستفادة الكاملة من التكنولوجيا مثل التشخيص الوراثي (Vance and Zouves, 2005). وتلعب الوراثة دوراً هاماً في حالات العقم مجهولة السبب (Mustafa et al., 2019). ومن الجينات ذات العلاقة بالعقم لدى النساء الجين المسؤول عن تشفير مستقبلات الهرمون المحفز لنمو الحويصلات (FSHR) (Laven, 2019) والجين المشفر للهرمون المحفز لنمو الحويصلات (FSHB) ويعد من أهم الجينات ذات العلاقة بالخصوبة (Bianco et al., 2021). وأفادت دراسات ارتباط جين *CYP17* بمتلازمة تكيس المبايض المؤدية الى العقم فيكون إنزيم *CYP17* مسؤول عن زيادة إنتاج هرمون الاندروجين مسبباً العقم (Munawar Lone et al., 2021).

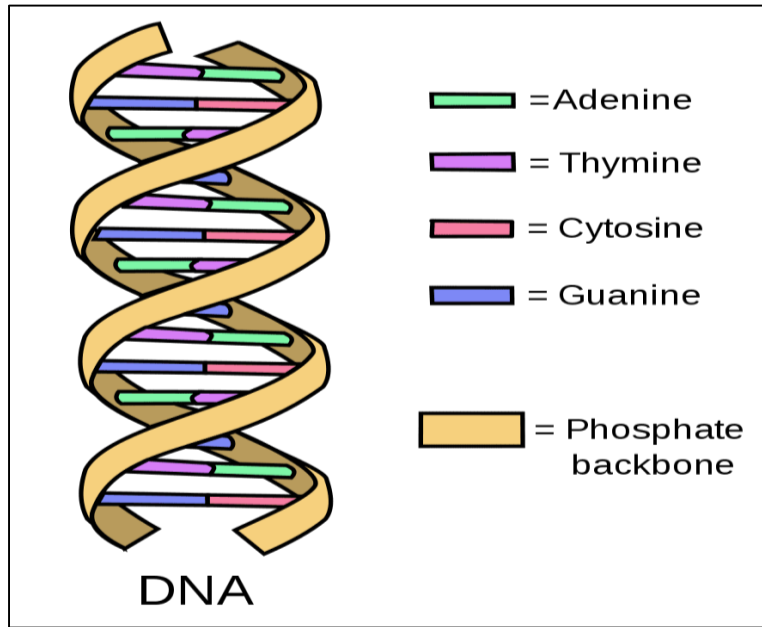
**5. عوامل أخرى:** وتشمل عدة أسباب منها تقدم العمر وهو عامل خطر غير قابل للتعديل لدى المرأة، أذ أن نصف فرصة الحمل في سن 35 مقارنة بعمر 25 عاماً حيث تبدأ جودة وكمية بويضات المرأة في الانخفاض (Steed et al., 2021). وأحد العوامل المحتملة التي قد تؤثر سلباً على خصوبة الإناث هي الإجهاض التلقائي المتكرر او المحرض (Pike, 2020). وجد Dobby, (2015) علاقة بين فصائل الدم والعقم حيث أستنتج بأن المجموعة B هي الأكثر انتشاراً بين النساء الخصبات بينما

المجموعة O هي فصيلة الدم السائدة بين الإناث غير الخصبة. وتلعب الأمراض المنقولة جنسياً (STD) دوراً هاماً في حالات العقم لدى النساء (Mustafa et al., 2019). وأثارت بعض الأمراض الالتهابية المزمنة الناتجة عن التهاب اللثة والآفات النخرية المتقدمة لدى النساء المصابات بالعقم غير المبرر مصدر قلق كبير لأنها قد يكون لها دوراً في مسببات العقم (Yildiz Telatar et al., 2021).

## 2-4: الأسس الوراثية لبعض حالات العقم في النساء

يعد الحفاظ على معلومات التسلسل الجينومي في الكائنات الحية أمراً مهماً لاستمرار الحياة لأن ال-DNA الوحدة الأساسية للوراثة حيث يتأثر بالتعديلات الكيميائية بواسطة عوامل داخلية وخارجية (Chatterjee and Walker, 2017). يتكون الحامض النووي ال-DNA من خيطين من النيوكليوتيدات المبلمرة التي تعمل جنباً إلى جنب والتي ترتبط بعضها ببعض بواسطة روابط هيدروجينية بين قواعد النيتروجينية كما موضح في الشكل (1) (Kumar et al., 2018)؛ (Ghannam et al., 2021). يعرف الجين بأنه الوحدة الجزيئية للوراثة، وترث الكائنات الحية مجموعتها الكاملة من الجينات من خلال التكاثر وتؤدي الطفرات التي تحدث في تسلسل الجينات إلى متغيرات مختلفة من نفس الجين حيث تسمى الاختلافات في الجين بالأليلات وقد تنتج الأليلات اختلافات في السمات داخل مجموعة سكانية معينة وتكون الأليلات إما سائدة أو متنحية، ويعد الأليل السائد شائعاً في الطبيعة ويسمى بالنوع البري أما الأليل المتنحي نادر نسبياً ويسمى بالنوع المتحور أو الطافر (Panawala, 2017). يحتوي الجينوم البشري على مجموعة متنوعة من الاختلافات الجينية وتعد التغييرات أحادية النيوكليوتيدات التي تغير الأحماض الأمينية في مناطق ترميز البروتين أحد الأسباب الرئيسية للاختلاف الظاهري للإنسان وحدثت الأمراض (Pei et al., 2020). قد يحدث تغيير تسلسل الحامض النووي وإتلافه بواسطة العوامل البيئية مثل المواد الكيميائية المسببة للطفرات

وأنواع معينة من الإشعاع وبعد تصحيح أخطاء تسلسل الحامض النووي في جميع أنواع الخلايا أمراً مهماً للبقاء على قيد الحياة (Al-Khafaji, 2017). وقد ارتبطت العديد من الجينات بالعقم بما فيها جين مستقبل الهرمون المحفز للحويصلات *FSHR* gene (Rai et al., 2019). و جين الهرمون المحفز للحويصلات نوع بيتا *FSHβ* يعد من أهم الجينات ذات العلاقة بالخصوبة لدى النساء (Bianco et al., 2021). ويعد جين *CYP17* من الجينات المرتبطة بالعقم من خلال ارتباطه بمتلازمة تكيس المبايض المتعدد (PCOS) والتي قد تصيب 4-20% من النساء في سن الإنجاب فتبلغ مساهمة العوامل الوراثية في مسببات العقم المرتبط بمتلازمة تكيس المبايض 79%، ومساهمة البيئة ونمط الحياة والتاريخ الفردي تبلغ 21%. ويُعتقد أن زيادة إنتاج الأندروجين في بعض النساء هي نتيجة لخلل في تنظيم الجينات المختلفة المشاركة في تخليق هرمونات الستيرويد ومنها جين *CYP17* (Ali et al., 2022).



الشكل (1) تركيب DNA مع الأزواج القاعدية (Frazier, 2019)

**Genetic variation and diversity****5-2: التباين والتنوع الوراثي**

يعكس التنوع الجيني بين الأفراد وجود أليات مختلفة في الجينات وبالتالي وجود أنماط وراثية مختلفة داخل السكان وللتنوع الجيني أهمية كبيرة بالنسبة للأفراد أو لمجموعة سكانية Salo and (Gustafsson,2016). يمكن لأي نوع من التنوعات الجينية أن تسبب مرضاً بشرياً من خلال مجموعة متنوعة من الآليات بما في ذلك التأثيرات على تنظيم الكروماتين والتعبير الجيني والتنظيم ووظيفة البروتين وعدم الاستقرار الجيني (Coelho et al., 2019). تشفير الحمض النووي عبارة عن تقنية جزيئية تسمح بتحديد أي نوع بيولوجي عن طريق تضخيم وتسلسل وتحديد تتابعات الحامض النووي القصير من جين معين أو بعض المناطق الجينية المختارة (Barcaccia et al., 2015).

حيث لا بد من الاعتماد على الواسمات الجزيئية Molecular Markers كونها تثبت الأسس النظرية للبيولوجيا العامة وإمكانية استخدامها في تحاليل التنوع الوراثي (Kartavtsev, 2021). وقد وجد أن الواسمات الجزيئية تسهل دراسة التنوع الجيني وترتبط بشكل وثيق مع المواقع الجينية للصفات (Jahnke et al., 2022). وأن هذه الواسمات بتطور مستمر ويمكن أن تختلف بين الحين والآخر بسبب ارتفاع معدل الطفرات التي توفر مصدر التباين لحدوث التطور أو التي تكون مسؤولة عن تغيرات تراكمية ممكن أن تسبب أمراض معينة (Zhao and Schuchardt, 2019).

وقد ساهمت التقانات الوراثية في فهم طبيعة الحياة وتقديم تطبيقات ساهمت في كشف التباين الوراثي والتنوع الجيني للتجمعات والأصول البيولوجية والقرباية والتطابق بين الاجناس والحياة البرية والطب الشرعي، وقد استخدمت عدة تقانات في دراسة التنوع الوراثي أهمها تقنية التشكل الوراثي للنيوكليوتيدات المفردة (Anagnostou et al., 2021b).



## 2-6: تعدد أشكال النيوكليوتيدات المنفردة

**Single Nucleotide Polymorphisms- SNPs**

يُعرّف تعدد الأشكال الوراثية بأنه وجود أكثر من أليل واحد في موقع وراثي داخل مجموعة سكانية، إضافة إلى ذلك يجب أن يحدث كل أليل بمعدل لا يقل عن 1% من السكان (Anagnostou *et al.*, 2021b). عبارة SNPs عن تغيير نيوكليوتيدة في موقع محدد على تسلسل القواعد النيتروجينية من المادة الوراثية ويحصل في كل 300-1000 زوج قاعدي في الجينوم وهذا يجعل منه مؤشر وراثي في دراسة التباين الوراثي، وبشرط لا يقل تكرارها عن 1% في السكان (Dhutmal *et al.*, 2018). يمثل تعدد الأشكال (SNP) التباين الجيني في البشر يكون 99.9% من تسلسل الحامض النووي متطابق بينما 0.1% المتبقي من الحامض النووي يحتوي على متغيرات تسلسلية تم تحديد ما يقارب عشرة ملايين من SNPs (Shah and Joshi, 2019). تم اعتبار أدوات البيولوجيا الجزيئية، مثل الكشف عن تعدد أشكال النيوكليوتيدات المفردة (SNPs) للمساعدة في إدارة بروتوكولات تحفيز المبيض (Anagnostou *et al.*, 2021b). تتميز واسمات SNP بأنها عالية الاستقرار الوراثي وتكون ذات تكرارات عالية وترتبط بعلاقة قوية بالصفات التناسلية (Ortega *et al.*, 2018; Raschia *et al.*, 2017). ترتبط SNPs بالجينات المرتبطة بأمراض معقدة أيضا كأمراض القلب والسكري والسرطان والفصام وضغط الدم والصداع النصفي والزهايمر، توجد هذه SNPs في الغالب داخل الجين أو في منطقة تنظيمية بالقرب من الجين ويمكن أن تؤثر على وظيفة الجين لتلعب دورًا مباشرًا أكثر في المرض (Kaur *et al.*, 2019).

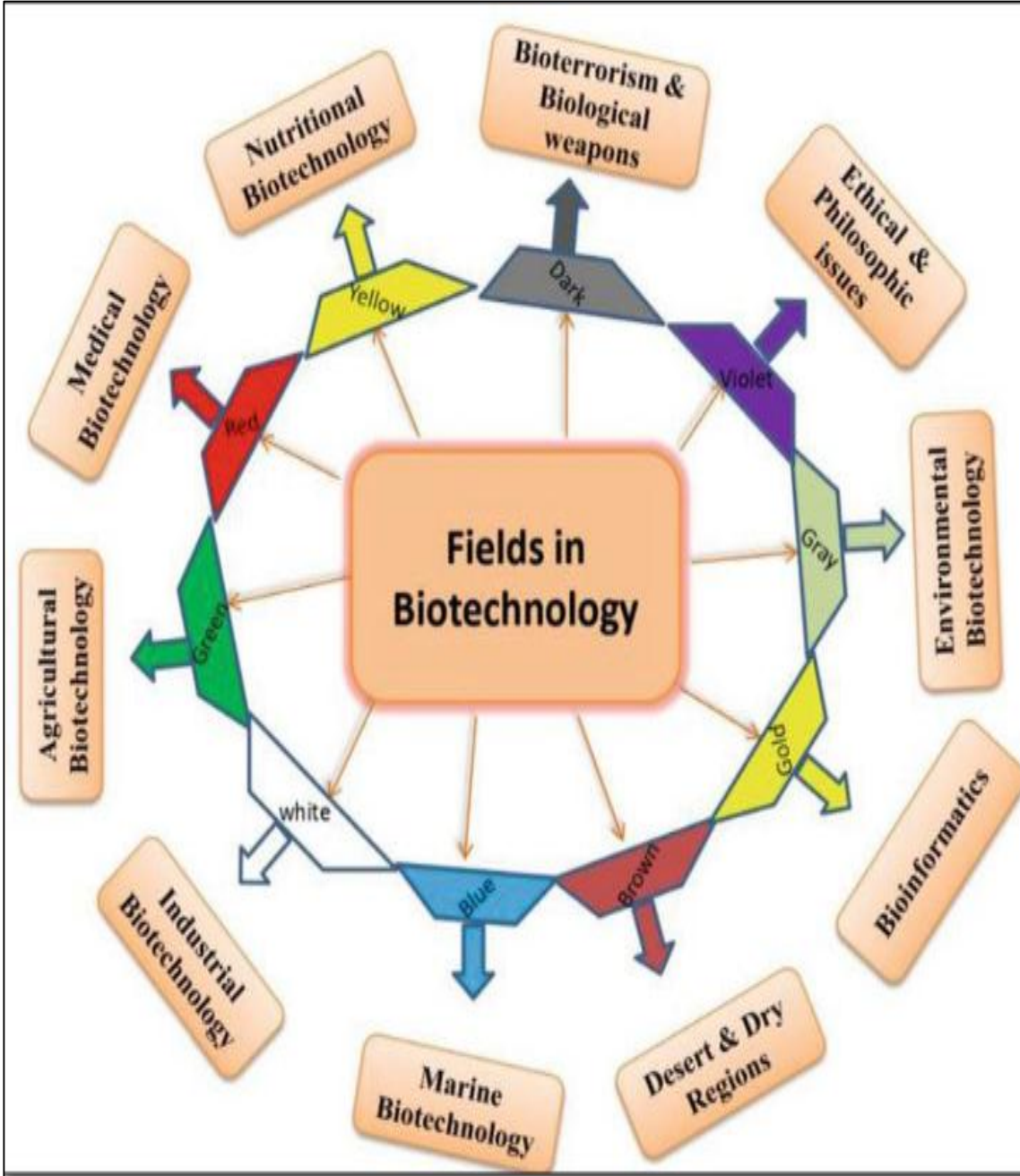
**Biotechnology****7-2: التقانات الحياتية**

التقانات الحياتية هي التكنولوجيا الحيوية التي تستخدم تعديل الأنظمة البايولوجية أو الكائنات الحية أو مشتقاتها (عن طريق الهندسة الوراثية) لإنتاج منتجات جيدة (مثل السلالات البكتيرية الجديدة والمحاصيل المقاومة للآفات والمستحضرات الصيدلانية الجديدة) وتشير أيضاً إلى معالجة بعض تطبيقات العلوم البيولوجية المختلفة (Ranjit *et al.*, 2021). التقنيات الحيوية هي مجال بحث علمي متعدد التخصصات يستخدم الكائنات الحية أو أجزائها لتطوير أو تعديل المنتجات أو تحسين النباتات والحيوانات والكائنات الحية الدقيقة (Padhy *et al.*, 2020). تعد مجال مبتكر متعدد التخصصات يؤثر على العديد من القطاعات المختلفة، بما في ذلك الزراعة والطب والأدوية وإنتاج المواد الكيميائية الدقيقة وإمدادات الغذاء والطاقة وحماية البيئة (Martin *et al.*, 2021). وأشار (et al., 2020) Padhy بإرتباط التقنيات الحيوية وعالم الألوان بعضها ببعض من خلال تطبيقات التكنولوجيا الحيوية كما في الشكل (2) وقد حققت تقدماً كبيراً في الجانب الصحي، إذ تعد التكنولوجيا الحيوية الصيدلانية مجالاً جديداً يتم فيه تطبيق مبادئ التكنولوجيا الحيوية على تطوير الأدوية واللقاحات.

أكثر الجوانب أهمية وتأثيراً وانتشاراً للتقانات الحياتية هو علاقتها مع العلوم البايولوجية وخاصة تلك التي ترتبط بالهندسة الوراثية وعلم الأحياء الجزيئية Molecular Biology ومن أهم العلوم التي تستند عليها التقانات الحياتية هو علم الوراثة الجزيئية وذلك بسبب التقدم الواضح في التقنيات الجزيئية الحديثة ونتيجة للثورة المعلوماتية والعلمية الواسعة تطورت الكثير من الأدوات البايولوجية كتضخيم الجين بواسطة تفاعل البلمرة التسلسلي PCR (Svec *et al.*, 2015). وكذلك دراسة تتابعات الأحماض النووية بواسطة تقانة DNA Sequencing (Heather and Chain, 2016). فضلاً عن تطور العديد في الأدوات البايولوجية الجزيئية والمعلوماتية الحيوية Bioinformatics، التي

تتمثل (Phylogenetic Tree و Multiple Sequence Alignment و BLAST Analysis)

والتي كان لها أثر كبير في التقدم العلمي الحاصل في هذا المجال (Wong, 2016).



الشكل (2) تصنيفات التقنيات الحيوية (Padhy *et al.*, 2020)

**DNA Sequencing****8-2: تقنية تسلسل الأحماض النووية**

أحدثت التطورات الحديثة في دراسة الجزيئات الحيوية ثورة في الأبحاث البيولوجية ومن بين هذه التطورات تسلسل الأحماض النووية والتي فتحت أبوابها حقبة جديدة ومثيرة من تحليلات الجزيئات الحيوية وتطبيقاتها، بما في ذلك الطب الشخصي، وتشخيص الأمراض التي تصيب البشر وكيفية الوقاية منها (Dorado *et al.*, 2021). أول تسلسل حامض نووي تم الحصول عليه لأول مرة كان في عام 1970 من قبل عدداً من الباحثين باستخدام طرقة تعتمد على الأساس اللوني ثنائي الأبعاد للنيوكليوتيدات وبعد التطور في العلوم وفي تصنيع أجهزة ذات دقة عالية فإن معرفة تسلسل الحامض النووي أصبح أسهل وأسرع (Pettersson *et al.*, 2009). أن تسلسل الحمض النووي هو عملية لتحديد عدد وترتيب النيوكليوتيدات (الأدينين A والثايمين T والكوانين G والسايروسين C) في الجينات أو جزيء من الحمض النووي (Bamanga *et al.*, 2018). تطورت تقنية التسلسل بشكل كبير مع ظهور تسلسل الجيل التالي عالي الإنتاجية (NGS) وهذه لا يتم فيها تسلسل الجين المفرد فقط بل يشمل أيضاً مناطق وراثية أكبر كمجموعة من الجينات والتسلسل عميق للجينوم كامل والتسلسل الكامل للكروموسوم (Shetty *et al.*, 2021). ويمكن ملاحظة أهمية تسلسل الحامض النووي في تحديد أسباب الأمراض حيث قد تحدث بعض الأمراض التي تصيب الإنسان بسبب طفرة صامتة في موقع لصق مما يعني أن الحامض الأميني الناتج يترجم ويرمز لنفسه ولكن لا يتعرف على موقع اللصق لأن النيوكليوتيدة قد تغيرت في الحامض النووي (Bamanga *et al.*, 2018). يتم تصنيف تقانة تسلسل القواعد النيتروجينية الى ثلاثة أجيال، الأول يسمح بتسلسل شظايا الحامض النووي الصغيرة والثاني يزيد الإنتاجية ويقلل من الكلفة وبالتالي يكون أكثر ملائمة للتسلسل الكامل للجينوم أما الجيل الثالث فيقوم حالياً بدفع التكنولوجيا إلى أقصى حدودها حيث يكون قادراً على تسلسل الجزيئات

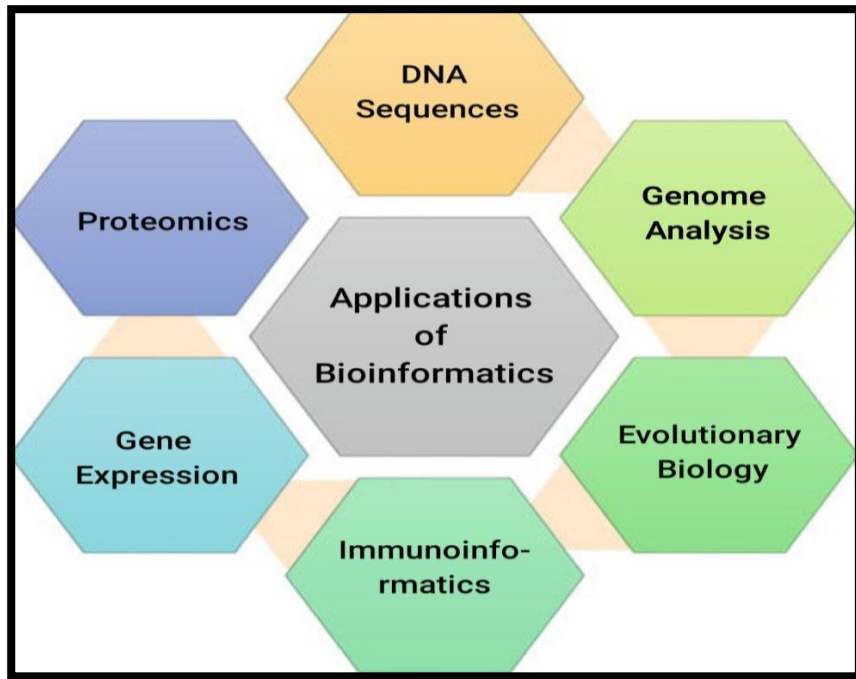
المفردة، دون تضخيم سابق وهذا كان من المستحيل لذا يمثل هذا ثورة جديدة ( Dorado *et al.*, 2021).

## Bioinformatics

## 2-9: المعلوماتية الحيوية

في العقود القليلة الماضية، تم استكشاف المعلوماتية الحيوية على نطاق واسع في العديد من مجالات العلوم البيولوجية وهي تجمع بين مبادئ علم الأحياء والكمبيوتر العلوم والرياضيات والفيزياء والإحصاء لتحليل وتفسير البيانات البيولوجية فتستخدم القوة الحسابية والخوارزمية والبرمجيات لاستخراج المعرفة من البيانات البيولوجية لأغراض التحليل والتنبؤ (Patel *et al.*, 2021). المعلوماتية الحيوية هي الفرع الجديد للعلوم الذي يتعامل مع اكتساب وتخزين وتحليل ونشر البيانات البيولوجية بمساعدة علوم الكمبيوتر وتكنولوجيا المعلومات كما أن لديها قدرة هائلة على تحليل كمية هائلة من البيانات البيولوجية بسرعة وفعالية من حيث التكلفة (Nowicki *et al.*, 2018). أستخدمت المعلوماتية الحيوية وتطبيقاتها على نطاق واسع في عدد من المجالات من أجل الفهم الأفضل وتحليل البيانات التي ساعدت في تسريع البحث العلمي في العديد من المجالات بما في ذلك تسلسل الحامض النووي وتحليل الجينوم والبيولوجيا التطورية، المعلوماتية المناعية والتعبير الجيني والبروتيوميات شكل (3) (Patel *et al.*, 2021). كذلك أن المعلوماتية الحيوية تعتبر من العلوم سريعة التطور وبالتالي لا يمكن التقليل من أهميتها فهي مفيدة في إنشاء أشجار النشوء والتطور، والتنبؤ ببنية البروتين وتعد محاذاة التسلسل المتعدد (MSA) هي الخطوة الرئيسية في أداء تلك المهام (Reddy and Fields, 2022).

أصبح هناك فهم أساسي لعمل الجين عند ترميز تسلسل بروتينات معينة كما ونشعر بنقص المعلومات حول الدور الذي يلعبه الحامض النووي في أمراض أو وظائف معينة لآلاف البروتينات التي يتم إنتاجها لذا تجمع المعلوماتية الحيوية بين الأساليب المستخدمة في جمع هذه المعلومات الضخمة والمعقدة وتخزينها وتحديدها وتحليلها وربطها، ينتج عن كل هذا العمل محيط من المعلومات لا يمكن أدراكه إلا بمساعدة الطرق المحوسبة (Branco and Choupina, 2021).



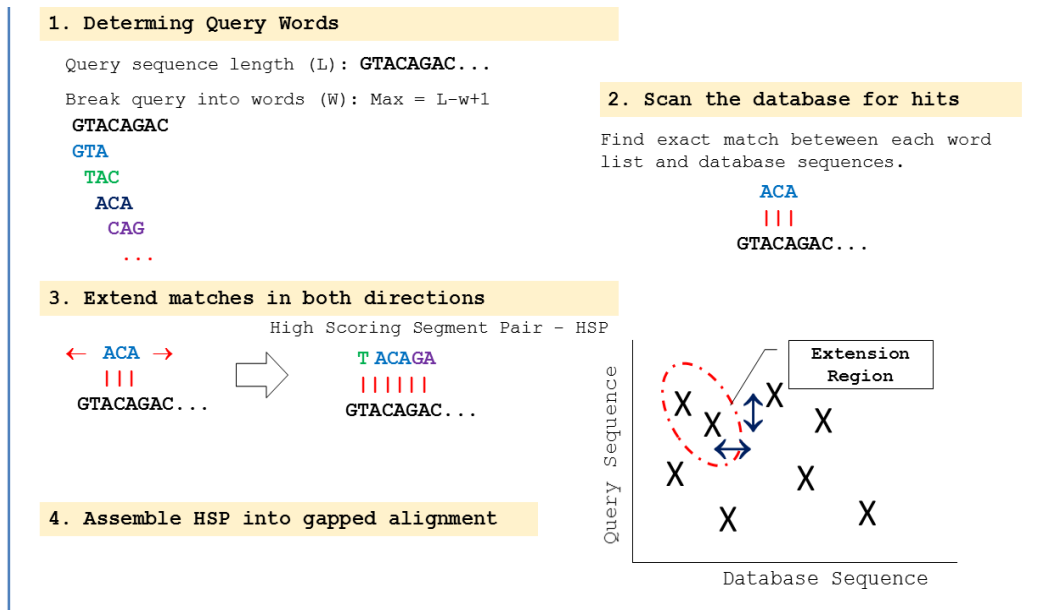
الشكل (3) تطبيقات المعلوماتية الحيوية في مختلف التخصصات (Patel et al., 2021)

أهم الأدوات المستخدمة في هذه التقنية هي:

### 1. أداة التحليل التوافقي للبحوث BLAST Analysis

البلاست هي أداة لمقارنة التسلسلات البايولوجية للحامض النووي والبروتين من أجل معرفة أوجه التشابه والاختلاف ومن أجل الحصول على معلومات مخفية موجودة داخل التسلسل ولتتبع العلاقة

التطويرية الموجودة داخل التسلسلات (Nowicki *et al.*, 2018). تتميز هذه الأداة بكونها سريعة وموثوقة من خلال مقارنة (Query) التسلسل المعلوم بقاعدة البيانات المراد استخدامها بطريقة مبسطة يمكن توضيحها بإربع مراحل ( تجميع قائمة الكلمات (k-tuples) والبحث عن المراسلات في قاعدة البيانات ثم تمديد المحاذاة من الكلمات المحددة وأخيراً تجميع محاذاة متباعدة وفقاً لأزواج القطع (Amaral *et al.*, 2007) كما في الشكل (4) تساعد أداة البلاست الباحثين على تحليل البيانات الجينية بطريقة سريعة ومتطورة ويتم تنفيذ BLAST على أجهزة الحوسبة عالية الأداء (HPC) وأجهزة الكمبيوتر العملاقة بشكل كبير باستخدام آلاف المعالجات (Nowicki *et al.*, 2018). وقد أوضح Kappelmann-Fenzl, (2021) بأن أداة البحث عن المحاذاة المحلية الأساسية (BLAST) هي واحدة من أكثر أدوات المعلوماتية الحيوية استخداماً وينعكس التأثير الواسع النطاق لـ BLAST في أكثر من 53000 من الأستشهادات التي تلقاها هذا البرنامج في العقدين الماضيين.



الشكل (4) خطوات عمل برنامج البلاست

**Multiple Sequence Alignment****2. محاذاة التسلسل المتعدد**

محاذاة التسلسل المتعدد هو العلم أو الطريقة التي يتم بها ترتيب تسلسلين أو أكثر من التسلسلات البيولوجية واحداً فوق الآخر للعثور على مناطق التشابه بينهما وتسمى هذه المناطق بالمناطق المحفوظة (Reddy and Fields, 2022). تعد محاذاة التسلسل المتعدد خطوة أولية في العديد من أدوات المعلوماتية الحيوية، وهي تمثل تحدياً على مجموعات البيانات التي تظهر عدم تجانس كبير في طول التسلسل وخاصة عندما تحتوي مجموعات البيانات على تسلسلات مجزأة نتيجة لتضمين القراءات المتجاورة الناتجة عن تقنيات التسلسل من الجيل التالي (Shen *et al.*, 2022). تعد محاذاة التسلسل المتعدد (MSA) مهمة في المعلوماتية الحيوية كونها تتعامل مع قواعد بيانات تسلسل الجينات والبروتينات المتزايدة باستمرار ويتم تطبيق MSA في تحليل النشوء والتطور، وفي إكتشاف مجالات البروتين وتحديد البنية الثانوية والثلاثية في البروتينات وكذلك في تحليل عينة الميتاجينوم وأكتشاف الجينات (Takacs and Grolmusz, 2021). وقد مكّن التطور المستمر لتقنيات التسلسل الباحثين من الحصول على كميات كبيرة من بيانات التسلسل البيولوجي مما أدى إلى زيادة الطلب على برامجٍ يمكنها إجراء محاذاة التسلسل بسرعة وبدقة (Chao *et al.*, 2022).

**Molecular Chaperone****2-10: المرفقات الجزيئية**

هي عبارة عن بروتينات توفر الظروف المواتية لطّي البروتينات الأخرى بشكل صحيح وبالتالي تمنع تجمعها (Guzman and Gruebele, 2014). وأن البروتينات المصنعة حديثاً عادةً يجب طيها من سلسلة خطية من الأحماض الأمينية إلى شكل ثلاثي الأبعاد (Arthur, 2015). وتستخدم المرفقات الجزيئية الأدينوسين ثلاثي الفوسفات (ATP) كمصدر للطاقة في طي البروتينات (Hinnerwisch *et al.*, 2005). إذ أشار Arthur (2015) إلى أن المرفقات الجزيئية عبارة عن



جزيئات بروتينية تساعد في الطي السليم للبروتينات الأخرى، ولكنها لا تحدد الشكل النهائي للبروتينات المتعددة، بل أنها تبقى عديد الببتيد الجديد مفصلاً عن الظروف الكيميائية المدمرة له في بيئة السايوتوبلازم في حين أنها توفر البيئة المناسبة التي تسمح للبروتينات بالطي (الالتفاف) من تلقاء نفسها، وهي على شكل أسطوانة جوفاء توفر ملجأً لطي البروتينات. أن التفاعل الذي يحدث بين المرفقات الجزيئية والبروتينات يعمل على التشكيل الصحيح والمناسب للبروتينات وأن النظام الخلوي يتعرف على البروتينات التي تتشكل بطريقة خاطئة وممكن أن يقوده لعملية تحطيمها عن طريق وضع علامة عليها، وأن كميات ضئيلة من الماء موجودة فيه للمساعدة في عملية الطي (Kmiecik and Kolinski, 2011; Cpndb, 2016). تشمل المرفقات الجزيئية مجموعتين تتواجد الأولى في الكائنات بدائية النواة (prokaryotic) مثل البكتريا والعضيات والبلاستيدات الخضراء وتسمى chaperonin GroEL والمجموعة الثانية تتواجد في الكائنات حقيقية النواة (eukaryotic) وتسمى chaperonin CCT أو TRiC أو c-cpn (Hinnerwisch *et al.*, 2005).

## Protein Folding

## 2-11: طي البروتين

طي البروتينات: هي عملية فيزيائية يتم من خلالها أكساب سلسلة البروتين تركيب ثلاثية الأبعاد (three-dimensional structure) أي يتكون شكل خاص بكل بروتين، وهذا الشكل عادةً ما يعطي الوظيفة من الناحية البايولوجية للبروتين (De Lima Cornea *et al.*, 2018). بشكل عام كل البروتينات توجد بشكل غير ملتف أو مطوي بشكل لولب عشوائي وعند أنتاجها من سلسلة mRNA الى سلسلة خطية من الأحماض الأمينية عندها تكون مفتقرة الى الاستقرار لذلك تتفاعل الأحماض الأمينية مع بعضها لتكوين التركيب ثلاثي الأبعاد (Saunders and Deane, 2010).

وأن عملية طي البروتينات تعد ضرورية في بيئة الخلايا المزدهمة لمنع التجميع الذي يحدث نتيجة لإرتفاع درجات الحرارة او نتيجة الى أنواع الأجهاد المختلفة (Lee and Tsai, 2005).

