



جامعة دمشق
كلية العلوم
قسم علم الحياة الحيوانية

دراسة بعض التبدلات الجينية المرافقة لقصور المبيض المبكر (POF) عند النساء 46,XX في سورية

دراسة أعدت لنيل درجة الدكتوراه في الوراثة الجزيئية

إعداد

رنا جورج العجوري

إشراف

د. وليد الأشقر

هيئة الطاقة الذرية السورية

قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية

مشرفاً مشاركاً

أ. د عصام قاسم

جامعة دمشق - كلية العلوم

قسم علم الحياة الحيوانية

مشرفاً

الفهرس

أ.ب الخلاصة
ت.ث Abstract
ج التعاون العلمي
8-1 الفصل الأول: المقدمة والأهداف
67-10 الفصل الثاني: الدراسة المرجعية
10 1.2 آلية عمل المبيض عند المرأة
10 1.1.2 جريبات المبيض
12 2.1.2 هرمونات الدورة الحيضية
13 3.1.2 الدورة الحيضية
15 2.2 العقم و أسبابه عند النساء
15 1.2.2 العوامل المكتسبة
16 2.2.2 العوامل المتعلقة بالإباضة
17 3.2.2 العوامل المتعلقة بالرحم
18 4.2.2 قصور المبيض المبكر (POF)
18 3.2 قصور المبيض المبكر (POF) و الإضطرابات الوراثية
19 1.3.2 شذوذات الصبغي الجنسي X
20 1.1.3.2 متلازمة تيرنر (Turner Syndrome)
21 2.1.3.2 ثلاثية الصبغي (Trisomy)
21 3.1.3.2 متلازمة الصبغي X الهش (Fragile X Syndrome)
23 4.1.3.2 الحذوف على الصبغي X
26 5.1.3.2 الإنتقالات الصبغية الجسمية - و الصبغي X المتوازنة
27 4.2 المورثات المرشحة لقصور المبيض المبكر و الصبغي X
27 1.4.2 المورثات المرشحة المتوضعة على الذراع القصيرة من الصبغي X
27 1.1.4.2 المورثة (ubiquitin-specific protease 9) USP9X
28 2.1.4.2 المورثة (DEAD-BOX 3, X-LINKED) DBX
28 3.1.4.2 المورثة (Zinc finger X) ZFX
29 4.1.4.2 المورثة (Bone morphogenetic protein) BMP15
29 2.4.2 المورثات المرشحة المتوضعة على الذراع الطويلة من الصبغي X

29 (Diaphanous Homolog 2) DIAPH2 المورثة 1.2.4.2
29 (Dachshund Homolog 2) DACH2 المورثة 2.2.4.2
30 (Premature Ovarian Failure, 1B) POF1B المورثة 3.2.4.2
30 (X-propyl aminopeptidase 2) XPNPEP2 المورثة 4.2.4.2
30	.. (Progesterone Receptor Membrane Component-1) PGRMC1 المورثة 5.2.4.2
31(fragile X mental retardation 1) FMR1 المورثة 6.2.4.2
31 المورثات الجسمية المرشحة لقصور المبيض المبكر.
31 LHR المورثة FSHR المورثة LH المورثة FSH المورثة 1.5.2
32 (Inhibin A) INHA المورثة 2.5.2
33 (FORKHEAD-TRANSCRIPTION-FACTOR-LIKE-2) FOXL2 المورثة 3.5.2
34 (Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase) GALT المورثة 4.5.2
34 (Growth Differentiation Factor 9) GDF9 المورثة 5.5.2
35 المورثة (Bone morphogenetic protein 15) BMP15 و بنيتها الجزيئية
35 BMP15 المورثة في الطفرات 1.6.2
38 BMP15 المورثة في الطفرات النقطية 1.1.6.2
44 Small indels الحذف والإدخال الصغيرة 2.1.6.2
45 TGF- β superfamily آلية عمل أعضاء 7.2
50 BMP15 في مراحل تشكل الجريبات في المبيض 8.2
55 المورثة (Growth differentiation factor 9) GDF9 وبنيتها الجزيئية 9.2
57 GDF9 المورثة في الطفرات 1.9.2
60 GDF9 في مراحل تشكل الجريبات في المبيض 10.2
62 GDF9 في مراحل الجريبات الإبتدائية والأولية وقبل الغارية 1.10.2
62 GDF9 في مرحلة الجريبات الغارية حتى مرحلة ما بعد الإباضة 2.10.2
63 GDF9 في تَوَسُّع الخلايا الرُّكْمِيَّة 3.10.2
94-69 الفصل الثالث: الدراسة العملية
69 3. العينة المدروسة و طرائق البحث
69 1.3 العينة المدروسة.
70 2.3 طرائق البحث

70 1.2.3 الدراسة الوراثية الخلوية (Cytogenetics)
70 1.1.2.3 الزراعة الخلوية وتجهيز المحضرات الصبغية
71 2.1.2.3 دراسة الصيغة الصبغية باستخدام تقانة التعصيب G و التلوين بغيرمزا
73 2.2.3 عزل الـ DNA الجينومي (genomic DNA)
74 3.2.3 التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR (Polymerase Chain Reaction)
74 1.3.2.3 تضخيم المورثة BMP15
78 2.3.2.3 تضخيم المورثة GDF9
81 4.2.3 الرحلان الكهربائي
82 5.2.3 السلسلة الآلية للـ DNA (DNA Sequencing)
84 1.5.2.3 سلسلة الـ DNA بطريقة سانجر التقليدية
86 2.5.2.3 السلسلة الأوتوماتيكية للـ DNA باستخدام الرحلان الكهربائي ضمن الأنابيب الشعرية.....
86 1.2.5.2.3 تنقية شدة الـ PCR
87 2.2.5.2.3 تفاعل السلسلة الحلقي
88 3.2.5.2.3 تنقية شدة تفاعل السلسلة الحلقي
88 4.2.5.2.3 فصل شدة الـ DNA بواسطة الرحلان الكهربائي ضمن الأنابيب الشعري
91 3- التحليل الإحصائي.....
91 4-3 المواد و التجهيزات المستخدمة
91 1-4.3 المحاليل و المواد المستخدمة
93 2-4.3 الأدوات
94 3-4.3 التجهيزات المستخدمة
128-96 الفصل الرابع: النتائج
97 1.4 الدراسة الوراثية الخلوية و تحديد الطابع النووي للعينات المدروسة
98 2.4 الدراسة السريرية
100 3.4 الكشف عن الطفرات في المورثة BMP15
100 1.3.4 تضخيم الإكزون الأول للمورثة BMP15
100 2.3.4 تضخيم الإكزون الثاني للمورثة BMP15
102 3.3.4 نتائج قراءة السلسلة الأوتوماتيكية للإكزونين الأول و الثاني في المورثة BMP15
103 1.3.3.4 الطفرة Ala180Thr

104 Asn103Ser التغير 2.3.3.4
105 263 insLeu التغير 3.3.3.4
106 Ser284Ser التغير 4.3.3.4
107c.851+13G>A التغير الجديد 5.3.3.4
108 GDF9 المورثة في الطفرات في المورثة 4.4
108 GDF9 المورثة للإكزون الأول للمورثة 1.4.4
109 GDF9 المورثة للإكزون الثاني للمورثة 2.4.4
111 GDF9 المورثة في المورثة 3.4.4
112 Asn177 Lys التغير الجديد 1.3.4.4
113 Asp411Asn التغير الجديد 2.3.4.4
114 Thr149Thr التغير 3.3.4.4
115 Glu182Glu التغير 4.3.4.4
116 -5.4 التحليل الإحصائي
149-130 الفصل الخامس: المناقشة
130 ارتفاع مستوى هرمون الـ FSH وقصور المبيض المبكر
132 أنماط الطفرات والتغيرات في المورثة BMP15 وارتباطها مع قصور المبيض المبكر
143 أنماط التغيرات في المورثة GDF9 وارتباطها مع قصور المبيض المبكر
152-151 الفصل السادس: الخاتمة و التوصيات
156-153 قائمة المصطلحات العلمية
157 إهداء
158 شكرو تقدير
160 المراجع

الخلاصة

خلفية البحث: يوجد الكثير من الأسباب التي تؤدي إلى العقم عند النساء ويعد قصور المبيض المبكر أو الـ POF (Premature ovarian failure) من أكثرها شيوعاً، يعتمد تشخيص الـ POF على انقطاع الطمث قبل عمر الأربعين عاماً مترافقاً مع مستويات مرتفعة من الهرمون المنبه للجريب FSH ($FSH \geq 40$ IU/L).

تمثل الإضطرابات الوراثية أهم مسببات هذا المرض وتتضمن الزيوغ الصبغية أو الطفرات في المورثات الوظيفية ومن أهم المورثات المرشحة للـ POF: المورثة *BMP15* (Bone Morphogenetic Protein-15) التي تقع على الذراع القصيرة من الصبغي الجنسي X، والمورثة *GDF9* (Growth Differentiation Factor-9) والتي تقع على الذراع الطويلة من الصبغي الخامس، وقد أشارت الدراسات الأخيرة إلى الدور الحاسم لعوامل النمو المرمزة من قبل هاتين المورثتين في تشكل الجريبات وتكاثر الخلايا الحبيبية وفي الخصوبة.

هدف البحث: تهدف هذه الدراسة إلى تحري وجود الطفرات والتغيرات في المورثتين *BMP15* و *GDF9* لدى عينة من النساء السوريات المصابات بقصور المبيض المبكر وتحديد نسب تواترها في المجتمع السوري، مما سيساعد في الكشف والتدخل المبكر لتفادي عواقب الـ POF وهو التقرير الأول المقدم في سورية.

المواد والطرائق: شملت عينة البحث 80 امرأة مصابة بقصور المبيض المبكر موزعة على النحو التالي: 55 امرأة لديها انقطاع طمث أولي (عدم وجود دورة طمثية أبداً) و 25 امرأة لديها انقطاع طمث ثانوي (غياب الدورة الطمثية لمدة تزيد عن ستة أشهر)، و 200 امرأة كعينة شاهدة مع دورة طمثية منتظمة.

تمت الدراسة بحسب المراحل التالية: - دراسة وراثية خلوية بهدف استبعاد حالات الزيوغ الصبغية من

العينة المدروسة، - عزل الـ DNA الجينومي من الدم الوريدي - تضخيم إكزونات المورثتين بواسطة التفاعل السلسلي للبوليميراز (PCR) متبوعاً بالسلسلة الآلية لنواتج التضخيم للكشف عن الطفرات والتغيرات المورثية.

النتائج: أظهرت جميع حالات الـ POF المدروسة صيغة صبغية طبيعية (46,XX)، وكشفت سلسلة المناطق المرمزة في المورثة *BMP15* وجود طفرة نقطية معروفة هي Ala180Thr عند مريضة واحدة بتواتر قدره 1.2% ولم نجدها في عينات الشواهد، وثلاثة تغيرات عند أربع مريضات تم وصفهم في دراسات سابقة كتعدد شكلي وحيد النيكليوتيد هم Ser284Ser، Asn103Ser، 263 insLeu بتواتر 1.2% و 5% و 1.2% على التوالي. بالإضافة إلى كشف تغير واحد جديد في الإنترون لدى مريضة واحدة c.851+13G>A.

أما فيما يتعلق بالمورثة *GDF9* فقد كشفت سلسلة المناطق المرمزة وجود أربعة تغيرات عند 23 مريضة: اثنان من التغيرات جديان هما Asn177 Lys و Asp 411Asn ظهرا عند مريضتين ولم نلاحظهما في أي من عينات الشواهد، من المحتمل أن يكونا طفرات مسببة لقصور المبيض المبكر عند النساء، أما التغيران الباقيان فقد تم وصفهما في دراسات سابقة كتعدد شكلي وحيد النيكليوتيد وهما Thr149Th و Glu182Glu.

الاستنتاج: تعد التغيرات في المورثتين *BMP15* و *GDF9* شائعة بين مريضات قصور المبيض المبكر في المجتمع السوري بنسب تواتر قاربت النسب العالمية، وقد أظهرت هذه الدراسة طفرات محتملة لم يتم وصفها سابقاً مما يتوجب إجراء دراسة وظيفية لتحديد أهمية هذه الطفرات ودور كل منها في حدوث أو تطور الـ POF.

Investigation of some genetic variants accompanied with premature ovarian failure (POF) in Syrian women having 46,XX karyotype

Abstract

Background: there are too many causes of infertility in women and Premature ovarian failure (POF) is the most common one. POF is defined as the cessation of ovarian function before the age of 40 years and associated with high levels of gonadotropins (FSH \geq 40 UI/L) and low levels of gonadal hormones.

The genetic causes of POF include chromosomal abnormalities and mutations in genes such as Bone Morphogenetic Protein-15 (*BMP15*) located on the short arm of chromosome X and Growth Differentiation Factor-9 (*GDF9*) located on the long arm of chromosome 5. Recent studies have shown that the proteins encoded by these two genes play a role in folliculogenesis and granulosa cell growth and fertility.

Aim of Study: study was to verify the involvement of *BMP15* and *GDF9* variations in POF women in Syria and their frequency in the Syrian population. This may help in early detection of POF and this is the first report about POF in Syria.

Materials and Methods: Genetic screening of 80 patients with POF, 55 primary amenorrhea (PA), 10 secondary amenorrhea (SA) and 200 controls of Syrian origin was done. the study was performed as follows: 1- cytogenetic study in order to

exclude chromosomal abnormalities. 2- isolation of genomic DNA from frozen blood samples. 3- Amplification of exons by polymerase chain reaction (PCR) followed by automated DNA sequencing to detect mutations and genetic variations.

Results: All selected patients had a normal karyotype analysis 46,XX, Sequencing of the coding regions of the *BMP15* detected a point mutation Ala180Thr in one patient with a frequency of 1.2% and was not detected in controls. Three other variations (Asn103Ser ,Ser284Ser ,263 insLeu) were detected in four patients with a frequency of 1.2, 5 and 1.2%, respectively. Moreover, a new variation c.851+13G>A was detected in one patient.

