



جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

## دراسة جزئية وفلسجية لمتلازمة تكيس المبيض المتعدد

### عند النساء في محافظة كربلاء

أطروحة مقدمة إلى

إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة

في علوم الحياة (علم الحيوان)

من قبل

لقاء حسون صكبان الجبوري

بكالوريوس علوم حياة / جامعة بغداد / 1996

ماجستير علم الحيوان / جامعة كربلاء / 2006

بإشراف

الأستاذ الدكتور  
ستار جاسم حنروش

الأستاذ الدكتور  
علي حمود السعدي

# بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

قَبْرٌ وَيَبَشِّرِ الصَّابِرِينَ ﴿١٥٥﴾ الَّذِينَ إِذَا أَصَابَتْهُمُ مُصِيبَةٌ

قَالُوا إِنَّا لِلَّهِ وَإِنَّا إِلَيْهِ رَاجِعُونَ ﴿١٥٦﴾ أُولَئِكَ عَلَيْهِمْ صَلَوَاتٌ

مِّن رَّبِّهِمْ وَرَحْمَةٌ ۖ وَأُولَئِكَ هُمُ الْمُهْتَدُونَ ﴿١٥٧﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة البقرة

## ﴿إقرار المشرفين﴾

نشهد إن إعداد هذه الأطروحة قد جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء، وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة (علم الحيوان).

<u>المشرف</u>	<u>المشرف</u>
<b>التوقيع</b>	<b>التوقيع</b>
<b>الاسم: د. ستار جاسم حتروش</b>	<b>المشرف: د. علي حمود السعدي</b>
<b>المرتبة العلمية: أستاذ</b>	<b>المرتبة العلمية: أستاذ</b>
<b>مكان العمل: كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء</b>	<b>مكان العمل: كلية العلوم/جامعة بابل</b>
<b>التاريخ: / / 2014</b>	<b>التاريخ: / / 2014</b>

**توصية رئيس قسم علوم الحياة:**

بناءً على التوصيات المقدمة من قبل الأستاذين المشرفين نرشح هذه الأطروحة للمناقشة

**التوقيع:**

**الاسم: م. د. نصير مرزة حمزة.**

**التاريخ: / / 2014**

## ﴿إقرار المقوم اللغوي﴾

أشهد أن هذه الأطروحة الموسومة (دراسة وراثية خلوية وجزيئية لمتلازمة تكيس المبيض المتعدد في محافظة كربلاء) قد تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وصحح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

**التوقيع:**

**الاسم: د. محمد حسين المهداوي**

**المرتبة العلمية: أستاذ مساعد**

**العنوان: كلية التربية للعلوم الإنسانية / جامعة كربلاء**

**التاريخ: 2014 /2/**

## ﴿إقرار لجنة المناقشة﴾

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعين أدناه نشهد بأننا قد أطلعنا على الأطروحة الموسومة (دراسة جزيئية وفلسجية لمتلازمة تكيس المبايض المتعدد عند النساء في محافظة كربلاء) المقدمة من قبل الطالبة (لقاء حسون صكبان) كجزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه فلسفة (علم الحيوان / وراثه خلوية) ، وبعد إجراء المناقشة العلمية وجد إنها مستوفية لمتطلبات الشهادة وعليه نوصي بقبول الأطروحة بتقدير (امتياز).

### رئيس لجنة المناقشة

التوقيع:

الاسم: د. خالد حمدان غنوان

المرتبة العلمية: أستاذ

مكان العمل: جامعة بغداد / كلية طب الأسنان

التاريخ: / / 2014

### عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. حسن فاضل ناجي

المرتبة العلمية: أستاذ

مكان العمل: جامعة بابل / كلية العلوم

التاريخ: / / 2014

### عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. هيفاء هادي حساني

المرتبة العلمية: أستاذ

مكان العمل: جامعة النهرين/ كلية التقنيات الحيوية التطبيقية

التاريخ: / / 2014

### عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. حسين خضير عبيس

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

مكان العمل: جامعة القادسية / كلية التربية

التاريخ: / / 2014

### عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. وفاء فوزي إبراهيم

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

مكان العمل: جامعة كربلاء / كلية الصيدلة

التاريخ: / / 2014

### المشرف

التوقيع:

الاسم: د. علي حمود السعدي

المرتبة العلمية: أستاذ

مكان العمل: جامعة بابل/كلية العلوم

التاريخ: / / 2014

### المشرف

التوقيع:

الاسم: د. ستار جاسم حنروش

المرتبة العلمية: أستاذ

مكان العمل: جامعة كربلاء/كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ: / / 2014

### مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

التوقيع:

الاسم: د. نجم عبد الحسين نجم

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

التاريخ: / / 2014

## الإهداء

إلى من جرع الكأس فارغاً ليسقيني قطرة حب  
إلى من كتّت أنامله ليقدّم لي لحظة سعادة  
إلى من حصد الأشواك عن دربي ليمهد لي طريق العلم  
إلى القلب الكبير (والدي العزيز)

إلى من أرضعتني الحب والحنان  
إلى رمز الحب وبلسم الشفاء  
إلى القلب الناصع بالبياض (والدتي الحبيبة)

إلى القلوب الطاهرة الرقيقة والنفوس البريئة إلى  
رياحين حياتي (إخوتي)

لقاء

## شكر وامتنان

الحمد لله حمدا يوافي نعمته وفضله، والصلاة والسلام على صاحب الشفاعة محمد وعلى آله وصحبة أجمعين. أما بعد

فلا يسعني إلا أن أتقدم بجزيل الشكر والامتنان إلى المشرفين الفاضلين الأستاذ الدكتور علي حمود السعدي والأستاذ الدكتور ستار جاسم حتروش لاقتراحهما موضوع البحث وجهدهم المتواصل في المتابعة والتشجيع والإرشاد العلمي.

وأنتقدم بشكري الجزيل إلى الأستاذ المساعد الدكتور قيس حسين السماك / المساعد الإداري بجامعة كربلاء وإلى الأستاذ المساعد الدكتور نجم عبد الحسين نجم عميد كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء وإلى رئاسة قسم علوم الحياة .. وأتقدم بخالص شكري إلى كادر مدينة الصدر التعليمية في النجف الأشرف لتعاونهم الكبير معي في جمع العينات وخص بالذكر الدكتورة بشرى جعفر والدكتورة روبدة باقر وتوت والسيدة فليحة باقر محمد رضا والآنسة سناء حسن جاسم لما أبدوه جميعاً من مساعدة وعون كبيرين خلال مدة البحث كما أتقدم بجزيل الشكر إلى الدكتورة رغد طالب نعمان والآنسة فاطمة صاحب عبد والأخ الأستاذ باسم كاظم القيسي والدكتورة إيمان محمد جبر .

كما أتقدم بوافر شكري وتقديري إلى الدكتور حسن موسى حمزه ابو المعالي / كلية الصيدلة جامعة كربلاء والأخت العزيزة الدكتورة هند حسين عبيد/ كلية العلوم/ جامعة بغداد والدكتور كاظم محمد سبع /جامعة المثنى / كلية العلوم لما قدموا لي من مساعدة ، وأتقدم بالشكر إلى الدكتور ثامر كريم خضير- كلية الزراعة -جامعة كربلاء لمساعدته في إجراء الاختبارات الإحصائية .

وأخيرا شكري وتقديري إلى كل من أعانني بكلمة طيبة ودعاء صادق وليقبل شكري واعتذاري كل من فاتني ذكر اسمه وليجزيه الله عني حق قدره .

الباحثة

## قائمة المحتويات

رقم الصفحة	العنوان	الرقم
<b>الفصل الأول المقدمة</b>		
2-1	المقدمة	
<b>الفصل الثاني - إستعراض المراجع</b>		
3	المبيض	1-2
4	دورة المبيض ودورة الهرمونات خلالها	2-2
6	متلازمة تكيس المبيض المتعدد	3-2
7	تعريف متلازمة تكيس المبيض المتعدد	4-2
7	أعراض تكيس المبيض المتعدد	5-2
7	الأكياس المبيضية	1-5-2
9	انعدام الخصوبة	2-5-2
10	الفسولوجيا المرضية لمتلازمة تكيس المبيض المتعدد	6-2
11	العيوب العصبية الغذائية	1-6-2
12	اختلال تكوين الستيرويدات المبيضية	2-6-2
13	أختلال انتاج الاندروجين الكظري	3-6-2
14	مقاومة الأنسولين مع فرط الأنسولين التعويضي	4-6-2
14	فعالية الجهاز العصبي الودي المتزايدة	5-6-2
15	العيوب الوراثية	6-6-2
15	الاضطرابات الايضية في النساء المصابات بمتلازمة تكيس المبيض المتعدد	7-2
16	مقاومة الأنسولين	1-7-2
16	السمنة	2-7-2
17	الاضطرابات الهرمونية المسببة لمتلازمة تكيس المبيض المتعدد	8-2
19	الإجهاد ألتأكسدي و متلازمة تكيس المبيض المتعدد	9-2
20	دور العوامل المضادة للأكسدة في متلازمة تكيس المبيض المتعدد	10-2
21	علاج متلازمة تكيس المبيض المتعدد	11-2
22	الدراسة الجزيئية لمتلازمة تكيس المبيض المتعدد	12-2
23	جين (TPA)	1-12-2
24	جين انزيم المحول للانجيوتنسين (ACE gene)	2-12-2



25	جين السايبتوكروم (CYP17 P- 450 C 17α)	3-12-2
26	جين مستقبل البروجستيرون (PGR)	4-12-2
27	جين انزيم الاروماتيز (CYP 19)	5-12-2
29	الدراسة الوراثية لمتلازمة تكيس المبيض المتعدد	13-2
29	معايير الدراسة الوراثية الخلوية	14-2
29	أختبار النوى الصغيرة في الخلايا اللمفاوية للدم المحيطي	1-14-2
31	معامل الانقسام الخيطي	2-14-2
32	الانحرافات الكروموسومية	3-14-2
32	التغيرات التركيبية	1-3-14-2
33	التغيرات العددية	2-3-14-2

الفصل الثالث - المواد وطرائق العمل		
35	الأجهزة والمواد	1-3
35	الأجهزة والمعدات المستخدمة	1-1-3
36	المواد	2-1-3
36	المواد الكيميائية	أ - 2-1-3
37	العُدّة الجاهزة	ب - 2-1-3
38	طرائق العمل	2-3
38	جمع عينات الدم من النساء المصابات بالـ PCOS	1- 2-3
38	استمارة استبيان للمريضات	----
39	تقسيم عينات الدم المدروسة	1-1-2-3
39	الدراسة الهرمونية والوراثية الخلوية والجزئية للنساء المصابات بمتلازمة تكيس المبيض المتعدد	2-2-3
39	الدراسة الهرمونية للنساء المصابات بمتلازمة تكيس المبيض المتعدد	1-2-2-3
39	تقدير هرمونات التناسل	1-1-2-2-3
40	الدراسة الوراثية الخلوية	2-2-2-3
40	تهيئة الأدوات المختبرية	1-2-2-2-3
40	تحضير المحاليل المستعملة في الدراسة	2 -2-2-2-3

40	محلول الساييتوكالازين بي	أ - 2 -2-2-2-3
40	المحلول المشطر (PHA)	ب - 2 -2-2-2-3
41	محلول الكولجسين	ج - 2 -2-2-2-3
41	محلول كلوريد البوتاسيوم واطئ التوتر KCl	د - 2 -2-2-2-3
41	المثبت	هـ - 2 -2-2-2-3
41	محلول دارئ سورنسن	و - 2 -2-2-2-3
41	محلول صبغة كمزا	ز - 2 -2-2-2-3
42	المضادات الحيوية * محلول البنسلين البلوري * محلول الستربتومايسين	ح - 2 -2-2-2-3
42	أوساط الزرع النسيجي (الوسط الزرعي النسيجي الكامل - الوسط الزرعي الحافظ)	ط - 2 -2-2-2-3
43	دراسة المعايير الوراثية الخلوية	3-2-2-2-2-3
43	زرع الدم	1-3-2-2-2-2-3
43	حصاد الخلايا	2-3-2-2-2-2-3
43	حصاد الخلايا لإختبار الأنقسام الخلوي والانحرافات الكروموسومية	أ -2-3-2-2-2-2-3
44	حصاد الخلايا لاختبار الانوية الصغرى	ب -2-3-2-2-2-2-3
45	تحضير الشرائح الزجاجية	3-3-2-2-2-2-3
45	تلوين الشرائح الزجاجية	4-3-2-2-2-2-3
45	فحص الشرائح الزجاجية	5-3-2-2-2-2-3
46	الدراسة الجزيئية	3-2-2-3
46	استخلاص الـ DNA	1-3-2-2-3
47	ترحيل الـ DNA	2-3-2-2-3
49	التوصيف الجزيئي للجينات المدروسة	3-3-2-2-3
49	اختيار البودئ	أ-3-3-2-2-3
50	تخفيف البودئ	ب-3-3-2-2-3
50	تفاعل أنزيم البلمره المتسلسل للجينات المدروسة	4-3-2-2-3

51	البرامج المستخدمة في الدراسة الجزيئية للجينات المدروسة	5-3-2-2-3
53	تحميل ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل والترحيل الكهربائي	6-3-2-2-3
53	التوصيف الجزيئي لمعرفة التعدد المظهري لجين <i>CYP17</i> و <i>CYP19</i>	7-3-2-2-3
54	التحليل الإحصائي	3-3

### الفصل الرابع – النتائج والمناقشة

55	العلامات السريرية في النساء المصابات بمتلازمة تكيس المبيض	1-4
55	دليل كتلة الجسم والعمر	1-1-4
56	الشعرانية	2-1-4
57	التاريخ العائلي ومتلازمة الـ PCOS	3-1-4
58	فترات الحيض عند النساء المصابات بالـ PCOS	4-1-4
59	الإجهاض ومتلازمة الـ PCOS	5-1-4
59	انعدام الخصوبة	6-1-4
60	الدراسة الهرمونية	2-4
6460	هرمونات الغدة النخامية (LH – FSH)	1-2-4
62	هرمون التستوستيرون	2-2-4
63	هرمون البرولاكتين	3-2-4
63	هرمون البروجستيرون	4-2-4
64	هرمون الأيستراديول	5-2-4
65	الدراسة الوراثية الخلوية لمتلازمة تكيس المبيض المتعدد.	3-4
65	معامل الانقسام الخيطي	1-3-4
66	اختبار الانوية الصغيرة	2-3-4
67	الانحرافات الكروموسومية	3-3-4
70	الدراسة البيولوجية الجزيئية	4-4
71	التوصيف الجزيئي للتعدد المظهري لجين <i>PGR</i>	1-4-4
76	التوصيف الجزيئي للتعدد المظهري لجين <i>ACE</i>	2-4-4
82	التوصيف الجزيئي للتعدد المظهري لجين <i>PTA</i>	3-4-4

87	التوصيف الجزيئي للتعدد المظهري لجين <i>CYP17</i>	4-4-4
93	التوصيف الجزيئي للتعدد المظهري لجين <i>CYP19</i>	5-4-4
	العنوان	ت
99	الاستنتاجات	
100	التوصيات	
101	المصادر	

## قائمة الجداول

رقم الصفحة	العنوان	التسلسل
49	تسلسل البرايمرات المستخدمة المجهزة	1-3
50	المواد المستخدمة في تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل	2-3
51	البرنامج المستخدم لدراسة التعدد المظهري لجين مستقبل البروجستيرون PGR	3-3
51	البرنامج المستخدم للتعرف على التعدد المظهري لجين ACE	4-3
52	البرنامج المستخدم للتعرف على التعدد المظهري لجين TPA	5-3
52	البرنامج المستخدم للتعرف على التعدد المظهري لجين CYP17	6-3
53	البرنامج المستخدم للتعرف على التعدد المظهري لجين CYP19	7-3
55	مقارنة قيم كتلة الجسم والعمر في النساء المصابات بال-PCOS والسيطرة.	1-4
57	النسب المئوية لبعض العلامات السرية في النساء المصابات بال-PCOS.	2-4
62	دراسة المعايير الهرمونية في النساء المصابات بال-PCOS مقارنة بنساء السيطرة	3-4
65	معدل معامل الانقسام والنوى الصغرى و الانحرافات الكروموسومية في الخلايا اللمفاوية في الدم المحيطي للنساء المصابات بمتلازمة تكيس المبيض المتعدد (PCOS) ونساء السيطرة	4-4
73	النسب المئوية للتعدد المظهري لجين ( PRG ) في النساء المصابات بال-PCOS ونساء السيطرة .	5-4
74	علاقة التعدد المظهري لجين (PGR) مع هرمونات التكاث وكتلة الجسم والعمر في نساء السيطرة.	6-4
75	علاقة التعدد المظهري لجين (PGR) مع هرمونات التكاث وكتلة الجسم والعمر في النساء المصابات بال-PCOS.	7-4
78	النسب المئوية للتعدد المظهري لجين (ACE) في النساء المصابات بال-PCOS ونساء السيطرة.	8-4
80	علاقة التكرار المظهري لجين (ACE) مع هرمونات التكاث وكتلة الجسم والعمر في نساء السيطرة.	9-4
81	علاقة التكرار المظهري لجين (ACE) مع هرمونات التكاث وكتلة الجسم والعمر في النساء المصابات بال-PCOS.	10-4

84	النسب المئوية للتعدد المظهري لجين (TPA) في النساء المصابات بالـ PCOS و مجموعة نساء بالسيطرة	11-4
85	علاقة التعدد المظهري لجين (TPA) مع هرمونات التكاثر وكتلة الجسم والعمر في نساء السيطرة .	12-4
86	علاقة التعدد المظهري لجين (TPA) مع هرمونات التكاثر قيد الدراسة في النساء المصابات بالـ PCOS .	13-4
89	النسب المئوية للتعدد المظهري لجين (CYP17) في النساء المصابات بالـ PCOS ومجموعة نساء بالسيطرة .	14-4
90	علاقة التعدد المظهري لجين (CYP17) مع هرمونات التكاثر وكتلة الجسم والعمر في نساء السيطرة	15-4
91	علاقة التعدد المظهري لجين (CYP17) مع الهرمونات وكتلة الجسم والعمر في النساء المصابات بالـ PCOS.	16-4
95	النسب المئوية للتعدد المظهري لجين (CYP19) في النساء المصابات بالـ PCOS و مجموعة نساء بالسيطرة .	17-4
96	علاقة التعدد المظهري لجين (CYP19) مع هرمونات التكاثر وكتلة الجسم والعمر في نساء السيطرة .	18-4
97	علاقة التعدد المظهري لجين (CYP19) مع هرمونات التكاثر وكتلة الجسم والعمر في النساء المصابات بالـ PCOS .	19-4

## قائمة الأشكال

رقم الصفحة	العنوان	التسلسل
6	دورة الحيض والإباضة	1-2
7	تكتيس المبايض بالأشعة فوق الصوتية أ: صورة بالموجات فوق الصوتية Ultrasound لمبيض طبيعي ب: صورة بالموجات فوق الصوتية Ultrasound للمبيضين الأيمن والأيسر تظهر تكتيسات المبيضين في النساء المصابات بال(PCOS).	2-2
11	النظريات الشائعة لتفسير الفسيولوجيا المرضية لـ PCOS	3-2
14	آلية تخليق الستيرويدات المبيضية	4-2
19	الإجهاد التأكسدي الناتج من عملية فقدان التوازن ما بين العوامل المؤكسدة ومضادات الأكسدة	5-2
24	دور عامل Tissue plasminogen activator (TPA) في عملية تكوين الخثرة (Wikipedia ) clot or thrombus	6-2
30	آلية تكون النوى الصغيرة A - النوى الصغيرة الناتجة عن فقد الكسور الكروموسومية B - النوى الصغيرة الناتجة عن الكروموسومات ثنائية النواة	7-2
67	الأنوية الصغرى للخلايا اللمفاوية ثنائية النواة ( صبغة Giemsa ، قوة التكبير 100 X	1-4
68	الكروموسومات الطبيعية في خلية لمفاوية لامرأة من مجموعة السيطرة ( صبغة Giemsa ، قوة التكبير 1000 X )	2-5
68	ظاهرة فرط المجموعة الكروموسومية للخلايا اللمفاوية في طور الاستوائي لامرأة من مجموعة ال-PCOS ( صبغة Giemsa ، قوة التكبير 1000 X )	3-4
69	بعض التغيرات الكروموسومية (CA) الظاهرة في عينات نساء ال-PCOS ( صبغة Giemsa ، قوة التكبير 1000 X )	4-4
69	بعض التغيرات الكروموسومية في عينات النساء المصابة بمتلازمة ال-PCOS ( صبغة Giemsa ، قوة التكبير 1000 X )	5-4
70	الترحيل الكهربائي لحزم ال-DNA لعينات النساء المصابات بال-PCOS على هلام الأكاروز المحضر بتركيز 0.8 % ( 70 فولت - تيار 40 ملي أمبير).	6-4

71	الترحيل الكهربائي لنتاج الـ PCR لجين مستقبل البروجستيرون ( <i>PGR</i> ) لتوصيف التعدد المظهري على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% عند فرق جهد 70 فولت/سم 40 وتيار ولمدة ساعتين.	7-4
72	الترحيل الكهربائي لنتاج الـ PCR لجين مستقبل البروجستيرون ( <i>PGR</i> ) الذي يبين انخفاض الشكل الاليلي ( <i>T2T2</i> ) في المجموعتين على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% عند فرق جهد 70 فولت/سم وتيار 40 ولمدة ساعتين.	8-4
77	ترحيل الـ PCR لجين ( <i>ACE</i> ) لتوصيف التعدد المظهري على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% وبفرق جهد 70 فولت/سم وتيار 40 ولمدة ساعتين.	9-4
77	الترحيل الكهربائي لنتاج الـ PCR لجين ( <i>ACE</i> ) - سيادة الشكل الاليلي ( <i>D / I</i> ) في النساء المصابات بالـ PCOS والسيطرة ، على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% وبفرق جهد 70 فولت/سم وتيار 40 ولمدة ساعتين.	10-4
82	الترحيل الكهربائي لنتاج الـ PCR لجين ( <i>TPA</i> ) لتوصيف التعدد المظهري ، على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% وبفرق جهد 70 فولت/سم وتيار 40 ولمدة ساعتين.	11-4
87	نتاج الترحيل الكهربائي لنتاج الـ PCR قبل عملية القطع بالإنزيم القاطع <i>MspA11</i> لجين <i>CYP17</i> على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% وفرق جهد 70 فولت/سم وتيار 40 ولمدة ساعتين.	12-4
88	نتاج الترحيل الكهربائي لنتاج الـ PCR - RFLP لجين <i>CYP17</i> بعد تقطيعه بالإنزيم القاطع <i>MspA11</i> على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% وبفرق جهد 70 فولت/سم وتيار 40 ملي أمبير ولمدة ساعتين.	13-4
93	نتاج الترحيل الكهربائي لنتاج الـ PCR لجين <i>CYP19</i> قبل عملية القطع بالإنزيم القاطع <i>Hsp92II</i> على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% بفرق جهد 70 فولت/سم وتيار 40 ملي أمبير ولمدة ساعتين.	14-4
94	نتاج الترحيل الكهربائي لنتاج الـ PCR - RFLP بعد تقطيعه بالإنزيم القاطع <i>Hsp92II</i> لجين <i>CYP19</i> على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% وبفرق جهد 70 فولت/سم وتيار 40 ولمدة ساعتين.	15-4



## قائمة المختصرات

المختصر	المصطلح
AAM	Age at menarche
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACTH	Adrenocorticotrophic Hormone
Ang II	Angiotension II
AR	Androgen receptor
ASRM	American Society for Reproduction Medicine
BMI	Body Mass Index
CAs	Chromosomal Aberrations
CF	Cystic Fibrosis
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone
CRP	C- Reactive Proteins
CVD	cardiovascular diseases
CYP 19	Cytochrome p-450 c19
CYP17	Cytochrome p-450 c17
Cyto-B	Cytochalasin B
D	Deletion
DHEA	Dehydroepiandrosterone
DHEAS	Dehydroepiandrosterone Sulfate
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DMT2	Diabetes Mellitus Type 2
DNA	Deoxy Ribonucleic Acid
ER	Estrogen Receptor
ESHRE	European Society for Human Reproduction and Embryology
FSH	Follicle –Stimulating Hormone
FSHR	Follicle –Stimulating Hormone Receptor
GFR	Growth Factor Receptor
GnRH	Gonadotropin – Releasing Hormone
GPX	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione
HPO	Hypothalamic –Pituitary Ovarian
HPR	Human Progesterone receptor
HSD17B	17 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase
I	Insertion

IGF-1	Insulin Growth Factor
IGT	Impaired glucose tolerance
IL6	Interleukin 6
ILGF	Insulin –like growth factors
INSR	Insulin Receptor
IR	Insulin resistance
LDL	Low density lipoproteins
LH	Luteinizing Hormone
MD	Metabolic Disorders
MI	Mitotic Index
MN	Micronuclei
NGF	Nerve Growth Factor
NIH	National Institutes Health
NO	Nitric oxide
NO2	Nitrogen dioxide
NOS	Nitrogene Oxide Species
OS	Oxidative stress
P	Progesterone
P.B.S	Phosphate Buffer Saline
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PCOS	Polycystic ovary syndrome
PCR	Polymerase chain reaction
PGR	Progesterone receptor
PHA	Phytohaemagglutnin
PIF	Prolactin Inhibiting Factor
POF	Premature Ovarian Failure
POL	Prolactine
RAS	rennin angiotensin system
ROS	Reactive oxygen species
RPL	Recurrent Pregnancy Loss
RPMI– 1640	Rosswell Park Memorial Insitute – 1640
SA	Spontaneous Abortions
SAS	Statistical Analysis System
SCE	Sister Chromatide Exchange
SF-1	Steroidogenic Factor- 1
SHBG	Sex Hormone Binding Protein
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
SOD	Super oxide Dismutase
SREBP	Sterol Regulatory Binding Protein

T	Testosterone
T3	Tri Iodo Thyronine
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor – $\alpha$
TPA	Tissue –type plasminogen activator

جدول (4-6) علاقة التعدد المظهري لجين (PGR) مع هرمونات التكاثر وكتلة الجسم والعمر في نساء السيطرة .

(Mean ± SD)

Age	BMI	Estradiol	Progesterone	Prolactin	Testosterone	FSH	LH	الطرز المظهرية لجين PGR
28.91±0.67	24.79±0.63	96.34±1.45	15.44±-0.59	8.16 ±0.71	0.38±0.06	4.12±0.57	6.44±0.31	T1T1
29.00± 0.79	24.66±0.50	96.07± 1.56	15.03± 0.67	7.54± 0.84	0.39±0.04	3.33± 0.61	6.31± 0.37	T1T2
26.00± 0.64	25.50±0.61	95.86±1.67	14.82±0.81	9.00±0.64	0.31±0.08	4.94±0.33	6.60±0.41	T2T2
NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	P≤

P≤ : مستوى المعنوية

( Non -Significant ) : NS عدم وجود فروق معنوية

( المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري ) Mean± SD

جدول (7-4) علاقة التعدد المظهري لجين (PGR) مع هرمونات التكاثر وكتلة الجسم والعمر في النساء المصابات بال-PCOS.  
(Mean ± SD)

Age	BMI	Estradiol	Progesterone	Prolactin	Testosterone	FSH	LH	الطرز المظهرية لجين PGR
26.28±0.57	29.78±0.90	56.85±1.76	8.38±0.89	17.68 ±0.99	1.11±0.24	5.51±0.54	16.86±0.55	T1T1
28.28± 0.43	29.80±0.81	55.77± 1.58	7.98± 0.78	17.69± 0.98	1.06±0.31	5.69± 0.48	16.85± 0.48	T1T2
30.20±0.67	27.60±0.77	55.73±1.4	8.01±0.95	17.18±1.09	1.09±0.19	5.72±0.50	16.80±0.57	T2T2
NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	P≤

P≤ : مستوى المعنوية

(Non -Significant) : NS عدم وجود فروق معنوية  
( Mean± SD ) المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري

جدول (9-4) علاقة التعدد المظهري لجين (ACE) مع هرمونات التكاثر وكتلة الجسم والعمر في نساء السيطرة .

(Mean ± SD)

Age	BMI	Estradiol	Progesterone	Prolactin	Testosterone	FSH	LH	الطرز المظهرية لجين ACE
27.29± 0.76	24.76± 0.61	96.26± 1.74	15.65± 0.77	8.27 ± 0.90	0.40± 0.08	4.40± 0.51	6.27± 0.41	DD
29.29± 0.70	24.74± 0.71	96.15± 1.93	15.30± 0.81	8.06± 0.81	0.37± 0.07	7.21± 0.48	6.46± 0.34	DI
27.40± 0.66	25.80± 0.57	96.65± 1.52	16.20± 0.90	8.96± 0.75	0.35± 0.09	4.58± 0.44	6.75± 0.25	II
NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	P≤

P≤ : مستوى المعنوية

( Non –Significant ) : عدم وجود فروق معنوية (

Mean± SD ( المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري )

**جدول (10-4) علاقة التعدد المظهري لجين (ACE) مع هرمونات التكاثُر وكتلة الجسم والعمر في النساء المصابات بال-PCOS.  
(Mean ± SD)**

Age	BMI	Estradiol	Progesterone	Prolactin	Testosterone	FSH	LH	الطرز المظهرية لجين ACE
28.11± 0.41	30.19± 0.90	56.75± 1.33	8.32± 0.81	17.75 ± 1.01	A 1.40± 0.11	B 4.40± 0.55	16.94± 0.51	DD
26.86± 0.49	29.79± 0.82	56.76 ± 1.42	8.23± 0.79	17.06± 0.98	B 1.05± 0.13	A 5.77± 0.47	16.82± 0.49	DI
28.25± 0.52	28.50± 0.77	56.90± 1.38	7.84± 0.85	17.38± 0.96	C 0.76± 0.09	A 5.83± 0.55	16.96± 0.47	II
NS	NS	NS	NS	NS	0.01	0.05	NS	P≤

P≤ : مستوى المعنوية

( Non -Significant ) : عدم وجود فروق معنوية

( Mean± SD ) المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري )

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنوياً.

جدول (12-4) علاقة التعداد المظهري لجين (TPA) مع هرمونات التكاثر وكتلة الجسم والعمر في نساء السيطرة.

(Mean ± SD)

Age	BMI	Estradiol	Progesterone	Prolactin	Testosterone	FSH	LH	الطرز المظهرية لجين TPA
28.54± 0.48	24.97± 0.75	96.23± 1.94	15.51± 1.01	8.17 ± 0.74	0.370± 0.04	4.14± 0.42	6.30± 0.45	DD
27.85± 0.57	24.70± 0.66	96.21± 2.04	15.53± 0.89	8.125± 0.89	0.375± 1.09	4.09± 0.57	6.59± 0.23	DI
27.04± 0.44	24.59± 0.71	96.19± 2.02	15.01± 0.98	8.124± 0.71	0.42± 0.06	3.96± 0.39	6.46± 0.30	II
NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	P≤

P≤: مستوى المعنوية

NS : ( Non -Significant ) عدم وجود فروق معنوية  
( Mean± SD ) المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري



جدول (4-13) علاقة التعدد المظهري لجين (TPA) مع هرمونات التكاثُر وكتلة الجسم والعمر في النساء المصابات بالـ PCOS. (Mean ± SD)

Age	BMI	Estradiol	Progesterone	Prolactin	Testosterone	FSH	LH	الطرز المظهرية لجين TPA
28.00± 0.58	29.56± 0.80	57.03± 1.73	8.33± 0.99	17.62 ± 1.08	1.06± 0.12	5.41± 0.50	16.81± 0.50	DD
26.60± 0.34	29.94± 0.89	56.65± 2.03	7.98± 1.03	17.76± 0.91	1.05± 0.16	5.67± 0.63	16.90± 0.44	DI
25.96± 0.42	29.72± 0.83	56.42± 2.10	8.23± 1.07	17.65± 1.16	1.21± 0.09	5.99± 0.37	16.88± 0.57	II
NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	P≤

P≤ : مستوى المعنوية

(Non -Significant): NS عدم وجود فروق معنوية  
Mean± SD ( المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري )

جدول (15-4) علاقة التعدد المظهري لجين (CYP17) مع هرمونات التكاثر وكتلة الجسم والعمر في نساء السيطرة .

(Mean ± SD)

Age	BMI	Estradiol	Progestrone	Prolactin	Testosterone	FSH	LH	الطرز المظهرية لجين CYP17
28.78±0.57	24.85±0.43	97.10±1.70	15.16±1.10	8.55 ±0.86	0.36±0.06	4.19±0.49	6.50±0.39	TT
28.45± 0.74	24.56±0.49	96.83± 1.67	15.40± 1.05	8.33± 0.95	0.40±0.02	4.07± 0.58	6.43± 0.21	TC
30.36±0.68	25.15±0.58	96.69±1.79	15.78±1.21	8.03±0.75	0.42±0.07	4.03±0.41	6.34±0.24	CC
NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	P≤

P≤ : مستوى المعنوية

(Non -Significant) : NS عدم وجود فروق معنوية  
( Mean± SD ) المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري )

جدول (16-4) علاقة التعدد المظهري لجين (CYP17) مع الهرمونات وكتلة الجسم والعمر في النساء المصابات بال-PCOS.

(Mean ± SD)

Age	BMI	Estradiol	Progesterone	Prolactin	Testosterone	FSH	LH	الطرز المظهرية لجين CYP17
B 24.88±0.40	29.18±0.86	B 56.83±1.43	8.34±0.78	17.75 ±0.82	C 0.97±0.09	5.47±0.56	16.70±0.40	TT
AB 27.98± 0.53	29.96±0.72	B 56.47± 1.78	8.20± 0.72	17.54± 0.90	B 1.12±0.14	5.64± 0.43	16.94± 0.37	TC
A 28.13±0.34	29.96±0.64	A 57.49±1.54	8.04±0.69	17.79±0.97	A 1.27±0.18	5.70±0.36	16.89±0.55	CC
0.05	NS	0.01	NS	NS	0.01	NS	NS	P≤

P≤ : مستوى المعنوية

NS : ( Non -Significant ) عدم وجود فروق معنوية

Mean± SD ( المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري )

المتوسطات التي تحمل حروف متشابهة ضمن العمود الواحد لا تختلف معنوياً .

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنوياً .

جدول (18-4) علاقة التعدد المظهري لجين (CYP19) مع هرمونات التكاثر وكتلة الجسم والعمر في نساء السيطرة .

(Mean ± SD)

Age	BMI	Estradiol	Progesterone	Prolactin	Testosterone	FSH	LH	الطرز المظهرية لجين CYP19
27.67± 0.55	24.85± 0.54	96.45±1.97	15.12± 0.83	7.81 ±0.87	0.40± 0.09	4.12±0.44	6.39±0.35	AA
29.78± 0.51	24.78±0.43	96.28± 1.99	15.33± 0.76	7.71±0.91	0.38±0.05	4.03±0.52	6.41±0.40	AG
28.24± 0.66	24.84±0.58	96.00±2.08	15.87±0.89	7.44± 0.78	0.36± 0.02	3.15±0.48	6.53±0.27	GG
NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	P≤

P≤ : مستوى المعنوية

(Non -Significant): NS عدم وجود فروق معنوية)

(المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري) Mean± SD

جدول (19-4) علاقة التعداد المظهري لجين (CYP19) مع هرمونات التكاثر وكتلة الجسم والعمر في النساء المصابات بال-PCOS.

(Mean ± SD)

Age	BMI	Estradiol	Progestrone	Prolactin	Testosterone	FSH	LH	الطرز المظهرية لجين CYP19
28.45±0.34	30.45±0.67	57.35±1.12	8.54±0.89	17.49 ±1.08	1.18±0.18	5.35±0.60	16.79±0.45	AA
27.24± 0.54	30.14±0.74	57.10± 1.50	8.13± 0.91	17.64± 1.02	1.08±0.20	5.64± 0.50	16.82± 0.58	AG
26.46±0.39	28.71±0.89	56.61±1.65	8.15±0.82	17.76±0.89	1.05±0.26	5.90±0.55	16.91±0.41	GG
NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	P≤

P≤ : مستوى المعنوية

NS ( Non -Significant ) : عدم وجود فروق معنوية

Mean± SD ( المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري )

الخلاصة

Abstract

## الخلاصة

صمم هذا البحث لدراسة بعض الجوانب الوراثية والبيولوجية الجزيئية والفسولوجية للنساء المصابات بمتلازمة تكيس المبيض المتعدد (PCOS) Polycystic Ovary Syndrome ، فقد جمعت عينات الدم من مركز الخصوبة والعقم في مستشفى الصدر التعليمي في محافظة النجف الأشرف خلال الفترة من تشرين الثاني / 2011 لغاية 30 كانون الأول / 2012. شملت الدراسة (130) امرأة مصابة بمتلازمة تكيس المبيض المتعدد وقورنت بمجموعة السيطرة التي تكونت من (100) امرأة والسليمان ظاهرياً بعد التأكد من خصوبتهن بأعمار تراوحت ما بين (15-45) سنة.

شملت الدراسة ثلاثة محاور: الأول تضمن علاقة بعض العلامات والمعايير السريرية والفسولوجية في النساء المصابات بالـ PCOS ، والثاني تناول دراسة بعض الفحوصات الخاصة بالوراثة الخلوية ومنها معامل الانقسام الخيطي (Mitotic Index (MI) وأختبار الانوية الصغيرة Chromosomal Micronuclei Test (MN) والنسبة المئوية للانحرافات الكروموسومية Aberrations (CAs) ، أما المحور الاخير فتضمن إجراء دراسة جزيئية لخمس جينات تسهم في حدوث المتلازمة والتعرف على التعدد المظهري وبعض الطفرات المحتملة بها ، وهي (PGR, ACE, TPA, CYP17, CYP19).

توصلت الدراسة إلى وجود زيادة معنوية ( $P \leq 0.05$ ) في النسبة المئوية لدليل كتلة الجسم (Body Mass Index (BMI) للنساء المصابات بالمتلازمة مقارنة بنساء السيطرة، إذ بلغت ( $29.79 \pm 0.96$ ) و ( $24.80 \pm 0.80$ ) على التوالي ، في حين لم يلاحظ وجود اختلاف معنوي بين معدلات الأعمار ما بين نساء المتلازمة والنساء غير المصابات بها.

وظهرت العديد من التغيرات في العلامات السريرية للنساء المصابات بالمتلازمة فقد لوحظ ارتفاع النسبة المئوية لكل من الشعرانية بنسبة (65.38%) والتاريخ العائلي بنسبة (38.46%) للمرض وعدم انتظام الدورة الشهرية بنسبة (63.85%) والإسقاطات المتكررة بنسبة (42.31%) وانعدام الخصوبة بنسبة (90%) في النساء المصابات بالمتلازمة مقارنة مع النساء المصابات بالمتلازمة اللواتي لم تظهر عليهن تلك العلامات.

أما دراسة الهرمونات للمريضات التي تناولت قياس مستوى تركيز هرمونات التكاثر وهي الهرمون المحفز للجريب (Follicle-Stimulating Hormone (FSH) وهرمون الجسم الأصفر

(اللوتيني) Luteinizing Hormone (LH) وهرمون التيستوستيرون Testosterone (T) وهرمون الحليب Prolactine (PRL) وهرمون البروجستيرون Progesterone (P) وهرمون الايسترادايول Estradiol (E2) ، فقد أظهرت وجود زيادة معنوية ( $P \leq 0.01$ ) في مستوى تركيز كل من الهرمون المحفز للجريبات والهرمون اللوتيني وهرمون الحليب وهرمون التيستوستيرون للنساء المصابة بالـ PCOS إذ بلغت (5.60 mIU/ml) و (16.86 mIU/ml) و (17.67 ng/ml) و (1.09 ng/ml) على التوالي مقارنةً مع نساء السيطرة فبلغت النسب (4.09 mIU/ml) و (6.43 mIU/ml) و (8.14 ng/ml) (0.38 ng/ml) على التوالي . أما تركيز هرموني الايسترادايول والبروجستيرون فقد كان منخفضاً معنوياً ( $P \leq 0.01$ ) وبلغ (8.21 ng/ml) و (56.76 Pg/ml) مقارنةً مع نساء السيطرة (15.40 ng/ml) و (96.22 Pg/ml) على التوالي.

أوضحت نتائج الدراسة الوراثة الخلوية الى حصول انخفاض معنوي ( $P \leq 0.001$ ) في معدل معامل الانقسام الخلوي في النساء المصابات بالمتلازمة مقارنة بالنساء السليمات، في حين ازداد تكرار الانوية الصغيرة بصورة معنوية ( $P \leq 0.001$ ) ، أما بالنسبة للانحرافات الكروموسومية العددية والتركيبية فقد شخص كل من حالات الحذف ، الكروموسوم ثنائي المركز ، تعدد المجموعة الكروموسومية و الكسور الكروموسومية التي ارتفعت وبصورة معنوية ( $P \leq 0.001$ ) في النساء المصابات مقارنة بالنساء غير المصابات بالمتلازمة.

أما نتائج الدراسة الجزيئية فقد كانت كما يأتي :

أظهر الجين *Progesterone Receptor gene (PGR)* وجود اليلين و ثلاث طرز وراثية (T1T1, T1T2, T2T2) في كل من مجموعة نساء متلازمة تكيس المبيض المتعدد ونساء السيطرة ، كما لوحظ وجود اختلاف معنوي ( $P \leq 0.001$ ) في النسبة المئوية لتكرار الاليلات الثلاثة بين المجموعتين وكذلك بين تكرار تلك الاليلات داخل المجموعة الواحدة (مجموعة نساء الـ PCOS ومجموعة السيطرة) وعند مقارنة التعداد المظهري مع مستوى قياس الهرمونات المدروسة ودليل كتلة الجسم والعمر لم تظهر أية فروقات معنوية بين المجموعتين.

وفيما يتعلق بالتعدد المظهري لجين *Angiotensin Converting Enzyme (ACE)* فقد تبين وجود اليلين لهذا الجين هما الحذف Deletion(D) والإدخال Insertion (I) مع ثلاث طرز وراثية (DD, DI , II)، وقد لوحظ وجود اختلاف معنوي ( $P \leq 0.001$ ) في النسبة المئوية لتكرار الاليلات الثلاثة وبين الاليل D والاليل I بين المجموعتين ، وكذلك بين تكرار تلك الاليلات داخل المجموعة الواحدة (مجموعة نساء الـ PCOS ومجموعة السيطرة) ، كما لوحظ ارتفاع الشكل الاليلي DI في كلتا المجموعتين ، ولم تظهر أية فروقات معنوية في مجموعة نساء المتلازمة أو مجموعة نساء السيطرة عند



المقارنة ما بين التعداد المظهري مع مستوى قياس الهرمونات المدروسة ودليل كتلة الجسم والعمر ماعدا ارتفاع مستوى تركيز هرمون التستوستيرون وبفارق معنوي ( $P \leq 0.01$ ) وانخفاض مستوى تركيز الهرمون المحفز للجريبات وبفارق معنوي ( $P \leq 0.05$ ) عند الشكل الاليلي DD. وعند دراسة التعداد المظهري لجين Tissue Plasminogen Activator (TPA) فقد ظهر كل من الاليل D و I وثلاثة أشكال اليلية لهما (DD, DI, II)، وقد كان الفرق معنوي ( $P \leq 0.001$ ) بين كل من الاليلات الثلاثة وبين كل من الاليل D و I بين مجموعة نساء متلازمة تكيس المبيض المتعدد ونساء السيطرة وكذلك بين تكرار تلك الاليلات في كل مجموعة. في حين لم تظهر فروق معنوية تربط ما بين مستوى تركيز الهرمونات وتكرار الاليلات الثلاثة في مجموعة نساء المصابات بال-PCOS ونساء السيطرة.

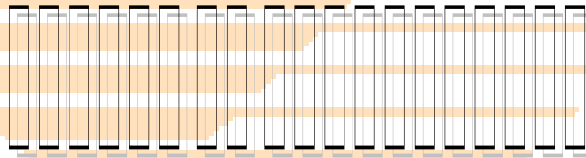
أما فيما يتعلق بالجين Cytochrome p-450c17 (CYP 17) فقد بينت الدراسة وجود اليلين للجين (T, C) وثلاثة طرز وراثية في مجموعة النساء المصابات بالمتلازمة والنساء غير المصابات بالمتلازمة وهي (TT, TC, CC)، وقد كانت نسبة الطراز المتماثل الطافر (CC) أعلى عند النساء المصابات بالمتلازمة مقارنة بالنساء غير المصابات وبفارق معنوي ( $P \leq 0.001$ ) كذلك الحال بالنسبة للاليلات الأخرى (TT, TC) النسبة المئوية للاليلين (T) و (C). أما علاقة التعداد المظهري والنسب المئوية للطرز الوراثية الثلاثة للجين (CYP17) مع مستوى تركيز الهرمونات التكاثرية ودليل كتلة الجسم والعمر في المجموعتين، فلم تظهر أية فروقات معنوية بينها ماعدا ارتفاع تركيز الهرمون الذكري التستوستيرون وانخفاض تركيز مستوى هرمون الاستراديول بالشكل الاليلي الطافر (CC) وبفارق معنوي ( $P \leq 0.01$ ) وكذلك زيادة العمر عند الشكل الاليلي (CC, TC) بفرق معنوي ( $P \leq 0.05$ ).

أوضحت نتائج التنميط لجين Cytochrome p-450c19 (CYP 19) وجود اليلين لطفرة SNP rs2414096 وهما (A, G) وظهور ثلاثة طرز وراثية لهذه الطفرة وهي (AA, AG, GG)، كما لوحظ وجود اختلاف معنوي ( $P \leq 0.001$ ) في النسب المئوية للتعدد لمظهري للطرز الوراثية الثلاثة وتكرار الاليل A و G ما بين النساء المصابات وغير المصابات بالمتلازمة، ولم يلاحظ وجود أية فروقات معنوية بين مستوى تركيز الهرمونات ودليل كتلة الجسم والعمر مع نسب تكرار الطرز الوراثية الثلاثة.

