



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

## تقييم التغيرات الفسلجية وتعدد الأشكال الوراثية لبعض جينات السايتوكروم P450 لمريضات تكيس المبايض في محافظة ديالى

رسالة مقدمة إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة

من الطالبة

وفاء حسن احمد

بكالوريوس علوم حياة/ كلية التربية للبنات / جامعة بغداد (1995)

بإشراف

أ.د. عمار أحمد سلطان

Ministry of Higher Education  
and Scientific Research  
Diyala University  
College of Education for Pure Sciences  
Department of biology



# **Evaluation of physiological variations and genetic polymorphisms of some cytochrome P450 genes in polycystic ovary syndrome patients in Diyala Governorate.**

A thesis submitted to the Council of the College of Education for Pure Sciences/University of Diyala It is part of the requirements for obtaining a master's degree in life sciences

By

Wafaa Hassan Ahmed

Bachelor of Life Sciences/Girls College of Education/University of Baghdad (1995)

Supervised by

Prof . Ammar Ahmed Sultan (Ph.D.)

1445 AH

2024 AD

## 1-1 المقدمة Introduction

متلازمة تكيس المبايض (PCOS) Polycystic Ovary Syndrome هي اضطراب في الغدد الصماء والتمثيل الغذائي الأكثر شيوعاً في سن الانجاب عند النساء, إذ يوجد حالياً أربعة أنماط ظاهرية معترف بها لمتلازمة PCOS والتي لكل منها آثاره الصحية والاستقلابية على المدى البعيد وتشمل: فرط الاندروجينية Hyperandrogenism وقلة الإباضة Ovulation Deficiency وشكل المبيض المتعدد الكيسات Polycystic Ovary Morphology وايضاً حصول العقم وفشل الحمل Infertility and Pregnancy Failure (Azziz, 2018) ، ومن اضطرابات الدورة الشهرية عند النساء هو حدوث طمث غير منتظم Oligomenorrhea او زوال الطمث Amenorrhea او حصول اضطراب في عملية الإباضة Ovulation او العقم Infertility (شمس الدين، 2010).

ان النساء المصابات بمتلازمة تكيس المبايض PCOS معرضات بشكل متزايد إلى مقاومة الأنسولين، مرض السكري من النوع الثاني، ضعف الخصوبة، متلازمة التمثيل الغذائي، مضاعفات الولادة، الاضطرابات المزاجية والنفسية (Azziz, 2018).

ومن التأثيرات السلبية على المدى البعيد لمريضات PCOS ضعف تحمل الجلوكوز وايضاً وامراض القلب والاعوية الدموية، متلازمة الايض الغذائي، الضغط النفسي، نقص فيتامين D (Emily وآخرون، 2018). يعتبر مرض تكيس المبايض مرض التهاب مزمن منخفض الدرجة، ويكون لدى نساء متلازمة تكيس المبايض مستويات مرتفعة بشكل دائم من علامات الالتهاب IL-18، IL-6، IL-8 ، TNF- $\alpha$ ، CRP (Dabravolski وآخرون، 2022).

تمثل PCOS اضطراب وراثي متعدد الجينات ومتعدد العوامل وايضاً اضطراب معقد جداً (Azziz, 2018). حيث وجد هناك عدد من الجينات المسببة للمتلازمة والتي تشمل جينات

السايتركروم *Cyp17A1*، *Cyp19* وايضاً جينات اخرى منها *TPA*، *ACE*، *PGR* (صكبان، 2014) كذلك جين *CYP11A1*، *Cyp19A1* (Heiderzadch piehrood, 2022).