Sequencing *GDF9* mutation coding regions detected four variations in 23 patients. Two new variants (Asn177 Lys and Asp 411Asn) were detected in two patients but not in controls. Therefore, they might be causing mutations of POF in women. However, Thr149Th and Glu182Glu were previously described before as single nucleotide polymorphisms.

Conclusion: variations in *BMP15* and *GDF9* are common in Syrian POF patients with frequencies similar to the previous reports. New variants have been detected. Therefore, further functional studies are needed in order to determine the role of these new variants in POF.

التعاون العلمي

أنجز هذا البحث بالتعاون مع مشفى التوليد الجامعي و الهيئة العامة لمشفى الزهراوي في دمشق من أجل تأمين العينات الدموية من مريضات يعانين العقم بسبب قصور المبيض المبكر، وبالتعاون مع هيئة الطاقة الذرية السورية قمنا بالدراسة العملية في قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية برئاسة الأستاذ الدكتور نزار مير علي، حيث تمت دراسة الصيغة الصبغية والتغيرات الوراثية في المورثتين *GDF9* و *BMP15* وذلك في مخبر الوراثة البشرية بإدارة وإشراف علمي للأستاذ الدكتور وليد

الأشقر.

الفصل الأول
المقدمة والأهداف

المقدمة

يُعتبر قصور المبيض المبكر (Premature ovarian failure (POF) (MIM-311360) والذي يُعرّف أيضاً بعدم كفاءة المبيض المبكر (Primary ovarian insufficiency (POI) عيباً أساسياً في المبيض يؤدي إلى توقف وظيفته، يتميز إما بغياب الدورة الطمثية أي انقطاع الطمث الأولي (PA Primary amenorrhea) وهو الشكل الأكثر خطورةً، أو بالنضوب المبكر لجريبات المبيض قبل عمر 40 عاماً أي انقطاع الطمث الثانوي (Secondary amenorrhea) SA) ولمدة تزيد عن ستة أشهر وهو الشكل الأكثر تواتراً (Cordts *et al.*, 2011). يرتبط الـ POF في كلتا الحالتين مع وجود مستويات مرتفعة من هرمونات موجهات الأبقناد Hypergonadotropic وبشكل خاص الهرمون المُنبه للجريب (FSH ≥ 40 IU/L) ويرتبط أيضاً بوجود مستويات منخفضة من هرمون الإستروجين (Vujović *et al.*, 2012) (estradiol < 20 pmol/L) Hypoestrogenism.

من المعروف أن قرابة 90% من النساء يحدث لديهن انقطاع الطمث الطبيعي أو الإياس (Menopause) بين عمري 45 و 55 عاماً ويبلغ متوسط العمر لحدوث الإياس 51 عاماً وتعاني النساء من عدة أعراض تسبق حدوث الإياس مثل الخفقان في القلب، القلق عند النوم، الإنخفاض في الطاقة، الشعور بالومضات الحرارية، و ذلك بسبب الإضطراب في مستويات هرمونات المبيض (Cox&Liu, 2014)، وبالمقابل لا تُظهر معظم النساء المصابات بقصور المبيض المبكر علامات واضحة أو أعراض تسبق انقطاع الطمث الثانوي والغالبية لديهن دورة طمثية طبيعية وخصوبة محتملة (Shelling, 2010).

يُصنّف الـ POF كسبب شائع للعقم عند النساء و يحدث تقريباً لدى امرأة واحدة من بين 1000 قبل عمر 20 عاماً بنسبة (0.01%) و لدى امرأة واحدة من بين 1000 قبل عمر 30 عاماً بنسبة (0.1%)

كما يوجد لدى امرأة واحدة من بين 100 قبل عمر 40 عاماً (1%) (Persani *et al.*, 2009).

هناك ثلاث آليات محتملة يمكن أن تؤدي إلى حدوث الـ POF وهي: الإنخفاض الخلقي في عدد الجريبات الابتدائية و عدم القدرة على تطور الجريبات الابتدائية إلى المراحل اللاحقة و زيادة معدل فقدان الجريبات نتيجة تسارع عمليات الرتق الجريبي، ومع ذلك تبقى الآليات المسببة لهذا المرض معقدة ومتباينة (Persani *et al.*, 2010).

رغم أن أكثر من 50% من حالات الـ POF مجهولة السبب (Idiopathic) فإن هناك العديد من الأسباب المحتملة لحصول المرض مثل العلاج الكيميائي أو العلاج الإشعاعي الذي يؤدي إلى قصور المبيض المبكر وتُظهر الدراسة النسيجية للمبيض بعد العلاج تليفاً في قشرة المبيض و تضرر الأوعية الدموية بالإضافة إلى انخفاض في عدد الجريبات والذي يرتبط بشكل مباشر مع مستوى التعرض إلى العلاج (Woad *et al.*, 2006)، كما تُشير أدلة محدودة أن جراحة الحوض قد تترافق مع الـ POF لأنها تُلحق الضرر بالأوعية الدموية للمبيض (Farquhar *et al.*, 2005)، وقد تبين وجود ارتباط بين الـ POF مع العديد من أمراض المناعة الذاتية ويُقدر أن نسبة 10-20% تقريباً من النساء اللواتي يظهرن قصور مبيض مبكر لديهن أحد أمراض المناعة الذاتية مثل: قصور الغدة الدرقية، قصور الغدة الكظرية، مرض السكري من النمط-1 وغيرها من الأمراض المناعية (Bakalov *et al.*, 2005)، كما يمكن أن تؤدي السموم البيئية والإلتهابات الفيروسية مثل التهاب الغدة النكفية و كذلك بعض الأمراض الإستقلابية إلى ظهور الـ POF (Vilodre *et al.*, 2007).

تمثل الإضطرابات الوراثية الأسباب الأكثر شيوعاً لقصور المبيض المبكر عند النساء و تُقدر نسبتها بين 8.8-33% من الحالات، وقد تكون على مستوى الصبغي أو في المورثات الموجودة على الصبغي

الجنسي X و الصبغيات الجسمية (Goswami & Conway, 2007).

ووفقاً لمعظم الدراسات فإن الزيوغ الصبغية (Chromosomal aberrations) للصبغي الجنسي X هي الأكثر تواتراً بين هذه الإضطرابات بنسبة 13% وقد تكون تبدلات بنيوية أو عددية ومن المرجح ارتباطها مع الـ POF لأنها تحدث في مواقع تضم مورثات تنظم تكاثر وتطور الخلايا الجنسية المنشئة (Germ cells) في المبيض (Cordts et al., 2011., Baronchelli et al., 2012).

يمكن أن نصنف الزيوغ الصبغية وفقاً للتالي:

1- الانقلابات أو الإنعكاسات (Inversions) وهي تقلب ترتيب المورثات في الصبغي والذي يحدث عند انكسار الصبغي في مكانين مختلفين و تعود القطعة البينية (Intervening segment) للدخول عكسياً. هنا لا تحدث خسارة في الـ DNA ولكن قد تتخرب المورثات في نقاط الكسر أو قد تصبح تحت سيطرة مناطق متتاليات منظمة مختلفة مما يؤدي إلى تغيير التعبير المورثي لهذه المورثات على نحو مفاجئ.

2- الإنتقالات أو الإزفاءات (Translocations) وهي تعمل على إعادة توضع شذف صبغية ضمن المجين، مثلاً كسر صبغيين متبوع بإصلاح شاذ يؤدي إلى إعادة ترتيب أجزاء كبيرة من المجين، مما ينتج عنه خلل وراثي على مستوى المورثات.

3- الحذوفات (Deletions) والتي يتباين مقدارها من حذف نوكلئوتيد واحد إلى قطعة كبيرة من الصبغي إلى حذف كامل الصبغي، ويمكن أن تحدث على طرف الصبغي أو داخله وهي تسبب العديد من الأمراض الوراثية.

كشفت العديد من الدراسات عن وجود مورثات مرشحة أو متهمة بإحداث قصور المبيض المبكر وقد تكون الطفرات في هذه المورثات مسؤولة عن تطور الـ POF تقريباً في 10% من الحالات (Kokcu, 2010)، وبشكل عام تُصنف الطفرات التي تحدث على مستوى المورثة الواحدة (Single gene mutation) على النحو التالي:

1- الطفرات النقطية (Point mutation) حيث يستبدل فيها أحد الأسس الآزوتية بأساس آخر.

قد تؤدي هذه الطفرات ضمن المناطق المرّمزة إلى تغيير حمض أميني بآخر يندخل ضمن البروتين مما يؤدي إلى تغيير في وظيفته وتدعى عندها طفرة مُعَلّطة (Missense mutation)، أو تسبب إنهاء مبكر للترجمة إذا استبدلت أحد كودونات التوقف (Stop codons) وهي (UAG، UAA، UGA) بالكودون المرّمز لأحد الحموض الأمينية الموجودة في الـ RNA المرسال (mRNA) مما يؤدي إلى خلل في وظيفة البروتين وتدعى عندها طفرة عديمة المعنى (Nonsense mutation). و لما كان كل حمض أميني يُرمز بأكثر من ثلاثية أسس واحدة فإن تغيير نكليوتيد واحد لا يغير دائماً في الحمض الأميني و بالتالي لا يؤثر على وظيفة البروتين الناتج وتدعى الطفرة بالصامتة (Silent mutation).

2- طفرات الإدخال (Insertion) أو الحذف (Deletion)، يمكن لكليهما أن يغير في طول وتوالي الـ DNA بسبب إدخال أو حذف نكليوتيد واحد أو أكثر، و يؤدي حدوثهما في الجزء المرّمز للبروتين في المورثة إلى تغيير في إطار القراءة (Reading frame) و بالتالي تغيير الحموض الأمينية التالية كلياً مما ينتج عنه خلل في وظيفة البروتين و يدعى هذا النمط بطفرات الإزاحة (Frameshift)، هذا و قد تؤدي الحذوفات الكبيرة (يشمل الحذف عدداً من الميغا أساس) إلى خسارة مورثات بكاملها.

3- الطفرات الديناميكية (Dynamic mutations) حيث تضم مورثات الأشخاص الأسوياء تكرارات ثلاثية النوكليوتيد مثل CAG أو CGG سواء في المناطق المؤزة للبروتين أو المناطق غير المترجمة وإن التضخم الكبير في عدد هذه التكرارات الثلاثية (تتضخم 1000 مرة تقريباً في مورثات الأشخاص المصابين) يؤدي إلى عدم استقرارها وبالتالي حدوث هذه الطفرات المسؤولة عن بعض الأمراض الوراثية مثل متلازمة الصبغي X الهش (Fragile X Syndrome).

تعتبر المورثة *BMP15* (Bone Morphogenetic Protein-15) (NM-005448) من أكثر المورثات المرشحة لقصور المبيض المبكر عند النساء وهي تقع على الذراع القصيرة من الصبغي الجنسي X في الموقع Xp11.2، وتتألف من إكزونين (Exons) يُقدر طولهما بـ 1179 زوجاً من الأسس (bp) يُرمزان ثلاث مناطق وظيفية هامة في البروتين *BMP15* الذي يُعتبر عامل نمو و تمايز يقوم بدور حاسم في عملية نمو الجريبات وتطورها في المبيض ويساهم في تحديد معدل عملية الإباضة (Laissue et al., 2006; Dube et al., 1998). أشارت الدراسات إلى وجود العديد من الطفرات في المورثة *BMP15* عند نساء أظهرن قصور المبيض المبكر مع وجود طابع نووي طبيعي 46.XX و تراوح تواتر هذه الطفرات بين 1.5-12% كما تنوع الطابع الظاهري عند المصابات بين انقطاع الطمث الأولي PA و انقطاع الطمث الثانوي SA (Rossetti et al., 2009; Stigliani et al., 2013).

تضم قاعدة بيانات طفرات هذه المورثة حتى الآن 17 طفرة: 16 طفرة نقطية وطفرة حذف وإدخال واحدة (www.biobase-international.com/hgmd/BMP15) وليس من المؤكد أن كل هذه الطفرات مسؤولة عن تغيير النشاط الوظيفي للبروتين *BMP15* وبالتالي ارتباطها بشكل كامل مع الـ POF حيث أن آلية التأثير الحيوي لبعض هذه الطفرات ما زالت غير معروفة في الوقت الحاضر.

من المورثات الجسمية المرشحة لقصور المبيض المبكر عند النساء المورثة *GDF9* (Growth) (Differentiation Factor-9) (NM-005260) التي تقع على الذراع الطويلة من الصبغي الخامس في الموقع 5q31.1 (McPherron *et al.*, 1993). تُعتبر المورثة *GDF9* مماثلة (Homologous) للمورثة *BMP15* في الإنسان وفي العديد من أنواع الثدييات بسبب التشابه الكبير بينهما في البنية الأولية و السلسلة وكذلك التشابه في الوظيفة وهي تتألف من إكزونين يُقدر طول الإكزون الأول بقرابة 397 زوجاً من الأسس (bp) أما طول الإكزون الثاني فيبلغ 968 زوجاً من الأسس (bp) وهما يرمزان ثلاث مناطق وظيفية هامة في البروتين *GDF9* الذي يُعتبر أيضاً عاملاً نمو وتمايز يساهم في نمو و تطور الجريبات في المبيض كمنظم رئيسي للعديد من عمليات الخلايا الحبيبية التي تحيط بالخلية الببيضية وكذلك منظم لمعدل عملية الإباضة (Jaatinen *et al.*, 1999; Dixit *et al.*, 2005).