الفصل الأول

المقدمة

Introduction



تُعد متلازمة تكيس المبيض المتعدد (Polycystic Ovary Syndrome) PCOS من أكثر الاضطرابات الهرمونية والوراثية شيوعاً لدى النساء ، إذ وصفت لأول مرة من قبل العالمان Stein و Leventhal في عام 1935 (Roe and Dokras, 2011) ، وتقدر نسبة الإصابة بالمتلازمة حوالي (15-20 %) من النساء في العالم في عمر الإنجاب (12-45) سنة (Rotterdam , 2004)، وتعد السبب الرئيس للعقم سواء كان أولي أو ثانوي لدى النساء ، وأن حوالي 26% من النساء المصابات بالتكيس تكون ضمن العقم الأولي و 14% منهن تكون ضمن العقم الثانوي و30% يتضمن دورة شهرية منتظمة و 50% يعانين من ندرة الحيض و 20% يعانين من انقطاع الحيض (Futterweit , 1998).

أن متلازمة تكيس المبيض هي حالة غير متجانسة سريراً Heterogeneous status في النساء المتضررات ، إذ تحدث PCOS في الغالبية العظمى من المجتمعات وتؤدي العوامل البيئية والوراثية أثراً كبيراً في إحداث المرض ، ولكن السبب الرئيس لحدوثها غير معروف بشكل دقيق ومؤكد (Sheikhha et al., 2007) . هناك الكثير من السمات السريرية والكيموحياتية للمتلازمة ، منها زيادة مستويات الهرمونات الاندروجينية Hyperandrogenesis كزيادة مستوى الهرمون الذكري (Testosterone hormone) عن الحد الطبيعي مما يسبب انعدام الخصوبة Infertility في أغلب الحالات و انعدام التبويض Anovulatory والشعرانية Hirsutism (Leon and Nalhan,1994) ، كذلك تعد مقاومة الأنسولين Insulin Resistant(IR) وزيادة الأنسولين من الاضطرابات الوظيفية الايضية Metabolic Disorders(MD) الرئيسة المصاحبة للنساء المصابات بالمتلازمة ، إذ ان حوالي 70% منهن يتعرضن لمقاومة الأنسولين التي تتطور للإصابة بمرض السكري النوع الثاني (Diamanti-Kandarakis et al., 2008).

تلعب الوراثة دوراً كبيراً في إحداث المتلازمة ، فقد وجد أن المرأة التي في عائلتها فرداً واحداً أو أكثر مصاباً بالـ PCOS كالأُم أو الأخت تكون أكثر عرضة لخطر الإصابة بها دون غيرها (Louis ,2007). وقد أثبتت الدراسات أن حوالي 100جين مرشح على الأقل تسهم في حدوث المرض (Goodarzi, 2008) منها الجينات المسؤولة عن تصنيع الهرمونات الستيرويدية Steroids Hormones كجينات (CYP19 ,CYP11A, CYP21and CYP17) أو التي تسهم بالالتهابات المزمنة (Chronic inflammation) مثل جينات (TPA , PTI-1 , TNF-α) أو التي تشترك بعملية التكاثر ومقاومة الأنسولين منها جينات (Prapas et (FSHR , INSR and IL-6) (al ., 2009). يسبب المرض مضاعفات أخرى على المدى البعيد والنتيجة بصورة أساس من زيادة الوزن Obesity ومقاومة الأنسولين كارتفاع ضغط الدم Hypertension (Chen et al., 2007) وأمراض

القلب الوعائية المزمنة (Cussons *et al.* , 2005) Cardiovascular Diseases(CVD) وإسقاط الحمل المتكرر (Norman ,2000; Kazerooni *et al.* Recurrent pregnancy loss (RPL) Endometrial carcinoma *al.*, 2013) وحدوث الجلطة الدماغية وسرطان كل من بطانة الرحم والمبيض Ovarian cancer والبيضي (Balen, 2001; Spritzer *et al.* , 2005) Breast Cancer والبيضي.

لوحظ حدوث عدد من التغيرات الوراثية الخلوية لدى النساء المصابات بتكيس المبيض المتعدد منها زيادة عدد الانوية الصغيرة (MN) Micronuclei واختلالات الكروموسومات Aneuploidy و polyploidy لكروموسوم X (Moran *et al.*, 2008).

ونظراً للزيادة الكبيرة للنساء المصابات بهذه المتلازمة ولقلة الدراسات التي تخص جوانب الوراثة الخلوية والجزئية وعلاقتها بالعلامات السريرية والفسيولوجية لمتلازمة تكيس المبيض المتعدد ، فقد تم إجراء هذه الدراسة التي تهدف إلى :

1- دراسة التغيرات في المعايير الهرمونية الفسلجية المرافقة للمتلازمة التي شملت كل من الهرمون المحفز للجريبات FSH والهرمون اللوتيني LH وهرمون الشحمون الخصوي Testosterone (T) وهرمون البروجستيرون Progesterone (P) وهرمون الاستراديول Estradiol (E2) وهرمون الحليب Prolactin (PRL) .

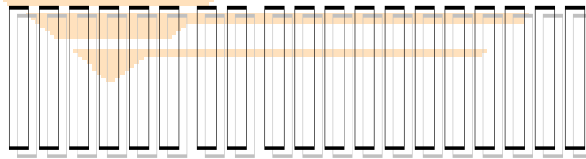
2- دراسة التغيرات الوراثية الخلوية للنساء المصابات بمتلازمة تكيس المبيض المتعدد والتي شملت التغيرات التركيبية والعديدية للكروموسومات ومعامل الانقسام الخلوي (MI) والانوية الصغيرة (MN) للخلايا للمفاوية ثنائية النواة للدم المحيطي.

3- دراسة جزئية لبعض الجينات المهمة التي تلعب دوراً هاماً في حدوث المرض والكشف عن التعدد المظهري Polymorphism والطفرات والجينات هي (PGR gene , ACE gene , TPA gene , CYP17 gene , CYP19 gene) .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature Review



## 1-2. المبيض The Ovary

يحتوي الجهاز التكاثري للانسان على اثنين من الغدد التكاثرية المهمة هما المبيضان الأيمن والأيسر، اللذين لهما عملان اساسيان هما إنتاج البويضات أو الكميات وإنتاج الهرمونات المبيضية التي تشمل الاستروجين Oestrogen والبروجستيرون Progesterone والهرمون المرخي Relaxin Hormone (Ganong, 1991)، يكون المبيض بيضوي الشكل ويتكون من قشرة Cortex ولب Medulla ، وتحتوي قشرة المبيض على جريبات المبيض Ovarian Follicles والأجسام الصفراء Corpora Lutea وتغلف هذه القشرة بظهارة سطحية أما الغلالة البيضاء Tunic albugenia فهي طبقة سميكة من النسيج الضام تقع تحت الظهارة السطحية مباشرة وتتمزق الغلالة البيضاء عند نمو الجريبات والأجسام الصفراء، أما لب المبيض فيتكون من المنطقة الداخلية التي تحتوي على عدد كبير من الأوعية الدموية والأعصاب والأوعية اللمفية ، ويتكون من نسيج ضام وعضلات ملساء ، وأن الجريبات المبيضية هي المسؤولة عن تكوين البويضات وإفراز هرمون الاستروجين ، بينما تفرز الأجسام الصفراء هرمون البروجستيرون ، أما الانسجة البينية Interstitial tissues الموجودة في المبيض فهي المسؤولة عن إفراز الهرمون المرخي وكميات من هرمون البروجستيرون وكمية قليلة من الاندروجينات (الحاج ، 2013)

هناك أربع أنواع من الجريبات في مبيض الأنثى البالغة وهي: (Ganong, 1995)

### 1- الجريبات الابتدائية أو الأساسية Primary or Primordial follicles

تتألف من سليفة البويضة Oogonium التي تحاط بطبقة من الخلايا الظهارية المضلعة التي تمثل الخلايا الحبيبية Granulosa cells ، وتكون الجريبات الابتدائية محاطة بالغشاء القاعدي وتقع في الجزء الخارجي من قشرة المبيض ، ويحتوي كل مبيض على أعداد كبيرة من الجريبات الابتدائية.

### 2- الجريبات النامية أو الثانوية Growing or Secondary follicles

وهي الجريبات التي تترك مرحلة الحضانة Resting Stage بوصفها جريبات ابتدائية لتنمو وتتطور ، حيث تمر خلاياها بالانقسام الخيطي Mitosis وبذلك يزداد عدد طبقاتها الطلائية لتصبح طبقتين أو أكثر من الخلايا الحبيبية .

### 3- جريبات جراف Graafian follicles

وتسمى هذه الجريبات أيضاً بالجريبات الحويصلية Vesicular follicles وتتكون من الجريبات المحتوية على الغار Antrum التي تتميز فيها الطبقة الشفافة Zona pellucid وكذلك طبقة القراب Theca ، يقوم المبيض في هذه المرحلة من نمو الجريبات بممارسة عمليتين مهمتين هما تكوين البويضات وإفراز الهرمونات التي تكونها خلايا طبقة القراب ( الاستروجينات والاندروجينات) أما الخلايا المحيطة فتكون البروجستينات.

#### 4-الجريبات الضامرة Atretic follicles.

وهي الجريبات الناتجة من جريبات جراف التي لم يحدث فيها إباضة وتسمى الجريبات غير الإباضة أو المتحللة Degenerating follicles.

#### 2-2. دورة المبيض ودورة الهرمونات خلالها

ما أن تصل الفتاة السوية سن البلوغ حتى تبدأ دورة الطمث، ويتداخل في تنظيم هذه الدورة كل من تحت المهاد والغدة النخامية والمبايض وبطانة الرحم Endometrium. فعند بلوغ المبايض تنشط بواسطة هرمون محفز الجريبات لنمو الجريبات follicles ويوضحه وافراز هرمونات الجنس. ففي المرأه يكون معدل دوره الحيضيه لها 20-35 يوم بمعدل 28 يوم (Bary et al., 1994) والمسؤول عن تنظيم هذه الدورة الهرمون المحرر لمغذيات القند Gonadotropin – Releasing Hormone (GnRH) (Frhan, 2003).

في بداية دوره حيضيه تتحفز أكثر من 40 جريبيه أوليه primary follicles في احد او كلا المبيضين وبشكل عشوائي للنمو وهذا التحفيز يتم عن طريق هرمون المحفز للجريبات – Follicle Stimulating Hormone (FSH) المفرز من الغدة النخامية وجريبيه واحده فقط تنمو الى جريبيه ناضجه (Graffian follicle) حيث تكون حساسه لمستوى FSH العالي في المصل في الطور الجريبي المبكر وهو العامل الذي يحدد اختيارها من دون الأخريات (Hillier,1993). أما البقيه فأنها تنتكس و تندثر. ويبدو أن عدد الجريبات التي تبدأ بالنمو تعتمد على حجم الجمعيات الثماليه residual pools للجريبات غير الفعاله (Peters et al ., 1975) وكل جريبيه أساسيه Predominante follicle يتم تجميعها وتطويعها في الأيام الأولى من الدورة (Mais et al., 1986). وهي متكونه من خليه بيضه Oocyte ثنائيه المجموعه الكروموسومية ناضجه محاطه بالخلايا الطبقة الحبيبيه Granulosa والخلايا الداخليه للطبقة القرايبه theca interna مشتقة من stroma المبيض اللتان تنتجان الاستروجين الذي تزداد كميته تدريجياً مع نضج الجريبه (Hsueh et al., 1982). إن أكثر الحوادث الهرمونية أهمية التي يمكن ملاحظتها في هذه المرحلة هو زيادة مستوى FSH الذي يحفز الاضمحلال في مستوى تصنيع الستيرويدات خلال الطور اللوتيني الذي يصاحبه زيادة في مستوى الهرمون اللوتيني المفرز من الغدة النخامية (Luteinizing Hormone (LH) الذي يساعد في تحفيز عدد من الجريبات (Vermesh and Kletzky, 1987). وتتواجد مستقبلات خاصة لهرمون محفز الجريبات على اسطح الخلايا الحبيبيه وبوجود FSH فالجريبات تبدأ بتعطي aromatization كميات محدوده من الاندروجينات Androgens (Menally et al.,1979). وبوجود تراكيز واطئة فأن هذه الاندروجينات تقلل من قابليه

أنتاج الايستروجين وبهذا يصبح محيط الجريب اندروجيني Androgenic مما يؤدي الى اضمحلال الجريب (Chabab *et al.* , 1986). ويكون إنتاج الايستروجين مصحوباً بأنخفاض تدريجي في مستوى FSH الذي يمكن ملاحظته خلال منتصف الطور الجريبي mid follicular phase الذي يسبق الزيادة في قطر الجريب وهو الذي يحدد استمرار نمو الجريب الابتدائي وتطوره وان آلية التغذية الراجعة السالبة negative feed back mechanism للايستروجين على مستوى FSH تخدم في تثبيط كل الجريبات عدا الجريبة الحاوية على البيضة التي سوف تنطلق، ولأجل الاستجابة لدفق LH فإن خلايا الطبقة الحبيبية يجب أن تستحث مستقبلات هذا الهرمون وتظهر هنا من جديد أهمية الايستروجين كموجه أساسي إذ أن زيادة مستواه داخل محيط الجريبة ذاتها يعمل على تحويل وجهة FSH في حث مستقبلات نفسه وبدلاً من ذلك فإنه يقوم بحث مستقبلات LH (Ckikasaw *et al.*, 1986).

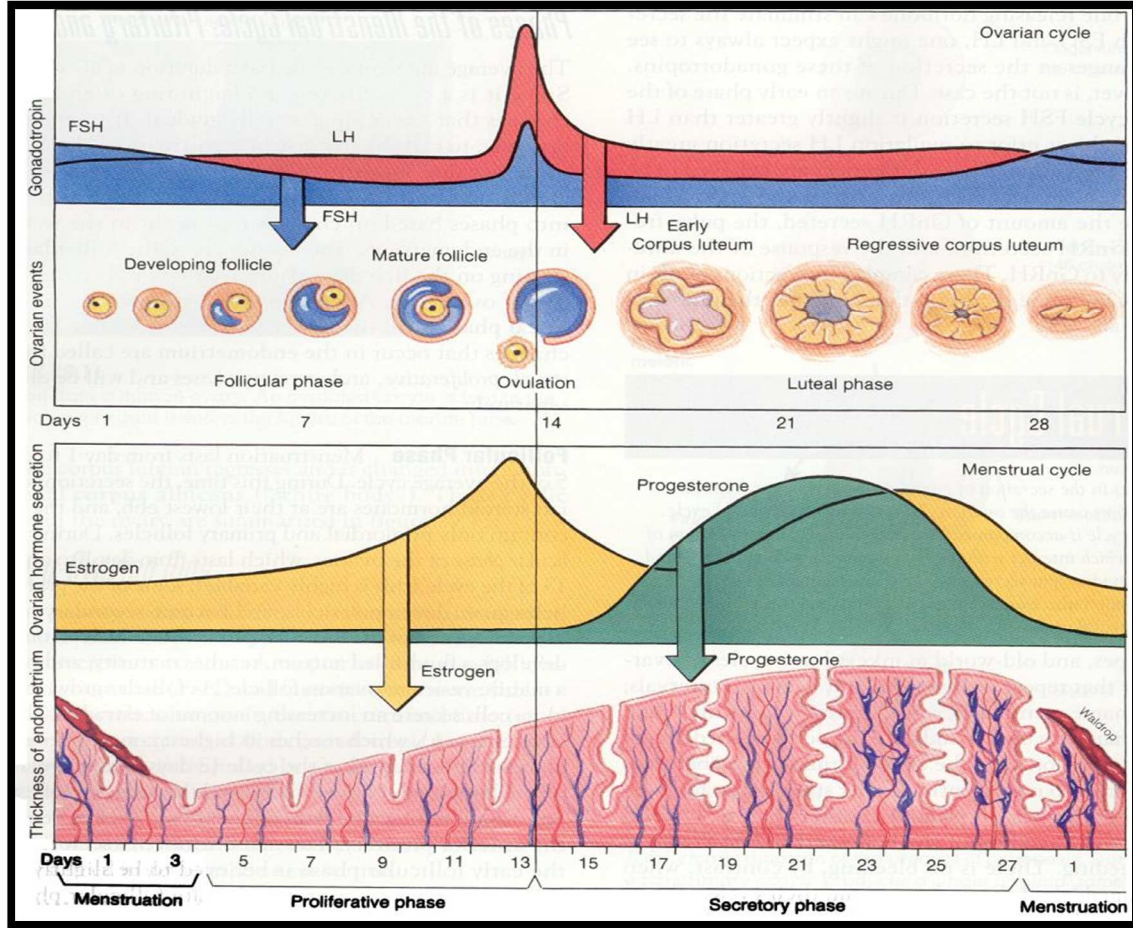
وفي يوم 14 وهو نصف وقت الدورة الحيضية يزداد مستوى الايستروجين تدريجياً ثم يزداد بسرعة ويصل أعلى مستوى له بحدود 24-36 ساعة قبل الاباضة التي تحدث بحدود 10-12 ساعة (Pauerstein *et al.*, 1987)، يتمزق سطح المبيض وتحرر البيضة Oocyte الى الفراغ البروتيني قرب أصابع قناة فالوب وانطلاق البيضة بوساطة تحفيز من قبل هرمون LH الذي يصل أعلى مستوى له (Yen, 1993)، وبعد تحرير البيضة ينخفض مستوى الايستروجين وكذلك (LH وFSH) مما يختزل مستواهم، ويبدأ ارتفاع البروجسترون الذي يؤدي الى إزالة دفق LH من خلال تأثيره السالب الذي يحدث بوجود التراكيذ العالية منه ، وان المدة الواقعة من اليوم الأول للدورة الحيضية وحتى انطلاق البيضة يسمى بالطور الجريبي follicle -phase ويمثل 14 يوماً (Harold and Niswender., 1971).

أن LH ايضاً يقاب خلايا الجريبة الى الجسم الأصفر Corpus luteum حيث تبدأ كل من الطبقة القرابية والحبيبية بالتصفر. ويقوم كل من LH وFSH بتكوين وصيانة الجسم الأصفر خلال الطور اللوتيني Luteal phase الذي يمثل المدة الواقعة من يوم حدوث الاباضة الى بدء حدوث الطمث (shoham *et al.*, 1992) ويمثل 16 يوماً والذي يرتفع فيه مستوى هرمون البروجسترون في الدم بحدود 10-19 مايكروغرام / ملتر وبسرعة لمدة 3-5 ايام بعد حدوث الاباضة ثم ينخفض (Neill *et al.*, 1967).

أن الجسم الأصفر يفرز كميات كبيرة من البروجسترون وايضاً الايستروجين لهذا يرتفع مستوى الايستروجين مرة ثانية (Shamma *et al.*, 1992). وإذا لم تخصب البيضة فإن الجسم الأصفر يتحطم في الأسبوع الأخير من الدورة الى جسم زجاجي Hyaline body يعرف بالجسم الأبيض Corpus



albicans وينخفض مستوى الايستروجين والبروجستيرون وتنتهي الدورة المبيضية ويحدث الحيض (Frhan, 2003) . ويرتبط ظهور العديد من الأعراض المرضية بتغيرات مستويات LH منها متلازمة تكيس المبيض المتعدد (Fulghesu *et al.*, 1999) Polycystic Ovary Syndrome(PCOS).



الشكل (1-2): دورة الحيض والاباضة (<http://reds.yahoo.com>)

### 3-2. متلازمة تكيس المبيض المتعدد Polycystic ovary syndrome

تُعرف متلازمة تكيس المبيض المتعدد بأنها اضطراب معقد وراثياً غير متجانساً Heterogeneous (Roshdy , 2010) . تتميز المتلازمة بحالة فرط الأندروجينات Hyperandrogenes وانعدام أو قلة الحيض Oligoamenhorrea or Amenhorrea والشعرانية Hirsutism وظهور حب الشباب في الوجه Acne ، كما وينتج في اغلب الحالات الشائعة العقم بين النساء المصابات في عمر التكاثر الطبيعي، إذ تُعدّ من أكثر الأمراض الهرمونية الشائعة في مختلف بلدان العالم

(Yarak et al ., 2005)، وترتبط الـ PCOS أيضا مع السمنة Obesity ومقاومة الأنسولين Insulin Resistance وداء السكري من النوع الثاني (DMT2) (Lee et al., Diabetes Mellitus Type2) (2013) . كذلك الإجهاض المتكرر (Su et al., 2013) Recurrent miscarriage، وأمراض القلب الوعائية (Cussons et al.; 2006) Cardiovascular Diseases (CVD) والسرطانات المختلفة كسرطان الرحم المبيض (Balen,2001) والالتهابات المزمنة (Repaci et al Chronic Inflammations (2011) ..

## 2-4. تعريف متلازمة تكيس المبيض المتعدد Definition of PCOS

أن تعريف هذه المتلازمة لازال خاضعاً للمناقشة وبقيت أمراضيتها غير مؤكدة (Li et al., 2014) . توجد ثلاث مجاميع مختلفة للمعايير التشخيصية القياسية للمتلازمة وأجريت المحاولات الأولى لتعريف PCOS خلال مؤتمر الخبراء الذي أجرته المعاهد الوطنية للصحة (NIH) National Institutes of Health عام 1990 وتضمن كل من فرط الاندروجين والاختلال الوظيفي للمبيض (Zadawski and Duanif,1992) ، وفي 2003 قدم مؤتمر روتردام Rotterdam للجمعية الأوروبية للتكاثر البشري وعلم الأجنة European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) والجمعية الأمريكية للطب التكاثري American Society for Reproduction Medicine (ASRM) تعريفاً موسعاً للـ PCOS، وقد تضمن هذا التعريف الخصائص المظهرية والتشخيصية للمرض مثل اضطرابات الدورة الشهرية وانعدام الإباضة وزيادة الاندروجين بالإضافة إلى اضطرابات الغدد الصماء والبدانة (Rotterdam, 2004).

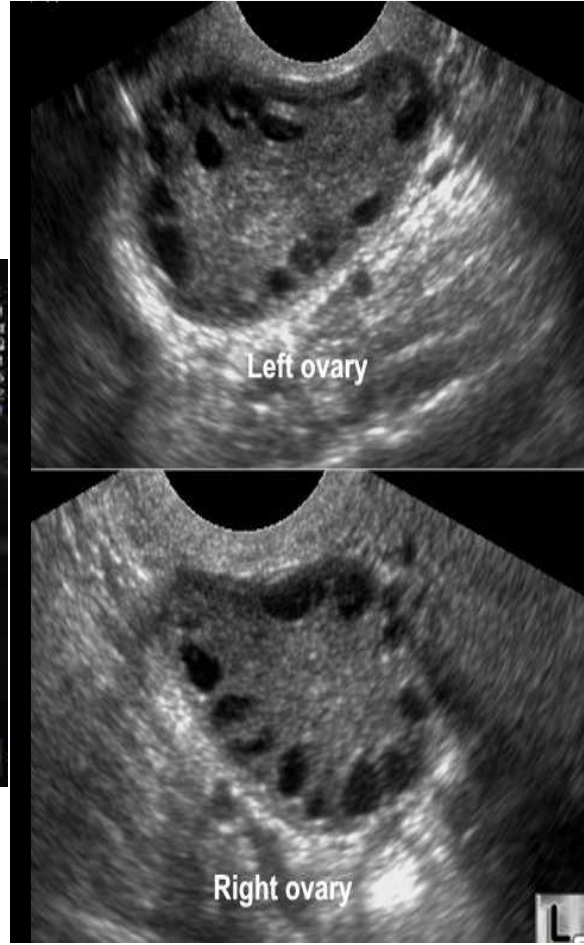
## 2-5. أعراض تكيس المبيض المتعدد Symptoms of PCOS

### 2-5-1. الأكياس المبيضية Ovarian Sacs

يظهر في أثناء الفحص بالأشعة فوق الصوتية Ultrasound لمبايض النساء المصابات بالـ PCOS عدد كبير من الأكياس Sacs (شكل 2-2) المحتوية على بويضات غير ناضجة يتراوح حجمها (2-9) ملم إذ انه في كل دورة شهرية ينمو كيس لتكوين بيضة ناضجة يتراوح حجمها (18-22) ملم ولكن ما يحصل أن عدد كبير من الأكياس تنمو في وقت واحد ثم يتوقف نموها جميعاً في منتصف الطريق و بالتالي عدم وصول أي من هذه البويضات للحجم المناسب ولا تحدث لها إباضة ويظهر التصوير بالموجات فوق الصوتية زيادة في حجم المبيض وتظهر الأكياس كحبات عقد اللؤلؤ (String of pearl) (Koracs and Norman, 2007; Al-Hakeim et al ., 2010).



ب



أ

شكل (2-2) تكيس المبيض بالاشعة فوق الصوتية  
أ: صورة بالموجات فوق الصوتية Ultrasound للمبيضين الأيمن والأيسر تظهر تكيسات المبيضين في  
النساء المصابات بالـ(PCOS) ب: صورة بالموجات فوق الصوتية Ultrasound لمبيض طبيعي  
(Schmidt, 2011)

عندما لا تحصل عملية التبويض لسبب من الأسباب فإن المنطقة الحبيبية Granulosa من المبيض  
والتي تحيط بالحوصله المبيضية تتحطم ذاتياً يؤدي إلى موت الخوي المبرمج للخلايا (Programmed  
Cells Death) ويعرف بالـ Apoptosis مما يؤدي إلى تفتت الحوصله إلى أجزاء واختفائها . ولكن  
خلايا القراب theca cell لا تموت وتُحفظ بسبب المحتوى العالي للأنسولين والذي يمنع الحوصله من  
التفتت مما يؤدي إلى تكوين الكيس المبيضي (Palomba et al ., 2005) .

تنتج خلايا القراب theca cell هرمون Androstenedione وبعد فترة قصيرة تقوم الخلايا الحبيبية  
بتحويله إلى هرمون الأستروجين، بينما تقوم خلايا القراب بتحويله إلى هرمون الشحمون الخصوي  
(Talbot et al ., 2001 ; Diamanti et al ., 2004) .

## 2-5-2. انعدام الخصوبة Infertility

تُعرف انعدام الخصوبة Infertility علمياً بأنها عدم حصول الحمل بعد سنة كاملة من الاتصال الجنسي المنتظم وبدون استعمال موانع حمل (Vanzandvoort *et al.*, 1996)، أو إن الحمل يتكرر لدى المرأة ولكن لا يستمر ولا يشمل العقم الناتج عن العملية الجراحية (كإزالة المبايض) أو استعمال بعض العلاجات الطبية التي لها آثار جانبية على صحة التكاثر مثل استخدام العلاج الكيماوي والإشعاعي (Arlond, 2000) ولا يعد الزوجين خصبيين مالم تحمل المرأة طفلاً كاملاً ويولد حياً، والطفل المنتج يكون ذا صحة جيدة (Janathan *et al.*, 1996).

تشارك هورمونات (الغدة تحت المهاد، الغدة النخامية و المبيض) في تنظيم الوظيفة التكاثرية والفسولوجية في الجسم عن طريق تحفيز بعض الهرمونات وتنشيط الأخرى بواسطة ميكانيكية التغذية الراجعة وان حدوث خلل في هذا التوازن الهرموني يؤدي إلى الإصابة بمتلازمة الـPCOS التي تصيب النساء خاصة في العمر الإنجابي (Conway,2000)، أما ارتفاع النسبة المئوية لانعدام الخصوبة لدى النساء المصابات بتكيس المبيض المتعدد قد يعزى إلى عدة تفسيرات منها وجود اختلال في محور تحت المهاد – النخامية (Hypothalamic-Pituitary axis) الأمر الذي قد يعمل زيادة نسبة إفراز الهرمون اللوتيني إلى الهرمون المحفز للجريب (LH/FSH ratio) وبالنتيجة تحفيز خلايا القراب للمبيض لإفراز مستويات أعلى من هرمون الشحمون الخصوي مما قد يحدث اختلال في نمو وتطور الحويصلات المبيضية (Stein and Leventhal,1935 ; Adams *et al.*, 1986) . وقد يكون لغدة تحت المهاد والاختلال الحاصل في إفراز هرموناتها المحررة لمحرضات القند GnRH دوراً مهماً في إحداث انعدام الخصوبة لدى متلازمة تكيس المبيض (Berger *et al.* , 1975 ; Walddstriecher *et al.* , 1988)

قد تسهم حالة نقص الدرقية (Hypothyroidism) في حالة انعدام خصوبة النساء المصابات بتكيس المبايض ، كما أن نقصان الهرمون الثايرونين ثلاثي اليود T3 وهرمون Thyroxin (T4) وارتفاع في تركيز الهرمون المحفز للدرقية (TSH) قد يؤدي إلى زيادة إفراز الشحمون الخصوي وإحداث حالة انعدام الخصوبة من خلال تأثير (TSH) على أيض الاستروجين وتقليل إنتاج (SHBG) Sex Hormone –Binding Globulin والذي يقوم بنقل الاندروجينات والاستروجين في الدم وأيضاً إلى النسيج الهدف وبذلك يرتفع مستوى التستوستيرون الحر في النساء المصابات بمتلازمة الـPCOS مسبباً انعدام الخصوبة تكيس المبايض (Palomba *et al.*, 2004; Dahiya *et al.*, 2012) . وتعزى حالة انعدام الخصوبة أيضاً إلى إصابة النساء بداء السكري من النوع الثاني الذي قد يعمل على تحفيز المبيض لإفراز الاندروجين مما قد يسهم في حالة انعدام الخصوبة أو يسبب ارتفاع مستوى

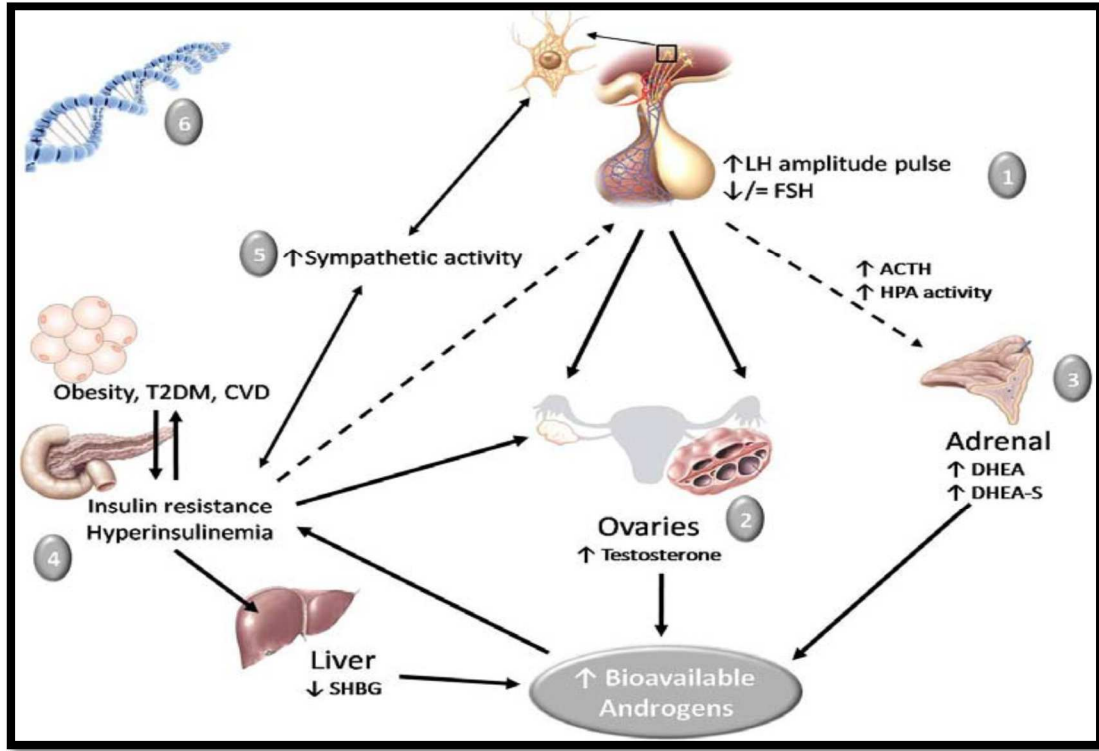
الأنسولين الذي يثبط إنتاج الكبد لـ (SHBG) مسبباً زيادة الاندروجين الحر (Tomlinson *et al.*, 2013). تعاني أكثر من 60% من نساء الـ PCOS من انعدام الخصوبة (الأولي والثانوي) (Balen *et al.*, 1995)، وعادة الحوامل والمصابات بتكيس المبيض المتعدد تتعرض إلى مشاكل الإجهاض المتكرر Recurrent Miscarriage وكذلك حالة سكري الحمل Gestational Diabetes وارتفاع الضغط Hypertension (Norman,2000).

## 2-6. الفسيولوجيا المرضية لمتلازمة تكيس المبيض المتعدد Pathophysiology of PCOS

أن النشوء المرضي للـ PCOS معقد ومرتبطة بالعديد من العوامل ولازال فهمه فقيراً ، وقد تمثل بالاندروجينات والأنسولين ، إذ هما العنصرين الرئيسيين لوسائط الغدد الصم إذ يوجد ارتباط قوي ما بين فرط الأنسولين وفرط الاندروجينات لكن الآليات وعلاقتها وارتباطها مع الـ PCOS غير مفهوم بشكل كامل ، بحيث ينتج فرط الاندروجينات من فرط الأنسولين لمقاومة الأنسولين أو العكس صحيح (Schuring *et al.* , 2008).

أما النظريات الشائعة التي وضعت لتفسير الفسيولوجيا المرضية للـ PCOS هي:

- 1- العيوب العصبية الغدية Neuroendocrine defects
  - 2- اختلال تكوين الستيرويدات المبيضية Impaired ovarian steroidogenesis
  - 3- اختلال إنتاج الاندروجين الكظري Impaired adrenal androgen production
  - 4- مقاومة الأنسولين مع فرط الأنسولين التعويضي Resistance with compensatory hyperinsulinemia
  - 5- زيادة فعالية الجهاز العصبي الودي Increased sympathetic
  - 6- العيوب الوراثية Genetic defects
- ويوضح الشكل (2-3) النظريات أعلاه.



شكل ( 2-3 ) النظريات الشائعة لتفسير الفسيولوجيا المرضية للـ PCOS  
(Schuring *et al.* ,2008).

## 1-6-2 العيوب العصبية الغذائية Neuroendocrine defects

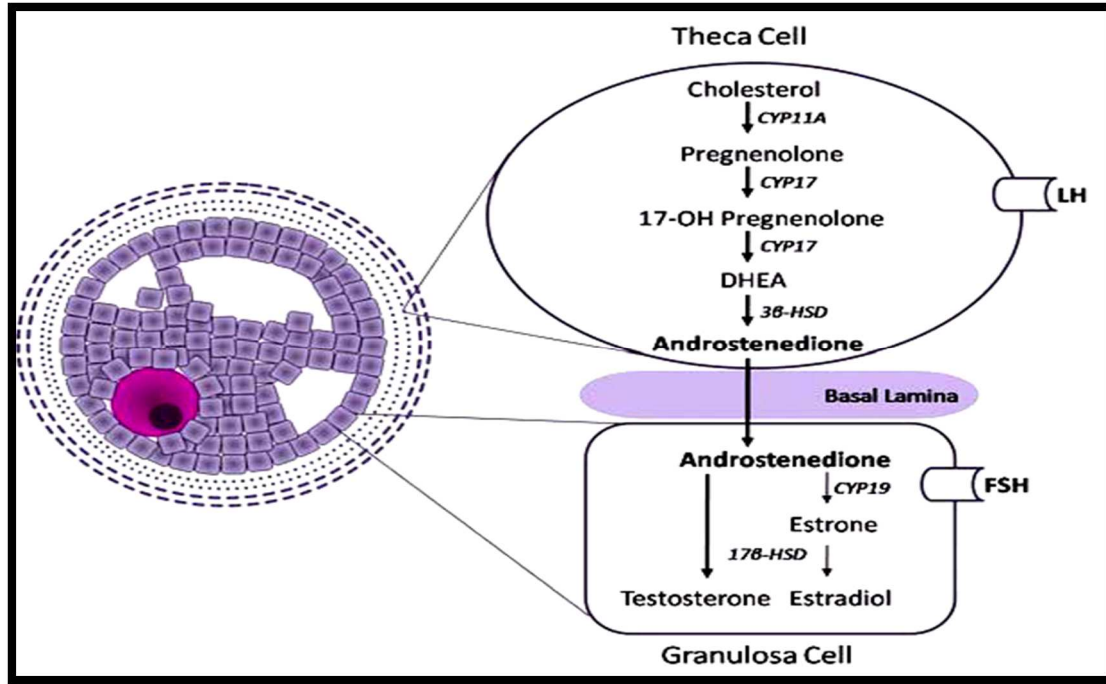
تفرز غدة ما تحت المهاد لإفراز الهرمون المحرر للقند (Gonadotropin – Releasing Hormone) GnRH ويكون إفرازه متفاوت طول الدورة الحيضية وكذلك يتفاوت الهرمون اللوتيني والهرمون المحفز للجريبات (FSH) من ناحية التكوين والإفراز ، أن الزيادة في إفراز الهرمون المحرر للقند (GnRH) التي تلاحظ في الطور الجريبي المتأخر يحفز تكوين الهرمون اللوتيني (LH) والذي يحفز الاباضة وإفراز الستيرويدات اللوتينية كالبروجستيرون (progesterone) والاستراديول (Estradiol) بنبضات بطيئة Pluses من GnRH يكون الإفراز التميزي للهرمون المحفز للجريبات والهرمون اللوتيني مضطرباً في التقدم الجريبي والاباضة اللاحقة وإفراز (الاستروجينات ، الأندروجينات ، البروجستيرون) (Marshall and Griffin ,1993). تكون حالة التوازن في الـ PCOS للمحور ما تحت المهاد – النخامية – المبيض (Hypothalamic – Pituitary Ovarian (HPO) مضطربة وينتج عن ذلك النمو والنضوج للجريبات بشكل غير طبيعي وقلة الاباضة أو انعدامها oligo-anovulation، وتعاني النساء المصابات من حالات غير طبيعية من الإفراز المنسلي والذي يتميز

بزيادة تردد نبض الهرمون اللوتيني ووفرة كلاً من الإفراز البطني والطبيعي للهرمون المحفز للجريبات والذي يؤدي بدوره إلى ارتفاع في نسبة الهرمون اللوتيني إلى الهرمون المحفز للجريبات (LH / FSH) (Taylor et al .,1997; Blank et al., 2006) .

## 2-6-2. اختلال تكوين الستيرويدات المبيضية

### Impaired ovarian Steroidogenesis

تعد المبايض المصدر الرئيس لزيادة الاندروجين الملاحظ في الـ PCOS ويتم إنتاج ستيرويدات المبيض عن طريق الخلايا الغمدية Theca cell الخلايا الحبيبية Granulose cells اللتان تعملان سوياً في الجريبات الثانوية Secondary Follicles والجريبات الناضجة Graffian Follicles، إذ يحفز الهرمون اللوتيني الخلايا الغمدية (Theca cells) لإنتاج الـ Androstenedione من الكوليستيرول ومن ثم يتم تحويل الاستروجينات في الخلايا الحبيبية عن طريق أنزيم الاروماتيز (Aromatase (CYP19 المعتمد على عمل الهرمون المحفز للجريبات (Hillier et al .,1994). يوجد عاملان رئيسيان يؤثران في الكمية الكلية للاندروجين المفرز عن طريق المبيض وهما العدد الكلي للخلايا الغمدية وسعة الستيرويدات فيها ، وكلا هذين العاملين يكون مضطرباً في النساء المصابات الـ PCOS ، ويلاحظ في تلك النسوة أن هنالك زيادة في الطبقة العضلية للخلايا الغمدية الداخلية Theca interna في الجريبات المبيضية الحاوية على أوعية دموية وخلايا فارزة للاستروجين ، ويؤدي ذلك إلى تكون عدد كبير من الخلايا المولدة للستيرويدات (Magoffin,2005) ، فضلاً عن ذلك تظهر مبايض تلك النسوة فعالية مفرطة في العديد من الأنزيمات الأساسية الخاصة بالتكوين الحيوي للاندروجينات (Wickenheisser et al .,2000; Nelson et al ., 2001) ويوضح شكل (2-4) آلية تخليق الستيرويدات المبيضية .



شكل (2-4) : آلية تخليق الستيرويدات المبيضية (Hillier et al., 1994).

### 3-6-2. أختلال إنتاج الاندروجين الكظري

#### Impaired adrenal production androgen

تعد منطقة القشرة الكظرية Adrenal Cortex الموقع الرئيسي الآخر لإنتاج الاندروجين في الإناث ، وتستخدم الغدة الكظرية المسار نفسه المولد للستيرويدات المبيض إلا انه يتم السيطرة عليه من قبل هرمون المحفز لقشرة الكظرية ACTH (Adrenocorticotrophic Hormone) المفرز من الجزء الامامي للغدة النخامية بدلاً من الهرمون اللوتيني في المبيض ، أن المستويات المرتفعة من الاندروجينات المفرزة من القشرة الكظرية مثل Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) والملاحظ في النساء المصابات بالـ PCOS جعلت ذلك من احد المقترحات المتسببة في حالة فرط الاندروجينات التي تعد من مظاهر الـ PCOS ، وأن الآلية التي يتم فيها فرط الاندروجينات الكظرية غير واضحة (Yildiz and Azziz , 2007)

تظهر الزيادة في اندروجينات القشرة الكظرية في النساء المصابات بالـ PCOS نتيجة للإفراز المفرط للكورتيزول (Cortisol) من منطقة الحزمة (Zona Fasciculata) للقشرة الكظرية ، كما اقترح بأن الزيادة في أيض الكورتيزول يؤدي إلى تقليل التغذية الراجعة السالبة Negative feedback



على الهرمون المحفز لقشرة الكظر (ACTH) وبذلك يقل إفرازه (Azziz et al., 1998; Tsilchorozidou et al., 2003).

#### 2-6-4. مقاومة الأنسولين مع فرط الأنسولين التعويضي

### Insulin resistance with compensatory hyperinsulinemia

يؤدي الأنسولين دوراً مباشراً وغير مباشراً في زيادة الاندروجين في النساء المصابات بالـ PCOS وعلى الرغم من أن النساء المصابات بالـ PCOS تعاني من مقاومة الأنسولين المحيطية إلا أن تكوين الستيرويدات المبيضية تظهر حساسية مفرطة للأنسولين (Baillargeon and Nestler, 2006). يعمل الأنسولين بشكل تآزري مع الهرمون اللوتيني في تعزيز إنتاج الاندروجين من الخلية الغمدية بوساطة مستقبلات الأنسولين (Nestler, 1997; Diamanti-Kandaraki et al., 2008)، فضلاً عن ذلك يمكن أن يحفز الأنسولين النمو التوسعي Proliferation للخلايا الغمدية البشرية (Duleba et al., 1998) وكذلك نمو المبيض وتكوين الكيس الجريبي في الجرذان (Poretsky et al., 1992).

يمكن أن يكون لحالة فرط الأنسولين تأثيرات عكسية في النساء الـ PCOS من خلال فعل الأنسولين على المواقع غير المبيضية التي تتضمن الكبد والغدة الكظرية والغدة النخامية (Adashi et al., 1981; Nestler et al., 1991)، كما يمتلك الأنسولين تأثيرات تثبيطية لإنتاج كلوبيولين الكبد المرتبط بالهرمون الجنسي (SHBG) وزيادة الاندروجينات (Nestler et al., 1991; Yki-Järvinen et al., 1995). وينتج انخفاض مقاومة الأنسولين مع العقاقير الحساسة للأنسولين مثل المتفورمين Metformine يسبب تحسناً معتدلاً في حالة فرط الاندروجينات، كما ينتج لاحقاً تحسناً في وظائف المبيض (Nestler, 2008).

#### 2-6-5. فعالية الجهاز العصبي الودي المتزايدة

### Increased Sympathetic Activity

يؤدي النشاط المعدل (المتناوب) في الجهاز العصبي الودي sympathetic nervous system دوراً خاصاً في وبائية الـ PCOS وترتبط العوامل المتضمنة فرط الاندروجينات Hyperandrogenism (Greiner et al., 2005)، مقاومة الأنسولين Insulin Resistance مع فرط الأنسولين التعويضي Compensatory Hyperinsulinemia، السمعة المركزية Central Obesity مع تزايد فعالية الجهاز العصبي الودي (Fagius, 2003; Grassi et al., 2004)، ويؤثر الإجهاد Stress على زيادة نشاط الجهاز الودي حيث يعمل الإجهاد على زيادة إفراز (CRH)

Corticotropin-Releasing Hormone والذي يزيد من تحرير (ACTH) Adrenocorticotrophic Hormone وكذلك يؤثر على القشرة الكظرية لافراز الاندروجينات، وأن الفرضية التي تتضمن دور الجهاز العصبي المركزي في وبائية او السبب المرضي للـ PCOS أصبحت أكثر قوة عندنا تبين أن النساء المصابات بالـ PCOS لديهن زيادة في إنتاج عامل النمو العصبي (NGF) Nerve Growth Factor في المبيض وفي الغدة الأدرينالية والذي يزيد من نشاط وفعالية الـ (Catecholamine neuron) الذي يزيد في فعالية الأعصاب الودية ، وقد اقترحت هذه النتائج بأن الإفراط في إنتاج عامل (NGF) المبيضي هو عامل مهم في مظهرية الـ PCOS (Dissen *et al.*, 2009).

## 2-6-6. العيوب الوراثية Genetic defects

من الممكن أن يكون التداخل ما بين العوامل الوراثية المتعددة والعوامل البيئية ضروري في تقدم الـ PCOS وقد بينت العديد من البحوث أن هنالك تأثيراً وراثياً في فسيولوجيا مرض الـ PCOS (Escobar-Morreale *et al.*, 2005) ، أنشأ الأساس العائلي للمتلازمة بواسطة دراسة عدد من العوائل التي تعاني من هكذا اضطراب مع انتشار متزايد في فرط الاندروجينات والاضطرابات الوراثية والمظهرية للـ PCOS في النساء القريبات من النساء المتأثرات بالمتلازمة وقد اقترح بأن العوامل المرتبطة مع الحالة المرضية يمكن أن تنتقل إلى الأبناء والبنات (Legro *et al.*, 1998a).