أشار (Takai *et al.*, 2008) الى أن البروتينات وتحت ظروف معينة كظروف الأجهاد المختلفة تفشل في عملية الطي (الالتفاف الصحيح) الأمر الذي يؤثر سلباً على وظيفة هذه البروتينات، وهنا تبرز أهمية البروتينات التي لها القدرة على الطي او إعادة الطي. بين (Pace 2009) أن طي البروتينات تعد عملية دقيقة وأن قابلية الأواصر الهيدروجينية بين الذرات المختلفة هي التي تكسب عملية الطي القوة المطلوبة فضلاً عن الأستقرار المطلوب، ولعل أبرز الحالات التي تظهر فيها أهمية طي البروتينات بمساعدة المرافقات الجزيئية هي عند أرتفاع درجات الحرارة حيث أن هذا الأرتفاع يؤثر بشكل مباشر على الطي ويطيّل من وقته بشكل كبير (Kmiecik and Kolinski, 2011). ونظراً لتطور علوم تقنيات المعلوماتية الحيوية التي من شأنها تحديد ورسم البروتينات التي تحدث لها عملية الطي فضلاً عن البروتينات التي لم يحدث لها ذلك (Mashaghi *et al.*, 2014).

## 2-12: أنواع المعلومات وقواعد البيانات

### Types of information and databases

نظراً للحجم الكبير من البيانات التي تم إنشاؤها وتنظيمها أصبح التخزين ضرورياً لهذه البيانات، تم إنشاء قواعد بيانات تضم مجموعة كبيرة من المعلومات البيولوجية المخزنة والمعالجة للسماح للمجتمع العلمي بالوصول إليها (Prosdocimi, 2010). يمكن تقسيم المصادر التي تستخدمها المعلوماتية الحيوية إلى: (1) تسلسل الحمض النووي الخام، (2) تسلسل البروتين، (3) الهياكل الجزيئية، (4) تسلسل الجينوم (Diniz and Canduri, 2017). هناك 1739 قاعدة بيانات بيولوجية تخزن كميات كبيرة

من المعلومات ويتم تصنيفها إلى قواعد بيانات أساسية تتكون من نتائج البيانات التجريبية التي يتم نشرها دون تحليل دقيق فيما يتعلق بالمنشورات السابقة وقواعد البيانات الثانوية يتم فيها التنظيم بتجميع وتفسير البيانات يسمى المحتوى عملية التنظيم (Prodocimi, 2010). هناك قواعد بيانات وظيفية مثل موسوعة كيو تو للجينات والجينوم (KEGG) و (Reactome) التي تسمح بتحليل وتفسير الخرائط الأيضية (Prodocimi et al., 2002).

تشمل قاعدة البيانات الأولية والرئيسية لتسلسل النيوكليوتيدات والبروتينات: GenBank في المركز الوطني للتكنولوجيا الحيوية للمعلومات (NCBI) وقاعدة بيانات الحامض النووي الياباني (DDBJ)، ومختبر البيولوجيا الجزيئية الأوروبي (EMBL) (Pevsner, 2015). قواعد البيانات هذه هي أعضاء في التعاون الدولي لقاعدة بيانات تسلسل النيوكليوتيدات (INSDC) وتبادل المعلومات المودعة فيها يومياً (Prodocimi et al., 2002). أما قواعد البيانات الثانوية فتشمل موارد معلومات البروتين (PIR) وبنك بيانات البروتين (PDB)، التصنيف الهيكلي للبروتينات (SCOP). وان قواعد البيانات هذه منسقة وتقدم فقط المعلومات المتعلقة بالبروتينات التي تصف هيكلها ومجالاتها ووظيفتها وتصنيفها (Amaral et al., 2007).

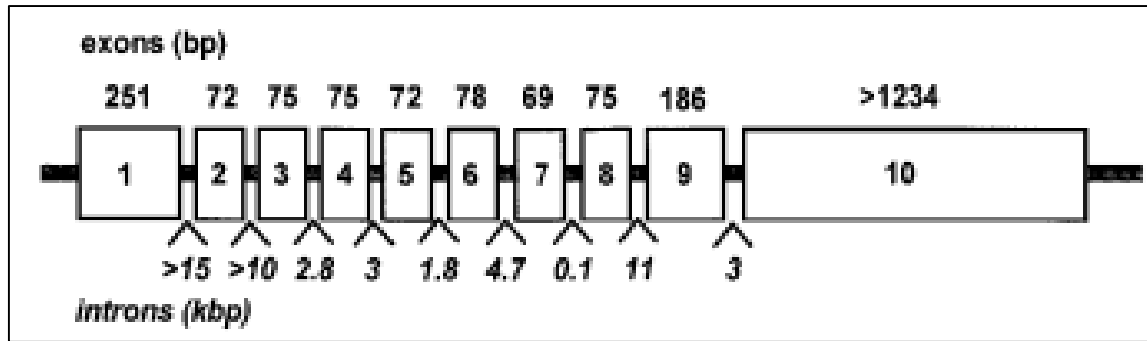
## 2-13: جين مستقبل الهرمون المحفز للحويصلات *FSHR*

### Follicle stimulating hormone receptor (*FSHR* gene)

أظهرت الدراسات الأخيرة بأن جين *FSHR* مصدر علمي مهم في الدراسات الجزيئية ومن العلامات الجيدة والمفيدة في دراسة التباين الوراثي وعلاقته بضعف الخصوبة والعقم (Wu et al., 2017). يعد *FSHR* أحد أهم المستقبلات ذات التأثير الكبير على التكاثر، والذي ينتمي إلى عائلة بروتينات G (مستقبلات للبروتينات) (Antara and Smita, 2015). مستقبل الهرمون المحفز

للحويصلات (FSHR) ينتمي إلى فصيلة فرعية من مستقبلات هرمون البروتين السكري (P-) Glycoprotein) والذي يعمل بدوره على نقل تأثير هرمون FSH على شكل إشارات إلى المادة الوراثية (Banerjee *et al.*, 2021).

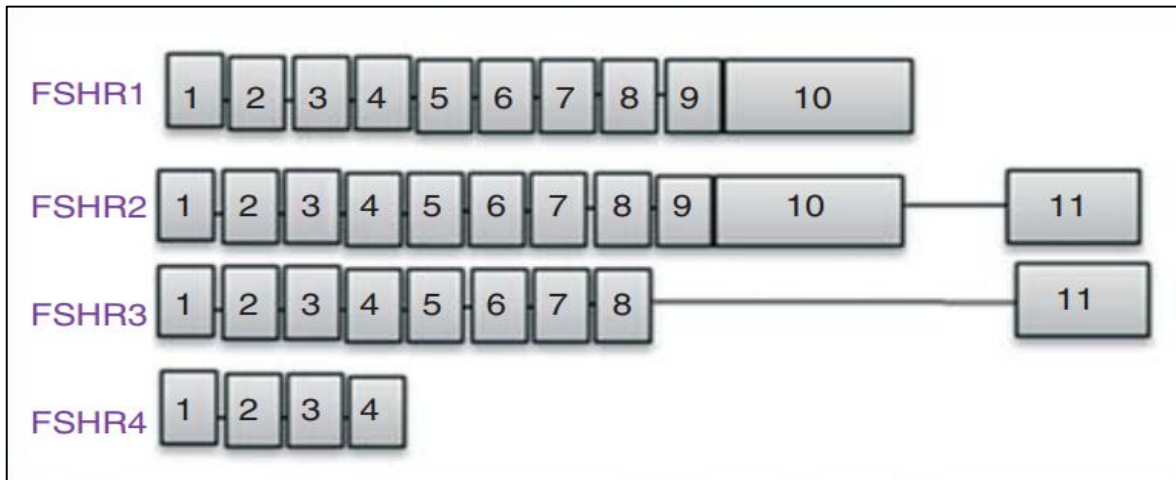
يشفر هذا المستقبل بواسطة جين *FSHR* يكون موقعه على الكروموسوم الثاني في الإنسان ويقع بين أزواج النيوكليوتيدات 48962157 و 49154515 من الجينوم النووي ويتألف من 10 أكسونات مفصولة بتسع أنترونات شكل (6) (Simoni *et al.*, 1997). يبلغ حجمه حوالي 54 Kb، يكون أمتداد الأكسونات العشرة من 69-1234 زوج قاعدي والإنترونات التسعة من 1.8 إلى 15 ألف زوج قاعدي ويتكون البروتين الناتج من 695 حامضاً أمينياً وتكون الأحماض الأمينية المشفرة بهذه القطع غنيةً أما بالحامض الأميني الليوسين (Leucine) أو الأيزوليوسين (Isoleucine) (Omer *et al.*, 2016). الأكسونات من (1-9) مسؤولة عن تشفير جزء المستقبل خارج الخلية، أما الأكسون العاشر فهو مسؤول عن تشفير جزء الغشاء الخلوي الناقل والجزء الداخلي من الخلية وتشفير النهاية الكربونية C-Terminal لبروتين FSHR (Ulloa-Aguirre *et al.*, 2018).



الشكل (5): تركيب جين *FSHR*

أشارت الدراسات إلى أن التغيرات الوراثية في جين *FSHR* يمكن أن تسبب إزالة أو تقليل حساسية المستقبل لهرمون FSH على السطح الخارجي لغشاء الخلية مما ينتج عنه انخفاض في نقل

إشارات الهرمون الذي يؤثر بالمحصلة النهائية على التكاثر في الأفراد (Casarini *et al.*, 2016). كذلك أن تعبير FSHR بمستوى عالٍ يؤدي إلى موت الخلايا المبرمج (Casarini *et al.*, 2018). ويحدث تعبير FSHR العالي عبر الخلايا الحبيبية في المبيض ويتناقص بمجرد اختيار جريب واحد مهيم (Casarini *et al.*, 2019). توجد أربعة أشكال (FSHR1, FSHR2, FSHR3 and FSHR4) من مستقبلات FSHR اعتماداً على تعديل وترتيب شفرة الحامض النووي mRNA (الأكسونات) بعملية التضفير البديل (Alternative Splicing): FSHR1 يعتبر المستقبل الرئيس ويتألف من 10 أكسونات وأن الأكسون العاشر هو الأكبر من حيث الحجم، FSHR2 يكون فيه الأكسون 10 أقصر قليلاً مع إضافة أكسون 11 إلى النهاية 5'، FSHR3 يتكون من 8 أكسونات مشابهة للمستقبل FSHR1 مع إضافة أكسون 11 إلى النهاية 5'، وأخيراً FSHR4 يحتوي على 4 أكسونات فقط. ويعد المستقبلان FSHR1 وFSHR3 نشطان من الناحية البيولوجية إذ يعمل الأول في الخلايا الحبيبية للمبايض وخلايا سرتولي في الخصية أما الثاني فيعمل في الخلايا الجذعية والحوصلات المبيضية في مراحل تطورها الأولى شكل (7) (Li *et al.*, 2007; Sullivan *et al.*, 2013; Bhartiya and Singh, 2015).



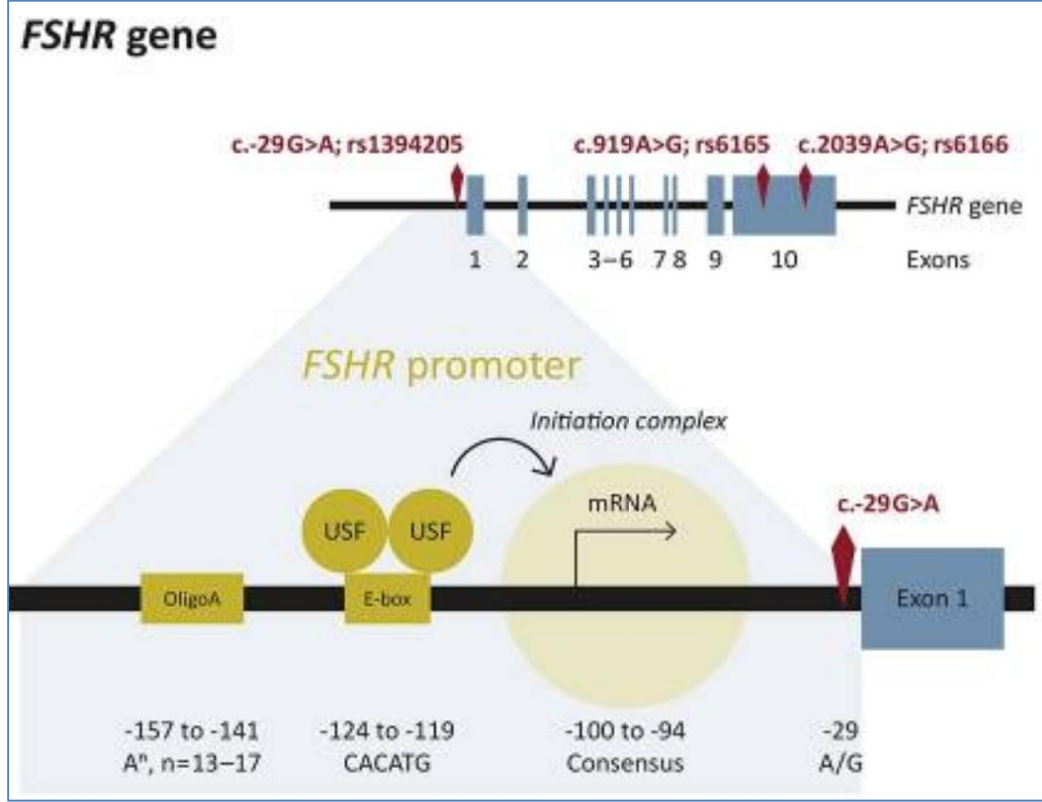
الشكل (6) أشكال مستقبل الهرمون المحفز للحوصلات FSHR (Bhartiya and Singh, 2015).

**14-2: التشكل الوراثي في جين *FSHR***

أن تعدد الأشكال الوراثية لجين *FSHR* قد يؤدي إلى خلل وظيفي لهرمون المحفز للحويصلات *FSH*، وبالتالي يؤثر على وظيفة المبيض (Trevisan *et al.*, 2014). ترتبط زيادة التعبير الجيني في بعض التراكيب الوراثية مع زيادة انتشار الخلايا الظهارية على سطح المبيض، بالإضافة إلى ذلك يعمل *FSH* من خلال *FSHR* على تحفيز الخلايا الحبيبية على التكاثر والتميز لذلك فإن شذوذ *FSHR* ينجم عنه تحلل الحويصلات المبيضية (Monniaux *et al.*, 2010). كذلك أوضحت دراسة بأن سبب العقم قد يكون وراثياً نتيجة الطفرات الحاصلة في الجينات التي تشفر كل من هرمونات الكونادوتروبيين وجينات مستقبلات الغدد التناسلية، التي سبب حدوثها عدداً من الأنماط الظاهرية المختلفة بما في ذلك البلوغ المتأخر، وانقطاع الطمث الأولي والعقم، وقصور الغدد التناسلية (Szymańska *et al.*, 2018). توصلت دراسة إلى وجود ارتباط بين التباين الوراثي لجين *FSHR* وتركيز هرمون *FSH* في الدم وبعض الصفات التكاثرية كذلك يؤثر على حساسية المبيض لهرمونات الغدد التناسلية وتلعب دوراً مهماً في تحديد مدى استجابة المبيض للتحفيز من حيث أستهلاك *FSH* ومدة التحفيز وعدد البويضات (Alviggi *et al.*, 2018).

أتاحت الابتكارات الحديثة في الأدوات الحيوية الحاسوبية التي يمكنها التنبؤ بتأثير *SNPs* على تسلسلات الأحماض الأمينية فرصة للتنبؤ بتأثير التشكلات الوراثية لجين *FSHR* على تسلسلات الأحماض الأمينية المتغيرة، فضلاً عن زيادة المعرفة بتعدد التراكيب الوراثية للـ *FSHR* مع العقم عند النساء (Zilaitiene *et al.*, 2018). ووجد أن الطفرات الوراثية في جين *FSHR* أدت إلى تكون تعدد الأشكال الوراثية التي ارتبطت في بعض حالات عقم النساء (Zilaitiene *et al.*, 2018). وبعد التغيرين الوراثيين Ala307Thr و Asn680Ser هما الأكثر شيوعاً في جين *FSHR* على مستوى

الأكسون العاشر، الذي يتحول فيهما G إلى A في الموقعين 919 و 2039 على التوالي وبالتالي قد يؤثران على ارتباط هرمون FSH مع المستقبل FSHR (Huang and Shi, 2019). وبينت دراسة وجود ارتباط بين تعدد الأشكال الوراثي *FSHR* في الموقع 680 (Asn680Ser) مع الاستجابة الجيدة للمبيض، ولوحظ أن التغيير الوراثي في الموقع  $G>A$  -29 في منطقة المحفز يكون مرتبط مع ضعف استجابة المبيض وانخفاض تعبير جين *FSHR* (Anagnostou et al., 2021a). يمكن أن تؤثر الطفرات وتعدد الأشكال الوراثية في جين مستقبلات FSH (*FSHR gene*) على القدرة الإيجابية لدى الرجال والنساء (Anagnostou et al., 2021b). وفي دراسة أخرى تم الكشف عن ثمانية تشكلات وراثية للنيوكليوتيدات المنفرة (SNPs) في جين *FSHR*، أذ وجد سبعة SNPs في الأكسون العاشر في المواقع 307، 329، 449، 524، 567، 665، 680 و SNP واحد فقط في منطقة المحفز (Promoter) في الموقع -29 (Bhartiya and Patel, 2021). أظهرت عدد من الدراسات أن ال SNPs الأكثر شيوعاً في جين *FSHR* يكون في الموقعين 307 و 680 كما أن exon العاشر من هذا الجين يؤثر على كفاءة نقل الإشارة ويرتبط ارتباطاً وثيقاً باستجابة المبيض للإخصاب في المختبر (IVF) وأكدت الدراسات التي أجريت على الخلايا الحبيبية أن SNPs ل *FSHR* مرتبطة بنشاط النسخ للمحفز وقدرة ارتباط الجين بيتا مع مستقبله *FSHR* وبالتالي فإن SNPs تؤثر على المستوى الأساسي ل FSH بطرق مختلفة (Wang et al., 2021). يلعب مستقبل الهرمون المنبه للحويصلات (*FSHR*) دوراً أساسياً كأحد أهم الجزيئات استجابة لبعض الأدوية المتعلقة بالعقم، ويعتمد ضعف احتياطي المبيض والاستجابة الضعيفة لمثل هذه العلاجات جزئياً على المستقبل *FSHR* نفسه ومع ذلك قد تتغير وظيفة وحساسية الدواء لهذا المستقبل بسبب اختلاف الأليل وتعدد الأشكال الوراثية في جين *FSHR* (Tafazoli et al., 2021) شكل (7).



شكل (7) توزيع الطفرات الوراثية في جين *FSHR* (Laan *et al.*, 2012).

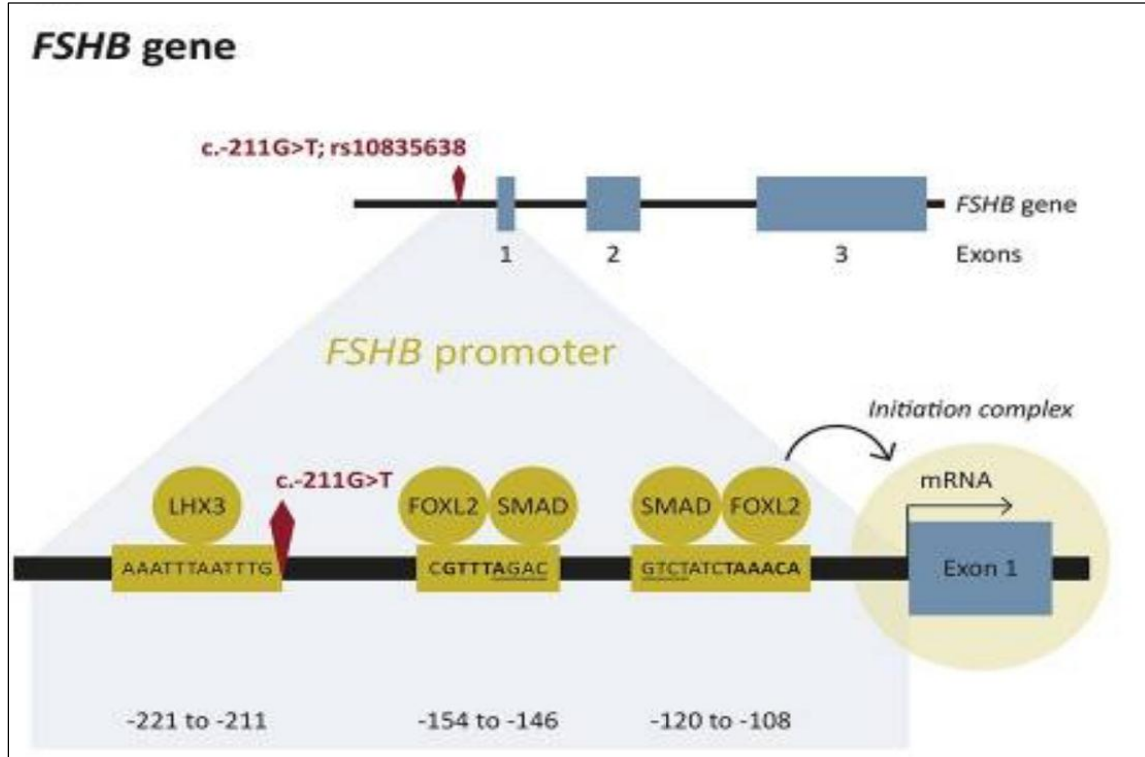
## 2-15: جين الهرمون المحفز للحويصلات نوع بيتا

### Follicle stimulating hormone – beta gene (*FSHβ* gene)

يعد الهرمون المحفز للحويصلات (Follicle stimulating hormone-FSH) من الهرمونات الأساسية لمحور تحت المهاد- الغدة النخامية - الغدة التناسلية، ويلعب دوراً رئيساً في التكاثر لدى الرجال والنساء (Trevisan *et al.*, 2019). وهو أحد الهرمونات المغذية للمناسل ويتكون من بروتينات سكرية (Glycoproteins)، وتكون نسبة الكربوهيدرات حوالي 25.13% وتقدر الكتلة الجزيئية له 32 كيلو دالتون (Sindiani *et al.*, 2021). يتكون الهرمون من جزئين هما وحدات ألفا (Alpha-subunit) ويكون تسلسل الأحماض الأمينية لهذا الجزء متطابقاً في جميع الهرمونات التي



تقع ضمن هذه العائلة والتي تشمل (TSH وHCG وLH) وتتألف من 96 حامض أميني، أما الجزء الثاني فهو بيتا (beta-subunit) ويكون فيه تسلسل الأحماض الأمينية لكل هرمون غير مطابق للتسلسل في الهرمونات الأخرى (Bhartiya and Patel, 2021). يُشفّر الجزء ألفا بواسطة جين واحد فقط بينما الجزء بيتا بواسطة جينات مختلفة، أن الوظيفة الرئيسة لهذين الجزئين هو أظهار الفعالية الحيوية والكيموحيوية للهرمون (Wang, 2021). وأن الجزء بيتا هو المسؤول عن خصوصية عمل الهرمون مقارنةً بالهرمونات الأخرى، إذ يمارس الهرمون أنشطته البيولوجية من خلال ارتباط الوحدة الفرعية  $\beta$  بمستقبلاتها الخاصة (FSHR) (Trevisan et al., 2019). تتكون الوحدة الفرعية بيتا (FSH- $\beta$ ) من 111 حامض أميني والتي لها تأثير بيولوجي محدد، وهي مسؤولة عن التفاعل مع مستقبل الهرمون المحفز للجريب (Bhartiya and Patel, 2021). يتم ترميز (FSH- $\beta$ ) بواسطة جين *FSH $\beta$*  الذي يبلغ طوله حوالي 4181 زوج قاعدي ويقع على الكروموسوم الحادي عشر 11P14.1 في الموقع 30231014-30235194 ويتكون من ثلاثة أكسونات يفصلهما أنترونين (Chu et al., 2010). يتم التعبير عن جين *FSH $\beta$*  بشكل كبير في الغدة النخامية لكن عدداً من الدراسات وجدت أنه يتم التعبير عنه في أنسجة أخرى كالمشيمة والرحم (Wang et al., 2021). كما في الشكل (8).



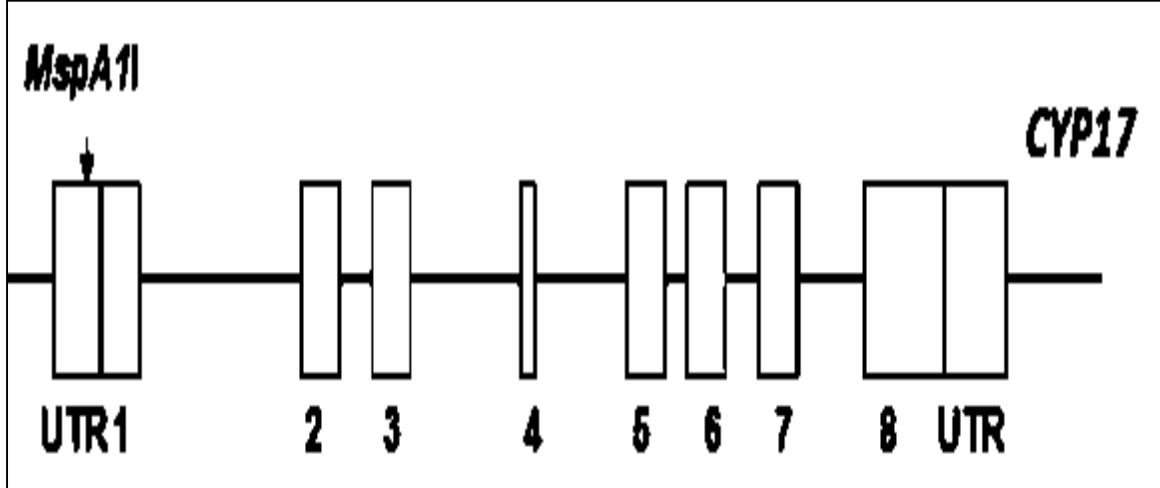
الشكل (8): تركيب جين *FSHβ* والمحفز (promotor) (Schubert *et al.*, 2019)

## 2-16: التشكل الوراثي لجين *FSHβ*

بينت دراسات سابقة ارتباط الأليل الطافر T ↓ T-211G>T في محفز جين *FSHβ* بانخفاض مستويات هرموني LH وFSH (La Marca *et al.*, 2013)، وبزيادة الفترات بين دورات الحيض (Laisk-Podar *et al.*, 2015)، ونتائج التلقيح الاصطناعي (In vitro fertilization) (Hayes *et al.*, 2015)، والعقم عند النساء مجهول السبب (Rull *et al.*, 2018). كذلك وجد ارتباط بين تعدد الأشكال الوراثية -211G>T في محفز جين *FSHβ* مع انخفاض مستويات هرمون FSH والعمر في سن اليأس، ومتلازمة تكيس المبايض المتعدد في النساء البريطانيات (Ruth *et al.*, 2016). في دراسة أخرى أجريت على النساء البرازيليات تم الكشف عن تركيبين وراثيين (GT, GG) ناتجين عن الطفرة -211G>T في منطقة المحفز حيث كان تكرار الأليل البري G

(86.4%) والأليل الطافر T (13.6%) وكانت النساء الحاملة للتركيب الوراثي الهجين GT تمتلك مستويات عالية من الهرمون اللوتيني وكذلك استجابة أقل لتحفيز المبايض أثناء التلقيح الاصطناعي مقارنة بالتركيب الوراثي البري GG، كما أفادت الدراسة أن الأليل T يقلل من نسخ  $FSH\beta$  في الغدد التناسلية (Trevisan *et al.*, 2019). كذلك اشارت دراسة الى أن النساء الحاملات للأليل T كانت مرتبطة بمستويات أعلى من FSH و LH والعقم مجهول السبب ويقلل من نشاط نسخ الجين وفي دراسة شملت 140 امرأة مصابة بالعقم (متوسط العمر 33 عامًا) وجد أن التركيب الوراثي الهجين GT كان لديه استجابة أقل لتحفيز المبيض مقارنة بالنمط الجيني GG (النوع البري) (Conforti *et al.*, 2019). كما بين Huhtaniemi and Rivero-Müller, (2019) بأن الجين  $FSH\beta$  يحتوي على تركيبين وراثيين رئيسيين من المحتمل أن يؤثر على التكاثر، وقد أجريت معظم الدراسات السريرية على تعدد الأشكال الجيني SNP rs10835638 في منطقة المحفز للجين  $FSH\beta$  (-211G>T) فوجد أن الأليل T يقلل من النشاط النسخي للجين. أن تعدد الأشكال النيوكليوتيدية (-211G>T) لجين  $FSH\beta$  درست لأول مرة في السكان اليونانيين المصابين بالعقم وعند دراسة تعدد الأشكال بشكل منفصل تم الحصول على فروق ذات دلالة إحصائية تتعلق بمستويات LH (Anagnostou *et al.*, 2021a). بينت دراسة أن الطفرة -211G>T في جين  $FSH\beta$  أدت الى ظهور ثلاثة تراكيب وراثية في 213 امرأة إيطالية مصابة بالعقم، أذ وجد أن الأليل T الطافر ارتبط مع ارتفاع مستويات هرمون LH في النساء العقيمات المصابات بانتباز بطانة الرحم (Bianco *et al.*, 2021). كذلك أشار (Polyzos *et al.*, 2021) الى ندرة التركيب الوراثي الطافر TT لدى النساء الآسيويات مقارنةً بالنساء الأوروبيات، وذلك من خلال دراسته للكشف عن العلاقة بين تعدد الأشكال الوراثية لجين  $FSH\beta$  ومدى استجابة المبيض.

يقع جين *CYP17A1* (Cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1) على الذراع الطويل للكروموسوم العاشر (10q24.32) في الموقع 102837413-102830531 ويحتوي على 8 أكسونات و7 أنترونات ويبلغ طوله حوالي 6883 زوج قاعدي ويشفر هذا الجين لأنزيم CYP17 الذي يتألف من 508 حامض أميني ووزن جزيئي 57.4 كيلو دالتون (Singh et al., 2018; Kardelen et al., 2018). كما في الشكل (9). ويُعد من الجينات الرئيسية التي لها علاقة بحدوث العقم ومتلازمة تكيس المبايض لدى النساء (Liu et al., 2021). وهو جزء من عائلة الساييتوكروم CYP والتي تلعب دوراً في أيض الأستروجينات والهرمونات الستيرويدية ومستقبلات عامل النمو (Growth Factor Receptor) (Estrada et al., 2016). بينت دراسة أن أنزيم الساييتوكروم (CYP17) يعمل في المراحل الرئيسية من البناء الحيوي للهرمون الستيرويدي للمبيض والغدة الكظرية (Ashraf et al., 2021). هناك 18 عائلة من الساييتوكروم CYP (P450) في الثدييات مسؤول عنها 57 جيناً، لذلك فالتغيرات والأخطاء التي تتعرض لها الجينات تؤدي إلى أمراض وعيوب منها التكوّن الشاذ لهرمونات الستيرويد وعيوب في مسارات الأحماض الدهنية والكوليسترول والصفراء عدم أنتظام فيتامين D (Papi et al., 2018). إن إنزيم CYP17 مسؤول عن تكوين هرمون الذكورة الأندروجين، بينما يعمل إنزيم CYP19 لتحويل الأندروجين إلى أستروجين عطري (Munawar Lone et al., 2021). كما ويُعتقد أن زيادة إنتاج الأندروجين في متلازمة تكيس المبايض يحدث نتيجة لخلل في تنظيم الجينات المختلفة المشاركة في تخليق هرمونات الستيرويد، مثل *CYP17* و *CYP19* (Ali et al., 2022).