تضم قاعدة بيانات طفرات هذه المورثة حتى الآن 6 طفرات نقطية

(www.biobase-international.com/hgmd/GDF9)، وقد أشارت الدراسات إلى وجود هذه الطفرات عند نساء أظهرن قصور المبيض المبكر و بلغ تواترها تقريباً 1.4% وتنوع الطابع الظاهري عند المصابات بين انقطاع الطمث الأولي PA و الثانوي SA مع وجود طابع نووي طبيعي 46.XX (Laissue *et al.*, 2006). تمت دراسة آلية التأثير الحيوي لبعض هذه الطفرات على البروتين الناتج ولكن مازال ارتباطها المباشر مع الـ POF غير مؤكد وهذا يدعم الإستنتاج بأن قصور المبيض المبكر مرض معقد ومتعدد العوامل يشارك في تطوره العديد من المواقع الوراثية (Kokcu, 2010).

تمكّن الباحثون خلال السنوات الأخيرة عن طريق دراسة المورثات المرشحة من تمييز المورثات والمسارات التي تؤدي إلى تطور قصور المبيض المبكر عند النساء على الرغم من أن الآليات المسببة

لهذا المرض مازالت غير واضحة في أكثر الحالات (Cordts *et al.*, 2011).

بما أن الإضطرابات الوراثية من الأسباب الشائعة للـ POF الذي يؤدي إلى العقم عند النساء، وبناءً على ماسبق تبرز أهمية إجراء الدراسات على المستوى الوراثي الجزيئي في سورية حيث يمثل كشف التبدل الوراثي عند المريضة في حال وجوده معلومة مفيدة لعائلتها و قريباتها و يمكننا أن نتوقع تطور الـ POF وخسارة الخصوبة في عمر مبكر، وبالتالي فإن الإختبار الوراثي أداة تشخيصية مهمة هنا لتفادي عواقب الـ POF وخصوصاً عند هؤلاء النساء من أجل اتخاذ قرارات مهمة تتعلق بالحمل أو اللجوء إلى استخدام تقنيات تحفظ الخصوبة بهدف الحمل في مرحلة لاحقة مثل تجميد الخلايا البيضية الناضجة أو تجميد نسيج المبيض (Picton *et al.* 2008).

تشير البيانات العالمية إلى أن المورثتين *BMP15* و *GDF9* هما من أكثر المورثات المرشحة لقصور المبيض المبكر لذا رأينا أن تحديد الطفرات والتغيرات الوراثية في كل من هاتين المورثتين يمكن أن يساعد في الكشف وبالتالي التدخل المبكر لتفادي عواقب الـ POF عند المرأة في سورية ذات النمط النووي الطبيعي 46,XX، وأيضاً تحديد تواتر هذه التغيرات المرافقة للـ POF في مجتمعنا السوري ومقارنته مع المجتمعات الأخرى لمعرفة نسبة انتشارها (وهو التقرير الأول المقدم في سورية)، وهذا كان الهدف من الدراسة الحالية.

الفصل الثاني
الدراسة المرجعية

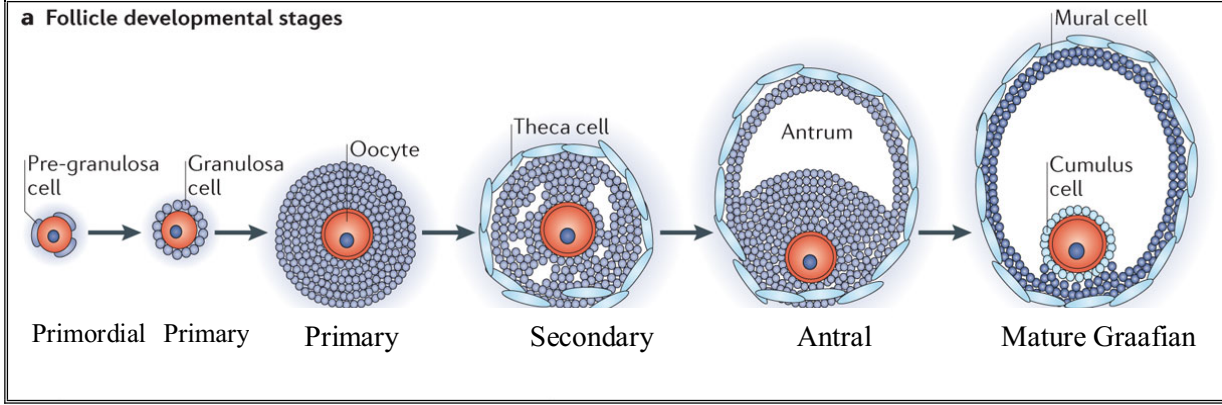
1.2 - آلية عمل المبيض عند المرأة

إن الوظيفة الأساسية للمبيض هي إنتاج الخلايا البيضية (Oocytes) الناضجة من أجل الإخصاب و التكاثر بالإضافة إلى إفراز الهرمونات الستيروئيدية الضرورية من أجل تنشيط و تفعيل عملية الإباضة و تهيئة الرحم من أجل الحمل فيما بعد.

1.1.2 - جريبات المبيض

يبدأ المبيض بالتشكل خلال الأسابيع الأولى من الحمل وتظهر الـ Oogonia (بزور البيوض) في الأسبوع العاشر من الحمل نتيجة تكاثر الخلايا الجنسية المنشئة الابتدائية (Primordial germ cells) ثم تتطور إلى الخلايا البيضية الأولية وتُحاط بطبقة واحدة من الخلايا السليفة للحبيبية (Pregranulosa cells) مشكلة الجريب الابتدائي (Primordial follicle) ويُعتبر الجريب الوحدة الوظيفية في المبيض (Forabosco *et al.*, 1993). يحتوي المبيض في المرحلة الجنينية تقريباً بين (6 - 7) ملايين من الجريبات الابتدائية حيث يتحلل أغلب هذه الجريبات قبل الولادة وبعدها، وعند البلوغ يبقى من هذه الجريبات تقريباً (200 000) ولكن يصل بحدود (400) جريب إلى مرحلة الإباضة خلال المرحلة الإنجابية للمرأة، و تستنفذ الجريبات من المبيض عند أغلب النساء تقريباً في عمر 50 سنة مما يؤدي الى حدوث انقطاع الطمث (Menopause) (Gougeonet *al.*, 1996). يدخل الجريب الابتدائي عند البلوغ طور النمو حيث يزداد حجم الخلية البيضة بشكل واسع وتصبح الخلايا السليفة للحبيبية مكعبة الشكل وتدعى عندها بالخلايا الحبيبية (Granulosa cells)، وعندما تشكل هذه الخلايا طبقة أو أكثر حول الخلية البيضية نتيجة تكاثرها يدعى الجريب بالأولي (Primary follicle) الذي يتطور إلى الجريب الثانوي أو قبل الغاري (Secondary or preantral follicle)، وتستغرق مرحلة الانتقال من

الجريب الأولي إلى الجريب الثانوي عند الإنسان بحدود 120 يوم (Picton *et al.*, 1998). تفرز الخلية البيضة خلال طور النمو غشاء غني بـ (Glycoprotein) يحيط بها، و تتشكل ممرات تصل بينها وبين الخلايا الحبيبية تدعى موصلاً فجويّ (Gap junction) تؤمن الإتصال بينهما و تسمح بمرور الجزيئات الصغيرة بالإتجاهين (Gershon *et al.*, 2008)، وكذلك يتشكل جوف (Antrum) مملوء بسائل ضمن الجريب يقسم الخلايا الحبيبية إلى نمطين هما: الخلايا الحبيبية الرُكمية التي تحيط بالخلية البيضة (Cumulus granulosa cells) والخلايا الحبيبية الجدارية التي تبطن جدار الجريب (Mural granulosa cells) ويدعى الجريب في هذه المرحلة الجريب الغاري (Antral follicle)، تأخذ مرحلة الإنتقال من الجريب الثانوي إلى الجريب الغاري تقريباً 71 يوم عند الإنسان وتتمايز في هذه المرحلة الخلايا القرايية (Theca cells) التي تكون على تماس مع نسيج المبيض إلى نمطين هما: القراب الظاهر (Theca externa) و القراب الغائر (Theca interna) وتبدأ هذه الخلايا بالتعبير عن مستقبل هرمون الـ LH و تتابع الخلايا الحبيبية التعبير عن مستقبل هرمون الـ FSH كما يكتمل نضج الخلية البيضية من حيث النمو والإستعداد للإنقسام المنصف الثاني (Yamato *et al.*, 1992). انطلاقاً من هذه المرحلة ينمو جريب واحد من الجريبات بشكل أسرع وينتج مستويات أعلى من هرموني الإستروجين و الإنهيبين و يصبح الجريب المهيمن و يتابع تطوره الى مرحلة جريب غراف الناضج (Mature Graafian follicle) المؤهل للإخصاب وذلك خلال مدة 14 يوم تقريباً، ويتميز بأن الخلية البيضة تحتل جزء طرفي منه مُحاطة بـ (2-3) طبقات من الخلايا الحبيبية تدعى الـ رُكّة البيضية (Cumulus oophorus) كما هو موضح في (الشكل 1) (van den Hurk & Zhao, 2005).



الشكل 1 : مراحل تطور الجريبات

تتطور الخلايا البيضية داخل جريبات المبيض و يتكون الجريب في المراحل المبكرة من خلايا تحيط بالخلية البيضية تدعى الخلايا الحبيبية (Granulosa cells) و التي يؤدي تكاثرها إلى نمو الجريب كما تظهر خلايا تتوضع على السطح الخارجي للغشاء القاعدي تدعى الخلايا القارية (Theca cells) في مرحلة الجريب الثانوي و يتشكل جوف (Antrum) مملوء بسائل يقسم الخلايا الحبيبية إلى نمطين هما : الخلايا الحبيبية الرُكمية التي تحيط بالخلية البيضة (Cumulus granulosa cells) والخلايا الحبيبية الجدارية التي تبطن جدار الجريب (Mural granulosa cells)، تأخذ مرحلة الإنتقال من الجريبات الأولية إلى الجريبات الثانوية عند الإنسان بحدود 120 يوم كما تأخذ مرحلة الإنتقال من الجريبات الثانوية إلى الجريبات الغارية تقريباً 71 يوم (Rong & David, 2013).

2.1.2 - هرمونات الدورة الحيضية

يتم تنظيم الدورة الحيضية (Menstrual cycle) عند المرأة بواسطة ارتفاع و تقلبات العديد من الهرمونات المختلفة والتي تعمل معاً لإعداد الجسم للحمل و تتضمن:

- الهرمون المنبه للجريب Follicle-Stimulating Hormone (FSH) والهرمون المُلَوِّتَن (LH)
- الهرمون المنبه للجريب Luteinizing Hormone اللذان تفرزهما الغدة النخامية.
- هرمونات الإستروجين و البروجسترون و الإنهيين اللذين يفرزهم المبيض.

3.1.2 - الدورة الحيضية

يبلغ متوسط الدورة الحيضية عند المرأة 28 يوم و يمكن تقسيماً وفقاً للأطوار و التغيرات التي تطرأ على المبيض إلى ثلاثة أطوار:

- الطور الجريبي Follicular Phase

- الإباضة (التبويض) Ovulation

- الطور التالي للإباضة Postovulatory Phase أو الطور الأصفر Luteal Phase

تتحكم المنظومة الهرمونية بتطور و نضج الجريبات في المبيض وهي تعتمد على سلامة وظيفة المحور الهرموني تحت المهادي-النخامي-المبيضي (Hypothalamo - Pituitary - Ovarian hormone Axis) (Ferin, 2008)، تفرز منطقة تحت المهاد (Hypothalamus) في الدماغ الهرمون المُطلق لموجهات الأفتاد GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) الذي يسير عبر الأوعية الدموية الدقيقة في الجهاز النخامي البؤبي (Pituitary Portal System) ليصل إلى الفص الأمامي للغدة النخامية (Pituitary anterior)، ويحثها على إفراز هرموني الـ FSH و الـ LH اللذين يؤديان دوراً مهماً في نمو الجريبات و عملية الإباضة (Charlton, 2008). في الطور الجريبي الذي يستمر من بداية الحيض إلى ما قبل الإباضة وتحت تأثير هرمون الـ FSH يتم تحفيز مجموعة من الجريبات الغارية حوالي (10-20 جريب) لتتابع النمو ولكن يصل جريب واحد فقط للنضج التام ويتابع تطوره حتى الإباضة في حين تتوقف بقية الجريبات عن النمو و تدخل في عملية الرتق الجريبي. يؤدي ارتباط هرمون الـ FSH مع مستقبلاته على الخلايا الحبيبية إلى تحفيز الإنقسام الفتيلي (Mitosis) مما يسمح بنمو الجريب وإنتاج هرمون الإستروجين بالإضافة إلى إفراز الإنهيبيين، وتجدر الإشارة إلى أن

ارتفاع مستوى الإستروجين و الإنهبين يؤدي إلى تثبيط إفراز هرمون الـ FSH من الغدة النخامية بآلية التلقيم الراجع السلبية (Negative Feedback Mechanism) ويتوقف نتيجة لذلك تحفيز المبيض ونضوج أكثر من جريب (Burger *et al.*, 1998; Macklon & Fauser, 2001).

مع اقتراب الجريب المهيم من النضج ومع تزايد إنتاج هرمون الإستروجين ووصوله إلى الذروة يُلاحظ في الـ 36 ساعة التي تسبق عملية الإباضة ارتفاع مفاجئ في تركيز هرمون الـ LH الناتج عن تحفيز الإستروجين له ويؤدي هذا الإرتفاع وبمشاركة هرمون الـ FSH إلى حث الخلايا الحبيبية الرُكمية على إفراز معقد (Hyaluronic acid rich matrix) وتدعى هذه العمليات بالتوسع الرُكمية، التي تؤدي إلى تمزق جدار جريب غراف و خروج الخلية البيضة مع الـ رُكّة البيضية المُلتصقة بها و تحركها من سطح قشرة المبيض إلى القناة الناقلة للبيوض، تحدث عملية الإباضة في منتصف الدورة الحوضية (أي بعد حوالي 14 يوماً من بداية الطور الجريبي) (Russell & Robker, 2007).