## 2-7. الاضطرابات الايضية في النساء المصابات بمتلازمة تكيس المبيض المتعدد

### Metabolic disturbances in PCOS women

غالباً ما تعاني النساء المصابات بالـ PCOS من الاضطرابات الايضية Metabolic Disturbances (Teede *et al.*, 2006) ، مع نقصان في إفراز الأنسولين أو نقصان في تأثيره وتُعد مقاومة الأنسولين مع فرط الأنسولين التعويضي الميزة الأساسية في الـ PCOS فضلاً عن المتلازمة الايضية (Essah and Nestler, 2006; Cussons *et al.*, 2008) ، تكون النساء المصابات عرضة للإصابة بالسكري من النوع الثاني عادة (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2008) ، كما يمكن عد حالة فرط الاندروجينات مكون إمراضي للمتلازمة الايضية الأنثوية ، وتعاني نساء الـ PCOS من انتشار متزايد للعوامل الخطيرة المتعددة التي تزيد من خطر الإصابة بالأمراض القلبية

الوعائية (CVD) مثل ارتفاع ضغط الدم و السمنة ومرض السكري النوع الثاني والاختلال الوظيفي للدهون (Kandaraki et al., 2009) Dyslipidemia.

## 2-7-1. مقاومة الأنسولين (IR) Insulin Resistance

تعرف حالة استتباب الكلوكوز (glucose homeostasis) الطبيعي بأنها حالة التوازن الدقيق ما بين تأثير الأنسولين في الأنسجة الهدف وإفراز الأنسولين من قبل خلايا بيتا البنكرياسية. وعادةً ما تتعرض العضلات الهيكلية والكبد والنسيج الشحمي للأنسولين ، إذ يقدر تأثير الأنسولين في العضلات الهيكلية بحوالي 85% من كمية الأنسولين الكلية التي تتناسب مع كمية الكلوكوز المأخوذ (DeFronzo et al., 1981). وتعد العضلة الهيكلية الهدف المهم لحالة استتباب الكلوكوز أما النسيج الشحمي فيكون دوره مركزي لتحديد حساسية الأنسولين للجسم الكامل (Minokoshi et al., 2003).

تصل نسبة إصابة نساء الـ PCOS بحالة مقاومة الأنسولين أعلى من 70% (Hughes et al., 2006) ويمكن تعريف حالة مقاومة الأنسولين بأنها الاستجابة الحيوية الضعيفة للأنسولين مع حالة فرط الأنسولين التعويضي ، مما يجعل المريضات عرضة للإصابة بتحمل الكلوكوز الضعيف والسكري من النوع الثاني ، وقد بينت الدراسات بأن 30-40% من النساء المصابات بالـ PCOS تكون ذو تحمل كلوكوز ضعيف وتتطور لدى 10% منهم حالة السكري النوع الثاني عند عمر 40 سنة (Franka et al., 1998; Vendola et al., 2000)، وتعزى مثل هكذا حالة إلى العيوب في إفراز الأنسولين وانخفاض تصفية الأنسولين الكبدي في الدم (Ciampelli et al., 1997).

تعتبر مقاومة الأنسولين المفتاح للعديد من الخصائص المرضية الفسيولوجية للـ PCOS مسببة الكثير من الاختلالات في عمليتي التكاثر والايض ، يعمل الأنسولين على تحفيز إنتاج الاندروجين في المبايض وتقليل تكوين (SHBG) الكبدي بوساطة الزيادة في الاندروجينات الحرة والكلية والمتغيرة حيوياً (Poretsky et al., 1999).

## 2-7-2. السمنة Obesity

النساء المصابات بمتلازمة تكيس المبايض المتعدد تكون أكثر عرضة لتطور حالة البدانة (السمنة) من غيرهن من النساء في العالم ، وأن انتشار الوزن الزائد والبدانة في نساء PCOS يختلف ما بين البلدان والمجاميع العرقية إذ يتراوح ما بين (60-80%) (Azziz et al., 2004). تظهر النساء البدنيات المصابات بالـ PCOS انخفاضاً في مستويات (SHBG) وارتفاعاً في مستويات الاندروجين الحر

مقارنة مع نظرائهن ذوات الوزن الطبيعي (Holte et al., 1994) ، وقد وجد أن توزيع الدهون في الجسم يؤثر في تركيز (SHBG) والاندروجين (Tchernof and Despres, 2000)

تؤثر السمنة بشكل سلبي في الوظيفة التكاثرية بشكل مستقل في نساء ال-PCOS (Rich-Edwards et al., 2002)، كما أن النساء البدنيات والمصابات بالمتلازمة تكون ذات قابلية حمل أكثر صعوبة واستجابة أقل للعقاقير المستحضرة للإباضة (Hirschberg, 2009) ،ويمكن أن تلعب السمنة والعوامل المرتبطة بالنسيج الشحمي دوراً بالغ الأهمية في تحفيز وإدامة ال-PCOS ، فضلاً عن ذلك يؤدي توزيع الدهون غير الطبيعي إلى الاختلالات الايضية بالاضافة إلى تأثيرها على عمل بعض الغدد الصم (Pasquali et al., 2006).

تلعب الحركات الشحمية Adipokine مثل Adiponectin التي تفرز حصراً من النسيج الشحمي في زيادة مقاومة الأنسولين وبقية الاضطرابات الأخرى ، وبعض الحركات تفرز بشكل غير طبيعي من النسيج الشحمي ويمكن أن تؤثر في وظيفة الغدة الأدرينالية والمبيض ، وقد وجد أن النسيج يحرر العديد من الحركات في نساء ال-PCOS بشكل قلق لكن يمكن أن تكون هذه التغيرات منعكسة على درجة البدانة او مقاومة الأنسولين بدلاً من عكسها على ال-PCOS بحد ذاته (Mitchel et al. 2005)

عادةً السمنة ترتبط بمقاومة الانسولين وتوزيع الدهون في الجسم يعتبر مؤشر نوعي Specific Marker لعدم انتظام الايض ومن اختلالات الايض المرتبطة بمقاومة الانسولين هي ارتفاع الكلوكون البلازما ، ومشاكل في تنظيم الدهون (ارتفاع Triglycerides وزيادة Low-density lipoprotein وقلّة High-density lipoprotein) ، وكذلك ارتفاع ضغط الدم والتأثير على حالة ما قبل التخثر Prothrombic والسمنة ، وهذه المشاكل والاختلالات في الايض تحفز من حدوث الداء السكري النوع الثاني تصلب الشرايين وأمراض القلب (Rojas et al . 2014).

## 8-2. الاضطرابات الهرمونية المسببة لمتلازمة تكيس المبيض المتعدد

### Hormonal Disturbances Of PCOS

لا يستجيب المبيض في النساء المصابات بالمتلازمة لهرمونات الغدة النخامية بشكل مناسب كما في المبايض الطبيعية ، فكل من هرموني LH و FSH يؤثران في المبيض وهرمونات بصورة مباشرة، إذ أن FSH هو الهرمون الرئيس في مرحلة الطور الجريبي Follicular phase من الدورة الحيضية Menstrual cycle حيث يعمل على تحفيز تكوين ونضج البويضات وبالتالي إفراز هرمون

الاستروجين من البيضة الناضجة Graffian Follicle (Vale et al., 2004) بينما يكون LH الهرمون الرئيسي في مرحلة الطور اللوتيني Luteal phase الذي يحفز الاباضة Ovulation ومن ثم تكوين هرمون الاستروجين والبروجستيرون Progesterone في مرحلة الجسم الأصفر Corpusluteal Phase بعد الاباضة وان إي خلل في مستويات هرموني FSH و LH ينعكس على مستوى هرموني البروجيستيرون والاسروجين وكذلك على إنتاج الهرمون الذكري وبالتالي يسبب اضطرابات في الوظيفة التكاثرية للمبيض كاختلال الدورة الحوضية وتأخير الإنجاب أو العقم وتسمى الاختلالات التكاثرية (Reproductive Disorders) (Conway, 2000). أشارت البحوث إلى أن اضطراب الدورة الحوضية في عمر المراهقة (من 16 سنة فما فوق) يؤدي إلى زيادة خطر الإصابة بالـ PCOS لا سيما في الفتيات البدينات أو عند حصول زيادة في مستوى هرمون LH غير الطبيعية والذي يسبب عدم الاباضة إذ تكون المتلازمة في قمة حصولها بين الأعمار (18-30 سنة) (Lo et al., 2006). أن الإصابة بالـ PCOS في الأعمار المبكرة وعدم حصول الاباضة لفترة طويلة يؤدي إلى تأخير الإنجاب وان حصل حمل فانه يتعرض إلى إجهاض تلقائي أو يرافقه الإصابة بمرض سكري الحمل (Marilym and Richardson, Gestational diabetes 2003).

أن فرط الأندروجين Hyperandrogenism يعد من أكثر المميزات الكيموحيوية انتشاراً لدى النساء المصابات بتكيس المبيض المتعدد الـ PCOS ، توجد في حوالي (70-80) من نساء الـ PCOS وترتبط مع التركيز العالي لمستوى الهرمون الذكري الحر Free-Testosterone (Nisenblat and Norman, 2009) ، وتظهر حالة فرط الاندروجين بشكل الشعرانية Hirsutism و حب الشباب Acne وكذلك الصلع الذكوري male pattern Alopecia ، تؤثر فرط الاندروجين على حداً سواء على كل من عملية الأكسدة Oxidant ومضادات الأكسدة Antioxidant في نساء الـ PCOS (Gonzalez et al., 2005).

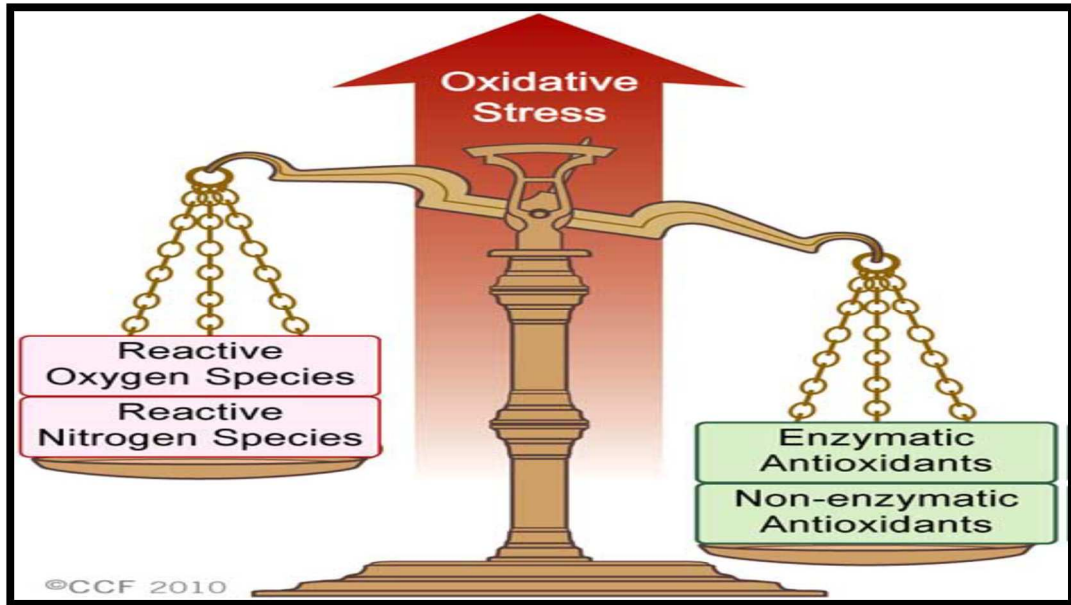
يقصد بالشعرانية نمو الشعر على الوجه وأسفل البطن والذقن والشفة العليا وأعلى وأسفل الظهر وتمثل حالة تحول الشعر الزغب Villus إلى الشعر الطرفي terminal ويكون التوزيع بنمط ذكري نتيجة ارتفاع مستوى الأندروجينات عند المصابة بالمتلازمة (Balén and Jacobs, 1997). تصيب الشعرانية (60-90%) من النساء المصابات بمتلازمة تكيس المبيض المتعدد (Chang et al., 2005). أن التوزيع وكثافة الشعر يختلف حسب العرق البشري ، فمثلاً القوقاز أكثر كثافة وانتشار للشعر الذكري من الأمريكان والهنود ، وظهر أن التأثير الوراثي يكون أكبر من التأثير الهرموني في نمو الشعر ، كما أن زيادة إنتاج الاندروجين يؤدي إلى الشعرانية وحب الشباب Acne الذي يظهر بحوالي (35%) من

الـ PCOS (Balen *et al.*, 1995)، وترتبط صفة حب الشباب بصورة رئيسة مع المستويات العالية من الإفراز الدهني Sebaceous secretion (Slayden *et al.*, 2001). معظم نساء الـ PCOS في مختلف الأعراق يظهر لديهن ظاهرة الصلع الذكوري الاندروجيني Androgenic alopecia (Cela *et al.*, 2003). وأما الشواك الأسود Acanthosis Nigricans ، الذي تصيب حوالي 3% من نساء الـ PCOS ، يظهر فيها الجلد أسوداً أو مخملياً مع فرط التصبغ Hyperpigmentation ويظهر التورم الحليمي Papillomatosis في الإبطين axillae ومؤخرة العنق nape of neck وثنيات الجلد skin flexures وترتبط مع مقاومة الأنسولين وفرط الأنسولين (Schwartz, 1994).

## 9-2. الإجهاد التأكسدي ومتلازمة تكيس المبايض المتعدد

### Oxidative Stress (OS) and PCOS

تؤدي المقاومة الأنسولين وفرط الأنسولين والإجهاد التأكسدي Oxidative Stress (OS) دوراً مهماً في حدوث أمراض متلازمة الـ PCOS (Lee *et al.*, 2009). ويسهم الإجهاد التأكسدي كما هو معروف في حدوث أمراض القلب الوعائية (CVD) في النساء المصابة بالـ PCOS (Sabuncu *et al.*, 2001). وتحدث حالة (OS) عادةً نتيجة عدم التوازن بين العوامل المؤكسدة Oxidant agents وعوامل المضادة الأكسدة anti Oxidant agents (Lee *et al.*, 2010)، شكل (5-2).



شكل (5-2) الإجهاد التأكسدي الناتج من عملية فقدان التوازن ما بين العوامل المؤكسدة

ومضادات الأكسدة (Lee *et al.*, 2010)

تُعد Nitrogene Oxide Speices (NOS) من أهم عوامل الأكسدة وهي جذور حرة مع مراكز نيتروجينية تشمل Nitric Oxide (NO) و Nitrogen Dioxide (NO<sub>2</sub>) ، ويتكون NO خلال عملية تحول L-arginine إلى Citruline بوجود أنزيم (arginosuccinate synthetase and lyase) (Agarwal *et al.*, 2008) ، وتحت الظروف الفسيولوجية الطبيعية يعمل NO في مختلف الأنسجة بتنظيم الوظائف الخلوية للخلية إما في حالة زيادته يؤدي إلى السمية الخلوية ، وكذلك تلف كل الكربوهيدرات والبروتينات والدهون والأحماض النووية (Agarwal *et al.*, 2005).

وترتبط N بأمراض الربو Asthma و تصلب الشرايين Arthrosclerosis (Naziroglu,2009) . وأشار Verit و Ereli (2008) إلى علاقة (NO) بمقاومة الأنسولين IR في النساء المصابات بال-PCOS. أما Reactive oxygen species (ROS) فهي أحد أشكال الجذور الحرة الرئيسية المكتونة والحاوية على الأوكسجين المركزي وهي مركبات غير مستقرة وسريعة تتفاعل مع الجزيئات الأخرى لتكوين مركبات حاوية على أزواج من الإلكترونات في أغلفتها الأبعد (Agarwal *et al.*, 2008). يتم استهلاك حوالي 98% من الأوكسجين المستنشق من خلال عملية تحلل الدهون Lipolysis وتوليد الطاقة الكيميائية الضرورية ، و2% تختزل إلى ثلاث أشكال رئيسية من مصادر ROS وتشمل (O<sub>2</sub>-,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH) (Cadenas and Davies,2000). عندما لا تكون هناك كميات كافية من مضادات الأكسدة Antioxidants تتولد (ROS) وتسبب تلف الخلية وعملية استبدال البيورينات Purines إلى Pyarmidines مما يؤدي إلى عملية كسر السلسلة الـ Break of strand DNA وتلفه (Inoue *et al.*, 2003) . يعد عامل الأكسدة Protein carbonyl من العوامل المؤكسدة القوية التي ترتبط مع متلازمة الـ PCOS ، فقد لوحظ في دراسة Fenkci وجماعته (2007) ان النساء المصابات بال-PCOS تكون عندهن زيادة عالية في أكسدة البروتينات ومستوى الـ Protein carbonyl مما يوثق علاقة مقاومة الأنسولين مع الـ Protein carbonyl في نساء الـ PCOS.

## 10-2 . دور العوامل المضادة للأكسدة في متلازمة تكيس المبايض المتعدد

### Role of antioxidants factors in PCOS

تقوم العوامل المضادة للأكسدة في نساء الـ PCOS على منع أو تقليل التأثيرات الضارة الحاصلة نتيجة الزيادة في العوامل المؤكسدة في الجسم إذ تلعب دوراً هاماً للجهاز التكاثري وتقليل انعدام الخصوبة infertility (Agarwal *et al.*, 2008). وتعمل هذه العوامل بنظامين مختلفين هما :-

1 - مضادات الأكسدة الأنزيمية Enzymatic antioxidants وتشمل:

superoxide dismutase (SOD) , glutathione peroxidas (GPX) , catalase.

2- مضادات الأكسدة اللانزيمية Non Enzymatic antioxidants وتشمل:

Glutathione (GSH) , (α-tocopherol ) Vitamin E , ascorbate , L-carnitine, coenzyme Q10 , β-carotene

لوحظ تغيرات في تركيز بعض مركبات مضادات الاكسدة في المصل والسوائل المحيطة في النساء المصابات الـ PCOS التي تعد كمؤشرات لتعديل أو إزالة العوامل الإجهاد التأكسدي والاضطرابات الايضية و السمنة والسكري النوع الثاني وأمراض القلب (Jozwik *et al.*, 1999). وتوصل مجموعة باحثين إلى أن الإجهاد التأكسدي يستحث الموت الخلوي المبرمج (Apoptosis) إذ إن العديد من المواد التي تستحث الموت الخلوي المبرمج هي أما مواد مؤكسدة أو محفزات للايض التأكسدي وبالمقابل فأن الكثير من مثبطات الموت المبرمج هي مواد لها فعالية مضادة للأكسدة أو تعزز دفاعات الخلية المضادة للأكسدة (Ghandra *et al.*, 2002).

## 11-2. علاج متلازمة تكيس المبيض المتعدد Treatment of PCOS

استخدمت عقاقير الخصوبة بشكل واسع منذ بداية الستينات ، ومن أهمها عقار المتفورمين Metformin وأن هذا العلاج آمن وفعال وله فوائد علاجية فريدة لا تتوفر في غيره (David *et al.*, 2001). ويعمل المتفورمين على حث عملية الاباضة وتكوين البيض (Fleming *et al.*, 2002) ، إذ أظهرت الدراسات بفعاليتها من خلال انخفاض تكوين الكلوكوز في الكبد مع انخفاض معدل امتصاص الكاربوهيدرات في الأمعاء ، إذ انه يخفض من مستوى الكلوكوز في الدم وذلك بزيادة حساسية الأنسولين دون زيادة تركيز الأنسولين (Brown *et al.* , 2006) . وكذلك يؤدي إلى تحسن الدورة الحيضية وانتظامها عند الكثير من النساء المصابات بمتلازمة بالـ PCOS وكذلك يعمل على تقليل نسبة الإجهاد للنساء المصابات بالـ PCOS وهو علاج مثالي للنساء اللواتي يرغبن بالحمل والولادة، وعندما يقترن مع ممارسة الرياضة مع نظام غذائي صحي في نحو ستة أشهر ، إذ يعمل على تحسين حوالي 85% من المرضى من خلال عمله على تحسن وانتظام الدورة الحيضية وعملية الاباضة (Velazquez *et al.*, 1994) . أما عقار سترات الكلوميفين Citrate Clomiphene أو الكلوميدي Clomide فيساعد على حث عملية تكوين البويض ونمو الجريبات ومضاعفة عددها (David *et al.*, 2001) . ويقوم الـ Clomide وهو من مضادات الأستروجين Antioestrogenic بتنشيط عملية الاباضة من خلال ارتباطه مع مستقبلات الأستروجين oestrogen receptor في محور تحت المهاد – النخامية وبذلك يمنع تفاعلات الأستروجين ويوقف عملية التغذية الراجعة السالبة



Negative feed back لهذا الهرمون وبذلك يزيد من إنتاج هرمون LH, FSH (Kettel *et al.*, 1993).

وتعد مجموعة Thiazolidinediones التي تشمل (pioglitazone, troglitazone, rosiglitazone) وتعمل على زيادة التحسس للأنسولين وتحسين فرط الأنسولين antihyperglycemic في النساء المصابات بالـ PCOS واللواتي لديهن مرض السكري النوع الثاني حيث تعمل على تقليل مستوى تركيز الأنسولين المنتشر والكلستيريدات الثلاثية والأحماض الدهنية غير المؤسرة nonesterified fatty acids بالإضافة إلى تنشيط عملية التبويض ويؤثر على عملية تصنيع الستيرويدات Steroidogenesis (Bhatia, 2005).

ويعد نظام التغذية والتمارين الرياضية الخط الأول لعلاج النساء المصابات بالمتلازمة ذوات الأوزان فوق الطبيعي overweight ، فقد لوحظ أن نقصان الوزن عن طريق النظام الغذائي والتمارين الرياضية يُحسن من الحساسية للأنسولين ومعدل التبويض ، ويزيد من معدلات الحمل ، ويقلل من حالات الإجهاض ويزيد الـ (SHBP) لتقليل مستوى الاندروجين الحر (Moran *et al.*, 2003).

## 2-12. الدراسة الجزيئية لمتلازمة تكيس المبايض المتعدد

### Molecular Study of PCOS

تعد متلازمة تكيس المبايض المتعدد من أكثر الأمراض شيوعاً و تبايناً (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2006). إذ أشارت الدراسات إلى انتشار المتلازمة في مختلف المجتمعات العرقية والتوائم (Rjeffey, 2000)، إذ تعد حالياً PCOS صفة وراثية متعددة الجين تنتج عن تفاعل تغيرات للجينات المحمية والمتحسسة والعوامل البيئية خلال حياة ما قبل وما بعد الولادة وأن أسس الآليات الوراثية لهذه المتلازمة بقي مجهولاً بشكل واسع ، فضلاً عن الجوانب المبهمة في النواحي الجزيئية والفسبولوجية (Escobar-Morreale *et al.*, 2005).

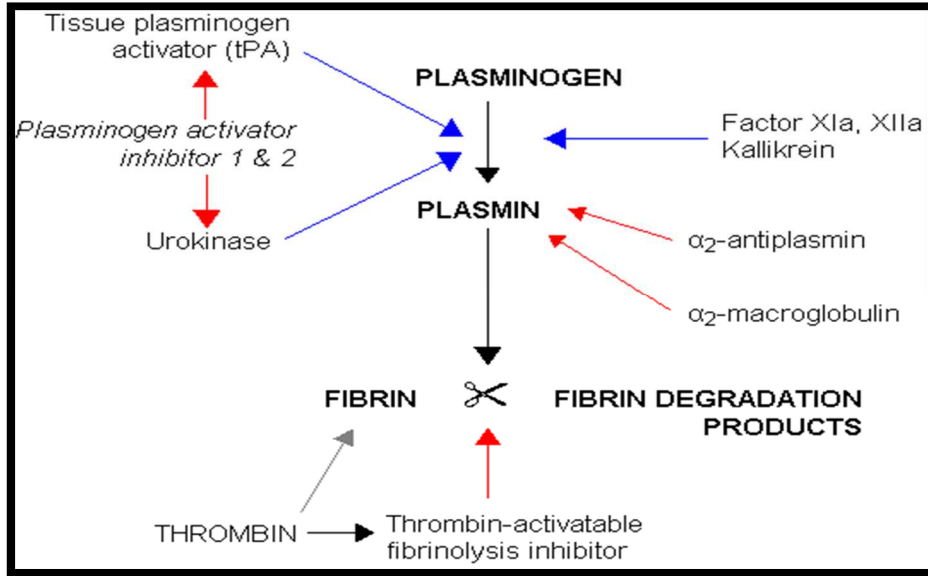
تؤدي التغيرات الجزيئية للجينات المرشحة لحدوث المتلازمة دوراً كبيراً وفعالاً ، فقد لوحظ العديد من الجينات التي تساهم في حدوثها، إذ يوجد حوالي 100 جين مرشح لحدوث المتلازمة (Goodarzi, 2008)، منها الجينات التي تشترك في بناء وعمل ايض الستيرويدات وكذلك الجينات التي تشترك بعملية ايض الكربوهيدرات وإفراز وعمل الأنسولين وغيرها ، وفي ما يأتي أهم الجينات المرشحة لحدوث الـ PCOS (Prapas *et al.*, 2009).

- 1- الجينات التي تشترك في بناء وإفراز الستيرويدات Steroidogenesis وتشمل :  
(*Androgen receptor (AR) , CYP17 CYP21, CYP19 , CYP11a*)
- 2- الجينات التي تشترك في عمل وتنظيم Gonadotrophin وتشمل :  
جين (*v-LH , follistatin , Dopamine receptor*).
- 3- الجينات التي تشترك في استتباب الطاقة energy homeostasis وتشمل  
*Leptin receptor gene and others* .
- 4- الجينات التي تشترك في عمل الأنسولين وتشمل :  
*Insulin –like growth factors (ILGF) , insulin receptor gene(IRG) ,  
Calpain 10 (CAP10-INS-VNTR and others )*
- 5- الجينات التي تشترك في الالتهابات المزمنة وتشمل :  
*(TNF-a , PAI-1 , IL-6 , TPA and others )*

## 1-12-2. جين (*TPA*) Tissue – type plasminogen activator gene

يعد جين *TPA* او ما يسمى (*PLAT*) من الجينات المرشحة التي ترتبط مع امراضية متلازمة تكيس المبيض المتعدد التي تشارك في الالتهابات المزمنة ويرتبط مع أمراض القلب المختلفة (McCormack *et al.*, 1996) . يقع جين *TPA* على كروموسوم رقم 8 (p11.2- p12) داخل انترون 8 بين كل من اكسون 8 و 9 (Ridker *et al.*, 1997). وجد Steeds (1998) أن التعدد المظهري لجين *TPA* (Alu-repeat I/D polymorphism of *TPA* gene) يرتبط مع أمراض احتشاء القلب Myocardial Infarction وأمراض القلب الوعائية، ويعد جزء من الجهاز محلل الفايبرين fibrinolytic system (المضاد للخرثرة) إذ يعمل *TPA* على إنتاج الشكل الفعال البلازمين plasmin من الشكل الغير فعال البلازمينوجين plasminogen, ومن ثم شطر الفايبرين fibrin (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2001) .

النساء المصابات بـ PCOS تمتلك جهاز تخثر الدم عالي النشاط Blood Coagulation System وتتكون الخثرة عادةً Thrombus كنتيجة لعدم التوازن مابين عوامل ما قبل الخثرة prethrombotic factors والعوامل المضادة للخرثرة Anti –thrombotic factors التي تعمل على توازن الخثرة وكذلك نتيجة لمقاومة الأنسولين ينتج اختلال في عملية Hemostatic ويزداد تكوين الخثرة Thrombosis وزيادة في الفايبرينوجين وزيادة قابلية تجمع الصفائح الدموية (Karadeniz *et al.*, 2007a).



شكل (6-2) : دور عامل Tissue plasminogen activator (TPA) في عملية تكوين الخثرة (www.en.wikipedia) clot or thrombus

## 2-12-2 . جين أنزيم المحول للانجيوتنشين Angiotensin converting enzyme (ACE) gene

يعد أنزيم Angiotensin converting enzyme (ACE) أحد مكونات جهاز الرنين (RAS) rennin angiotensin system (Yang *et al.*, 2006)، يعرف بتسميات عدة" منها Kininase peptidyl dipeptidase (Karabulut *et al.*, 2010)، يؤثر نظام RAS على العديد من العمليات منها نضج الخلايا البيضية (Oocyte Maturation) والتبويض وتصنيع الستيرويدات (Steroidogenesis)، فضلاً عن تكوين الجسم الأصفر Corpus luteum من خلال سلسلة تفاعلات معقدة مع أنظمة الجسم المختلفة (Sun *et al.*, 2009; Bayram *et al.*, 2011) ويشفر هذا الانزيم من قبل جين ACE ويمكن التعبير عنه في أنسجة متعددة بما في ذلك المبيضين (Van Sande *et al.*, 1985) ويلعب أنزيم ACE دوراً مهماً في تنظيم ضغط الدم Blood Pessure وكذلك يرتبط مع نواتجه بعملية تصنيع الأوعية الدموية Angiogenesis لبطانة المبيض ovarian endothelium (Plendl *et al.*, 1996) من خلال عملية تحويل angiotensin I إلى angiotensin II وتنشيط فعالية براديكينين bradykinin واستئناف عملية الانقسام الاختزالي (Giometti *et al.*, Meiosis 2005; Stefanello *et al.*, 2006) وتصنيع الستيرويدات (Unsal *et al.*, 2009).

يقع جين ACE على الكروموسوم (17 q 23.3) (Rai et al., 2008) ، ولاحظ (Rigat et al. , 1990 ; Turgut et al., 2011) أن هنالك تغير بين الأفراد المختلفة في تركيز أنزيم ACE البلازمي الذي يعود بطبيعته إلى التعدد المظهري لجين ACE التي تشمل الإدخال Insertion (I) والحذف Deletion (D) في المنطقة الغير المشفرة للتتابع القاعدي (287-bp DNA) التي تقع في انترون رقم 16 من جين ACE ويدعى (ACE I / D polymorphism) الذي يعطي مؤشر لدراسة الارتباط بين ACE gene و الفسيولوجيا الامراضية للأمراض المختلفة ذات العلاقة ، فقد وُجد ارتباط الاليل D لجين ACE مع حدة مرض التليف الكيسي (Marson Cystic Fibrosis(CF) (et al., 2012) ، في حين لم تثبت وجود علاقة بين الاليل D وسرطان Nasopharyngeal carcinoma (Li et al. , 2011).

أثبتت الدراسات التجريبية أن الأليل D مرتبط مع المستويات العالية من أنزيم ACE) البلازمي (Nakai et al., 1994; Winkelmann et al., 1996) التي قد تؤدي إلى المستويات العالية من Ang-II والتي تلعب دوراً كبيراً في اضطراب تصنيع الهرمونات الستيرويدية ، كما يلعب انزيم ACE دوراً هاماً في تنظيم ضغط الدم ، وبما له من دور محتمل في تقدم أمراض القلب الوعائية في النساء المصابات بال-PCOS (Ferreira et al., 2007) ، في حين توصلت دراسة الباحث Yoshimura (1997) إلى وجود مستقبلات Ang-II على الخلايا الستيرويدية التي تصنع الهرمونات الستيرويدية في نساء ال-PCOS.

### 3-12-2 جين الساييتوكروم (CYP17 P- 450 C 17α)

يعد جين (CYP17) Cytochrome p -450 c 17 α من الجينات الرئيسية التي تساهم في حدوث متلازمة ال-PCOS والتي تلعب دوراً في عملية ايض الستيروجينات ومستقبلات عامل النمو Growth Factor Receptor(GFR) والهرمونات الستيرويدية والاندروجينات (Dunning et al., 1999). يقع جين (CYP17) على الموقع الكروموسومي (10 q 24.3) ويحوي على 8 اكسونات ويشفر لإنزيم 17 p-450 الذي يعمل في المراحل الرئيسية من البناء الحيوي للهرمون الستيرويدي للغدة الكظرية Adrenal gland والمبيض (Cary et al. , 1994) ، يتوسط p -450 c 17 α كل من انزيم (17α hydroxylase) الذي يقوم بتحويل pregnenolone إلى dehydroepianandrosteron وانزيم (17, 20 Lyase) الذي يكون androstenedione من Progesterone وهذه الاندروجينات يمكن أن تتحول إلى estrone و estradiol و Testosterone (Napoli and Armamento-Villareal ,2007).

توجد ثلاثة أشكال اليلية لجين CYP17 وهذا التعدد المظهري يعود إلى تغير أو استبدال زوج قاعدي (T---34C) في منطقة (5- UTR untranslated region) -5 ضمن منطقة المحفز promoter (Feigelson *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1999) ، عملية الاستبدال هذه في جين CYP17 تساهم في تنشيط استنساخ عالي للاليل المتغاير أو الطافر (Variant or Mutant allele) (CC) or A2A2) مقارنة مع الاليل (TT or A1A1) (Homozygot A1) Common Allele أو (CC or TT) (Heterozygote). التعدد المظهري في جين CYP17 يقدم موقع القطع بالإنزيم MspA1 ليعطي اثنين من الاليلات فالاليل A2 يحتوي على هذا الموقع ، في حين الاليل A1 لا يحتوي أي موقع للقطع بالإنزيم MspA1 (Carey *et al.* , 1994) .

تلعب الاستروجينات والاندروجينات دوراً هاماً في حدوث أمراض سرطان الثدي Breast cancer وسرطان بطانة الرحم (Esteller *et al.*, 1997; Goodman *et al.* endometrial cancer (CC or A2A2) في النساء (al., 2001; Hong *et al.*, 2004). فقد لوحظ زيادة تكرار الاليل (CC or A2A2) في النساء المصابات بسرطان الثدي في الهند بعد انقطاع الطمث (Chakraborty *et al.*, postmenopausal (2007) .

الباحث Sata وجماعته (Sata *et al.*, 2003) وجدوا علاقة تربط ما بين تكرار الاليل A2A2 لجين CYP17 مع إسقاط الحمل المتكرر (Recurrent Pregnancy Loss (RPL)، فقد لوحظ ارتفاع تكرار الاليل A2 عند النساء التي تعاني من (RPL) مقارنة مع بقية أنواع التعدد المظهري لجين CYP17 (A1A1, A1A2) .

#### 4-12-2. جين مستقبل البروجستيرون (PGR) progesterone receptor gene

تزداد مخاطر الإصابة بأمراض السرطانات النسائية عادةً Gynecological Neoplasias في النساء المصابات بتكيس المبيض المتعدد التي تشمل كل من سرطان بطانة الرحم Endometrial Cancer وسرطان الثدي Breast Cancer وسرطان المبيض Ovarian cancer ، إذ يكون الدور التنظيمي لهرمون البروجستيرون ضعيفاً في نسيج بطانة الرحم في النساء المصابات بالـPCOS (Spritzer *et al.*, 2005).

جين مستقبل البروجستيرون البشري (hPR) Human Progesterone receptor gene من الجينات المرشحة لحدوث متلازمة تكيس المبيض المتعدد وهو جين أحادي النسخة يقع على كروموسوم رقم 11 (11q22-q23) (Rousseau Merck *et al.*, 1987) ، يقوم بوظائفه عادةً

من خلال وجوده بشكله isoforms هما (PGR -A , PGR -B) التي يتم التعبير عنها من جين أحادي النسخة نتيجة النسخ لاثنين من المحفزات المختلفة Promoters. يقوم PGR -A بتنشيط فعالية estrogen receptor gene (ER gene) بينما يقوم PGR -B بتنشيط عمل الجين Punyadeera (Punyadeera et al., 2003 ; Shimada et al., 2004) يعمل جين مستقبل البروجستيرون كمحفز على انقسام نسيج الثدي (Mitogen) ويرتبط مع مخاطر الإصابة بسرطان الثدي (Greendale et al., 1999).

اتضح في دراسة أجراها Lancaste وجماعته (1998) ارتباط التعدد المظهري لجين مستقبل البروجستيرون PGR مع سرطاني الثدي والمبيض في الولايات المتحدة ، إذ يزداد الاليل (T2T2 homozygous) و (T1T2.heterozygous) في حين لا يوجد هذا الارتباط في كل من استراليا وأوربا ، في حين وجد Wang-Gohrke وجماعته (2000) انخفاض مخاطر الإصابة بسرطان الثدي للنساء اللواتي يحملن الشكل الاليلي T2T2 قبل انقطاع الحيض Premenopausal ولا توجد تلك العلاقة في النساء اللواتي تفوق أعمارهن الخمسون سنة أي بعد انقطاع الطمث لديهن post menopausal . وجد كذلك النساء اللواتي يتعرضن لفقدان الحمل المتكرر (RPL) أن الاليل T2 لا يرتبط مع مخاطر (RPL) بالرغم من قلة البروجستيرون الذي يلعب الدور الكبير في مرحلة تكون الجسم الأصفر من الدورة الحيضية وبداية الحمل من خلال نضوج البويضة Oocyst وغرس الجنين والمحافظة على المشيمة في بداية الحمل gestation (Aruna et al., 2010) . كذلك وجد Taylor وجماعته (2010) أن التغيرات الـ SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) في مستقبل البروجستيرون يؤثر على سن الحيض وطول الفترة الحيضية مما يدعم الرأي حول أن جين مستقبل البروجستيرون من الجينات المساهمة والمرشحة التي تلعب الدور الكبير والمؤثر في الوظيفة الحيضية menstrual function وفترة الحيض Age at Menarach . أما O'Mara وجماعته (2011) وجد أن التغيرات الحاصلة في جين PGR ترتبط معنوياً مع زيادة مخاطر الإصابة بسرطان بطانة الرحم Endometrial cancer ، إذ لاحظ أن الاليل T2 للتغيرات rs11224561 SNP مرتبط مع زيادة الإصابة بسرطان بطانة الرحم.

## 5.12-2. جين ( Aromatase ) CYP19 ( Cytochrome p-450 c19 )

يُعد ارتفاع مستوى إفراز الاندروجين المبيضي مفتاح فسيولوجيا امراضية متلازمة الـ (PCOS) (Diamanti-Kandarakis and Piperi,2005). هنالك العديد من الجينات التي تشفر الإنزيمات الرئيسية التي تشترك في البناء الحيوي للاندروجينات Androgens



## 2-13. الدراسة الوراثية لمتلازمة تكيس المبايض المتعدد Genetic study of PCOS

متلازمة تكيس المبايض المتعدد (PCOS) هي اضطراب وراثي الأصل متباين Heterogeneous يعكس الأسباب المحتملة المتعددة والخصائص الطبية السريرية المتغيرة التي يمكن أن تنتقل كصفة مندلية Mendelian autosomal dominate (Rojanasakul *et al.*, 1985). لم تفهم الاسباب الحقيقية لحدوث المرض لحد الآن وذلك للتداخل الكبير ما بين العوامل الوراثية والبيئية المسببة لها (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2006).

كانت نتائج الدراسات الكروموسومية لمرضى المتلازمة متناقضة ، بالرغم من شيوع حالات الـ aneuploidies و polyploidies في كروموسوم X (Rojanasakul *et al.*, 1985)، وظاهرة الحذف deletion للذراع الطويل لكروموسوم رقم 11 بشكل واسع (Meyer *et al.*, 2000) ، فضلاً عن أنواع أخرى من التغيرات الوراثية الخلوية Cytogenetic Abnormalities (Rojanasakul *et al.*, 1985). أشار Yesilada وجماعته (2006) أن تكرار النوى الصغيرة MN (Micronucleie) عند النساء المصابات بالـ PCOS يزداد بثلاث أضعاف مقارنة بما موجود عند النساء السليمات (إذ يعد هذا الاختبار مؤشر لتلف الدنا DNA). علماً يزداد (MN) عند نساء المصابات بالـ PCOS اللواتي يعانين من السمنة وحالات الإجهاض المتكرر (Trkova *et al.*, 2000 ; Andreassi *et al.*, 2011).

## 2-14. معايير الدراسة الوراثية الخلوية Cytogenetic Parameters

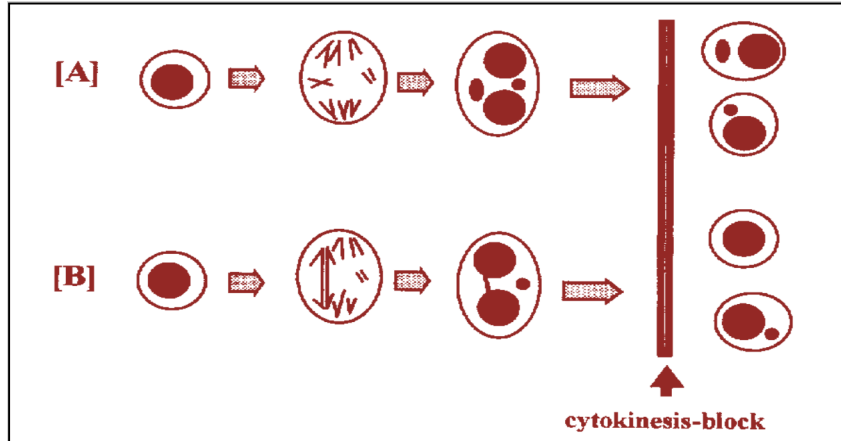
### 2-14-1. اختبار النوى الصغيرة في الخلايا اللمفاوية للدم المحيطي

#### Assay Micronucleus in peripheral blood lymphocytes(PBLs)

يعد اختبار النوى الصغيرة طريقة بسيطة لتقدير الضرر الكروموسومي في الجسم الحي بواسطة قياس تكرار النوى الصغيرة التي تعرف باسم أجسام هاول-جولي (Howell-Jolly bodies) لدى علماء الدم (Dias *et al.*, 2006). تمثل النوى الصغيرة كتل متجمعة من الكروماتين ناتجة عن الكروموسومات عديمة المرتكز او الكروموسومات الكاملة التي لم تتضمنها النواة الجديدة بعد تضاعف الدنا والانقسام النووي (الشكل 2-7) (Fenech, 2002a). تنشأ هذه النوى في الخلايا السرطانية من طرح الجينات المتضخمة خلال طور البناء (Shimizu *et al.*, 1998). يعد التبرعم النووي (Cellular budding) هو الخطوة السابقة لتكون النوى الصغيرة، وهي آلية تزيل الخلايا بوساطتها الدنا



الإضافي او المتضخم وبالنتيجة فهو دالة على تضخم الجين أو الجرعة الجينية الإضافية، تنشأ النوى الصغيرة أيضا نتيجة لتضرر نقاط السيطرة في الدورة الخلوية مما ينتج خلالها في توزيع الكروموسومات كما إن تنشيط ميثلة الدنا (DNA methylation) المستحث غذائيا او بنشيط انزيم DNA methyl transferase ربما يؤدي إلى تكون نوى صغيرة (Fenech, 2006).



شكل (7-2) آلية تكون النوى الصغيرة (Fenech, 2002 a)

A - النوى الصغيرة الناتجة عن الفقد او الكسر الكروموسومية

B - النوى الصغيرة الناتجة عن الكروموسومات ثنائية المركز

على الرغم من كون اختبار النوى الصغيرة يعد مؤشراً للفقد أو الكسر الكروموسومي ولكنه من جانب آخر لا يعطي مقياساً لتغيرات أخرى مثل الانتقالات المتوازنة ومن الخطأ اعتباره كاختبار بديل لاختبار الإنحرافات الكروموسومية ولكنه يعد اختباراً مبدئياً نافعاً لتحديد وجود أو عدم وجود فقد أو كسر كروموسومية (Fenech, 1997). تختلف نتائج اختبار النوى الصغيرة بين المختبرات والمسجلين مما أدى إلى تحديد معايير القياس العالمية.

يُنجز اختبار النوى الصغيرة باستخدام تقنيات كثيرة في الحي وفي الزجاج و باستخدام خلايا مختلفة، منها كريات الدم الحمراء غير الناضجة لنقي العظم في الفأر والخلايا اللمفية، فقد أتضح بأنها تعطي نتائج مناسبة وموافقة لتلك التي تنجز باستخدام خلايا نقي العظم (Sato and Tomita, 2001) وتعد طريقة اختبار النوى الصغيرة باستخدام تقنية إيقاف حركية السائتوبلازم باستخدام مادة (Cyto- (2003 (Norppa and Flack , chalsin -B) من طرائق القياس الأكثر شيوعاً والتي تمكن من قياس مؤشرات أخرى هي الجسور البلازمية والبراعم النووية والموت الخلوي سواء بالتخر (Necrosis) والموت الخلوي المبرمج (Apoptosis) ومعدل الانقسام النووي (Fenech, 2002b)، فقد استخدمت لدراسة تأثيرات الإشعاعات المؤينة و نقص حامض الفوليك (Folic acid) التي تؤدي إلى عدم ثبات

المجين (Genome) وتضخم الجين وبالتالي ارتفاع تكرار النوى الصغيرة (Fenech, 2006). وتناولت دراسات أخرى اختبار تكون النوى الصغيرة دون استخدام مادة B - Cyto-chalasin (الأعظمي، 2000 ؛ العزاوي، 2006).

## 2-14-2. معامل الانقسام الخيطي (Mitotic Index(MI)

يُعد الانقسام الخيطي احد مراحل دورة حياة الخلية ( $M, G_2, S, G_1$ ) وهو عملية متواصلة يتم فيها مضاعفة المادة الوراثية خلال الطور البنائي (S - phase) من دورة الانقسام، وتختلف الفترة الزمنية التي تحتاجها الخلايا للانقسام من نوع لأخر من الكائنات ومن عضو لأخر ومن خلية لأخرى (Tamarin, 1996).