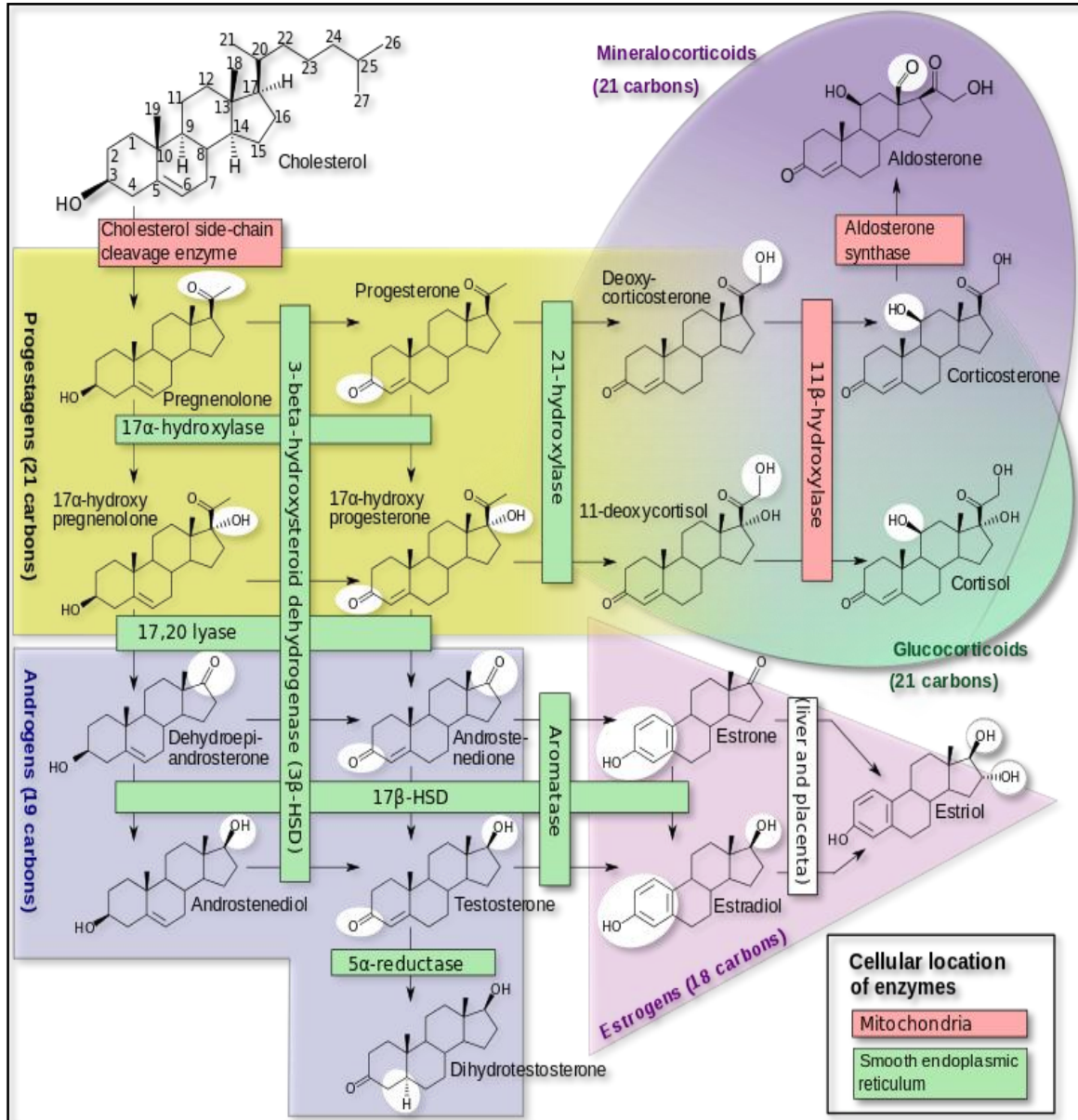


شكل (9): تركيب جين *CYP17* (El Ezzi et al., 2014)

## 2-18: دور إنزيم الأروماتيز في تصنيع الأندروجين

إن عملية تصنيع الأستروجين تحدث بوجود الكوليسترول المايتوكونديري والأندروجين كمواد أساسية لتصنيع مادة أندروستيستيرون التي تتحول إلى أستروجين بواسطة إنزيم الأروماتيز (Conley and Hinshelwood, 2001) (الشكل 6). ويتكون معقد الإنزيم من إنزيم الأروماتيز و NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate cytochrome reductase) وفلافو بروتين (Flavoprotein) (Bulun et al., 2005)، وإن هذا المعقد مرتبط بالشبكة الأندوبلازمية (Karkola, 2009). يتكون الإنزيم من حلقة حديد (Heme ring) وستة مواقع أخرى لتمييز المركبات (Substrate recognition sites) تسمى اختصاراً SRS (Gotoh, 1992) وتقع هذه المواقع على أجسام حلزونية تسمى helix وبإختلاف هذه الحلزونات والانحناءات ووجودها وعدم وجودها تختلف أنواع Cyp450 (الشكل 10) (Karkola, 2009).

تبدأ عملية تصنيع الأندروجين بتحول الكولسترول الى بريكنينولون (Pregnenolone) بواسطة الإنزيم (CYP11A1) Cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme (Nguyen *et al.*, 2013)، بعدها تدخل جزيئة بريكنينولون في مسارين (Al-Masoudi *et al.*, 2014): أولهما يكون في الأنسان، إذ يتحول الى 17 $\alpha$ -hydroxy Pregnenolone بواسطة الإنزيم (CYP17) (17 $\alpha$ -hydroxylase) وينفس الإنزيم تتحول الى dehydroepiandrosterone (DHEA) وبواسطة الإنزيم 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) تتحول الى Androstenedione (ASD) ثم يعمل الإنزيم 17 $\beta$ -hydrosteroid dehydrogenase (17 $\beta$ -HSD) على تحويلها الى التستوستيرون (Testosterone). أما المسار الثاني فيوجد في الفئران والهامستر وخنزير غينيا (Secchi *et al.*, 2021) فيختلف في كون البريكنينولون سيتحول الى بروجسترون والذي بدوره يتحول الى 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone ومن ثم الى ASD التي تتحول الى تستوستيرون، وبعد هذا يأتي دور معقد أنزيم الأروماتيز، إذ يعمل هذا المعقد على تحويل الأندروجين الناتج عن كلا المسارين الى أستروجين، ومن الجدير بالذكر أن هذا الأستروجين لا يصبح فعالا إلا بعد أن ترتبط به مجموعة سلفات فيتكون estrone-3-sulfate أو estradiol-3-sulfate (Karkola, 2009).



الشكل (10): مخطط لعملية تصنيع الاندروجين في الانسان ويظهر فيه دور انزيم الأروماتيز

## 19-2: التشكل الوراثي في جين *CYP17*

أشارت بعض الدراسات الى وجود ارتباط ما بين تباين أشكال النيوكليوتيدات المنفردة (SNP) لجين *CYP17* في منطقة 5'-UTR مع التغيرات في التعبير الجيني في معظم النساء العراقيات المصابات بمرض انتباز البطانة الرحمي (Al-Rubae'i et al., 2017). كذلك أجريت دراسة تبين

مدى ارتباط التباين الوراثي لجين *CYP17* في النساء المصابات بالعقم ومجموعة المقارنة في المجتمع الباكستاني، أذ توصلت الدراسة الى وجود فروق معنوية  $P < 0.05$  بين الأنماط الوراثية للجين المدروس (CC، TC، TT). وأوضحت دراسة أن التركيب الوراثي الخليط TC يرتبط بشكل كبير بقابلية الإصابة بمتلازمة تكيس المبايض لدى النساء العقيمات (Munawar Lone et al., 2021).

وفي دراسة أخرى أجريت للكشف عن تعدد أشكال النيوكليوتيدات المفردة (SNPs) في جين *CYP17*، حيث تم الكشف عن تغير وراثي T-34C في منطقة 5'-UTR أدى الى تكون ثلاثة تراكيب وراثية (A2A2، A1A2، A1A1) أذ لم يظهر بين تكرار الأليلات والتراكيب الوراثية أي فروق معنوية بين النساء العقيمات ومجموعة المقارنة عند مستوى  $P < 0.05$  كذلك وجود ارتفاع ملحوظ في مستوى هرمون التستوستيرون لدى النساء العقيمات الحاملة للتركيب الوراثي الطافر A2A2 مقارنةً بالتركيبين الوراثيين البري والهجين وهذا يشير الى وجود ارتباط وراثي بين التركيب الوراثي وفرط الاندروجين في المجتمع الكشميري (Ashraf et al., 2021). ومن الدراسات الأخرى التي قام بها Ali et al., (2022) للكشف عن العلاقة التشكلات الوراثية لجين *CYP17* ومتلازمة تكيس المبايض أذ كشف عن تغير أدى الى استبدال الثايمين (T) بالسائتوسين (C) عند الموقع 34- في منطقة المحفز حيث أشارت الدراسة الى أن وجود الأليل C لدى النساء يزيد من خطر الإصابة بتكيس المبايض. كذلك أوضحت دراسة أجريت في الصين إلى أن التغير الوراثي *CYP17* T/C (rs74357) في منطقة المحفز له دوراً كبيراً في زيادة قابلية الإصابة بمتلازمة تكيس المبايض لدى النساء الحاملات للأليل C، مما يشير إلى أن تعدد الأشكال الوراثية لجين *CYP17* قد يكون عاملاً مهماً للتنبؤ بخطر الإصابة بمتلازمة تكيس المبايض أو مسار مهم في اضطراب التمثيل الغذائي والهرموني المرتبط بمتلازمة تكيس المبايض (Liu et al., 2021).



## ثالثاً-المواد وطرائق العمل

**Materials and Methods**

1-3: الأجهزة والأدوات و المواد المستعملة في الدراسة

الجدول (1) الأجهزة المخبرية والادوات المستخدمة في استخلاص ومضاعفة الـDNA

الشركة المصنعة والمنشأ	اسم الجهاز او الاداة		ت
(Japan) Hirayama	Autoclave	جهاز تعقيم	1
Human Lab (Korea)	Biosafety cabinet	الكابينة المعقمة	2
Eppendorf (Germany)	Centrifuge	جهاز الطرد المركزي	3
Unsef (Russ)	Cool box	حافضة مبردة لنقل العينات	4
Denver (Germany)	Electrical sensitive balance	ميزان الكتروني حساس	5
Cleaver scientific (UK)	Electrophoresis constant power supply	مجهر الطاقة الكهربائية المستمر	6
Biometra (Germany)	Gel documentation	جهاز توثيق الهلامات	7
Bioneer (Korea)	Gel electrophoresis apparatus	جهاز الترحيل الكهربائي	8
Binder (USA)	Incubator	حاضنة	9
Shonic (China)	Microwave Oven	فرن الموجات الدقيقة	10
Unsef (Russ)	Thermal cycler (PCR)	المداور الحراري	11

CYAN ( Belgium)	Vortex	جهاز رجاج	12
Memmert (Germany)	Water bath	حمام مائي	13
Denville scientific (Poland )	Automatic Micropipettes	ماصات أوتوماتيكية مختلفة الاحجام	14

الجدول (2) المواد الكيميائية المستخدمة في استخلاص المادة الوراثية ومضاعفة القطع الجينية

الشركة المصنعة والمنشأ	اسم المادة		ت
Geneaid	DNA Extraction Kit	عدة استخلاص الـ DNA	1
UK	Absolute ethanol alcohol	كحول الايثانول المطلق	2
Bioneer –Korea	Ethidium Bromide stain	صبغة بروميد الاثيديوم	3
Bioneer-Korea	Buffer solution (TBE 10X)	محلول منظم	4
Monlinex -China	Agarose	الأكاروز	5
Denver –Germany	Loading dye	صبغة التحميل	6
Promega- USA	DNA Ladder (100)bp	معلم الحجم	7
Promega- USA	Deionized water	ماء منزوع الأيون	8
Bioneer-Korea	Master Mix	عدة تفاعل البلمرة	9

Jeitech (Korea)	Primers	البادئات	10
-----------------	---------	----------	----

**Samples of the study****3-2: عينات الدراسة**

جمعت 90 عينة دم بواقع 60 عينة سريرية من النساء العقيمات والمراجعات الى العيادات الخاصة في محافظة ميسان و30 عينة دم للنساء السليمات كمجموعة مقارنة وللفترة من 2021/10/20 الى 2021/11/25، جمعت المعلومات حول حالات العقم بإستعمال أستمارة توثيق المعلومات لتسجيل أسلوب حياتهم وعاداتهم والوزن والطول وتاريخهم العائلي وكانت الفئات العمرية بين (15-45) عاماً أما مجموعة المقارنة من النساء فكانت لهم دوره شهرية منتظمة ولم يكن هناك تاريخ لفقدان الحمل أو مضاعفات أخرى وتم جمع عينات مجموعة حالات العقم بحسب أنواع العقم الى مجموعتين تضمنت المجموعة الاولى 30 حالة عقم أولي جمعت أيضاً حسب فئتين عمريتين بواقع 15 حالة عقم من (15-30) عاماً و15 حالة عقم من (31-45) عاماً وكذلك المجموعة الثانية التي تضمنت 30 حالة عقم ثانوي جمعت بنفس تقسيم فئات المجموعة الأولى كما وتم جمع 30 عينة دم كمجموعة مقارنة من النساء اللاتي أنجبن أطفالاً بدون أي تدخل علاجي وذلك من أجل المقارنة بين هذه المجموعة ومجموعة النساء العقيمات.

**استمارة استبيان للمريضات**

العمر	دليل كلته الجسم (BMI)	عدد الأطفال	التاريخ العائلي	الوزن	الطول	عدد الاسقاطات	الاضطراب الهرموني

**3-3: طريقة جمع عينات الدم Method of collection blood samples**

جمعت عينات الدم من مجموعة النساء العقيمت ومجموعة المقارنة بعد حصول الموافقة الرسمية منهن والتأكد من تشخيصهن من قبل طبيبات أخصاص عن طريق توثيقهم لنتائج الفحوصات السريرية والمختبرية، حيث سحب 2 مليلتر من الدم الوريدي بوساطة محقنة طبية ووضعت العينة في أنبوبة تحتوي على مادة مانعة لمتخثر (EDTA) Ethylene diamine tetra acetic acid ورجت العينة بلطف لمنع التخثر، وبعدها وضعت في المجمدة بدرجة حرارة 20 - درجة مئوية ولحين وقت أستعمالها في أستخلاص الحامض النووي DNA.

**3-4: حساب مؤشر كتلة الجسم (BMI)**

تم حساب مؤشر كتلة الجسم حسب المعادلة التالية:

$$\text{مؤشر كتلة الجسم (BMI)} = \frac{\text{وزن الجسم (كغم)}}{(\text{الطول})^2 (\text{المتر})} \quad (\text{Vilarino et al., 2011})$$

**3-5: الدراسة الوراثية Genetic study**

تم إجراء الدراسة الوراثية في مختبر الوراثة الجزيئية والهندسة الوراثية في كلية العلوم - جامعة ميسان ( للفترة من 20 / 10 / 2021 ولغاية 25 / 3 / 2022 ) على 90 عينة من دم النساء العقيمت والسليمات بهدف أستخلاص المادة الوراثية DNA وتحديد التركيب الوراثية (Genotype) لجينات ( $FSH\beta$ ,  $FSHR$ ,  $CYP17$ ) ومعرفة طبيعة العلاقة مع مؤشر كتلة الجسم والعمر للنساء وكذلك نوعية الأحماض الأمينية المنتجة، فضلاً عن دراسة ومعرفة نسبة توزيع التركيب الوراثية الخاصة للجينات المذكورة أعلاه في النساء ومعرفة تكرار الأليلات والتركيب الوراثية التي تم الحصول عليها.

حيث تمثلت الدراسة الوراثية (التحاليل الوراثية) ما يلي:

- 1- أستخلاص المادة الوراثية (DNA) من عينات الدم.
- 2- الكشف عن وجود المادة الوراثية (DNA) بالترجيل الأولي.
- 3- استخدام تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لمضاعفة القطع الجينية المدروسة.
- 4- الترحيل الثانوي بالأكاروز وأستخدام معلمات الحجم (DNA Ladder 100-1000 bp) وذلك للتأكد من وجود الجين وحجم القطعة المدروسة.
- 5- استخدام تقانة تتابع القواعد النيتروجينية (Sequencing) لمعرفة أختلافات التراكيب الوراثية بين النساء العقيمات والسليمات.

### 3-6: القياسات والمحاليل المختبرية

#### 3-6-1: محلول Phosphate Buffered Saline (PBS)

حضر هذا المحلول بإذابة 8 و 0.2 و 1.44 و 0.24 غرام من NaCl و KCl و Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> و KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> على التوالي في 800 مل من الماء المقطر، وعدل pH إلى 7.4 ومن ثم أكمل الحجم بالماء المقطر إلى اللتر وعقم بواسطة جهاز التعقيم.

#### 3-6-2: محلول دائري Tris-Borate-EDTA buffer (TBE)

حضر 10X من محلول الدائري لغرض أستعماله بعد تخفيفه في الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis وذلك بإذابة 108 غرام من مادة Tris base و 55 غرام من حامض البوريك و Boric acid و 40 مليلتر من مادة Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) بتركيز 0.5 مولاري. أُضيف الماء المقطر وصولاً إلى لتر واحد بعد تعديل الأس الهيدروجيني (pH) إلى 8

هنا أصبح المحلول الدارئ (10X)، وعند العمل يحضر 1X من هذا الدارئ وذلك بإضافة 50 مل من الدارئ ويكمل الحجم الى 500 مل من الماء المقطر.

### 3-6-3: إنزيم Proteinase K

تم تحضير هذا الأنزيم وذلك بإذابة 20 مليغراماً من مادة Proteinase K في (1100) مايكرو لتر من الماء المقطر الخالي من إنزيم النيوكليز Nuclease-Free water.

### 3-6-4: هلام الأكاروز Agarose gel

حضر هلام الأكاروز بتركيز (1%) للكشف عن DNA، وبتركيز (2%) للكشف عن منتج التضخيم ، حيث تم إذابة 0.50 غرام للحصول على تركيز (1%) وكذلك 1 غرام من مادة الأكاروز للحصول على تركيز (2%) وعلى التوالي في 50 مل من محلول (1X TBE) بوضعه في دورق ثم سخن بواسطة فرن الموجات الدقيقة (المايكروويف) حتى ذوبان الخليط وبعد ذلك ترك المحلول في درجة حرارة الغرفة لتتخفض درجته إلى أقل من (60 م) وأضيف 3 مايكرو من الإثيديوم بروميد Ethidium bromide بعدها صب الهلام في قالب الترحيل الكهربائي الأفقي بعد وضع المشط المخصص له وترك حتى التصلب.

### 3-6-5: المعلم الجزيئي الحجمي للدنا DNA molecular size markers

أستعمل المعلم الجزيئي Molecular marker والمصنع من قبل شركة (Promega) بحجم كلي (100-1000) زوج قاعدي وبدرجات (100) زوج قاعدي.

### 3-6-6: البادئات Primers

البادئات الخاصة بقطع جينات كل من (*FSH $\beta$*  و *FSHR* و *CYP17*) تم تصنيعها وتجهيزها عن طريق شركة (Bioneer Corp.) الكورية والجدول (3) يوضح تتابعات البادئات وأحجام القطع والمصادر المعتمدة منها.

جدول (3) تتابع البادئات المستعملة في الدراسة

المصدر	حجم (bp)	تتابعات البادئات (5'→3')	اسم الجين
Grigorova et al., 2008	364	F: GGAGCCAGATCATGAAATGTT	<i>FSH<math>\beta</math></i>
		R: GACCAATGCTAGCCTGAAGC	
Rai et al., 2019	520	F: TTTGTGGTCATCTGTGGCTGC	<i>FSHR</i>
		R : CAAAGGCAAGGACTGAATTATCATT	
Antognelli et al., 2009	400	F: CATTGCACTTCTGGAGTC	<i>CYP17</i>
		R: GGCTCTTGGGGTACTTG	

### 3-7: عملية أستخلاص الحامض النووي DNA من الدم

تضمنت هذه العملية إخراج عينات الدم من المجمدة والأنتظار لمدة قصيرة حتى تدوب وتتحول الى حالة سائلة بهدف أستخلاص الدنا وتبعاً للتعليمات التي ترافق كل عدة أستخلاص الخاصة بالشركة المصنعة الجدول رقم (4) ووفقاً للخطوات الاتية:

1. تم تحضير أنبوية الأنزيم Proteinase K بإضافة 1100 مايكرو لتر من الماء المقطر منزوع الأيونات.
2. وضع 200 مايكرو لتر دم كل عينة بعد ذوبانها في أنابيب معقمة سعة 1.5 مل بواسطة ماصة أوتوماتيكية سعة (100-1000) مايكرو لتر.
3. أُضيف 200 مايكرو لتر من محلول Phosphate Buffered Saline- PBS.
4. أُضيف 20 مايكرو لتر من محلول أنزيم المذاب سابقاً إلى الأنبوية الحاوية على الدم لتكسير كريات الدم الحمراء بواسطة ماصة ذات حجم (5-50) مايكرو لتر.
5. مزجت محتويات الأنبوية بواسطة جهاز الرج (vortex) ولمدة قصيرة لغرض جعلها متجانسة ومن ثم حضن العينات في الحمام المائي لمدة 10 دقائق وعلى درجة حرارة 60 مئوية مع التقليب كل دقيقتين.
6. أُضيف 200 مايكرو لتر من محلول GSB إلى محتوى الأنبوية ومزجها جيداً بواسطة جهاز الرج وبعدها تحضن العينات لمدة 10 دقائق في الحمام المائي مع الملاحظة هنا بالتقليب كل دقيقتين وهنا يتحول المزيج ليصبح مخضراً.
7. إضافة 200 مايكرو لتر من الإيثانول المطلق لكل أنبوية ومزجها جيداً بإستعمال جهاز الرج.
8. نقل المزيج لكل أنبوية إلى إنابيب خاصة مرقمة بأرقام عينات الدم المأخوذة وتكون مجهزة وموجودة مع عدة الأستخلاص تسمى هذه الأنابيب أنابيب العمود الرابط والتي تم وضعها بداخل أنابيب أكبر تحتويها (أنابيب الجمع) بسعة 2 مل ومجهزة أيضاً مع عدة الأستخلاص مع مراعاة ترقيم جميع أنابيب التجميع أيضاً.



9. وضع أنابيب التجميع التي تحوي بداخلها أنابيب العمود الرابط في جهاز الطرد المركزي بسرعة 13500 دورة / دقيقة ولمدة دقيقة واحدة، ومن ثم التخلص من المحلول المترسب في أنابيب الجمع ونقل أنابيب العمود الرابط الى أنابيب جمع جديدة وذلك لكي تتم عملية الغسل لاحقاً.
10. إضافة 400 مايكرو لتر من محلول الغسل W1 لكل عينة في أنابيب العمود الرابط التي وضعت في أنابيب جمع جديدة ووضعها في جهاز الطرد المركزي وعلى سرعة 13500 دورة / دقيقة ولمدة 30 ثانية وبعدها التخلص من محلول الراسب المتجمع في أنابيب تجميع العمود الرابط وسكبه وأعادته إنابيب التجميع الفارغة مرة أخرى الى العمود الرابط.
11. إضافة 600 مايكرو لتر من محلول الغسل Wash buffer لكل انبوبة في أنابيب العمود الاول ولغرض إزالة بقايا الايثانول المطلق وبعد ذلك تم وضعها في جهاز الطرد المركزي وعلى سرعة 13500 دورة / دقيقة ولمدة 30 ثانية وبعدها تم التخلص من الراسب المتجمع في أنابيب الجمع وأرجاع أنابيب العمود الرابط الى أنابيب الجمع الفارغة مرة أخرى.
12. وضع أنابيب العمود الاول الموضوع في أنابيب التجميع في جهاز الطرد المركزي بسرعة 13500 دورة / دقيقة ولمدة 3 دقائق لغرض التجفيف.
13. نقل أنابيب العمود الاول الحاوي على ال DNA لكل عينة الى أنابيب سعة 1.5 مل (أنابيب أبندروف) والتي رقت مسبقاً مع أرقام العينات المأخوذة.
14. إضافة 100 مايكرو لتر من محلول Elution buffer المجهز مع عدة الأستخلاص لكل عينة وتركها لمدة 3 دقائق وبعدها إجراء طرد مركزي بسرعة 13500 دورة / دقيقة لغرض إذابة الدنا داخل أنابيب العمود الرابط ونزوله الى داخل الأبندروف المعقمة والمرقمة سابقاً وبهذه الخطوة تمت عملية أستخلاص الدنا. أما للتأكد من الدنا المستخلص نقوم بعملية الترحيل الكهربائي وبعدها

يحفظ الدنا في كيسٍ محكم جيداً لمنع التلوث وبدرجة -20 في المجمدة ولحين إجراء الفحوصات الجزيئية اللاحقة.

جدول (4) مكونات عدة استخلاص الدنا

ت	المواد	الكمية (مل)	الشركة
1	محلول تحليل كريات الدم الحمراء Proteinase K	135	Geneaid
2	GSB Buffer	40	
3	W1 (Washing Buffer1)	45	
4	W2 (Washing Buffer2)	25	
5	Elution Buffer	30	
6	GS Column	100pcs	
7	Collection Tube (2µl)	100pcs	

### 1-7-3: التحري عن وجود الحامض النووي المستخلص Extracted DNA

أعتمدت طريقة الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis لكي يتم التأكد من وجود الحامض النووي DNA بصورة مبدئية حيث أعتمدت طريقة (Sambrook *et al.*, 1989) فضلاً عن جهاز توثيق البيانات Gel documentation.

### 2-7-3: المواد المستخدمة في الترحيل الكهربائي

1. أكاروز Agarose.
2. المحلول المنظم (TBE 1X) المحضر من تخفيف المحلول المنظم (TBE 10X) من خلال إضافة 900 مل من الماء المقطر الى 100 مل من محلول (TBE 10X).
3. صبغة برومايد الأيثيديوم كمادة مشعة لرؤية حزم الـDNA.
4. صبغة التحميل loading dye.

### 3-7-3: خطوات عملية الترحيل الكهربائي

1. وزن 0.5 غرام من مسحوق الأكاروز بتركيز 1% باستخدام الميزان الحساس وإذابته في حجم 50 مل TBE 1X والموضوع في دورق زجاجي.
2. وضع المحلول في فرن كهربائي (Microwave) ولمدة دقيقتين لغرض إذابة الأكاروز من خلال القيام بالتسخين الى حين التأكد من إن المزيج أصبح رائقاً خالياً من أي دقائق عالقة في السائل.
3. يترك المحلول لكي يبرد ليصل الى 60 درجة مئوية أي يصبح دافئاً.
4. أضيف 3 مايكرو لتر من صبغة برومايد الأيثيديوم (Ethidium Bromide) الى المحلول الدافئ ومزجها جيداً لكونها تعطي توهجاً للحامض النووي عند اتحادها معه أثناء الترحيل.
5. وضع حوض الترحيل (Tray) على سطح مستوٍ وتثبت فيه الأمشاط (Combs) لعمل الحفر (wells) في مادة الجل قرب إحدى نهايتي الحوض (عدد الحفر تختلف تبعاً لعدد أسنان المشط) ويتم صب المحلول المحضر أعلاه برفق لمنع تكون أي فقاعة.
6. ترك حوض الترحيل دون أي تحريك لحين تصلب الهلام بدرجة حرارة الغرفة بعدها يتم إزالة المشط بعناية للحصول على الحفر المتكونة في الهلام واللازمة لحقن عينات الـDNA.

7. وضع الخزان على سطح مستوٍ بعدها يملأ بدارئ (TBE X1) (Sambrook *et al.*, 2001) ويربط به القطبين السالب والموجب والمتصلة مع جهاز القدرة Power supply، ثم يوضع الحوض الحاوي على الهلام في الخزان حتى يغمر دارئ TBE الهلام والحفر من جهة القطب السالب.
8. مزج 2 مايكرو لتر من صبغة التحميل Loading dye مع 3 مايكروليتر من DNA (لكل عينة) وحقنها في حفر الهلام التي أعدت مسبقاً، ثم يُشغل مصدر الطاقة بفرق جهد (85 فولت) ولمدة ساعة.
9. بعد أنتهاء الترحيل، تم أخراج الهلام من حوض الترحيل وأستخدم جهاز توثيق البيانات Gel documentation للتأكد من نجاح عملية أستخلاص الدنا، ثم صور الهلام لغرض توثيق النتائج.

### 3-8: التفاعل السلسلي للبوليمريز (PCR)

جهزت المواد الخاصة بتقنية PCR وتم تحضير مزيج التفاعل في مكان نظيف ومعقم في كابينة خاصة (PCR Cabinet) التي تحوي الأشعة فوق البنفسجية (UV) Ultraviolet لتعقيم الماصات الدقيقة والتبات مع مراعاة ارتداء القفازات الطبية عند العمل، حيث حضر مزيج تفاعل PCR في أنبوبة أبندروف سعة (100) مايكرو لتر تحوي master mix الجهاز من شركة Bioneer الكورية وكان الحجم النهائي للمكونات (50 مايكروليتر) ثم وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي الصغير لمدة 30 ثانية كما في جدول 5.

جدول (5) كميات المواد المستعملة في تقنية PCR-DNA (مايكروليتر)

الحجم النهائي	ماء مقطر	البادئات		قالب DNA	Master Mix	المادة الكيميائية
		Reverse	Forward			
50	22	4	4	10	10	الحجم

ضبطت درجة الحرارة لجهاز المبلمر الحراري (PCR) ووقت ودرجة حرارة الألتصاق Annealing temperature بعد تغيير الوقت ودرجة الحرارة لعدة مرات وتبعاً لنوع البادئ وبعد معرفة درجة الحرارة المثلى لعمل كل بادئ وثقت مع عدد الدورات وكانت كما في الجداول (6 و7 و8).

جدول (6) البرنامج الخاص ببادئات تقنية PCR-DNA لجين *FSHR*

عدد الدورات	الزمن (دقائق)	درجة الحرارة (مئوي)	المراحل
1	5:00	95	Initial Denaturation
35	1:00	95	Denaturation
	0:45	56	Annealing
	0:45	72	Extension
1	5:00	72	Final Extension
-	حسب الرغبة	4	Final hold

جدول (7) البرنامج الخاص ببادئات تقنية PCR-DNA لجين *FSHB*

عدد الدورات	الزمن (دقائق)	درجة الحرارة (مئوي)	المراحل
1	5:00	95	Initial Denaturation

35	1:00	95	Denaturation
	0:45	60	Annealing
	0:30	72	Extension
1	7:00	72	Final Extension
-	حسب الرغبة	4	Final hold

جدول (8) البرنامج الخاص ببيادانات تقنية PCR-DNA لجين *CYP17*

عدد الدورات	الزمن (دقائق)	درجة الحرارة (مئوي)	المراحل
1	5:00	95	Initial Denaturation
35	1:00	95	Denaturation
	0:30	56	Annealing
	0:30	72	Extension
1	5:00	72	Final Extension
-	حسب الرغبة	4	Final hold

**1-8-3: الكشف عن منتج تضخيم القطع الجينية DNA product detection**

أجريت عملية الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز بالخطوات المذكورة نفسها في 3-5-4 بأستثناء تركيز الأكاروز الذي كان 2 % وإضافة مؤشر الدليل الحجمي DNA Marker في الحفر الجانبية وذلك بوضع 3 مايكروليتر منه في أول حفرة من جهة اليسار من قطعة جل الأكاروز أما بقية الحفر فُحَقن فيها منتج التضخيم PCR بمقدار (5) مايكروليتر ثم القيام بترحيل منتج التضخيم بتيار كهربائي 75 فولت و65 ملي أمبير ولمدة ساعة واحدة وبعد أنتهاء الترحيل تم فحص الهلام بجهاز

توثيق البيانات Gel documentation للتأكد من نجاح التضخيم ولمعرفة حجم الحزم في هلام الأكاروز.

### DNA Sequencing

### 9-3: تحديد التسلسل المتتابعي للدنا

لغرض التحري عن التسلسل المتتابعي للقواعد النيروجينية أرسلت نماذج العينات بمقدار 30 مايكروليتر من القطع المكثرة من الجينات (PCR Product) إلى خارج القطر وتحديدًا شركة Macrogen الكورية، وقد أجريت عملية التتابع (Sequencing) للشريط الأمامي Forward وحسب طلبنا من الشركة، أذ جاءت النتائج ملفات خاصة يمكن فتحها والتعامل معها باستخدام تقنيات المعلوماتية الحيوية والخوارزميات كأداة التحليل (Blast) حيث ساعدت هذه الأداة في مقارنة نتائجنا مع البيانات العائدة لنفس الجينات الموجودة في المركز الوطني الأمريكي للتقانات الاحيائية (NCBI) التي درست سابقاً في دول مختلفة من العالم.

### Genetic diversity

### 1-9-3: التنوع الوراثي

حسب كل من عدد التسلسلات (N) والتشكل الوراثي Number of polymorphic (NH) باستخدام برنامج DnaSP ver. 5.10 (Excoffier and Lischer, 2010) بين النساء العقيمات ومجموعة المقارنة في محافظة ميسان.

### Genotypes

### 2-9-3: التراكيب الوراثية

تم أستخراج التراكيب الوراثية عن طريق برنامج Geneious Software (الأصدار 10.1.3) أذ تمت مقارنة تسلسلات العينات القياسية والمصابة بالعقم من النوع الأول والثاني مع التركيب الوراثي للنساء الموجود في بنك الجينات العالمي.

### 10-3: رسم البروتين ثلاثي الأبعاد (3D)

رسم البروتين ثلاثي الأبعاد حسب الخطوات الآتية:

1. تحويل تتابعات DNA بصيغة FASTA الى تتابعات أحماض أمينية بالصيغة نفسها بإستخدام برنامج Blast في موقع NCBI على شبكة الانترنت.
2. أستخدام برنامج Phyre2 V.2.0 لتحويل تتابعات الأحماض الأمينية من صيغة FASTA الى صيغة PDB والتنبؤ بشكل البروتين ثلاثي الأبعاد بوقت يتراوح بين 2-6 ساعة (Kelley *et al.*, 2015).
3. أستخدام برنامج EzMol V.1.22 لغرض رسم أشكال البروتين ثلاثية الأبعاد مع تحديد مكان تغير الطفرة الوراثية على البروتين (Reynolds *et al.*, 2018).

### 11-3: التحليل الإحصائي

تم تحليل البيانات بإستخدام البرنامج الاحصائي Statistical Package for Social Sciences ver. 24 (SPSS) قورنت الفروق المعنوية للمتوسطات بإستخدام أختبار أقل فرقاً معنوياً



تحت مستوى احتمالية  $P < 0.05$ ، حلت تكرارات التراكيب الوراثية والأليلات والنسبة الحرجة (OR) ومدة الثقة Confidence Intervals (CI) بإستعمال البرنامج MedCalc وكذلك حلت النتائج بإستخدام قانون التوازن هاردي-واينبرغ Hardy-Weinberg equilibrium تبعاً للبرنامج في الموقع

الإلكتروني [www.had2know.com/academics.html](http://www.had2know.com/academics.html)

## رابعاً – النتائج والمناقشة

### Results and Discussion

#### 1-4: العلامات السريرية للنساء المصابات بالعمق

شمل العدد الكلي لعينات الدراسة الحالية 90 عينة دم، تضمنت 60 عينة للنساء المصابات بالعمق والذي كان على نوعين رئيسيين هما العمق الاولي والعمق الثانوي، فضلاً عن 30 عينة دم من نساء سليماً كمجموعة مقارنة.

#### Body Mass Index (BMI)

#### 1-1-4: مؤشر كتلة الجسم

يعد مؤشر كتلة الجسم (BMI) من أهم العلامات المميزة التي تدل على العمق في النساء، إذ يشير جدول (9) الى وجود زيادة معنوية في مؤشر كتلة الجسم عند مستوى (0.05) حيث بلغ (0.72)  $\pm 27.47$  كغم/م<sup>2</sup> في النساء العقيمات مقارنةً مع عينة المقارنة (0.59  $\pm 21.25$ ) كغم/م<sup>2</sup>. واتفقت هذه النتيجة مع ما توصل اليه (Khmil et al., 2020) الذي وجد بأن السمنة تؤدي إلى تفاقم الخلل الهرموني لدى النساء المصابات بالعمق الناجم عن متلازمة تكيس المبايض.