يبدأ الطور الأصفر مباشرة بعد الإباضة وينتهي عندما تبدأ الدورة الحوضية التالية (يستمر من 12-16 يوم) و يتحول ما تبقى من جريب غراف الناضج بعد طرح الخلية البيضة إلى الجسم الأصفر (Corpus luteum) الذي يصبح مسؤولاً عن إفراز الهرمونات الستيروئيدية الجنسية حيث يُلاحظ ارتفاع في مستوى هرمون البروجستيرون في الدم بشكل ملحوظ وكذلك انخفاض في مستويات هرموني الـ FSH والـ LH. في حالة عدم حدوث الإخصاب يضمحل الجسم الأصفر في الأيام (26-28) من الدورة وتنخفض مستويات هرموني الإستروجين والبروجستيرون مما يؤدي إلى تساقط بطانة الرحم وحدث الحيض (Sugino *et al.*, 2005).

2.2 - العقم و أسبابه عند النساء

يُعرّف العقم (Infertility) بالفشل في الحمل بعد مرور عام على الزواج (Gnoth *et al.*, 2005) حيث تؤثر عدم القدرة على إنجاب الأطفال على الرجال والنساء في جميع أنحاء العالم ويمكن أن تؤدي إلى القلق والاكتئاب و أحياناً العزلة عن المجتمع (Chachamovich *et al.*, 2010)، والعقم مشكلة صحية عالمية تؤثر على قرابة 8-10% من الأزواج (Couples) وهذا يعني أن 50-80 مليون شخص على الصعيد العالمي يواجهون مشكلة في تأسيس أسرة متكاملة. يوجد نوعان من العقم هما العقم الأولي (Primary infertility) ويعني عدم القدرة على إنجاب مولود حي (إما بسبب عدم الحمل أو عدم القدرة على إتمام الحمل حتى الولادة) وتبلغ نسبته في الشرق الأوسط قرابة 2,6%، والعقم الثانوي (Secondary infertility) ويعني عدم القدرة على إنجاب مولود حي لمدة خمس سنوات منذ آخر ولادة لطفل حي (بسبب الإجهاضات المتكررة أو بسبب حمل يؤدي إلى مولود ميت) و تتراوح نسبته في الشرق الأوسط بين 15 - 20% وذلك وفقاً لدراسات حديثة لمنظمة الصحة العالمية (WHO, 2012).

يوجد الكثير من الأسباب التي تؤدي إلى العقم عند المرأة ويمكن تصنيفها على النحو التالي:

1.2.2 - العوامل المكتسبة "Acquired Factors" وأهمها:

- العمر حيث تتراوح ذروة الخصوبة عند المرأة بين 18 و 24 عاماً ويبدأ احتياطي المبيض من الجريبات بالإنخفاض بعد عمر 27 عاماً و بمعدل أكبر نوعاً ما بعد عمر 35 عاماً لذلك يعتبر العمر من العوامل المهمة في العقم عند النساء (Wallace *et al.*, 2010).

- زيادة الوزن أو نقصان الوزن حيث يتم إنتاج معظم هرمون الاستروجين في المبيض و قرابة 30%

من قبل الخلايا الدهنية وبالتالي يسبب وجود الكثير من الدهون في الجسم إنتاج الكثير من هذا الهرمون و العكس صحيح وهذا يؤدي إلى الخلل في المستوى الطبيعي لهرمون الاستروجين الذي يؤثر بدوره على الخصوبة (Nelson *et al.*, 2001).

- التدخين والأمراض المنقولة جنسيا والعلاج الشعاعي والكيميائي والتي تؤدي إلى انقطاع الطمث الثانوي (ASRM, 2009; Rosendahl *et al.*, 2010)

- الإلتصاقات الثانوية بعد العمليات الجراحية في التجويف البيرتواني (Ten Broek *et al.*, 2012).

2.2.2 - العوامل المتعلقة بالإباضة "Ovulation Factors"

تعتبر اضطرابات عملية الإباضة واحدة من الأسباب الأكثر شيوعا للعقم وهي المسؤولة عن 30% من حالات عدم الخصوبة عند النساء وتعتمد عملية الإباضة على التوازن المعقد بين إفراز الهرمونات وتفاعلاتها لتكون ناجحة وأي اضطراب في هذه العملية يمكن أن يعيق الإباضة ومن هذه الإضطرابات:

- المشاكل الهرمونية الناتجة عن الخلل في منطقة تحت المهاد أو الوطاء وكذلك في الغدة النخامية حيث أن منطقة تحت المهاد مسؤولة عن إفراز الهرمون المطلق لموجهات الأفتناد (GnRH) الذي ينبه الفص الأمامي للغدة النخامية ويحثها على إفراز هرموني الـ FSH و الـ LH وبشكل هذا الخلل قرابة 20%

من حالات المشاكل الهرمونية (Prabhakar *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2007).

- المشاكل الهرمونية الناتجة عن فرط إنتاج البرولاكتين حيث يمكن أن يسبب فرط إنتاج الغدة النخامية لهرمون البرولاكتين (المسؤول عن تنمية الثدي وإنتاج الحليب أثناء فترة الرضاعة) إلى تثبيط هرمون GnRH وبالتالي يمكن أن يؤدي إلى العقم (Mancini *et al.*, 2008).

- متلازمة المبيض متعدد الكيسات " PCOS" Polycystic Ovary Syndrome

تعتبر الـ PCOS واحدة من أكثر اضطرابات الغدد الصماء انتشاراً عند النساء وهي تصيب قرابة 5-10% من الإناث في مرحلة النشاط التناسلي (12- 45 عاماً) (Azziz *et al.*, 2004)، وتحدث بسبب عدم استجابة المبيض بشكل طبيعي للهرمونات المحفزة للمبيض مما يؤدي إلى نمو عدد من الجريبات في كل شهر ولكنها تبقى صغيرة الحجم (6 - 7 ملم) و لا يصل أي منها إلى الحجم اللازم لحدوث عملية الإباضة (أكثر من 16 ملم) وهذا يؤدي إلى تكس الجريبات على سطح المبيض على شكل كيسات صغيرة و بالتالي حدوث سماكة في قشرة المبيض وزيادة في حجمه (Dewailly *et al.*, 2014).
تبدي النساء المصابات بهذه المتلازمة ندرة الحيض (Oligomenorrhea) أو انقطاع الحيض (Amenorrhea) حيث أن عدم الوصول إلى مرحلة الجريب المهيمن أو المسيطر يؤدي إلى عدم حدوث عملية الإباضة و بالتالي عدم تشكل الجسم الأصفر المسؤول عن إفراز هرمون البروجسترون (Teede *et al.*, 2010)، كما تُظهر النساء أيضاً فرط أندروجيني متمثلاً في ارتفاع مستويات هرمون التستوستيرون الذي يؤدي إلى الشعرانية وظهور حب الشباب و تعتبر الاضطرابات الإستقلابية ومن بينها مقاومة الأنسولين والسمنة من السمات المميزة لمتلازمة الـ PCOS . (Huang *et al.*, 2010; Moran *et al.*, 2010).

3.2.2 - العوامل المتعلقة بالرحم "Uterine Factors" وقناة فالوب "Fallopian Tubes"

وهي عوامل كثيرة من أهمها تشوهات الرحم (الرحم ذو القرنين ، وجود حاجز في الرحم)، الأورام الليفية الرحمية الحميدة وهي شائعة للغاية في النساء وتسبب الأورام الليفية الكبيرة العقم عن طريق إضعاف بطانة الرحم أو إغلاق قناة فالوب أو تشويه شكل تجويف الرحم ، وأيضاً يعتبر مرض بطانة الرحم المهاجرة أو ما يُعرف بالأندومتريوز (Endometriosis) من مسببات العقم الشائعة عند النساء في العقد الثالث

من العمر و ينتج عن وجود بطانة الرحم في مواقع أخرى غير جوف الرحم كالمبيضين و قنوات فالوب و أربطة الرحم وغيرها وذلك على شكل عقد أو نتوءات صغيرة قد تؤدي إلى عدم حدوث الإباضة في المبيض. وقد يمنع وجود الأندومتریوز في قناة فالوب الخلية البيضية من الوصول إلى الرحم مما قد يجعله سبباً للعقم، إضافة إلى ذلك فإن مرض التهاب الحوض الناتج عن عدوى جرثومية وخاصةً المتدثرات الحثرية (chlamydia) يمكن أن يكون سبباً في انسداد القناة الناقلة للبيوض (Bulletti *et al.*, 2010; Shuiqing *et al.*, 2002).

4.2.2 - قصور المبيض المبكر (POF)

يعتبر قصور المبيض المبكر من أهم العوامل التي تؤدي إلى العقم عند المرأة ويوجد الكثير من الأسباب التي تؤدي إلى حدوث الـ POF و يمكن تصنيفها على النحو التالي:

1 - الاضطرابات الوراثية

2 - أسباب علاجية المنشأ

3 - أسباب المناعة الذاتية

4 - أسباب خمجية

5 - السموم البيئية

6 - أسباب مجهولة

تُعتبر الاضطرابات الوراثية من أهم هذه الأسباب والتي سوف نتناولها بشيء من التفصيل .

3.2 - قصور المبيض المبكر (POF) و الاضطرابات الوراثية

أشارت الدراسات التي شملت الحالات العائلية لمريضات الـ POF إلى الدور المهم للاضطرابات الوراثية كمسبب لهذا المرض، وعلى الرغم من أن غالبية هذه الاضطرابات تشمل الصبغي الجنسي X إلا أن عدداً متزايداً من الدراسات وثقت أيضاً إشتراك بعض الصبغيات الجسمية في حدوث أو تطور الـ POF

(Persani et al., 2010). وتضم الآليات الوراثية الممكنة التي تؤدي إلى انخفاض مبكر في

إحتياطي المبيض من الجريبات والذي يسبب قصور المبيض مايلي:

• تبدل في الآلية المنظمة لهجرة وتكاثر الخلايا الجنسية المنشئة الإبتدائية (Primordial germ cells) التي تعطي بزور البيوض وكذلك في الإنقسام المنصف قبل الولادة مما يؤدي إلى انخفاض في كمية الجريبات الإبتدائية.

• زيادة رتق لجريبات المبيض (الرتق هي عملية طبيعية تحدث للجريبات مما يؤدي إلى تكييفها وارتشافها وذلك عند الإستماتة الخلوية أو قصور نضوج الجريب) و تحدث هذه الزيادة بسبب تعطيل تنظيم العوامل التي تتحكم في معدل عملية الإستماتة الخلوية ومن أهم هذه العوامل (هرمونات الـ FSH، LH، الإستروجين، الأندروجين و غيرها).

مازالت الأسباب التي قد تحفز هذه الآليات الوراثية غير محسومة بشكل كبير وبالإضافة إلى ذلك لم يتم حتى الآن تحديد الطفرات المرتبطة مع الـ POF إلا في عدد قليل جداً من المورثات، كما لم ترتبط أي طفرة منها مع أكثر من 10% من الحالات وهذا يدعم الإستنتاج أن الـ POF مرض متعدد العوامل المعقدة والذي على الأرجح يشارك فيه العديد من المواقع الوراثية المختلفة (Kokcu, 2010).

تشمل الإضطرابات الوراثية المرتبطة مع الـ POF مايلي:

1.3.2 - شذوذات الصبغي الجنسي X

قد تؤدي اضطرابات الصبغي X إلى حذف أو تعطيل مورثات تلعب دوراً أساسياً و حاسماً في وظيفة المبيض ويقدر أن نسبة 10-15% من حالات الـ POF مرتبطة مع زيوغ الصبغي X المتضمنة كلاً من زيوغ صبغية بنيوية مثل: الحذوفات (Deletions)، الصبغي متماثل الأذرع (Isochromosomes)،

الانتقالات الصبغية الجسمية - الصبغي X المتوازنة (balanced X chromosome-autosomal translocations) و زيوغ صبغية عددية مثل: أحادية الصبغي (Monosomy) و ثلاثية الصبغي (Trisomy) (Portnoi *et al.*, 2006; Toniolo, 2006; Cordts *et al.*, 2011).

1.1.3.2 - متلازمة تيرنر (Turner Syndrome)

يُعرف الغياب الكامل أو الجزئي لأحد الصبغين الجنسيين X بمتلازمة تيرنر (Turner Syndrome) أو أحادية الصبغي X (X chromosome monosomy) ويبلغ انتشارها واحد من بين 2500 ولادة لأنثى حية وهي أكثر أنماط الزيوغ الصبغية انتشاراً بين النساء العقيمات (Sybert *et al.*, 2004)، ويتميز 50% تقريباً من حملة متلازمة تيرنر بالغياب الكامل لأحد الصبغين X (45,X0) حيث تعاني النساء من خلل تكون المبيض (Ovarian dysgenesis) والعقم (انقطاع الطمث الأولي) وكذلك المبايض الشريطية الشكل بالإضافة إلى صفات ظاهرية أخرى مثل قصر القامة، زيادة الوزن والبدانة، تورم في اليدين والقدمين، بينما تتميز النسبة المتبقية من النساء حملة هذه المتلازمة بشذوذات بنوية في الصبغي X أو بنمط موزايكي (45,X0/46,XX) حيث يوجد النمطان السوي والشاذ و ينتج عنه نمط ظاهري أكثر اعتدالاً تتفاوت فيه درجات ضعف المبيض ومدى التشوهات الجسدية بين المرضى (Bharath *et al.*, 2010). إن سبب العقم عند النساء حملة متلازمة تيرنر مركب ويعود في جزء منه إلى الآثار غير المحددة الناتجة عن اختلال الصيغة الصبغية وبشكل أكبر إلى فقدان الخلية البيضية في المراحل الأولى من الطور الطليعي الإنتصافي (Prophase) قبل مرحلة التثخن الإنتصافي (Pachytene) مما يؤدي إلى خلل تكون المبيض والمبايض الشريطية، كما يمكن أن يعود سبب العقم إلى حدوث اضطراب في عملية الإزدواج الصبغي (Chromosome pairing) أثناء الإنقسام المنصف الذي ينتج عنه تسارع الرنق الجريبي وبالتالي تدهور في جريبات المبيض من الولادة فصاعداً (Ogata

(*et al.*, 1995)، و تشير البيانات الوراثية الخلوية إلى أن الحذف على الذراع الطويلة من الصبغي X (Xq) يمكن أن يكون مرتبطاً مع قصور المبيض بدون وجود التشوهات الجسدية (Lachlan *et al.*, 2006)، في حين أن انخفاض جرعات من المورثات الموجودة على الذراع القصيرة من الصبغي X (Xp) يميل ليرافق مع قصر القامة والتشوهات الجسدية مثل القصور الفرداني (haploinsufficiency) للمورثة SHOX (Clement- Jones *et al.*, 2000).