يحسب معامل الانقسام كدليل لعدد الخلايا المنقسمة التي تكون في أطوار انقسامية مختلفة إلى العدد الكلي للخلايا المنقسمة وغير المنقسمة (Ghosh *et al.*, 1991) ، يستخدم معامل الانقسام للكشف عن التأثير السمي الوراثي (Genotoxic) للعوامل الفيزيائية والكيميائية في الخلايا، إذ إن المواد المطفرة والمسرطنة غالبا ما تؤثر على عدد الانقسامات ومعامل الانقسام. وجد إن معامل انقسام الخلايا للمفاوية البشرية يتأثر بطبيعة الوسط الغذائي المستخدم وطول مدة الحضانة ويلاحظ ارتفاع قيمة المعامل بزيادة مادة الكولجسين (Colchicine) وطول مدة استخدامها ولوحظ إن الوسط الغذائي RPMI -1640 المحور والمجهز بمصل الإنسان المزروعة خلاياه بدلا من مصل الأبقار الجنيني قد حقق زيادة بمقدار الضعف في معامل الانقسام (Shubber and Al-Allak, 1986; Yassen *et al.*, 1998).

اتضح إن لكثير من المواد الكيميائية القدرة على تثبيط معامل الانقسام الخيطي منها مركبات النتروز (Nitrose compound) والعديد من نواتج عمليات التصنيع فضلا عن العقاقير الطبية والمبيدات (العزاوي، 2006)، كما إن للعوامل الفيزيائية ومنها الإشعاع تأثيرا على معامل الانقسام حيث توصل الباحث (Ad'hiah *et al.*, 2001) إلى إن الجرعة الحادة (300 راد ) من أشعة كاما أدت إلى تثبيط معامل الانقسام الخيطي لذكور وإناث الفئران وبشكل حاد مقارنة بالجرعة نفسها ولكن بعد تجزئتها. في حين ازداد معامل انقسام الخلايا اللمفية للمصابين بابيضاض الدم الحاد المزمن والذي انخفض معنويا بعد استخدام عقاري Doxorubicin، Cyclophosphamide (Al-Qaisy, 2005). كما تأثر معامل الانقسام للعاملين في مجال الطباعة بالأوفسيت (Aksoy *et al.*, 2005)، وارتفع معنويا معامل انقسام الخلايا اللمفية للعمال المتعرضين للنفط ومشتقاته وازداد الارتفاع بزيادة العمر (الغانمي، 2006) كما انخفض معامل الانقسام لدى المتعاملين مع المبيدات الزراعية (العزاوي، 2006).

### 3-14-2. الانحرافات الكروموسومية (CAs) Chromosomal Aberrations

تقع الانحرافات الكروموسومية في نوعين أساسيين وهي الانحرافات الكروموسومية التركيبية والانحرافات الكروموسومية العددية (Brooker, 2005).

#### 1-3-14-2. التغيرات التركيبية Structural Aberrations

تشمل التغيرات التركيبية تغيرات في تركيب الكروموسوم او الدنا المتكون منه (Hartwell *et al.*, 2004).

أ- الحذف (Deletion): يحدث عندما تزال مجموعة من أزواج القواعد النتروجينية المتجاورة من الدنا والنتاج من خلل في التضاعف أو فشل في الأتحادات الأختزالية أو الخيطية أو نتيجة التعرض للأشعة المؤينة أو المواد الكيميائية ويستخدم مصطلح الحذف عادة لوصف المنطقة المحذوفة من الكروموسوم.

ب- التضاعف (Duplication): يحدث عندما تكرر أزواج القواعد النتروجينية مما يؤدي إلى زيادة عدد نسخ منطقة كروموسومية معينة، ويقسم إلى التضاعف الترادفي (Tandem duplication) وفيه تجاور مكررات المنطقة بعضها البعض أما بنفس الترتيب أو بترتيب معكوس أما في التضاعف غير الترادفي (المتشتت) (Non-tandem duplication) فإن النسختين أو النسخ المتعددة للمنطقة ليست متجاورة وربما تقع في جزء بعيد من نفس الكروموسوم أو من كروموسوم آخر.

ت- الانقلاب (Inversion): يقصد بالانقلاب دوران قطعة كروموسومية بالاتجاه المعاكس نتيجة حدوث كسرين في موقعين مختلفين على الكروموسوم نفسه وقد يشتمل الانقلاب على منطقة المرتكز فيدعى الانقلاب المرتكزي (Pericentric Inversion) أو لا يشتمل عليها فيدعى الانقلاب اللامرتكزي (Paracentric Inversion).

ث- الانتقال (Translocation): يتم الانتقال بتبادل قطعة كروموسومية بين كروموسومات مختلفة أو بين أجزاء مختلفة لنفس الكروموسوم ويمكن تميز ثلاثة أنواع منه هي الانتقال البسيط (Simple translocation) والانتقال المتبادل (Reciprocal translocation) وانتقال روبرتسونين (Robertsonian translocation).

ج- العناصر القافزة (Transposable genetic elements): تعرف العناصر القافزة بأنها أي قطعة من DNA لها القدرة على الحركة من موقع لآخر في المادة الوراثية ووفقاً لمنشأها ووظيفتها

فإنها تعاقب من الدنا يؤدي وظيفة معينة في الكائن الذي توجد فيه (Hartweel *et al.*, 2001; Brooker, 2005 Lewis, 2005).

ح- الكروموسومات الحلقية (Ring chromosomes): يحدث حذف في نهايتي الكروموسوم وان التحام هذه النهايات يؤدي لتكوين كروموسوم حلقي.

خ- الكروموسومات المتناظرة (Isochromosomes): ينقسم الكروموسوم أحيانا على طول محور عمودي على محور انقسامه الأصلي وينتج عن ذلك كروموسوم يحوي نسختين لأحد الأذرع دون الآخر.

د- الكروموسومات الدقيقة المزدوجة (Doubleminute Chromosomes) والمناطق متجانسة الصبغة (Homogeneous region): يحدث نتيجة تضخم الجين Gen amplification زيادة في عدد نسخ الجين وتتم العملية خلال التضخم الفائض (Redundant amplification) للدنا والتي تزيد من الانحرافات الكروموسومية مثل الدقائق المزدوجة والمناطق متجانسة الصبغة وتعد الأخيرة من الانحرافات الشائعة في الخلايا السرطانية والتي ينتج فيها تكرار قد يصل إلى 100 نسخة للمنطقة (Kim and Pelletier, 1999; Lodish *et al.*, 2000).

## 2-3-14-2. التغيرات العددية Numerical abnormalities

تتميز الكائنات حقيقية النواة بثبات أعدادها الكروموسومية سواء كان في خلاياها الجسدية (2N) أو خلاياها الجنسية (N) والتي تتوارث من الآباء إلى الأبناء، قد يتغير العدد الكروموسومي نتيجة التعرض لمؤثرات بيئية معينة أو بفعل عوامل داخلية المنشأ. يمكن حصر هذه التغيرات في ثلاثة أنواع أساسية وهي التضاعف الكروموسومي غير التام (Aneuploidy) والتضاعف الكروموسومي التام (Polyploidy) والموزائكية الكروموسومية Chromosomal Mosaics (Sunstad and Simmons, 2000; Yadav, 2004).

أولاً: التضاعف غير الحقيقي Aneuploidy

يتضمن التغير زيادة أو نقصان كروموسوم واحد أو أكثر والذي قد يحدث في الخلايا الجسدية أو الجنسية وكالاتي:

أ- احادي الكروموسوم (Monosomy; 2N-1): هي الحالة التي يحصل فيها فقدان احد الكروموسومات في الخلايا الجسدية للفرد.

ب- فقد الكروموسومين المتماثلين ( $2N-2$ ; Nullisomy): هو فقد كروموسومين متماثلين في الخلايا الجسدية.

ت- ثلاثي الكروموسومات المتماثلة ( $2N+1$ ; Trisomy): هو إضافة كروموسوم لزوج كروموسومي معين، فيصبح هذا الكروموسوم ممثلاً بثلاث نسخ متماثلة في الخلية.

ث- رباعي الكروموسوم المتماثل ( $2N+2$ ; Tetrasomy): هو إضافة كروموسومين متماثلين إضافيين في الخلايا الجسمية لزوج كروموسومي فيصبح الكروموسوم ممثلاً بأربع كروموسومات متماثلة. وتلاحظ حالة التعدد المجموعي غير الكامل بصورة مكررة في العديد من الأورام الصلبة.

ثانياً -التضاعف الحقيقي Euoploidy

يتضمن التغيرات في مجموعة كروموسومية كاملة ( $N$ ) في الخلية أو الكائن كالاتي:

أ- أحادية المجموعة الكروموسومية ( $1N$ ; Haploidy): تحوي الخلايا الجسدية على مجموعة كروموسومية واحدة بدلا من اثنين.

ب- ثلاثية المجموعة الكروموسومية ( $3N$ ; Triploidy): تحوي الخلايا الجسدية على ثلاثة مجاميع كروموسومية .

ت- رباعية المجموعة الكروموسومية ( $4N$ ; Tetraploidy): تحوي الخلايا الجسدية على أربع مجاميع كروموسومية.

ث- خماسية المجموعة الكروموسومية ( $5n$ ; Pentaploidy): وقد تكون الحالة سداسية أو سباعية أو ثمانية وهكذا.

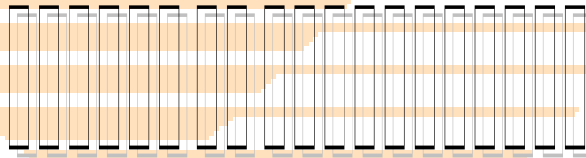
ثالثاً- الموزائكية الكروموسومية

توجد هذه الحالة في الأفراد الذين يمتلكون على الأقل خطين خلويين مع هيئة كروموسومية مختلفة مشتقة من زيجة واحدة ناشئة عن عدم الانفصال في الانقسام الخيطي بعد الإخصاب، لذلك فإن احد الخلايا البنوية تستلم أكثر من نسخة والأخرى يحدث فيها نقص وكل خلية سوف ينشأ عنها خط خلوي مع عدد كروموسومي غير طبيعي. تختلف خصائص الخلايا التي تمثل كل خط خلوي في الأنسجة المختلفة وتعطي مدى من الموزائكية.

الفصل الأول

المقدمة

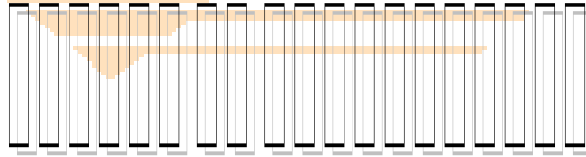
Introduction



الفصل الثاني

استعراض المراجع

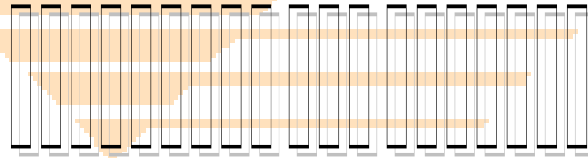
Literature Review



الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Material And Methods





## 3-1. الأجهزة والمواد

## 3-1-1. الأجهزة والمعدات المستخدمة

الشركة المصنعة والمنشأ	اسم الجهاز أو المستلزم	ت
صنع محلي	cooled Box	1 الصندوق المبرد لنقل العينات
Jeitech (Korea)	Laminar flow cabinet	2 الكابينة المعقمة
Labtech (Korea)	Water bath	3 حمام مائي
Hereaus (Germany)	Centrifuge	4 جهاز النبذ المركزي
Hettich (Germany)	Cooling Centrifuge	5 جهاز النبذ المركزي المبرد
Sartorius( Germany)	Electrical sensitive balance	6 ميزان الكتروني حساس
Labtech (Korea)	Magnetic stirrer	7 محراك مغناطيسي
Cleaver scientific (USA)	PCR	8 جهاز تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل
Cleaver scientific (USA)	Gel electrophoresis apparatus	9 جهاز الترحيل الكهربائي
Cleaver scientific (USA)	Photo documentation system	10 نظام التوثيق الفوتوغرافي
Cleaver scientific (USA)	Electrophoresis constant power supply	11 جهاز الطاقة الكهربائية المستمر
Cleaver scientific (USA)	UV light transillminator	12 جهاز الإظهار بالأشعة فوق البنفسجية
Dubuque (USA)	Vortex	13 مزج
AFMA (Jordan)	EDTA coated tube	14 أنابيب مانعة للتخثر EDTA
Qrenier (Germany)	Eppendrofs tubes	15 أنابيب ابندروف مختلفة الأحجام
Nunclon (Denmark)		16 أنابيب بلاستيكية سعة 10مل

فضلاً عن مختلف أنواع الزجاجيات من أنابيب اختبار وبيكرات وسلندرات وماصات باستور وشرايح زجاجية (slides) ، محاقن نبيذة بمختلف الأحجام .

2-1-3. المواد.

أ - المواد الكيميائية

الشركة المصنعة والمنشأ	Material	المادة	ت
BDH(England)	Sodium Bicarbonate	بيكاربونات الصوديوم	1
BDH chemical Ltd(England)	Glacial Acetic Acid	حامض الخليك الثلجي	2
BDH chemical Ltd(England)	Sodium Chloride	كلوريد الصوديوم	3
Sigma(USA)	Cytochalasin B	سايٹوكالازين بي	4
BDH chemical Ltd(England)	Gimsa Stian	صبغة كمزا	5
Merck(Germany)	Dihydrogen Potasium Phosphate	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين	6
BDH(England)	Potasium Chlorid	كلوريد البوتاسيوم	7
BDH(England)	Absolute Ethanol	كحول الأثيلي المطلق	8
Fluka(Switzerland)	Dihydrogen Sodium Phosphate	فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين	9
BDH chemical Ltd(England)	Absolute Methanol	كحول مثيلي مطلق	10
Kimadia(Egypt)	Colchicine	مادة موقفة للانقسام (الكولجسين)	11
Ajanta Pharma Limitad(India)	Crystalline penicillin Antibiotic	المضاد الحيوي البنسلين البلوري	12
Sinochem Jiangsu(India)	Streptomycin Anibiotic	المضاد الحيوي الستربتومايسين	13
Euro-Lone( Europe)	Fetal Bovine Serum	مصل الدم البقري الجنيني	14

Segma(England)	Phytoheamaagglutinin	المادة المحفزة على الانقسام (الملزن الدموي النباتي)	15
Leo Pharmaceutical(Denmark)	Heparin	مانع تخثر الدم ( الهيبارين)	16
BIO BASIC	Agarose	اكاروز	17
BIO BASIC	10X TBE Buffer Solution	محلول بفر منظم	18
Bioneer(Korea)	DNA ladder Marker (bp 1000 -100) (bp 1500- 100)	معلومات الحجم	19
Bioneer(Korea)	Bromophenol Blue	صبغة برومو فينول الزرقاء	20
Bioneer(Korea)	Primers	بوادئ	21
Bioneer(Korea)	PCR PreMix	عدة ماستر مكس	22
BIO BASIC	Ethidium Bromide stain	صبغة بروميد الاثيديوم	23
BIO BASIC(Canada)	Isopropanol Alcohol	كحول الأيزوبروبانول	24
Aquarama(Canada)	Deionized water	ماء مزال الأيون	25
Biolabs(England)	Restriction Enzyme( <i>MspA1 I</i> )	الإنزيم القاطع ( <i>MspA1 I</i> )	26
Promega(USA)	Restriction Enzyme ( <i>H2p92II</i> )	الإنزيم القاطع ( <i>H2p92II</i> )	27
Bioneer(Korea)	Trice EDTA	محلول TE	28

## ب - العُدَّة الجاهزة

الشركة المصنعة والمنشأ	Kit	العدة	ت
Biomerieux inc(France)	Follicle Stimulating Hormone (FSH) Enzyme test kit	عُدَّة استخلاص هرمون FSH Follicle Stimulating Hormone	1
Biomerieux inc(France)	Luteinizing Hormone (LH) Enzyme Immunoassay kit	عُدَّة استخلاص هرمون LH Luteinizing Hormone	2
Biomerieux inc(France)	prolactin Hormone Enzyme Immunoassay kit	عُدَّة استخلاص هرمون الحليب prolactin Hormone	3
Biomerieux inc(France)	Progesteron Hormone Enzyme Immunoassay kit	عُدَّة استخلاص هرمون البروجستيرون (P) Progesterone Hormone	4

Biomerieux inc(France)	Estradiol Hormone Enzyme Immunoassay kit	عُدّة استخلاص هرمون (E2) Estradiol Hormone	5
Biomerieux inc(France)	Testosterone Enzyme Immunoassay test kit	عُدّة استخلاص الهرمون الذكري (T) Testosterone Hormone	6
Geneaid(Korea)	Wizard Genomic DNA Purification Kits	عدة استخلاص الـ DNA	7

### 2-3 طرائق العمل Methods

#### 2-3-1. جمع عينات الدم من النساء المصابات بالـ PCOS

#### Collection of Blood Samples from PCOS patients

تم جمع العينات من مركز الخصوبة في مستشفى الصدر التعليمي في محافظة النجف الأشرف. شملت الدراسة (130) مريضة بمتلازمة تكيس المبايض المتعدد راجعت المركز للفترة من تشرين الثاني 2011 لغاية 30 كانون الأول 2012 ، وتمت مقارنتهن مع (100) امرأة من الأصحاء ، وتم استثناء النساء المعالجات بالأدوية والمصابات بالإمراض الأخرى. جمعت المعلومات من المريضات ومجموعة السيطرة اعتماداً على استمارة خاصة تم أعدادها لبيان بعض المعلومات المرتبطة بالعينات، إذ تم دراسة تأثير العوامل الآتية وعلاقتها بمتلازمة تكيس المبايض المتعدد وهي : العمر وعدد الأطفال والتاريخ العائلي للمرض ، دليل كتلة الجسم و الشعرانية وعدد الإسقاطات وانتظام الدورة.

#### استمارة استبيان للمريضات

العمر	دليل كتلة الجسم (BMI)	الشعرانية	عدد الأطفال	عدد الإسقاطات	التاريخ العائلي للمريضة	انتظام الدورة الحيضية

**3-2-1-1. تقسيم عينات الدم المدروسة**

تم سحب ( 10 مل) من الدم الوريدي بواسطة محقنه طبية من مراجعات مركز العقم والخصوبة في مستشفى الصدر التعليمي مع مجموعة السيطرة في اليوم الثاني أو الثالث من الدورة الشهرية ، و قسمت عينة الدم إلى :

1- وضع ( 3 ml ) في أنابيب تحتوي مادة مانعة للتخثر EDTA بعد ما تم رجها بلطف لمنع تخثر الدم واستخدمت لإجراء الفحوصات الجزيئية.

2- وضع ( 3ml ) في أنابيب مختبرية زجاجية حاوية على مادة الهيبارين لمنع تخثر الدم لغرض إجراء تجارب الوراثة الخلوية خلال 24 ساعة.

3- وضع (5ml) في أنابيب بلاستيكية serum tubes لغرض فصل المصل serum وإجراء الفحوصات الهرمونية المطلوبة فبعد فصل المصل بعملية الطرد المركزي 3000 rpm لمدة 20 دقيقة ثم خزن المصل بدرجة حرارة (-20) °م لحين قياس تركيز الهرمونات المشمولة بالدراسة.

**3-2-2. الدراسة الهرمونية والوراثية الخلوية والجزيئية للنساء المصابات بمتلازمة تكيس المبايض المتعدد****3-2-2-1. الدراسة الهرمونية للنساء المصابات بمتلازمة تكيس المبايض المتعدد****3-2-2-1-1. تقدير هرمونات التناسل Reproductive Hormones assay**

تم قياس مستوى هرمونات التكاثر لكل مريضة وهي كل من هرمون محفز الجريبة FSH وهرمون الجسم الأصفر LH وهرمون الحليب والبروجسترون والاستروجين تم قياسها في اليوم الثاني أو الثالث من الدورة الحيضية. وفي هذه الدراسة تم استعمال تقنية (Enzyme linked ; Fluorescent Assay technique (EIFA) - واسم الجهاز (Bio Merieux (Mini VIDAS). وأجري الفحص في مدينة الصدر التعليمية.

**طريقة العمل**

1- جهزت العدد التشخيصية الخاصة بالهرمون الذي يراد قياس مستواه خارج التجميد وترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة نصف ساعة.

2 - استخدم شريط واحد (Stripp) و SPR من العدة التشخيصية لكل عينة.

- 3- أضيف (0.2) مل من مصل المريضة في المكان المخصص له في الشريط.
- 4- وضع الشريط في جهاز Mini Viads المحضر / لمحاولة التحميل .
- 5- ادخلت نتيجة قياس الهرمون الخاص ومعلومات المريضة مستخدماً لوحة المفاتيح لتخليق قائمة العمل مع المقارنة بالقيم القياسية التي تظهر في الجهاز والمتوافقة مع معلومات المريضة .
- 6- أدخل التحليل بعمل مباشر في Mini Vidas بتشغيل القائمة و خطوات التحليل كلها يقوم بها الجهاز اوتوماتيكياً.

### 3-2-2-2. الدراسة الوراثية الخلوية The Cytogenetic Study

#### 3-2-2-2-1. تهيئة الأدوات المختبرية

غسلت الأدوات الزجاجية بالماء ومساحيق الغسيل بصورة جيدة، ثم غسلت بالماء المقطر وجففت وغلفت بأوراق الألمنيوم وعقمت في الفرن (Oven) بحرارة 180°م لمدة ساعة ونصف بعدها تركت لتبرد واستخدمت مباشرة أو حفظت لحين الحاجة.

#### 3-2-2-2-2. تحضير المحاليل المستعملة في الدراسة

##### أ - محلول السايٹوكالازين بي Cytochalasin –B

حضر بإذابة 1 ملغم من مادة الـ Cyto-B في 1.6 ملتر من مذيب Dimethyl Sulfoxide (DMSO) ، وأخذ 100 مايكروليتر من المحلول السابق وأضيف الى 900 مايكروليتر من الوسط الزراعي الحافظ ، وأخذ منه 75 مايكروليتر لكل 1 ملتر من الوسط الزراعي المعدي RPMI -1640 ، ليكون بتركيز نهائي 4.5 مايكروغم/ملتر، ثم حُفظ المحلول في درجة حرارة – 20 °م لحين استعماله في الدراسة ليوقف انقسام الخلايا في الطور الانفصالي anaphase (Fenech, 2000) .

##### ب - المحلول المشطر (PHA) Phytohemagglutinin

حضر المحلول بإذابة 1 ملغم في 5 ml من الماء المقطر ليكون التركيز النهائي (200) مايكروغم/مل وحسب تعليمات الشركة.

### ج - محلول الكولجسين Colchicin

حضر المحلول بإذابة حبة واحدة بوزن (0.5) ملغم في 1 مل من الماء المقطر للحصول على تركيز 0.5 ملغم / مل وأضيف 0.1 مل من هذا المحلول لكل 5 مل من الوسط الزراعي (Verma and Baba, 1994).

### د- محلول كلوريد البوتاسيوم واطئ التوتر KCl Hypotonic Solution

حُضِر بإذابة 5.587 غم من مسحوق كلوريد البوتاسيوم في كمية قليلة من الماء المقطر ثم أُكْمِل الحجم إلى 1 لتر بالماء المقطر وُدُوب بصورة كاملة ليصبح المحلول بتركيز 0.075 مولاري ثم حُفِظ في درجة حرارة 4 °م لحين الأستخدام (Verma and Babu, 1989).

### هـ - المثبت Fixative

حُضِر بالمزج الآني للميثانول المطلق مع حامض الخليك الثلجي بنسبة (1:3) (حجم/حجم) (Yaseen, 1990).

### و- محلول دارى سورنسن Sourenson Buffer

حُضِر بأذابة 7.08 غم من مادة  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  مع 6.74 غم من مادة  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  في 1 لتر من الماء وحفظ في درجة 4 °م لحين الأستخدام في تحضير الصبغة وغسل السلايدات بعد عملية التصبغ (Verma and Babu, 1989).

### ز- محلول صبغة كمزا Giemsa Stain

حُضِر بإذابة 2 غم من مسحوق الصبغة في 100 مللتر من الميثانول المطلق وُخُلط لحين ذوبان الصبغة بشكل جيد باستخدام جهاز المحرك المغناطيسي ذي الصفيحة الهزازة بعد ذلك رُشِح المحلول باستخدام ورق ترشيح نوع (1) (Whatman No. 1)، حفظ بعدها في قناني معتمة، ويعد هذا المحلول خزين Stock Solution، عند الأستخدام أُخِذ 1 مللتر من محلول الخزين وأضيف إليه 4 مللتر من دارى سورنسن الدافئ المحضر في الفقرة (3-2-2-2-2- و)، واستخدم في صبغ النماذج المعدة على الشرائح الزجاجية (Verma and Babu, 1989).

ح - المضادات الحيوية

● محلول البنسلين البلوري (Crystalline Penicillin Solution):

حضر المحلول بإذابة عبوة من مسحوق البنسلين Benzyl Penicillin Sodium (Salt;1000000) في 5 مل من الماء المقطر والمعقم مع الرج جيدا حتى ذوبانه تماما ليصبح تركيزه 200000 وحدة دولية/ مل ، حفظ بدرجة حرارة (-18 م °).

● محلول الستربتومايسين (Streptomycin Solution): حضر بإذابة عبوة من

مسحوق الستربتومايسين (1غم) في 5 مل ماء مقطر معقم ليصبح تركيزه 200000 مكغم/ مل ، حفظ بدرجة حرارة (-18 م °).

ط - أوساط الزرع النسيجي Tissue Culture Media

● الوسط الزرع النسيجي الكامل Complete Tissue Culture Media

وهو الوسط الزرع RPMI – 1640 (Rosswell Park Memorial Insitute – 1640) ، والذي يتكون من :

المادة	الكمية/ الحجم
الوسط الزرع RPMI-1640	10.3 g
بيكاربونات الصوديوم NaHCO <sub>3</sub>	7.5g لكل 100 ml
المضاد الحيوي البنسلين Penicillin	0.5 ml
المضاد الحيوي الستربتومايسين ( Streptomycin )	1ml
مصل الدم البقري الجنيني	100 ml

ذوب مسحوق الوسط الزرع RPMI-1640 في 800 ملتر من الماء الخالي من الأيونات Deionized Water ، ثم أضيفت مادة بيكاربونات الصوديوم ومحاليل المضادات الحيوية المحضرة في الفقرة (3-2-2-2-2-ح) ، بعد ذلك ضبط الـ pH الى (6.8 - 7.2) ، ثم أضيف مصال الدم البقري الجنيني ورشح الوسط الزرع باستعمال مرشح ذي ثقوب 0.22 مايكرومتر للتخلص من البكتريا ووزع



على أنابيب اختبار نظيفة ومعقمة بواقع 4.5 مللتر ووضعت في حاضنة بدرجة حرارة 37°م لمدة ثلاثة أيام للتأكد من عدم تلوثها ، ثم حفظت في درجة حرارة 4°م لحين الاستخدام (Yaseen, 1990).

### • الوسط الزراعي الحافظ Maintenance Media

يحتوي هذا الوسط مكونات الوسط الزراعي النسيجي الكامل ماعدا مصل الدم البقري الجنيني.

### 3-2-2-2-2-3. دراسة المعايير الوراثية الخلوية

شملت اختبار الانقسام الخلوي الخيطي (MI) والانحرافات الكروموسومية (CAs) وفحص الانوية الصغرى (MN).

### 3-2-2-2-2-3.1. زرع الدم Blood Culture

1- أجريت عملية زرع الدم داخل كابينة معقمة إذ تم زرع ثلاث أنابيب لكل عينة لإجراء اختباري MI و CA وثلاث أنابيب أخرى لاختبار MN.

2- أضيف 0.5 مل من الدم إلى أنابيب الزرع الحاوية على 5 مل من الوسط الزراعي المحضر في الفقرة (3-2-2-2-2-3 - ط ) ، أضيف لها بعد ذلك (0.25) مل من محفز النمو (PHA) بتركيز نهائي مقداره (10) مايكروغرام /مل ثم مزجت الأنابيب بلطف ووضعت بوضع مائل في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م مع مراعاة رج الأنابيب كل 24 ساعة أثناء فترة الحضانة .

### 3-2-2-2-2-3.2. حصاد الخلايا Harvesting.

#### أ - حصاد الخلايا لإختبار الأنقسام الخلوي والانحرافات الكروموسومية .

حُصدت الخلايا اللمفية وفقاً للطريقة المذكورة من قبل (Verma and Babu, 1989) وكما يأتي :

1- أضيف 0.1 مللتر من محلول الكولجسين المحضر في الفقرة (3-2-2-2-2-3 - ج) لكل أنبوبة زرع قبل انتهاء مدة الحضانة بمدة 20 دقيقة ، لغرض إيقاف الأنقسام الخلوي في الطور الأستوائي Metaphase لدراسة معامل الانقسام الخلوي ، رجت الأنابيب جيداً وبهدوء وأعيدت لإكمال مدة الحضانة وهي 72 ساعة في درجة 37°م .

2- عند انتهاء مدة الحضان فصلت الخلايا بجهاز الطرد المركزي بسرعة 1500 دورة / دقيقة ولمدة 10 دقائق.

3- أزيل الرائق Supernatant باستعمال ماصة باستور Pasture Pipette وترك الراسب Pellet المحتوي على الخلايا مع قليل من الوسط الزراعي في قعر الأنبوبة.

4- خلط الراسب جيداً باستعمال المازج الكهربائي ثم أضيف إليه محلول كلوريد البوتاسيوم الدافئ في درجة حرارة 37 °م ، المحضر في الفقرة (3-2-2-2-2-د) ، كانت الإضافة تدريجية مع مراعاة الرج المستمر حتى وصلت إلى 10 مللتر لكل أنبوبة.

5- أعيدت الأنابيب إلى الحاضنة في درجة حرارة 37 °م لمدة 30 دقيقة.

6- فصلت الخلايا من الخليط بجهاز النذب المركزي بسرعة 1500 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق وأزيل الرائق ، مع أبقاء القليل منه فوق الراسب.

7- أضيف لكل أنبوبة وبصورة مباشرة و تدريجية 5 مللتر من المثبت المحضر آنياً كما ورد في الفقرة (3-2-2-2-هـ) مع مراعاة الرج المستمر.

8- فصلت الخلايا من الخليط بجهاز الطرد المركزي بسرعة 1500 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق.

9- أعيدت الخطوة رقم 7 و 8 لمرات عدّة لغرض غسل وتثبيت الخلايا بشكل جيد وتوقف عملية الغسل حالما يصبح المحلول رائقاً .

10- أعيدت الخطوة رقم 8 ثم أزيل الرائق مع ترك ما يقارب 1 مللتر منه في قعر الأنبوبة إذ يكون على شكل عالق ضبابي عند الرج.

### **ب - حصاد الخلايا لاختبار الانوية الصغرى**

أعيدت نفس الخطوات المتبعة في حصاد الخلايا أعلاه باستثناء الخطوة (1) فقد أضيفت مادة الساييتوكلازين B المحضر في فقرة (3-2-2-2-2-أ) بمقدار (20) مايكروغرم / مل عند الساعة 44 لإيقاف الخلايا عند الطور الانفصالي (Anaphase) وأعيدت بعدها الأنابيب للحاضنة لإكمال مدة الحضان الـ 72 ساعة (Fenech, 2000) .

### 3-3-2-2-2-2-3. تحضير الشرائح الزجاجية Preparation of Slides

مسكت الشرائح وهي مبللة بالماء البارد بوضع مائل وقطر عليها (6-8) قطرات من العالق الخلوي بعد مزجه بصورة جيدة باستخدام ماصة باستور وقطرت العينة من ارتفاع مناسب (حوالي 3 أقدام) وحضر لكل نموذج (3-5) شرائح، ثم جففت بوضعها بصورة مائلة في درجة حرارة الغرفة لمدة (3-5) دقائق.

### 4-3-2-2-2-2-3. تلوين الشرائح الزجاجية Staining of Slides

وضعت الشرائح بوضع أفقي على حامل خاص ، وأضيف ملون كمزا المحضر أنيا بحيث غطيت الشرائح بالملون وتركت لمدة (3-4) دقائق ثم غسلت مباشرة بدارئ سورنسن الدافئ.

### 5-3-2-2-2-2-3. فحص الشرائح الزجاجية

فحصت الشرائح الزجاجية باستخدام المجهر الضوئي فقد اجري مسح شامل للشريحة باستخدام العدسة الشيئية X10 لملاحظة توزيع الخلايا ووجود الخلايا المنقسمة، وعند ذلك استخدمت العدسة X40 لحساب معامل الانقسام والعدسة الزيتية (Oil immersion; X100) لفحص الانحرافات الكروموسومية.

أما كيفية حساب المؤشرات الوراثية الخلوية السابقة الذكر فتم وفق المعادلات الآتية :

$$\text{عدد الخلايا المنقسمة} \times 100 = \text{معامل الانقسام الخيطي} = \text{Mitotic Index (MI)}$$

العدد الكلي للخلايا (1000)

تم حساب معامل الانقسام الخيطي حسب طريقة (Becker, 1986)

معدل التغيرات الكروموسومية : يمثل عدد الخلايا الحاوية على Chromosomal aberration(CA) تغيرات كروموسومية في مئة خلية منقسمة

حسب طريقة ( Lamberti et al., 1983 )

حيث إن :

MN تمثل الانوية الصغرى .

MN1 الخلايا ثنائية النواة الحاوية على نوية صغيرة واحدة .

MN2 الخلايا ثنائية النواة الحاوية على نويتين صغيرتين .

MN3 الخلايا ثنائية النواة الحاوية على ثلاث نويات صغيرة .

MN4 الخلايا ثنائية النواة الحاوية على أربعة أنوية صغيرة .

N = عدد الخلايا المحسوبة ، على أن لا تقل عن ألف خلية .

وحسب ما ورد في (Fenech and Morley, 1985) .

### 3-2-2-3. الدراسة الجزيئية Molecular Study

#### 1-3-2-2-3. استخلاص الـ DNA

- تم استخلاص الحامض النووي الـ DNA من عينات الدم المشمولة بالدراسة لغرض إجراء الفحص الجزيئي للجينات المشمولة بالدراسة وعينات السيطرة.

#### • مكونات عدة استخلاص الـ DNA Extraction Kit Components

المكونات Components الكمية Amount /ml

1- محلول تحليل خلايا (RBC) RBC Lysis Solution	(360 ml)
2- محلول تحليل الخلايا Cells Lysis Solution	(100 ml)
3- محلول ترسيب البروتين Protein Removal Solution	(40 ml)

#### • طريقة استخلاص الـ DNA Protocol of DNA Extraction

تم استخلاص الـ DNA من الدم حسب تعليمات العدة (Kit) المجهزة من شركة Geneaid

- 1- أضيف (300) مايكروليتر من الدم إلى ابندروف حجم (1.5 ml) ثم أضيف لها (900) مايكروليتر من محلول RBC lysis Buffer ومزج الخليط بلطف وترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة (5 دقائق) لتحليل خلايا الدم.

- 2- نبذت بعدها الأنابيب بسرعة ( 3000 rpm ) دورة/ دقيقة لمدة 5 دقائق.
- 3- أهمل الرائق بلطف من دون أتلاف الطبقة البيضاء مع بقاء حوالي (50) مايكروليتر من الرائق لغرض مزج طبقة الخلايا البيضاء بواسطة جهاز المازج Vortex.
- 4- أضيف (300) مايكروليتر من محلول Cell lysis Buffer ومزجت المحتويات بجهاز Vortex ثم حضنت الأنابيب بالحاضنة لمدة (10) دقائق بدرجة حرارة C° (60) مع رج الأنابيب ثلاث مرات (كل 3 دقائق).
- 5- أضيف (100) مايكروليتر من Protein Removal Buffer إلى الأنابيب ومزجت بلطف بالمازج ثم وضعت في الثلج لمدة (5) دقائق.
- 6-نبذت الأنابيب لمدة 3 دقائق بسرعة 15000 rpm.
- 7- نقل الرائق إلى أنابيب جديدة وأهمل الراسب وأضيف له (300) مايكروليتر من الايزوبروبانول Isopropanol ثم مزج الخليط بلطف لمشاهدة خيوط الـ DNA.
- 8-نبذت الأنابيب لمدة (5) دقائق بسرعة 15000 rpm.
- 9-أهمل الايزوبروبانول بلطف Isopropanol وأضيف (300) مايكروليتر من الايثانول Ethanol (70%) إلى الـ DNA المتمركز على جدران الأنبوبة ثم رجت الأنابيب لغسل الـ DNA.
- 10-نبذت الأنابيب لمدة 3 دقائق بسرعة 15000 rpm.
- 11-تم إزالة الايثانول Ethanol بلطف بقلب الأنابيب على ورقة ترشيح لمدة 10 دقائق.
- 12-أضيف إلى الأنابيب محلول ( TE ) Trice EDTA ( 100 µl) ثم حضنت الأنابيب في حمام مائي بدرجة حرارة (60C°) لمدة (30-60) دقيقة مع الرج لإذابة الـ DNA.
- 13-حفظت الأنابيب بدرجة حرارة (-20°) لحين الاستعمال.

### 2-3-2-2-3. ترحيل الـ DNA Agarose Gel Electrophoresis

بعد استخلاص الـ DNA اعتمدت طريقة (Sambrook *et al.*,1989) للتأكد من وجود الـ DNA المستخلص من الدم.

● مواد الترحيل الكهربائي Reagents of Gel Electrophoresis

- 1- أكاروز Agarose
- 2- محلول بفر المنظم 10 X TBE buffer solution
- 3- صبغة برومو فينول الزرقاء Bromophenol Blue
- 4- بروميد الأثديوم Ethidium Bromide
- 5- معلمات الحجم DNA ladder Marker (bp 1000- 100) و (bp 2000- 100).

● خطوات الترحيل الكهربائي Protocol of Gel Electrophoresis

\*تحضير هلام الأكاروز

- 1- أذيب ( 0.8 ) غم من الأكاروز في (100مل ) من 1 X TBE بواسطة تسخين المزيج إلى درجة الغليان باستخدام الحمام المائي إلى أن تم إذابة كل دقائق الهلام إذ يبدو المزيج صافي من دون أي دقائق عالقة من المسحوق .
- 2- أضيف ( 2 ) مايكروليتر من بروميد الأثديوم Ethidium Bromide إلى سائل الأكاروز
- 3- حرك سائل الأكاروز لكي يمتزج ولتجنب حدوث فقاعات
- 4- صب المزيج في صفيحة الإسناد وبعد غمس المشط comb قرب إحدى نهايتي الصفيحة
- 5 - ترك المزيج ليتصلب في درجة حرارة الغرفة.
- 6- أزيل المشط بهدوء وكذلك مساند الصفيحة بعد تصلب المزيج.
- 7 - وضعت الصفيحة في مسندها في وحدة الترحيل الكهربائي ثم غطيت ببفر الترحيل 1X TBE إذ تم تغطية الهلام.

\*تحميل الـ DNA والترحيل الكهربائي DNA Loading and electrophoresis

مزج (10) مايكروليتر من الـ DNA مع (3) مايكروليتر من loading dye (صبغة البروموفينول الزرقاء Bromophenol Blue) إذ حملت العينات في الحفر المفردة من الهلام تم ترحيل العينات على طاقة كهربائية مقدارها (70 فولت) وبتيار مقداره 40 ملي أمبير ولمدة ساعة، و استخدام جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية UV Light transillminator لغرض مشاهدة حزم الـ DNA، ان الحزم

الملونة بصبغة برومايد الاثيديوم Ethidium bromide صورت باستخدام جهاز التوثيق الفوتوغرافي  
.Photo documentation system

### 3-2-2-3. التوصيف الجزيئي للجينات المدروسة

#### أ- اختيار البوادئ

تم اختيار البوادئ Primers وكما موضح في الجدول رقم (3-1) لغرض إجراء الكشف  
الجزيئي ومعرفة التعدد المظهري للجينات والطفرات الموجودة (Lim *et al.*, 2002 ;  
Karadeniz *et al.*, 2007a ; Karadeniz *et al.*, 2007b ; Jin *et al.*, 2009; Sun *et al.*,  
2009).

#### جدول (3-1) تسلسل البرايمرات المستخدمة

اسم الجين ومختصره	التسلسل
progesterone receptor gene (PRG) gene	F- 5'-TAT GAG CTA TTT GAG TAA AGC CT-3'
	R-5'-TTC TTG CTA AAT GTC TGT TTT AA-3'
Angiotensin converting enzyme (ACE) gene	F- 5'-CTG GAG ACCACT CCC ATC CTT TCT-3
	R- 5'-GAT GTGGCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3'
tissue-type plasminogen activator (TPA) gene	F: 5'- CCGTAACAGGACAGCTCA-3'
	R: 5'- ACCGTGGCTTCAGTCATGGA-3'
Cytochrome P450 (CYP17 gene)	F: 5' - CATTGCACTCTGGAGTC-3'
	R : 5' - AGGCTCTTGGGGTACTTG-3'
Aromatase (CYP19) gene	F: 5'-TCTGGA AAC TTT TGG TTT GAG TG-3'
	R: 5'- GAT TTA GCT TAA GAG CCT TTT CTT ACA-3'

### ب - تخفيف البوادئ Primers Dilution

جُهزت البوادئ جميعها من شركة Bioneer Company/ Korea كمسحوق مجفف Lyophilized product ، تم تحضير محلول الخزين Stock solution ومحلول العمل Working solution بحسب تعليمات شركة Bioneer. حُضِر محلول الخزين وذلك بإضافة الماء المزال الأيون Deionized water للحصول على التركيز النهائي للعالق (100 picomols/  $\mu$ l). أما محلول العمل Working solution فقد تم تحضيره بواسطة سحب (10) مايكروليتر من محلول الخزين (100 picomols/  $\mu$ l) وتخفيفه بـ (90) مايكروليتر من الماء المزال الأيون للحصول على التركيز النهائي لمحلول العمل والذي هو (10 Picomols/  $\mu$ l) .

### 4-3-2-2-3. تفاعل أنزيم البوليمر المتسلسل للجينات المدروسة.

#### Polymerase Chain Reaction (PCR) for Study genes

يوضح الجدول رقم (2-3) المواد المستخدمة في الكشف الجزيئي باستخدام تفاعل أنزيم البوليمر المتسلسل للعينات المدروسة .

#### جدول (2-3) المواد المستخدمة في تفاعل أنزيم البوليمر المتسلسل

المادة	التركيز
Taq DNA polymerase	1 U
Each: d NTP(d ATP ,d CTP, d GTP, d TTP)	250 $\mu$ M
Tris- KCl (pH 9.0)	10 mM
Mgcl2 Stabilizer and tracking dye	30 mM
Template DNA	1.5 mM
Primer	5-10 ng
H2O	18 $\mu$ l

بعد ذلك تم مزج المواد أعلاه بواسطة جهاز المازج vortex ثم نُقلت الأنابيب إلى جهاز الـPCR.



## 3-2-2-3-5. البرامج المستخدمة في الدراسة الجزئية للجينات المدروسة

الجدول الآتية تمثل البرامج المستخدمة في الكشف الجزيئي باستخدام تقنية (PCR) و (PCR-RFLP) وبحسب نوع الجين .

جدول (3-3) البرنامج المستخدم لدراسة التعدد المظهري لجين مستقبل البروجستيرون

. (Karadeniz et al., 2007a) PGR Polymorphism

No.	Steps	Temperature	Time	No. of cycles
1	Initial Denaturation	94C°	5min.	1
2	Denaturation	94C°	30 sec.	35
3	Annealing	55C°	60 sec.	
4	Extension	72C°	45 sec	
5	Final Extension	72C°	5 min	1
6	Final hold	4	-	

جدول (4-3) البرنامج المستخدم للتعرف على التعدد المظهري لجين (ACE)

(Sun et al., 2009) (ACE) I/D gene Polymorphism

No.	Steps	Temperature	Time	No. of cycles
1	Initial Denaturation	94C°	2.5 min.	1
2	Denaturation	94C°	30 sec.	30
3	Annealing	60C°	105 sec.	
4	Extension	72C°	60 sec	
5	Final Extension	72C°	5 min	1
6	Final hold	4	-	

جدول (5-3) البرنامج المستخدم للتعرف على التعدد المظهري لجين ( TPA ) باستخدام تقنية الـ (PCR) (Karadeniz *et al.*, 2007b).

No.	Steps	Temperature	Time	No. of cycles
1	Initial Denaturation	94C°	2.5 min.	1
2	Denaturation	94C°	30 sec.	30
3	Annealing	60C°	105 sec.	
4	Extension	72C°	60 sec	
5	Final Extension	72C°	5 min	1
6	Final hold	4	-	

جدول (6-3) البرنامج المستخدم للتعرف على التعدد المظهري Polymorphism لجين CYP17 gene (Cytochrome P450) باستخدام تقنية (PCR-RFLP) (Lim *et al.*, 2002).

No.	Steps	Temperature	Time	No. of cycles
1	Initial Denaturation	94C°	5min.	1
2	Denaturation	94C°	60 sec	35
3	Annealing	57C°	60 sec	
4	Extension	72C°	60 sec	
5	Final Extension	72C°	10 min	1
6	Final hold	4	-	

جدول (7-3) البرنامج المستخدم للتعرف على التعدد المظهري لجين الاروماتيز CYP19 gen SNP rs2414096 Polymorphism(aromatase) باستخدام تقنية (PCR- RFLP) (Jin *et al.*, 2009)

No.	Steps	Temperature	Time	No. of cycles
1	Initial Denaturation	94C°	5min.	1
2	Denaturation	94C°	60 sec	30
3	Annealing	60C°	60 sec	
4	Extension	72C°	60 sec	
5	Final Extension	72C°	10 min	1
6	Final hold	4	-	

3-2-2-3-6 . تحميل ناتج تفاعل البلمره المتسلسل والترحيل الكهربائي

### Loading PCR product and Electrophoresis

تم تحميل ( 3µl ) من الـ DNA ladder مع (10 µl) من نواتج PCR في جل الأكاروز وبتركيز (2%) (1X TBE Buffer) إذ تم الترحيل بفرق جهد مقداره (70) فولت/سم وبتيار 40 ملي فولت ولمدة ساعة ونصف صبغ الجل بصبغة بروميد الأثيديوم السائلة وبكمية (2µl) تم مشاهدة الحزم بواسطة UV transiluminater ، وتم تصويرها باستخدام جهاز التوثيق الفوتوغرافي Photo documentation system .

3-2-2-3-7 . التوصيف الجزيئي لمعرفة التعدد المظهري لجين CYP17 و CYP19 باستخدام تقنية (PCR-RFLP) .