جدول (9): مقارنة مؤشر كتلة الجسم في النساء العقيمات والمقارنة.

مؤشر كتلة الجسم (Kg/m <sup>2</sup> )	المجموعة
Mean $\pm$ SD	
27.47 $\pm$ 0.72	النساء العقيمات
A	
21.25 $\pm$ 0.59	المقارنة
B	
0.05	مستوى المعنوية

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنوياً.

## Family History of infertility

## 4-1-2: التاريخ العائلي للعقم

يعتبر التاريخ العائلي أحد أهم أدوات التشخيص وتقييم المخاطر في علم الوراثة الطبية إذ تبين في جدول (10) أن للنساء العقيمات تاريخاً عائلياً مرتبطاً بالعقم بنسبة 68.33% مقابل 31.67% ليس لديهن تاريخ عائلي وهذا يتفق مع ما توصل اليه (Rich *et al.*, 2004) الذي عد التاريخ العائلي لأي مرض بمثابة عنصر حاسم في استخدام الأختبارات الجينية في الرعاية الأولية ولكون التثقيف الطبي حول تاريخ العائلة غير متطور وأستخدامه في الرعاية الأولية للمرضى محدوداً لذلك هناك حاجة إلى أدوات جديدة لمساعدة أطباء الرعاية الأولية في جمع البيانات والتطبيق الفعال لتاريخ عائلة المريض في عصر التطور الوراثي. وهنا أوضح (Vance and Zouves (2005) بأن يتم تقييم مخاطر التاريخ العائلي في العقم للأزواج بالتعرف على المخاطر الجينية المؤثرة على الحمل. بينت دراسة أخرى دور التاريخ العائلي في متلازمة تيرنر Turner أو مرض تكيس المبايض حيث كان من الدرجة الأولى لدى الاقارب (Dabrowski *et al.*, 2019).

جدول (10): بعض العلامات السريرية ونسبها المئوية في النساء المصابات بالعقم.

النسبة المئوية	العدد	المظاهر	
68.33%	41	Yes	التاريخ العائلي
31.67%	19	No	
85%	51	Yes	الاضطرابات الهرمونية
15%	9	No	
21.67%	13	Yes	الإجهاض
78.33%	47	No	

## Hormonal disorders

### 3-1-4: الأضطرابات الهرمونية

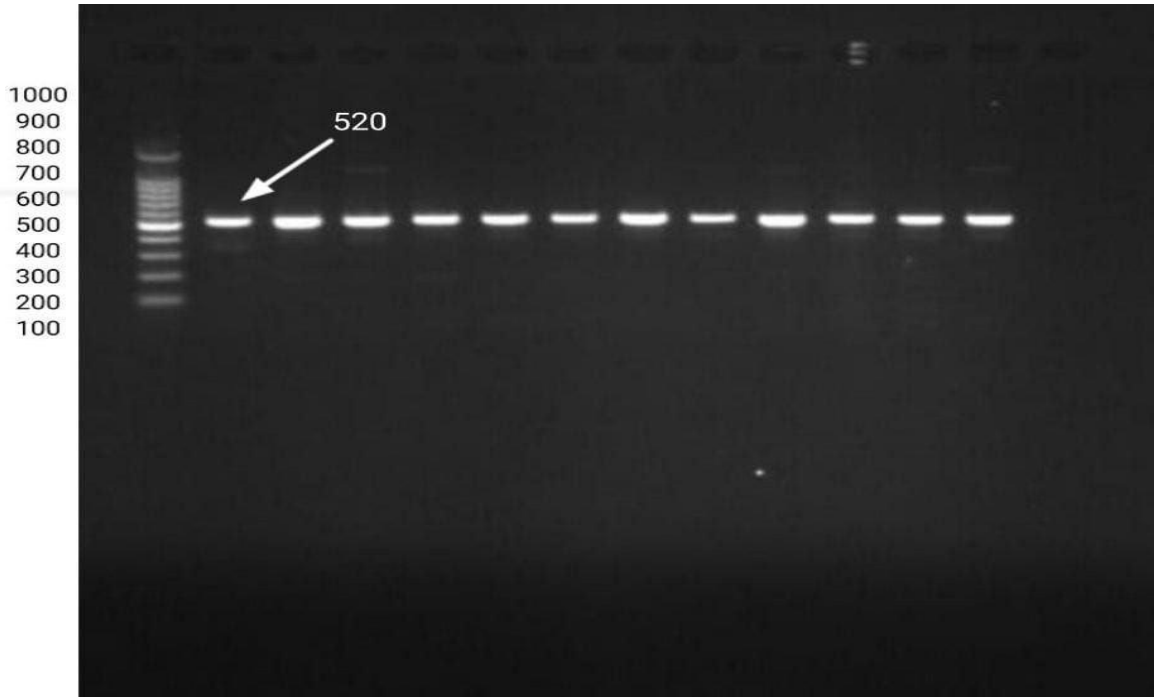
أظهرت النتائج في جدول (10) أن 85% من النساء قيد الدراسة تعاني من اضطرابات هرمونية مقابل 15% كان لديهن مستوى هرموني منتظم، يعد الاضطراب الهرموني أحد أهم مسببات العقم إذ تعاني بعض النساء المصابات بالعقم من اضطرابات في الدورة الحياتية ناتجة عن اضطرابات في مستويات الهرمونات فعند زيادة مستوى هرمون الاندروجين عن مستواه الطبيعي تحصل اضطرابات في الدورة الحياتية فتتوقف الإباضة أحياناً وقد يحصل تكيس للمبايض (Leon *et al.*, 2021)، وكذلك في دراسة (Claahsen-van der Grinten *et al.*, 2021) الذي ذكر أن السيطرة الهرمونية هي المفتاح المهم لوظيفة الغدد التناسلية لذلك يجب إجراء قياسات منتظمة للستيرويدات الكظرية ومستقبلاتها بالإضافة إلى ذلك يجب تقييم هرمونات محور تحت المهاد - النخامية - الغدة التناسلية في الإناث ومراعاة أنتظام الدورة الشهرية وذلك لأنها ممكن أن تسبب ضعف الغدد التناسلية واضطرابات الدورة الشهرية وضعف الخصوبة عند الإناث. كذلك بينت دراسة أخرى (Khmil *et al.*, 2020) أن السبب الأكثر شيوعاً لعقم النساء هو اضطرابات الإباضة. وقد أوضح (Nasser *et al.*, 2021) العلاقة بين الهرمونات (PRL وLH وFSH وTSH) والعقم عند النساء العراقيات في محافظة بغداد، إذ أظهرت النتائج ارتفاع معنوي في مستوى هرمون البرولاكتين ( $P < 0.01$ ) بين النساء المصابات بالعقم مقارنة بالمجموعة السليمة (مجموعة المقارنة) أشارت النتائج بالإضافة إلى ذلك إلى وجود فرق معنوي عند ( $P < 0.01$ ) لمستوى هرمون TSH للنساء العقيمات ولم تكن هناك فروق ذات دلالة إحصائية في مستوى (FSH) بين النساء المصابات بالعقم ومجموعة المقارنة.

**Abortion****4-1-4: الأجهاض (الأسقاطات)**

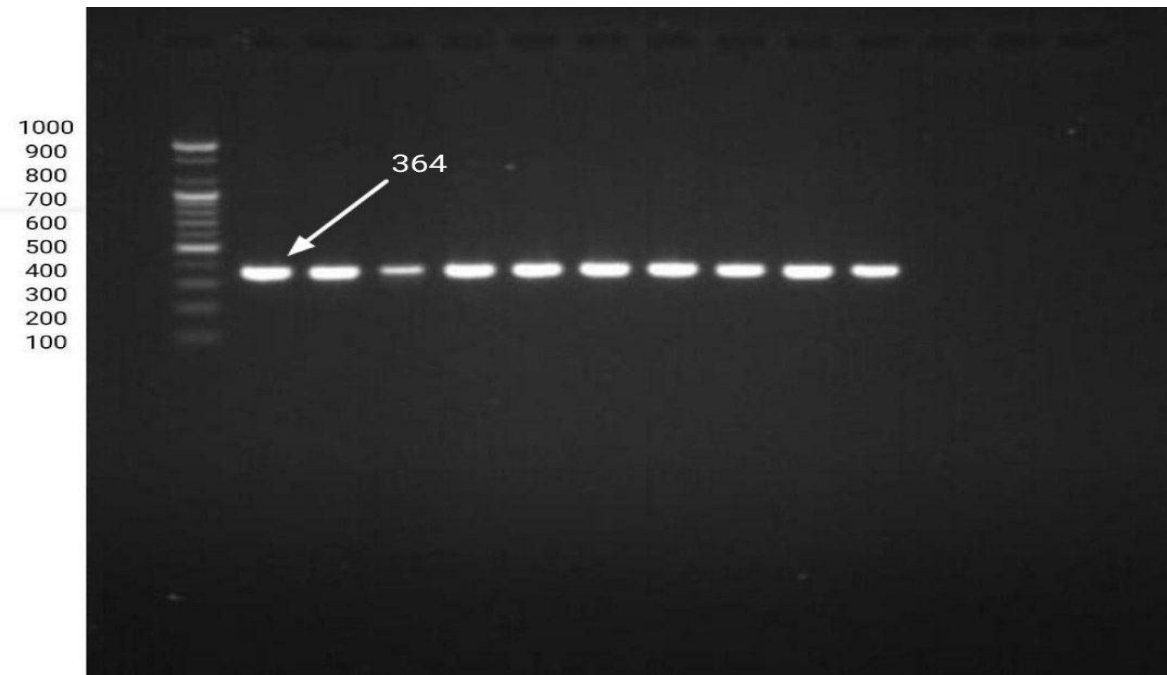
يوضح جدول (10) بأن للإجهاض دوراً مؤثراً أيضاً على بعض حالات العقم لدى النساء في محافظة ميسان إذ بلغت نسبة الأسقاطات لدى النساء المصابات بالعقم حوالي 21.67% مقابل 78.33% مصابات بالعقم ولم تتعرض لأي حالة أسقاط وهذا يتفق مع ما ذكره الباحث (Pike, 2020) بأن أحد العوامل المحتملة التي قد تؤثر سلباً على خصوبة الإناث هي الإجهاض، فقد بينت الدراسة أن الاجهاض المتكرر قد يكون مرتبطاً بارتفاع مستوى هرمون التستوستيرون وهرمون الاباضة (LH).

**Genetic characterization****4-2: التوصيف الوراثي****4-2-1: أستخلاص وتضخيم DNA**

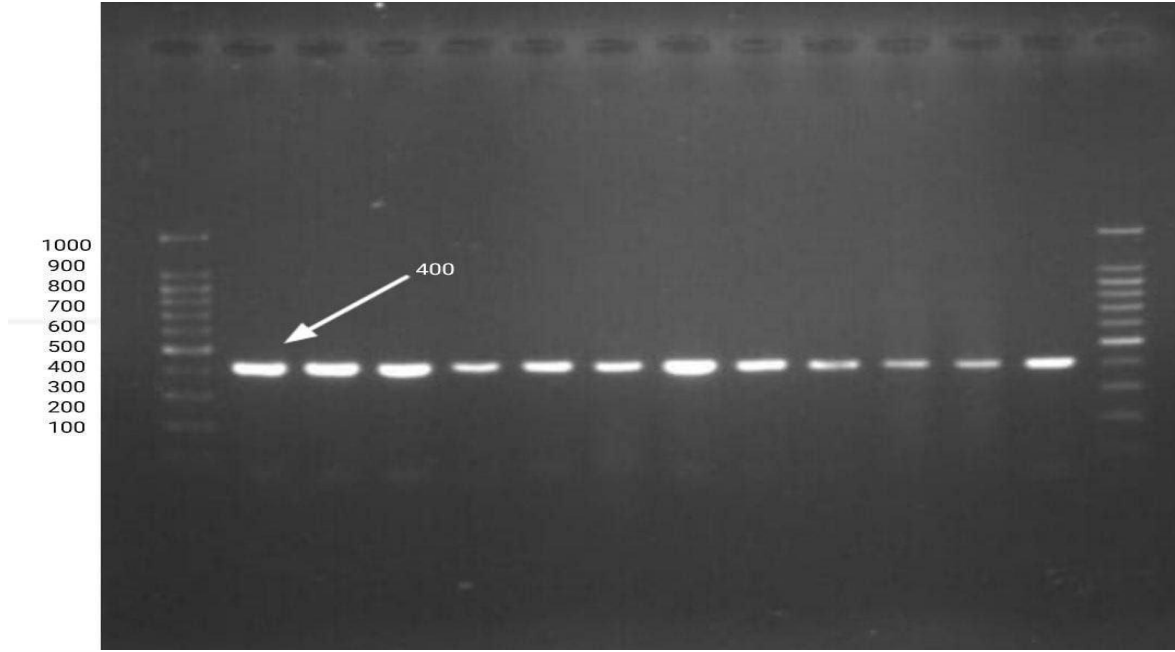
تم العمل على أستخلاص الـ DNA كمرحلة أولى من عينات الدم من خلال تحطيم الدم وأستخراج الـ DNA الكروموسومي (Genomic DNA) تمهيداً لعزل القطع المحددة من الجينات المدروسة ومضاعفتها بتقانة PCR وباستخدام العدة الخاصة (Kit) وفق طريقة العمل المختبرية التي ذكرت أنفاً في فصل مواد وطرائق العمل، وتم إجراء الترحيل الكهربائي لجميع العينات للتأكد من نجاح عملية استخلاص DNA، إذ أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز 2% نجاح عملية تضخيم DNA، حيث أعطى جين *FSHR* حزمة بحجم 520 زوج قاعدي وأعطى جين *FSHβ* حزمة بحجم 364 زوج قاعدي وأعطى جين *CYP17* حزمة بحجم 400 زوج قاعدي (الاشكال 11 و 12 و 13) ونتائج تحليل التسلسلات (ملحق 1 و 2 و 3).



شكل (11) منتج التضخيم لجين *FSHR* على هلام الأكاروز 2%.



شكل (12) منتج التضخيم لجين *FSHβ* على هلام الأكاروز 2%.



شكل (13) منتج التضخيم لجين *CYP17* على هلام الأكاروز 2%.

#### 4-2-2: التنوع الوراثي Genetic diversity

تم استخدام تقانة تتابع القواعد النيروجينية (DNA Sequencing) حسب الطريقة المشار إليها في فصل المواد وطرائق العمل، وقد توفر لدينا ثلاثة ملفات: الأول هو ملف المنحنيات البيانية (Curves) ويكون بصيغة (Pdf) وقد تم الاستفادة منه في التعرف على التراكيب الوراثية للجينات في عينات الدراسة، أما الثاني ويكون بصيغة (abi) وهو ملف الرسم الكهربائي ويستخدم في برامج المعلوماتية الحيوية لتحديد تتابع القواعد النيروجينية والكشف عن وجود أو عدم وجود الطفرات الوراثية والتغير في الحامض الأميني والملف الثالث يكون بصيغة (FASTA) وهو مصطلح في المعلوماتية الحيوية يمثل تسلسل نيوكليوتيدي أو أحماض أمينية ويتم الاستفادة منه في رسم البروتين ثلاثي الأبعاد. علماً أنه تم حذف بعض القواعد النيروجينية غير المتطابقة (Rubbish) في بداية ونهاية القطع المدروسة من الجينات الثلاثة للحصول على نتائج أكثر دقة.

#### 4-2-2-1: مقاييس التنوع الوراثي لجين *FSHR*

أظهرت بعض المقاييس الوراثية لجين *FSHR* أن عدد التسلسلات الكلية 12 تسلسلاً تكون منها ثلاثة تشكلات وراثية (NH) توزع الى تشككين وراثيين في النساء المصابات بالعقم من النوع الأول وثلاث تشكلات وراثية في النساء المصابات بالعقم من النوع الثاني بينما في عينة المقارنة ظهر تشكلاً وراثي واحد. بلغ عدد طفرات الانتقالات والحذف الكلية طفرة وراثية واحدة لكل منهما، وكانت هذه المنطقة غنية بمحتواها من القواعد النيروجينية السايتوسين C والثايمين T (جدول 11). من جهة أخرى أن الطفرتين التي حدثت أثرت أحدهما في تغير أنتاج الاحماض الامينية، وبالتالي أدت الى اختلاف نسب القواعد النيروجينية في تتابعات جين *FSHR* لدى مجموعة المقارنة والنساء المصابات بالعقم بنوعيه التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة ( Visual Bioinformatics Tools, 2022).

جدول (11) بعض المقاييس الوراثية لجين *FSHR* في النساء العقيمات والمقارنة

المقاييس الحيوية	العقم نوع 1	العقم نوع 2	المقارنة	الكلية *
عدد التسلسلات sequences (N)	4	4	4	12
عدد التشكلات الوراثية of polymorphic (NH)	2	3	1	3
عدد الانتقالات transitions	0	1	0	1
حذف Deletion	1	1	0	1
محتوى النيوكليوتيدات Nucleotide composition	C: 30.7% T: 28.3% A: 24.6% G: 16.4%	C: 31.0% T: 28.3% A: 24.5% G: 16.2%	C: 31.3% T: 27.9% A: 24.5% G: 16.3%	
نسبة GC	47.0%	47.2%	47.6%	

\*وجود تشكلات وراثية وانتقالات مشتركة



#### 4-2-2-2: مقاييس التنوع الوراثي لجين $FSH\beta$

الجدول (12) يوضح بعض المقاييس الوراثية لجين  $FSH\beta$  أذ بلغ عدد التسلسلات الكلية 20 تسلسلاً تكون منها تشككين وراثيين (NH) توزع على تشككٍ وراثيٍّ واحدٍ لكل من النساء المصابات بالعقم من النوع الأول ومجموعة المقارنة وتشككين وراثيين في النساء المصابات بالعقم من النوع الثاني، وبلغ عدد طفرات التحولات الكلية طفرة واحدة وكذلك كانت المنطقة المدروسة غنية بمحتواه من القواعد النيتروجينية الأدينين A والكوانين G ، وكان موقع الأستبدال في منطقة المحفز أذ استبدلت القواعد النيتروجينية في الموقع 211-، فحدث أستبدال القاعدة النيتروجينية الكوانين G بالقاعدة النيتروجينية الثايمين T.

جدول (12) بعض المقاييس الوراثية لجين  $FSH\beta$  في النساء العقيمات والمقارنة

المقاييس الحيوية	العقم نوع 1	العقم نوع 2	المقارنة	الكلي *
عدد التسلسلات Number of sequences (N)	8	8	4	20
عدد التشكلات الوراثية Number of polymorphic (NH)	1	2	1	2
عدد التحولات Number of transversions	1	1	1	1
محتوى النيوكليوتيدات Nucleotide composition	C: 20.7% T: 24.5% A: 29.2% G: 25.6%	C: 20.4% T: 25.4% A: 29.0% G: 25.2%	C: 19.9% T: 23.7% A: 28.9% G: 27.5%	
نسبة GC	46.4%	45.6%	47.4%	

\*وجود تشكلات وراثية وتحولات مشتركة

#### 4-2-2-3: مقاييس التنوع الوراثي لجين *CYP17*

أظهرت نتائج التنوع الوراثي لجين *CYP17* أن عدد التسلسلات الكلية 12 تسلسلاً نتج عنها ثلاثة تشكلات وراثية (NH) توزع الى تشككين وراثيين في كل من النساء المصابات بالعقم من النوع الأول والنوع الثاني في حين وجد تشكلاً وراثياً واحداً في مجموعة المقارنة. بلغ عدد طفرات التحولات الكلية طفرة واحدة وكان التسلسل المدروس غني بمحتواه من القواعد النيتروجينية السابتوسين C (جدول 13)، كذلك يوضح الجدول أستبدال القواعد النيتروجينية في الموقع 34- من منطقة المحفز، إذ حدث أستبدال القاعدة النيتروجينية الثايمين T بالقاعدة النيتروجينية السابتوسين C.

جدول (13) بعض المقاييس الوراثية لجين *CYP17* في النساء العقيمات والمقارنة

المقاييس الحيوية	العقم نوع 1	العقم نوع 2	المقارنة	الكلي *
عدد التسلسلات Number of sequences (N)	4	4	4	12
عدد التشكلات الوراثية Number of polymorphic (NH)	2	2	1	2
عدد الانتقالات Number of transitions	1	1	1	1
محتوى النيوكليوتيدات Nucleotide composition	C: 32.0% T: 24.7% A: 19.1% G: 24.2%	C: 31.9% T: 24.5% A: 19.3% G: 24.3%	C: 31.5% T: 24.5% A: 19.9% G: 24.1%	
نسبة GC	56.2%	56.2%	56.6%	

\*وجود تشكلات وراثية وانتقالات مشتركة

رغم أن الأختلاف في نسبة القواعد النيتروجينية (النيوكليوتيدات) ضئيل فإنه يمكن أن تعزى الأختلافات في نوع العقم الى التباين في نسب القواعد النيتروجينية، إذ ذكرت الدراسات أن البروتينات الحاوية على نسبة عالية من أزواج القواعد النيتروجينية GC رغم أنها تكون أكثر استقراراً من

البروتينات الحاوية على نسبة أقل والسبب في ذلك يعود الى الأصرة الهيدروجينية بين القاعدة النيتروجينية C والقاعدة النيتروجينية G هي أصرة ثلاثية (Zheng ; Yakovchuk *et al.*, 2006) الا أنها تخضع لأنحلال ذاتي بصورة أسرع مما يقلل من طول عمر الخلية. وتتفق هذه النتائج أيضاً مع دراسة (Bohlin *et al.*, 2017) الذي أشار الى أن الأختلاف في تكوين النيوكليوتيدات يؤدي الى تكوين الأنماط الوراثة المختلفة.

### Multiple Sequence Alignment

### 3-4: محاذاة التسلسل المتعدد

#### 1-3-4: جين *FSHR*

بينت نتائج تحليل تسلسل القواعد النيتروجينية بطريقة محاذاة التسلسل المتعدد (MSA) (Clustal omega 1.2.3. , 2022) الكشف عن تغييرين وراثيين لجين مستقبل الهرمون المحفز لنمو الحويصلات *FSHR* في النساء العقيمات مقارنةً مع مجموعة المقارنة من النساء السليمات ومع التتابعات المذكورة في بنك الجينات لنفس الجين تحت رقم الانضمام (KR711781.1).

أذ تم الكشف في الأكسون العاشر لجين *FSHR* وتحديداً في الموقع 2001 عن طفرة حذف للقاعدة النيتروجينية A لكل من عينات العقم الاولي والثانوي، كذلك تم الكشف في عينات العقم الثانوي عن طفرة وراثية محسوسة أستبدلت فيها القاعدة النيتروجينية A بالقاعدة النيتروجينية G عند الموقع 2039 (2039 A>G) من تسلسل النيوكليوتيدات الكلي للأكسون العاشر كما في الشكل (14).

كانت هذه النتيجة مطابقة لما توصل اليه (Trevisan *et al.*, 2019) في دراستهم على النساء البرازيليات المصابات بالعقم في حصولهم على الطفرة A2039G. وأيضاً في دراسة (García- Jimémez *et al.*, 2018) على النساء المكسيكيات أذ تم الكشف عن الطفرة الوراثة (A2039G) في جين *FSHR*. كذلك في دراسة (Tănase *et al.*, 2020) على النساء الرومانيات حيث تم الحصول على الطفرة (A2039G). وكذلك في دراسة (Conforti *et al.*, 2022) التي أجريت على

النساء الاوربيات بينت بأن وجود التشكلات الوراثية في جين *FSHR* مؤشراً لإمكانية حدوث العقم عند النساء. وبالنسبة الى طفرة الحذف فأنها تعد طفرة جديدة ولم تسجل في الأنسان أي انها لم تسجل تحت أي رقم انضمام في بنك الجينات (NCBI BLAST, 2022) إذ لم تتطرق الدراسات حول جين *FSHR* الى الطفرة التي حدثت في هذا الموقع.

وبالعودة الى نتيجة الكشف عن تسلسل القواعد النيتروجينية (DNA sequences) نلاحظ حدوث الطفرات الوراثية في تتابعات القواعد النيتروجينية وعلى الرغم من حدوث طفرتين فقط هما طفرة حذف القاعدة النيتروجينية الادنين وطفرة وراثية محسوسة (ترمز الى حامض أميني جديد) الا أنهما أثرا بشكل معنوي أي لهم الامكانية في حدوث العقم، وهذا يتفق مع ما أشار اليه Conforti *et al.*, (2022) اذ ذكر ان حدوث الطفرات الوراثية المحسوسة وغير المحسوسة في جين *FSHR* تؤثر في البروتينات ذات الصلة عن طريق التغير في عملية النسخ وبالتالي تؤثر على دقة وكفاءة الربط مع mRNA وهذا ما يفسر التأثير الحاصل في مستوى الهرمونات وبالتالي انخفاض معدل الحمل في التشكلات الوراثية لجين مستقبلات الهرمونات المحفزة لنمو الحويصلات التي تعرضت الى طفرات.

KR711781.1	GCCTTTGTGGTCATCTGTGGCTGCTATATCCACATCTACCTCACAGTGCAGGAAACCCCAAC	1680
Control	-----ACCCCAAC	8
Primary	-----ACCCCAAC	8
Secondary	-----ACCCCAAC	8
	*****	
KR711781.1	ATCGTGTCTCTCTAGTGACACCAGGATCGCCAAGCGCATGGCCATGCTCATCTTCACT	1740
Control	ATCGTGTCTCTCTAGTGACACCAGGATCGCCAAGCGCATGGCCATGCTCATCTTCACT	68
Primary	ATCGTGTCTCTCTAGTGACACCAGGATCGCCAAGCGCATGGCCATGCTCATCTTCACT	68
Secondary	ATCGTGTCTCTCTAGTGACACCAGGATCGCCAAGCGCATGGCCATGCTCATCTTCACT	68
	*****	
KR711781.1	GACTTCCTCTGCATGGCACCCATTCTTTCTTTGCCATTTCTGCCTCCCTCAAGGTGCCC	1800
Control	GACTTCCTCTGCATGGCACCCATTCTTTCTTTGCCATTTCTGCCTCCCTCAAGGTGCCC	128
Primary	GACTTCCTCTGCATGGCACCCATTCTTTCTTTGCCATTTCTGCCTCCCTCAAGGTGCCC	128
Secondary	GACTTCCTCTGCATGGCACCCATTCTTTCTTTGCCATTTCTGCCTCCCTCAAGGTGCCC	128
	*****	
KR711781.1	CTCATCACTGTGTCCAAAGCAAAGATTCTGCTGGTTCTGTTTCACCCCATCAACTCCTGT	1860
Control	CTCATCACTGTGTCCAAAGCAAAGATTCTGCTGGTTCTGTTTCACCCCATCAACTCCTGT	188
Primary	CTCATCACTGTGTCCAAAGCAAAGATTCTGCTGGTTCTGTTTCACCCCATCAACTCCTGT	188
Secondary	CTCATCACTGTGTCCAAAGCAAAGATTCTGCTGGTTCTGTTTCACCCCATCAACTCCTGT	188
	*****	
KR711781.1	GCCAACCCCTTCTCTATGCCATCTTTACCAAAAACCTTTCGCAGAGATTTCTTCACTCTG	1920
Control	GCCAACCCCTTCTCTATGCCATCTTTACCAAAAACCTTTCGCAGAGATTTCTTCACTCTG	248
Primary	GCCAACCCCTTCTCTATGCCATCTTTACCAAAAACCTTTCGCAGAGATTTCTTCACTCTG	248
Secondary	GCCAACCCCTTCTCTATGCCATCTTTACCAAAAACCTTTCGCAGAGATTTCTTCACTCTG	248
	*****	
KR711781.1	CTGAGCAAGTGTGGCTGCTATGAAATGCAAGCCCAAATTTATAGGACAGAAACTTCATCC	1980
Control	CTGAGCAAGTGTGGCTGCTATGAAATGCAAGCCCAAATTTATAGGACAGAAACTTCATCC	308
Primary	CTGAGCAAGTGTGGCTGCTATGAAATGCAAGCCCAAATTTATAGGACAGAAACTTCATCC	308
Secondary	CTGAGCAAGTGTGGCTGCTATGAAATGCAAGCCCAAATTTATAGGACAGAAACTTCATCC	308
	*****	
KR711781.1	ACTGTCCACAACACCCATCCAAAGGAATGGCCACTGCTCTTCAGCTCCCAGAGTCACCAAT	2040
Control	ACTGTCCACAACACCCATCCAAAGGAATGGCCACTGCTCTTCAGCTCCCAGAGTCACCAAT	368
Primary	ACTGTCCACAACACCCATCC-AGGAATGGCCACTGCTCTTCAGCTCCCAGAGTCACCAAT	367
Secondary	ACTGTCCACAACACCCATCC-AGGAATGGCCACTGCTCTTCAGCTCCCAGAGTCACCAAT	367
	*****	
KR711781.1	GGTTCACCTTACATACTTGTCCCTCTAAGTCATTTAGCCAAAACATAAAACACAATGTGA	2100
Control	GGTTCACCTTACATACTTGTCCCTCTAAGTCATTTAGCCAAAACATAAAACACAATGTGA	428
Primary	GGTTCACCTTACATACTTGTCCCTCTAAGTCATTTAGCCAAAACATAAAACACAATGTGA	427
Secondary	GGTTCACCTTACATACTTGTCCCTCTAAGTCATTTAGCCAAAACATAAAACACAATGTGA	427
	*****	
KR711781.1	AAATGTATCTGAGTATTGAATGATAATTC	2129
Control	AAATGTATCTGAGTATTGAATGATAATTC	457
Primary	AAATGTATCTGAGTATTGAATGATAATTC	456
Secondary	AAATGTATCTGAGTATTGAATGATAATTC	456
	*****	

الشكل (14): مقارنة تتابعات القواعد النيروجينية لجين *FSHR* في النساء العقيمات والمقارنة ورقم

الانضمام (KR711781.1).

4-3-2: جين  $FSH\beta$

كشفت نتائج تحليل تسلسل القواعد النيتروجينية بطريقة محاذاة التسلسل المتعدد (MSA) للقطعة المدروسة من جين  $FSH\beta$  في منطقة المحفز عن وجود تغير وراثي واحد عند الموقع (-211) من تسلسل القواعد النيتروجينية الكلي بناءً على رقم الانضمام (AH003599.1) في النساء العقيمات، إذ استبدلت القاعدة النيتروجينية G بالقاعدة النيتروجينية T (-211 G>T) كما مبين في الشكل (15).

وتعد الطفرة التي تم الحصول عليها هي طفرة تحول (Transversion) أي تغيرت القاعدة النيتروجينية من مجموعة البيورين (Purine) الى البايريميدين (Pyrimidine). وعند المقارنة مع الدراسات التي أجريت على جين  $FSH\beta$  أتفقت نتائج دراستنا مع ما ذكر في الدراسات بوجود طفرة تحول G> T في الموقع -211 ضمن منطقة المحفز من جين  $FSHB$ ، ففي دراسة أجريت في بريطانيا على النساء من ناحية الانجاب تم الكشف عن الطفرة T>G-211 ضمن منطقة المحفز من جين  $FSHB$  (Rull *et al.*, 2018)، وفي دراسات أخرى تم الكشف عن ذات التغيير الوراثي في مختلف البلدان (Trevisan *et al.*, 2019 ; Huhtaniemi and Rivero-Müller, 2019 ; Anagnostou *et al.*, 2021b ; Bianco *et al.*, 2021; Polyzos *et al.*, 2021)

AH003599.2	ATTTTCATTCAGTAATGCATCTCCTGAACAGAGTCAAAGCAATACTTGGAAAGGACTCTGA	120
Secondary	-----AATGCATCTCCTGAACAGAGTCAAAGCAATACTTGGAAAGGACTCTGA	48
Primary	-----AATGCATCTCCTGAACAGAGTCAAAGCAATACTTGGAAAGGACTCTGA	48
Control	-----AATGCATCTCCTGAACAGAGTCAAAGCAATACTTGGAAAGGACTCTGA	48
*****		
AH003599.2	ATTTCTGATTTAAAGATACAAAAGAAAAATCTGGAGTCACAATTAATTTGAGAAGGTAA	180
Secondary	ATTTCTGATTTAAAGATACAAAAGAAAAATCTGGAGTCACAATTAATTTGAGAAGGTAA	108
Primary	ATTTCTGATTTAAAGATACAAAAGAAAAATCTGGAGTCACAATTAATTTGAGAAGGTAA	108
Control	ATTTCTGATTTAAAGATACAAAAGAAAAATCTGGAGTCACAATTAATTTGAGAAGGTAA	108
*****		
AH003599.2	AGGAGTGGGTGTGCTACTGTATCAAATTTAATTTGTACAAAATCATCATCTCTAGTAACA	240
Secondary	AGGAGTGGGTGTGCTACTGTATCAAATTTAATTTGTACAAAATCATCATCTCTAGTAACA	168
Primary	AGGAGTGGGTGTGCTACTGTATCAAATTTAATTTGTACAAAATCATCATCTCTAGTAACA	168
Control	AGGAGTGGGTGTGCTACTGTATCAAATTTAATTTGTACAAAATCATCATCTCTAGTAACA	168
*****		
AH003599.2	TTATTTTTTCTAATCTACTGCGTTTAGACTACTTTAGTAAAGCTTGATCTCCCTGTCTAT	300
Secondary	TTATTTTTTCTAATCTACTGCGTTTAGACTACTTTAGTAAAGCTTGATCTCCCTGTCTAT	228
Primary	TTATTTTTTCTAATCTACTGCGTTTAGACTACTTTAGTAAAGCTTGATCTCCCTGTCTAT	228
Control	TTATTTTTTCTAATCTACTGCGTTTAGACTACTTTAGTAAAGCTTGATCTCCCTGTCTAT	228
*****		
AH003599.2	CTAAACACTGATTCACCTACAGCAAGCTTCAGGCTAGCATTGGTCATATTAATACCCAAC	360
Secondary	CTAAACACTGATTCACCTACAGCAAGCTTCAGGCTAGCATTGGTCATATTAATACCCAAC	288
Primary	CTAAACACTGATTCACCTACAGCAAGCTTCAGGCTAGCATTGGTCATATTAATACCCAAC	288
Control	CTAAACACTGATTCACCTACAGCAAGCTTCAGGCTAGCATTGGTCATATTAATACCCAAC	288
*****		
AH003599.2	AAATCCACAAGGTGTTAGTTGCACATGATTTTGTATAAAAAGGTGAACTGAGATTTTCATTC	420
Secondary	AAATCCACAAGGTGTTAGTTGCACATGATTTTGTATAAAAAGGTGAACTGAGATTTTCATTC	348
Primary	AAATCCACAAGGTGTTAGTTGCACATGATTTTGTATAAAAAGGTGAACTGAGATTTTCATTC	348
Control	AAATCCACAAGGTGTTAGTTGCACATGATTTTGTATAAAAAGGTGAACTGAGATTTTCATTC	348
*****		

الشكل (15): مقارنة تتابعات القواعد النيتروجينية لجين *FSHβ* في النساء العقيمات والمقارنة ورقم الانضمام (AH003599.2).