2.1.3.2 - ثلاثية الصبغي X (Trisomy)

تُعد ثلاثية الصبغي X (47,XXX) من حالات الزيوغ الصبغية المنتشرة و المرتبطة مع قصور المبيض المبكر وتشير إحدى الدراسات إلى أن نسبة هذه المتلازمة تبلغ نحو 3,8% من مريضات الـ POF (Goswami *et al.*, 2003). ويعود سبب العقم إلى حدوث اضطراب في الإزدواج الصبغي أثناء عملية الإنقسام المنصف وذلك بسبب وجود صبغي X إضافي مما يؤدي إلى اضطراب في تشكل مغزل الإنقسام أو عرقلة هجرة الصبغيات إلى قطبي الخلية، كما يمكن مشاهدة مريضات من النمط الموزاييكي (46,XX/47,XXX) حيث يتميز بوجود النمطين السوي و الشاذ في الخلايا والذي يؤدي بدوره إلى نمط ظاهري غير طبيعي (Pouresmaeill *et al.*, 2007).

3.1.3.2 - متلازمة الصبغي X الهش (Fragile X Syndrome)

تُعد هذه المتلازمة من حالات الزيوغ الصبغية المنتشرة و المرتبطة بالصبغي X وتعتبر من الأسباب الوراثية الشائعة للتخلف العقلي والتأخر في النمو عند الرجال و قصور المبيض المبكر عند النساء، تبلغ نسبة انتشارها نحو 1 من بين 6000 أنثى وتعد المورثة *FMR1* (Fragile X Mental Retardation 1) الموجودة على الذراع الطويلة من الصبغي X في المنطقة Xq27 هي المسؤولة عن هذه المتلازمة (ACOG, 2006; Sherman, 2000) و يتراوح عدد التكرارات ثلاثية النكليوتيد CGG

في المنطقة 5' غير المترجمة (5' untranslated region) من الإكسون الأول لهذه المورثة ما بين 5-54 تكرار و ذلك في الحالة الطبيعية و يسبب التوسع الكبير (Expansion) في عدد هذه التكرارات ما بين 55 - 200 تكرار إلى ظهور ما يعرف بالطفرة الأولية Pre-mutation (وهي الطفرة التي تزيد مخاطر طفرات أخرى وتوجد في المورثات التي تحتوي على تكرار ثلاثية نوكلوتيد والذي يمكن أن يتوسع إلى عدد تكرار أكبر كالمورثة *FMRI*)، وتزيد مخاطر الإصابة بقصور المبيض المبكر عند النساء اللواتي لديهن طفرة أولية (خاصةً عند النساء اللواتي لديهن تكرار ثلاثية النيكلوتيد ما بين 80 - 99 تكرار) بمعدل أعلى بعشر مرات من النساء اللواتي لديهن طفرة كاملة Full mutation (أكثر من 200 تكرار لثلاثية النيكلوتيد CGG) (Tejada *et al.*, 2008; Van Esch, 2006). تشير الدراسات أن المرضى الذين يحملون *FMRI* premutation ينتجون في الواقع مستويات أعلى من RNA المرسال (m-RNA) مقارنة بالطبيعي وكلما زاد طول التكرار زادت مستويات الـ RNA المرسال مما يؤدي إلى تراكم البروتين الذي يسبب ضمور الخلايا العصبية، ويلعب بروتين *FMRI* دوراً مهماً في نمو و تطور الدماغ في مراحل ما قبل و بعد الولادة (Jin *et al.*, 2003). ويعتقد بعض الباحثون أن الألية نفسها قد تعمل في المبيض حيث أن تراكم البروتين *FMRI* قد يكبح أو يعيق تعبير المورثات الضرورية لنمو الخلية البيضية في مبيض الجنين وبالتالي يسبب قصور المبيض المبكر، أو أن آليات محددة قد تعمل في الخلايا البيضية تؤدي إلى وقف تركيب الـ RNA المرسال بالتالي عدم اصطناع بروتينات حاسمة وضرورية لنمو الجريبات في المبيض و ربما يفسر هذا الأمر سبب العقم عند المريضات اللواتي تحملن متلازمة الصبغي X الهش، وتوجد عدة اقتراحات لآليات مختلفة تشرح المخاطر المرتبطة بتكرار ثلاثية النيكلوتيد CGG في المورثة *FMRI* لكن تبقى الآلية أو الآليات الفعلية التي يؤثر فيها هذا التكرار على الـ POF غير معروفة في الوقت الحاضر (Ennis *et al.*, 2006; Locatelli *et al.*, 2008).

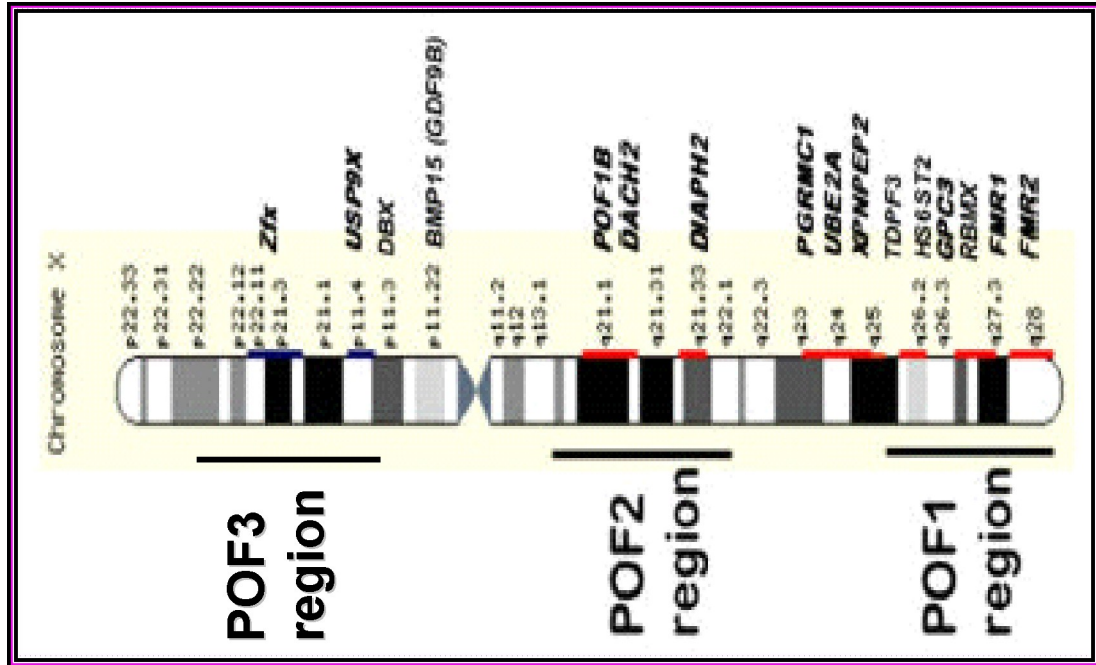
كشفت العديد من الدراسات أن قرابة 0,8 إلى 7,5% من النساء اللواتي تحملن الطفرة الأولية في متلازمة الصبغي X الهش أظهرن الـ POF، و أن قرابة 2 إلى 5% من حالات الـ POF مجهولة السبب حملت النساء فيها الـ Premutated allele، كما أشارت الدراسات العائلية أن قرابة 13% من النساء مع حالات الـ POF أظهرن الطفرة الأولية في المورثة *FMR1* (Stigliani *et al.*, 2013; Wittenberger *et al.*, 2007).

4.1.3.2 - الحذوف على الصبغي X

أشارت الكثير من الأبحاث إلى الإرتباط بين قصور المبيض المبكر والحذوف على الصبغي X والتي تعتبر من الأسباب الوراثية المؤدية إلى العقم و الأكثر شيوعاً من الإنتقالات الصبغية ويحتوي كلاً من الذراع القصيرة و الذراع الطويلة من الصبغي X على مورثات مهمة من أجل وظيفة المبيض، حيث مكنت الدراسات الجزيئية و الوراثية الخلوية على مريضات الـ POF من تقدير وجود ثلاث مناطق رئيسية حرجة (Critical regions) من أجل وظيفة المبيض الطبيعية تتوضع فيها الحذوف وهي: المنطقة (POF1) Xq26.2-q28 والمنطقة (POF2) Xq13.3-q22 التي يقدر طولها بأكثر من Mb15 وهما موجودتان على الذراع الطويلة من الصبغي X والمنطقة (POF3) Xp11.2- p21 الموجودة على الذراع القصيرة (الشكل 2) (Hernando *et al.*, 2004)، والتي يؤدي الحذف فيها إلى انقطاع الطمث الأولي في 50% من الحالات و انقطاع الطمث الثانوي في الـ 50% الأخرى بينما يسبب الحذف في الموقع X q13 عادةً انقطاع الطمث الأولي (Goswami *et al.*, 2005). تعد الحذوف الطرفية على الذراع الطويلة من الصبغي X شائعة نسبياً وذات تكرار عالي وترتبط بشكل حصري مع قصور المبيض المبكر (انقطاع الطمث الأولي أو الثانوي) وخاصة في الأعمار التي تتراوح بين 24- 39 سنة، ويوجد

العديد من الحالات التي سبق وصفها و في بعضهم تكرر نفس الحذف في اثنين أو حتى في ثلاثة أجيال من عائلة واحدة (Ferreira *et al.*, 2010). وصف Marozzi و زملاؤه إعادة ترتيب الذراع الطويلة من الصبغي X في ستة مريضات POF و أكد أن المنطقة الطرفية المميزة للحذوف تمتد من Xq26.2 إلى Xq28 (Marozzi *et al.*, 2000) أما Rossetti و زملاؤه فقد أبلغوا عن حذف بعيد في الصبغي X عند اثنتين من النساء مع ال POF (Rossetti *et al.*, 2004)، في حين ضيق Eggermann و زملاؤه المنطقة الطرفية التي تتوضع فيها الحذوف بعد تقرير لحالة امرأة مع حذف صغير يمتد من Xq27.2 / Xq27.3 إلى Xqter في قصة POF عائلية مع انقطاع طمث ثانوي (Eggermann *et al.*, 2005). بالمقابل أشارت دراسة Krauss و زملاؤه إلى وجود حذوف في منتصف الذراع الطويلة من الصبغي X في المنطقة Xq22-q26 عند عائلة تضم أربع نساء مع حالات انقطاع طمث ثانوي (Krauss *et al.*, 1987)، وبينما ترتبط الحذوف الكبيرة مع انقطاع الطمث الأولي يتفاوت الطابع الظاهري لدى النساء المصابات بال POF اللواتي تحملن الحذوف الصغيرة المتوسطة عادةً في الموضع Xq27-q28 الممتد بطول Mb 4 بين انقطاع الطمث الثانوي وهو الشائع و انقطاع الطمث الأولي في حالة واحدة. ويُفسر هذا التباين بأن الحذوف الصغيرة تؤدي إلى فقدان عدد أقل من المورثات التي قد لاتسبب طابع ظاهري حاد و(أو) وجود عوامل إضافية غير مرتبطة بالصبغي X مثل حذوف مماثلة قد تسبب الطابع الظاهري الحاد (Fimiani *et al.*, 2006). من المرجح أن يعود سبب العقم في حالة الحذف إلى خلل في البنية الهيكلية للصبغي X و الذي قد يؤدي إلى تغيير في الإزدواج الصبغي الطبيعي أثناء عملية الإنقسام المنصف، أو يمكن لهذه الحذوف أن تغير من تعبير مجموعات جديدة مُكتشفة من تسلسلات مرتبطة بالصبغي X و هي أيضاً موجودة على الصبغيات الجسمية تدعى (Copy Number Variations) CNV و تُعرف بأنها مناطق من الحمض النووي أكبر

من واحد كيلو أساس تُظهر اختلاف في عدد النسخ بين المجموعات السكانية الطبيعية و تسهم في الإختلاف الوراثي المرتبط بالأمراض ومن ضمنها الـPOF، ويبلغ العدد الكلي لـ CNV المكتشفة 31 و من بينها 3 موجودين على الصبغي X وفي الواقع يمكن لهذه التسلسلات أن تؤثر على نسخ أو مستويات نسخ المورثات المجاورة (Quilter *et al.*, 2010).



الشكل 2: رسم تخطيطي للصبغي الجنسي X يوضح المناطق الرئيسية الحرجة الثلاثة لقصور المبيض المبكر (POF).

تتضمن هذه المناطق: المنطقة (POF1) Xq26.2-q28 والمنطقة (POF2) Xq13.3-q22 والتي يقدر طولها بأكثر من 15 Mb وهما موجودتان على الذراع الطويلة من الصبغي X والمنطقة (POF3) Xp11.2-p21 الموجودة على الذراع القصيرة من الصبغي وتضم هذه المناطق مورثات مهمة من أجل وظيفة المبيض (Fasnacht *et al.*, 2006).