تم التعرف على التعدد المظهري لجين CYP17 و CYP19 وذلك باستعمال تقنية (PCR-RFLP) إذ تضاعف قطعة الجين المراد دراسته باستخدام بادئات متخصصة وعن طريق تفاعلات الـ PCR ، ثم بعدها يكشف عن وجود الطفرة وعدم وجودها عن طريق استخدام

إنزيمات قاطعة تتعرف على مواقع معينة ضمن القطعة المتضاعفة وتقطيعها بالإنزيمات القاطعة فبالنسبة لجين CYP17 فبعد الانتهاء من البرنامج يتم الترحيل لجزء من الناتج ( 5 µl ) بهلام الاكاروز 2% مع صبغة بروميد الاثيديوم للتأكد من الحصول على الحزمة الصحيحة (459 bp) ، يخلط بعدها 10 µl من ناتج الـ PCR مع (1 U) من إنزيم *MspA1I* و 10X reaction buffer و serum albumin ليصبح الحجم النهائي ( 15 µl ) ويمزج جيدا عندها يحضن بدرجة حرارة 37 C° لمدة 4 ساعات ثم يرحد على هلام الاكاروز بتركيز 2% وإتباع الخطوات السابقة نفسها وسوف تظهر ثلاثة أشكال اليلية حسب الطراز الوراثي للعينة وهي الآتي :

- طبيعي متماثل bp 459 Normal Homozygous

- غير متماثل (bp 459, bp 335, bp 124)

- طافر متماثل (bp 335, bp 124) Mutant Homozygous (Lim *et al.*, 2002)

أما بالنسبة لجين CYP19 فبعد الانتهاء من البرنامج يتم الترحيل لجزء من الناتج ( 5 µl ) على هلام الاكاروز بتركيز 2% مع صبغة بروميد الاثيديوم للتأكد من الحصول على الحزمة الصحيحة (189 bp) بعدها يخلط 10 µl من الناتج مع (1 U) من إنزيم *HSP92 II* و 10X reaction buffer و serum albumin ليصبح الحجم النهائي (15µl) ويمزج جيدا عندها يحضن بدرجة حرارة 37 C° لمدة (3-4) ساعة ثم يرحد على هلام الاكاروز بتركيز 2% وأتباع الخطوات السابقة نفسها وتظهر ثلاثة أشكال اليلية من الحزم حسب الطراز الوراثي للعينة وهي الآتي :

- طبيعي متماثل bp 189 Normal Homozygous

- غير متماثل (bp 189, bp 161, bp 28)

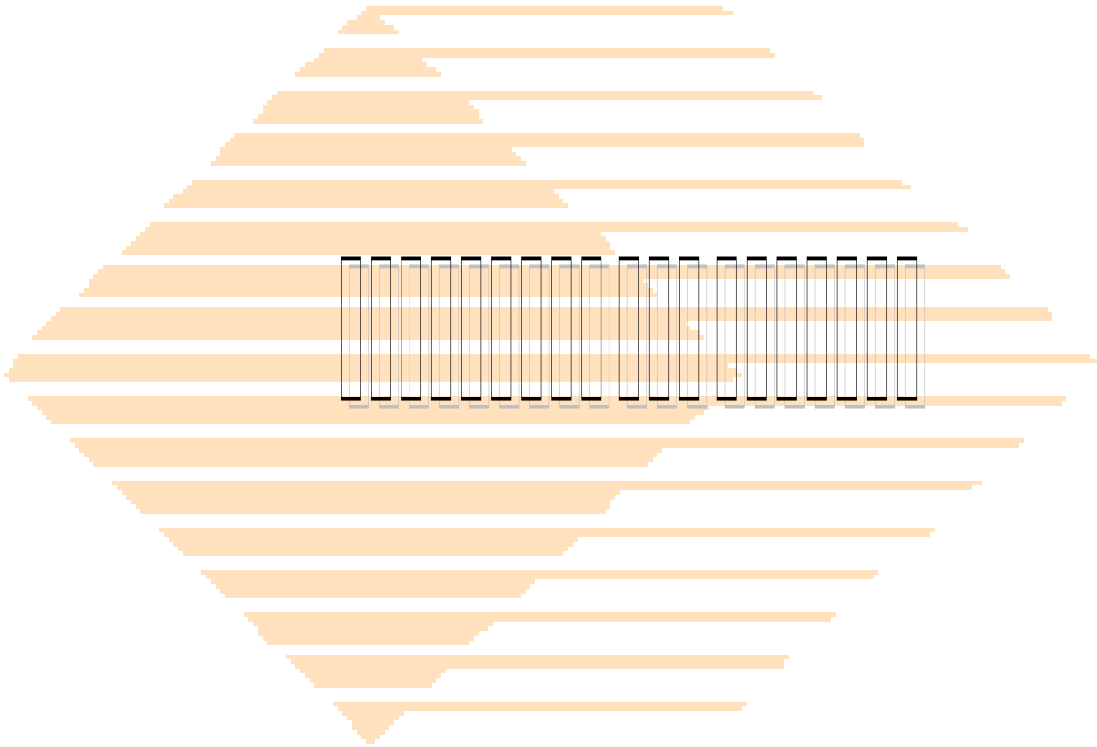
- طافر متماثل (bp 161, bp 28) Mutant Homozygous (Jin *et al.*, 2009) .

### 3-3. التحليل الإحصائي

حُللت نتائج الاختبارات كفاءة التي أجريت في البحث إحصائياً باستعمال برنامج Statistical Analysis System (SAS) ، وقورنت الفروق المعنوية بين متوسطات المعاملات باستخدام اختبار دنكن متعدد الحدود (SAS Institute,2012).

الفصل الرابع  
النتائج والمناقشة

Results and Dissection



1-4. العلامات السريرية في النساء المصابات بمتلازمة تكيس المبايض المتعدد

Clinical Signs of PCOS Women

1-1-4 . دليل كتلة الجسم والعمر Body Mass Index and Age

تشير النتائج في جدول (1-4) إلى وجود زيادة معنوية في دليل كتلة الجسم (BMI) الذي بلغ (29.79± 0.96) كغم/م<sup>2</sup> مقارنةً مع عينات السيطرة (24.80 ± 0.80) كغم/م<sup>2</sup> ، وتُعد زيادة الوزن وارتفاع كتلة الجسم من أهم العلامات الظاهرية المميزة التي تدل على الإصابة بمتلازمة PCOS.

جدول (1-4) مقارنة قيم كتلة الجسم والعمر في النساء المصابات وغير المصابات بال-PCOS.

العمر (Yeas) Age Mean ± SD	دليل كتلة الجسم (BMI) (Kg/m <sup>2</sup> ) Mean ± SD	المجموعة
28.86±0.44	A 29.79±0.96	النساء المصابات بال-PCOS
27.20 ±0.64	B 24.80 ±0.80	النساء غير المصابات بال-PCOS
NS	0.05	مستوى المعنوية

NS: (Non –Significant) عدم وجود فروق معنوية.

(Mean ± SD) المتوسط ± الانحراف القياسي.

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنوياً.

أن السمنة المفرطة تلعب دوراً أساساً في التغيرات الوظيفية والتكاثرية التي تكون مرتبطة مع بعضها البعض والتي تعد من أهم خصائص متلازمة PCOS ، فالنسيج الشحمي (Adipose tissue) له القابلية على تصنيع الاندروجينات الفعالة في الجسم فكلما زادت السمنة زاد مستوى هرمون الاندروجين وذلك بسبب تحول الكوليسترول بسلسلة عمليات أيضية إلى هرمون التستوستيرون المحيطي والذي يعد مصدراً آخر لهذا الهرمون فضلاً عن المبيض (Fassnacht *et al.*, 2003; Pasquali, 2006; Recabarren *et al.*, 2008; Valkeuburg *et al.*, 2008)

تكون العلاقة عكسية بين زيادة الوزن وعملية الاباضة إذ أن زيادة الوزن قد تسبب زيادة ترسب الشحوم حول المبيض مما يؤدي إلى تكيس البويضات داخل المبيض وعدم حصول الاباضة واضطراب

الدورة الشهرية وتأخر الحمل (Reaven, 1995; Inzucchi *et al.*, 1998)، وهناك دراسات تشير إلى أن زيادة الوزن تحدث كذلك نتيجة زيادة مستويات الأنسولين مما يحفز المبيض على تكوين هرمون التستوستيرون لذلك فإن زيادة الوزن يرافقها دائماً زيادة هرمون التستوستيرون (Conway, 2000)، كما يقلل الأنسولين إنتاج (SHBG)، كذلك يعمل الأنسولين على تصفية السكر من الدم من خلال زيادة استخدامه من قبل الخلايا وزيادة تحويله إلى كلايوجين في الكبد والعضلات، فهو يسهل دخول الكلوكوز إلى داخل الخلايا وبصورة خاصة ألياف العضلات الهيكلية وعضلة القلب ومن ثم تحويله إلى أحماض دهنية مما يجعل الخلايا بدينة وهذا ما يفسر إصابة الكثير من النساء اللواتي يعانين من التكيس بالسمنة المفرطة وزيادة الوزن كما أكدت ذلك بعض الدراسات (Nestler, 1997; Banaszewska *et al.*, 2003). وقد تعود تلك الزيادة في الوزن إلى احتمال ارتفاع تركيز الكولسترول الكلي في المصل بشكل معنوي الذي ينتج عن ارتفاع في تركيز البروتينات الدهنية واطئة الكثافة Low Density Lipoproteins (LDL) في المصل، فضلاً عن ذلك يكون تركيز الكسريدات الثلاثية قد ارتفع بفعل الإصابة بالمتلازمة مما يؤدي إلى حصول زيادة معنوية في الوزن واضطراب في توزيع الدهون وهذا ما تم تأكيده من قبل العديد من الباحثين (Birdsall *et al.*, 1997; Legro *et al.*, 1999; Sir-Petermann *et al.*, 2001).

أما بالنسبة للعمر فلم تظهر أية فروقات معنوية بين متوسطات الأعمار لكل من النساء المصابات بال-PCOS والسيطرة، إذ كانت الأعمار متقاربة بين المجموعتين وأن جميع الأعمار للعمر التكاثري (12-45) تكون معرضة للإصابة بمتلازمة تكيس المبيض المتعدد (Rotterdam, 2004).

#### 2-1-4 الشعرانية Hirsutism

بينت النتائج في جدول (2-4) ارتفاعاً في النسبة المئوية للنساء اللواتي يعانين من حالة الشعرانية ومصابات بال-PCOS مقارنة مع اللواتي لا تظهر عندهن هذه الحالة ومصابات بال-PCOS، فقد وصلت النسبة المئوية للشعرانية إلى 65.38% مقابل 34.62% لم تظهر لديهن الصفة على التوالي.

تكون الشعرانية متزامنة لدى نساء ال-PCOS وهي من الصفات السريرية الأولية لحالة فرط الاندروجين (Rotterdam, 2004)، وعادة ما تحدث نتيجة ارتفاع نسبة الهرمون الذكري التستوستيرون المفرز من قبل المبيض نتيجة الإفراز العالي للهرمون اللوتيني من الغدة النخامية مقارنة بمستوى هرمون FSH والذي بدوره يجعل الجريبات في المبايض تنتج هرمون التستوستيرون الذكري أكثر من الاستروجين الانثوي (Rotterdam, 2004; Mofid *et al.*, 2007). وقد تعود الزيادة

للشعرانية في نساء المصابات بالـPCOS نتيجة إلى زيادة إنتاج الاندروجينات المفرزة من الغدة الكظرية (Brown, 2007). كما أن للإصابة بداء السكري من النوع الثاني دوراً في زيادة النسبة المئوية للشعرانية وهذا قد يعود إلى زيادة إفراز الأندروجين المبيضي (Diamanti *et al.*, 2004; Dunaif,2005).

جدول ( 2-4 ) النسب المئوية لبعض العلامات السريرية في النساء المصابات بالـPCOS.

النسبة المئوية	العدد	المظاهر
65.38 % 34.62 %	85 45	الشعرانية Hirsutism (Yes) (No)
38.46 % 61.54 %	50 80	تاريخ العائلة Family History (Yes) (No)
36.15 % 63.85 %	47 83	فترات الحيض Menstrual periods (منتظمة) (غير منتظمة)
42.31% 57.69 %	55 75	الإسقاطات Abortions (Yes) (No)
90% 10%	117 13	انعدام الخصوبة Infertility Yes No

3-1-4. التاريخ العائلي لمتلازمة الـPCOS  
Family History of PCOS

أظهرت نتائج الدراسة أن (38.46 %) كان لديهم تاريخ عائلي للمرض (أقرباء من الدرجة الأولى) في حين (61.54%) لم يكن لديهم تاريخ عائلي للمتلازمة (جدول 2-4).

لقد أشارت العديد من الأدلة إلى أن متلازمة تكيس المبيض المتعدد هي من الأمراض الوراثية المعقدة كبقية الأمراض الأخرى مثل الربو (Asthma) وفصام الشخصية (Schizophrenia) وأمراض القلب (Cardiovascular diseases) والسكري (Diabetes) (Vink *et al.*, 2006). فقد أثبت الباحث



Urbanek (2007) دور العوامل الوراثية والبيئية في تطور أمراضية الـ PCOS إذ هنالك عدد من الجينات المسؤولة عن ظهور الأعراض السريرية والامراضية فيه كحالة فرط الاندروجينات والسمنة وفرط الأنسولين وظهور مقاومة الأنسولين وأمراض القلب والسكري من النوع الثاني وحالات سرطان مختلفة.

لقد وجد Kahrar-Millr وجماعته (2001) أن من بين 93 امرأة مصابة بالـ PCOS هناك (40%) منهن أخوات. وفي دراسة أخرى للباحث Legro وجماعته (1998b) توصلوا إلى أن (24%) من النساء المصابات بالـ PCOS ظهرت لديهن حالة فرط الإندروجين مع دورة حيضية منتظمة ، في حين كان مستوى الهرمون الذكري مرتفع لجميع الأخوات.

كما اثبت Norman وجماعته (1996) أن النساء الاستراليات الشقيقات والمصابات بالـ PCOS ظهرت في (70%) منهن صفة ارتفاع مستوى الأنسولين في الدم Hyperinsulinemia ، في حين ذكر Vrbikova وجماعته (2008) ان النساء المصابات بالـ PCOS ولديهن تاريخ عائلي (FH+) لمرض السكري النوع الثاني يظهرهن مقاومة للأنسولين وخلل تحمل للكلوكوز (Impaired glucose tolerance) أعلى من النساء اللواتي ليس لديهن تاريخ عائلي للمرض (FH-). ولذلك فأن انتشار متلازمة تكيس المبيض المتعدد بين الأقارب من الدرجة الأولى يُعد عاملاً إيجابياً خطراً في إعطاء معلومات عن تطور حالة الـ PCOS (Azziz and Kahrar-Miller, 2000).

#### 4-1-4. فترات الحيض Menstrual periods

يبين الجدول (2-4) أن النساء المصابات بالـ PCOS يعانين من اضطراب في فترات الحيض ، إذ يلاحظ (63.85%) يعانين من عدم انتظام الدورة الحيضية مقابل (36.15%) كانت لديهن دورة حيضية منتظمة .

تؤدي الاضطرابات في المستويات الهرمونية الدور الأكبر في اضطرابات الدورة الحيضية إذ يزيد ارتفاع مستوى الهرمونات الاندروجينية (الهرمون الذكري) عن الحد الطبيعي في حصول ذلك الاضطراب ومن ثم توقف الإباضة، فضلاً عن أن اضطراب الدورة الحيضية ونزول الطمث بفترات غير منتظمة Oligomenorrhae أو غياب الطمث Amenorrhea تؤدي إلى اضطراب في عملية الإباضة Ovulation ومن ثم حصول انعدام الخصوبة (Hart et al., 2004). كذلك انخفاض إفراز هرمون الاستروجين والبروجستيرون يؤدي إلى تثخن بطانة الرحم وقد

تتطور الحالة إلى فرط التنسج لبطانة الرحم Endometrial Hyperplasia التي قد تقود للإصابة بسرطان الرحم (Hardiman *et al.*, 2003; Current, 2008).

#### 4-1-5. الإجهاض ومتلازمة الـ PCOS Abortion and PCOS

لقد أظهرت النتائج في جدول (4-2) وجود حالة الإسقاطات عند النساء المصابات بالـ PCOS بحوالي (42.31%) مقابل (57.69%) مصابة بتكيس المبيض المتعدد ولم تتعرض لحالة الإجهاض . هناك العديد من العوامل التي تؤدي دوراً رئيساً في زيادة مخاطر حالات الإسقاطات المتكررة Recurrent Pregnancy Loss (RPL) عند النساء المصابات بمتلازمة الـ PCOS ، فقد أشار Homburg وجماعته (1993) إلى أن حالات الإسقاطات المستمرة تكون مرتبطة بارتفاع مستوى الهرمون اللوتيني وهرمون الشحمون الخصوي في الدم. كذلك لوحظ زيادة حالات (RPL) مع زيادة الإجهاد التأكسدي وزيادة العوامل المؤكسدة (Agarwal *et al.*, 2012) . وتلعب السمنة وإرتفاع دليل كتلة الجسم (BMI) كمؤشر خطير في زيادة حالات الإسقاطات المنكرة عند نساء الـ PCOS (Wang *et al.*, 2001). كذلك تلعب الجينات دوراً هاماً في عملية الاجهاض Miscarriage والاسقاطات المتكررة عند النساء ومنها جين الساييتوكروم CYP17 ، فقد اثبت Sata وجماعته (2003) ارتباط الاليل A2 لجين CYP17 مع (RPL) للنساء المصابات بالـ PCOS.

#### 4-1-6. انعدام الخصوبة Infertility

لوحظ ارتفاع نسبة حالة انعدام الخصوبة لدى النساء المصابات بالـ PCOS ، فقد كانت النسبة المئوية لانعدام الخصوبة إلى (90%) مقابل (10%) فقط لم تظهر لديهن الصفة (جدول 4-2) أن الارتفاع الكبير للنسبة المئوية لانعدام الخصوبة لانعدام الخصوبة لدى النساء المصابات بتكيس المبيض المتعدد قد يُعزى إلى عدة أسباب منها حالة نقص الدرقية (Hypothyroidism) وذلك بسبب النقصان في الهرمون ثلاثي يوديد الثايرونين (T3) (Tri Iodo Thyronine) وارتفاع في تركيز الهرمون المحفز للدرقية (TSH) وهذا قد يؤدي إلى زيادة إفراز الشحمون الخصوي وحدوث حالة انعدام الخصوبة إضافة أن ارتفاع مستوى (TSH) يؤثر على ايض الاستروجين كما وانه يقلل من انتاج (SHBG) في الكبد وبذلك يرتفع مستوى تركيز هرمون التستوستيرون الحر (Dahiya *et al.*, 2012)، كذلك قد تلعب الزيادة في تركيز الكوليسترول الكلي لدى مرضى متلازمة تكيس المبيض دوراً كبيراً في حال انعدام الخصوبة وذلك لكونه المصدر الرئيس لتكوين الهرمونات الستيرويدية ومن بينها الاندروجينات (Miettinen *et al.*, 2001)

كما تلعب السمنة وزيادة BMI دوراً في انعدام الخصوبة إذ أشار Balen وجماعته (1995) إلى أن ارتفاع معدل إنعدام الخصوبة لدى النساء اللواتي يكون لديهن BMI عالياً  $BMI > 30 \text{kg/m}^2$ . كذلك هنالك دور مهم لغدة ما تحت المهاد والاختلال الحاصل في إفراز هرموناتها المحررة لمحرضات القند (GnRH) في إحداث حالة إنعدام الخصوبة لدى نساء الـ PCOS (Walddstriecher *et al.*, 1988).

هذا ويوجد تفسير آخر لحصول انعدام الخصوبة في نساء الـ PCOS وهو وجود اختلال في محور تحت المهاد – النخامية (Hypothalamic – Pituitary axis) الأمر الذي قد يعمل زيادة في نسبة إفراز الهرمون اللوتيني إلى الهرمون المحفز للجريب (LH / FSH) وبالنتيجة تحفيز خلايا القراب Theca Cells للمبيض لإفراز مستويات أعلى من هرمون التستوستيرون مما قد يسبب اختلال في نمو وتطور الحويصلات المبيضية (Ibanze *et al.*, 2002).

#### 2-4. الدراسة الهرمونية للنساء المصابات بالـ PCOS 1-2-4. هرمونات الغدة النخامية (LH – FSH).

تشير نتائج الجدول (3-4) إلى ارتفاع متوسط تراكيز هرمونات مغذيات القند وهما هرمون محفز الجريبات FSH وهرمون الجسم الأصفر LH، فقد بلغ مستوى هرمون LH في نساء الـ PCOS  $(16.86 \pm 0.57)$  ملي وحدة دولية/ ملتر عند مستوى معنوي عالي ( $P \leq 0.01$ ) بالمقارنة مع مستوى LH في نساء السيطرة الذي يبلغ متوسط تراكيز الهرمون فيها  $(6.43 \pm 0.35)$  ملي وحدة دولية / ملتر في حين بلغت معدل متوسط تركيز هرمون FSH  $(5.60 \pm 0.52)$  في النساء المصابات بالـ PCOS بالمقارنة مع متوسط قياسه عند نساء السيطرة  $(4.09 \pm 0.6)$  ملي وحدة دولية / ملتر. أن نمو حويصلات المبيض يتم تحت سيطرة هرموني FSH و LH ، لذلك اقترح Brown (1978) أن استجابة المبيض تكون عند وصول هرمون FSH إلى المستوى المطلوب وان مستوى FSH يكون متغاير خلال الطور الجريبي وذلك لنمو الجريبة والتحسن لتحفيز مغذيات القند ، إذ أن LH يحفز الاباضة ومن ثم يحفز الجسم الاصفر على تكوين الهرمونات الستيرويدية steriodogenesis (Hillier,1993) ولكن المستوى العالي منه يكبح فعالية الاروماتيز (Aromatase) ويثبط نمو الخلية البيضية (Overes *et al.*, 1992) إذ تشير هذه الدراسة إلى ارتفاع هرمون LH في الطور الجريبي مقارنة بعينة السيطرة وهذا يؤدي إلى الاضطراب الهرموني وبالتالي عدم حدوث الاباضة.

تُعد الغدة النخامية وتحت المهاد من الأعضاء الرئيسية التي تنظم الآلية التي يعمل من خلالها نظام الغدد الصم (Herman *et al.*, 1996) ففي الفص الأمامي للغدة النخامية يعمل الجهاز البائي على إنتاج الببتيدات التي ترتبط مع المستقبلات النوعية المتواجدة على سطوح الخلايا وبذلك فإنها أما أن تعمل على تحرير الهرمون Hormone release أو تثبيط الهرمون Hormone inhibition كما يعمل تحت المهاد على تحفيز إنتاج مغذيات المناسل من الغدة النخامية من خلال الإنتاج النبضي (Pulsatile production) للهرمونات المحررة لمغذيات المناسل وبذلك تتم عملية تحفيز الاستنساخ الجيني لمغذيات المناسل (LH, FSH) (Turgeon *et al.*, 1996) ، فعند ازدياد معدل التكرار النبضي (معدل إطلاق) الهرمونات المحررة لمغذيات المناسل فإن ذلك يؤدي إلى تحفيز استنساخ الوحدة الثانوية بيتا (B –sub unit) للهرمون اللوتيني أكثر من الهرمون المحفز للجريبات المبيضية وبالعكس فإن انخفاض التردد أو التكرار النبضي لمعدل تحرير الهرمونات المطلقة لمغذيات المناسل يؤدي إلى تثبيط استنساخ الوحدة الثانوية بيتا لهرمون LH وبالتالي اختزال أو تقليل استنساخ الهرمون LH أكثر من هرمون FSH (Haisenleder *et al.*, 1991)

لقد ذكر بعض الباحثين أن أي تغير في المعلومات الواردة للجهاز العصبي والمتسببة عن هرمون الأنسولين وعامل النمو المشابه للأنسولين (IGF) – like growth (Speroff *et al.*, 1999 ; Coffler *et al.* , 2003 ; Yarak *et al.*, 2005). كما أن عملية إنتاج الاندروجينات من الاندروستيرويدات والاسترون ربما تزيد من حساسية الغدة النخامية للهرمونات المحررة من المناسل فضلا عن فعلها المؤثر في زيادة حساسية الهرمونات المحررة لمغذيات المناسل لمستقبلاتها على السطوح الخلوية الأمر الذي يسهم وبشكل فعال في إحداث الأمراض أو إظهار الأعراض المرضية المترافقة مع متلازمة التكريس وبالتالي ارتفاع تركيز LH معنوياً في الدم وازدياد سرعة استجابته وبشكل مفرط لمغذيات المناسل (Lobo *et al.*, 1981).

جدول (3-4) : دراسة المعايير الهرمونية في النساء المصابات بالـ PCOS مقارنة بنساء السيطرة (Mean ± SD) .

Estradiol Pg/ml	Progesterone ng/ml	Prolactin ng/ml	Testosterone ng/ml	FSH mIU/ml	LH mIU/ml	المجموعات
B 56.76 ±1.91	B 8.21 ±0.86	A 17.67 ±1.11	A 1.09±0.12	A 5.60. ±0.52	A 16.86 ±0.57	PCOS
A 96.22 ±2.01	A 15.40±1.02	B 8.14±0.9	B 0.38±0.05	B 4.09±0.6	B 6.43±0.35	Control
0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	مستوى المعنوية

Mean ±SD : المتوسط ± الانحراف القياسي  
المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنوياً.

#### 2-2-4. هرمون التستوستيرون Testosterone Hormone

تبين نتائج الجدول (3-4) أن متوسط تركيز هرمون التستوستيرون T ارتفع معنوياً عند مستوى احتمالية ( $P \leq 0.01$ ) لدى مجموعة النساء المصابات بالـ PCOS ( $1.09 \pm 0.12$ ) نانومول/ لتر مقارنة مع مجموعة السيطرة ( $0.38 \pm 0.05$ ) نانومول/ لتر وجاء ذلك متفقاً مع ما ذكره العديد من البحوث في هذا المجال ( Gilling-Smith *et al.*, 1994; Sporada and Papic, 2004) ، أن الأندروجينات تشتق عادةً من الكوليستيرول في المبايض والغدة الكظرية ، كما أنها تنتج في العضلات والكبد والجلد والأنسجة الدهنية وذلك من خلال عملية تحويل أنواع معينة من الستيرويدات (Nelson *et al.*, 1999) ففي العضلات والأنسجة الدهنية تضاف مجموعة كيميائية إلى الأندروجينات لتتحول إلى استروجينات (Aromatization) وبذلك يتحول هرمون التستوستيرون والأندروستيديون androsteindione إلى استروجينات ( Estrone , Estradiol ) ، وهذا يتوافق مع ما ذكره Frhan (2003) إذ كانت نسبة تركيز هرمون التستوستيرون في عينة المصابات بخلل الطور اللوتيني أعلى من السيطرة إذ إن زيادة LH ينتج عن الإصابة بتكيس المبايض الذي يسبب ارتفاع التستوستيرون واضطراب الهرمونات الأخرى.

## 3-2-4. هرمون البرولاكتين Prolactin Hormone

يتضح من الجدول (3-4) ارتفاعاً عالياً في مستوى هرمون البرولاكتين في مصل النساء اللواتي يعانين من متلازمة تكيس المبايض المتعدد ارتفاعاً معنوياً ( $P \leq 0.01$ ) ملحوظاً فقد بلغ  $(17.67 \pm 1.11)$  نانو غرام / مل مقارنة مع مجموعة السيطرة  $(8.14 \pm 0.9)$  نانو غرام / مل. وجاء هذا يتوافق مع ما أشار إليه Ehrmann (2005). كما بين Lee وجماعته (1986) أن هرمون البرولاكتين يكبح فعالية الأروماتيز للخلايا الحبيبية للمبيض وبذلك يدعم نظرية دور البرولاكتين في كبح النضج الجريبي وعدم الإباضة ومن ثم عدم الإخصاب.

ومن المحتمل أن يؤدي الارتفاع في نسبة الإصابة بمتلازمة تكيس المبايض المتعدد إلى حالة من الإضطراب النفسي والعصبية في النساء المصابات بهذه المتلازمة وهذا يؤدي إلى إصابتهم بالقلق الشديد أو ما يسمى بالحصص النفسي (Anxiety) (Barry et al., 2011)، إذ انه من المسلمات العلمية كون تركيز هرمون البرولاكتين يرتفع معنوياً في مجرى الدم تحت تأثير الإجهاد الناتج عن ترويدي الأوضاع الصحية والنفسية، فقد أوكل من (Hull, 1987; Urbanek and Spielman, 2002) إلى أن العوامل الفسلجية التي تحدث زيادة معنوية في تركيز الهرمون هي الإجهاد والحمل والرضاعة والنوم والتمارين الرياضية، كما يرتفع أيضاً بتأثير بعض الأدوية والمضادات الحيوية وان هرمون البرولاكتين ليس له عامل محرر خاص به، إلا أن تحت المهاد يفرز مادة عصبية إفرازية تثبط إفراز هرمون البرولاكتين وتسمى العامل المثبط للبرولاكتين (Prolactin Inhibiting factor) PIF (Boon et al., 2006).

## 4-2-4. هرمون البروجستيرون Progesterone Hormone

أشارت النتائج المبينة في الجدول (3-4) إلى وجود انخفاض معنوي كبير ( $P \leq 0.01$ ) في معدل تركيز هرمون البروجستيرون للمجموعة المصابة بالـ PCOS  $(8.21 \pm 0.86)$  نانو غرام / مل عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة  $(15.40 \pm 1.02)$  نانو غرام / مل وهذا يتفق مع نتائج دراسات أخرى أشارت إلى انخفاض تركيز البروجستيرون في نساء الـ PCOS الذي يحصل بسبب تحول البروجستيرون إلى اندروجين قبل الإباضة وان عدم حصول الإباضة يمنع تكوين الجسم الأصفر وبالتالي يقلل إنتاج البروجستيرون (Gilling-Smith, 1994; Conway, 2000)، إذ أن البروجستيرون هرمون ستيرويدي يفرز من قبل الجسم الأصفر، وهو مسؤول عن إفرازات الرحم الضرورية لزراعة الجنين ولهذا فهو يقوم بحماية الحمل بواسطة إختزال التقلصات الرحمية (Marc et al., 2002)

يعد هرمون البروجستيرون من أكثر البروجستينات فعالية من الناحية البايولوجية الذي يتكون بصورة رئيسة من الجسم الأصفر في المبيض فضلاً عن قشرة الكظرية والمشيمة والخصية ، إذ انه يظهر بصورة مفاجئة في يوم الإباضة في البول، وذلك نتيجة تايضه وتحوله بشكل رئيس إلى بركناندايول (Frhan, 2003). يتم التصنيع الحيوي للبروجستيرون من الخلات التي تُحوّله إلى كوليستيرون يتحول بدوره إلى المركب الوسطي الرئيس وهو البركنينولون حيث ينتج بعد ذلك البروجستيرون ، الذي يختزل في الكبد ليتحول بعد ذلك إلى بركناندايول الذي يطرح مع البول (عشير و العلوجي، 1989) .

#### 5-2-4. هرمون الايسترادايول (E2) Estradiol Hormone

كان متوسط تركيز الايسترادايول ( $56.76 \pm 1.91$ ) بيكوغرام / مل في النساء المصابات بال-PCOS التي أظهرت انخفاضاً معنوياً كبيراً ( $P \leq 0.01$ )، مقارنة مع عينة السيطرة ( $2.01 \pm 96.22$ ) بيكوغرام/ مل.

أن ارتفاع LH في المصل الذي ينتج عنه عدم الإباضة وعدم انتظام الدورة الشهرية وتنتظم الدورة الشهرية بدرجة كبيرة عن طريق الايسترادايول فالعلاقة بين التغذية الراجعة السالبة لكل من الاستروجين و FSH ينتج عنها زيادة في مستوى الهرمونات الموجهة للفند خلال دورة الطمث (Burger *et al.*, 1985).

وتحفز العلاقة الراجعة الموجبة بين الايسترادايول وLH عملية الإباضة داخل خلايا المبيض ، إذ يحفز الايسترادايول استجابة المستقبلات الحوصلية الضرورية لنمو الجريبة وتطويرها ، فأن الزيادة إفراز الاستروجين في المبيض (والادريالية أيضاً) في مرحلة قبل الإباضة يحفز تحت المهاد على إفراز GnRH ، والذي يحفز الفص الأمامي للغدة النخامية لإفراز LH الذي يؤثر على الحويصلة المبيضية حيث تقوم Theca Cell بإنتاج الاندروجين ثم تحويله إلى استروجين بتأثير هرمون FSH ، كذلك يصنع الاستروجين من الكولستيرون في المبيض أيضاً (Robert, 1981). إن أي خلل في واحدة أو أكثر من الأدوار التي يقوم بها الايسترادايول، قد يؤدي إلى خلل في الدورة ، فالارتفاع في مستوى الايسترادايول عندما يكون مترافقاً مع مستويات قليلة من البروجسترون قد يؤدي إلى زيادة في استجابة الهرمون المحرر للهرمونات موجهة الفند (LH , FSH-RH) وبالتالي قد يؤدي إلى ارتفاع في مستوى (LH) ومن ثم تنتج حالة عدم إباضة ثانية (Lemarchand-Beraud *et al.*, 1982).

3-4. الدراسة الوراثية الخلوية لمتلازمة تكيس المبايض المتعدد

1-3-4. معامل الانقسام MI (Mitotic Index)

يحسب معامل الانقسام كدليل لعدد الخلايا المنقسمة التي تكون في أطوار انقسامية مختلفة إلى العدد الكلي للخلايا المنقسمة وغير المنقسمة (Gosh et al., 1991)، تشير النتائج الموضحة في جدول (4-4) المتعلق بمقارنة معدلات معامل الانقسام الخلوي (MI) عند النساء المصابات بال-PCOS مع مجموعة نساء السيطرة إلى انخفاض MI وبمستوى معنوي ( $P \leq 0.001$ ) إذ بلغت (1.27) و (3.66) على التوالي.

جدول (4-4) معدل معامل الانقسام والنوى الصغرى و الانحرافات الكروموسومية في الخلايا اللمفاوية في الدم المحيطي للنساء المصابات بمتلازمة ال- (PCOS) ونساء السيطرة (Mean± SD).

مستوى المعنوية $P \leq$	السيطرة	النساء المصابات بال-PCOS	المؤشرات الوراثية
0.001	A 3.66±0.48	B 1.27±0.54	معامل الانقسام Mitotic Index(MI)
0.001	B 1.90±0.31	A 6.75± 0.49	النوى الصغيرة Micronucleus(MN)
0.001	B 0.026±0.09	A 2.102±0.05	الانحرافات الكروموسومية Chromosomal Aberations(CA)

Mean ±SD : المتوسط ± الانحراف القياسي

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنوياً.

يُعد اختبار معامل الانقسام الخيطي ومعامل التشوه الكروموسومي أدلة وراثية للكشف عن التأثيرات السمية الخلوية الناتجة من العوامل الفيزيائية والكيميائية (King et al., 1982). وأن الانقسام الخيطي هو احد مراحل دورة حياة الخلية ( $M, G_1, S, G_2$ ) وهو عملية متواصلة يتم فيها مضاعفة المادة الوراثية خلال الطور البنائي (S - phase) من دورة الانقسام ، وتختلف الفترة الزمنية التي تحتاجها الخلايا للانقسام من نوع لأخر من الكائنات ومن عضو لأخر ومن خلية لأخرى (Tamarin, 1996). فقد أشارت بعض البحوث العلمية إلى أن الإصابة ببعض الأمراض يؤدي إلى تثبيط في معامل MI كأمراض السرطان وبعض الأمراض الوراثية (Fadhel, 2002). فمن المحتمل حصول خلل في إحدى مراحل الدورة الخلوية سبب عدم مقدرة الخلية في الوصول إلى مرحلة الأنقسام الخيطي وذلك نتيجة الاضطرابات



الهرمونية والايضية الكبيرة التي تحدث في النساء المصابات بال-PCOS (Nersesyian *et al.*, 2006) حيث انخفضت قيمة MI وبشكل معنوي كبير ( $P \leq 0.001$ ) في نساء PCOS مقارنة بمجموعة السيطرة .

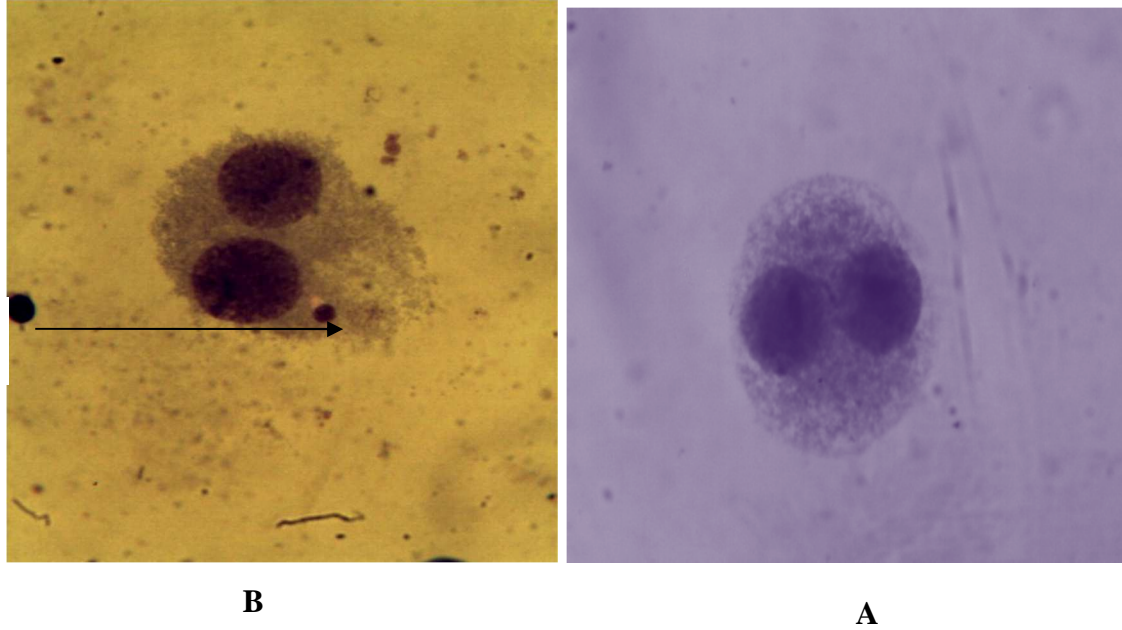
### 2-3-4. اختبار النوى الصغرى MN (Micronucleus assay)

لقد أظهرت نتائج الدراسة زيادة في معدل النوى الصغرى للنساء المصابات بال-PCOS مقارنة بالنساء السليمات في جدول (4-4) إذ يلاحظ وجود فرق معنوي عالي ( $P \leq 0.001$ ) عند المقارنة بين المجموعتين، وكانت قيم معدلات النوى الصغرى لتلك المجموعتين ( $6.75 \pm 0.49$ ) و ( $1.90 \pm 0.31$ ) على التوالي . وهذا يشير إلى حدوث عدم استقرار في الجينوم البشري و تلف معين في الـ DNA إذ تتوافق هذه النتائج مع دراسات عالمية أخرى (Yesilada *et al.*, 2006; Hamurcu *et al.*, 2010).

هنالك الكثير من العوامل والأسباب الرئيسية التي تؤدي إلى ارتفاع MN عند النساء المصابات بال-PCOS ، فالمظاهر السريرية والاضطرابات الايضية المصاحبة مثل حالة فرط الأنسولين وفرط الاندروجينات تلعب دوراً رئيساً في زيادة عدد الأنوية الصغيرة في الخلايا اللمفاوية للدم المحيطي (Dunaif,1997; Rosenfield,1999; Andreassi *et al.*, 2011). الشكل (1-4)

تحدث الإجهادات الذاتية Spontaneous abortions بنسبة 40 % في نساء ال-PCOS ، وعادة يرتبط ارتفاع معدل الـ MN مع النساء اللواتي يتعرضن لتلك الإجهادات (Trkova *et al.*, 2000). كما أن حالة الإجهاد التأكسدي التي تحدث نتيجة عدم التوازن ما بين العوامل المؤكسدة والمضادة للأكسدة التي تتعرض لها نساء ال-PCOS تزيد أيضاً من ارتفاع MN ، فقد وجدت علاقة وثيقة بين مستوى الأكسدة وزيادة عدد الانوية الصغيرة (Yesilada *et al.*, 2006).

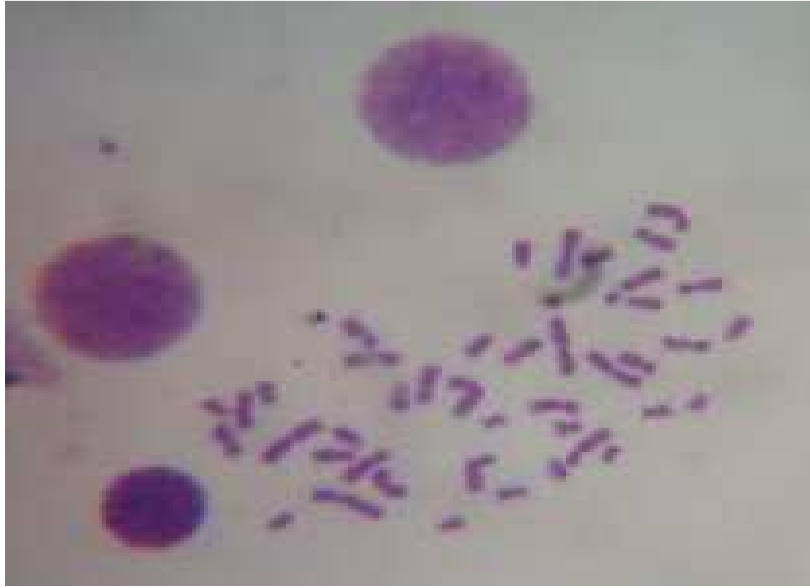
فضلاً عن ذلك توجد علاقة قوية ما بين السمنة المفرطة وزيادة دليل كتلة الجسم ومقاومة الأنسولين وارتفاع عدد الانوية الصغيرة وهذا ما أشار إليه Andreassi وجماعته (2011). وفي العادة ترتبط السمنة ارتباطاً وثيقاً مع أمراض القلب المختلفة ، فقد لوحظ أن النساء البدينات تزداد لديهن مخاطر الإصابة بأمراض القلب وزيادة عدد الأنوية الصغيرة (Federici *et al.*, 2008) ، كما تشترك العوامل البيئية ومنها الغذاء وطبيعة المعيشة في ارتفاع عدد MN (Fenech and Bonassi, 2011).



شكل (1-4) الأنوية الصغرى للخلايا المفاوية ثنائية النواة (صبغة Giemsa ، قوة التكبير X 100)  
 A- خلية لمفاوية ثنائية النواة غير حاوية على أنوية صغرى ( مجموعة السيطرة ) B- خلية لمفاوية  
 ثنائية النواة تحتوي على نوية صغيرة واحدة (مجموعة الـPCOS) .

### 3-3-4. الانحرافات الكروموسومية (CAs) 3-3-4

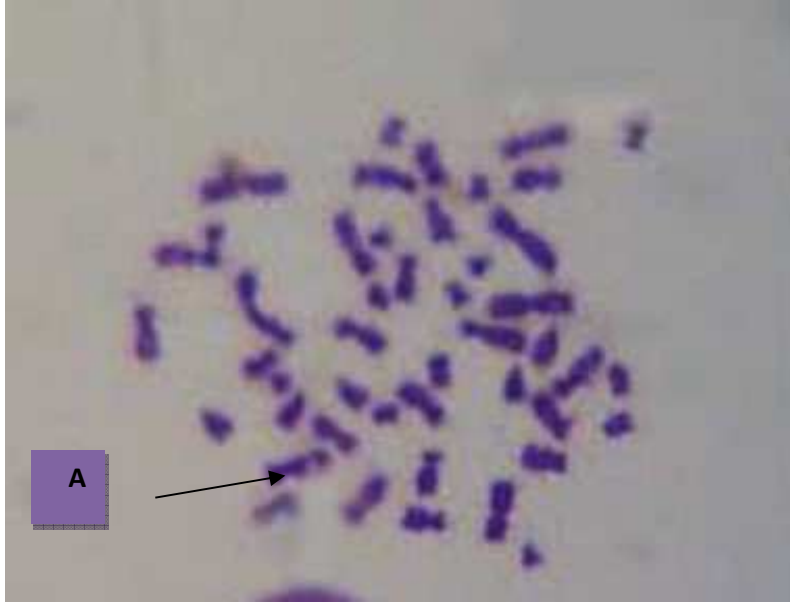
لقد ازداد معدل الانحرافات الكروموسومية (CAs) في نساء الـPCOS مقارنةً مع مجموعة النساء السليمات ( السيطرة ) إذ تشير نتائج مقارنة المعدلات الموضحة في جدول (4-4) إلى وجود فرق معنوي عالي ( $P \leq 0.001$ ) ، حيث ظهرت انحرافات كروموسومية مختلفة لعينة النساء المصابة بمتلازمة الـPCOS مثل (الحذف و فرط المجموعة الكروموسومية والكسور الكروموسومية والكروموسوم ثنائي المركز) وبلغت النسبة المئوية لمعدلات الانحرافات الكروموسومية (2.102%) مقابل ( 0.026 % ) على التوالي (الاشكال 2-4 و 3-4 و 4-4 و 5-4).