### 3-3-4 جين *CYP17*

بينت نتائج تحليل تتابع النيوكليوتيدات بطريقة محاذاة التسلسل المتعدد (MSA) في منطقة المحفز (promoter) الكشف عن تغير وراثي واحد في الموقع 34- لجين *CYP17* في النساء العقيمات مقارنة مع مجموعة المقارنة ومع التتابعات المذكورة في بنك الجينات لنفس الجين تحت رقم الانضمام (EU322845.1).

أذ تغيرت القاعدة النيتروجينية الثايمين (T) بالقاعدة النيتروجينية السايروسين (C) وتغير الطفرة (-34T>C) طفرة أستبدال (Transition) وفيها تحولت القاعدة النيتروجينية الى قاعدة أخرى من نفس النوع بايريميدين -بايريميدين (C↔T) وكما مبين في الشكل (16). وكانت النتيجة التي تم الحصول عليها مطابقة لما توصل اليه (Liu *et al.*, 2021) التي تشير إلى أن تعدد الأشكال الجيني T / C لعب دوراً في زيادة قابلية الإصابة بمتلازمة تكيس المبايض عند النساء التي حمل الأليل C، وهذا يدل إلى أن تعدد الأشكال للجين *CYP17* يعد عاملاً مهماً في اضطراب التمثيل الغذائي والهرموني المرتبط بمتلازمة تكيس المبايض المسببة للعقم. وأيضاً نتيجة الباحث (Kaur *et al.*, 2018) على النساء في شمال الهند المصابات باضطرابات الدورة الشهرية بسبب انقطاع الإباضة والعقم وفرط الأندروجين أذ أن فرط إنتاج الأندروجين هو السمة المرضية الرئيسة لمتلازمة تكيس المبايض التي هي السبب الرئيسي لعقم النساء فكان لتعدد الأشكال الجيني (C > -34T) قابلية تطوير متلازمة تكيس المبايض في شمال الهند. وكذلك كانت نتائجنا مطابقة لما توصل إليه (Ashraf *et al.*, 2021) عند دراسة ارتباط تعدد الاشكال T/C لجين *CYP17* بتكيس المبايض وفرط الأندروجين المسبب لعقم النساء في كشمير. أذ أن استبدال القاعدة النيتروجينية الثايمين (T) بالقاعدة النيتروجينية السايروسين (C) أدى الى حدوث تشكّل وراثي مسبباً للعقم وهذا مشابه لنتائج (Munawar Lone *et al.*, 2021) في دراستهم التي أجريت على النساء العقيمات في باكستان حيث أرتبط تعدد الاشكال الجيني (-34T>C) في منطقة المحفز لجين *CYP17* بشكل كبير بقابلية الإصابة بمتلازمة تكيس المبايض. وأيضاً مطابق لدراسة (Ali *et al.*, 2022) الذي كشف عن وجود علاقة بين تعدد الأشكال الجيني T / C لجين *CYP17* و متلازمة تكيس المبايض PCOS وتم اعتبار أن الافراد الحاملين للأليل C يزيد من خطر الإصابة بمتلازمة تكيس المبايض وبالتالي حدوث العقم. ولكن النتائج لم تطابق دراسة أجراها (Mohammed *et al.*,



(2015) لجين *CYP17A1* في النساء العراقيات حيث أستنتج الباحث عدم وجود ارتباط بين

جين *CYP17* ومتلازمة تكيس المبايض PCOS.

EU332845.1	GGTGATCAACTGACCTCCCTTACCTAGCTCCTCCTCCGGAGGTTTGCCTGGAGTTGAGC	540
Control	-----CTGACCTCCCTTACCTAGCTCCTCCTCCGGAGGTTTGCCTGGAGTTGAGC	51
Primary	-----CTGACCTCCCTTACCTAGCTCCTCCTCCGGAGGTTTGCCTGGAGTTGAGC	51
Secondary	-----CTGACCTCCCTTACCTAGCTCCTCCTCCGGAGGTTTGCCTGGAGTTGAGC	51
	*****	
EU332845.1	CAGCCCTTGAGGAGGCCCTTCACTCCCACCGCCTCTCCTTCTGGATATGAGCTCAGGC	600
Control	CAGCCCTTGAGGAGGCCCTTCACTCCCACCGCCTCTCCTTCTGGATATGAGCTCAGGC	111
Primary	CAGCCCTTGAGGAGGCCCTTCACTCCCACCGCCTCTCCTTCTGGATATGAGCTCAGGC	111
Secondary	CAGCCCTTGAGGAGGCCCTTCACTCCCACCGCCTCTCCTTCTGGATATGAGCTCAGGC	111
	*****	
EU332845.1	CTGGCTGGGCTCCAGGAGAATCTTCCACAAGGCAAGAGATAACACAAAGTCAAGGTGAA	660
Control	CTGGCTGGGCTCCAGGAGAATCTTCCACAAGGCAAGAGATAACACAAAGTCAAGGTGAA	171
Primary	CTGGCTGGGCTCCAGGAGAATCTTCCACAAGGCAAGAGATAACACAAAGTCAAGGTGAA	171
Secondary	CTGGCTGGGCTCCAGGAGAATCTTCCACAAGGCAAGAGATAACACAAAGTCAAGGTGAA	171
	*****	
EU332845.1	GATCAGGGTAGCCCTTTAAAAGGCCCTCTGTGCCCTAGAGTTGCCACAGCTCTTCTACT	720
Control	GATCAGGGTAGCCCTTTAAAAGGCCCTCTGTGCCCTAGAGTTGCCACAGCTCTTCTACT	231
Primary	GATCAGGGTAGCCCTTTAAAAGGCCCTCTGTGCCCTAGAGTTGCCACAGCTCTTCTACT	231
Secondary	GATCAGGGTAGCCCTTTAAAAGGCCCTCTGTGCCCTAGAGTTGCCACAGCTCTTCTACT	231
	*****	
EU332845.1	CCACTGCTGTCTATCTTGCCCTGCCGGCACCCAGCCACCATGTGGGAGCTCGTGGCTCTCT	780
Control	CCACTGCTGTCTATCTTGCCCTGCCGGCACCCAGCCACCATGTGGGAGCTCGTGGCTCTCT	291
Primary	CCACCGCTGTCTATCTTGCCCTGCCGGCACCCAGCCACCATGTGGGAGCTCGTGGCTCTCT	291
Secondary	CCACCGCTGTCTATCTTGCCCTGCCGGCACCCAGCCACCATGTGGGAGCTCGTGGCTCTCT	291
	*****	
EU332845.1	TGCTGCTTACCCTAGCTTATTTGTTTTGGCCCAAGAGAAGGTGCCCTGGTGCCAAAGT	837
Control	TGCTGCTTACCCTAGCTTATTTGTTTTGGCCCAAGAGAAGGTGCCCTGGTGCCAAAGT	348
Primary	TGCTGCTTACCCTAGCTTATTTGTTTTGGCCCAAGAGAAGGTGCCCTGGTGCCAAAGT	348
Secondary	TGCTGCTTACCCTAGCTTATTTGTTTTGGCCCAAGAGAAGGTGCCCTGGTGCCAAAGT	348
	*****	

الشكل (16): مقارنة تتابعات القواعد النيتروجينية لجين *CYP17* في النساء العقيمات والمقارنة ورقم

الانضمام (EU332845.1).

#### 4-4: الأحماض الأمينية لبروتين FSHR

بعد أكمال تحليل نتائج تتابعات القواعد النيروجينية لجين *FSHR* تم ترجمتها بإستخدام برنامج (codon Code V.7.1.2) وتحويلها الى الأحماض الأمينية المكونة لبروتين *FSHR* وهي (155) حامض أميني ناتج عن 465 زوج قاعدي ومن خلال تحليل تتابعات الأحماض الأمينية لجميع عينات التجربة تم ملاحظة حصول تغير في موقع واحد بالأكسون العاشر التي تبدلت فيها القاعدة النيروجينية الأدينين الى الكوانين  $2039G>A$ ، حيث أدت الطفرة النقطية الى تغير الشفرة الوراثية AAT الى AGT فحصل بسببه أستبدال الحامض الأميني الاسبارجين Asn المتكون في موقع حدوث الطفرة الى الحامض الأميني السيرين Ser في الموقع 680 (Asn680Ser).

أذ يوضح الشكل رقم (17) مقارنة بين تتابعات الأحماض الأمينية للنساء العقيمات قيد الدراسة مع رقم الانضمام (KR711781.1) والذي تم الحصول عليه في NCBI وعند المقارنة مع الدراسات السابقة التي أجريت على النساء المصابات بالعقم وجدنا اتفاق نتائجنا مع ما توصل اليه (Trevisen *et al.*, 2014) في دراستهم على النساء البرازيليات المصابات بالعقم في حصولهم على الطفرة Asn680Ser كذلك في دراسة اخرى أجريت في الصين على 184 امرأة صينية مصابة بالعقم تم الكشف عن طفرة الاستبدال (Asn680Ser و Thr307Alg) ضمن الأكسون العاشر لجين *FSHR* (Meng *et al.*, 2018). كذلك تم الكشف عن الطفرة ذاتها في النساء في المملكة المتحدة البريطانية المصابات بالعقم (Dominguez-Lopez *et al.*, 2018). وفي دراسة أخرى تم الكشف عن نفس التغير (Asn680Ser) وسجلت نتائجهم تحت رقم الانضمام rs6161 (Tănase *et al.*, 2020).

Identity	400	410	420
infertility	QYKLTVP	FLMCNLA	FADLCIGIYLLLIASVDIHTKSQY
KR711781.1	QYKLTVP	FLMCNLA	FADLCIGIYLLLIASVDIHTKSQY
Identity	430	440	450
infertility	HNYAIDWQTGAGCDAAGFFTFVFA	SELSVYTLTAITLERW	
KR711781.1	HNYAIDWQTGAGCDAAGFFTFVFA	SELSVYTLTAITLERW	
Identity	470	480	490
infertility	HTITHAMQLDCKVQLRHAASVMVMGWIFAF	AAALFP	IFG
KR711781.1	HTITHAMQLDCKVQLRHAASVMVMGWIFAF	AAALFP	IFG
Identity	508	510	520
infertility	ISSYMKVSI	CLPMDIDS	PLSQLYVMSLLVNLVLA
KR711781.1	ISSYMKVSI	CLPMDIDS	PLSQLYVMSLLVNLVLA
Identity	550	560	570
infertility	GCIYHIYLTVRNP	NIVSSSSD	TRIAKRMAMLI
KR711781.1	GCIYHIYLTVRNP	NIVSSSSD	TRIAKRMAMLI
Identity	590	600	610
infertility	APISFFAISASLKVPLITVSKAKILLVLFHP	INSCANPF	
KR711781.1	APISFFAISASLKVPLITVSKAKILLVLFHP	INSCANPF	
Identity	630	640	650
infertility	LYAIFTKNFRRDFFILL	SKCGCYEMQAQIYRTETS	STVH
KR711781.1	LYAIFTKNFRRDFFILL	SKCGCYEMQAQIYRTETS	STVH
Identity	670	680	695
infertility	NTHPRNGHCSSAPRV	TSGSTYILVPLSHLAQN	
KR711781.1	NTHPRNGHCSSAPRV	TSGSTYILVPLSHLAQN	

الشكل (17): مقارنة تتابعات الاحماض الامينية لبروتين FSHR بين تتابعات الاحماض الامينية

للنساء العقيمت ورقم الانضمام (KR711781.1) (الاسبارجين: N, السيرين: S).

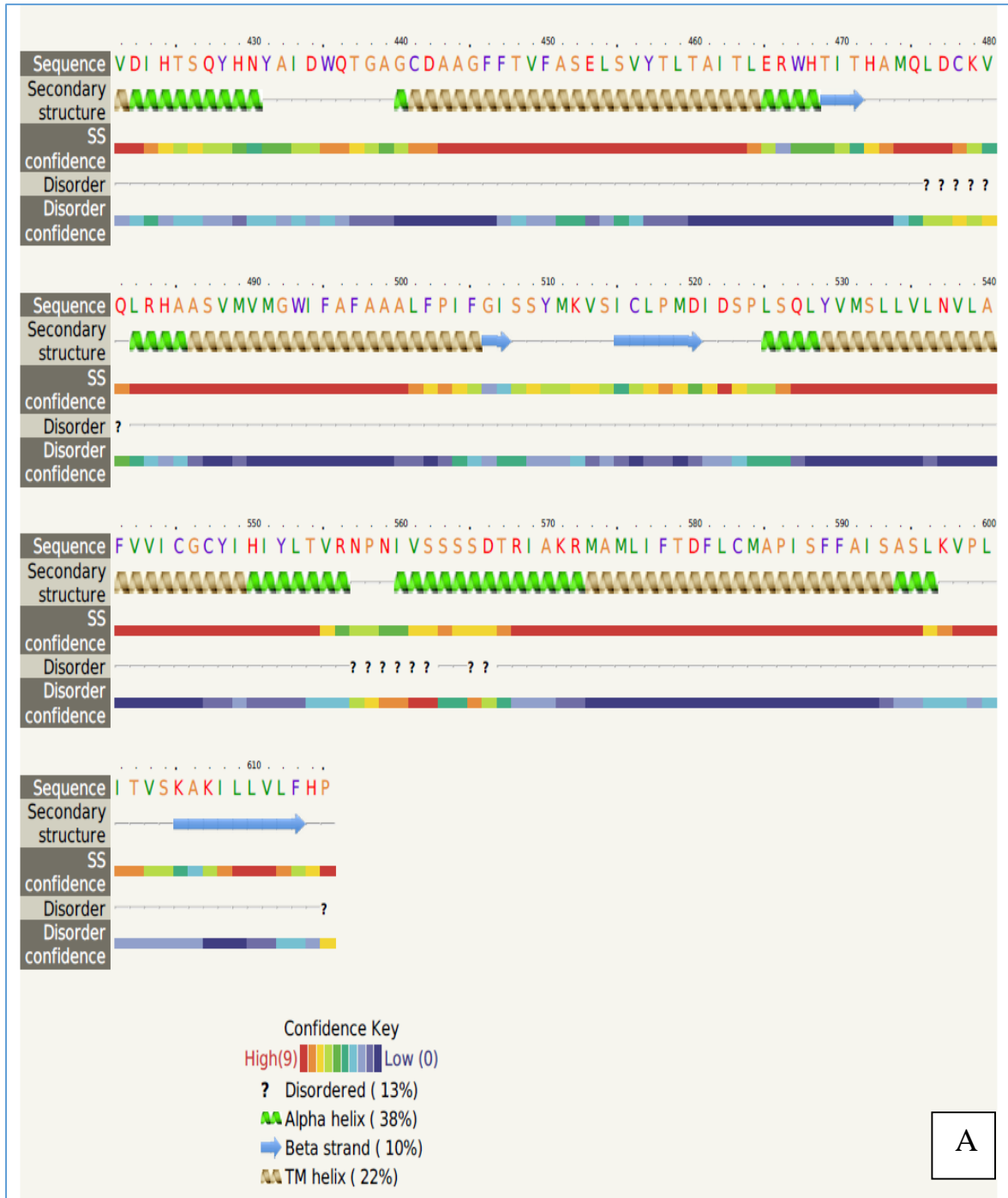
كذلك تم استخدام برنامج phyre2 للكشف عن التركيب الثانوي لقطعة بروتين FSHR

المدرسة، أذ نلاحظ من الشكل (18) توزيع حلزون ألفا (Alpha helix) وصفائح بيتا (Beta

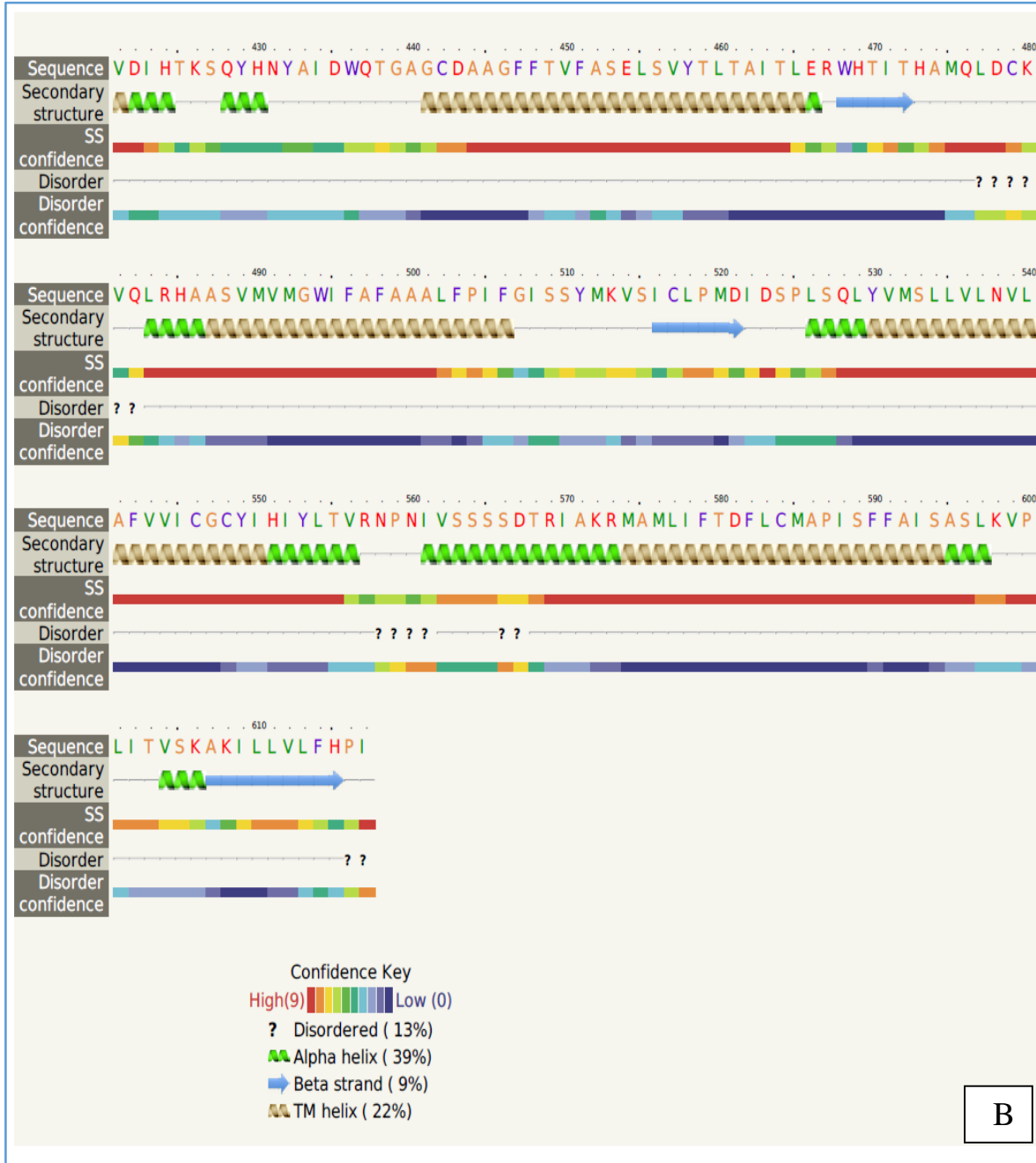
strand) المكون لتركيب البروتين الثانوي للنساء العقيمت ورقم الانضمام (KR711781.1)، أذ

كانت نسبة حلزون ألفا (38%) و(39%) أما نسبة صفائح بيتا (10%) و(9%) على التوالي، ونسبة

حلزون الغشاء الخلوي (TM helix) والجزء المضطرب (Disordered) كانت متساوية في النسبة العقيمت ورقم الانضمام بنسبة (22%) و(13%) على التوالي.



A



الشكل (18): التركيب الثانوي لبروتين FSHR ونسبة حلزون ألفا (Alpha helix) وصفائح بيتا (Beta strand) للنساء العقيمات وB لرقم الانضمام (KR711781.1). خطأ! الإشارة

المرجعية غير معروفة.

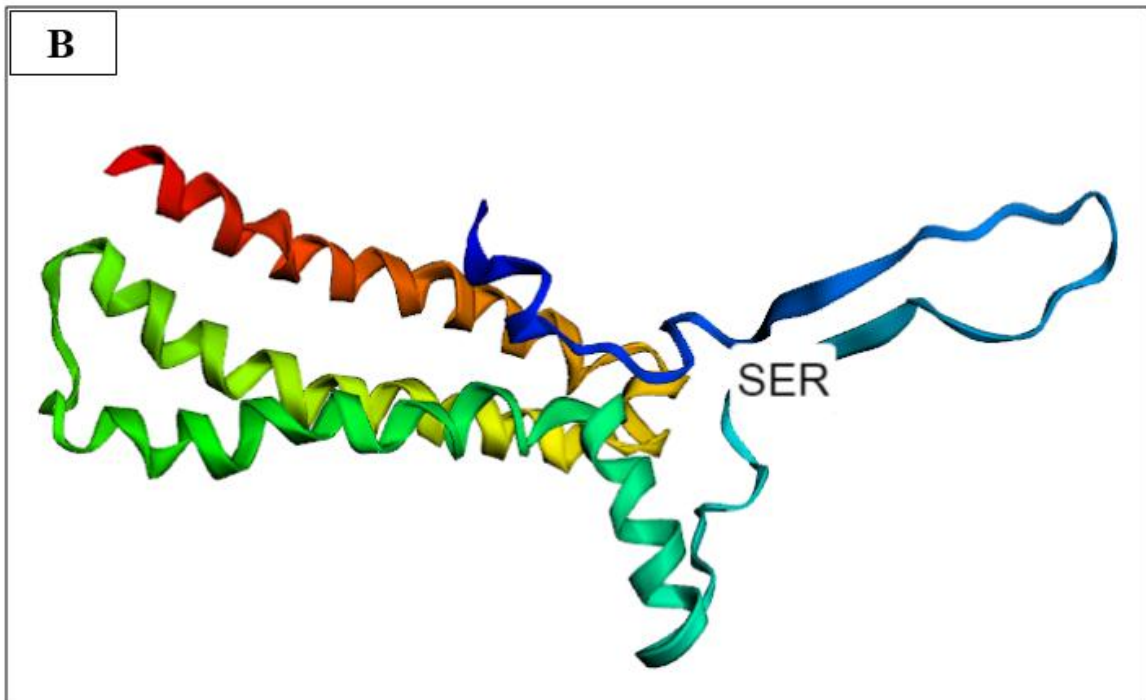
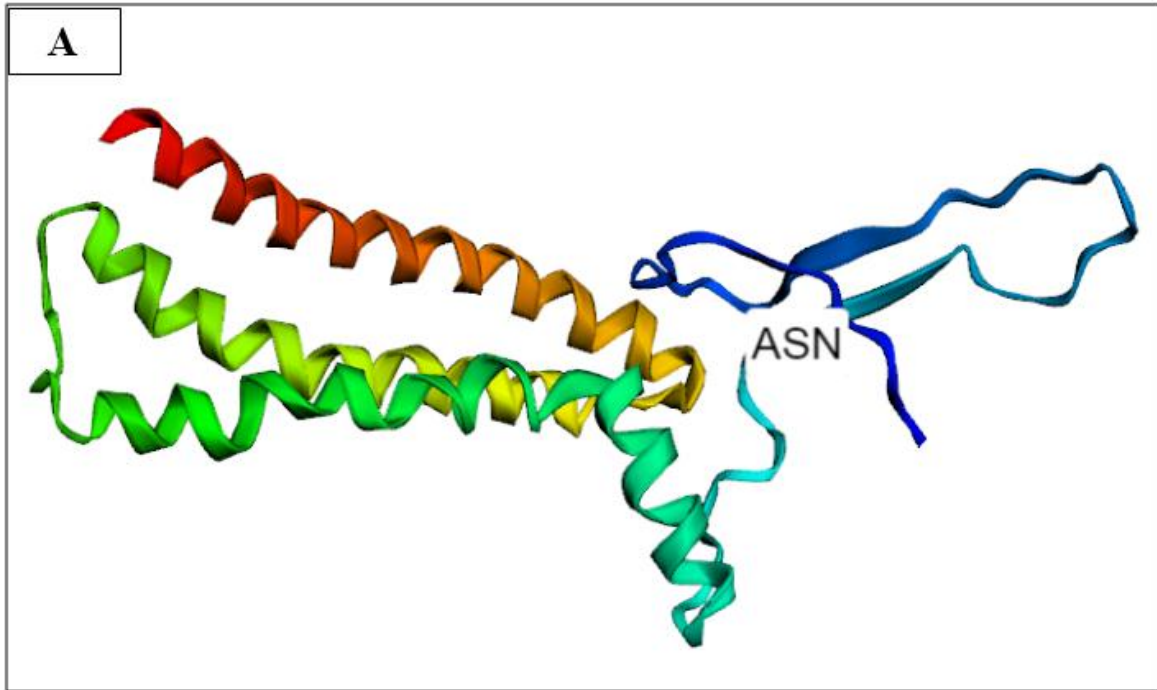
تعزى الاختلافات بسبب الطفرة الوراثية الى الاختلافات بين الحامض الأميني الناتج قبل الطفرة والحامض الاميني المتشكل بعد الطفرة، إذ أن الوزن الجزيئي للحامض الأميني الأسبارجين

(C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) يبلغ 132.12 غم/مول في حين أن الوزن الجزيئي للحامض الأميني السيرين (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>) يبلغ 105.09 غم/مول أما من ناحية الأهمية الغذائية فيشترك كلا الحامضين بكونهما حامضين غير أساسيين كذلك يعد السيرين حامض أميني قطبي متعادل والأسبارجين حامض أميني قطبي سالب الشحنة وبعد السيرين أكثر شيوعاً ولديه صلات وثيقة بالمسارات الأيضية بينما الأسبارجين له علاقة بتكوين الكلوكون (Thurkill *et al.*, 2006)، كذلك يختلف كلا الحامضين بإمكانية تواجدهما في بروتينات حقيقية النواة فيمكن ملاحظة أن نسبة تواجد الحامض الأميني الأسبارجين تبلغ 4.3% (AAC, AAU) في حين أن نسبة تواجد الحامض الأميني السيرين 6.8% (AGC, AGU, UCG, UCA, UCC, UCU)، هذه الخصائص المختلفة لكلا الحامضين الأمينين تعطي أنطباعاً إلى أن التغير فيما بينهما يمكن أن يؤثر على خصائص البروتين المنتج وهذا ما تم التوصل إليه في هذه الدراسة إذ أن الطفرة أدت إلى تغير شكل البروتين المنتج.

#### 4-5: التركيب ثلاثي الأبعاد لبروتين FSHR

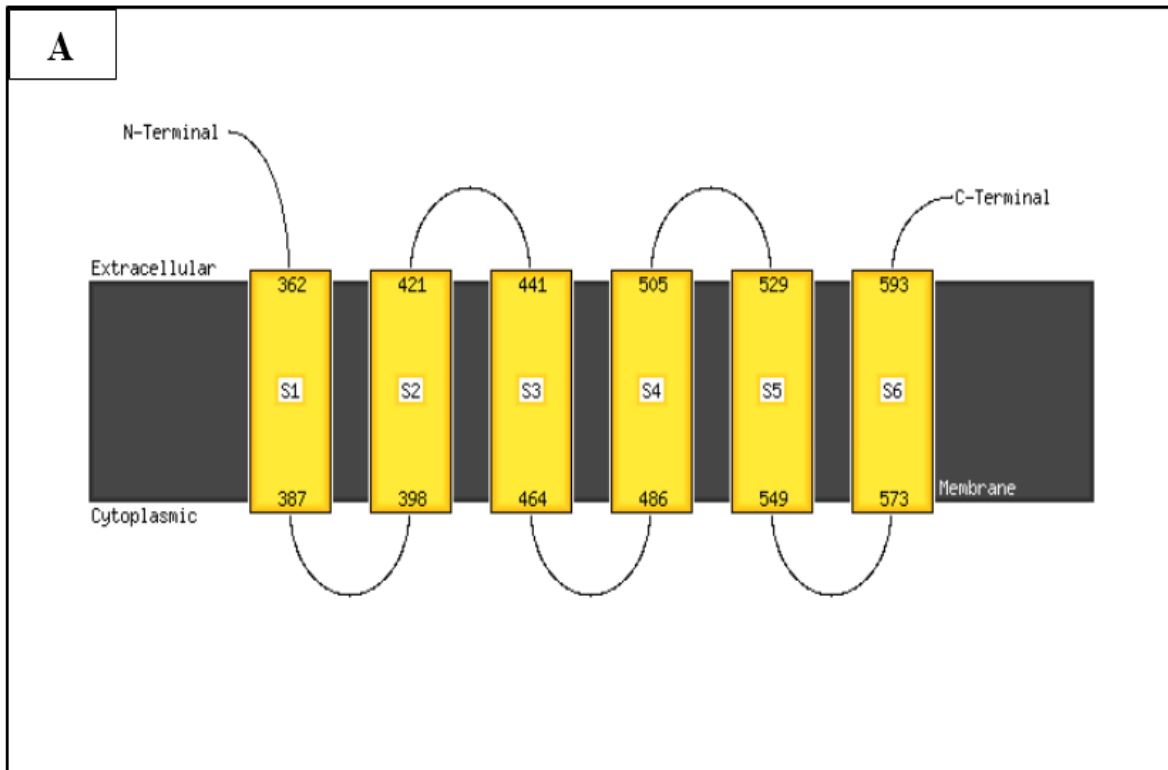
بينت محاذاة الأحماض الأمينية لبروتين FSHR بين النساء العقيمات ورقم الانضمام (KR711781.1) عن وجود طفرة وراثية أدت إلى تغير الحامض الأميني الأسبارجين (Asn) إلى الحامض الأميني السيرين (Ser) في الموقع 680 (Asn680Ser) كما في شكل (19)، والتي تقع في جزء السطح الداخلي للخلايا الحبيبية للمبايض (Intercellular) أي في منطقة ارتباط الهرمون المحفر لنمو الحويصلات (FSH) مع مستقبله المحدد (FSHR). لذا استخدمت برامج المعلوماتية الحيوية للتنبؤ بتركيب البروتين ثلاثي الأبعاد (3D) لتوضيح مكان تغير الأحماض الأمينية في بروتين FSHR نتيجة الطفرة الوراثية، وكون البروتين يحتوي على مناطق مختلفة ذات أهمية من الناحية الوظيفية.



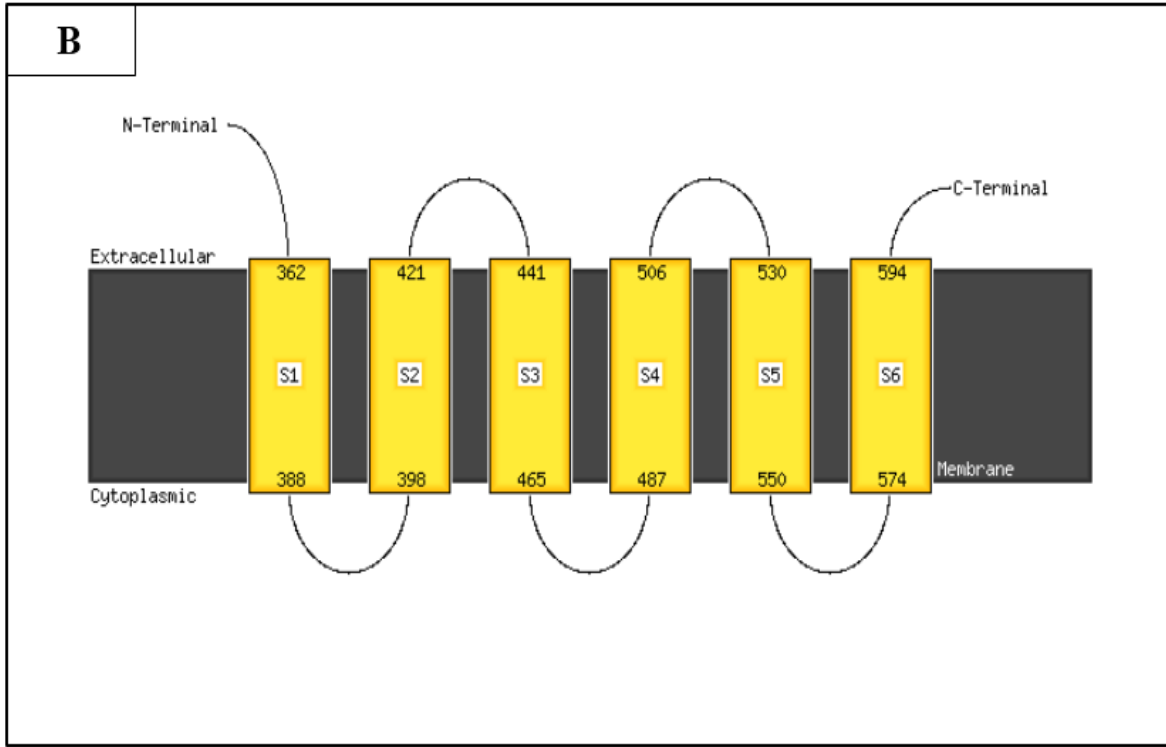


شكل (19) الأشكال ثلاثية الأبعاد لبروتين FSHR (A) في مجموعة المقارنة ورقم الانضمام (KR711781.1). (B) في النساء العقيمت.