5.1.3.2 - الإنتقالات الصبغية الجسمية - و الصبغي X المتوازنة

تؤدي الإنتقالات بين أحد الصبغيات الجسمية و الصبغي الجنسي X إلى العقم وقد سجل هذا عند أكثر من 100 حالة تم الإبلاغ عنها من مريضات الـ POF، و ينتج التأثير الضار على وظيفة المبيض من نقاط الكسر (Breakpoints) التي تتوزع على كامل الصبغي X ولكن في كثير من الحالات تتجمع في منطقة حرجة تقع بين Xq13 و Xq27 على الذراع الطويلة من الصبغي X مع الإشارة إلى أن 80% من نقاط الكسر تكون قاطعة للمنطقة Xq21 (Beke *et al.*, 2013). تعتبر الحذوف في مريضات الـ POF شائعة نسبياً في المنطقة (POF1) في حين تتوضع نقاط الكسر في الإنتقالات الجسمية والصبغي X المتوازنة بشكل تفضيلي في المنطقة (POF2) و ترتبط مع قصور المبيض المبكر في أعمار مبكرة تتراوح بين 16 – 21 سنة (Shelling, 2010)، ولا يوجد حتى الآن مورثة واحدة في هذه المناطق تكون المسؤولة دائماً عن الـ POF بل على العكس من ذلك قد توجد عدة مورثات على طول المنطقة الحرجة ربما تكون قد تعطلت بسبب الإنتقالات المتوازنة وبالتالي يبدو أن أي عيب هيكلي في الصبغي X قد يغير من ديناميكية الصبغي والذي يؤثر على عملية الإزدواج الصبغي خلال الانقسام المنصف مما يؤدي إلى تسارع الرق الجريبي (Stigliani *et al.*, 2013; Simpson, 2008). من المرجح أن يعود سبب العقم في حالات الإنتقالات إما إلى إعادة الترتيب الصبغي الذي قد يسبب تغيرات في الكروماتين الذي يمكن أن يتحكم في دخول البروتين وتنظيم عمليات النسخ وبالتالي فإن تعطيل هذه الآليات الدقيقة يمكن أن يسبب قصور المبيض المبكر، أو يعود إلى وجود مواضع على الذراع الطويلة من الصبغي X يمكن أن تكون قد تعطلت بسبب إعادة الترتيب الصبغي أو بسبب مايسمى بأثر موضعي (Position effect) والذي يُعرف بالإختلاف في التعبير المورثي الناتج عن التغيير في موقع المورثة على طول الصبغي، حيث يسبب الانتقال إلى موقع مختلف على الجينوم تغيرات في تنظيم المورثات

النوعية المرتبطة بالصبغي X و الضرورية لصيانة وظيفة المبيض الطبيعية والذي أثبتت من خلال دراسة الكسور الصبغية المرتبطة بمرض قصور المبيض المبكر (Schlessinger *et al.*, 2002).

4.2 - المورثات المرشحة لقصور المبيض المبكر و الصبغي الجنسي X

أدت الدراسات الجزيئية على مريضات الـ POF إلى تحديد الحذوف و الإنتقالات في مناطق الـ POF1 والـ POF2 وكذلك الدراسات على النماذج الحيوانية المعدلة وراثياً إلى اقتراح عدد من المورثات المرشحة كسبب للمرض، وقد تم تحديد بعض الطفرات الموجودة في مجموعة من هذه المورثات في أقل من 10% من حالات الـ POF (Harris *et al.*, 2002) هذا وماتزال العوامل المحددة الوراثية الفعلية مجهولة حيث تحتاج المورثات المرشحة إلى تأكيد بواسطة إجراء المزيد من التحقيقات وبالتالي ارتباط هذه الطفرات مع العقم غير مؤكد حتى الآن (Baronchelli *et al.*, 2012).

1.4.2 - المورثات المرشحة المتوضعة على الذراع القصيرة من الصبغي الجنسي X

يبلغ عددها أربع مورثات وتعتبر محورية من أجل وظيفة الخلايا الجنسية المنشئة وهي :

1.1.4.2 - المورثة *USP9X* (Ubiquitin-Specific Protease 9)

تقع هذه المورثة على الذراع القصيرة من الصبغي X في الموقع Xp11.4 وهي تُرمز الأنزيم ubiquitin-specific protease وهو من أنزيمات Deubiquitinating التي تشارك في تنظيم العمليات الحيوية البيولوجية في الخلية مثل: الإستماتة الخلوية و تنظيم الدورة الخلوية و إشارة مسارات النقل (Kim *et al.*, 2003)، تعتبر المورثة البشرية *USP9X* مماثلة للمورثة *faf* (faf facets) الموجودة في ذبابة الخل والتي تعتبر ضرورية من أجل تطور العيون و الخلايا البيضاء (Cadavid *et al.*, 2000)، مايزال الدور الذي تلعبه المورثة *USP9X* في تطور الغدد التناسلية في الإنسان غامض

حتى الآن و بالرغم من أن وجودها في المنطقة التي تهرب فيها المورثات من تعطيل الصبغي X يقترح دوراً حاسماً لها في التسبب بمتلازمة تيرنر .

2.1.4.2 - المورثة *DBX* (DEAD-BOX 3, X-LINKED)

تتوضع في المنطقة p11.3 - Xp11.23 الموجودة على الذراع القصيرة من الصبغي X تتألف من 17 إكزون وهي تنتمي إلى عائلة بروتينات DEAD-box الذين يشاركون في جميع عمليات الإستقلاب الخلوي (Rocak et al., 2004). تعتبر المورثة *belle* الموجودة في ذبابة الخل والمماثلة للمورثة *DBX* عند الإنسان ضرورية من أجل خصوبة الإناث، بينما يوجد في الفأر تعبير للمورثة *Dbx* في الخلايا البيضية الناضجة هذا ويقترح وجود تعبير للمورثة المماثلة لـ *DBX* في الخلايا الجنسية المنشئة عند إناث ذبابة الخل و الضفدع و الفأر. إن وظيفة هذه المورثة محفوظة عبر الأنواع (Johnstone et al., 2005) وأيضاً من المرجح أن تلعب المورثة *DBX* دوراً وظيفياً في تكون الجريبات عند الإنسان وبالتالي يمكن افتراض أن الـ POF قد ينتج عن حذف للمورثة أو بسبب طفرة في المورثة تؤدي إلى تعطيل أو عرقلة وظيفة الخلايا الجنسية المنشئة.

3.1.4.2 - المورثة *ZFX* (Zinc Finger X)

تتوضع هذه المورثة في المنطقة Xp22.1-21.3 الموجودة على الذراع القصيرة من الصبغي X وتُرمز البروتين zinc finger الذي يُعتقد أن له دور في التمايز الجنسي وتشكل النطاف و متلازمة تيرنر، وقد أشارت الدراسة على الفئران المعدلة وراثياً إلى كون الفئران الطافرة (ذكور وإناث) أصغر من الحجم الطبيعي وأقل قابلة للحياة وتحوي عدد أقل من الخلايا الجنسية المنشئة في المبايض و الخصى مقارنة بالحالة الطبيعية. وقد أظهرت الإناث الطافرة نقص في الخلايا البيضية مما أدى إلى تناقص في الخصوبة وتقصير عمر الإنجاب وهذه الصفات موجودة في النساء مع قصور المبيض المبكر وهو يعد

أول دليل مباشر لدور *ZFX* في النمو والتطوير التناسلي (Luoh *et al.*, 1997).

4.1.4.2 - المورثة *BMP15* (Bone Morphogenetic Protein)

تعتبر من أقوى المورثات المرشحة لقصور المبيض المبكر و المتوضعة على الذراع القصيرة من الصبغي X و سوف نتناولها بشكل مُفصل في الفقرات اللاحقة.

2.4.2 - المورثات المرشحة المتوضعة على الذراع الطويلة من الصبغي X

ومن أهم هذه المورثات :

1.2.4.2 - المورثة *DIAPH2* (Diaphanous Homolog 2)

تمتد على حوالي Mb1 وتتوضع على الذراع الطويلة من الصبغي X في المنطقة Xq21-24، تلعب المورثة المماثلة لـ *DIAPH2* والموجودة في ذبابة الفاكهة دوراً في الخصوبة عند الإناث عن طريق التدخل في الإنقسام الخلوي للخلايا الجريبية المبيضية والخلايا الجنسية المنشئة، ويؤثر الحذف فيها على تشكل الحيوانات المنوية في الذكور و تشكل الخلايا البيضية في الإناث مؤدياً إلى العقم في ذبابة الفاكهة، ويرجح هذا التشابه الوظيفي مع المورثة البشرية *DIAPH2* كون قصور المبيض المبكر قد نتج عن تعطيل المورثة (لوحظ في حالة الإنتقال Xq21/autosome تعطيل الإنترون الأخير في المورثة *DIAPH2* والذي ارتبط مع الـ POF) (Bione *et al.*, 1998).

2.2.4.2 - المورثة *DACH2* (Dachshund Homolog 2)

تتوضع في منطقة الـ POF2 على الذراع الطويلة من الصبغي X تحديداً في الموقع Xq21.3 و تتألف من 11 اكزون ممتدة على طول حوالي kb 700، تم تحديد هذه المورثة من خلال دراسة الإنتقال الجسيمي والصبغي X في مريضات الـ POF (Prueitt *et al.*, 2002) و يُعتقد أن لها وظيفة خلال

عمليات التمايز الخلوي الجريبي وأشارت دراسة الطفرات الوراثية إلى أن المورثة *DACH2* ربما تتدخل في النمط الظاهري لقصور المبيض المبكر (Bione et al., 2004).

3.2.4.2 - المورثة *POF1B* (Premature Ovarian Failure, 1B)

تتألف من 17 اكزون وتمتد على حوالي 100 kb على الذراع الطويلة من الصبغي X في الموقع Xq21.2 الموجود في منطقة الـ POF2 حيث أدت دراسة الانتقال الجسيمي والصبغي X في النساء مع الـ POF إلى اعتبار *POF1B* مورثة مرشحة لقصور المبيض المبكر، ويُعتقد أن لها وظيفة خلال المراحل المبكرة من تطور المبيض، و أشار Lacombe وزملاؤه إلى وجود طفرة نقطية في الإكزون العاشر من هذه المورثة مقترحاً وجود وظيفة لها في انقسام الخلايا الجنسية المنشئة وذلك من خلال دراسة لعائلة تضم خمس إخوات متأثرات بهذا المرض (Lacombe et al., 2006).

4.2.4.2 - المورثة *XPNPEP2* (X-Propyl aminopeptidase 2)

تتوضع في الموقع Xq25 على الذراع الطويلة من الصبغي X و تحديداً في منطقة الـ POF1، و قد أشار Prueitt و زملاؤه إلى تعطيل المورثة *XPNPEP2* في الإنتقالات المتوازنة بين الذراع الطويلة من الصبغي X والصبغيات الجسمية والتي ارتبطت مع انقطاع الطمث الأولي، وبالتالي تم اعتبار هذه المورثة من المورثات المرشحة كسبب لقصور المبيض المبكر (Prueitt et al., 2000).

5.2.4.2 - المورثة *PGRMC1* (Progesterone Receptor Membrane Component-1)

تتوضع في منطقة الـ POF1 على الذراع الطويلة من الصبغي X وقد أشارت دراسة على مريضات الـ POF الذين ترافقت حالتهم مع الانتقال بين الصبغي X وأحد الصبغيات الجسمية [(t(X;11)(q24;q13)] إلى انخفاض في مستويات تعبير المورثة *PGRMC1* المجاورة لنقاط كسر

الصبغي X ، بالإضافة أن الكشف عن الطفرة H165R في هذه المورثة دعا إلى اقتراح أن المستويات

المنخفضة أو الطافرة من PGRMC1 قد تسبب قصور المبيض المبكر من خلال إضعاف تفعيل cytochrome P450 وزيادة معدل الإستماتة الخلوية لخلايا المبيض (Mansouri et al., 2008).

6.2.4.2 - المورثة *FMRI* (Fragile X Mental Retardation 1)

تُعد المورثة *FMRI* المتوضعة على الذراع الطويلة من الصبغي X في الموقع Xq27 مسؤولة عن متلازمة الصبغي X الهش والتي تسبب التخلف العقلي عند الذكور مع الإشارة إلى أن بعض هؤلاء الذكور لديهم أقارب إناث مصابات بقصور المبيض المبكر. تحدث هذه المتلازمة عندما يكون هناك أكثر من 200 تكرار لثلاثية النيكليوتيد CGG في المنطقة 5' غير المترجمة (5'UTR) من هذه المورثة (طفرة كاملة) (Nolin et al., 2003)، وتشير الأبحاث أن نحو 15-20% من النساء اللواتي تحملن طفرة أولية تطور لديهن قصور المبيض المبكر، في حين لم تُظهر النساء اللواتي تحملن طفرة كاملة ال-POF، وحتى الوقت الحاضر يعتبر وجود الطفرة الأولية في المورثة *FMRI* من العوامل الخطرة التي تسبب ال-POF (Sullivan et al., 2005).

5.2 - المورثات الجسمية المرشحة لقصور المبيض المبكر

نظراً لعدم القدرة على تحديد المورثات المسببة لـ POF اعتمد الباحثون خلال العقود الأخيرة على نهج المورثات المتهمة أو المرشحة وتم تحديدها بسبب دورها في وظيفة المبيض و / أو دورها في تطور الجريبات ويمكن تصنيف أهم هذه المورثات على النحو التالي:

1.5.2 - المورثة *FSH* (Follicle-Stimulating Hormone)

المورثة *LH* (Luteinizing Hormone)

المورثة *FSHR* (Follicle-Stimulating Hormone Receptor)

المورثة *LHR* (Luteinizing Hormone Receptor)

يؤدي هرمونا الـ FSH و الـ LH و مستقبلاتهما دوراً مهماً في تطور و نضج جريبات المبيض، تتوضع مورثات مستقبلات هذين الهرمونين FSHR و LHR على الذراع القصيرة من الصبغي الثاني في الموقع 2p21، وقد أفادت بعض الدراسات عن وجود طفرات في هذه المورثات ارتبطت مع انقطاع الطمث الأولي أو الثانوي أو قصور المبيض مع فرط موجهات الأفتناد (hypergonadotropic ovarian failure)، كما أظهرت الدراسات النسيجية على مبايض المريضات الحاملات لطفرات في المورثة FSHR وجود أثلام ونقص تتسج في المبيض مع ضعف في تطور الجريبات الإبتدائية و الأولية (Meduri et al., 2003)، وبشكل مماثل ارتبط وجود التعدد الشكلي (polymorphisms) في مورثة مستقبل الإستروجين ER مع قصور المبيض المبكر مجهول السبب، ولكن يجب إجراء المزيد من الدراسات لتأكيد هذا الإرتباط في مجموعات أكبر من المريضات وبالتالي ربما هناك دوراً محتملاً لطفرات المورثات السابقة في تطور الـ POF (Bretherick et al., 2008).