بحثت عدد من الدراسات الجينية لمتلازمة تكيس المبايض في العلاقة بين الجوانب السريرية المهمة لمتلازمة PCOS والمتغيرات التي تم تحديدها بواسطة دراسة الترابط الجينومي Genome-wide association Study في السنوات القليلة الماضية (Liu وآخرون، 2016؛ Tian وآخرون، 2020). وان الهدف من دراسة الترابط الجينومي الكامل لمريضات متلازمة تكيس المبايض لكي تقدم نظرة حاسمة للآلية التي من خلالها ان تؤثر فيها تعدد الاشكال (SNPs) Single Nucleotide Polymorphism على مسببات الحالة الخاصة بمتلازمة تكيس المبايض وبالتالي التمكن من تحسين العلاج إذ تبين بعد هذه الدراسات عدة جينات تؤثر في قابلية الإصابة PCOS منها جين *DENND1A1*، *NSR*، *LHCGR*، *AMHR2*، *THADA*، *TOX3*، إذ تشارك هذه الجينات المذكورة سابقاً في مسارات بما فيها مقاومة الانسولين، تنظيم الاندروجين وعمل الغدد التناسلية، والمسارات المرتبطة باضطراب التمثيل الغذائي وعلاقتها بأمراض PCOS (Tain وآخرون، 2020، Hiam وآخرون، 2019)، يعتبر جين مستقبل فيتامين D *VDR* جيناً مرشحاً مهماً لمتلازمة تكيس المبايض (Morteza وآخرون، 2013). وهو هرمون نووي وعامل نسخ مرتبط بالحمض النووي ويشكل ثنائي مغاير مع مستقبل ريتينويد *RXR* X، ويتم توزيعه في جميع أنحاء الأنسجة عندما يرتبط فيتامين D بهذا المركب فإنه يقوي التفاعل بين *VDR* و *RXR* فيما يتسبب في نسخ العديد من الجينات التي ينظمها فيتامين D (Abdul-Sahib وآخرون، 2017، Haussler وآخرون، 2011). تلعب الوراثة دوراً كبيراً في أحداث المتلازمة، إذ وجد ان المرأة التي في عائلتها فرداً واحداً أو أكثر مصاباً بـ PCOS كالأب أو الاخت تكون أكثر عرضة لخطر الإصابة بالمتلازمة دون غيرها (Louis، 2007)، اثبتت الدراسات وجود 100 جين مرشح على الأقل تسهم في حدوث المتلازمة منها

الجينات المسؤولة عن تصنيع الهرمونات الستيرويدية كجينات *CYP19, CYP11A, CYP1, CYP21* والجينات التي تساهم في الالتهابات المزمنة منها جينات *TPA, PT-1, TNF-α* والانزيمات التي تشارك في مقاومة الانسولين IR منها جينات *FSHR, INSR, IL-6* (prapas وآخرون, 2009).

## 1-2 الهدف من الدراسة Aim of the study:-

تهدف الدراسة الحالية إلى تأثير بعض التغيرات الفسلجية والوراثية على الإصابة بمتلازمة تكيس المبايض من خلال الخطوات التالية:-

- 1) التحري عن الطفرات الوراثية في جيني *CYP17A1* و *CYP2C8* من خلال استخدام تقانة تعدد الاشكال الوراثية للنيوكليوتيدة المفردة SNPs
- 2) التحري عن النسب الخاصة بكل قاعدة تضخيم rs المدروسة وعلاقتها بمرض PCOS.
- 3) علاقة المظاهر الفسيولوجية المناعية المدروسة مع مرض PCOS .
- 4) ربط المعلومات المستحصلة من الدراسات الوراثية والدراسات الاخرى للوصول الى نتيجة تخص الدراسة الحالية .

## Summery

Polycystic ovary syndrome is an endocrine, metabolic, and polygenic genetic disorder that leads to infertility in about 10% of women of reproductive age. The aim of the current study was to evaluate the role of several physiologic variations in women with polycystic ovarian syndrome, as shown by blood pressure, sex hormones, vitamin D, insulin, lipid profile, blood profile, and genetic polymorphisms of the *CYP2C8* and *CYP17A1* genes.

In the current study, 33 samples from healthy women were used for the control group; the 54 samples were obtained from women patients with polycystic ovarian syndrome in the age range of 20 to 40 who returned to Al-Batoul Teaching Hospital and Al-Shams Laboratories in the city of Baaqubah, the center of Diyala Governorate. The samples were collected beginning in October 2022 and ending in May 2023. For the group of patients and healthy women's , the physiological and biochemical study involved measuring the body mass index, waist circumference ratio, systolic and diastolic blood pressure, sex hormones, insulin, and vitamin D3 levels, fasting blood sugar levels, and blood and lipid profiles.

The statistical analysis showed that patients with polycystic ovarian syndrome had significantly higher body mass index ( $P \leq 0.001$ ), waist circumferences and increasing blood pressures ( $P \leq 0.05$ ) than healthy women. The current study's findings indicate that the levels of vitamin D3, testosterone, and LH in the two study groups varied significantly ( $P < 0.05$ ). It was discovered that, in comparison to healthy women, the patients had higher amounts of testosterone and LH. Conversely, it was discovered that patients' levels of vitamin D3 were lower than those of healthy women. Between the two research groups, there were no statistically significant variations in the levels of FSH, TSH, prolactin, and insulin.