يوضح الشكل (20) تسلسل الأحماض الأمينية في حلزونات ألفا ( $\alpha$ -helix) لبروتين FSHR ضمن الغشاء الخلوي (Transmembrane-TM) في كل من النساء المصابات بالعمم ومجموعة المقارنة، أذ نلاحظ أن كلا النوعين تحتوي على ستة حلزونات ( $S6 < S1$ ) أن مواضع الأختلاف بين المجموعتين كانت في  $S1$  (387-362 و 388-362) و  $S3$  (464-441 و 465-441) و  $S4$  (505-486 و 506-487) و  $S5$  (549-529 و 550-530) و  $S6$  (573-593 و 594-574) على التوالي والذي يقع في الجزء الخارجي لغشاء الخلية (Extracellular) والساييتوبلازم (Cytoplasmic)، كذلك نلاحظ في الشكل توزيع تتابعات الاحماض الامينية لبروتين FSHR عبر الغشائي، أذ تقع النهايتان الأمينية والكاربونية في الجزء خارج الخلية. وقد يعزى سبب الأختلاف في تسلسلات حلزون ألفا بين المجموعتين الى طفرة الحذف في عينات النساء المصابة بالعمم.







شكل (20) موقع حلزون الفا (A) في النساء العقيمت (B) في رقم الانضمام (KR711781.1).

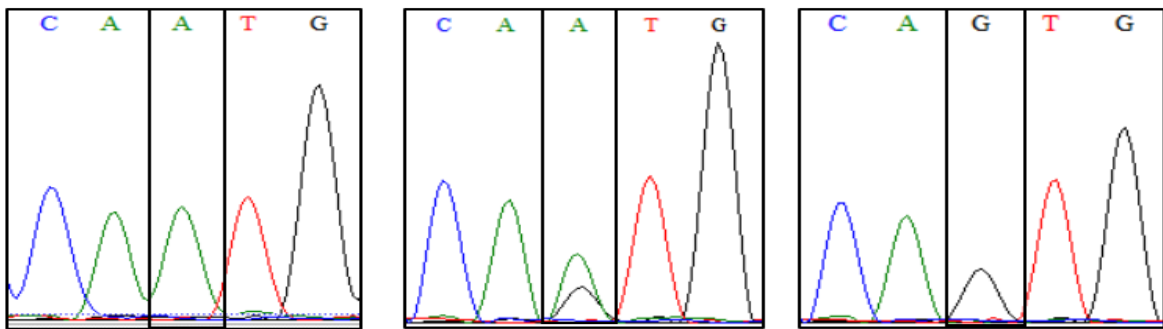
وهذا يتفق مع Fox *et al.*, (2001) الذي بين أن الطفرات الوراثية في جين *FSH* أدت الى تغيير البروتين الناتج، وكنتيجة لتغير شكل البروتين ثلاثي الابعاد (3D) ولوجود ارتباط بين شكل البروتين ووظيفته لذا قد تكون هذه الطفرة هي إحدى أسباب الاضطرابات الهرمونية لدى النساء العقيمت، لأنها تقلل من حساسية الإرتباط بين الهرمون ومستقبله وبذلك تقلل من نسبة الهرمون النشط. ويتفق مع (Ulloa-Aguirre *et al.*, 2018) اذ أشار الى أن الطفرات الوراثية أو تعدد أشكال النيوكليوتيدات (SNP) التي تحدث في تتابعات جين *FSHR* قد تؤدي الى تغيير في وظيفة بروتين المستقبل للهرمون المحفز لنمو الحويصلات وفي النهاية تؤدي لحدوث اضطراب هرموني. كذلك أتفقت نتائجنا مع ما توصل اليه (Casarini *et al.*, 2014) و (García-Jiménez1 *et al.*, 2018) الذين أوضحوا بأن النساء المكسيكيات التي تحمل الطفرة الوراثية *Asn680Ser* في بروتين *FSHR* تكون أقل حساسية لهرمون *FSH* وبالتالي تكون معدلات الحمل لديهن منخفضة.

4-6: التراكيب الوراثية

4-6-1: توزيع التراكيب الوراثية لجين *FSHR* (2039 A>G) في النساء العقيمات

والمقارنة

تم أستخراج التراكيب الوراثية عن طريق برنامج Geneious Software (الاصدار 10.1.3) أذ تمت مقارنة تسلسلات العينات القياسية والمصابة بالعقم من النوع الأول والثاني مع التركيب الوراثي للنساء الموجود في بنك الجينات العالمي (Accession Number: KR711781)، وأظهرت محاذاة (Alignment) تسلسلات النساء فيما بينهم في العثور على ثلاثة تراكيب وراثية في الموقع المدروس 2039 A>G من جين مستقبل الهرمون المحفز لنمو الحويصلات (*FSHR*)، أذ يدل وجود منحنى واحد أخضر على التركيب الوراثي البري (Wild) (AA) أي عدم حصول طفرة في كلا الأليلين أما وجود منحنين أخضر وأسود فيدل على التركيب الوراثي الهجين (Heterozygous) (AG) أي حصول طفرة في أحد الأليلات سواء تغيرت القاعدة فوق المنحنى الى G أم لم تتغير، ويشير وجود منحنى واحد أسود وتغير القاعدة فوق المنحنى الى G الى التركيب الوراثي الطافر (المتماثل) أي حصول تغير في كلا الأليلين (GG) وكانت هذه النتيجة متطابقة مع نتيجة الباحث ( Rai *et al.*, 2019) الذي وجد بأن الأليل النادر "G" ومتغاير الزيجوت والأنماط الجينية الطافرة متماثلة الزيجوت تزيد بشكل كبير من خطر العقم عند النساء شكل (21).



شكل (21) التراكيب الوراثية في الموقع A2039G لجين *FSHR*

يوضح الجدول (14) تكرار الأليلات والتراكيب الوراثية لجين *FSHR* للعينات المدروسة، أذ بينت النتائج وجود ثلاثة تراكيب وراثية (AA و AG و GG) بتكرار (0.125 و 0.625 و 0.250) على التوالي أما تكرار الأليلات هي A (0.563) و G (0.437) في مجموعة النساء العقيمت. أما في مجموعة المقارنة فكان تكرار التراكيب الوراثية AA (0.25) و AG (0.75) ولم يوجد أي تكرار للتراكيب الوراثي GG، بينما بلغ التكرار الأليلي A (0.625) و G (0.375).

جدول (14): تكرار التراكيب الوراثية والأليلات لجين *FSHR* في النساء العقيمت والمقارنة.

التكرار		الأليلات	التكرار		التركيب الوراثي
مجموعة المقارنة	النساء العقيمت		مجموعة المقارنة	النساء العقيمت	
0.625	0.563	A	0.25	0.250	AA
0.375	0.437	G	0.75	0.625	AG
			0	0.125	GG

يوضح الجدول (15) أعداد ونسب توزيع التراكيب الوراثية والأليلات في عينات النساء العقيمت والنساء السليمات (المقارنة)، أذ لوحظ ثلاثة تراكيب وراثية، وكانت نسبة التركيب الوراثي البري AA في النساء المصابات بالعقم والنساء السليمات (المقارنة) متساوية وبلغت (25%)، كما وبينت نتائج التحليل الاحصائي فرق غير معنوي قيمته (P= 0.99) عند مستوى احتمال (P<0.05) والنسبة الحرجة (OR) كانت (0.99) وكانت نسبته كأليل وقائي من العقم Preventive fraction (PF) (عندما تكون نسبة OR أصغر من واحد) بلغت (0.01) كذلك مدة الثقة (CI) تراوحت بين (-0.63-15.99). وبالنسبة للتركيب الوراثي المتباين الزيجة AG فوجد أن نسبته في النساء العقيمت أقل مما

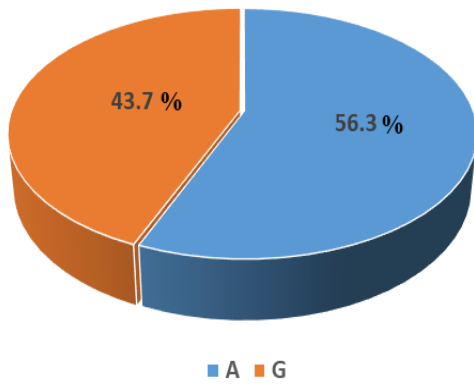
في مجموعة المقارنة اذ بلغ (62.5%) في النساء العقيمات اما في عينات مجموعة المقارنة (75%)، حيث وجد هناك فرق معنوي قيمته ( $P=0.04$ ) عند مستوى الاحتمال ( $P<0.05$ ) والنسبة الحرجة (OR) كانت (0.56)، وكانت نسبته كأليل وقائي من العقم (Preventive fraction (PF) هي (0.44) ومدة الثقة (CI) تتراوح بين (0.03 - 8.08). أما بالنسبة التركيب الوراثي الطافر GG كانت نسبته (12.5%) في النساء العقيمات أما في مجموعة المقارنة فلوحظ غيابه التام وكان هناك فرق غير معنوي قيمته ( $P=0.74$ ) عند مستوى الاحتمال ( $P<0.05$ ) والنسبة الحرجة (OR) كانت (1.80) وكانت نسبته كأليل مسبب Etiological fraction (EF) ومرتبطة مع العقم (عندما تكون النسبة الحرجة OR أكبر من واحد) بلغت (0.125) ومدة الثقة (CI) تتراوح بين (0.06 - 54.33). وكانت النتائج هذه بعدم وجود فرق معنوي في دراستنا لجين مستقبل الهرمون المحفز للحويصلات مطابقاً لما توصل اليه (Rai *et al.*, 2019) في دراستهم على النساء الهنديات لمعرفة تأثير تغير (Asn680Ser) في جين *FSHR* وحالة العقم حيث لم يجد فروق معنوية في ترددات النمط الجيني بين مجموعتي العقم والمقارنة ( $P>0.05$ ) أي أنه يخضع لتوزيع هاردي واينبرغ. أما نسبة الأليل A في عينات النساء العقيمات وعينات المقارنة كانت (56.3%) و(62.5%) على التوالي. بينما نسبة الأليل G بلغت (37.5%) في عينات المقارنة و(43.7%) في النساء العقيمات الشكل (22).

جدول (15): توزيع التراكيب الوراثية لجين *FSHR* في النساء العقيمت والمقارنة.

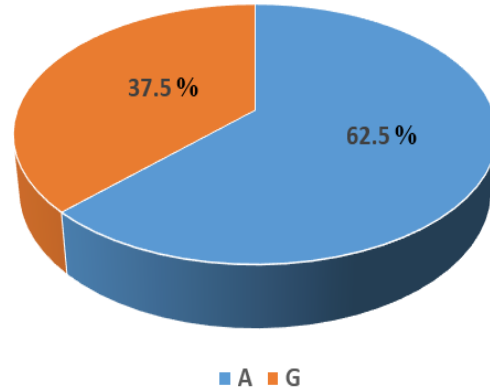
P value	(95%CI)	OR	نساء المقارنة العدد (%)	النساء العقيمت العدد (%)	التركيب الوراثي
0.99 NS	0.63-15.99	0.99	1 (25.0%)	2 (25.0%)	AA
			0.01		P.F
*0.04	0.03-8.08	0.56	3 (75.0%)	5 (62.5%)	AG
			0.44		P.F
0.74 NS	0.06-54.33	1.80	0	1 (12.5%)	GG
			0.125		E.F

OR = Odds ratio (النسبة المئوية)، CI = Confidence Intervals (مدة الثقة)، P.F = Preventive fraction (نسبة الجزء الوقائي)، E.F = Etiological fraction (نسبة الجزء المسبب). NS = فرق غير معنوي عند مستوى احتمال  $P < 0.05$ .

نسبة توزيع الأليلات لجين  
*FSHR* في عينة العقيمت



نسبة توزيع الأليلات لجين  
*FSHR* في عينة النساء المقارنة



الشكل (22) نسبة توزيع الأليلين A و G للجين *FSHR* في عينة النساء العقيمت والمقارنة

بإستخدام قانون توازن هاردي واينبرغ، أظهرت نتائج الجين *FSHR* عدم وجود فرقاً ذا دلالة إحصائية بين مجموعة النساء العقيمات ومجموعة المقارنة قيمته ( $P= 0.4453$ ) عند مستوى احتمالية  $P<0.05$ . هذا يعني أن مجموعة المقارنة تخضع لتوزيع هاردي واينبرغ وكانت الأعداد المشاهدة للتركيب الوراثية (*GG* و *AG* و *AA*) (1 و 5 و 2) على التوالي والأعداد المتوقعة (1.53 و 3.94 و 2.53) على التوالي أيضاً، أما قيمة أتران هاردي واينبرغ للتركيب الوراثية *AA* (31.64) و *AG* (49.22) و *GG* (19.14) كما هو موضح في الجدول (16).

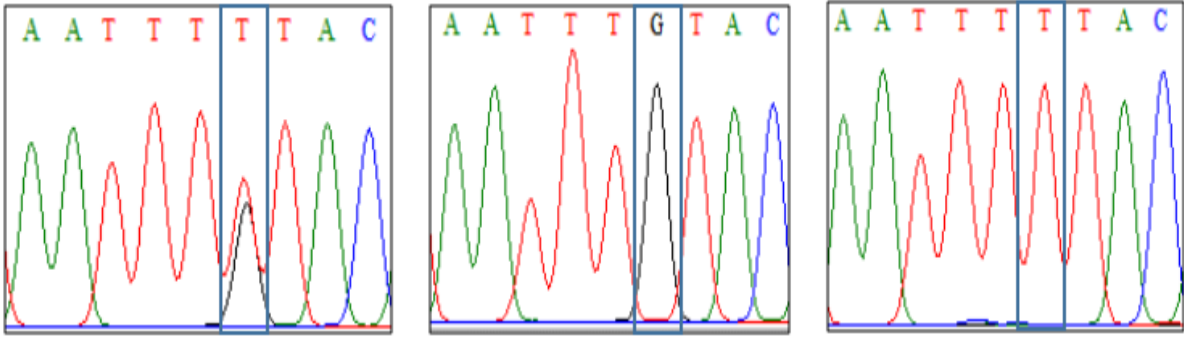
جدول (16): التركيب الوراثية لجين *FSHR* واعدادها المشاهدة والمتوقعة وقيمة اتران هاردي -

واينبرغ في النساء العقيمات والمقارنة.

<i>P</i> value	اتزان هاردي واينبرغ (%)	العدد المتوقع	العدد المشاهد	التركيب الوراثي
0.4453	31.64	2.53	2	<b>AA</b>
	49.22	3.94	5	<b>AG</b>
	19.14	1.53	1	<b>GG</b>

## 4-6-2: توزيع التراكيب الوراثية لجين $FSH\beta$ (-211 G>T) في النساء العقيمات والمقارنة

تم أستخراج التراكيب الوراثية عن طريق برنامج Geneious Software (الإصدار 10.1.3) (Geneious Software, 2013). أذ تمت مقارنة تسلسلات العينات القياسية (المقارنة) والمصابة بالعقم من النوع الأول والثاني مع التتابعات المسجلة في بنك الجينات العالمي (NCBI) (Accession Number: AH003599)، وأظهرت محاذاة (Alignment) تسلسلات النساء فيما بينهم في العثور على ثلاثة تراكيب وراثية في الموقع المدروس -211 G>T من جين بيتا الهرمون المحفز لنمو الحويصلات ( $FSH\beta$ )، أذ يدل وجود منحنى واحد أسود على التركيب الوراثي البري (GG) (Wild) أي عدم حصول طفرة في كلا الأليلين أما وجود منحنين أحمر وأسود فيدل على التركيب الوراثي الهجين (Heterozygous) (GT) أي حصول طفرة في أحد الأليلات سواء تغيرت القاعدة فوق المنحنى الى G أم لم تتغير، ويشير وجود منحنى واحد أحمر وتغير القاعدة فوق المنحنى الى T الى التركيب الوراثي الطافر (المتماثل) أي حصول تغير في كلا الأليلين (TT) شكل (23). وكانت هذه النتيجة متوافقة مع دراسة الباحث (Bianco et al., 2021) الذي وجد أن الطفرة -211G>T في جين  $FSH\beta$  أدت الى ظهور ثلاثة تراكيب وراثية في النساء الايطاليات المصابات بالعقم، أذ وجد أن الأليل T الطافر أرتبط مع ارتفاع مستويات هرمون LH في النساء العقيمات المصابات بانتباز بطانة الرحم. وكذلك أشار (Polyzos et al., 2021) الى ندرة التركيب الوراثي الطافر TT لدى النساء الآسيويات مقارنةً بالنساء الأوربيات، وذلك من خلال دراسته للكشف عن العلاقة بين تعدد الاشكال الوراثية لجين  $FSH\beta$  ومدى استجابة المبيض.



شكل (23) التراكيب الوراثية في الموقع 211 G>T- لجين *FSHβ*

يوضح جدول (17) تكرار الأليلات والتراكيب الوراثية لجين *FSHβ* للعينات المدروسة. أذ أظهرت النتائج في النساء العقيمات وجود ثلاثة تراكيب وراثية (TT و GT و GG) بتكرار (0.06 و 0.88 و 0.06) على التوالي أما تكرار الأليلات هي G (0.91) و T (0.09). أما في مجموعة المقارنة فكان تكرار التراكيب الوراثية GG (0.75) و GT (0.25) ولم يوجد أي تكرار للتراكيب الوراثية TT، بينما بلغ التكرار الأليلي G (0.87) و T (0.13).

جدول (17): تكرار التراكيب الوراثية والأليلات لجين *FSHβ* في النساء العقيمات والمقارنة.

التكرار		الأليلات	التكرار		التركيب الوراثي
مجموعة المقارنة	النساء العقيمات		مجموعة المقارنة	النساء العقيمات	
0.91	.087	G	0.75	0.88	GG
0.09	0.13	T	0.25	0.06	GT
			0	0.06	TT

يوضح الجدول (18) أعداد ونسب توزيع التراكيب الوراثية والأليلات في عينات النساء العقيمات والمقارنة، أذ لوحظ أن نسبة التركيب الوراثي المتمائل الزيجة (البري) GG في النساء المصابات بالعمق



والمقارنة غير متساوية حيث بلغت (87.5%) في النساء العقيمت و(75.0%) في عينة المقارنة ، ولم يكن هناك فرق معنوي و قيمته (P =0.54) عند مستوى الاحتمال (P <0.05) والنسبة الحرجة (OR) كانت (2.33) وكانت نسبته كأليل مسبب Etiological fraction (EF) ومرتبطة مع العقم بقيمة (0.5) ومدة الثقة (CI) تتراوح بين (0.156-34.895). وبالنسبة للتركيب الوراثي المتباين الزيجة GT فوجد أن نسبته في عينة المقارنة أعلى مما في العقيمت إذ بلغت (6.25%) في النساء العقيمت أما في عينات المقارنة فبلغت (25.0%) وكان هناك فرق غير معنوي قيمته (P =0.29) عند مستوى الاحتمال (P <0.05) والنسبة الحرجة (OR) كانت (0.20) وكانت نسبته كأليل وقائي من العقم Preventive fraction (PF) وبلغت قيمته (0.80) ومدة الثقة (CI) تتراوح بين (-0.01- 4.17). أما التركيب الوراثي متماثل الزيجة (الطافر) TT كانت نسبته (6.5%) في النساء العقيمت وفي عينات المقارنة ف لوحظ غيابه التام وكان هناك فرق معنوي قيمته (P =0.04) عند مستوى احتمال (P <0.05) والنسبة الحرجة (OR) كانت (0.87) وكانت نسبته كأليل وقائي من العقم (PF) وبلغت قيمته (0.13) ومدة الثقة (CI) تتراوح بين (0.030-25.284) . وكانت النتيجة غير متوافقة مع (Anagnostou *et al.*, 2021a) حول تعدد الأشكال النيوكليوتيدي (-211G>T) لجين *FSHβ* في نساء اليونانيات المصابين بالعقم والذي حصل على فروق ذات دلالة إحصائية تتعلق بمستويات LH .

أما نسبة توزيع الأليل G في عينة النساء العقيمت ومجموعة المقارنة كانت (87.5%) و(90.6%) على التوالي. أما نسبة الأليل T فكانت نسبته (12.5%) في عينة النساء العقيمت و(9.4%) في مجموعة المقارنة كما مبين في الشكل (24). وهذا متطابق أيضاً مع دراسة الباحث (Laisk-Podar *et al.*, 2015) وذلك بوجود ارتباط بين أليل T في الطفرة (-211G>T)

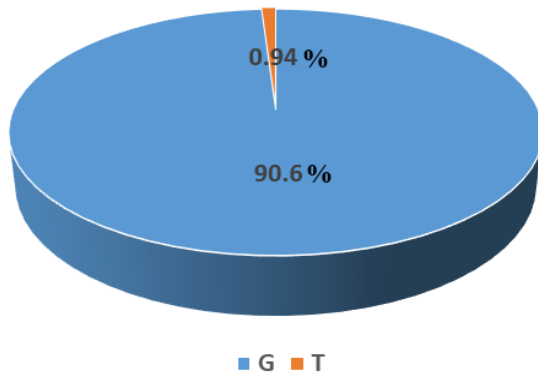
والمستويات القليلة من FSH وLH، ومطابق أيضاً لنتيجة الباحث (Rull *et al.*, 2018) بإرتباط الأليل T في *FSHB: c.-211G>T* بالعقم مجهول السبب .

جدول (18): توزيع التراكيب الوراثية لجين *FSHβ* في النساء العقيمت والسليمات (المقارنة).

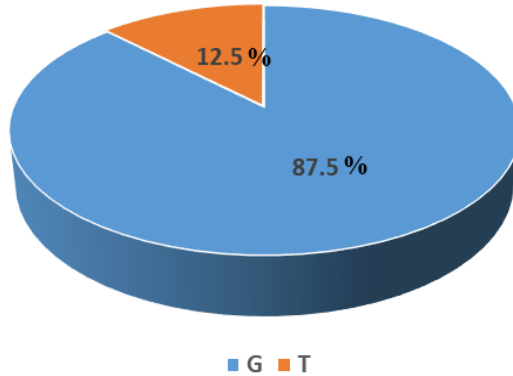
P value	(95%CI)	OR	النساء المقارنة العدد (%)	النساء العقيمت العدد (%)	التركيب الوراثي
0.54 NS	0.156-34.895	2.33	3 (75.0%)	14 (87.5%)	GG
			0.5		E.F
0.29 NS	0.01-4.17	0.20	1 (25.0%)	1 (6.25%)	GT
			0.80		P.F
*0.04	0.030-25.284	0.87	0	1 (6.25%)	TT
			0.13		P.F

OR = Odds ratio (النسبة المئوية)، CI = Confidence Intervals (مدة الثقة)، P.F = Preventive fraction (نسبة الجزء الوقائي)، E.F = Etiological fraction (نسبة الجزء المسبب). NS = غير معنوي عند مستوى احتمال  $P < 0.05$ .

نسبة توزيع الأليلات لجين  
*FSHβ* في عينة المقارنة



نسبة توزيع الأليلات لجين  
*FSHβ* في النساء العقيمت



شكل (24) نسبة توزيع الأليلين G و T للجين *FSHβ* في عينة النساء العقيمت والمقارنة

وباستخدام قانون توازن هاردي واينبرغ أظهرت نتائج الجين *FSHβ* وجود فرقٍ ذي دلالة إحصائية بين مجموعة النساء العقيمات ومجموعة المقارنة وكانت قيمته ( $P = 0.011^*$ ) عند مستوى احتمالية  $P < 0.05$  هذا يعني أن مجموعة المقارنة لا تخضع لتوزيع هاردي واينبرغ وكانت الأعداد المشاهدة للتركيب الوراثية TT و GT و GG (1 و 14) على التوالي والأعداد المتوقعة (0.14 و 2.72 و 13.14) على التوالي أيضاً أما قيمة أتران هاردي واينبرغ للتركيب الوراثية GG (82.13) و GT (16.99) و TT (0.88) وكما موضح في الجدول (19).

جدول (19): التركيب الوراثية لجين *FSHβ* وأعدادها المشاهدة والمتوقعة وقيمة أتران هاردي -

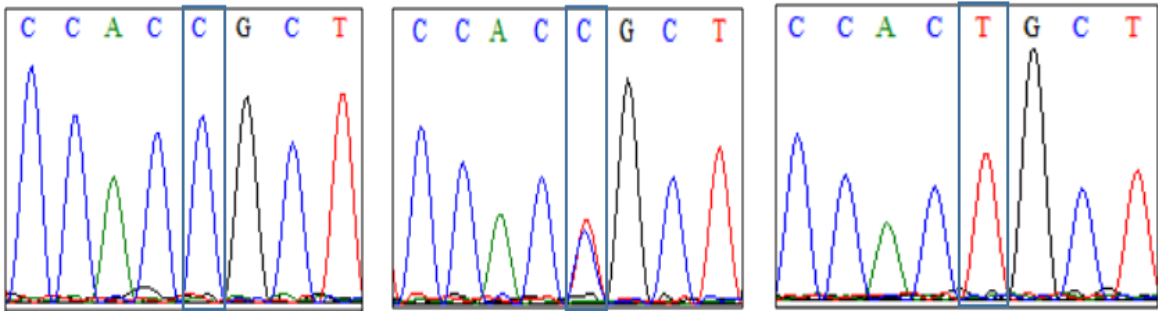
واينبرغ في النساء العقيمات والمقارنة.

<i>P</i> value	أتران هاردي واينبرغ (%)	العدد المتوقع	العدد المشاهد	التركيب الوراثي
0.011*	82.13	13.14	14	GG
	16.99	2.72	1	GT
	0.88	0.14	1	TT

4-6-3: توزيع التركيب الوراثية لجين (*CYP17* (-34 T>C) في عينات العقيمات والمقارنة

تم أستخراج التركيب الوراثية عن طريق برنامج Geneious Software (الإصدار 10.1.3) أذ تمت مقارنة تسلسلات العينات القياسية والمصابة بالعقم من النوع الأول والثاني مع التركيب الوراثي للنساء الموجود في بنك الجينات العالمي (Accession Number: EU322845)، وأظهرت محاذاة

(Alignment) تسلسلات النساء فيما بينهم في العثور على ثلاثة تراكيب وراثية في الموقع المدروس  $-34 T>C$  من جين *CYP17*, أذ يدل وجود منحنى أحمر واحد على التركيب الوراثي البري (Wild) (TT) أي عدم حصول طفرة في كلا الأليلين أما وجود منحنيين أزرق وأحمر فيدل على التركيب الوراثي الهجين (Heterozygous) (TC) أي حصول طفرة في أحد الأليلات سواء تغيرت القاعدة فوق المنحنى الى C أم لم تتغير، ويشير وجود منحنى أزرق واحد وتغير القاعدة فوق المنحنى الى C الى التركيب الوراثي الطافر (CC) وكانت هذه النتيجة متوافقة مع نتيجة الباحث (et al., 2021) Xu الذي عثر على التراكيب الوراثية الثلاثة (TT,TC,CC) بسبب الطفرة  $T>C$  في الموقع  $-34$  من المحفز وأثبت بأن النمط الوراثي الطافر (CC) يزيد من قابلية الإصابة بمتلازمة تكيس المبايض المسببة للعقم في النساء القوقازيات شكل (25).



شكل (25) التراكيب الوراثية في الموقع  $-34 T>C$  لجين *CYP17*

يوضح الجدول (20) تكرار الأليلات والتراكيب الوراثية لجين *CYP17* للعينات المدروسة. أذ أظهر وجود ثلاثة تراكيب وراثية (CC و TC و TT) بتكرار (0.13 و 0.37 و 0.50) على التوالي أما تكرار الأليلات هي T (0.69) و C (0.31) في مجموعة النساء العقيمات. أما في مجموعة المقارنة فكان تكرار التراكيب الوراثية للنمط TT (1) ولم يوجد أي تكرار للتراكيبين الوراثيين CC و TC بينما بلغ تكرار الأليل T (1) وعدم وجود أي تكرار للأليل C.

جدول (20): تكرار التراكيب الوراثية والأليلات لجين *CYP17* في النساء العقيمت والمقارنة.

التكرار		الأليلات	التكرار		التركيب الوراثي
مجموعة المقارنة	النساء العقيمت		مجموعة المقارنة	النساء العقيمت	
1	0.69	T	1	0.50	TT
0	0.31	C	0	0.37	TC
			0	0.13	CC

يوضح الجدول (21) والشكل (14) أعداد ونسب توزيع التراكيب الوراثية والأليلات في عينات النساء المصابات بالعقم والنساء السليمات (المقارنة)، أذ لوحظ أن نسبة التركيب الوراثي البري TT في النساء المصابات بالعقم ونساء المقارنة غير متساوية حيث بلغت (50.0%) في النساء العقيمت و(100.0%) في النساء السليمات (المقارنة) ولم يكن هناك فرق معنوي قيمته ( $P = 0.18$ ) عند مستوى الاحتمال ( $P < 0.05$ ) والنسبة الحرجة (OR) كانت (0.11) وكانت نسبته كأليل وقائي من العقم Preventive fraction (PF) وبلغت (0.89) ومدة الثقة (CI) تتراوح بين (0.005-2.727).

وبالنسبة للتركيب الوراثي المتباين الزيجة TC فوجد أن نسبته بلغت (37.5%) في النساء العقيمت بينما لوحظ غيابه بالكامل في عينات المقارنة ولم توجد هناك فروق ذات دلالة إحصائية أذ كانت قيمته ( $P = 0.29$ ) عند مستوى الاحتمال ( $P < 0.05$ ) والنسبة الحرجة (OR) كانت (5.73) وكانت نسبته كأليل مسبب Etiological fraction (EF) ومرتبطة مع العقم بلغت (0.375) ومدة الثقة (CI) تتراوح بين (0.230-142.550).

أما التركيب الوراثي متمائل الزيجة (الطافر) CC كانت نسبته (12.5%) في النساء العقيمات أما في عينات المقارنة ف لوحظ غيابه التام ولم يكن هناك فرق معنوي فكانت قيمته ( $P = 0.34$ ) عند مستوى الاحتمال ( $P < 0.05$ ) وقيمة النسبة الحرجة (OR) هي (1.80)، أما كأليل مسبب Etiological fraction (EF) ومرتبطة مع العقم بلغت نسبته (0.125) ومدة الثقة (CI) تتراوح بين (0.059-54.333). كشفت نتائجنا عن اختلاف كبير في TC بين مرضى متلازمة تكيس المبايض والمقارنة حيث كانت النسبة 37.5% مقابل عدم وجود أي نسبة لمجموعة المقارنة وهذا متوافق مع نتيجة الباحث (Munawar Lone *et al.*, 2021) الذي كشف عن تواتر مرتفع بشكل ملحوظ في التركيب الوراثي TC ، في المرضى بالمقارنة مع مجموعة المقارنة حيث وجد أن توزيع التراكيب الوراثية لجين *CYP17* (CC ، TC ، TT) كانت: 43.1% ، 54.9% ، و 2% على التوالي والنسبة الحرجة (OR= 4.97) ومدة الثقة (95% CI) هي (2.75-8.33) ولكن النتيجة معنوية ( $p < 0.01$ ) في المرضى وتختلف التراكيب الوراثية عن مجموعة المقارنة فكانت (86% و 12% و 2%) على التوالي. وكان هذا متوافق مع الباحث (Wiweko *et al.*, 2011) الذي وجد علاقة ما بين حالة فرط الأندروجينات Hyperandrogenemia مع الأليل CC في النساء المصابات بالعقم ومتلازمة تكيس المبايض. وكانت نتائجنا مطابقة أيضاً للباحث (Li *et al.*, 2012) حيث لاحظ زيادة كبيرة في المخاطر (TC مقابل TT) فكانت النتيجة للتركيب الوراثي TC (OR = 1.44) ، 95% - CI = 1.10-1.88 اما التركيب الوراثي TT فكانت النسبة الحرجة (OR = 1.41) ومدة الثقة (1.10-1.81) 95% CI. بالنسبة الى نسبة الأليل T في عينات النساء العقيمات وعينات المقارنة كان (68.7%) و (1.0%) على التوالي. أما نسبة الأليل C فكانت نسبته (31.3%) في النساء العقيمات وعدم وجود اي نسبة للأليل في عينات المقارنة الشكل (26).