2.5.2 - المورثة INHA (Inhibin A)

تتوضع هذه المورثة على الذراع الطويلة من الصبغي الثاني في الموقع 2q33-qter وهي تتألف من إكزونين يرمزان بروتين الإنهيبين Inhibin A الذي يعتبر واحد من أهم المنظمين للدورة التناسلية الأنثوية، ويتم إنتاجه في الخلايا الحبيبية الموجودة في جريبات المبيض و يقوم بتخفيض إفراز هرمون الـ FSH في آلية التلقيح الراجع السلبية تحت المهاد والفص الأمامي للغدة النخامية، حيث يوجد ارتباط بين الإنخفاض في مستويات هرمون الإنهيبين وبين الإنخفاض في احتياطي المبيض من الجريبات وذلك بسبب زيادة تركيز هرمون الـ FSH الذي يؤدي إلى زيادة عدد الجريبات الناضجة و بالتالي زيادة معدل نفاذ الجريبات (Chand_ et al., 2010). يُلاحظ الإنخفاض في مستويات هرمون الإنهيبين في الدم عند

النساء قبل مرحلة انقطاع الطمث الطبيعية (Pre-menopausal) وقبل أن تصبح الأعراض السريرية ظاهرة وذلك بسبب التناقص التدريجي في جزيئات المبيض، و يُعتبر مستوى هذا الهرمون في الدم مؤشر على كفاءة المبيض. تم الإبلاغ عن وجود طفرات في المورثة *INHA* عند مريضات الـ POF وقد تم الافتراض أن الطفرات في هذه المورثة من شأنها أن تؤدي إلى تسارع في نفاذ الجزيئات مما يؤدي إلى قصور المبيض المبكر (Dixit *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2008; Woad *et al.*, 2009).

3.5.2 - المورثة *FOXL2* (FORKHEAD-TRANSCRIPTION-FACTOR-LIKE-2)

تتوضع المورثة *FOXL2* على الذراع الطويلة من الصبغي الثالث في الموقع 3q23 ويظهر بروتين *FOXL2* حصراً في الأجنان النامية وفي المبيض، وتكمن أهميته في الانتقال من مرحلة الجزيئات الابتدائية إلى مرحلة الجزيئات الأولية (Crisponi *et al.*, 2001). يسبب وجود عدد كبير من الطفرات في هذه المورثة نمط ظاهري معقد يُعرف بمتلازمة BPES (-Blepharophimosis) و Ptois-Epicanthus inversus Syndrome) ويوجد لها نمطان (BPES type I و BPES type II)، يبدي المرضى المتأثرون بالنمط الأول تشوه وجهي مميز مترافق مع قصور المبيض المبكر في حين يبدي المرضى المتأثرون بالنمط الثاني تشوهاً وجهياً فقط، وتؤدي الطفرات عديدة المعنى (nonsense) و الحذوف في المورثة *FOXL2* إلى تركيب بروتين مبتور (truncated protein)، كما يسبب وجود الطفرات المغلطة أو طفرات الإزاحة (missense, frame shift) إنتاج كمية أكبر من البروتين، هذا ويجب أن يكون التشخيص السريري دقيق عند المرضى المصابين بمتلازمة BPES حيث من المتوقع أن الطفرة في المورثة *FOXL2* هي الأكثر احتمالاً أن تكون المسبب للـ POF (Corrêa *et al.*, 2010).

4.5.2 - المورثة *GALT* (Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase)

تتألف المورثة *GALT* من 11 إكزون ممتدة على طول حوالي 4 kb وهي تتوضع على الذراع القصيرة من الصبغي التاسع في الموقع 9p13، يسبب وجود الطفرات في هذه المورثة الـ Galactosemia (وجود الجالاكتوز في الدم) وهي حالة تتميز بالنمو والتخلف العقلي. تم الإبلاغ عن وجود أكثر من 150 طفرة ارتبط بعضها بحدوث قصور المبيض المبكر، وقد أشارت العديد من التقارير بأن النساء مع الـ Galactosemia لديهن خطر عالي لتطور الـ POF بنسبة تقدر بين 60 - 70 % (Kaufman *et al.*, 2002; Laml *et al.*, 1994; *al.*،) و مازالت الآلية الدقيقة لقصور المبيض عند مريضات الـ Galactosemia غير واضحة لكن من المرجح أن يتم التعبير عن هذه الآلية خلال تشكل الجريبات في المرحلة الجنينية حيث يؤدي وجود مستوى عالي من الغالاكتوز إلى إضعاف هجرة الخلايا الجنسية المنشئة وانخفاض في العدد الأصلي من بزور البيوض وبالتالي افتراض وجود تأثير سام للغالاكتوز في هذه المرحلة من التطور (Bandyopadhyay *et al.*, 2003).

5.5.2 - المورثة *GDF9* (Growth Differentiation Factor 9)

تعتبر من المورثات المرشحة الهامة لقصور المبيض المبكر تتوضع على الذراع الطويلة من الصبغي الخامس وستكون موضوع حديثنا في الفقرات اللاحقة.

6.2 - المورثة *BMP15* (Bone morphogenetic protein 15) وبنيتها الجزيئية

تقع المورثة *BMP15* والتي تُدعى أيضاً (Growth differentiation factor- 9 B) GDF-9B على الذراع القصيرة من الصبغي X في الموقع Xp11.2 و تمتد تقريباً بطول 5,82 kb على الـ DNA الجينومي، تتألف من إكزونين يُقدر طولهما بـ 1179 زوجاً من الأسس (bp) مفصولين عن بعضهما بإنترون طوله تقريباً 4,6 kb و هي تُرمز البروتين *BMP15* الذي ينتمي إلى TGF-beta superfamily. يبلغ طول الإكزون الأول 328 زوجاً من الأسس (bp) وطول الإكزون الثاني 851 زوجاً من الأسس (bp) وهما يُرمزان 392 حمض أميني في البروتين المكون من ثلاث مناطق وظيفية هامة كمايلي:

- الببتيد الإشعاعي (Signal peptide) مؤلف من 18 حمضاً أمينياً (amino acids).
 - طليعة الببتيد (Propeptide) أو (pro-region) مؤلف من 249 حمضاً أمينياً.
 - البروتين الناضج (Mature protein) أو (Mature region) مؤلف من 125 حمضاً أمينياً.
- (Dube *et al.*, 1998; Laitinen *et al.*, 1998; Aaltonen *et al.*, 1999).

1.6.2 - الطفرات في المورثة *BMP15*

تُعتبر المورثة *BMP15* من أكثر المورثات المرشحة عالمياً لقصور المبيض المبكر عند النساء (Laissue *et al.*, 2006)، تضم قاعدة بيانات طفرات هذه المورثة ([http:// www. biobase-international.com/ hgmd /BMP15](http://www.biobase-international.com/hgmd/BMP15)) 17 طفرة وليس من المؤكد أنها كلها المسؤولة عن تغيير النشاط الوظيفي للبروتين *BMP15* وبالتالي ارتباطها بشكل كامل مع العقم

حيث أن آلية التأثير الحيوي لبعض هذه الطفرات ما زالت غير معروفة في الوقت الحاضر وتتدرج هذه الطفرات تحت نمطين :

1 - الطفرات النقطية Point mutation التي تؤدي إلى تغيير حمض أميني بحمض أميني آخر

مثل الطفرة 704A>G التي تؤدي إلى استبدال الأدينين بالغوانين (TAT-TGT) في الموقع 704

وبالتالي تغيير الحمض الأميني ثيروسين إلى سيستيئين في الكودون 235.

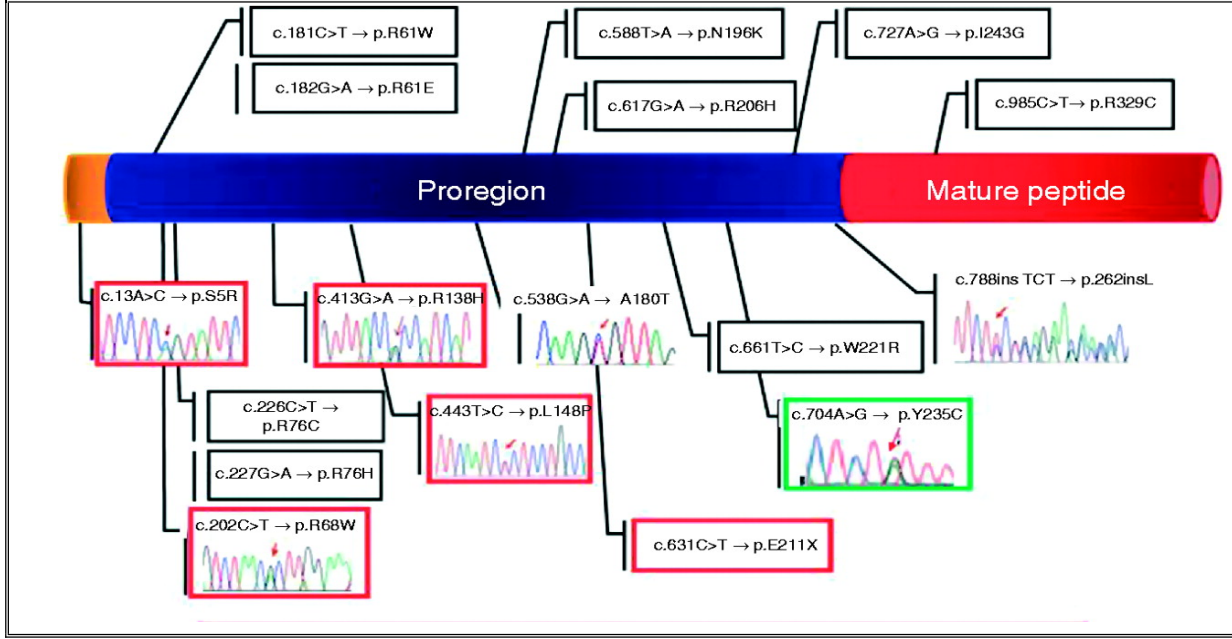
2 - طفرات الحذف والإدخال الصغيرة Small indels يتم فيها حذف نيكليوتيدات و إدخال نيكليوتيدات

في شريط الـ DNA مما يؤدي إلى تغيير في العدد الكلي للنيكليوتيدات وكذلك التغيير في تسلسلها.

يوضح (الشكل 3) بعض الطفرات و التغييرات في المورثة *BMP15* مع الإشارة إلى مكان تواضع كل

منها على البروتين و تُظهر المربعات الملونة الآليات البيولوجية المحتملة لهذه الطفرات وهي كالتالي :

- تسبب الطفرات الموجودة في المربعات الحمراء منتجات حيوية فيها عيوب.
- تسبب الطفرة الموجودة في المربع الأخضر إنتاج منتجات شاذة تؤدي إلى تأثير سلبي مهيم.
- لم تُدرس الطفرات الموجودة في المربعات السوداء و بالتالي آلية تأثيرها غير معروفة حتى أن التأثير البيولوجي لأول طفرة ظهرت في منطقة البروتين الناضج غير معروف حالياً.



الشكل 3: شكل تخطيطي لبعض الطفرات و التغيرات في المورثة *BMP15* وأماكن توضعها على

البروتين

يشير توضع الطفرات ضمن مربعات ملونة إلى التأثير البيولوجي المحتمل حيث تسبب الطفرات في المربعات الحمراء و المتوضعة في منطقتي (Proregion و Signal peptide) من البروتين منتجات حيوية فيها عيوب أما الطفرات في المربعات السوداء و الموجودة في منطقتي (Proregion و Mature peptide) فتأثيرها غير معروف كما تسبب الطفرة في المربع الأخضر و المتوضعة في منطقة (Proregion) من البروتين منتجات شاذة تؤدي إلى تأثير سلبي مهيمن (Persani *et al.*, 2010).