The study's findings also revealed that female patients had significantly higher levels of VLDL, triglycerides, and cholesterol than did healthy female patients ( $P < 0.05$ ). However, the levels of FBS, HDL, and LDL did not differ statistically significantly ( $P > 0.05$ ) between the two research groups. Regarding blood variables, the findings indicate that there are no statistically significant differences ( $P > 0.05$ ) between the two research groups under investigation.

The current study's findings indicate that there are no statistically significant differences ( $P > 0.05$ ) between the patients' body mass index and the levels of sex hormones and insulin. Conversely, it was shown that there was a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) in the amount of vitamin D3 between obese and non-obese patients.

There were no statistically significant variations between the age groups of patients with polycystic ovarian syndrome and the levels of sex hormones, vitamin D3, and insulin.

The results indicated that, in addition to the presence of other positive and negative correlations between the current variables that are not significant, there is a significant positive correlation between testosterone and FSH ( $P = 0.026$ ,  $R = 0.304^*$ ), according to the Pearson correlation coefficient, which is used to measure correlations between quantitative variables.

The results indicated that LH and testosterone recorded the highest sensitivity (72% and 74%) and specificity (55% and 58%) at cut-off points (4.37 and 0.17), with a difference statistically significant ( $P < 0.05$ ) in identifying patients with polycystic ovary syndrome. The receiver curve is used to determine the sensitivity and specificity of variables in diagnosing patients with polycystic ovary syndrome.

The molecular aspect of our current study included investigating the genetic polymorphisms of some cytochrome P450 genes, these genes CYP2C8 and CYP17A1, and evaluating their relationship with the risk of developing polycystic ovary syndrome. The results of DNA sequencing of the non-coding region (3-UTR) of the CYP2C8 gene, which consists of 405 base pairs, found the variant 1058932rs and the occurrence of a point mutation of the transformation type, as the genotype GA and the two alleles A and G in this variant are a risk factor for developing polycystic ovary syndrome with significant differences according to the odds coefficient that reached 1.50, 1.00, and 1.00, respectively, in the group of patients compared to the group of healthy women. As for the exon region of the CYP2C8 gene, which consists of 1051 base pairs, two variants were identified that are related to the development of polycystic ovary syndrome, as a point mutation of the transition type occurred Translocation at the site of the two variants rs10509681 and rs1934951, as the genotype TT and the T allele for the variant rs10509681 are considered a risk factor for the development of polycystic ovary syndrome, and the OR value was recorded, which reached 3.29 and 3.13, respectively, with significant differences in the group of patients compared to the group of healthy women. As for the variant rs1934951, which carries the genotype CC and CT and the C allele, which is considered a risk factor that caused the development of polycystic ovary syndrome, with significant differences and according to the OR value, which reached 1.21, 1.00, and 1.35, respectively, in the group of patients compared to the group of healthy women. Our study and the results are the first of its kind in the world, according to the researcher's knowledge, and showed the exon region of the CYP17A1 gene, which consists of 454 base pairs, which Nucleotide sequencing was performed to detect variants related to the risk of developing polycystic ovary syndrome. Two variants, 6162rs and rs6163, were found, along with point mutations of the Transversion type for the first variant and point mutations of the Translocation



type for the second variant in polycystic ovary syndrome patients when compared with healthy controls. It was found that the location of the 6162rs variant, which carries the genotype GA and alleles G and A, is related to the development of polycystic ovary syndrome, according to the OR coefficient, which reached 1.43, 1.00, and 1.00, respectively, as a result of a point mutation occurring in the 6163rs variant of the Transversion type. It was found that the location of the 6163rs variant, which carries the genotype CA and alleles C and A, is related to the development of polycystic ovary syndrome, according to the OR coefficient, which reached 1.97 and 1.00. rs743572. This variant revealed that the AG genotype and allele A were more frequent in the patient group compared to the healthy group. Therefore, this genotype is considered a risk factor in increasing the susceptibility to polycystic ovary syndrome according to the OR coefficient, which reached 2.14 and 1.18, respectively, as a result of a point mutation of the Transition type.