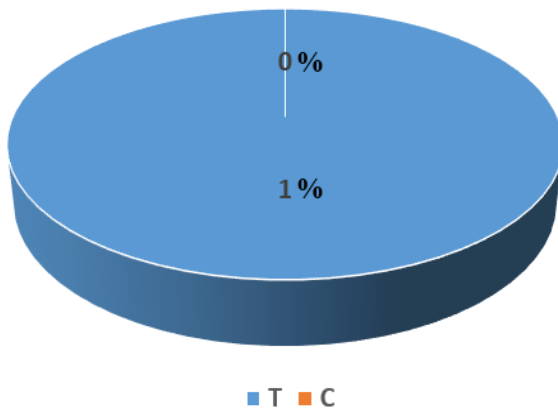
جدول (21): توزيع التراكيب الوراثية لجين *CYP17* في النساء العقيمت والمقارنة.

P value	(95%CI)	OR	المقارنة العدد (%)	النساء العقيمت العدد (%)	التركيب الوراثي
0.18 NS	0.005-2.727	0.11	4 (100.0%)	4 (50.0%)	TT
					0.89
0.29 NS	0.230-142.550	5.73	0	3 (37.5%)	TC
					0.375
0.34 NS	0.059-54.333	1.80	0	1 (12.5%)	CC
					0.125

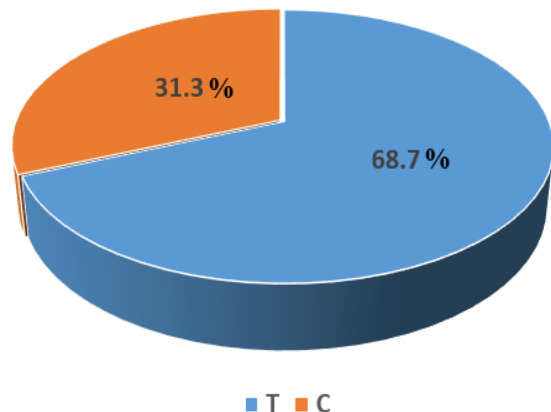
نسبة Preventive fraction =P.F، (مدة الثقة) Confidence Intervals =CI، Odds ratio =OR (النسبة الحرجة)،

الجزء الوقائي)، Etiological fraction =E.F (نسبة الجزء المسبب). NS=غير معنوي عند مستوى احتمال  $P<0.05$ .

نسبة توزيع الأليلات لجين  
*CYP17* في عينة المقارنة



نسبة توزيع الأليلات لجين  
*CYP17* في النساء العقيمت



شكل (26) نسبة توزيع الأليلين T و C للجين *CYP17* في عينة النساء العقيمت والمقارنة

بإستخدام قانون توازن هاردي واينبرغ أظهرت نتائج الجين *CYP17* عدم وجود فرق ذي دلالة

إحصائية بين مجموعة النساء العقيمت ومجموعة المقارنة وكانت قيمته ( $P= 0.7189$ ) عند مستوى

احتمالية ( $P < 0.05$ ) هذا يعني أن مجموعة المقارنة تخضع لتوزيع هاردي واينبرغ وكانت الأعداد المشاهدة للتركيب الوراثية (CC و TC و TT) (1 و 3 و 4) على التوالي والأعداد المتوقعة (0.78 و 3.44 و 3.78) على التوالي أيضاً أما قيمة اتزان هاردي واينبرغ للتركيب الوراثية TT (47.27) و TC (42.97) و CC (9.77) كما هو موضح في الجدول (22).

جدول (22): التركيب الوراثية لجين *CYP17* واعدادها المشاهدة والمتوقعة وقيمة اتزان هاردي- واينبرغ في النساء العقيمات والمقارنة.

<i>P</i> value	اتزان هاردي واينبرغ (%)	العدد المتوقع	العدد المشاهد	التركيب الوراثي
0.7189	47.27	3.78	4	TT
	42.97	3.44	3	TC
	9.77	0.78	1	CC

يُعد أنزيم *CYP17* المفتاح الرئيس في المسار الحيوي لبناء الأستروجينات، إذ يتحول الى  $17\alpha$ - hydroxy Pregnenolone بواسطة الأنزيم *CYP17* ( $17\alpha$ - hydroxylase) وبنفس الأنزيم تتحول الى dehydroepiandrosterone (DHEA) وبواسطة الأنزيم  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase ( $3\beta$ -HSD) تتحول الى Androstenedione (ASD) (Wickenheisser *et al.*, 2004). وبالتالي فإن زيادة الفعالية الانزيمية لأنزيم *CYP17* تنعكس على مستوى عملية الاستنساخ. فقد وجد (Wood *et al.*, 2004) ان حدوث طفرة وراثية في منطقة المحفز (Promoter) لجين *CYP17* تؤدي الى تضاعف مستوى التعبير الجيني بحدود 2-3 مرات وبالتالي تؤثر على وظيفته. اما (Wickenheisser *et al.*, 2004; Wickenheisser *et al.*, 2006) بينوا



ان حدوث تغير وراثي في الموقع 16- التابع لمنطقة محفز جين *CYP17* تؤدي الى زيادة عوامل النسخ التي ترتبط بمنطقة المحفز وخاصة عامل النسخ NF 1C1C، وبالتالي زيادة عوامل النسخ تزيد من عملية التعبير الجيني في النساء المصابات بتكيس المبايض. كذلك بين ( Trevisan *et al.*, 2014) ان وجود الاليل الطافر C في جين (*CYP17* (-34 T>C) يرتبط بمستويات اعلى من الأنشطة الانزيمية وبالتالي يتسبب في زيادة نسبة الاندروجين مقارنةً بالاليل T.

#### 4-7: العلاقة بين التراكيب الوراثية للجينات المدروسة ومؤشر كتلة الجسم والعمر

##### 4-7-1: جين *FSHR*

يتبين من الجدول (23) وجود فرق معنوي ( $P<0.05$ ) في مؤشر كتلة الجسم (BMI) للنساء الحاملة للتراكيب الوراثي الهجين AG الذي كانت قيمته  $28.66\pm 3.06$  كغم/م<sup>2</sup> على بقية النساء ذات التركيبين الوراثيين AA و GG والذي بلغت  $27.95\pm 1.83$  و  $28.23\pm 2.92$  كغم/م<sup>2</sup> وهذا مطابق لما توصل اليه (Rai *et al.*, 2019) بوجود فرق معنوي بين نساء العقيمت ومجموعة المقارنة مع مؤشر كتلة الجسم قدر ب- ( $P=0.0001$ ). أما بالنسبة للعمر فقد كان لتعدد الأشكال الوراثية تأثيراً معنوياً ( $P<0.05$ ) إذ كانت قيمته في النساء ذات التركيب الوراثي الطافر GG ( $32.10\pm 4.67$  سنة) مقارنة بـ ( $33.33\pm 3.86$  سنة) للنساء ذات التركيب الوراثي البري AA أما النساء ذات التركيب الوراثي الهجين AG فقد كانت قيمتها ( $31.88\pm 5.08$  سنة) في حين لم تتفق مع نتيجة (Rai *et al.*, 2019) الذي لم يجد فرق معنوي بين النساء العقيمت ومجموعة المقارنة مع العمر وقدر ب- ( $P=1.000$ ).

جدول (23): علاقة مؤشر كتلة الجسم (BMI) والعمر مع التراكيب الوراثية لجين *FSHR*.

العمر (سنة) Mean ± SD	مؤشر كتلة الجسم (Kg/m <sup>2</sup> ) Mean ± SD	التركيب الوراثي
33.33±3.86	27.95±1.83	AA
31.88±5.08	28.66±3.06	AG
32.10±4.67	28.23±2.92	GG
0.0174	0.042	P value

#### 4-7-2: جين *FSHβ*

يوضح الجدول (24) العلاقة بين التراكيب الوراثية للطفرة ( $G>T$  -211) في مؤشر كتلة الجسم والعمر، إذ أظهرت النتائج فروقاً معنوية ( $P<0.05$ ) في مؤشر كتلة الجسم الذي بلغ في التركيب الوراثي الطافر TT  $28.43\pm 2.91$  كغم/م<sup>2</sup> بينما بلغ  $28.01\pm 3.26$  كغم/م<sup>2</sup> في التركيب الوراثي البري GG أما في التركيب الوراثي الهجين GT فبلغ  $27.87\pm 3.04$  كغم/م<sup>2</sup>، ولم تسجل فروق معنوية بين الأعمار باختلاف التراكيب الوراثية وكانت القيم ( $30.12\pm 3.95$  و  $31.00\pm 4.46$  و  $30.85\pm 3.40$ ) سنة للتراكيب الوراثية TT و GT و GG على التوالي.

جدول (24): علاقة مؤشر كتلة الجسم (BMI) والعمر مع التراكيب الوراثية لجين *FSHβ*.

العمر (سنة) Mean ± SD	مؤشر كتلة الجسم (Kg/m <sup>2</sup> ) Mean ± SD	التركيب الوراثي
30.85± 3.40	28.01±3.26	GG
31.00±4.46	27.87±3.04	GT
30.12±3.95	28.43±2.91	TT
0.085	0.018	<i>P</i> value

#### 3-7-4: جين *CYP17*

لم تظهر نتائج التحليل الاحصائي جدول (25) أي تأثير معنوي ( $P < 0.05$ ) للتراكيب الوراثية لجين *CYP17* في مؤشر كتلة الجسم، إذ أظهرت النتائج ان اعلى قيمة في مؤشر كتلة الجسم كانت في التركيب الوراثي CC ( $28.23 \pm 2.65$ ) وادناها في التركيب الوراثي TT ( $26.70 \pm 2.38$ ). كذلك لم نلاحظ من الجدول وجود فروق معنوية للعلاقة بين التراكيب الوراثية والعمر.

جدول (25): علاقة مؤشر كتلة الجسم (BMI) والعمر مع التراكيب الوراثية لجين *CYP17*.

العمر (سنة) Mean ± SD	مؤشر كتلة الجسم (Kg/m <sup>2</sup> ) Mean ± SD	التركيب الوراثي
29.54±5.75	26.70±2.38	TT
33.08±4.11	27.85±4.08	TC
31.00±3.79	28.23±2.65	CC
0.314	0.777	<i>P</i> value

تعد السمنة من أهم علامات الإصابة بالعقم كونها تلعب دوراً أساسياً في التغيرات النكاثرية والوظيفية التي تكون مرتبطة مع بعضها البعض، فكلما زاد النسيج الشحمي بالجسم زادت قابلية الجسم على تصنيع الأندروجينات الفعالة وذلك لوجود علاقة طردية بينهما، إذ يزداد مستوى هرمون الأندروجين في الجسم بزيادة السمنة بسبب تحول الكولسترول بعمليات أيضية إلى هرمون التستوستيرون المحيطي الذي يُعد مصدراً آخرًا لهذا الهرمون إضافةً إلى المبيض (Valkeuburg *et al.*, 2008). وجد (Katole and Saoji, 2019) أن أنتشار العقم الأولي عند النساء يزداد مع ارتفاع مؤشر كتلة الجسم (BMI) ونمط الحيض غير المنتظم والتاريخ العائلي للعقم والتقدم بالعمر.

## خامساً: الاستنتاجات والتوصيات

## Conclusions and Recommendations

## 1-5: الاستنتاجات

يمكن الاستنتاج من الدراسة الحالية ما يلي:

1. أن السبب في ضعف استجابة النساء العقيمات للعلاج الهرموني قد لا يكون بسبب اضطراب الهرمون بل بسبب خلل في المستقبلات الخاصة في الأعضاء الهدف كالمبايض.
2. أظهرت نتائج تحليل تتابعات النيوكليوتيدات الكشف عن طفرتين وراثية في جين *FSHR* وطفرة واحدة في جيني *FSHβ* و *CYP17*.
3. تغيير شكل البروتين ثلاثي الأبعاد 3D لجين *FSHR* نتيجة تغيير الأحماض الأمينية التي تم الكشف في النساء العقيمات مقارنة برقم الأنضمام المسجل في بنك الجينات.
4. أن الأليل G والنمط الوراثي GG لجين *FSHR* لهم ارتباط مع العقم كجزء مسبب للعقم بينما الأليل A والنمطين الوراثيين AA و AG فقد أظهر ارتباطاً مع جزء الأليل الوقائي للمرض.
5. أن الأليل G والنمط الوراثي GG لجين *FSHβ* لهم ارتباط معنوي مع الجزء المسبب للعقم بينما الأليل T والنمطين الوراثيين TT و GT أظهر ارتباطاً مع جزء الأليل الوقائي للعقم.
6. أن الأليل C والنمطين الوراثيين CC و TC لجين *CYP17* لهم ارتباط معنوي مع الجزء المسبب للعقم بينما الأليل T والنمط الوراثي TT أظهر ارتباطاً مع جزء الأليل الوقائي للعقم.
7. وجود ارتباط معنوي بين التراكيب الوراثية في جيني *FSHβ* و *FHSR* ومؤشر كتلة الجسم وكذلك ارتباط معنوي بين *FHSR* والعمر، بينما لم يكن هناك أي فرق معنوي يذكر لجين *CYP17* في مؤشر كتلة الجسم والعمر.

**2-5: التوصيات Recommendations**

- 1- تأكيد أهمية إجراء الاختبارات الجزيئية للجينات ذات العلاقة بالعمق الى جانب الاختبارات الهرمونية لتشخيص العمق.
- 2- إجراء دراسة للكشف عن علاقة التشكلات الوراثية للجينات المدروسة مع مستوى الهرمونات الغدية للمناسل (FSH,LH) وأجراء دراسة على جينات أخرى ذات علاقة بالعمق أيضاً.
- 3- نوصي بإستخدام تعدد الاشكال الوراثية في الجينات المدروسة كأدوات تشخيصية للعمق.
- 4- دراسة التعبير الجيني لجينات *FSHR* و *FSHβ* و *CYP17* في الرجال والنساء وتأثيرها على العمق.
- 5- التوسع في استخدام برامج المعلوماتية الحيوية لأهميته والتي يمكن الأستفادة منها في عدة مجالات.
- 6- أهمية تخفيض الوزن والموازنة الهرمونية حيث تعتبر علاج أساسي مهم لحصول حالة الحمل.

## سادساً – المصادر

- Ali, R. M., Shkurat, T. P., Alexandrova, A. A., Bugrimova, E. S., Lomteva, S. V., & Ammar, M. N. (2022). Association of CYP17 gene polymorphism (rs743572) with polycystic ovary syndrome. *Meta Gene*, 31, 100996.
- Al-Khafaji, H. M. (2017). Detection one of DNA repair gene for lung cancer in sample of Iraqi patients. *Iraqi journal of biotechnology*, 16(3).
- Al-Masoudi, N. A., Ali, D. S., Saeed, B., Hartmann, R. W., Engel, M., Rashid, S., & Saeed, A. (2014). New CYP17 hydroxylase inhibitors: synthesis, biological evaluation, QSAR, and molecular docking study of new pregnenolone analogs. *Archiv der Pharmazie*, 347(12), 896-907.
- Al-Rubae'I, S.H.N.; Naji, T. S. and Turki, K.M., (2017). Common variation of the CYP17 gene in Iraqi women with endometriosis disease. *Genomics Data*, 11:55-59.
- Alviggi, C., Conforti, A., Santi, D., Esteves, S. C., Andersen, C. Y., Humaidan, P., & Simoni, M. (2018). Clinical relevance of genetic variants of gonadotrophins and their receptors in controlled ovarian stimulation: a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction update*, 24(5), 599-614.
- Amaral, A. M., Reis, M. S., & Silva, F. R. (2007). O programa BLAST: guia prático de utilização. *EMBRAPA. Documentos*, 224.
- Anagnostou, E., Kafkoutso, A., Mavrogianni, D., Domali, E., Dimitroulia, E., Mathiopoulos, D., & Loutradis, D. (2021a). Individual and combined assessment of Ser680Asn FSH receptor and FSH $\beta$ -211 G> T gene polymorphisms in ovarian response in

- 
- IVF/ICSI program. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 22(14), 1857-1865.
- Anagnostou, E., Mavrogianni, D., Prifti, I. N., Dimitroulia, E., Protopapas, A., Drakakis, P., & Loutradis, D. (2021 b).** The Role of FSHR SNPs and AMH in Follicular Fluid and Serum in Ovarian Response during COS: A Pilot Study. *International Journal of Reproductive Medicine*, 2021.
- Antara, A. and Smita, D. (2015).** Role of the extracellular and intracellular loops of follicle-stimulating hormone receptor in its function. *Frontiers Endocrinology*. 10:1-10.
- Antognelli, C., Del Buono, C., Ludovini, V., Gori, S., Talesa, V. N., Crinò, L., ... & Rulli, A. (2009).** CYP17, GSTP1, PON1 and GLO1 gene polymorphisms as risk factors for breast cancer: an Italian case-control study. *BMC cancer*, 9(1), 1-14.
- Arthur, I.H. (2015).** <http://www.hhmi.org/scientists/arthur-l-horwich>.
- Ashraf, S., Rasool, S. U. A., Nabi, M., Ganie, M. A., Jabeen, F., Rashid, F., & Amin, S. (2021).** CYP17 gene polymorphic sequence variation is associated with hyperandrogenism in Kashmiri women with polycystic ovarian syndrome. *Gynecological Endocrinology*, 37(3), 230-234.
- Balen, A. H., Conway, G. S., Kaltsas, G., Techatrasak, K., Manning, P. J., West, C., & Jacobs, H. S. (1995).** Andrology: Polycystic ovary syndrome: the spectrum of the disorder in 1741 patients. *Human reproduction*, 10(8), 2107-2111.
- Bamanga, R. A., Ja'afar, J. N., & Gali, A. I. (2018).** Progress in DNA sequencing. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 11(1), 110-119.



- Banerjee, A. A., Joseph, S., & Mahale, S. D. (2021).** From cell surface to signalling and back: The life of the mammalian FSH receptor. *The FEBS Journal*, 288(8), 2673-2696.
- Barcaccia, G., Lucchin, M., & Cassandro, M. (2015).** DNA barcoding as a molecular tool to track down mislabeling and food piracy. *Diversity*, 8(1), 2.
- Benksim, A., Elkhoudri, N., Addi, R. A., Baali, A., & Cherkaoui, M. (2018).** Difference between primary and secondary infertility in Morocco: frequencies and associated factors. *International journal of fertility & sterility*, 12(2), 142.
- Bhartiya, D., & Singh, J. (2015).** FSH–FSHR3–stem cells in ovary surface epithelium: basis for adult ovarian biology, failure, aging, and cancer. *Reproduction*, 149(1), R35-R48.
- Bhartiya, D., & Patel, H. (2021).** An overview of FSH-FSHR biology and explaining the existing conundrums. *Journal of Ovarian Research*, 14(1), 1-14.
- Bianco, B.; Loureiro, F. A.; Trevisan, C. M.; Peluso, C.; Christofolini, D. M.; Montagna, E.; Laganà, A. S. and Barbosa, C. P. (2021).** Effects of FSHR and FSHB variants on hormonal profile and reproductive outcomes of infertile women with endometriosis. *Journal Frontiers in Endocrinology*, 21: 1-10.
- Bohlin, J. ; Eldholm, V. ; Pettersson, J.H. ; Brynildsrud, O. and Snipen, L. (2017).** The nucleotide composition of microbial genomes indicates differential patterns of selection on core and accessory genomes. *BMC Genomics*, 18(1) :151 doi 10.1186/s12864-017-3543-7.
- Branco, I., & Choupina, A. (2021).** Bioinformatics: new tools and applications in life science and personalized medicine. *Applied microbiology and biotechnology*, 105(3), 937-951.

- Bulun SE, Imir G, Utsunomiya H, Thung S, Gurates B, Tamura M, (2005).** Aromatase in endometriosis and uterine leiomyomata. *J Steroid Biochem Mol Biol.*; 95:57–62.
- Casarini, L., Moriondo, V., Marino, M., Adversi, F., Capodanno, F., Grisolia, C., & Simoni, M. (2014).** FSHR polymorphism p. N680S mediates different responses to FSH in vitro. *Molecular and cellular endocrinology*, 393(1-2), 83-91.
- Casarini, L., Reiter, E., & Simoni, M. (2016).**  $\beta$ -arrestins regulate gonadotropin receptor-mediated cell proliferation and apoptosis by controlling different FSHR or LHCGR intracellular signaling in the hGL5 cell line. *Molecular and cellular endocrinology*, 437, 11-21.
- Casarini, L., Santi, D., Simoni, M., & Potì, F. (2018).** ‘Spare’ luteinizing hormone receptors: facts and fiction. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 29(4), 208-217.
- Casarini, L., & Crépieux, P. (2019).** Molecular mechanisms of action of FSH. *Frontiers in endocrinology*, 10, 305.
- Chao, J., Tang, F., & Xu, L. (2022).** Developments in Algorithms for Sequence Alignment: A Review. *Biomolecules*, 12(4), 546.
- Chatterjee, N., & Walker, G. C. (2017).** Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*, 58(5), 235-263.
- Chu, C., Xu, B., & Huang, W. (2010).** A study on expression of FSH and its effects on the secretion of insulin and glucagon in rat pancreas. *Tissue and Cell*, 42(6), 370-375.
- Claahsen-van der Grinten, H. L., Stikkelbroeck, N., Falhammar, H., & Reisch, N. (2021).** Management of endocrine disease: gonadal dysfunction in congenital adrenal hyperplasia. *European Journal of Endocrinology*, 184(3), R85-R97.
- Clustalw Omega. (2022).** <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

- Cpndb . (2016).**<http://www.cpndb.ca/index.php> . The Chaperonins Data base.
- Coelho, M. C., Pinto, R. M., & Murray, A. W. (2019).** Heterozygous mutations cause genetic instability in a yeast model of cancer evolution. *Nature*, 566(7743), 275-278.
- Conforti, A., Vaiarelli, A., Cimadomo, D., Bagnulo, F., Peluso, S., Carbone, L., ... & Alviggi, C. (2019).** Pharmacogenetics of FSH Action in the Female. *Frontiers in endocrinology*, 10, 398.
- Conforti, A., Tüttelmann, F., Alviggi, C., Behre, H. M., Fischer, R., Hu, L., & Longobardi, S. (2022).** Effect of Genetic Variants of Gonadotropins and Their Receptors on Ovarian Stimulation Outcomes: A Delphi Consensus. *Frontiers in endocrinology*, 12.
- Conley A, and Hinshelwood M. (2001).** Mammalian aromatases. *Reproduction*;121(5):685-95.
- Dabrowski, E., Jensen, R., Johnson, E. K., Habiby, R. L., Brickman, W. J., & Finlayson, C. (2019).** Turner syndrome systematic review: spontaneous thelarche and menarche stratified by karyotype. *Hormone Research in Paediatrics*, 92(3), 143-149.
- De Lima Corrêa, L., Borguesan, B., Krause, M. J., & Dorn, M. (2018).** Three-dimensional protein structure prediction based on memetic algorithms. *Computers & Operations Research*, 91, 160-177.
- Deyhoul, N., Mohamaddoost, T., & Hosseini, M. (2017).** Infertility-related risk factors: a systematic review. *Int J Womens Health Reprod Sci*, 5(1), 24-29.
- Dhutmal, R. R., Mundhe, A. G., & More, A. W. (2018).** Molecular marker techniques: A Review. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 6, 816-825.
- Dibby, H. J. (2015).** Blood Group and Infertility Relationship. *Medical Journal of Babylon*, 12(2).
- Ding, X., & Schimenti, J. C. (2021).** Strategies to identify genetic variants causing infertility. *Trends in Molecular Medicine*, 27(8), 792-806.

- 
- Diniz, W. D. S., & Canduri, F. (2017).** Bioinformatics: an overview and its applications. *Genet Mol Res*, 16(1), 10-4238.
- Dominguez-Lopez, P., Diaz-Cueto, L., Arechavaleta-Velasco, M., Caldiño-Soto, F., Ulloa-Aguirre, A., & Arechavaleta-Velasco, F. (2018).** The follicle-stimulating hormone receptor Asn680Ser polymorphism is associated with preterm birth in Hispanic women. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 31(5), 580-585.
- Dorado, G., Gálvez, S., Rosales, T. E., Vásquez, V. F., & Hernández, P. (2021).** Analyzing modern biomolecules: the revolution of nucleic-acid sequencing—Review. *Biomolecules*, 11(8), 1111.
- Edward, L. M. (2008).** Unexplained Infertility. *Fertility Centers of Illinois*.
- El-Ezzi, A. A., Zaidan, W. R., El-Saidi, M. A., Al-Ahmadih, N., Mortenson, J. B., & Kuddus, R. H. (2014).** Association of benign prostate hyperplasia with polymorphisms in VDR, CYP17, and SRD5A2 genes among Lebanese men. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(3), 1255-1262.
- Estrada, D. F., Laurence, J. S., & Scott, E. E. (2016).** Cytochrome P450 17A1 interactions with the FMN domain of its reductase as characterized by NMR. *Journal of Biological Chemistry*, 291(8), 3990-4003.
- Excoffier, L. and Lischer, H. E. (2010).** Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.*, 10: 564-567.
- Frazier, G. H. (2019).** Defusing a Ticking Time Bomb: The Complicated Considerations Underlying Compulsory Human Genetic Editing. *Hastings Sci. & Tech. LJ*, 10, 39.

- Fontana, R., & Della Torre, S. (2016).** The deep correlation between energy metabolism and reproduction: a view on the effects of nutrition for women fertility. *Nutrients*, 8(2), 87.
- Fox, K. M., Dias, J. A., & Van Roey, P. (2001).** Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. *Molecular endocrinology*, 15(3), 378-389.
- García-Jiménez, G., Zariñán, T., Rodríguez-Valentín, R. et al. (2018).** Frequency of the T307A, N680S, and -29G>A single-nucleotide polymorphism in the follicle-stimulating hormone receptor in Mexican subjects of Hispanic ancestry. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 16, 100
- Garolla, A., Pizzol, D., Carosso, A. R., Borini, A., Ubaldi, F. M., Calogero, A. E., & Foresta, C. (2021).** Practical clinical and diagnostic pathway for the investigation of the infertile couple. *Frontiers in Endocrinology*, 1032.
- Ghannam, J. Y., Wang, J., & Jan, A. (2021).** Biochemistry, DNA Structure. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Grigorova, M., Punab, M., Ausmees, K., & Laan, M. (2008).** FSHB promoter polymorphism within evolutionary conserved element is associated with serum FSH level in men. *Human reproduction*, 23(9), 2160-2166.
- Gotoh O. (1992).** Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J. Biol. Chem.* 267, 83–90.
- Guzman, I., & Gruebele, M. (2014).** Protein folding dynamics in the cell. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(29), 8459-8470.
- Hatasaka, H. (2011).** New perspectives for unexplained infertility. *Clinical obstetrics and gynecology*, 54(4), 727-733.

- Hayes, M. G., Urbanek, M., Ehrmann, D. A., Armstrong, L. L., Lee, J. Y., Sisk, R., ... & Dunaif, A. (2015).** Genome-wide association of polycystic ovary syndrome implicates alterations in gonadotropin secretion in European ancestry populations. *Nature communications*, 6(1), 1-13.
- Heather, J.M. ; Chain, B. (2016).** The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107 (1): 1–8.
- Hinnerwisch, J., Fenton, W. A., Furtak, K. J., Farr, G. W., & Horwich, A. L. (2005).** Loops in the central channel of ClpA chaperone mediate protein binding, unfolding, and translocation. *Cell*, 121(7), 1029-1041.
- Hood, L., & Rowen, L. (2013).** The human genome project: big science transforms biology and medicine. *Genome medicine*, 5(9), 1-8.
- Huang, W., Cao, Y., & Shi, L. (2019).** Effects of FSHR polymorphisms on premature ovarian insufficiency in human beings: a meta-analysis. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17(1), 1-6.
- Huhtaniemi, I., & Rivero-Müller, A. (2019).** Mutations and polymorphisms, and their functional consequences, in gonadotropin and gonadotropin receptor genes. In *The Ovary* (pp. 127-148). Academic Press.
- Iliodromiti, S., Iglesias Sanchez, C., Messow, C. M., Cruz, M., Garcia Velasco, J., & Nelson, S. M. (2016).** Excessive age-related decline in functional ovarian reserve in infertile women: prospective cohort of 15,500 women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(9), 3548-3554.
- Isaksson, R. (2002).** Unexplained infertility: Studies on aetiology, treatment options and obstetric outcome.
- Jahnke, G., Smidla, J., & Poczai, P. (2022).** MolMarker: A Simple Tool for DNA Fingerprinting Studies and Polymorphic Information Content Calculation. *Diversity*, 14(6), 497.

- 
- Jurczewska, J., & Szostak-Węgierek, D. (2022).** The Influence of Diet on Ovulation Disorders in Women—A Narrative Review. *Nutrients*, 14(8), 1556.
- Kappelman-Fenzl, M. (2021).** Alignment. In *Next Generation Sequencing and Data Analysis* (pp. 111-122). Springer, Cham.
- Kalima-Munalula, M. N., Ahmed, Y., & Vwalika, B. (2017).** Factors associated with infertility among women attending the gynaecology clinic at University Teaching Hospital, Lusaka, Zambia. *Medical Journal of Zambia*, 44(1), 41-44.
- Kardelen, A. D., Toksoy, G., Baş, F., Abalı, Z. Y., Gençay, G., Poyrazoğlu, Ş., ... & Darendeliler, F. (2018).** A rare cause of congenital adrenal hyperplasia: clinical and genetic findings and follow-up characteristics of six patients with 17-hydroxylase deficiency including two novel mutations. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, 10(3), 206.
- Karkola, S. (2009).** Molecular Modelling of Estrogen-Producing Enzymes CYP450 Aromatase and 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1.
- Kartavtsev, Y. P. (2021).** Some Examples of the Use of Molecular Markers for Needs of Basic Biology and Modern Society. *Animals*, 11(5), 1473.
- Katole, A., & Saoji, A. V. (2019).** Prevalence of primary infertility and its associated risk factors in urban population of central India: A community-based cross-sectional study. *Indian journal of community medicine: official publication of Indian Association of Preventive & Social Medicine*, 44(4), 337.
- Kaur, S., Ali, A., Ahmad, U., Siahbalaee, Y., Pandey, A. K., & Singh, B. (2019).** Role of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in common

- migraine. *The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*, 55(1), 1-7.
- Kazemijaliseh, H., Tehrani, F. R., Behboudi-Gandevani, S., Hosseinpanah, F., Khalili, D., & Azizi, F. (2015).** The prevalence and causes of primary infertility in Iran: a population-based study. *Global journal of health science*, 7(6), 226.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. and Stemberg, M. J. (2015).** The Phyre<sup>2</sup> web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10: 845-858.
- Kmiecik, S., & Kolinski, A. (2011).** Simulation of chaperonin effect on protein folding: a shift from nucleation–condensation to framework mechanism. *Journal of the American Chemical Society*, 133(26), 10283-10289.
- Khmil, M., Khmil, S., & Marushchak, M. (2020).** Hormone Imbalance in Women with Infertility Caused by Polycystic Ovary Syndrome: Is There a Connection with Body Mass Index?. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 8(B), 731-737.
- Kumar, S., Chinnusamy, V., & Mohapatra, T. (2018).** Epigenetics of modified DNA bases: 5-methylcytosine and beyond. *Frontiers in genetics*, 9, 640.
- Kumar, K. R., Cowley, M. J., & Davis, R. L. (2019).** Next-generation *and hemostasis* (Vol. 45, No. 07, pp. 661-673). Thieme Medical Publishers.
- La Marca, A., Papaleo, E., Alviggi, C., Ruvolo, G., De Placido, G., Candiani, M., ... & Simoni, M. (2013).** The combination of genetic variants of the FSHB and FSHR genes affects serum FSH in women of reproductive age. *Human reproduction*, 28(5), 1369-1374.



- Laan, M., Grigороva, M., & Huhtaniemi, I. T. (2012).** Pharmacogenetics of FSH action. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, 19(3), 220.
- Laganà, A. S., Garzon, S., Götte, M., Viganò, P., Franchi, M., Ghezzi, F., & Martin, D. C. (2019).** The pathogenesis of endometriosis: molecular and cell biology insights. *International journal of molecular sciences*, 20(22), 5615.
- Laisk-Podar, T., Kaart, T., Peters, M., & Salumets, A. (2015).** Genetic variants associated with female reproductive ageing—potential markers for assessing ovarian function and ovarian stimulation outcome. *Reproductive biomedicine online*, 31(2), 199-209.
- Larsen, U. (2005).** Research on infertility: which definition should we use?. *Fertility and sterility*, 83(4), 846-852.
- Laven, J. S. (2019).** Follicle stimulating hormone receptor (FSHR) polymorphisms and polycystic ovary syndrome (PCOS). *Frontiers in Endocrinology*, 10, 23.
- Layman, L. C. (2002).** Human gene mutations causing infertility. *Journal of medical genetics*, 39(3), 153-161.
- Lee, S. Y., & Tsai, F. T. (2005).** Molecular chaperones in protein quality control. *BMB Reports*, 38(3), 259-265.
- Leon, L. I. R., Anastasopoulou, C., & Mayrin, J. V. (2021).** Polycystic Ovarian Disease. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Li, Y., Ganta, S., Cheng, C., Craig, R., Ganta, R. R., & Freeman, L. C. (2007).** FSH stimulates ovarian cancer cell growth by action on growth factor variant receptor. *Molecular and cellular endocrinology*, 267(1-2), 26-37.
- Li, Y., Liu, F., Luo, S., Hu, H., Li, X. H., & Li, S. W. (2012).** Polymorphism T→C of gene CYP17 promoter and polycystic ovary syndrome risk: a meta-analysis. *Gene*, 495(1), 16-22.