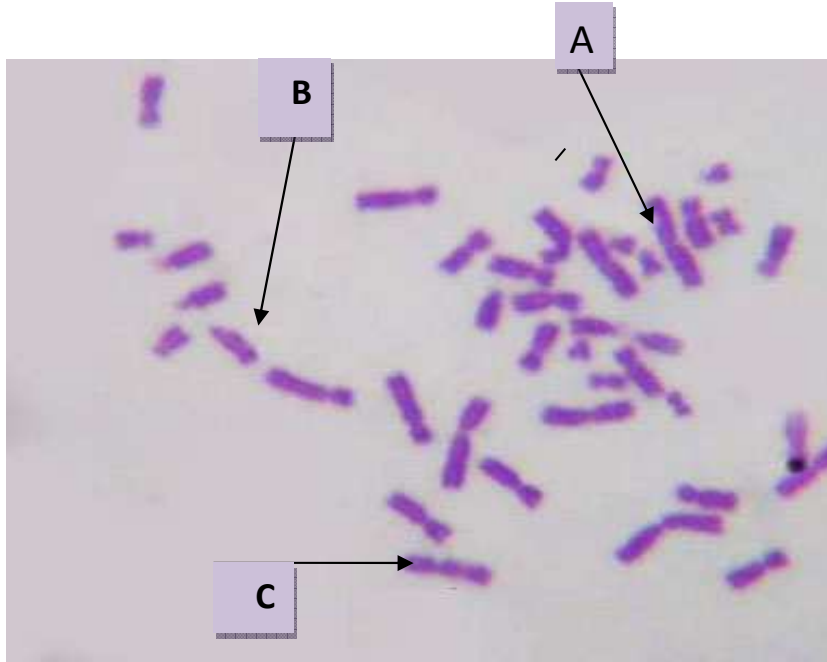
شكل (4-2) : الكروموسومات الطبيعية في خلية لمفاوية لامرأة من مجموعة السيطرة ( صبغة Giemsa ، قوة التكبير 1000 X )



شكل (4-3) ظاهرة فرط المجموعة الكروموسومية للخلايا اللمفاوية في الطور الاستوائي لامرأة من مجموعة PCOS ( صبغة Giemsa ، قوة التكبير 1000 X )



شكل (4-4): بعض التغيرات الكروموسومية (CA) الظاهرة في عينات نساء الـPCOS (صبغة Giemsa ، قوة التكبير X 1000 )  
A- حالة الكسور الكروموسومية



شكل (4-5) : بعض التغيرات الكروموسومية في عينات النساء المصابة بمتلازمة الـPCOS (صبغة Giemsa ، قوة التكبير X 1000 )

A- كسر كروموسومي

B- حذف لإحدى قطع الكروموسوم.

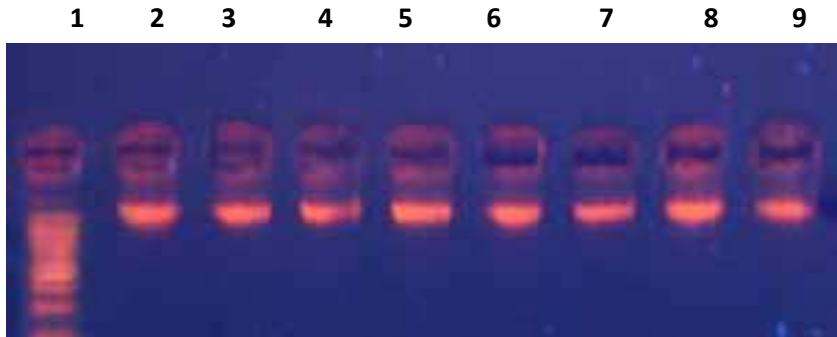
C- الكروموسوم ثنائي السنتروميير.

هناك كثير من العوامل التي تعمل على زيادة نسبة التشوهات الكروموسومية في النساء المصابات بال-PCOS حيث تتعرض إلى الاضطرابات الايضية (السمنة - مقاومة الأنسولين ومرض السكري النوع الثاني) ، فوجد Tafurt-Cardona وجماعته (2012) زيادة معدل الانحرافات الكروموسومية CAS في النساء البدنيات مقارنة بالنساء النحيفات وهذا يشير إلى عدم استقرار ال-DNA واختلاف قابلية إصلاح الضرر الحاصل بال-DNA . كذلك توصل Azim وجماعته (2003) إلى زيادة معدل الانحرافات في النساء اللواتي تعرضن للإسقاطات المتكررة ، في حين Boehm وجماعته (2008) لاحظوا زيادة CAS في النساء المصابات بمرض السكري النوع الثاني.

اقترحت عدد من الدراسات ومنها دراسة Landi and Barale (1999) التي بينت أن ارتفاع معدل CAS والتبادل الكروماتيدي الشقيق (SCE) Sister Chromatide Exchange يعود إلى التغيرات في مستويات الهرمونات الجنسية ، وقد يسهم الإجهاد التأكسدي والعوامل المؤكسدة مثل ROS بصورة كبيرة في ارتفاع معدل CAS في النساء اللواتي تعاني من الاضطرابات والأمراض التكاثرية مثل متلازمة تكيس المبايض المتعدد وحالات الإسقاطات المتكررة وحالة فشل المبايض المبكر (Kumar et Premature Ovarian Failure (POF) (2012).al.,

#### 4-4. الدراسة البيولوجية الجزيئية

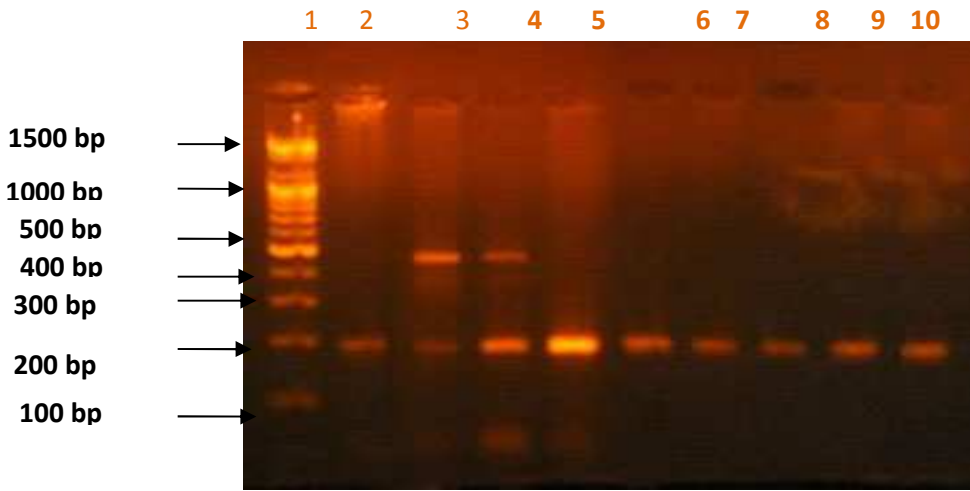
تم استخلاص ال-DNA من جميع عينات الدم قيد الدراسة ، أجري بعدها الترحيل الكهربائي للتأكد من وجود حزم ال-DNA على هلام الأكاروزو المحضر بتركيز ( 0.8 %) تحت فرق جهد 70 فولت/سم وتيار 40 ملي أمبير ولمدة ساعة واحدة ، إذ يتم فحص الحزم تحت جهاز الأشعة فوق البنفسجية المصبوغة بصبغة أنيديوم برومايد شكل (4-6) .



شكل (4-6) الترحيل الكهربائي لحزم ال-DNA لعينات النساء المصابات بال-PCOS على هلام الأكاروز المحضر بتركيز 0.8 % ( 70 فولت/سم - تيار 40 ملي أمبير) لمدة ساعة واحدة .

#### 1-4-4. التوصيف الجزيئي للتعدد المظهري لجين *PGR*.

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لنتائج ال-PCR ثلاثة أنواع من الطرز الوراثية للمجموعتين ، طراز وراثي متماثل (T1T1) Homozygous (Wild Type) يتمثل بالحزمة ذات الحجم الجزيئي 185 bp ، طراز وراثي متماثل (T2T2) Homozygous (representing) يتمثل بالحزمة 485 bp وطراز وراثي غير متماثل (T1T2) Heterozygous يتمثل بالحزمتين (الشكلين 4-7 و 4-8).

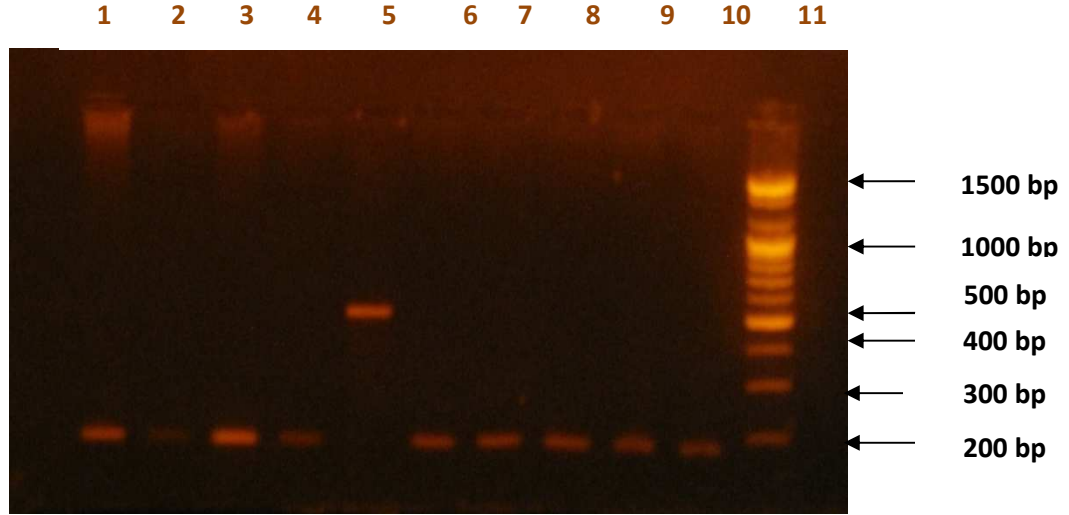


شكل (4-7) الترحيل الكهربائي لنتائج ال-PCR لجين مستقبل البروجستيرون (*PGR*) لتوصيف التعدد المظهري على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% عند فرق جهد 70 فولت/سم وتيار 40 ملي أمبير ولمدة ساعتين.

المجال 1 DNA Ladder (100-1500 bp) .

المجال (2,5,6,7,8,9,10) الشكل الاليلي (T1T1 Homozygous-Wild Typ) (185 bp)

المجال (3,4) الشكل الاليلي (T1T2 Heterozygous) (185 bp, 485 bp).



شكل (8-4) الترحيل الكهربائي لنتائج الـ PCR لجين مستقبل البروجستيرون (*PGR*) لتوصيف التعدد المظهري مع انخفاض الشكل الأليلي (T2T2) في المجموعتين على هلام الأكاروز المحضر بتركيز 2% عند فرق جهد 70 فولت/سم وتيار 40 ملي أمبير ولمدة ساعتين..

المجال (1,2,3,4,6,7,8,9,10) الشكل الأليلي (T1T1(Homozygous(Wild Type) (185 bp).  
 المجال (5) الشكل الأليلي (T2T2 (representing) (485 bp).  
 المجال (11) DNA Ladder (1500-100 bp)

يوضح الجدول (4-5) وجود فروق معنوية عالية ( $P \leq 0.001$ ) في الأعداد والنسب المئوية لتكرار الأليلات (T1T1, T1T2, T2T2) والنسبة لمئوية لكل من T1 و T2 لجين *PGR* عند المقارنة بين ومجموعة النساء المصابات بالـ PCOS ومجموعة السيطرة. فضلاً عن ظهور ارتفاع في تكرار الأليل T1T1 في المجموعتين فقد بلغت (57.69 %) و (92 %) على التوالي ( $P \leq 0.001$ ). كما ارتفعت النسبة المئوية وبفارق معنوي كبير ( $P \leq 0.001$ ) لتكرار الأليل المتباين T1T2 في النساء المصابات بالـ PCOS (38.46%) مقارنة مع السيطرة (6%)، بينما كانت النسبة المئوية لتكرار الأليل T2T2 منخفضة في كل من مجموعة السيطرة ومجموعة نساء الـ PCOS (2 %) و (3.85 %) ( $P \leq 0.001$ ) وظهر الفرق المعنوي نفسه عند مقارنة الأليلات الثلاثة في كل مجموعة.

جدول (4-5) النسب المئوية للتعدد المظهري لتوصيف جين ( PRG ) في النساء المصابات بالـ PCOS والسيطرة .

الطرز المظهرية لجين PGR	التعدد المظهري لجين PGR في نساء السيطرة (N) %	التعدد المظهري لجين PGR في نساء الـ PCOS (N) %
T1T1	(92) 92% b A	( 75) 57.69 % a A
T1T2	(6) 6 % b B	(50) 38.46% a B
T2T2	(2) 2% b B	( 5) 3.85% a C
P≤	0.001	0.001
T1 allele (Total )	(95) 95 % b A	(100) 76.92 % a A
T2 allele (Total)	(5) 5 % b B	( 30) 23.08) % a B
P≤	0.001	0.001

(N) % : ( العدد ) و النسبة المئوية

المتوسطات التي تحمل حروف كبيرة مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنوياً.  
المتوسطات التي تحمل حروف صغيرة مختلفة ضمن السطر الواحد تختلف معنوياً.

ومن دراسة العلاقة ما بين مستوى الهرمونات ودليل كتلة الجسم والعمر مع التعدد المظهري لجين مستقبل البروجستيرون PROGINS Polymorphism فقد تم التوصل إلى عدم وجود فروقات معنوية ما بين ارتباط التعدد المظهري للجين للآليلات الثلاثة مع مستوى الهرمونات المدروسة وكتلة الجسم والعمر بالنسبة لكل من النساء المصابات بالـ PCOS والسيطرة (الجدولين 4-6 و 4-7).







أن النساء المصابات بالـPCOS تكون أكثر عرضة للإصابة بالأمراض السرطانية النسائية ، ويساهم في ذلك نقصان الحاصل في هرمونات الأستروجين والبروجستيرون مع زيادة الهرمونات الذكورية (Spritzer *et al.*, 2005) ، إذ يرتبط جين *PGR* مع الفعالية التكاثرية للمرأة (Pepe and Albrecht, 1995; Boucharg,1999; Szekeres *et al.*, 2001) والتأثيرات الفسيولوجية للبروجستيرون تماماً على وجود التعدد المظهري للجين *PGR* (Rowe *et al.*, 1995).

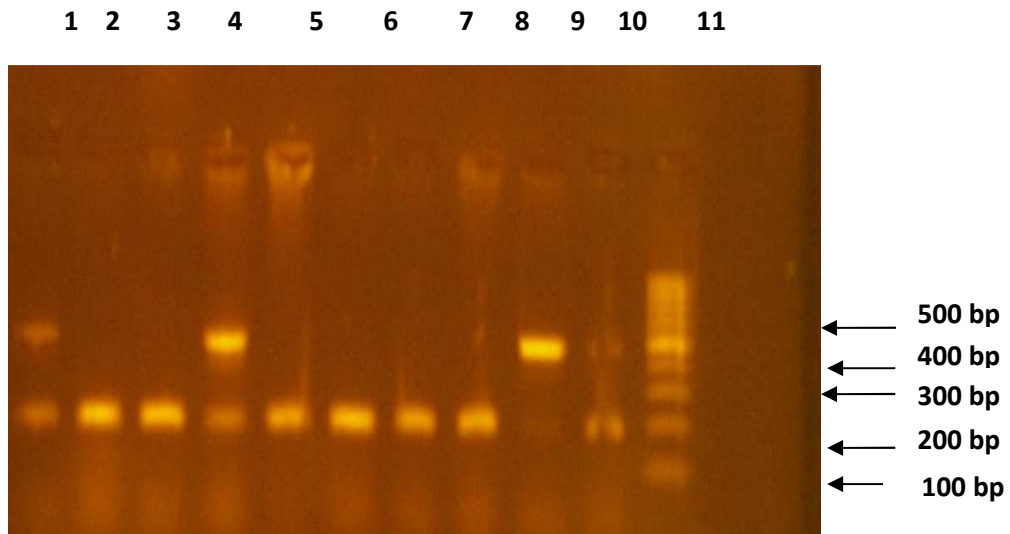
أن نتائج الدراسة الحالية كانت مطابقة لما توصلت إليه دراسة Karadeniz وجماعته (2007b) الذي بحث فيها التعدد المظهري لجين *PGR* في المجتمع التركي بحيث كانت فيه نسبة تكرار الاليل البري T1T1 مرتفعة مقارنة مع بقية الطرز الوراثة الأخرى لكل من نساء الـPCOS والسيطرة في حين انخفضت النسبة المئوية للشكل الاليلي T2T2 في المجموعتين وبلغت (3.2%) للنساء المصابات بالـPCOS و (3.6 %) والسيطرة .

قد تساهم ارتفاع الستيرويدات في زيادة مخاطر الإصابة بسرطان الرحم ، فقد أثبت O'Mara وجماعته (2011) عند دراسته التباين في أشكال النيوكليوتيدة المفردة (Single nucleotide polymorphisms) PNP's ارتباط الطفرة rs 11224561 في المنطقة غير المترجمة في جين *PGR* في المجتمع الآسيوي. أما Johnatty وجماعته (2008) فقد وجدوا ارتباط الطفرة (rs1042838) مع زيادة المخاطر بالإصابة بسرطان الثدي .

وقد وجد Wang-Gohrke وجماعته (2000) انخفاض تكرار الاليل المتغاير T2T2 عند النساء المصابات بسرطان المبيض بعد سن 50 سنة مقارنة بالنساء السليمات ، إذ وصلت نسبته إلى (0.9 %) عند النساء المصابات بسرطان المبيض و (3.1%) عند نساء السيطرة .

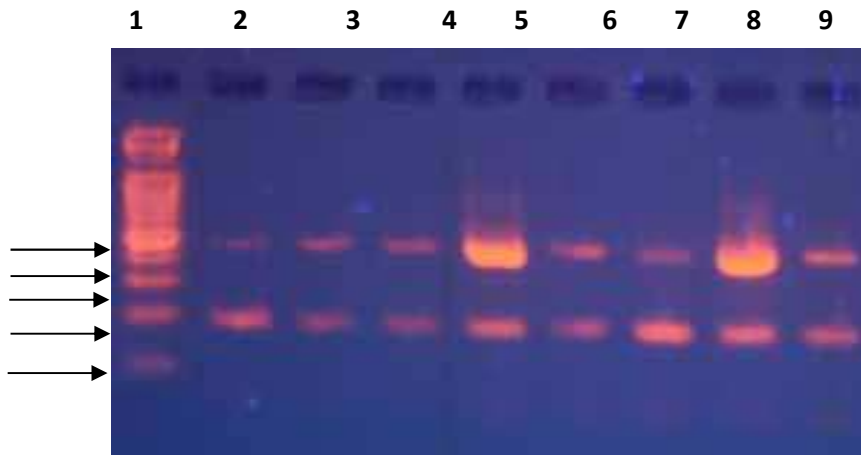
#### 2-4-4. التوصيف الجزيئي للتعدد المظهري لجين *ACE*.

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لنتائج الـPCR وجود ثلاثة أنواع من الطرز الوراثة للمجموعتين ، طراز وراثي متمائل (DD) Homozygous(Deletion) تمثل بالحزمة ذات الحجم الجزيئي 190 bp وطراز وراثي متمائل (II) Homozygous (Insertion) تمثل بالحزمة 490 bp وطراز وراثي غير متمائل (ID) Heterozygous تمثل بالحزمتين (bp490, bp 190) (الشكل 4-9 و 4-10).



شكل (4-9) الترحيل الكهربائي لنتائج الـ PCR لجين Angiotensin converting Enzyme (*ACE*) لتوصيف التعدد المظهري على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% وبفرق جهد 70 فولت/سم وتيار 40 ملي أمبير ولمدة ساعتين.

المجال (2, 3, 5, 6, 7, 8) الشكل الاليلي (DD) Deletion (bp 190)  
 المجال (9) الشكل الاليلي (II) Insertion (bp 490)  
 المجال (1, 4, 10) الشكل الاليلي (DI) (bp 190 , bp 490).  
 المجال (11) DNA Ladder (bp 1000-100)



شكل (4-10) الترحيل الكهربائي لنتائج الـ PCR لجين Angiotensin converting Enzyme (*ACE*) لتوصيف التعدد المظهري وسيادة الشكل الاليلي (D / I) في النساء المصابات بالـ PCOS ونساء السيطرة ، على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% وبفرق جهد 70 فولت/سم وتيار 40 ملي أمبير ولمدة ساعتين.

المجال (1) DNA Ladder (bp 1000-100)  
 المجال (2,3,4,5,6,7,8,9) الشكل الاليلي (DI) (bp 190 , 490).

يلاحظ من الجدول (4- 8) وجود فرق معنوي ( $P \leq 0.001$ ) في عدد تكرارات الاليلات الثلاثة (DD) و (DI) و (II) بين مجموعة نساء الـ PCOS ونساء السيطرة وكذلك الأمر بالنسبة لتكرار الاليل (D) و (I) الكلي. أما عند المقارنة بين العدد والنسب المئوية لكل من الأشكال الاليلية الجينية الثلاثة في كل مجموعة ، يلاحظ وجود فرق معنوي ( $P \leq 0.001$ ) ففي مجموعة نساء المصابات بالـPCOS- بلغ تكرار الاليل ID أعلى النسب (73.85%) مقابل (20 %) و (6.15 %) لكل من تكرار الاليل DD و II على التوالي ، كذلك الحال بالنسبة للعدد والنسب المئوية إلى اليليات الثلاثة بمجموعة السيطرة وظهر الفرق المعنوي ( $P \leq 0.001$ ) بينها فقد بلغت نسبها (78%)، (17%) ، (5%) لكل من الاليل DD وDI وII على التوالي . كذلك لوحظ انخفاض في نسبة تكرار الاليل II للمجموعتين (6.15%) و (5%) على التوالي.

جدول ( 4-8 ) النسب المئوية للتعدد المظهري لتوصيف جين (ACE) في النساء المصابات بالـPCOS والسيطرة.

الطرز الوراثية لجين ACE	التعدد المظهري لجين ACE في نساء الـPCOS (N) %	التعدد المظهري لجين ACE في نساء السيطرة (N) %
DD	20.00% ( 26 ) a B	17% (17) b B
DI	73.85% (96) a A	78% (78) b A
II	6.15% ( 8 ) a C	5% (5) b C
$P \leq$	0.001	0.001
D allele (Total)	56.92% (74) a A	56% (56) b A
I allele (Total)	43.08% ( 56 ) a B	44% (44) b B
$P \leq$	0.001	0.001

(N) % : ( العدد ) و النسبة المئوية

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنوياً. المتوسطات التي تحمل حروف صغيرة مختلفة ضمن السطر الواحد تختلف معنوياً.

يظهر الجدولين (4-9) و (4-10) الذين يوضحان العلاقة بين تكرار الايليات الثلاثة و الهرمونات و BMI والعمر إذ لم تظهر أية فروقات معنوية بين المجموعتين باستثناء حالة ارتفاع مستوى هرمون التستوستيرون وانخفاض مستوى هرمون FSH عند النساء ذوات التركيب الاليلي DD وبمستوى معنوية ( $P \leq 0.001$ ) و ( $P \leq 0.05$ ) على التوالي ، إذ تتوافق هذه النتيجة مع دراسات أخرى عديدة في هذا المجال (Cao et al., 2002 ; Bayram et al., 2011 ; Deepika et al., 2013) والتي أجريت في كل من دولة تركيا والصين الشعبية ، فقد توصلت أن تكرار الاليل DD كان مرتفعاً وبمستوى معنوي ( $P \leq 0.001$ ) بين نساء الـ PCOS والسيطرة ، وفي دراسة الباحث Sun وجماعته (2009) التي أجريت في الصين الشعبية ، لم يظهر أية فروقات معنوية بين الايليات الثلاثة لمجموعة نساء الـ PCOS ونساء السيطرة ، في حين توصل الباحث Jia وجماعته (2013) إلى ارتباط التعدد المظهري لجين ACE I/ D Polymorphism مع متلازمة الـ PCOS في النساء بالمجتمع القوقازي وليس الآسيوي . يؤدي جين أنزيم ACE دوراً هاماً في عملية تكوين الأوعية الدموية Angiotensin وأمراض الضغط وأمراض القلب الوعائية ، إذ يُعد جزء من جهاز الرينين (RAS) ، وعادة يرتبط الشكل الاليلي (DD) مع المستوى العالي لإنزيم ACE في حين يمثل الأليل (DI) الشكل المتوسط من مستوى الإنزيم بينما يمثل الأليل (II) انخفاض مستوى إنزيم ACE (Rigat et al., 1990; Jia et al., 2013) .

أن التركيز العالي لمستوى إنزيم ACE يعمل على تحفيز عملية تكوين الأوعية الدموية في البطانة المبيضية (Ovarian Endothelium) وزيادة تجهيز الدم ، وربما يزيد من تجهيز الكولسيترول الذي يُعد سلف تكوين الهرمون الستيرويدي ، إذ أن زيادة ACE-Ang II تقوم بتنشيط فعالية هرمون LH وتنشيط إفراز هرمون البروجستيرون ومن ثم زيادة إفراز هرمون LH بواسطة عملية التغذية الراجعة السالبة (Negative feedback) (Sun et al., 2009) . فضلاً عن ذلك يمكن أن يؤثر نظام جهاز (RAS) على محور الغدة النخامية (Hypothalamic – Pituitary axis) مما يؤدي إلى قيام Ang-II الداخلي والخارجي في الدماغ على تحفيز إفراز هرمون LH و هرمون GnRH (Steele et al., 1983; Ganong et al., 1993). واثبت Sun وجماعته (2009) علاقة DD مع حالة فرط الاندروجين المصاحبة لمتلازمة PCOS (ارتفاع هرمون التستوستيرون) وهذا ما تم التوصل إليه فعلاً في هذه الدراسة مما يؤكد أن لجين ACE دوراً كبيراً في تفاقم الأعراض السريرية لمتلازمة تكيس المبيض المتعدد وأمراضية و حدوث المتلازمة فضلاً عن علاقة ACE I/D polymorphism مع الاضطرابات الايضية المصاحبة لمتلازمة تكيس المبيض المتعدد التي تشمل كل من مرض السكري النوع الثاني وأمراض القلب الوعائية وضغط الدم (Sapkota et al., 2013) .

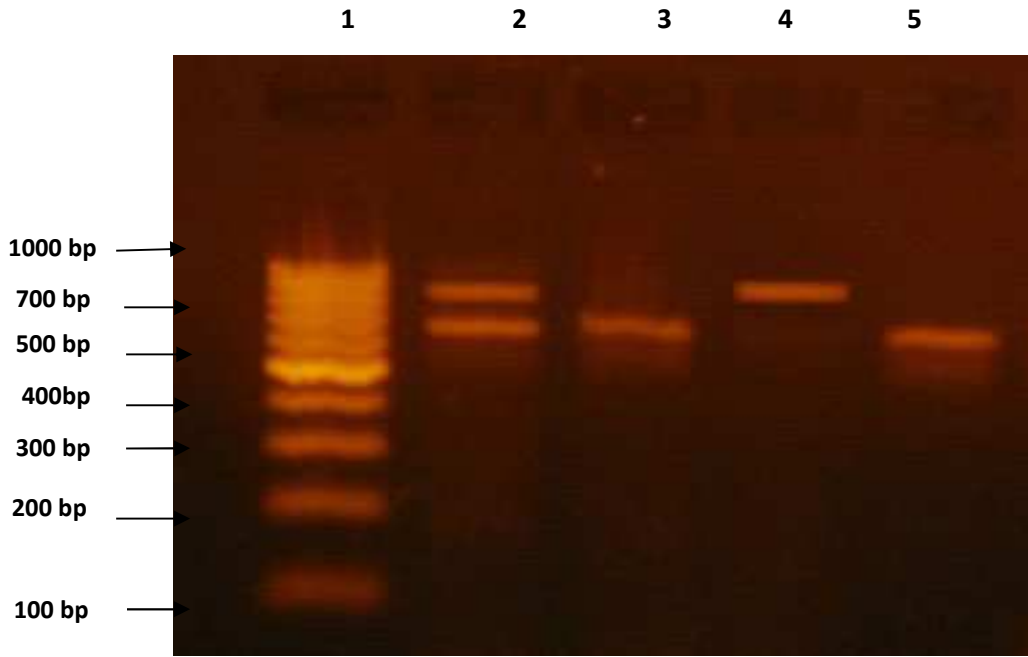






#### 3-4-4. التوصيف الجزيئي للتعدد المظهري لجين TPA.

أظهرت نتائج الترحيل لناتج الـ PCR ثلاثة أنواع من الطرز الوراثية من التكرارات الاليلية لجين TPA للمجموعتين ، طراز وراثي متمائل Homozygous (Deletion) (DD) تمثل بالحزمة ذات الحجم الجزيئي 655 bp ، طراز وراثي متمائل Homozygous (Insertion) (II) تمثل بالحزمة 967 bp وطراز وراثي غير متمائل Heterozygous (ID) تمثل بالحزمتين (655 bp ، 967 bp) شكل (4-11) .



شكل ( 4-11 ) الترحيل الكهربائي لناتج الـ PCR لجين TPA) لتوصيف التعدد المظهري ، على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% وبفرق جهد 70 فولت/ سم و تيار 40 ملي أمبير ولمدة ساعتين.

المجال (1) DNA Ladder (100-1000 bp)

المجال (2) الشكل الاليلي Heterozygous (DI) الحجم (655 bp, 967 bp).

المجال (3, 5) الشكل الاليلي Homozygous (DD) (Deletion) الحجم (655 bp).

المجال (4) الشكل الاليلي Homozygous (II) (Insertion) الحجم (967 bp).

يظهر جدول (4-11) وجود اختلافاً معنوياً ( $P \leq 0.001$ ) بين تكرارات الاليلات في منطقة Alu repeat I/D polymorphism بين مجموعة نساء الـ PCOS ومجموعة السيطرة، فقد بلغت نسب تكرار الاليلات الثلاثة (51.54%) ، (29.23%) ، (19.23%) مقابل (44%) ، (34%) ، (22%) على التوالي ( $P \leq 0.001$ ) ، كذلك بين تلك الاليلات في كل مجموعة الـ PCOS والسيطرة

والنسب المئوية لتكرار كل من الاليل D و I إذ يظهر ارتفاع نسبة الاليل DD عن بقية الاليلات (51.54%) مقابل (29.23%) و (19.23%) بالنسبة لمجموعة الـ PCOS بينما وصلت نسبة تكرار الاليل DD في مجموعة السيطرة إلى (44%) مقابل (34%) و (22%) لكل من الاليل DI و II على التوالي.

عادةً النساء المصابات بمتلازمة الـ PCOS تتعرض إلى تنشيط للجهاز الخثري الدموي (Blood Coagulation System) وزيادة مخاطر الإصابة بأمراض القلب والشرايين وأمراض الضغط (Karadeniz *et al.*, 2007a). أن جين Tissue Plasminogen activator (TPA) يشفر إلى إنزيم Serine protease الذي يعبر في الخلايا البطانية للأوعية الدموية والذي يقوم بتحويل Plasminogen إلى الشكل Plasmin (Collen and Lijnen, 2004)، حيث يلعب دوراً مهماً بأمراض القلب والضغط ويمكن اعتبار منطقة Alu repeat I/D polymorphism كمؤشر لحدوث الطفرات الوظيفية لجين TPA، من خلال العلاقة ما بين مستوى كل من (TPA) وأنتجين (PAI-1) التي تنظم ذلك (Panahloo *et al.*, 1995). وعادةً ما تعبر نسبة تكرار الاليل II للمنطقة غير المشفرة مع مستوى PAI-1 و TPA والتي تزداد عند الإصابة بأمراض الإحتشاء القلبي وأمراض القلب الوعائية وأمراض الضغط وغالباً ما تزداد الإصابة بهذه الأمراض عند النساء المصابات بالـ PCOS (Ridker *et al.*, 1997).

أن نتائج هذه الدراسة الحالية كانت مطابقة لما توصل اليه Karadeniz وجماعته (2007a) التي تم اجراءها في المجتمع التركي، فقد كان تكرار الاليل II منخفضاً إذ بلغت النسبة المئوية لتكراره (19.23%) في نساء الـ PCOS مقابل (22%) بالنسبة لنساء السيطرة.

جدول (4-11) النسب المئوية للتعدد المظهري لتوصيف جين (TPA) في النساء المصابات بالـ PCOS و مجموعة السيطرة .

التعدد المظهري لجين TPA في نساء السيطرة (N) %	التعدد المظهري لجين TPA في نساء الـ PCOS (N) %	الطرز المظهرية لجين TPA
44 % (44) b A	51.54 % (67) a A	DD
34 % (34) b B	29.23 % (38) a B	DI
22 % (22) b C	19.23 % (25) a C	II
<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>P<sub>≤</sub></b>
61 % (61) b A	66.15 % (86) a A	D allele (Total)
39 % (39) b B	33.85 % (44) b B	I allele (Total)
<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>P<sub>≤</sub></b>

% (N): (العدد) النسبة المئوية

المتوسطات التي تحمل حروف كبيرة مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنوياً.

المتوسطات التي تحمل حروف صغيرة مختلفة ضمن السطر الواحد تختلف معنوياً.

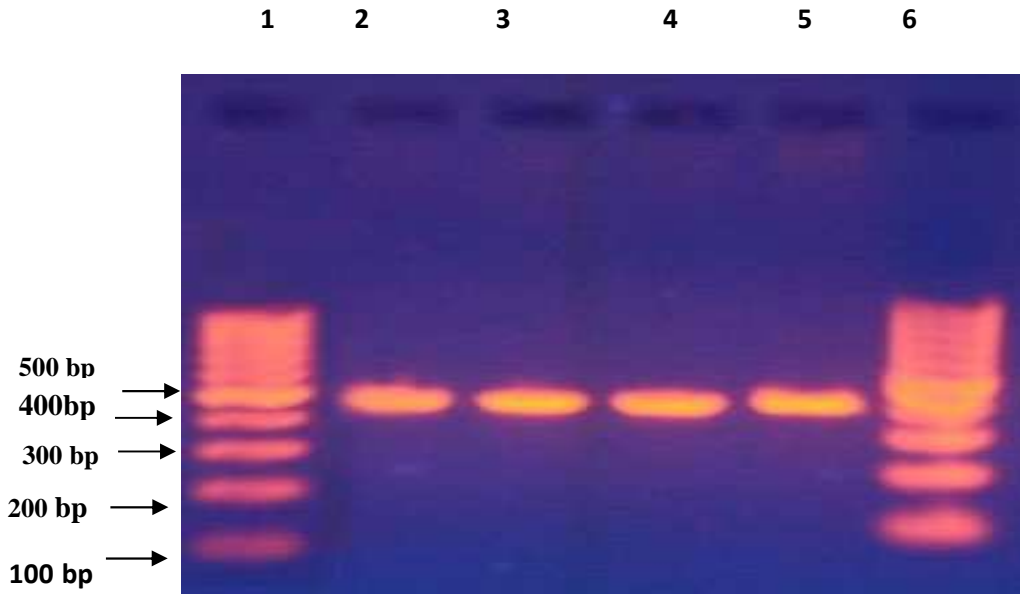
وعند دراسة علاقة مستوى الهرمونات وكتلة الجسم والعمر مع نسب وأعداد تكرار الاليلات ، لم نجد هناك علاقة بينها ولم تظهر أية فروقات معنوية (الجدولين 4-12 و 4-13).





#### 4-4-4. التوصيف الجزيئي للتعدد الشكلي لجين *CYP17*.

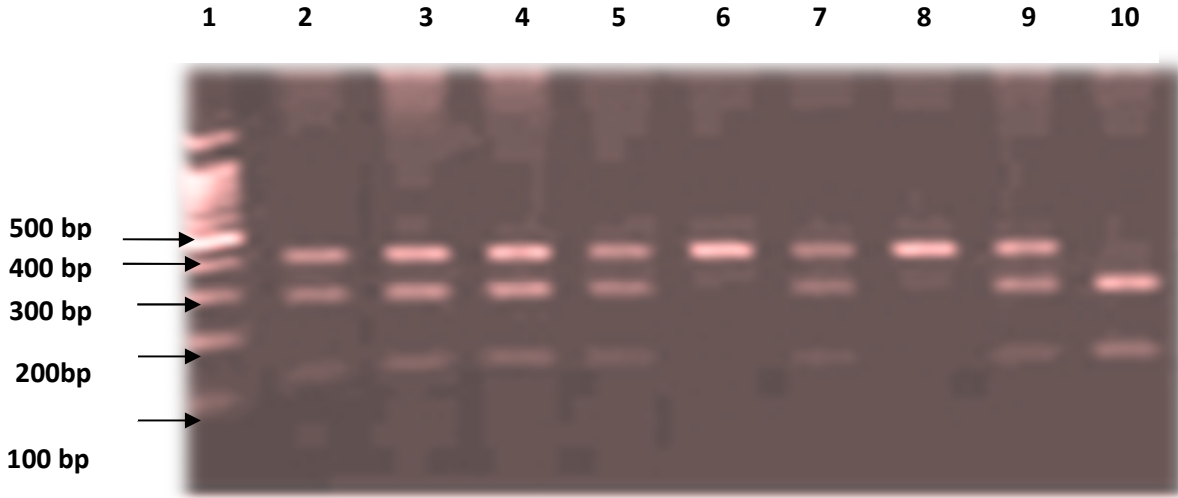
أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لنتائج الـ PCR-RFLP التي تم تقطيعها بإنزيم *MspA II* وجود ثلاثة أنواع من الطرز الوراثية للمجموعتين ، طراز وراثي طبيعي متمائل (TT) Normal (TT) Homozygous يتمثل بالحزمة ذات الحجم الجزيئي 459 bp ، طراز وراثي غير متمائل (TC) Heterozygous (TC) يتمثل بالحزم (bp 459, bp 335, bp 124) وطراز وراثي طافر متمائل (CC) Mutant Homozygous (CC) تتمثل بالحزمتين (bp 335, bp 124) (الشكلين 4-12 و 4-13).



شكل ( 4-12 ) الترحيل الكهربائي لنتائج الـ PCR قبل عملية القطع بالإنزيم القاطع *MspAII* لجين *CYP17* على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% وفرق جهد 70 فولت/ سم وتيار 40 ملي أمبير ولمدة ساعتين.

المجال (1, 6) DNA Lader (100-1000 bp).

المجال (2,3,4,5) نتائج الـ PCR لجين *CYP17* قبل القطع بالإنزيم القاطع *MspAII* (459 bp).



شكل ( 4-13 ) الترحيل الكهربائي لنتائج الـ PCR – RFLP لجين CYP17A1 بعد تقطيعه بالإنزيم القاطع *MspAII* على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% وبفرق جهد 70 فولت/ سم وتيار 40 ملي أمبير ولمدة ساعتين.

المجال (1) DNA Ladder (bp 1500-100)

المجال ( 2, 3 ,4, 5, 7,9 ) Heterozygous (TC) (bp 459 , bp 335, bp 124)

المجال ( 6, 8 ) Homozygous (TT) (bp 459)

المجال (10) Mutant Homozygous (CC) (bp 335, bp 124)

تُظهر نتائج جدول ( 4- 14 ) علاقة التعدد المظهري لجين CYP17 مع الإصابة بمتلازمة تكيس المبيض المتعدد، إذ يظهر من خلال الجدول ظهور فروق معنوية ( $P \leq 0.001$ ) بين تكرار الاليلات الثلاثة (TT, TC, CC) بين مجموعة نساء المصابات بالـPCOS مقارنة بمجموعة السيطرة ، فقد بلغت النسب (23.1%) ، (43.8%) ، (33.1%) في مجموعة الـPCOS مقابل ( 53% ) ، (28%) (19%) عند مجموعة السيطرة وعلى التوالي. وعند مقارنة أعداد ونسب التكرارات الثلاثة في كل مجموعة ونسبة تكرار الاليل A و G لوحظ وجود فروقات معنوية بينها ولكلا المجموعتين ( $P \leq 0.001$ ).

جدول ( 4-14 ) النسب المئوية للتعدد المظهري لتوصيف جين ( CYP17 ) في النساء المصابات بالـ PCOS و مجموعة بالسيطرة .

النساء المصابات بالسيطرة التعدد المظهري لجين CYP17 في (N) %	التعدد المظهري لجين CYP17 في نساء الـ PCOS (N) %	الطرز المظهرية لجين CYP17
(28) 28 % b A	( 43) 33.1 % a A	TT( A1A1 )
(53) 53 % b B	(57) 43.8% a B	TC( A1A2 )
(19) 19 % b B	( 30) 23.1% a C	CC ( A2A2)
<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>P≤</b>
(54.5) 54.5 % b A	(71.5) 55 % a A	T allele (Total )
(45.5) 45.5 % b B	( 58.5) 45 % a B	C allele (Total)
<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>P≤</b>

% (N): ( العدد ) و النسبة المئوية

المتوسطات التي تحمل حروف كبيرة مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنوياً.  
المتوسطات التي تحمل حروف صغيرة مختلفة ضمن السطر الواحد تختلف معنوياً.

ويلاحظ من الجدول (4-15) و (4-16) عدم ظهور فروق معنوية تربط ما بين التعدد المظهري للاليلات الثلاثة في جين CYP17 مع مستويات الهرمونات و BMI والعمر في المجموعتين ما عدا إرتفاع مستوى معدل هرمون التستوستيرون و الاستراديول والعمر للنساء المصابات بالـ PCOS واللواتي يحملن الاليل CC مقارنة مع TT, TC و بفرق معنوي ( P≤ ) ، وجاء ذلك متوافقاً مع ما توصل إليه Wiweko وجماعته (2011) إذ أكدوا وجود علاقة ما بين حالة فرط الاندروجينات Hyperandrogenemia مع الاليل CC في النساء المصابات بالـ PCOS .







فضلاً عن ذلك فقد كانت النتائج مشابهة لما توصل إليه Lim وجماعته (2002) للنساء المصابات بالـPCOS في المجتمع الكوري ودراسة Perez وجماعته (2008) حيث كان تكرار الاليل CC (A2A2) في نساء الـPCOS تقريباً ضعف ما موجود في مجموعة السيطرة.

لا تزال أمراضية متلازمة تكيس المبيض المتعدد غير مفهومة بشكل دقيق من حيث الميكانيكية وتتعدد الجينات المرشحة لحدوثها ولكن هناك العديد من الجينات التي تساهم في عملية البناء الحيوي للستيرويدات والاستروجينات ومنها (*CYP17, CYP19, CYP11a, CYP21*) (Prapas *et al.*, 2009). إذ أن هنالك أربع نظريات ناقشت الخلل في بناء الاندروجينات منها زيادة إفراز هرمون الاندروجين المبيضي وكذلك الخلل في عملية إفراز وعمل الأنسولين التي تسبب فرط الأنسولين وظهور مقاومة الأنسولين و الخلل العصبي (Neuroendocrin) الذي يسبب زيادة إفراز الهرمون اللوتيني ، وأخيراً التغيرات الحاصلة في أيض الكورتيزول (Cortisol) التي تسبب إنتاج الاندروجينات الكظرية (Tsilchorozidou *et al.*, 2004).

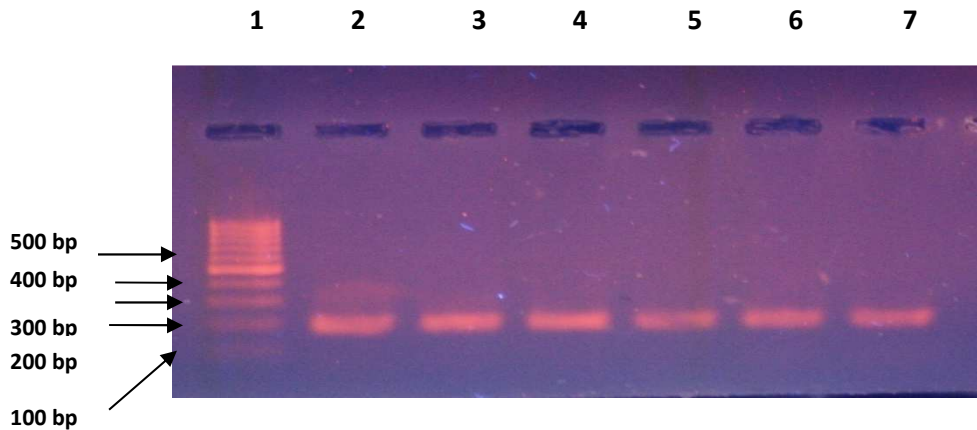
وهناك عدد من العوامل التي تعمل على زيادة تركيز هرمون التستوستيرون منها ارتفاع الهرمون اللوتيني LH كذلك الخلل الإنزيمي لكل من CYP17 و CYP11a التي تساهم في زيادة إفراز هرمون الذكورة (Ehrman *et al.*, 1992; Lim *et al.*, 2002). كما توجد عوامل استنساخ خاصة تسبب اضطراب في الفعالية التحفيزية لجين CYP17 التي تشمل كل من Sterol (SREBP) Regulatory Binding Protein (SF-1) و Steroidogenic Factor- 1 (GATA-6) والتي تشارك في عملية البناء الحيوي للاندروجينات ولكن هذه الفرضية لا تزال تحتاج إلى الكثير من البحث (Sewer and Jagarlapudi , 2009). أن الاليل C (A2) يعمل على زيادة إفراز الاندروجين (Local Androgen) ومن ثم يساعد بعملية تحلل الخلايا الدهنية الحشوية (Visceral adipocyte lipolysis) والإفراز العالي للأحماض الدهنية غير المؤسترة nonesterified fatty acids من الخلايا الدهنية (Adipocytes) وبالتالي يؤدي إلى تنشيط عملية بناء الكلايكونجين hepatic Gluconeogenesis وزيادة مقاومة الأنسولين (Randle *et al.*, 1963; Rebuffe-Scrive *et al.*, 1991). حيث لوحظ أن النساء اللواتي يحملن الشكل الاليلي الطافر CC والمصابات بالـPCOS تكون مقاومة للانسولين ودليل BMI عالياً (Echiburu *et al.*, 2008).

يُعد أنزيم CYP17 المفتاح في المسار الحيوي لبناء الاستروجينات ، إذ يقوم إنزيم الفا 17 هيدروكسليز 17 $\alpha$  hydroxylase بتحفيز عملية إضافة مجموعة الهيدروكسيل (OH) لكل من بريكينولون و البروجستيرون ، أما أنزيم 17, 20 Lyase فيعمل على كسر الأصرة

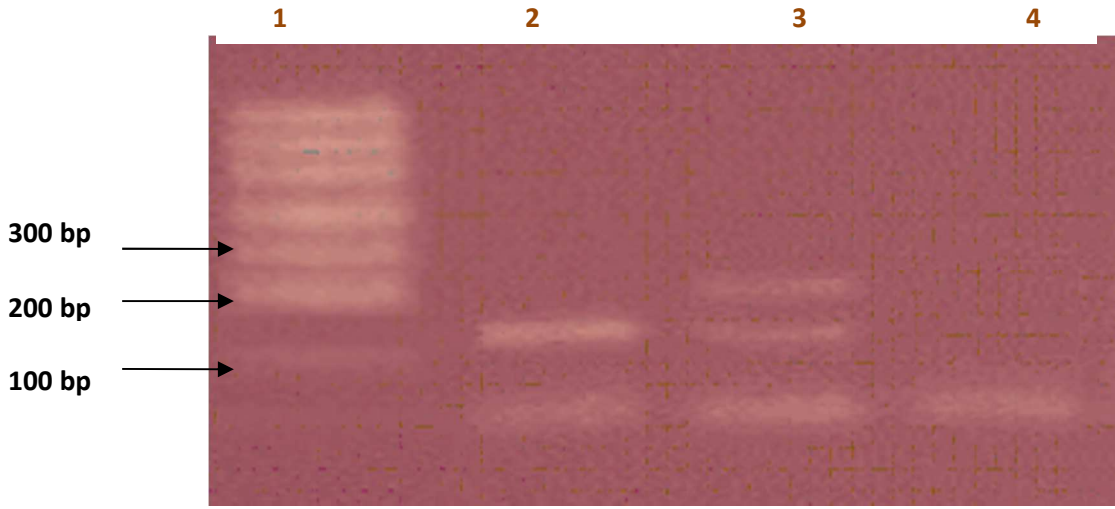
C20-C17 للمركب الفا 17- هيدروكسي بريكينولون والمركب  $17\alpha$  هيدروكسي بروجستيرون لتكوين ديهيدروابيانندروسستيرون (DHEA) Dehydroepiandrosterone واندروستينديون Androstenedione بالتتابع (Wickenheisser *et al.*, 2004). أن الزيادة في الفعالية الإنزيمية لهذا الإنزيم تنعكس على مستوى عملية الاستنساخ ، فقد وجد (Wood *et al.*, 2004) أن مستوى التعبير في جين CYP17 تتضاعف من 2-3 مرات في حال حدوث طفرة في منطقة الحفاز وتؤثر في وظيفته . في حين وجد Wickenheisser وجماعته (2004) عند إجرائه لعملية تحديد تتابع 16 bp (Sequence) في منطقة الحفاز لجين CYP17 أنها تلعب دور المفتاح في تنظيم عمل الـ Promoter ، وتتجسد هذه العملية عن طريق ارتباط العامل النووي (Nuclear Factor) NF 1C1C والذي يُعد كاحباً لجين CYP17 عن طريق ارتباطه بمنطقة الحفاز ، فضلاً عن ذلك فقد لوحظ أن وجود زيادة في إنتاج عوامل الاستنساخ تؤدي إلى زيادة التعبير الجيني لجين CYP17 في النساء المصابات بالـ PCOS (Wickenheisser *et al.*, 2006).

#### 5-4-4. التوصيف الجزيئي للتعدد المظهري لجين (CYP19)

بينت نتائج الترحيل الكهربائي لنتائج الـ PCR- RFLP التي تم تقطيعها بالإنزيم القاطع *Hsp92II* وجود ثلاثة أنواع من الطرز الوراثية تمثلت بالطراز الوراثي المتماثل (AA) Homozygous تمثل بالحزمة ذات الحجم 189 bp والطراز الوراثي غير المتماثل (AG) Heterozygous تمثل بالحزم (28 bp, 161 bp, 189 bp) والطراز الوراثي المتماثل (GG) Homozygous تمثل بالحزمتين (28 bp, 161 bp) ، (الشكلين 4-14 و 4-15).



شكل (4-14) الترحيل الكهربائي لنتائج الـ PCR لجين *CYP19* قبل عملية القطع بالإنزيم القاطع *Hsp92II* على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% بفرق جهد 70 فولت/ سم وتيار 40 ملي أمبير ولمدة ساعتين. المجال (1) DNA Ladder (100-1000 bp). المجال (2,3,4,5,6,7) نواتج الـ PCR قبل التقطيع بالإنزيم القاطع *MspAII* ، (189 bp).



شكل (4-15) الترحيل الكهربائي لنتائج الـ PCR – RFLP بعد تقطيعه بالإنزيم القاطع *Hsp92II* لجين *CYP19* على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% وبفرق جهد 70 فولت /سم وتيار 40 ملي أمبير ولمدة ساعتين.

- المجال (1) DNA Ladder (bp 1000-100) .
- المجال (2) Homozygous (GG) (bp 161 , bp 28)
- المجال (3) Heterozygous (AG) (bp 189, bp 161, bp 28).
- المجال (4) Homozygous (AA) (bp 189).

أظهرت النتائج المبينة في جدول (4- 17) وجود ارتباط معنوي ( $P \leq 0.001$ ) بين تكرار الطرز الوراثية في SNP rs 2414096 (Single nucleotide polymorphisms) لجين *CYP19* ما بين النساء المصابات بمتلازمة تكيس المبايض المتعدد مقارنة بمجموعة السيطرة ، حيث بلغت النسب المئوية للإشكال اللاليلية الثلاثة (GG, AG, AA) (18.46 %), (46.92%) (34.62%) مقارنة مع (47 %) (28 %) (25%) للنساء غير المصابات بالمتلازمة على التوالي . كذلك لوحظ ارتفاع نسبة تكرار الاليل AA لمجموعة السيطرة مقارنة بمجموعة الـ PCOS . وعند مقارنة نسبة الاليلات الكلية بين المجموعتين ظهرت بينها فروقات معنوية ( $P \leq 0.001$ ) فقد بلغت نسبة تكرار الاليل A (41.92%) في نساء الـ PCOS و (51.5%) لنساء السيطرة ، أما نسبة تكرار الاليل G فبلغ (58.08%) و (48,5%) على التوالي . وظهرت فروقات معنوية ( $P \leq 0.001$ ) بين الأعداد والنسب المئوية لتكرار الاليلات الثلاثة في كل مجموعة مع ارتفاع نسبة الاليل AG في كلا المجموعتين (46.92% ) و (47%) على التوالي مقارنة مع بقية الاليلات AA, و GG .

جدول ( 4-17 ) النسب المئوية للتعدد المظهري لجين ( *CYP19* ) في النساء المصابات بالـ PCOS و مجموعة السيطرة .

الطرز المظهرية لجين <i>CYP19</i>	التعدد المظهري لجين <i>CYP19</i> في نساء PCOS (N) %	التعدد المظهري لجين <i>CYP19</i> في نساء السيطرة (N) %
AA	( 24 ) 18.46 % a C	(28) 28 % b B
AG	(61) 46.92 % a A	(47) 47 % b B
GG	( 45 ) 34.62 % a B	(25) 25 % b C
P≤	0.001	0.001
A allele (Total)	(54.5) 41.92 % a B	(51.5) 51.5 % b A
G allele (Total)	( 75.5 ) 58.08 % b A	(48.5) 48.5 % a B
P≤	0.001	0.001

(N) % : ( العدد ) و النسبة المئوية

المتوسطات التي تحمل حروف كبيرة مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنوياً.

المتوسطات التي تحمل حروف صغيرة مختلفة ضمن السطر الواحد تختلف معنوياً.

وقد بين الجدولان ( 4-18 ) و ( 4-19 ) علاقة الهرمونات المدروسة و BMI والعمر مع التعدد المظهري لجين *CYP19* إذ لم تظهر إية فروقات معنوية بينها ، مع ارتفاع غير معنوي لمستوى تركيز هرمون FSH للشكل GG بالنسبة للـ PCOS مقارنة مع AA و AG .







يُعد جين إنزيم الأروماتيز (Aromatase) المفتاح الرئيس الذي يسيطر على أيض الأندروجينات والاستروجينات المبيضية (Diamanti-Kandarakis and Piperi , 2005) ويحفز أنزيم الأروماتيز عملية تحول الأندروجينات التي تحمل 19 ذرة كربون (C19 androgens) وتشمل التستوستيرون والأندروستيستيرون إلى الأندروستيديون Androstenedione التي تحمل 18 ذرة كربون (C18 estrogens) وتتضمن استراديول Estradiol والإيسترون Estrone (Simpson *et al.*, 1994) ، إذ أن القصور في فعالية إنزيم الأروماتيز يعمل على ارتفاع الأندروجينات لأن هذا القصور سوف يؤدي إلى انخفاض في معدل حدوث عملية تحول التستوستيرون والأندروستيستيرون إلى الأندروجينات، وبالتالي ارتفاع مستوياتها في الدم (Belgorosky *et al.*, 2003). لقد أشار Sowers وجماعته (2006) إلى ارتباط SNP rs 2414096 في جين *CYP19* مع حالة فرط الأندروجينات (Testosterone, androstenedione) والتي تساهم في حدوث متلازمة الـ PCOS. وعادةً ما تعطي النسبة E2/T معلومات حول فعالية أنزيم الأروماتيز مع وجود ارتباط الأليل AA مع فعالية الإنزيم بتحويل الأندروجينات إلى استروجينات مقارنة مع الأليل AG و GG (Jin *et al.*, 2009) ، وعلى العكس من ذلك فإن حالة انخفاض فعالية الأروماتيز تؤدي إلى فرط أندروجينات المبيض وتطور حالة الـ PCOS للفتيات المراهقات (Ito *et al.*, 1993; Belgorosky *et al.*, 2003).

وقد وجد Petry وجماعته (2005) أن SNP rs 2414096 (*CYP 19*) يرتبط مع خصائص فرط الأندروجينات في فترة المراهقة بينما، قد تشترك عوامل أخرى في تنظيم تركيز الأندروجينات والاستروجينات كالعوامل البيئية ونمط الحياة . كذلك يلعب هرمون FSH دوراً كبيراً في نشاط فعالية إنزيم الأروماتيز وذلك من خلال علاقته مع مستوى هرمون الاستراديول ، إذ يؤدي اختزال مستوى E2 إلى تحفيز إنتاج FSH بواسطة التغذية الراجعة السالبة وهذا ما يفسر ارتفاع مستوى تركيز FSH لدى النساء المصابات بالـ PCOS واللواتي يحملن الطراز الوراثي GG مقارنة مع بقية الأليلات AA و AG (Jin *et al.*, 2009) . في حين أشار Zhang وجماعته (2012) إلى عدم وجود فروقات معنوية بين الأنماط الوراثية (TT, TC, CC) لـ SNP rs2414096 في جين (*CYP19*) بينما وجد اختلاف في النسبة المئوية E2/ T وتركيز هرمون التستوستيرون بين الأنماط الثلاثة وأن النمط TC له علاقة في تثبيط فعالية أنزيم الأروماتيز .

## الاستنتاجات

- 1- ارتفاع النسبة المئوية لكل من دليل كتلة الجسم الشعرانية وحالة إنعدام الخصوية والإسقاطات المتكررة والدورة الحوضية غير المنتظمة في النساء المصابات بمتلازمة الـPCOS
- 2- أن للتاريخ العائلي للنساء المصابات بالـPCOS دوراً كبيراً في حدوث المتلازمة من خلال التاريخ العائلي الموجب للمتلازمة والقرابة من الدرجة الأولى.
- 3- ارتفاع مستوى تركيز كل من (هرمون LH ، FSH ، التستوستيرون و البرولاكتين) وانخفاض كل من مستوى تركيز هرموني الاستراديول والبروجستيرون عند النساء المصابات بالـPCOS مقارنة مع مجموعة السيطرة.
- 4- ظهور انخفاض في معامل الانقسام الخلوي للخلايا اللمفاوية و ارتفاع في النسبة المئوية للانوية الصغيرة MN ومعدل الانحرافات الكروموسومية في النساء المصابات بمتلازمة الـPCOS.
- 5- ارتفاع النسبة المئوية لتكرار الاليل البري T1T1 Wild Type وانخفاض الاليل الطافر T2T2 Mutant allele عند دراسة التعدد الشكلي لجين مستقبل البروجستيرون (PGR) في مجموعة نساء الـPCOS والسيطرة.
- 6- ارتفاع النسبة المئوية للطراز الاليلي المتباين (DI) لجين ACE مع انخفاض النسبة المئوية للطراز الاليلي المتماثل Insertion (I) في كل من مجموعة نساء الـPCOS ونساء السيطرة ، كذلك لوحظ ارتباط الشكلي الاليلي Deletion (DD) مع التركيز العالي لمستوى هرمون التستوستيرون.
- 7- أظهرت دراسة التعدد المظهري لجين TPA ارتفاع الشكل الاليلي المتماثل (DD) وانخفاض الشكل الاليلي II في مجموعة النساء المصابات بالـPCOS ونساء السيطرة.
- 8- ظهور الطراز الوراثي الطافر (CC) عند دراسة التعدد المظهري لجين CYP17 في كل من مجموعة نساء الـPCOS ونساء السيطرة.
- 9- ارتفاع النسبة المئوية للطراز الاليلي المتباين (AG) والطراز اللاليلي المتماثل (GG) في مجموعة نساء الـPCOS مقارنة مع مجموعة نساء السيطرة عند دراسة التباين في أشكال النيوكليوتيدة المفردة rs 2414096 (SNP) لجين الاروماتيز (CYP19)

## التوصيات

1- إجراء دراسة جزيئية لبعض الجينات المسؤولة عن حالة فرط لاندروجينات والتي تعد من السمات التشخيصية المهمة لمتلازمة تكيس المبايض المتعدد مثل جين مستقبل الأندروجين (AR) Androgen receptor gene (AR) . وكذلك الجينات التي تشترك في عملية صنع وإفراز الأنسولين مثل Insulin Receptor gene (IRG) أو التي تعمل على تنظيم واستتباب الطاقة مثل Leptin Receptor gene أو التي تساهم في حدوث الالتهابات المزمنة والتي تعبر عن الحركيات الخلوية مثل IL-6 , PAI-1 , TNF-a وكذلك الجينات التي قد تساهم في التسبب بحالة الإسقاطات المتكررة للنساء المصابات بمتلازمة الـPCOS ومدى ارتباطها بالمتلازمة.

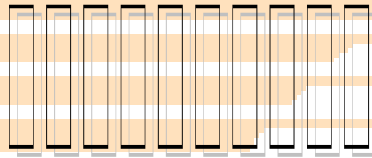
2-الكشف عن طفرات أخرى تتعلق بتباين النيوكليوتيدة المفردة Single Nucleotide Polymorphism (SNP) الموجودة ضمن تتابع الجين بأكمله لبعض الجينات المدروسة مثل CYP19 و CYP17 والبحث عن دورها وارتباطها بالعلامات التشخيصية والمميزة لمتلازمة الـPCOS.

3- إجراء دراسة جزيئية لبعض الجينات التي تسبب حدوث السرطانات النسائية مثل سرطان المبيض والثدي وبطانة الرحم والتي ترتفع نسبتها في النساء المصابات بهذه المتلازمة مقارنة بالنساء غير المصابات بالمتلازمة.

4- إجراء دراسة حول العوامل المؤكسدة مثل glutathione و superoxide dismutase و paraoxonase-1 في النساء المصابات بالـPCOS مع البحث عن الجينات التي تسبب الإجهاد التأكسدي .

المصادر

References



## المصادر العربية:

- الأعظمي، محمد عبد الوهاب شاكر. (2000). دراسة التغيرات الكروموسومية الناتجة من التلوث بالنواتج العرضية للصناعات النفطية في الإنسان. رسالة ماجستير/كلية العلوم. جامعة بغداد .
- الحاج، حميد أحمد. (2013). مبادئ علم الأنسجة . الطبعة الأولى . دار الميسرة للنشر والتوزيع والطباعة. الأردن، ص 305-324.
- الغزاوي ، بشير إسماعيل (2006). دراسة وراثية خلوية حول تأثير المبيدات على الخلايا للمفاوية للإنسان . رسالة ماجستير، معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الأحيائية. جامعة بغداد.
- عشير ، عبد الرحيم محمد والعلوجي ، صباح ناصر. (1989) . علم الغدد الصماء وتكاثر . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة بغداد . مطبعة بيت الحكمة ص 132-140 .
- الغانمي، ياسمين خضير خلف. (2006). دراسة التغيرات المناعية والوراثية في الأشخاص المعرضين للنفط ومشتقاته. رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة كربلاء.

## المصادر الأجنبية:

- Adams, J.; Polson, DW and Franks, S. (1986).** Prevalence of polycystic ovaries in women with anovulation and idiopathic hirsutism. *Br Med J Clin Res Ed*, 293(6543): 355-9.
- Adashi, E,Y.; Hsueh, A.J. and Yen, S.S. (1981).** Insulin enhancement of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release by cultured pituitary cells. *Endocrinology*, 108:1441-1449.
- Ad'hiah, A.H.; Hassan, M. K. A. and Kadhim, K. K. (2001).** The haemtological and cytogenetic effect of gamma radiation on white mouse (*Mus musculus*). *Ibn AL-Hatham J. Pure and APP. Sci*,14: 45-56.
- Agarwal, A.; Aponte-Mellado, A.; Premkumar,BJ.; Shaman, A and Gupta, A. (2012).** The effects of oxidative stress on female reproduction:a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10:49-80.
- Agarwal, A.; Gupta, S and Sharma, R.K. (2005).** Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, 14: 3-28.
- Agarwal, A.; Gupta, S.; Sekhon, L. and Shah, R.(2008).** Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: From molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*, 10(8): 1375-403.
- Aksoy, H.; Yolmaz, S.; Cleik, M.; Yuzba, D. and Unla, F. (2005).** Genotoxicity study in lymphocyte of set printing workers. *J. of applied toxico*, 126 (1): 10-15.

- Al-Hakeim, H. K.; Jassim, W.E. and Ali, A.I. (2010).** Prevalence of endocrine Disorder among Iraqi Women with Menstrual Disturbances Accepted for publication in J.Karbala Medicine.
- AL-Qaisy, D. S. (2005).** Detection of Drug Resistance in Patient with Lymphoid Leukaemia by Using the Cytogenetic Analysis Assay. M. Sc. thesis/ College of medicine. AL- Mustansiriyah university.
- Andreassi, MG.; Barale, R.; Iozzo, P. and Eugenio, P.(2011).** The association of micronucleus frequency with obesity, diabetes and cardiovascular Disease. *Mutagenesis*, 26( 1 ) : 77–83.
- Arlond, (2000).** *Gynaecology by ten teachers*. 17<sup>th</sup> ed., New York p:84.
- Aruna, M.; Nagaraja, T.; Andal, S.; Tarakeswari, S.; Sirisha, PVS.; Reddy, AG.; Thangaraj,K.; Singh,L. and Reddy, BM. (2010)** .Role of Progesterone Receptor Polymorphisms in the Recurrent Spontaneous Abortions : Indian Case. *PLos ONE* ,5(1): 8712-8718.
- Azim, M.; Khan, A.H.; Khilji , Z.L.; Pal ,J.A. and Khurshid, M . (2003).** Chromosomal Abnormalities as a Cause of Recurrent Abortions. *JPMA.*, 53:117-9.
- Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. (2004)** . The Prevalence and Features of the Polycystic Ovary Syndrome in an Unselected Population. *J Clin Endocrinol Metab*; 89:2745-2749.
- Azziz, R and Kashar-Miller MD .(2000).** Family history as a risk factor for the polycystic ovary syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab* , 13 (1 5):1303-1306.
- Azziz, R.; Black, V.; Hines, GA.; Fox, LM and Boots, LR. (1998).** Adrenal Androgen Excess in the Polycystic Ovary Syndrome: Sensitivity and Responsivity of the Hypothalamic- Pituitary-Adrenal Axis. *J Clin Endocrinol Metab*, 83:2317-2323.

- Baillargeon J.P. and Nestler, JE. (2006)** . Polycystic Ovary Syndrome: A Syndrome of Ovarian Hypersensitivity to Insulin? *J Clin Endocrinol Metab*, 91:22-24.
- Balen AH, Conway G.S, Kaltsas G, Techatrasak K, Manning PJ, West C and Jacoba, HS. (1995)**. Polycystic ovary syndrome: The spectrum of the disorder in 1741 patients. *Hum Reprod*; 10(8): 2107-11.
- Balen, A.(2001)**. Polycystic ovary syndrome and cancer. *Hum. Rrprod Update*. 7(6):522-525.
- Balen, A.H. and Jacobs , H.S. (1997)** . Infertility in practice , Churchill Livingstone , *Edinburgh* . 146-149.
- Banaszewska, B.; Spaczynski, R,Z.; Pelesz, M. and Pawelczyk, L. (2003)**. Incidence of elevated LH/FSH ratio in polycystic ovary syndrome women with normo-and hyperinsulinemia. *Rocz Akad Med Bialymst.*;48:131-4.
- Barry, J.A; Kuczmierczyk, A.R. and Hardiman2, P.J. (2011)**. Anxiety and depression in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Rrprod*,26 : 2442-51.
- Bary, J. J.; Cragg, P. A. Roland, G. and Taylor, D. W. (1994)**. *Lecture Notes on Human Physiology*. third edition, Black well Science Australia.
- Bayram, B.; Sayın, E.; Güneş, H.V.; Değirmenci, İ.; Türkoğlu, Z.; Doganer, F. and Turgut Coşan, D.( 2011)**. DD genotype of ACE gene I/D polymorphism is associated in a Turkish study population with osteoarthritis. *Mol. Biol. Rep*, 38, 1713–1716.
- Becker, W. (1986)**. *The world of the cell*. The Benjamin/ Cammings Pub. Co. Inc. California.
- Belgorosky, A.; Pepe, C.; Marino, R.; Guercio, G.; Saraco, N.; Vaiani, E. and Rivarola, MA. (2003)**. Hypothalamic-pituitary-ovarian axis during infancy, early and late prepuberty in an aromatase-deficient girl who is a



- compound heterocytote for two new point mutations of the CYP19 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88(11):5127-31.
- Berger ,M.J.; Taymor, M.L. and Patton, W.C.(1975).** Gonadotropin levels and secretory patterns in patients with typical atypical Polycystic ovary disease. *Fertil and Steril*; 26:619-27 .
- Bhatia, V. (2005).** Insulin Resistance in Polycystic Ovarian Disease . *Southern Medical Journal* . 98:902-909.
- Birdsall, M.A.; Farquhar, C.M. and White, H.D.(1997).** Association between polycystic ovaries and extent of coronary artery disease in women having cardiac catheterization . *Ann. Intern. Med.*, 12:32-35.
- Blank SK, McCartney CR, Marshall JC.(2006).** The origins and sequelae of abnormal neuroendocrine function in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*; 12:351-361.
- Boehm, BO.; Möller, P.; Högel, J.; Winkelmann, BR.; Renner, W.; Rosinger, S.; Seelhorst, U.; Wellnitz, B.; März, W, Melzner, J. and Brüderlein, S. (2008).** Lymphocytes of type 2 diabetic women carry a high load of stable chromosomal aberrations: a novel risk factor for disease-related early death. *abêtes.*, 57(11):2950-2957.
- Boon, N.A; Colledje,N.R.; Walker,B.R. and Hunter, J.A. (2006).** Davidson's Principles and practice of medicine. 20<sup>th</sup> Ed. Churchill Living Stone. P:768-799.
- Bouchard, P. (1999).** Progesterone and the progesterone receptor. *J Reprod Med.*, 44: 153–157.
- Brooker, R. J.(2005).**Genetic Analysis and Principles .2nd ed. Mcgraw- Hill Companies :197, 198, 202-210.
- Brown , A.J.; Tendler, D.A.; McMurry, R.G. and Setji, T.L. (2007).** Polycystic ovary syndrome and severe non alcoholic steatohepatitis

beneficial effect of modest weight loss and exercise on liver biopsy findings *Endocr. Pract*; 11:319-324 .

**Brown, F.; Wyckoff, J. ; Rowan, J. ; Jovanovic, L. ; Sacks, D.(2006).** Metformin in pregnancy : its time has not come yet. *Diabet. Care.*, 29 , 485-486.

**Brown, J. B. (1978).** pituitary control of ovarian function-concepts derived from gonadotropin therapy. *Aust NZJ obstet gynaecol*, 18:46-54.

**Bulun, SE.; Sebastian, S.; Takayama, K.; Suzuki, T.; Sasano, H and Shozu, M. (2003).** The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *J Steroid Biochem Mol Biol* ;86(3-5):219-24 .

**Burger, C. W.; Korsen, T.; Vankessel,H.; Van Dop, P. A.; Caron, J. M. and schoemaker, J. (1985).** Pulsatile luteinizing Hormone patterns in the follicular phase of the men strual cycle, polycystic ovarian disease (PCOD) and non-PCOD secondary amenorrhea. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 61: 1126-1130.

**Cadenas, E and Davies, KJ. (2000).** Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*; 29(3-4): 222-30.

**Cao Y, Wang Y, Zhou P, et al. (2002).** Relationship between ACE gene polymorphism and the renin-angiotensin system in PCOS patients. *Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics.*, 18: 665–666.

**Cary , AH.; Waterworth, D.; Patel, K.; White, D.; Little, J.; Novelli, P.; Franks, S and Williamson, R.(1994).** Polycystic ovaries and premature male pattern baldness are associated with one allele of the steroid metabolism gene CYP17. *Hum, Mol*, 3:1873-1876.

**Cela, E.; Robertson, C.; Rush, K.; Kousta, E.; White , DM.; Wilson, H.; Tyons, G.; Kingsley, P.; Mc Carthy, MI and Franks, S.(2003).** Prevalence of polycystic ovaries in women with androgenic alopecia. *European Journal of Endocrinology*; 149(5): 439-42.

- Chabab, A.; Hedon, B.; Amal, F.; Diafouka, F.; Bressot, N.; Flandre, O. and Cristol, P. (1986).** Follicular steroids in relation to Oocytes development and human Ovarian stimulation protocols. *Human Reproduction*. 7: 449 – 454.
- Chakraborty, A.; Murthy, NS.; Chintamani, C.; Bhatnagar, D.; Mohil, RS.; Sharma, PC and Saxena, S.(2007).** CYP17 gene polymorphism and its association with high-risk north Indian breast cancer patients. *J Hum Genet*;52(2):159-65 .
- Chang, WY.; Knochenhauer, E.S.; Bartolucci, A.A and Azziz, R. (2005).** Phenotypic spectrum of polycystic ovary syndrome: Clinical and biochemical characterization of the three major clinical subgroups. *Fertil Steril*; 83(6): 1717-23.
- Chen , M.j.; Yang , W.S., Yang , J.H , Chen , C .L .HO , H. N. and Yang , Y.S. (2007) .** Relationship between androgen levels and blood pressure in young women with polycystic ovarian syndrome .*Hyperten.*,49: 1442-1447.
- Ciampelli, M.; Fulghesu, A.; Cucinelli, F.; Pavone V.; Caruso, A.; Mancuso S and Lanzone, A. (1997).** Heterogeneity in  $\beta$  cell activity, hepatic insulin clearance and peripheral insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*; 12:1897-1901.
- Ckikasawa, K.; Araki, S.; Tameda, T. (1986).** Morphological and Endocrinological studies on follicular development during the human menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62: 305 – 310.
- Coffler, M.S.; Patel, K.; Dahan, M.H.; Malcom, PJ.; Kawashima, T. and Deutsch, R.(2003).** Evidence for abnormal granulosa cell responsiveness to follicle –stimulating hormone in women with polycystic ovary syndrome .*J.Clin. Endocrinol. Metab.*, 88:1742-1747.

- Collen, D. and Lijnen, H.R. (2004).** Tissue-type plasminogen activator. A historical perspective and personal account. *J Thromb Haemost.*, 2: 541-6.
- Conway, G. (2000).** The Polycystic Ovary Syndrome. Department of Endocrinology. The Middle Sex Hospital Mortimer Street London W1N8AA. January .
- Current, S.(2008).** Evaluation of amenorrhea.*Fertil. Steril.*, 90(5):19-22.
- Cussons AJ, Watts GF, Burke V, Shaw JE, Zimmet PZ, Stuckey BG. (2008).** Cardiometabolic risk in polycystic ovary syndrome: a comparison of different approaches to defining the metabolic syndrome. *Hum Reprod.*,23:2352-2358.
- Cussons, A.J.; Stuckey ,B.G.A and Watts,G.F.(2006).** Cardiovascular disease in the polycystic ovary syndrome: New insights and perspectives. *Atherosclerosis* .185 (2): 227-239.
- Dahiya, K.; Sachdeva, A.; Singh, V.; Dahiya, P.;Singh, R .; Dhankhar, R.; Ghalaut, P and Malik, I.(2012).** Reproductive Hormone and Thyroid Hormone Profile in Polycystic Ovarian Syndrome. *Endocrinology*, 3(6):1-11
- David, T.; Vander Molen, Valerie, S. ; Ratt, S. (2001).** Metformin increases the ovulatory rate and pregnancy rate from clomiphene citrate in patients with polycystic ovary syndrome who are resistant to clomiphene citrate alone. *Fertil. Steril.*,75, 310-314.
- Deepika , M.L.N.; K. Ranjith Reddy, K.; Usha Rani, V.; Balakrishna, N .; Prasanna Latha , K and Jahan, P .(2013).** Do ACE I/D gene polymorphism serve as a predictive marker for age at onset in PCOS? . *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(1):125-130.
- DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J, Felber JP. (1981).** The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from

indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes*, 30:1000-1007.

**Diamanti- Kanadarakis, E.; Piperi, Ch.; Argyrakopoulou,G.; Spina,J.; Papanastasiou, L.; Bergiele, A and Panidis, D.(2006).** Polycystic Ovary Syndrome : The influence of environmental and genetic factors . *HORMONES*. 5(1): 17-34.

**Diamanti, K.E.; Kouli, C.; Tsianateli, T. and Bergiele, A.(2004).** Therapeutic effects of metformin on insulin resistance and hyperandrogenism in Polycystic ovary syndrome. *Eur. J. Endocrinol.*138:269-74.

**Diamanti-Kandarakis E, Argyrakopoulou G, Economou F, Kandaraki E, Koutsilieris M. (2008).** Defects in insulin signaling pathways in ovarian steroidogenesis and other tissues in polycystic ovary syndrome (PCOS). *Steroid Biochem Mol Biol.*109.,(3-5):242-246.

**Diamanti-Kandarakis, E. and Piperi, C.(2005).** Genetics of polycystic ovary syndrome: searching for the way out of the labyrinth. *Hum. Rrprod Update*, 11(6):631-643.

**Diamanti-Kandarakis, E.; Spina, G.; Kouli, C and Migdalis, I.(2001).** Increased endothelin-1 levels in women with polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin therapy. *Clin Endocrinol Metab.*,86:4666–73.

**Dias, V. M.; Manelli-Oliveiraa, R. and Machado-Santellia, G. M. (2006).** Using fluorescence for improvement of the quantitative analysis of micronucleus in cell culture. *Mutat. Res.*, 565: 173–179.

**Dissen, GA.; Garcia-Rudaz, C.; Paredes, A.; Mayer, C.; Mayerhofer A. and Ojeda, SR.( 2009).** Excessive ovarian production of nerve growth factor facilitates development of cystic ovarian morphology in mice and is a feature of polycystic ovarian syndrome in humans. *Endocrinology*, 150:2906-2914.

- Duleba, AJ.; Spaczynski, RZ. and Olive, DL.(1998).** Insulin and insulin-like growth factor I stimulate the proliferation of human ovarian theca-interstitial cells. *Fertil Steril.*, 69:335-340.
- Dunaif, A. (1997).** Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocrine Reviews* ,18: 774–800.
- Dunaif, A.(2005).** Hyperandrogenic anovulation ( PCOS): *A unique disorder* of insulin action associated with an increased risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *AM. Med.*, 98(1) :335-395 .
- Dunning, AM.; Healey, CS.; Pharoah, PD.; Teare, MD.; Ponder BA and Easton DF (1999).** A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8:843-854.
- Echiburu, B.; Perez-Bravo, F.; Maliqueo, M.; Sanchez, F.; Crisosto,N and Sir-Petermann, T.(2008).** Polymorphism T→C (–34 bp) of gene CYP17 promoter in women with polycystic ovary syndrome is associated with increased body weight and insulin resistance : a preliminary study . *Metab*, 57(12):1765-1771.
- Ehrmann, D. A . (2005).** Polycystic ovary Syndrome . *N. Engl J .Med* ,352 : 1223-36 .
- Ehrmann, DA.; Rosenfield, RL.; Barnes, RB.; Brigell, DF. and Sheikh, Z. (1992).** Detection of functional ovarian hyperandrogenism in women with androgen excess. *N Engl J Med.*, 327(3):157-62.
- Escobar-Morreale, HF.; Luque-Ramirez, M. and San Millan, JL.(2005).** The Molecular-Genetic Basis of Functional Hyperandrogenism and the Polycystic Ovary Syndrome. *Endocr Rev.*, 26:251-282.
- Essah, PA. and Nestler, JE.( 2006).** The metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Invest.*, 29:270-280.

- Esteller, M.; Garcia, A.; Martinez-Palones, J. M.; Xercavins, J. and Reventos, J. (1997)** . Germ line polymorphisms in cytochrome-P450 1A1 (C4887 CYP1A1) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes and endometrial cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, 18,12: 2307-2311.
- Fadhel, T.K .(2002):** The study of some immunological parameters of Dushin and Beaker disease. Ph.D thesis, college of Science, AL-Mustansiryha University.
- Fagius J.(2003).** Sympathetic nerve activity in metabolic control - some basic concepts. *Acta Physiol Scand.*, 177:337-343.
- Fassnacht, M.; Schlenz, N.; Schneider, SB.; Wudy, SA.; Allolio, B.; and Arlt, W. (2003).** Behind adrenal and ovarian androgen generation: increased peripheral 5 alpha- reductase activity in women with Polycystic Ovary Syndrome. *Clint. Endocrinal. Metab.* 88:2760-6.
- Federici, C.; Botto, N.; Manfredi S.; Rizza, A.; Del Fiandra, M. and Andreassi, MG.(2008).** Relation of increased chromosomal damage to future adverse cardiac events in patients with known coronary artery disease. *Am. Cardiol.*,102:1296-1300.
- Feigelson, HS.; Coetzee, GA.; Kolonel, LN.; Ross. RK and Henderson, BE. (1997).** A polymorphism in the CYP17 gene increase s the risk of breast cancer . *Cancer Res.*, 57:1063-1065.
- Fenech , M. and Bonassi, S. (2011).** The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 26(1): 43–49.
- Fenech, M. (1997).** The advantage and disadvantage of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat. Res.*, 392: 11-18.
- Fenech, M. (2000)** . The in vitro micronucleus technique . *Mutat. Res.* 455: 81-95.

- Fenech, M. (2002a)** .Chromosomal biomarkers for genomic instability revelant to cancer. *DDT*, 7(1): 1128-1137.
- Fenech, M. (2002b)**. .Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology.*Toxicology*, 181-182: 411-416.
- Fenech, M. (2006)**. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a cytome assay of chromosomal instability, Mitotic dysfunction and cell death. *Mutat. Res.*, 800(1): 58-60.
- Fenech, M. and Morley, A. (1985)**. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Muta. Res.*, 147: 29-36.
- Fenkci IV, Serteser M, Fenkci S, Kose S.( 2007)**. Paraoxonase levels in women with polycystic ovary syndrome. *J Reprod Med*; 52(10): 879-83.
- Ferreira, R.; Oliveira, JF.; Fernandes, R.; Moraes, JF. and Gonçalves, PB. (2007)**. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. *Reproduction*, 134(5):713-9.
- Fleming, R.; Hopkinson, Z. Wallace, M.; Greer, I. ; Sattar, N. (2002)**. Ovarian function and metabolic factors in women with oligomenorrhea treated with metformin in a randomized double blind placebo-controlled trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**,1- 6.
- Franks, S.; Mason, H. and Willis, D. (2000)**. Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol*; 163:49-52.
- Frhan, B. A. (2003)**. The effect of IVF Therapy on follicular fluid hormones in femal with lateal phase Defect. Thesis, MCS. Collage. Med. University. Baghdad.
- Fulghesu ,A.M.; .Cucinelli, F.; Pavone, V.; Murgia, F.; .Guido, M.; Caruso, A.; .Mancuso, S and .Lanzone, A. (1999)**. Changes in luteinizing hormone and insulin secretion in polycystic ovarian syndrome.(1999). *Human Reproduction*, 14 (3) :611–617.



- Futterweit, WM.(1998)** . Polycystic ovarian disease :Etiology ,diagnosis and treatment .Compr.Ther.,14:12-20.
- Gaasenbeek, M.; Powell, BL.; Sovio, U. and Haddad, L.( 2004)**. Large-scale analysis of the relationship between CYP11A promoter variation, polycystic ovarian syndrome, and serum testosterone. *J Clin Endocrinol Metab*, 89:2408-13.
- Ganong, W. F. (1991)**. Review of medical physiology 15<sup>th</sup> edn. Lange Medical Publication , *California.*: 389 – 400.
- Ganong, W. F. (1995)**. Review of Medical physiology 7<sup>th</sup> edn. Lange Medical publication , California : 310 – 320.
- Ganong, WF. (1993)**. Blood, pituitary, and brain renin-angiotensin systems and regulation of secretion of anterior pituitary gland. *Front Neuroendocrinol*; 14: 233–249.
- Ghandra, J.; Samali, A. and Orrenius, S. (2002)**. Tiggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 29: 323-333.
- Gharani, N.; Waterworth, D.; M .; Batty, S. and White, D. (1997)**. Association of the steroid synthesis gene CYP11a with polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism. *Human Molecular Genetics*, 6(3):397-402.
- Ghosh, B.; Talukder, G. and Sherma, A. (1991)**. Effect of culture media on spontaneous incidences of mitotic index, chromosomal aberration ,SCE and cycle in peripheral blood lymphocytes of male and female donor. *Cytologia*, 67: 71-75.
- Gilling-Smith, C.; Willis, D.S.; Beard, RW and Franks,S. (1994)**. Hypersecretion of androstenedione by isolated theca cells from Polycystic Ovaries. *J. Clint. Endocrinal. Metab.*; 79(4):1158-65.
- Giometti, IC.; Bertagnolli, AC.; Ornes, RC.; Da Costa, LF.; Carambula, SF.; Reis, AM.; De Oliveira, JF.; Emanuelli, IP. and Gonçalves, PB. (2005)**. Angiotensin IIreverses the inhibitory action produced by theca

cells on bovine oocyte nuclear maturation. *Theriogenology*, 63(4):1014-25.

**González F, Minium J, Rote NS, Kirwan JP.( 2005).** Hyperglycemia alters tumor necrosis factor-alpha release from mononuclear cells in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*; 90(9): 5336-42.

**Goodarzi MO. (2008).** Looking for polycystic ovary syndrome genes: Rational and best strategy. *Semin Reprod Med* ; 26(1): 5-13.

**Goodman MT, McDuffie K, Guo C, Terada K, Donlon TA.( 2001).** CYP17 genotype and ovarian cancer: a null case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* ,10:563-564.

**Grassi G, Dell'Oro R, Facchini A, Quarti Trevano F, Bolla GB, Mancina G.( 2004).** Effect of central and peripheral body fat distribution on sympathetic and baroreflex function in obese normotensives. *J Hypertens*; 22:2363-2369.

**Greendale GA, Reboussin BA, Sie A, Singh HR, Olson LK, Gatewood O, Bassett LW, Wasilauskas C, Bush T, Barrett-Connor E. (1999) .** Effects of estrogen and estrogen-progestin on mammographic parenchymal density. Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Investigators. *Ann Intern Med*, 130:262-9 .

**Greiner M, Paredes A, Araya V, Lara HE.( 2005).** Role of stress and sympathetic innervations in the development of polycystic ovary syndrome. *Endocrine*; 28:319-324.

**Guo Y, Xiong DH, Yang TL.( 2006).** Polymorphisms of estrogen-biosynthesis genes CYP17 and CYP19 may influence age at menarche: a genetic association study in Caucasian females. *Human Molecular Genetics*, 15(16):2401-2408.

- Haisenleder, DJ.; Dalkin, AC.; Ortolano, GA. ; Marshall, JC. And Shupnik, MA.(1991).** A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency *in vivo*, *Endocrinology*, 128:559-571.
- Hamurcu, Z .; Bayram, F.; Kahrıman, G.; Dönmez-Altuntas, H. and Baskol, G.(2010).** Micronucleus frequency in lymphocytes and 8-hydroxydeoxyguanosine level in plasma of women with polycystic ovary syndrome. *ecological Endocrinology*, 26 (8) : 590-595.
- Hardiman,P.; Pillay, O.S. and Atiomo, W.(2003).** Polycystic ovary syndrome and endometrial carcinoma. *Lancet*; 361:1810-1812.
- Harold, G. S. and Niswender, G. D. (1971).** Blockade of the swage of preovulatory serum lutenizing hormone and ovulation with exogenous progesterone in cyclic rhesus (Macaca Mulatta) monkey. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 32: 309 – 316.
- Hart, R.; Hickey.; M and Franks S.(2004).** Definitions, prevalence and symptoms of polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*; 18(5): 671-83.
- Hartwell, L. H.; Hood, L.; Goldberg, M. L.; Reynolds, A. E.; Silver, L. M. and Veres, R. C. (2004).** *Genetics from Genes to Genome*. st ed. Mccrrow-Hill higher education,441 422-437.
- Herman, JP.; Prewitt, CM. and Cullinan. (1996).** Neuronal circuit regulation of the hypothalamo, pituitary, adrenocortical stress axis. *Crit.Rev.Neurobiol.* ,10:371-394.
- Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD.( 1994).** Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, twogonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol*; 100:51-54 .

- Hillier, S. G. (1993).** Ovarian stimulation with recombinant gonadotrophins : LH as adjunct to FSH. In: Jacobs, H. S., ed. The new frontier in ovulation induction Carnforth, UK: *Pathenon*: 39-47.
- Holte J, Bergh T, Gennarelli G, Wide L.( 1994).** The independent effects of polycystic ovary syndrome and obesity on serum concentrations of gonadotrophins and sex steroids in premenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)*; 41:473-481.
- Homburg , R. ; Berkowitz , D. and Levy . T (1993) .** In vitro fertilization and embryo transfer for the treatment of in fertility associated with polycystic ovary syndrome, *fertile steril*, 60 : 856-863.
- Hong, C. C.; Thompson, H. J.; Jiang, C.; Hammond, G. L.; Tritchler, D.; Yaffe, M. and Boyd, N. F. (2004).** Association between the T27C polymorphism in the cytochrome P450 c17alpha (CYP17) gene and risk factors for breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 88(3), 217- 230.
- Hsueh, A. J.; Adashi, E. Y.; Jones, P. B.; Welsh, T. H. J. ( 1982).** Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulose cells. *Endocrinol Rev*; 5: 76 – 127.
- Huang CS, Chern HD, Chang KJ, Cheng CW, Hsu SM, Shen CY. (1999) .** Breast cancer risk associated with genotype polymorphism of the estrogen-metabolizing genes CYP17, CYP1A1, and COMT: a multigenic study on cancer susceptibility. *Cancer Res*, 59:4870-4875.
- Hughes, C.; Elgasim, M.; Layfield, R. and Atiomo, W. (2006) .** Genomic and post genomic approaches to polycystic ovary syndrome – progress far :Mini Review. *Hum. Rrprod*,21(11) : 2766–2775.
- Hull , M.G.(1987).** Epidmiology of infertility and polycystic ovarian disease: endocrinological and demographic studies. *Gynecol.Endocrinol.*, 1:235-345.

- Ibanez, L.; Potau, N and Ferrer, A.(2002).**Anovulation in emmenorrhic, non obese adolescent girl and abdominal fat excess, dyslipidemia and subclinical hyperandrogenism. *J.Clin. Endocrinal and Metabol*;87:5702-5705 .
- Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park, A-M.; Kira, Y.; Imada, I and Utsum, K.(2003)** . Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current Medicinal Chemistry*, 10(23): 2495-2505.
- Inzucchi, S.E.; Maggs, D.G.; Spollett, GR.; Page, SL.; Rife, FS.; Walton, V and Shulman, GI.(1998).** Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus" *N.Engl. J.Med.*338(13):867-872.
- Ito, Y.; Fisher, CR.; Conte, FA.; Grumbach, MM. and Simpson, ER. (1993).** Molecular basis of aromatase deficiency in an adult female with sexual infantilism and polycystic ovaries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(24):11673-7.
- Janathan, S. B.; Eli, Y. A. and Paula, A. H. (1996).** Novak's Gynecology. 12<sup>th</sup> ed. USA . P 915 – 916 .
- Jia, H.; Wang, B.; Yu, L. and Jiang, Z. (2013).** Association of angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Sys*,14(3):255-62.
- Jin L, Zhu X-M, Luo Q.( 2006).** A novel SNP at axon 17 of INSR is associated with decreased insulin sensitivity in Chinese women with PCOS. *Molecular Hum. Rrprod*, 3:151-155 .
- Jin, J-L.; Sun, J.; Ge, H-J.; Cao, Y-X.; Wu, X-K.; Liang, F-J.; Sun, H-X.; Ke, L.; Yi, L.; Wu, Z-W and Wang, Y.(2009).** Association between CYP19 gene SNP rs2414096 Polymorphism and polycystic ovary syndrome in Chinese women, *BMC Medical Genetics*, 10:139-143.