- Liu, X., Xu, M., Qian, M., & Yang, L. (2021).** CYP17 T/C (rs74357) gene polymorphism contributes to polycystic ovary syndrome susceptibility: evidence from a meta-analysis. *Endocrine Connections*, 10(12), R305-R316.
- Luciano, A. A., Lanzone, A., & Goverde, A. J. (2013).** Management of female infertility from hormonal causes. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 123, S9-S17.
- Martin, D. K., Vicente, O., Beccari, T., Kellermayer, M., Koller, M., Lal, R., ... & Dundar, M. (2021).** A brief overview of global biotechnology. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(sup1), S5-S14.
- Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., & Stevens, G. A. (2012).** National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS medicine*, 9(12), e1001356.
- Mashaghi, A., Kramer, G., Lamb, D. C., Mayer, M. P., & Tans, S. J. (2014).** Chaperone action at the single-molecule level. *Chemical reviews*, 114(1), 660-676.
- Masoumi, S. Z., Parsa, P., Darvish, N., Mokhtari, S., Yavangi, M., & Roshanaei, G. (2015).** An epidemiologic survey on the causes of infertility in patients referred to infertility center in Fatemieh Hospital in Hamadan. *Iranian journal of reproductive medicine*, 13(8), 513.
- Med Calc Software Ltd.** Odds ratio calculator. <https://www.medcalc.org/calc/odds-ratio.php> (Version 20.2; accessed December 15, 2022).
- Mena, G. P., Mielke, G. I., & Brown, W. J. (2020).** Do physical activity, sitting time and body mass index affect fertility over a 15-year period in women? Data from a large population-based cohort study. *Human Reproduction*, 35(3), 676-683.

- Meng, Q. X., Song, D., Li, H., Wang, W., Ou, J., Xu, Y. L., & Zheng, A. Y. (2018).** Association of Thr307Ala and Asn680Ser of Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene Polymorphisms with Gonadotropin Administration during Controlled Ovarian Hyperstimulation. *Reproductive and Developmental Medicine*, 2(02), 81-87.
- Mohammed, M. B., AL-Awadi, S. J., & Omran, M. A. (2015).** Association between polycystic ovary syndrome and genetic polymorphisms of CYP 17 gene in Iraqi women. *Iraqi journal of biotechnology*, 14(2).
- Monniaux, D., Rico, C., Larroque, H., Dalbies-Tran, R., Médigue, C., Clément, F., & Fabre, S. (2010).** Anti-Müllerian hormone, an endocrine predictor of the response to ovarian stimulation in the bovine species. *Gynécologie, obstétrique & fertilité*, 38(7-8), 465-470.
- Moridi, A., Roozbeh, N., Yaghoobi, H., Soltani, S., Dashti, S., Shahrahmani, N., & Banaei, M. (2019).** Etiology and risk factors associated with infertility. *Int J Women's Health Reprod Sci*, 7(3), 346-353.
- Munawar Lone, N., Babar, S., Sultan, S., Malik, S., Nazeer, K., & Riaz, S. (2021).** Association of the CYP17 and CYP19 gene polymorphisms in women with polycystic ovary syndrome from Punjab, Pakistan. *Gynecological Endocrinology*, 37(5), 456-461.
- Mustafa, M., Sharifa, A. M., Hadi, J., Hizam, E., & Aliya, S. (2019).** Male and female infertility: causes, and management. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, 18, 27-32.
- Nasser, A. M., Al-Jumaili, E. F., & Alhusni, Z. K. (2021).** The effect of pituitary hormones levels and relationship to female infertility in Baghdad province. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1853, No. 1, p. 012015). IOP Publishing.
- NCBI BLAST, (2022).** <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

- 
- Nguyen, P. T., Conley, A. J., Sneyd, J., Lee, R. S., Soboleva, T. K., & Shorten, P. R. (2013).** The role of enzyme compartmentalization on the regulation of steroid synthesis. *Journal of theoretical biology*, 332, 52-64.
- Nowicki, M., Bzhalava, D., & BaŁa, P. (2018).** Massively parallel implementation of sequence alignment with basic local alignment search tool using parallel computing in java library. *Journal of Computational Biology*, 25(8), 871-881.
- Olooto, W.E., Amballi, A.A. and Banjo, T.A. (2012).** A review of female infertility: important etiological factors and management. *J. Microbiol Biotech Res.* 2(3):379–385.
- Omer, N. N., Gornas, N., Rahmatalla, S. A., & Ahmed, M. K. A. (2016).** Genetic characterization of indigenous Sudanese cattle using FSHR and LHR genes. *American Academic Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences*, 24(1), 1-9.
- Ortega, M. S., Denicol, A. C., Cole, J. B., Null, D. J., Taylor, J. F., Schnabel, R. D., & Hansen, P. J. (2017).** Association of single nucleotide polymorphisms in candidate genes previously related to genetic variation in fertility with phenotypic measurements of reproductive function in Holstein cows. *Journal of dairy science*, 100(5), 3725-3734.
- Pace, C.N. (2009).** Protein Ionizable Groups: pK Values and Their Contribution to Protein Stability and Solubility. *J. Biol. Chem.*, 284(20) : 13285–13289. doi: 10.1074/jbc.R800080200
- Padhy, I., Song, J., & Mahapatra, A. (2020).** Role of biotechnology in pharmaceutical research: A comprehensive review. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(5), 472-486.
- Panawala, L. (2017).** Difference Between chromosome and Gene. *PEDIAA*, 2017 Article, 8.

- Papi, G., Paragliola, R. M., Concolino, P., Di Donato, C., Pontecorvi, A., & Corsello, S. M. (2018).** 46, XY disorder of sex development caused by 17 $\alpha$ -hydroxylase/17, 20-lyase deficiency due to homozygous mutation of CYP17A1 gene: Consequences of late diagnosis. *Case Reports in Endocrinology*, 2018.
- Patel, H., Bhatt, D., Shakhreliya, S., Lam, N. L., Maurya, R., & Singh, V. (2021).** An Introduction and Applications of Bioinformatics. In *Advances in Bioinformatics* (pp. 1-14). Springer, Singapore.
- Pei, J., Kinch, L. N., Otwinowski, Z., & Grishin, N. V. (2020).** Mutation severity spectrum of rare alleles in the human genome is predictive of disease type. *PLoS computational biology*, 16(5), e1007775.
- Pike, G. K. (2020).** Abortion and Infertility. *Issues L. & Med.*, 35, 173.
- Pettersson, E. ; Lundeberg, J. and Ahmadian, A. (2009).** Generations of sequencing technologies. *Genomics*, 93 (2): 105–111. doi:10.1016/j.ygeno.2008.10.003. PMID 18992322.
- Pevsner, J. (2015).** *Bioinformatics and functional genomics*. John Wiley & Sons.
- Polyzos, N. P., Neves, A. R., Drakopoulos, P., Spits, C., Alvaro Mercadal, B., Garcia, S., ... & Vuong, N. L. (2021).** The effect of polymorphisms in FSHR and FSHB genes on ovarian response: a prospective multicenter multinational study in Europe and Asia. *Human Reproduction*, 36(6), 1711-1721.
- Prosdocimi, F., Cerqueira, G. C., Binneck, E., Silva, A. F., Reis, A. N., Junqueira, A. C. M., ... & Folgueras-Flatschart, A. V. (2002).** Bioinformática: manual do usuário. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 29, 12-25.
- Prosdocimi, F. (2010).** Introdução à bioinformática. Curso Online.
- Rai, S., Kumari, P., Singh, A., & Singh, R. (2019).** Correlation of follicle-stimulating hormone receptor gene Asn 680 Ser (rs6166)

- polymorphism with female infertility. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 8(10), 3356.
- Ranjit, P., Varma, C. A. S. L., Maddela, N. R., & Reddy, K. V. (2021).** Biotechnology of Twenty-First Century. In *Innovations in Biotechnology for a Sustainable Future* (pp. 17-42). Springer, Cham.
- Raschia, M. A., Nani, J. P., Maizon, D. O., Beribe, M. J., Amadio, A. F., & Poli, M. A. (2018).** Single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with milk yield in Argentinean Holstein and Holstein x Jersey cows. *Journal of animal science and technology*, 60(1), 1-10.
- Ray, A., Shah, A., Gudi, A., & Homburg, R. (2012).** Unexplained infertility: an update and review of practice. *Reproductive biomedicine online*, 24(6), 591-602.
- Reddy, B., & Fields, R. (2022).** Multiple sequence alignment algorithms in bioinformatics. In *Smart Trends in Computing and Communications* (pp. 89-98). Springer, Singapore.
- Reynolds, C. R., Islam, S. A. and Sternberg, M. J. E. (2018).** EzMol: A web server wizard for the rapid visualization and image production of protein and nucleic acid structures. *Journal of Molecular Biology*, 430(15): 2244-2248.
- Rich, E. C., Burke, W., Heaton, C. J., Haga, S., Pinsky, L., Short, M. P., & Acheson, L. (2004).** Reconsidering the family history in primary care. *Journal of general internal medicine*, 19(3), 273-280.
- Rull, K., Grigorova, M., Ehrenberg, A., Vaas, P., Sekavin, A., Nõmmemees, D., ... & Laan, M. (2018).** FSHB– 211 G> T is a major genetic modulator of reproductive physiology and health in childbearing age women. *Human Reproduction*, 33(5), 954-966.
- Ruth, K. S., Campbell, P. J., Chew, S., Lim, E. M., Hadlow, N., Stuckey, B. G., ... & Perry, J. R. (2016).** Genome-wide association study with 1000 genomes imputation identifies signals for nine sex hormone-

- related phenotypes. *European Journal of Human Genetics*, 24(2), 284-290.
- Šalamun, V., Verdenik, I., Laganà, A. S., & Vrtačnik-Bokal, E. (2018).** Should we consider integrated approach for endometriosis-associated infertility as gold standard management? Rationale and results from a large cohort analysis. *Archives of gynecology and obstetrics*, 297(3), 613-621.
- Salo, T., & Gustafsson, C. (2016).** The effect of genetic diversity on ecosystem functioning in vegetated coastal ecosystems. *Ecosystems*, 19(8), 1429-1444.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001).** *Molecular cloning: a laboratory manual* (3). *Immunol*, 49: 895-909.
- Sathiyarayanan, S., Sundar, J. S., Madhankumar, E. K., Praneetha, A., Kalaiselvi, S., Gopinath, P. M., ... & Ramesh, U. (2014).** A study on significant biochemical changes in the serum of infertile women. *Int J Curr Res Aca Rev*, 2(2), 96-115.
- Saunders, R., & Deane, C. M. (2010).** Synonymous codon usage influences the local protein structure observed. *Nucleic acids research*, 38(19), 6719-6728.
- Schubert, M., Pérez Lanuza, L., & Gromoll, J. (2019).** Pharmacogenetics of FSH action in the male. *Frontiers in endocrinology*, 10, 47.
- Secchi, C., Belli, M., Harrison, T. N., Swift, J., Ko, C., Duleba, A. J., ... & Shimasaki, S. (2021).** Effect of the spatial-temporal specific theca cell Cyp17 overexpression on the reproductive phenotype of the novel TC17 mouse. *Journal of translational medicine*, 19(1), 1-15.

- Segal, T. R., & Giudice, L. C. (2019).** Before the beginning: environmental exposures and reproductive and obstetrical outcomes. *Fertility and sterility*, 112(4), 613-621.
- Shah, T., & Joshi, K. (2019).** Analysis of FOXO3a Gene Polymorphism Associated With Asthma. In *FOXO Transcription Factors* (pp. 259-266). Humana, New York, NY.
- Shen, C., Zaharias, P., & Warnow, T. (2022).** MAGUS+ eHMMs: improved multiple sequence alignment accuracy for fragmentary sequences. *Bioinformatics*, 38(4), 918-924.
- Shetty, O., Gurav, M., Bapat, P., Karnik, N., Wagh, G., Pai, T., ... & Desai, S. (2021).** Moving Next-Generation Sequencing into the Clinic. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*, 42(03), 221-228.
- significantly enhances overall performance. *Anal. Biochem.* 1997, 247, 30–33. [CrossRef]
- Silva, K. S. F. (2019).** Genetic Counseling, Polymorphisms and Breast Cancer . *Family Medicine and Disease Prevention*, 5 (1), 1-7.
- Simoni, M., Gromoll, J., & Nieschlag, E. (1997).** The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocrine reviews*, 18(6), 739-773.
- Sindiani, A. M., Batiha, O., Esra'a Al-zoubi, S. K., Alsoukhni, G., Alkofahi, A., Alahmad, N. A., ... & Abu-Halima, M. (2021).** Association of single-nucleotide polymorphisms in the ESR2 and FSHR genes with poor ovarian response in infertile Jordanian women. *Clinical and experimental reproductive medicine*, 48(1), 69.
- Singh, S. K. (2020).** Determination of risk factors of infertility in village women-An epidemiological survey. *Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research*, 8(1).



- Singh, H., Kumar, R., Mazumder, A., Mazumder, R., & Abdullah, M. M. (2022).** Insights into Interactions of Human Cytochrome P450 17A1. *Current Drug Metabolism*.
- Steed, J. M., Parker, S., & Reed, B. (2021).** Smoking and Maternal Health: Evidence that Female Infertility Can Be Attributed to Smoking and Improved with Smoking Cessation. *Advances in Family Practice Nursing, 3*, 135-157.
- Sukhumsirichart, W. (2018).** Polymorphisms. In *Genetic diversity and disease susceptibility*. IntechOpen.
- Sullivan, R. R., Faris, B. R., Eborn, D., Grieger, D. M., Cino-Ozuna, A. G., & Rozell, T. G. (2013).** Follicular expression of follicle stimulating hormone receptor variants in the ewe. *Reproductive Biology and Endocrinology, 11*(1), 1-8.
- Surcel, M., Doroftei, B., Neamtiu, I. A., Muresan, D., Caracostea, G., Goidescu, I., ... & Zlatescu-Marton, C. (2022).** Impact of Follicle Stimulating Hormone Receptor (FSHR) Polymorphism on the Efficiency of Co-Treatment with Growth Hormone in a Group of Infertile Women from Romania. *Diagnostics, 12*(10), 2371.
- Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W., & Kubista, M. (2015).** How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular detection and quantification, 3*, 9-16.
- Szymańska, K., Kałafut, J., & Rivero-Müller, A. (2018).** The gonadotropin system, lessons from animal models and clinical cases. *Minerva ginecologica, 70*(5), 561-587.
- Tafazoli, A., Wolczyński, S., Wawrusiewicz-Kurylonek, N., Esmaeili, S. A., & Milyk, W. (2021).** Pharmacogenomic Biomarkers of Follicle-Stimulating Hormone Receptor Malfunction in Females with Impaired

- Ovarian Response—A Genetic Survey. *Journal of Clinical Medicine*, 10(2), 170.
- Taha, A. B., & Rashid, K. H. (2013).** Etiology of infertility in couples attending maternity hospital in Erbil. *Zanco Journal of Medical Sciences (Zanco J Med Sci)*, 17(1), 322\_330-322\_330.
- Takács, K., & Grolmusz, V. (2021).** The multiple alignments of very short sequences. *FASEB BioAdvances*, 3(7), 523-530.
- Takai, K., Nakamura, K., Toki, T., Tsunogai, U., Miyazaki, M., Miyazaki, J., ... & Horikoshi, K. (2008).** Cell proliferation at 122 C and isotopically heavy CH<sub>4</sub> production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(31), 10949-10954.
- Tănase, A. E., Nemescu, D., Popescu, R., Carauleanu, A., Mogos, R. A., Luca, A., & Onofriescu, M. (2020).** Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphisms of ovarian reserve markers in Romanian population. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 20(6), 1-1.
- Thurlkill, R.L. (2006).** pK values of the ionizable groups of proteins. *Protein Sci.*, 15(5) : 1214–1218. doi:10.1110/ps.05184080.
- Trevisan, C. M., de Oliveira, R., Christofolini, D. M., Barbosa, C. P., & Bianco, B. (2019).** Effects of a polymorphism in the promoter region of the follicle-stimulating hormone subunit beta (FSHB) gene on female reproductive outcomes. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 23(1), 39-44.
- Trevisan, C. M., Peluso, C., Cordts, E. B., de Oliveira, R., Christofolini, D. M., Barbosa, C. P., & Bianco, B. (2014).** Ala307Thr and Asn680Ser polymorphisms of FSHR gene in human reproduction outcomes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 34(5), 1527-1535.
- Valkenburg, O., Steegers-Theunissen, R. P., Smedts, H. P., Dallinga-Thie, G. M., Fauser, B. C., Westerveld, E. H., & Laven, J. S. (2008).** A

- more atherogenic serum lipoprotein profile is present in women with polycystic ovary syndrome: a case-control study. *The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(2), 470-476.
- Vance, A., & Zouves, C. (2005).** The importance of family history risk assessment in the infertility setting. *Fertility and Sterility*, 84, S125.
- Vilarino, F. L., Christofolini, D. M., Rodrigues, D., de Souza, A. M. B., Christofolini, J., Bianco, B., & Barbosa, C. P. (2011).** Body mass index and fertility: is there a correlation with human reproduction outcomes?. *Gynecological Endocrinology*, 27(4), 232-236.
- Visual Bioinformatics Tools (2022).** <http://www.danabaser.com>.
- Ulloa-Aguirre, A., Reiter, E., & Crepieux, P. (2018).** FSH receptor signaling: complexity of interactions and signal diversity. *Endocrinology*, 159(8), 3020-3035.
- Walker ,M.H., Tobler, K.J.(2022)** Female Infertility.. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishin; - from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556033/>
- Wang, H. Q., Zhang, W. D., Yuan, B., & Zhang, J. B. (2021).** Advances in the regulation of mammalian follicle-stimulating hormone secretion. *Animals*, 11(4), 1134.
- Wickenheisser, J. K., Nelson-DeGrave, V. L., Quinn, P. G., & McAllister, J. M. (2004).** Increased cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase promoter function in theca cells isolated from patients with polycystic ovary syndrome involves nuclear factor-1. *Molecular endocrinology*, 18(3), 588-605.
- Wickenheisser, J. K., Nelson-DeGrave, V. L., & McAllister, J. M. (2006).** Human ovarian theca cells in culture. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 17(2), 65-71.

- Wiweko, B. (2011).** Relation between CYP17 polymorphism and hyperandrogenemia in polycystic ovarian syndrome. *Indonesian Journal of Obstetrics and Gynecology*.
- Wong, K. C. (2016).** Computational Biology and Bioinformatics: Gene Regulation. CRC Press (Taylor & Francis Group). ISBN 9781498724975.
- Wood, J. R., Ho, C. K., Nelson-Degrave, V. L., McAllister, J. M., & Strauss III, J. F. (2004).** The molecular signature of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells defined by gene expression profiling. *Journal of reproductive immunology*, 63(1), 51-60.
- Wu, Q., Zhang, J., Zhu, P., Jiang, W., Liu, S., Ni, M., ... & Xia, X. (2017).** The susceptibility of FSHB-211G> T and FSHR G-29A, 919A> G, 2039A> G polymorphisms to men infertility: an association study and meta-analysis. *BMC medical genetics*, 18(1), 1-15.
- Xu, X., Hu, K., Shi, H., Yu, Y., Xu, J., & Sun, Y. (2021).** The single-nucleotide polymorphism rs743572 of CYP17A1 shows significant association with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, 43(5), 941-951.
- Yakovchuk, P.; Protozanova, E. and Frank-Kamenetskii, M.D. (2006).** Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Res.*, 34 (2): 564–74. doi:10.1093/nar/gkj454. PMC 1360284 Freely accessible. PMID 16449200.
- Yildiz Telatar, G., Gürlek, B., & Telatar, B. C. (2021).** Periodontal and caries status in unexplained female infertility: A case–control study. *Journal of Periodontology*, 92(3), 446-454.
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., De Mouzon, J., Sokol, R., ... & Van Der Poel, S. (2017).** The

- 
- international glossary on infertility and fertility care, 2017. *Human reproduction*, 32(9), 1786-1801.
- Zhao, F., & Schuchardt, A. (2019).** Exploring students' descriptions of mutation from a cognitive perspective suggests how to modify instructional approaches. *CBE—Life Sciences Education*, 18(3), ar45.
- Zheng, H., & Wu, H. (2010).** Gene-centric association analysis for the correlation between the guanine-cytosine content levels and temperature range conditions of prokaryotic species. *BMC bioinformatics*, 11(11), 1-10.
- Zilaitiene, B., Dirzauskas, M., Verkauskiene, R., Ostrauskas, R., Gromoll, J., & Nieschlag, E. (2018).** The impact of FSH receptor polymorphism on time-to-pregnancy: a cross-sectional single-centre study. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 18(1), 1-8.

# Appendices

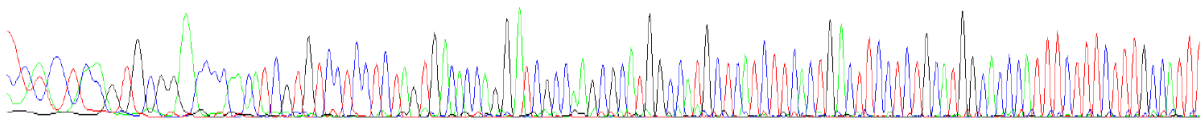
# الملاحق

## ملحق (1) تسلسل جين FSHR

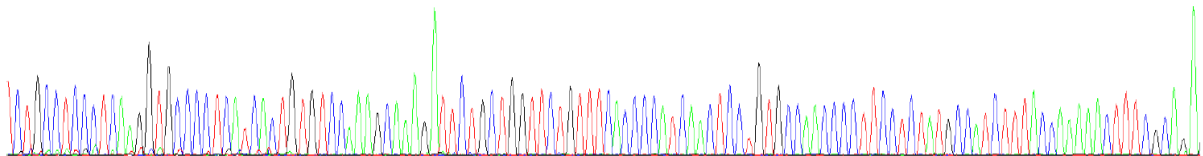
File: r2\_FSHR.ab1 Run Ended: 2022/4/7 2:8:4 Signal G:1597 A:2119 C:6878 T:4872  
 Sample: r2\_FSHR Lane: 1 Base spacing: 14.016861 491 bases in 5905 scans Page 1 of 1



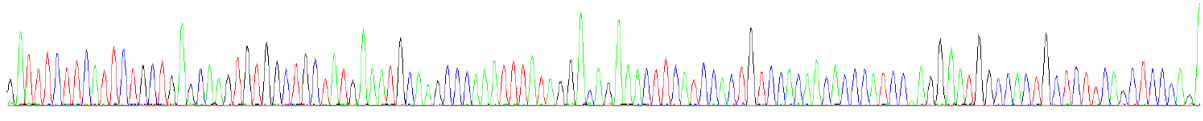
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120  
 CTC A C T CC G T G C G G A CCCCAACAT C GT GT CCT CCT C TAG T G ACACCA G G ATC GCCAAGC GCAT GGCCAT GCT CAT CTT CACT GACTT CCT CTGCAT GGCACCCATTTCTTCTTTGCCATT



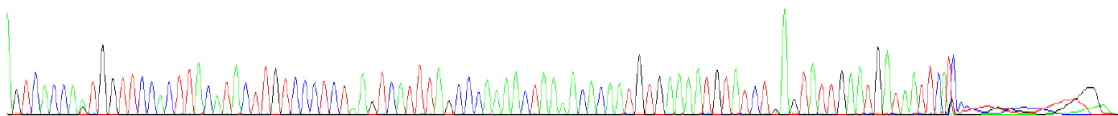
130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240  
 TCTGCCTCCCTCAAAGGTGCCCTCATCACTGTGTCCAAAGCAAGATTCTGCTGGTTCTGTTTCAACCCATCAACTCCTGTGCCAACCCCTTCCCTCTATGCCATCTTTACCAAAAACCTTTGCGAGA



250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370  
 GATTTCTTCACTCTGCTGAGCAAGTGTGGCTGCTATGAAATGCAAGCCCAAAATTTATAGGACAGAACTTCATCCACTGTCCACAAACCCATCCAAGGAATGGCCACTGCTCTTCAGCTCCCAAGA



380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490  
 GTCACCAATGGTTCACACTTACATACTTGTCCCTCTAAGTCAATTTAGCCCAAACTAAAACACAATGTGAAATGTATCTGAGTATTGAATGATAATTCACCTTTGCGCCTTGGGAGA



ملحق (2) تسلسل جين *FSH $\beta$*



File: R21\_RF.ab1 Run Ended: 2022/3/4 14:15:27 Signal G:1448 A:3269 C:3034 T:4908  
Sample: R21\_RF Lane: 26 Base spacing: 15.074051 1028 bases in 13811 scans Page 1 of 2

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120  
C CCGT GA G AAG A GGCAT C TTC A A G C T T T G A T A T G C T C T T G G A G C A T T T A T A A C C A T A T T T T T A A T G C A T C T C T G A A C A G A G T C A A A G C A A T A C T T G G A A A G G A C T C T G A A T T C T G A

130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240  
T T T A A A G A T A C A A A A G A A A A A T C T G G A G T C A C A A T T A A T T T G A G A A G G T A A A G G A G T G G G T G T G C T A C T G T A T C A A A T T T A A T T T T T A C A A A A T C A T C A T C T C T A G T A A C A T T A T T T T T T C T A A T

250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370  
C T A C T G C G T T T A G A C T A C T T T A G T A A A G C T T G A T C T C C C T G T C T A T C T A A A C A C T G A T T C A C T T A C A G C A A G C T T C A G G C T A G G C A A T T G G T C A A A A A A A A G G G G A A A T T G T G T A G G T T A G G G T

380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490  
G A G A T G G A A T A G A A T T T C C A A T T A G G T G G A C G A T A T A T A G G C T T T G T C T A T G C T C G C A G C T A G G A G G T C G T A A T A G T A A A A T A G G A A A C C A G C T C G T T C G G T A C T T C A G A C A G T

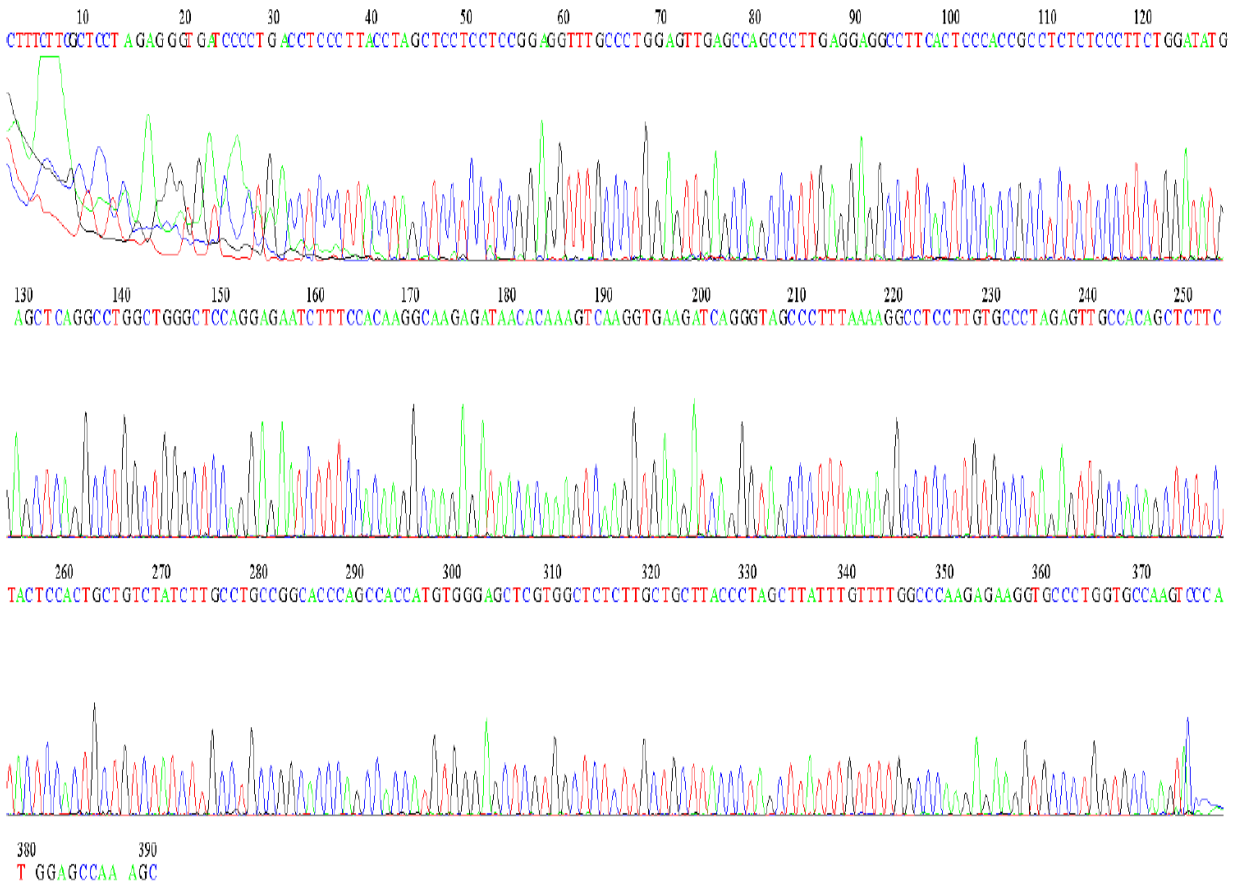
500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610  
A C G A A A C G A C G G A T A C A C A C G G A G C T A G A C A T G G A C G A G T G T A A T G G A A A C T C T G G T C A C C G T C T T C T C G A T T C G A C A A G C G A G G C T A A A A T T T G C T T C A T C A C A T T A G G

11.69 x 8.26 m

ملحق (3) تسلسل جين CYP17



File: c1\_Cyp17.ab1 Run Ended: 2022/4/7 2:8:4 Signal G:2337 A:2944 C:7253 T:4210  
Sample: c1\_Cyp17 Lane: 27 Base spacing: 13.409253 391 bases in 4680 scans Page 1 of 1





## Summary

This study was conducted in the Laboratory of Molecular Genetics and Genetic Engineering, Department of Biology, College of Science, University of Misan for the period from 10/20/2021 to 25/3/2022. The study aimed to determine the genetic variation of infertile women in Maysan Governorate. Blood samples were collected from 90 women (60 infertile and 30 healthy). Some clinical signs were measured for the samples, as body mass index (BMI), age, hormonal disorder, abortion and family history were measured. The polymerase chain reaction (PCR) for *FSHR*, *FSH $\beta$*  and *CYP17* genes was carried out, and the samples were sent to Macrogen, Korea, for DNA sequencing analysis. Some bioinformatics programs used for the purpose of Alignment the sequences of infertile women and the control group and aligned them with the standard sequences published in the National Center for Biotechnology Information NCBI using the program (BioEdit) and the detection of genetic polymorphism and nucleotide diversity using the program (Geneious 2020.0.4) as well as the detection of changes at the level of amino acids and three-dimensional protein drawing (Three dimensional structural) using the program (Phyre2 V.2.0). The results were summarized as follows:

1- It was found that there were two mutations, the translocation mutation and the deletion mutation, in the studied region in the tenth exon of the *FSHR* gene. This region was rich in its content of the nitrogenous bases, cytosine C and thymine T. *FSHR* gene sequences in the comparison group and infertile women, through sequencing technology. It was also found that there were three genotypes (AA, AG, GG) at the studied site 2039 A>G of the follicle growth stimulating hormone receptor (*FSHR*) gene, registered in NCBI with the number (Accession Number: KR711781. (25.0%, 62.5%, and 12.5%), respectively, for sterile

women, and the frequency of the allele for the A allele reached (56.3) and (62.5) in the infertile and comparator women, while the frequency of the G allele was less, as it reached (37.5) in the comparison samples and (43.7) in infertile women.

2- A change was detected in the 3D protein structure of the *FSHR* gene, which resulted from a change in the amino acids obtained from the studied infertility samples.

3- The results showed that there was a single mutation in the studied region of the *FSH $\beta$*  gene, which was rich in its content of the nitrogenous bases adenine A and guanine G, and the replacement site was in the catalyst region, as the nitrogenous bases were replaced at site -211, where the replacement of the nitrogenous base guanine G by the nitrogenous base thymine T occurred. It turns out The presence of three genotypes (GG, GT, and TT) in the studied site G>T -211 of the *FSH $\beta$*  gene, registered in NCBI with the number (Accession Number: AH003599), the differences were non-statistically significant, and the distribution percentage of these structures was (87.5% and 6.25%) % and 6.25%, respectively, for infertile women, as for the frequency of the G allele in the samples of infertile women and the comparison group, it was (0.906) and (0.875), respectively in infertile women.

4- It was found that the total number of mutations was (1) in the *CYP17* gene, which was rich in its content of the nitrogenous bases cytosine C, and the nitrogenous bases were replaced at the -34 position of the promoter region, as the nitrogenous base thymine T was replaced by the nitrogenous base cytosine C, of both types as It was found that there were three genotypes (TT, TC, and CC) in the studied site T>C -34 of the *CYP17* gene, registered in NCBI with the number (Accession Number: EU322845), and there were no significant differences for these combinations. .5%), respectively for infertile women, the frequency of the

## *Summary*

---

T allele in infertile and control samples was (68.7) and (1.0), respectively. As for the recurrence of the C allele, its percentage was (31.3) in infertile women, and there was no recurrence in the comparison samples obtained in this study.

5- There was a relationship between the genotypes of the studied genes, body mass index and age, so there was a significant difference in relation to the FSHR gene for infertile women. The results of the genotypes of the *FSHβ* gene with body mass index showed a significant difference, and no significant differences were observed for the gene itself with age. As for the results of the genotypes of the *CYP17* gene with body mass index and age, there were no significant differences.

Republic of Iraq  
Ministry of Higher Education and Scientific Research  
Misan University - College of Science  
Department of Biology



**A study of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the  
*FSHR*, *FSH $\beta$*  and *CYP17* genes and their relationship with  
infertile Women in Maysan Governorate**

A Thesis

Submitted to the Council of the College of Science University of  
Misan as Partial Fulfillment of the Requirement for Master Degree  
in Biology

By

**Raghad Jabbar Abdel-Saheb**  
B.Sc. Biology (2008)

Supervisor

**Assist. Prof. Dr. Salah Hassan Faraj**

2023 A.D

1444 A.H