- Johnatty, SE.; Spurdle, AB.; Beesley, J.; Chen, X, Hopper, JL.; Duffy, DL. And Chenevix-Trench, G. (2008).** Progesterone receptor polymorphisms and risk of breast cancer: results from two Australian breast cancer studies. *Breast Cancer Res Treat* ., 109:91–99.
- Jozwik M, Wolczynski S, Jozwik M, Szamatowicz M. (1999).** Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Reprod*. 5(5): 409-13.
- Kahsar, M., Nixon, C., Boots, L.R., Go, R.C. and Azziz, R. (2001).** Prevalence of polycystic ovary syndrome (PCOS) in first degree relatives of patients with PCOS. *Fertility and Sterility*, 75: 53-58.
- Kandaraki, E; Christakou, C and Diamanti-Kandarakis,E. (2009).** Metabolic syndrome and Polycystic ovary syndrome and Vice Versa. *Arq Bras Endocrinol Metab*.53(2):227-237.
- Karabulut , A; Turgut,S and Turgut, G.(2010 ).** Angiotensin converting enzyme gene insertion /deletion polymorphism in patients with polycystic ovary syndrome . *Gynecol. Endocrinol*.26 (6): 393-398.
- Karadeniz, M.; Erdogan, M.; Berdeli, A.; Fusun , S.; Saygili, F and Yilmaz, C.(2007a).** 4G/5G Polymorphism of PAI-1 gene and Alu-repeat I/D polymorphism of TPA gene in Turkish patients with polycystic ovary syndrome .*J Assist Reprod Genet* , 24:412–418.
- Karadeniz, M.; Erdogan, M.; Berdeli, A.; Tamsel , S.; Saygili, F and Yilmaz, C.(2007b).** The progesterone receptor PROGINS polymorphism is not related to oxidative stress factors in women with polycystic ovary syndrome. *Cardiovascular Diabetology*, 6(1):29-36.
- Kazerooni, T.; Ghaffarpasand, F.;Asadi, N.; Dekhoda, Z.; Dehghankhalili, M. and Kaserooni, Y. (2013).** Correlation between thrombophilia and recurrent pregnancy loss in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS): A comparative study. *J Chin Med Assoc*;76:282-288.

- Kettel, L. M.; Roseff, S.L.; Berya, S.L.; Mortola, J.F , and (1993).** Yen SS . Hypothalamic - pituitary-ovarian response to clomiphene Citrate in women with polycystic ovary Syndrome . *Fertil steril*, 59 , : 532-538 .
- Kim, J. and Pelletier, J. (1999).** Molecular genetics of chromosome translocations involving *EWS* and related family members. *Physiol. Genomics*, 1:127-138.
- Koracs, G.T. and Norman, R.( 2007)** Polycystic Ovary Syndrome" 2<sup>nd</sup>. Published by Cambridge University.
- Kumar, M.; Pathak, D.; Venkatesh, S.; Kriplani. A.; Ammini, AC. and Dada, R.( 2012).** Chromosomal abnormalities and oxidative stress in women with premature ovarian failure (POF). *Indian J Med Res.*, 135 : 92-97.
- Lambert, L. ; P.B. Ponzetto and G. Ardito. (1983).** Cell Kinetics and sister Chromatid exchanges frequency in human Lymphocytes. *Mut. Res.* 120 ; 193 – 9.
- Lancaster, JM.; Berchuck, A.; Carney, ME.; Wiseman, R. and Taylor, JA. (1998).** Progesterone receptor gene polymorphism and risk for breast and ovarian cancer. *Br J Cancer*, 78(2):277-278.
- Landi , S and Barale, R. (1999).** Sister chromatid exchanges , chromosome aberrations and micronuclei in femal lymphocyte : correlations with biological rhythms, miscarriages and contraceptive pill use. *Mutagenesis*, 14(6):581-585.
- Lee H, Oh JY, Sung YA, Chung H, Cho WY. (2009).**The prevalence and risk factors for glucose intolerance in young Korean women with polycystic ovary syndrome. *Endocrine.*;36(2):326-32.
- Lee, H.;Oh , J-Y.; Sung Y-A and Chung, H. (2013).** Is Insulin Resistance an Intrinsic Defect in Asian Polycystic Ovary Syndrome. *Yonsei Med J* .,54(3):609-614.

- Lee, JY.; Baw, C-K.; Gupta, S.; Aziz, N and Agarwal, A. (2010).** Role of Oxidative Stress in Polycystic Ovary Syndrome. *Current Women's Health Reviews*. 7 :96-107.
- Lee, M. S.; Ben – Rafael, Z.; Meloni, F.; Masgroinni, L. and Flickinger, G. L. (1986).** Effects of prolactin on steroidogenesis by human luteinized granulosa cells *Fertil. Steril.*, 46: 32-36.
- Legro, RS.; Kusanman, AR.; Dodson, WC. and Dunaif, A. (1999).** Prevalence and Predictors of Risk for Type 2 Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance in Polycystic Ovary Syndrome: A Prospective, Controlled Study in 254 Affected Women. *J Clin Endocrinol Metab*. 84:165-169.
- Legro, RS.; Driscoll, D.; Strauss, JF.; Fox, J. and Dunaif, A. (1998 b).** Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(25):14956-60..
- Legro, RS.; Spielman, R.; Urbanek, M.; Driscoll, D.; Strauss, JF. and Dunaif, A. (1998a).** Phenotype and genotype in polycystic ovary syndrome. *Recent Prog Horm Res.*;53:217–56.
- Lemarchand – Berand, T.; Aufferey, M. M.; Regmond, M. and Reg, I. (1982).** Maturation of the Hypothalamus-pituitary-ovarian Axis in adolescent girl. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 54:241-246.
- Leon, S.; Robert, H.G. and Nalhan, G.K.(1994).** An ovulation and the polycystic ovary clinical gynecologic endocrinology and infertility .5th edition .
- Lewis, R. (2005).** Human genetic concepts and applications .6<sup>th</sup> ed .Macgraw Hill: 65, 64, 66, 257.
- Li, X.; Feng, Y.; Lin, J.F.;Billig, H and Shao,R.(2014).** Endometrial progesterone resistance and PCOS. *J Biomedical Science*, 21:2-8.



- Li, Z-H; Pan, X-M; Han, B-W; Han, H-B; Zhang, Z and Gao, L-B. (2011).** No association between ACE polymorphism and risk of nasopharyngeal carcinoma. *J Renin–Angiotensin Aldosterone System*. 13(1): 210-215.
- Lim, S-K.; Kim, M-S.; Lee, S-H and Baek, K-H.(2002).** Polymorphism of CYP 17 and CYP11a for Polycystic Ovary Syndrome in a Korean Population, *Korean J. Genetics* , 24 (4) : 343-348.
- Lo, J.C.; Feigenbaum, S.L.;Yang, L.; Pressman, AR.; Selby, JV and Go, A. (2006).** Epidemiology and adverse cardiovascular risk profile of diagnosed Polycystic Ovary Syndrome *J.Clin. Endocrinol. Metab*; 91(4):1357-63.
- Lobo, RA.; Granger, L.; Goebelsmann, U. and Mishell, DR Jr.(1981).** Elevations in unbound serum estradiol as a possible mechanism for inappropriate gonadotropin secretion in women with PCOS. *Clin Endocrinol Metab. Jan.*,52(1):156-8.
- Lodish, H.; Brek, A.; Zipursky, S. L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D. and Darnell, D. J. (2000).** *Molecular Cell Biology*. 4th ed. Media Connected.
- Louis, V. (2007).** "Polycystic Ovary Syndrome (PCOS)" U.S. Department of Health and Human Services, office on Women's Health; 1-6.
- Magoffin, DA.(2005).** Ovarian theca cell. *Int J Biochem Cell Biol.*, 37:1344-1349.
- Mais, V.; Kazer, R. R.; Cetel, N. S.; Rivier, J.; Vale, W. and Yen, S. S. (1986).** The dependency of folliculogenesis and Corpus Luteum function on pulsatile gonadotrophin secretion in cycling women using agonadotrophin – Releasing hormone antagonist as aprobe. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62 : 1250–1263.
- Marc, G.; M. D.; Paola, C. M D.; Giuliana, B. M. D.; Sara; V.M.D. and Alfred, S.P.D.(2002)** . Comparson of the efficacy and safty of two

formulations of micronized progesterone ( Ellios <sup>TM</sup> and Vtrogestan <sup>TM</sup> ) used as luteal phase support after IVF. *Fertil.steril*; 77: 2.

- Marilym, R. and Richardson, M.D. (2003).** Current perspective in Polycystic Ovary Syndrome University of Kansas Medical Center, *American Family Physician*; 68(4):697-700.
- Marshall, JC. and Griffin, ML.(1993).** The role of changing pulse frequency in the regulation of ovulation. *Hum Reprod.*, 8:57-61 .
- Marson, F.A.L.; Bertuzzo, CS.I .; Hortencio, T.D.R.; Ribeiro, JD.; Bonadia, L.C. and Ribeiro, A.F. (2012).** The ACE gene D/I polymorphism as a modulator of severity of cystic fibrosis. *BMC Pulmonary Medicine* , 12:41-48 .
- McCormack, L.J.; Nagi, DK.; Stickland, MH.; Mansfield, MW.; Mohamed-Ali ,V.; Yudkin, JS.; Knowler, W. and Grant, PJ. (1996).** Promoter (4G/5G) plasminogen activator inhibitor-1 genotype in Pima Indians: relationship to plasminogen activator inhibitor-1 levels and features of the insulin resistance syndrome. *Diabetologia*,39:1512–18.
- Menally, K. P.; Makris, A.; De Grazia, C. Osthonondh, R. and Ryan, K. J. (1979).** The production of progesterone, and androgen and oestrogens by granulosa cells, thecal tissue and stromal tissue from human ovaries in vitro. *J. Clin. Endocrinol, Metab.* 49 : 687 – 699.
- Meyer, MF.; Gerresheim, F.; Pfeiffer, A.; Epplen, JT. and Schatz, H.(2000).** Association of polycystic ovary syndrome with an interstitial deletion of the long arm of chromosome 11. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 108: 519–23.
- Miettinen, H.E.; Rayburn, H and Krieger, M. (2001).** Abnormal lipoprotein metabolism and reversible female infertility in HDL receptor (SR-BI)-deficient mice. *J Clin Invest* ,108:1717–1722.

- Minokoshi, Y.; Kahn, CR. and Kahn, BB. (2003).** Tissue-specific Ablation of the GLUT4 Glucose Transporter or the Insulin Receptor Challenges Assumptions about Insulin Action and Glucose Homeostasis. *J Biol Chem.*, 278:33609-33612.
- Mitchell, M.; Armstrong, DT.; Robker, RL. and Norman, RJ.(2005).** Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction*, 130:583-597.
- Mofid, A.; Seyyed, A.; Zandieh, S. and Yazdani, T.(2007).** Hirsutism. *Int. J. Clin. Pract.*, 62(3): 433-443 .
- Moran, L.J., Noakes, M., Clifton, P.M., Norman, R.J. and Fenech, M.F. (2008)** .Genome instability is increased in lymphocytes of women with polycystic ovary syndrome and is correlated with insulin resistance. *Mutat. Res.*, 639: 55-63.
- Moran, L.J.; Noakes, M.; Clifton, PM.; Tomlinson, L.; Galletly, C. and Norman, R.J. (2003).** Dietary composition in restoring reproductive and metabolic physiology in overweight women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.*, 88(2): 812-9.
- Nakai, K.; Itoh, C.; Mitura, Y.;Hotta, K.; Musha, T.; Itoh, T.; Miyakawa ,T.; Iwasaki,R. and Hiramori, K. (1994).** Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. . *Circulation*. 90(5):2199-202.
- Napoli, N. and Armamento-Villareal, R.(2007).** Effects of Polymorphisms of the CYP450 Enzyme Genes on Estrogen Status and the Risk for Osteoporosis. *Current Pharmacogenomics*, 5: 1-10
- Naziroglu, M.( 2009).** Role of selenium on calcium signaling and oxidative stress-induced molecular pathways in epilepsy. *Neurochem Res.* ,34:2181-2191.

- Neill, J.; Johnsson, E. D. B.; Datta, J . K. and Kuobil, E. (1967).** Relationship between the plasma levels of luteinizing hormone and progesterone during the normal menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinology. Metab.* 27: 1167 – 1173.
- Nelson, VL.; Legro, RS.; Strauss, JF III. and McAllister, JM.( 1999).** Augmented Androgen Production Is a Stable Steroidogenic Phenotype of Propagated Theca Cells from Polycystic Ovaries. *Mol Endocrinol.*, 13:946-957.
- Nelson, VL.; Qin, K-N.; Rosenfield, RL.; Wood, JR.; Penning, TM.; Legro, RS.; Strauss, JF III. and McAllister, JM.( 2001).** The biochemical basis for increased testosterone production in theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.*, 86:5925-5933.
- Nersesyan, A.; Martirosyan, A.; Parsadanyan, G. and Zalinian, G.(2006).** Chromosomal aberrations level in peripheral blood lymphocytes of women with polycystic ovary syndrome. *J BUON*, 11(4):477-80.
- Nestler JE.( 1997).** Insulin regulation of human ovarian androgens. *Hum Reprod; 12 Suppl 1*:53-62.
- Nestler JE.( 2008).** Metformin for the Treatment of the Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med*; 358:47-54.
- Nestler, JE.; Powers, LP.; Matt, DW.; Steingold, KA.; Plymate, SR.; Rittmaster, RS.; Clore, JN. and Blackard, WG.( 1991).** A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 72:83-89.
- Nisenblat, V. and Norman RJ.( 2009).** Androgens and polycystic ovary syndrome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*; 16(3): 224-31 .

- Norman, RJ CA.(2000).** Lifestyle factors in aetioly and management. In: Polycystic Ovary Syndrome. 1st ed. Cambridge University Press.
- Norman, RJ.; Masters, S. and Hague, W.(1996).** Hyperinsulinemia is common in family members of women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.*,66:942-7.
- Norppa, H. and Falck, G. C. M. (2003).** What do human micronuclei contain. *Mutagenesis*, 18 (3): 221-233.
- O'Mara, TA .; Fahey, P.; Ferguson, K.; Marquart, L.; Lambrechts, D.; Despierre, E.; Vergote, I.; Amant, F.; Hall, P.; Liu, J.; Czene, K.; SASBAC.; Rebbeck, TR.; Ahmed, S.; Dunning, AM.; Gregory, CS.; Shah, M.; ANECS, Webb, PM and Spurdle, B. (2011).** Progesterone receptor gene variants and risk of endometrial cancer. *Carcinogenesis*. 32(3): 331-335.
- Overes, H. W.; de Leeuw,R. and Kloosterboer, H. J. (1992).** Regulation of aromatase activity in FSH-primed rat granulose cells *in vitro* by follicle stimulating hormone and various amounts of human chorionic gonadotropin .*Hum. Rrprod.*,7: 191-6.
- Palomba, S.; Orio, F. Jr; falbo, A.; Manguso, F.; Russo, T.; Cascella, T.; Tolino, A.; Carmina, E and Zullo, F. (2005) .** Prospective parallel randomized, double-blind, double-dummy controlled clinical trial comparing clomiphene citrate and metformin as the first-line treatment for ovulation induction in nonobese anovulatory women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* ,.90 (7) : 4568- 74.
- Palomba, S.; Orio, F.; Russo, T.; Cascella, S; Falbo, A.; Zulla, F. and Collao, A.(2004).** Is ovulation induction still a therapentic problem in patients with Polycystic ovary syndrome? *J. Endocrinal. Invest*; 27(8):796-805 .
- Panahloo, A.; Mohamed-Ali, V.; Lane, A.; Green, F.; Humphries, SE. and Yudkin, JS. (1995).** Determinants of plasminogen activator inhibitor 1

activity in treated NIDDM and its relation to a polymorphism in the plasminogen activator inhibitor 1 gene. *Diabetes.* , 44:37–42.

- Pasquali, R. (2006).** Obesity and androgens: facts and perspectives. *Fertile Sterile*, 85(5):1319-40.
- Pasquali, R.; Gambineri, A. and Pagotto, U.( 2006).** The impact of obesity on reproduction in women with polycystic ovary syndrome. *BJOG*; 113:1148-1159.
- Pauerstein, C. J.; Eddy, C. A.; Croxatto, H. D.; Hess, R.; Siler – Khoder, T. M. and Croxatto, H. B. (1987).** Temporal relationships of oestrogen, Progesterone and lutenizing hormone levels to ovulation in women. *Am. J. obstet. Gynecl.* 130: 876 – 484.
- Pepe, GJ. And Albrecht, ED. (1995).** Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. *Endocr Rev.*, 16:608–648.
- Perez, MS.; Cerrone, GE.; Benencia, H.; Marquez, N.; Piano, ED and Frechtel, GD.(2008).** Polimorfismos en los genes Cyp11a y Cyp17 y Etiologia del Hiperandrogenismo en Pacientes con Poliquistosis Ovarica. *Medicina.* 68: 129-134
- Peters, H.; Byskov, A. G.; Himelstein – Graw, R. and Faber, M. (1975).** Follicular growth: the basic event in the human ovary. *J. Reprod. Fertil.* 445 – 599.
- Petry CJ, Ong KK, Michelmore KF, Artigas, S.; Wingate, DL.; Balen, AH.; Zegher, F.de.; Ibanez,L and Dunger, DB.(2005).** Association of aromatase (CYP 19) gene variation with features of hyperandrogenism in two populations of young women. *Hum. Rrprod*, 20(7):1837-1843.
- Plendl, J.; Neumiiller, C.; Vollmar, A.; Auerbach, R. and Sinowatz, F.(1996).** Isolation and characterization of endothelial cells from different organs of fetal pigs. *Anat Embryol.*, 194:445-456.

- Poretsky, L.; Cataldo, NA.; Rosenwaks, Z. and Giudice, LC.( 1999).** The Insulin-Related Ovarian Regulatory System in Health and Disease. *Endocr Rev.*, 20:535-582.
- Poretsky, L.; Clemons, J. and Bogovich, K.( 1992).** Hyperinsulinemia and human chorionic gonadotropin synergistically promote the growth of ovarian follicular cysts in rats. *Metabolism*; 41:903-910.
- Prapas, N.; Karkanaki, A.; Prapas, I.; Katsikis, I and Panidis, D.(2009).** Genetic of polycystic ovary syndrome. *HIPPOKRATIA*. 13(4) : 216-223.
- Punyadeera, C.; Verboost, P. and Groothuis, P.(2003).** Oestrogen and progestin responses in human endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 84(4):393-410 .
- Rai, TS.; Dhandapany, PS.; Ahluwalia, TS.; Bhardwaj, M.; Bahl, A.; Talwar, KK.; Nair, K.; Rathinavel, A and Khullar, M. (2008).** ACE I/ D polymorphism in Indian patients with hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* , 311: 67-72 .
- Randle, PJ.; Garland, PB.; Hales, CN. and Newsholme, EA. (1963).** The glucose fatty acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*, 1:785-9.
- Reaven, G.M. (1995).** Effect of metformin on various aspects of glucose, insulin and lipid metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus with varying degrees of hyperglycemia" *Diabetes Metab.Rev.*,11(1): 97-108.
- Rebuffe-Scrive, M.; Marin, P. and Bjorntorp, P.(1991).** Effect of testosterone on abdominal adipose tissue in men. *Int J Obes.*, 15:791-5.
- Recabarren, S.E.; Smith, R.; Rios, R.; Maliqueo, M.; Echiburru, B.; Codener, E.; Cassorla, F.; Rojas, P and Sir-Petermann, T. (2008).** Metabolic profile in sons of women with Polycystic Ovary Syndrome. *J. Clint. Endocrinal. Metal.* 93(5):156-81.

- Repaci, A.; Gambineri ,A. and Pasquali, R. (2011).** The role of low-grade inflammation in the polycystic ovary syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology* , 335: 30-41.
- Rich-Edwards, JW.; Spiegelman, D.; Garland, M.; Hertzmark, E.; Hunter, DJ.; Colditz, GA.; Willett, WC.; Wand, H. and Manson, JE. (2002).** Physical activity, body mass index, and ovulatory disorder infertility. *Epidemiology*, 13:184-190.
- Ridker, PM.; Baker, MT.; Hennekens, CH.; Stampfer, MJ. and Vaughn, DE. (1997).** Alu-repeat polymorphism in the gene coding for tissue-type plasminogen activator (TPA) and risks of myocardial infarction among middle-aged men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*,17:1687–90.
- Rigat, B.; Hubert, C.; Alhenc-Gelas, F.; Cambien, F.; Corvol, P. and Soubrier, F. (1990).** An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*, 86:1343-1346.
- Rjeffey, M.D. (2000).** Long term consequences at Polycystic Ovary Syndrome Joint ASRM/ESHRE. *Repraluctive Endocrinol congress*, Coarse 1.
- Robert, J. F.; Quigley, M. F. and Yen, S. S. C. (1981).** Endogenous opiates modulate pulsatile luteinizing hormone release in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 52: 583 – 586.
- Roe, A. H. and Dokras, A. (2011).** The Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome in Adolescents. *Rev Obstet Gynecol.*, 4(2):45-51.
- Rojanasakul, A.; Gustavson, KH.; Lithell, H. and Nillius, SJ.(1985)** .Tetraploidy in two sisters with the polycystic ovary syndrome. *Clinical Genetics*, 27: 167–174.
- Rojas, J.; Chávez, M.; Olivar, L.; Rojas, M.; Morillo, J.; Mejías,J.; Calvo, M and Bermúdez, V. (2014).** Polycystic Ovary Syndrome, Insulin



Resistance, and Obesity: Navigating the Pathophysiologic Labyrinth, *International Journal of Reproductive Medicine* , 9:17.

- Rosenfield, RL. (1999).** Ovarian and adrenal function in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* , 28 265–293.
- Roshdy, HM. (2010).** The effect of Agnucaston and Metformin on the chromosomes of pregnant females and their embryos. *Nature and science*, 8(7):1-7.
- Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 (2004).** Consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.*, 81:19-25.
- Rousseau, M.; MF.; Misrahi, M.; Loosfelt, H.; Milgrom, E. and Berger, R. (1987).** Localization of the human progesterone receptor gene to chromosome 11q22-q23. *Hum Genet*, 77:280-282.
- Rowe, S. M., Coughlan, S. J., McKenna, N. J., Garrett, E., Kieback, D. G., Carney, D. N. and Headon, D. R. (1995).** Ovarian carcinoma-associated TaqI restriction fragment length polymorphism in intron G of the progesterone receptor gene is due to an Alu sequence insertion. *Cancer Res.*, 55: 2743–2745.
- Sabuncu, T.; Vural, H.; Harm, M. and Harma, M.( 2001).** Oxidative stress in polycystic ovary syndrome and its contribution to the risk of cardiovascular disease. *Clin Biochem.*,34:407-13.
- Sambrook, J. ; Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: A laboratory manual . 2nd edition, Cold spring harbor laboratory press, cold spring Harbor, New York.
- Sapkota, R.; Dasgupta, R.; Das, B and Rai, L. (2013).** The insertion /deletion D polymorphism of angiotensin converting enzyme (ACE) gene in type II diabetic. *Recent Research in Science and Technology*, 5(4):07-10.

- SAS Institute. (2012).** SAS/STAT: user's guide; version 9.1.3. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Sata, F.; Yamada, H.; Yamada, A.; Kato, EH.; Kataoka, S.; Saijo, Y.; Konodo, T.; Tamaki, J.; Minakami, H. and Kishi, R.(2003).** A polymorphism in the CYP17 gene relates to the risk of recurrent pregnancy loss. *Molecular Hum. Rrprod*, 9(11): 725-728.
- Sato, S. and Tomita, I. (2001).** Short-Term screening method for the prediction of carcinogenicity of chemical substances: current status and problems of an *in vivo* rodent micronucleus assay. *J of Health Science*, 47 (1): 1-8.
- Schmidt, J.(2011).** Polycystic Ovary syndrome.: Ovarian pathophysiology and consequences after the menopause . University of Gothenburg, Sweden. 96:2178-85.
- Schuring, AN.; Schulte, N.; Sonntag, B. and Kiesel, L. (2008).** Androgens and Insulin - Two Key Players in Polycystic Ovary Syndrome. *Gynäkol Geburtshilfliche Rundsch*; 48:9-15
- Schwartz, RA.( 1994).** Acanthosis nigricans. *J Am Acad Dermatol.*, 31(1): 1-19.
- Sewer, MB. and Jagarlapudi, S. (2009).** Complex assembly on the human CYP17 promoter. *Mol Cell Endocrinol*, 300 (1-2): 109-14.
- Shamma, F. N.; Penzias, A. S.; Thatcher, S. D.; Decherney, A. H. and Lavy, G. (1992).** Corpus luteum function in Successful IVF cycies. *Fertil. Steril.*; 57: 1107 – 9.
- Sheikhha MH.; Kalantar SM. and Ghasemi, N. (2007).** Genetics of polycystic ovary Syndrome. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 5 (1):1-5.
- Shimada, M.; Yamashita, Y.; Ito, J.; Okazaki, T.; Kawahata, K. and Nishibori, M. (2004).** Expression of two progesterone receptor isoforms in cumulus cells and theirroles during meiotic resumption of porcine oocytes. *Journal of Molecular Endocrinology* ,33(1): 209-225.

- Shimizu, N.; Itoh, N.; Utiyama, H. and Wahl, G. M. (1998).** Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J Cell Biol.*, 140:1307–1320.
- Shoham, Z.; Jacob, H. S.; Insler, V. (1992).** Lutenizing hormone its role, mechanism of action and detrimental effect when hypersecreted during the follicular phase. *Fertil Steril.*; 59: 153 – 61.
- Shubber, E. and AL-Allak, B. (1986).** Spontaneous chromosomal aberration and SCE in human lymphocyte effect of culture conditions. *Nucleus*, 29 : 92-98.
- Simpson, E.R; Mahendroo, M.S.; Means, G.D.; Kilgore, M.W.; Hinshelwood, M.M.; Graham-Lorence, S.; Amarneh, B.; Ito, Y.; Fisher, C.R. and Michael, M.D. (1994).** Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis . *Endocr. Rev*, 15:342-355.
- Sir- Petermann, T.; Maliqueo, M.; Perez-Bravo, F.; Angel, B.; Caarvajal, F and Delsolar, M.P. (2001).** PCOS: The importance of establishing diagnosis. *Rev. Med. Chil.*, 129: 805-812.
- Slayden, SM.; Moran, C.; Sams, WM, Jr.; Boots, LR. and Azziz, R. (2001).** Hyperandrogenemia in patients presenting with acne. *Fertil Steril.*, 75(5): 889-92.
- Sobczuk, A.; Romanowicz, H.; Fiks, T.; Polac, I and Smolarz, B.(2009).** The CYP17 and CYP19 gene single nucleotide polymorphism in women with sporadic breast cancer. *Pol J Pathol.* ,4: 163-167.
- Soderlund, D.; Canto, P.; Carranza-Lira, S. and Méndez, JP. (2005).** No evidence of mutations in the P450 aromatase gene in patients with polycystic ovary syndrome. *Hum. Rrprod*, 20(4):965-969.
- Sowers, MR.; Wilson, AL.; Kardia, SR.; Chu, J.; Ferrell, R. (2006).** Aromatase gene (CYP19) polymorphisms and endogenous androgen concentrations in a multiracial/multiethnic, multisite study of women at midlife. *Am J Med*, 119:23-30 .

- Speroff, LG. ; Glass, RH . and Kase, NG. (1999).** An ovulation and polycystic ovary : Clinical Gynecologic Endocrinology and infertility 6<sup>th</sup> ed : Speroff, L.; GlassRH. And Kase, NG, Lippincott Williams and Wikins, Baltimore , USA.:487-521.
- Sporanda, Z. and Papic, Z. (2004).** Effect of increased testosterone level on woman's infertility .*Diabetologia.Croatica.*, 33:53-58.
- Spritzer, PM.; Morsch, DM. and Wiltgen, D.(2005).** Polycystic ovary syndrome associated neoplasms. *Arq Bras Endocrinol Metabol.*, 49(5):805-10.
- Steeds, R.; Adams, M.; Smith, P.; Channer, K. and Samani, NJ. (1998).** Distribution of tissue plasminogen activator insertion/deletion polymorphism in myocardial infarction and control subjects. *Thromb Haemost.*,79:980-4.
- Steele, MK.; Gallo, RV. and Ganong, WF. (1983).** A possible role for the brain renin-angiotensin system in the regulation of LH secretion. *Am J Physiol*; 245: 805-810.
- Stefanello, JR.; Barreta, MH.; Porciuncula, PM.; Arruda, JN.; Oliveira, JF.; Oliveira, MA. and Gonçalves, PB.( 2006).** Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. *Theriogenology*, 66(9):2068-2076.
- Stein I, Leventhal M. (1935).** Amenorrhoea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol*; 29:181-191.
- Su, W-H.; Lee, F-K. and Wang, P-H.(2013).** Recurrent pregnancy loss and thrombophilia in women with PCOS. *J Chinese Medical Association* ,76: 243-244.
- Sun, J.; Fan, H.; Che, Y.; Cao, Y.; Wu, X; Sun, H.; Liang, F.; Yi, L and Wang, Y. (2009).** Association between ACE gene I/D polymorphisms

and hyperandrogenism in women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) and controls. *BMC Medical Genetics*, 10:64-69.

**Szekeres-Bartho, J.; Barakonyi, A.; Miko, E.; Polgar, B. and Palkovics, T. (2001).** The role of gamma/delta T cells in the feto-maternal relationship. *Semin Immunol* ., 13: 229–233 .

**Taufurt-Cardona, Y.; Jaramillo-Ruiz, LD.; Muñoz-Ordóñez, W.; Muñoz-Benítez, SL. and Sierra-Torres, CH.(2012).** High frequency of chromosome aberrations observed in lymphocytes in postmenopausal obese women. *Iomedica*.,32(3):344-54.

**Talbott, E.O.; Zoborowsk , J.V.; Sutton - Tyrrell K , Mc Hugh -pemu Kp and , Guzick D.S .(2001).** Cardio vascular risk in women with polycystic ovary syndrome . *Obstet Gynecol Clin North* ., 28 : 111-133.

**Tamarin, R. H. (1996).** Principles of Genetic. 5th ed. W. M. C. Brown publishers: 48-50.

**Taylor, AE.; McCourt ,B.; Martin, KA.; Anderson, EJ.; Adams, JM.; Schoenfeld, D. and Hall, JE. (1997).** Determinants of Abnormal Gonadotropin Secretion in Clinically Defined Women with Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*; 82:2248-2256.

**Taylor, K.C.; Small, C.M.; Epstein, M.P.; Sherman, S.L.; Tang, W.; Wilson, M.; Bouzyk, M and Marcus, M. (2010).** Associations of Progesterone Receptor polymorphisms With Age at Menarche and Menstrual Cycle Length. *Horm Res Paediatr*; 74: 421-427.

**Tchernof, A. and Despres, JP. (2000).** Sex steroid hormones, sex hormone-binding globulin, and obesity in men and women. *Horm Metab Res*, 32:526-536.

**Teede, H.; Hutchison, S.; Zoungas, S. and Meyer, C.(2006).** Insulin resistance, the metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular disease risk in women with PCOS. *Endocrine*, 30:45-53.

- Tomlinson, J.A.; Pinkney, J.H.; Evans, A.M. and Stenhouse ,E. (2013).** Screening for diabetes and cardiometabolic disease in women with polycystic ovary syndrome. *The British Journal of Diabetes and Vascular Disease*, 13(3): 115–123.
- Trkova, M.; Kapras, J.; Bobkova, K.; Stankova, J. and Mejsnarova, B. (2000).** Increased micronuclei frequencies in couples with reproductive failure. *Reproductive Toxicology*, 14: 331–335.
- Tsilchorozidou, T.; Honour, JW. and Conway, GS. (2003).** Altered cortisol metabolism in polycystic ovary syndrome: insulin enhances 5 $\alpha$ -reduction but not the elevated adrenal steroid production rates. *J Clin Endocrinol Metab*, 88:5907-5913.
- Tsilchorozidou, T.; Overton, C. and Conway, GS.(2004).** The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol*, 60: 1-17.
- Turgeon, GL.; Kimura, Y.; Waring, DW. And Mellon, PL.(1996).** Steroid and pulsatile gonadotropin releasing hormone (GnRH) regulation of Luteinizing hormone and GnRH receptor on a novel gonadotrope cell line. *Mol. Endocrinol.*, 10:439-45.
- Turgut, S.; Akin, F.; Akcilar, R.; Ayada, C. and Turgut, G. ( 2011).** Angiotensin converting enzyme I/D, angiotensinogen M235T and AT1-R A/C1166 gene polymorphisms in patients with acromegaly. *Mol. Biol. Rep.*, 38 (1): 569–576.
- Unsal, T.; Konac, E.; Yesilkaya, E.; Yilmaz, A.;Bideci, A.; Onen, H.I.; Cinaz, P. and Menevse, A.( 2009) .** Genetic polymorphisms of FSHR, CYP17, CYP1A1, CAPN10, INSR, SERPINE1 genes in adolescent girls with polycystic ovary syndrome. *J. Assist. Reprod Genet.*, 26: 205–216.
- Urbanek, M. (2007).** The genetics of the polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab*, 3(2):103-111.

- Urbanek, M. and Spielman, R.S.(2002).** Genetic analysis of candidate genes for the polycystic ovary syndrome .*Curr.Opin.Endocrinol. Diabetes* .,9:492-501.
- Vale, W.; Waiter, E.; Gray, P.; Harrison, C.; Bilezikjian, L. and Choe, S. (2004).** Actives and Inhibins and their signaling .*Annals of the New York Academy of Sciences*, 1038:142-7.
- Valkenburg, O.; Steegers-Theunissen, R.P.; Smedts, HP.; Dallinga-Thie, GM.; Fauser, BC.; Westerveld, EH. and Laven, JS. (2008).** A more atherogenic serum Lipoprotein Profile is Present in women with Polycystic Ovary Syndrome: a case-control study. *J. Clin. Endocrinol Metab*, 93(2):470-6.
- van Sande ME, Scharpé SL, Neels HM, Van Camp KO.(1985).** Distribution of angiotensin converting enzyme in human tissues. *Clin Chim Acta.*, 147(3):255-60.
- Vanzandvoort, H.; Dekanning, K. and Cerrits, T. (1996).** Medical Infertility care in low income countries. *Tropical Medicine and International Health*, 6(7) : 563-569.
- Velazquez, E.M.; Mendosa, S.; Hamer, T.; Sosa, F. and Glucck, C.J. (1994).** Metformin therapy in women with polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating menstrual regularity and pregnancy. *Metabolism*, 43:647- 655.
- Vendola, KA.; Zhou, J.; Adesanya, OO.; Weil, SJ. and Bondy, CA. (1998).** Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *J Clin Invest.*, 101:2622-2629.
- Verit, FF. and Erel O.( 2008).** Oxidative stress in non-obese women with polycystic ovary syndrome: correlations with endocrine and screening parameters. *Gynecol Obstet Invest.*,65:233-9.

- Verma, R. and A. Babu. (1994).** Human Chromosomes. Manual of basic Techniques Pregramon Press. New York, 240.
- Verma, R. S. and Babu, A. (1989).** Human chromosomes, Manual of basic techniques. Pergamon Press, Inc., 77: 218-222.
- Vermesh, M. and Kletzky, O. A.(1987).** Longitudinal evaluation of the Luteal phase and its transition into the follicular phase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65: 653– 658.
- Vink, JM.; Sadrzadeh, S.; Lambalk, CB. and Boomsma, DI. (2006).** Heritability of Polycystic Ovary Syndrome in a Dutch Twin-Family Study. *J Clin Endocrinol Metab*; 91(6):2100-2104.
- Vrbikova, J.; Grimmichova, T.; Dvorakova, K.; Hill, M.; Stanicka, S and Vondra, K.(2008).** Family History of Diabetes Mellitus Determines Insulin Sensitivity and  $\beta$  Cell Function in Polycystic Ovary Syndrome, *Physiol. Res.* 57: 547-553.
- Walddsteriecher, J.; Santoro, N.F; Hall, J.E.; Filicari, M. and Crowley, W.F.(1988).** Hyper function of the hypothalamic-pituitary axis in women with polycystic ovarian disease: indirect evidence for partial gonadotroph desensitization. *J Clin Endocrinol Metab*, 66:165–72
- Wang- Gohrke, S.; Chang-Claude, J.; Becher, H.; Kieback, DG and Runnebaum, I B.(2000).** Progesterone Receptor Gene Polymorphism Is Associated with Decreased Risk for Breast Cancer by Age 50. *Cancer Research*, 60: 2348-2350.
- Wang, JX.; Davies, MJ. and Norman, RJ.( 2001).** Polycystic ovarian syndrome and the risk of spontaneous abortion following assisted reproductive technology treatment. *Hum Reprod*,16:2606e9.
- Wickenheisser, J.K.; Nelson-DeGrave, VL.; Quinn, PG. and McAllister, JM.( 2004).** Increased cytochrome P450 17 alpha - hydroxylase promoter



function in theca cells isolated from patients with polycystic ovary syndrome involves nuclear factor-1. *Mol. Endocrinol.* 18(3): 588-605.

**Wickenheisser, J.K.; Nelson-Degrave, V.L. And McAllister, J.M. (2006).** Human ovarian theca cells in culture . *Trends Endocrinol. Metab.*, 17:63-69.

**Wickenheisser, JK.; Quinn, PG.; Nelson, VL, Legro, RS.; Strauss, JF III. and McAllister, JM.( 2000).** Differential Activity of the Cytochrome P450 17 $\alpha$ -Hydroxylase and Steroidogenic Acute Regulatory Protein Gene Promoters in Normal and Polycystic Ovary Syndrome Theca Cells. *J Clin Endocrinol Metab.*, 85:2304-2311.

**Winkelmann, BR.; Nauck, M.,; Klein, B.; Russ, AP.; Böhm, BO.; Siekmeier, R.; Ihnken, K.; Verho, M.; Gross, W and März, W.(1996).** Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with increased plasma angiotensin-converting enzyme activity but not with increased risk for myocardial infarction and coronary artery disease. *Ann Intern Med.*, 125(1):19-25.

**Wiweko, B.; Auditiyarini , E and Anita, D. (2011).** Relation between CYP17 Polymorphism and Hyperandrogenemia in Polycystic Ovarian Syndrome. *Indones J Obstet Gynecol .*, 35(1): 3-7.

**Wood, JR.; Ho, CK.; Nelson-Degrave, VL.; McAllister, JM. and Strauss, JF 3rd. (2004).** The Molecular signature of PCOS theca cells defined by gene expression profiling. *J. Reprod Immunol*, 63(1):51-60.

**Yadav, M. (2004).** *Genetics*. Discovery Publishing House. 2nd ed, New Delhi: 58- 60,74-78.

**Yang, M; Qiu, C-C; Xu, Q and Xiang, H-D.(2006).** Association of Angiotensin Converting Enzyme Gene I/D polymorphism With Type 2 Diabetes Mellitus. . *Biomedical and Environmental Sciences*, 19: 323-327

- Yarak, S.; Bagatin, E.; Hassun, K.; Parada, MOAB, and Filho, ST. (2005 ).** Hyperandrogenism and skin: polycystic ovary syndrome and peripheral insulin resistance., *An Bras Dermatol*, 80(4):395-410.
- Yaseen, N.Y. (1990).** Cytogenetic study on human colorectal cancer cell. Ph.D. thesis, Univ. of Sheffield.
- Yassen, A. A.; Salih, A. M.; Harbawi, D. and Jaber, T. A. (1998).** Anew modified medium for human peripheral blood leucocytes cultures. *AL-Kufa J.*, 1(2): 1-10.
- Yen, S. C. (1993).** Clinical applications of gonadotropin – releasing hormone and gonadotropin – releasing hormone analogs . *Fertil Steril.*; 39: 257 – 66.
- Yesilada, E.; Sahin, I.; Ozcan, H.; Yildirim, I.H.; Yologlu, S. and Taskapan, C. (2006).** Increased micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes in women with polycystic ovary syndrome. *Eur. J. Endocrinol.*, 154: 563-568 .
- Yildiz, BO. and Azziz, R. (2007).** The adrenal and polycystic ovary syndrome. *Rev Endocr Metab Disord*; 8:331-342.
- Yki-Jarvinen, H.; Mäkimattila, S. ; Utriainen, T. and Rutanen, E.M. (1995).** Portal insulin concentrations rather than insulin sensitivity regulate serum sex hormone-binding globulin and insulin-like growth factor binding protein 1 in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, 80:3227-3232.
- Yoshimura, Y.(1997).** The Ovarian Renin-Angiotensin System in Reproductive Physiology, *Frontiers in neuroend ocrinology. Front Neuroendocrinol .* 18(3):247-291.
- Zawadzki, J and Dunaif, A. (1992) .** Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach Oxford: *Blackwell Scientific Publications*:377–384.

**Zhang, XL.; Zhang, CW.; Xu, P.; Liang, FJ.; Che, YN.; Cao, YX.; Wu, XK.; Wang, WJ.; Yi, L.; Gao, Q. and Wang, Y. ( 2012).** NSPrs 2470152 in CYP19 is correlated to aromatase activity in Chinese polycystic ovary syndrome patients. *Molecular Medicine Reports*, 5 (1): 245-9.

# Summary

Designed this study some cytogenetic , molecular biology and physiological sides for women with polycystic ovary syndrome (PCOS). Blood samples were collected from fertility and sterility in Al-Sadr Medical Teaching Hospital in Al-Najaf City during the period between 1/10/2011 to 1/11/2012 .These samples included 130 females with polycystic ovary syndrome (PCOS), compared with 100 healthy females as a control group which were fertile and apparently healthy and their age ranged from 15-45 years.

This study included three parts, the first concerned associations of some clinical and physiological signs and parameters of females with PCOS; the second way studied some cytogenetic tests included Mitotic Index (MI) and Micronuclei (MN) coefficients and chromosomal aberration percentages (CAs); and the third includes molecular study for five genes contributed with PCOS and their polymorphisms and some possible mutations, these genes are *PGR*, *ACE*, *TPA*, *CYP17* and *CYP19*.

Current study revealed significant increment ( $P \leq 0.05$ ) for Body Mass Index (BMI) for females with PCOS than the control group , reaching (29.79) and 24.80) respectively. While no differences found for age groups between patients and control groups. Several changes found in clinical symptoms of PCOS patients like rate increment of Hirsutism (65.38%), Family History (38.46%), irregular menstrual period (63.85%), recurrent abortions(42.31%) and infertility(90 %) comparing to women with PCOS who they show those symptoms.

The reproductive hormones which included estimation of LH, testosterone, prolactin, progesterone, estradiol and FSH, revealed that the concentration significantly increment ( $P \leq 0.01$ ) for FSH, LH, prolactin and testosterone for PCOS suffering patient reaching (5.60 mIU / ml) , (16.86 mIU / ml), (17.67 ng / ml) and (1.09 ng / ml) , , comparison to control group, reaching (4.09 mIU / ml), (6.43 mIU / ml) , (8.14 ng / ml) and (0.38 ng / ml) , respectively in ( $P \leq 0.01$ ). While progesterone and estradiol were significantly decremented ( $P \leq 0.01$ ) reaching (8.21 ng/ml and (56.76 Pg/ml) comparison with control group (15.40 ng/ml) and (96.22 Pg/ml) respectively.

The cytogenetic study revealed a significant decrement ( $P \leq 0.001$ ) in Mitotic Index in females with PCOS compared with control group, while there are increment in micronuclei ( $P \leq 0.001$ ). While numerical and structural aberration of chromosomes diagnosed as deletion, dicentric chromosome, polyploidy and chromosomal breaks which increased significantly in patient than healthy control group ( $P \leq 0.001$ ).

The molecular study revealed that *PGR* gene has two alleles with three genotypes (T1T1, T1T2 and T2T2) in both of test and control patients. It's noticed a significant difference in percentage of the three alleles frequency between the two groups and within each group, and the polymorphism comparison with studied hormones concentrations and body mass index revealed no significant differences among these groups.

And for *ACE* gene polymorphism two alleles found, deletion (D) and insertion (I), with three genotypes (DD, DI, and II). A significant difference in percentages for the three alleles frequency and between allele D and I between the two groups and the frequency within each group (PCOS and control); in addition the DI allele increased significantly in both groups; and no significant difference found between patients and control in comparison with polymorphisms and studied hormones concentrations and body mass index and age except association of testosterone increment significant difference at ( $P \leq 0.01$ ). and FSH decrement significant difference ( $P \leq 0.05$ ) with allele DD.

When polymorphisms studied for *TPA* gene, allele D and I found with three allelic combinations (DD, DI, and II); a significant difference ( $P \leq 0.001$ ) between the three allelic combinations with both of D and I alleles between patients and control groups, and with allelic frequency in each group. While no significant difference found between studied hormones and the three alleles frequencies, in both patients and control groups.

*CYP17* gene has two alleles T and C, making three genotypes (TT, TC, and CC). The TT, TC, and CC genotype occurrence in females with PCOS was higher significantly comparing to control group at ( $P \leq 0.001$ ), the same distribution found for percentage of alleles T and C individually. The association of polymorphism percentage for the *CYP17* three genotypes with hormones concentration, body mass index and age, no significant differences except

association of testosterone increment and estradiol decrement with mutant allele CC ( $P \leq 0.01$ ), and also association of age with CC, TC genotypes at ( $P \leq 0.05$ ).

The typing results of *CYP19* gene revealed two alleles for the mutation SNP rs2414096 (A, G) and three genotypes for this mutation (AA, AG, GG), it's found that significant difference ( $P \leq 0.001$ ) in percentage for the three polymorphisms and frequency of A and G individually between diseased females and control group. No significant difference between hormones concentrations, body mass index and age with the three genotypes percentage.

**Republic of Iraq**  
**Ministry of Higher Education & Scientific Research**  
**University of Kerbala College of Education for Pure Sciences**  
**Department of Biology**



# **Molecular and Physiological Study on Polycystic Ovary Syndrome of Women in Kerbala Province**

**A Thesis**  
Submitted to the Council of College of Education For Pure Sciences University of Kerbala in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Biology/ Zoology

**By**

**Liqaa Hasoon Saqban Al- Joubori**

**B. Sc. Biology, Baghdad University / 1996**  
**M. SC. Zoology - Kerbala University/ 2006**

**Supervised by**

**Prof .Dr. Ali Hmood Al- Saadi      Prof. Dr. Staar Jasim Hatrosh**

**2014 A. D.**

**1435 A. H.**