1.1.6.2- الطفرات النقطية في المورثة *BMP15*

اهتم الباحثون بدراسة المورثة *BMP15* نظراً لأهمية الدور الذي يقوم به البروتين *BMP15* خلال مراحل تشكل الجريبات في المبيض، وقد قامت الكثير من الدراسات بإجراء مسح شامل للمناطق المرمزة في هذه المورثة بهدف الكشف عن وجود طفرات قد تكون مرتبطة بقصور المبيض المبكر عند النساء، و أظهرت هذه الدراسات وجود 16 طفرة نقطية ممتدة على طول الإكزونين الأول والثاني من المورثة قد تكون مسببة للعقم وكلها طفرات استبدال (Substitution) تؤدي إلى تغيير حمض أميني بآخر. اكتشفت أول طفرة مُغلّطة (missense mutation) في المورثة *BMP15* عام 2004 في دراسة Di Pasquale وزملائه (Di Pasquale *et al.*, 2004) فقد وصف الطفرة (Tyr235Cys) التي تقع على الإكزون الثاني من المورثة و قد غيرت الحمض الأميني التيروسين (Tyrosine) إلى السيستئين (Cysteine) في الكودون 235 من منطقة طليعة الببتيد في البروتين. تتميز هذه المنطقة بكون الحموض الأمينية مصانة في أنواع الثدييات المختلفة (الشكل 4) بالإضافة إلى الدور الحيوي الهام الذي تقوم به هذه المنطقة حيث تؤثر على إفراز ونشاط أعضاء *TGF-beta superfamily* (Knight & Glistner, 2006). وقد أشارت دراسة Di Pasquale وزملائه أن لهذه الطفرة تأثيراً سلبياً مهماً على النشاط الحيوي للبروتين حيث تؤدي إلى تشكيل بروتين طافر (Mutant protein) يرتبط وجوده مع انخفاض في معدل نمو الخلايا الحبيبية في الجريبات بالإضافة إلى انخفاض النشاط التحفيزي لتكاثر هذه الخلايا. سُجّلت هذه الطفرة عند أختين لديهما قصور مبيض مُفرط موجهات الأفتاد (Hypergonadotropic ovarian failure) بسبب خلل تشكل المبيض، تميز النمط الظاهري للأخت الكبرى بالعقم (انقطاع طمث أولي) مع وجود مبايض شريطية أما الصغرى فقد امتلكت دورة حيضية لمرة

واحدة و كان الطابع النووي في كلا الأختين طبيعياً (46,XX)، وقد تم التوريث من الأب السوي الحامل للطفرة إلى الإبتتين. لقد قدمت هذه الدراسة مثلاً استثنائياً عن مرض قصور المبيض المبكر المرتبط بالصبغي الجنسي X والذي يؤثر حصراً على الإناث متغايرة اللواقح (Heterozygous) التي ورثت هذا التبدل الوراثي من الأب السوي.

	221	235	240
BMP15 human	W H G T S S L D I A F L L L Y F N D T H		
sheep	W H G T S S L D T V F L L L Y F N D T Q		
mouse	W H G M T S L D V A F L L L Y F N D T D		
rat	W H G M T S L D V A F L L L Y F D D T D		
pig	G R G I S S L D T A F L L L Y F N D T --		

الشكل 4: تسلسل الحموض الأمينية في جزء من منطقة طليعة الببتيد (Propeptide) في البروتين BMP15 عند الإنسان و عند بعض الثدييات.

يوضح الشكل أن الحمض الأميني التيروسين Y (Tyrosine) الموجود في الكودون 235 من منطقة طليعة الببتيد في البروتين BMP15 مصان بشدة في الأنواع المختلفة من الثدييات مثل (الماعز، الفأر، الجرذ، الخنزير) مقارنةً بالإنسان مما يشير إلى أهمية هذا الحمض .

تتالت الدراسات الوراثية لكشف الطفرات والتغيرات الموجودة في المورثة *BMP15* عند البشر مثل الدراسة التي أجراها Dixit وزملائه (Dixit *et al.*, 2006) على مجموعة من النساء الهنديات (202 امرأة) تضمنت 60 امرأة مع انقطاع طمث أولي (primary amenorrhea) و9 مع انقطاع طمث ثانوي (secondary amenorrhea) و33 امرأة مع قصور مبيض مبكر (POF) ترافق مع مستويات مرتفعة من هرمون الـ FSH، وقد كشف المسح الشامل للمناطق المرمزة في المورثة *BMP15* عن وجود 11 طفرة مُغلّطة متوضعة في الإكزونين الأول و الثاني و ذلك في حالات قصور المبيض المبكر أو انقطاع الطمث الأولي كما هو موضح في الجدول 1.

شوهدت الطفرة (Glu211X) الواقعة في الإكزون الثاني عند مريضة بحالة تماثل اللواقح (Homozygous) وقد أدت إلى توقف مبكر للترجمة في منطقة طليعة الببتيد في الكودون 211 مكان توضع الحمض الأميني الغلوتاميك أسيد (Glutamic Acid) الذي نتج عنه عدم ترجمة منطقة البروتين الناضج ، أظهرت هذه المريضة نقص تنسج في المبيض مع عقم كامل ترافق مع مستويات مرتفعة من الـ FSH و الـ LH بالإضافة إلى شلل في الوجه وقد اعتبرت هذه الطفرة مؤشر على الدور الهام للمورثة *BMP15* في مبيض الإنسان، أما الطفرة (Arg76Cys) الموجودة في الإكزون الأول بحالة تغاير اللواقح والتي غيرت الحمض الأميني الأرجينين (Arginine) إلى السيستيئين (Cysteine) في الكودون 76 فهي تشبه أول طفرة بشرية (Tyr235Cys) تم اكتشافها في دراسة Di Pasquale و زملائه (Di Pasquale *et al.*, 2004)، ويعتبر السيستيئين هو الحمض الأميني الناتج عن الإستبدال في كلتا الطفرتين، كما أن الطفرة (Arg76Cys) هي الأكثر تواتراً حيث ظهرت عند خمس نساء (3 نساء مع قصور مبيض مبكر و 2 مع انقطاع طمث أولي)، وأشارت هذه الدراسة إلى ظهور كل الطفرات بحالة تغاير اللواقح باستثناء الطفرة (Glu211X). و أوضحت الدراسة أيضاً أن وجود هذه الطفرات في منطقة طليعة الببتيد في البروتين قد تؤدي إلى خطأ في عملية طي البروتين على نفسه أو ضياع النشاط الحيوي للبروتين أو انخفاض في استقراره (Stability) مما يسبب فقدان كامل أو جزئي في وظيفة البروتين الطافر.

الجدول 1: بعض الطفرات الموجودة في المورثة *BMP15*

يستعرض الجدول بعض الطفرات الموجودة في المورثة *BMP15* و أماكن توضعها بالإضافة إلى التغيير في السلسلة و التغيير في الحمض الأميني وذلك وفق دراسة (Dixit *et al.*, 2006).

الموضع	النكليوتيد المتغير	الحمض الأميني المتغير
Exon 1	c.181C>T	p.Arg61Trp
Exon 1	c.182G>A	p.Arg61Glu
Exon 1	c.226C>T	p.Arg76Cys
Exon 1	c.227G>A	p.Arg76His
Exon 2	c.538G>A	p.Ala180Thr
Exon 2	c.588T>A	p.Asn196Lys
Exon 2	c.617G>A	p.Arg206His
Exon 2	c.631C>T	p.Glu211X
Exon 2	c.661T>C	p.Trp221Arg
Exon 2	c.727A>G	p.Iso243Gly

وصف Laissue و زملاؤه (Laissue *et al.*, 2006) الطفرة (Leu148Pro) عند مريضة واحدة (مع انقطاع طمث ثانوي) من أصل 203 مريضة مع قصور المبيض المبكر شملتهم الدراسة، و تقع هذه الطفرة في الإكزون الثاني من المورثة *BMP15* حيث غيرت الحمض الأميني اللوسين (Leucine) إلى البرولين (Proline) في الكودون 148. وقد أظهرت عمليات السلسلة المتعددة أن اللوسين مصان بشدة في الفقاريات كما بينت الأبحاث المخبرية أن هذا الإستبدال أدى إلى تغيّر مهم في الخصائص الهيكلية للحمض الأميني ، وبالتالي قد يغير وجود الحمض الأميني البرولين من صلابة السلسلة الببتيدية في منطقة طليعة الببتيد في البروتين مما قد يؤثر على عملية طي البروتين على نفسه، و هذا قد يؤدي إلى إنتاج معقد ثنائي الجزيء (dimers) غير طبيعي أو حتى يمكن أن يمنع عملية الإزدواج لتشكيل ثنائي الجزيء ما قد يسبب تغير في مستويات البروتين، هذا وقد أشارت دراسة Hashimoto و زملاؤه (Hashimoto *et al.*, 2005) إلى أهمية التركيب الطبيعي لمنطقة طليعة الببتيد في البروتين *BMP15* عند الإنسان. تكرر ظهور الطفرة السابقة في دراسة Rossetti وزملائه (Rossetti *et al.*, 2009) عند مريضتين مع انقطاع طمث ثانوي مع التأكيد على نفس نتائج Laissue و فريقه المتعلقة بأهمية البنية الهيكلية للحمض الأميني المُستبدَل (اللوسين)، بالإضافة إلى اكتشاف طفرة جديدة (Arg138His) غيرت الحمض الأميني الأرجنين (Arginine) إلى الهيستيدين (Histidine) في الكودون 138 حيث ظهرت عند مريضة مع انقطاع طمث أولي من أصل 300 مريضة مدروسة (255 مريضة مع انقطاع طمث ثانوي و 45 مريضة مع انقطاع طمث أولي)، وأدت هذه الطفرة إلى انخفاض في إنتاج البروتين الناضج و قد دعمت نتائج هذه الدراسة الإستنتاج بأن إفراز كمية كافية من البروتين *BMP15* ضرورية من أجل الخصوبة عند النساء.

وبالمقابل أظهرت دراسة Lakhal و زملاؤه (Lakhal *et al.*, 2009) ولأول مرة وجود طفرة في منطقة الببتيد الإشعاعي في البروتين وهي الطفرة (Ser5Arg) و قد غيرت الحمض الأميني السيرين (Serine) إلى الأرجينين (Arginine) في الكودون 5، وقد سُجلت عند مريضة من أصل تونسي مع انقطاع طمث ثانوي بالإضافة إلى وجودها عند الأخت التي كانت ذات طابع نووي غير طبيعي (46,XY) و أظهرت الأم أيضاً انقطاع طمث ثانوي في عمر 36 سنة، وفتت هذه الدراسة إلى أن السيرين من الحموض الأمينية المصانة في الثدييات و أن هذا الإستبدال قد يُعدل من خصائص منطقة الببتيد الإشعاعي مما قد يؤثر على وظيفتها وبالتالي ينعكس على إفراز البروتين الطبيعي. تكرر أيضاً وصف الطفرة السابقة (Ser5Arg) في دراسة (Rossetti *et al.*, 2009) وقد اقترحت الدراسات الوظيفية عدم وجود أو وجود تأثير بسيط لهذه الطفرة على البروتين، وهذا يوضح صعوبة تأكيد الارتباط بين طفرات المورثة *BMP15* كعامل مسبب لمرض قصور المبيض المبكر وبين ظهور المرض بالإضافة إلى إمكانية مشاركة تغيرات في مواقع أخرى يجب البحث عنها.

أما الطفرة التي ارتبط وجودها مع قصور المبيض المبكر و كانت أكثر تواتراً في الظهور عند مريضات مع انقطاع الطمث الأولي أو الثانوي فهي (Ala180Thr) وقد غيرت الحمض الأميني الألانين (Alanine) إلى الثريونين (Threonine) في الكودون 180 وقد أظهرت الدراسات المخبرية عدم وجود تأثير طفيف لهذه الطفرة على البروتين الناتج وقد أُبلغ عنها في الكثير من الدراسات مثل:

Di Pasquale *et al.*, 2006; Dixit *et al.*, 2006; Ledig *et al.*, 2008; Rossetti *et al.*

(., 2009; Tiotiu *et al.*, 2010).

2.1.6.2- طفرات الحذف والإدخال الصغيرة Small indels

هي نوع خاص من الطفرات التي يتم فيها حذف نيكليوتيدات و إدخال نيكليوتيدات في شريط الـ DNA مما يؤدي إلى تغير في العدد الكلي للنيكليوتيدات بالإضافة إلى التغير في تسلسلها وتتميز هذه الطفرات بكونها قريبة من بعضها وتكون عادةً من مضاعفات العدد 3 خاصةً في المناطق المرمزة للبروتينات (Mills *et al.*, 2006; weber *et al.*, 2002). يتراوح مجال التغير فيها ما بين واحد إلى عشرة آلاف زوج أساس (bp) على طول الجينوم وهي تنتشر بكثرة في البشر حيث يمكن أن تُستخدم كعلامات وراثية تميز الشعوب المختلفة (Mills *et al.*, 2011; Väli *et al.*, 2008). ويُلاحظ أن البعض من هذه الطفرات التي تتوضع في المناطق المرمزة من المورثة يُحتمل أن تؤثر على الصفات البشرية و ظهور بعض الأمراض (Mullaney *et al.*, 2010)، و قد يؤدي وجودها إلى ظهور طفرات الإزاحة التي قد تُحدث تغير في وظيفة البروتين الناتج وذلك بسبب التغير في إطار القراءة (Reading frame) عند ترجمة الـ RNA المرسال (mRNA) أو بسبب قراءة مبكرة لكودون التوقف مما يؤدي إلى توقف الترجمة. كشفت دراسة (Dixit *et al.*, 2006) التي استخدمت المسح الشامل للمناطق المرمزة من المورثة *BMP15* وجود الطفرة (Ala180Phe/Ser+Val) في الإكزون الثاني حيث تم فيها حذف الأساسيين الغوانين و السيتوزين على التوالي في الموقعين 538 و 539 وإضافة الأساسيين التيمين و التيمين في منطقة الحذف مباشرةً، وقد غيرت هذه الطفرة الحمض الأميني الألانين (Alanine) إلى الفينيل ألانين (Phenylalanine) أو السيرين (Serine) وذلك في الكودون 180 ولم يُبلغ عن ظهور هذه الطفرة في دراسات أخرى (الشكل 5).

(A) Reference	TCTAAC <u>G</u> CTTGGAA
(B) 2-base deletion	TCTAAC <u>--</u> TTTGGAA
(C) 2-base insertion	TCTAAC <u>TTT</u> TTGGAA

الشكل 5: طفرات الحذف والإدخال الصغيرة (Small indels) في المورثة *BMP15*

يمثل (A) التسلسل الطبيعي في جزء من الإكزون الثاني في المورثة *BMP15* أما (B) فيوضح حذف الأساسين الغوانين والسيتوزين في حين يوضح (C) يوضح إضافة الأساسين التيمين و التيمين في موقعي الحذف 538 و 539.

7.2- آلية عمل أعضاء *TGF-β* superfamily

ينتمي إلى *TGF-β* superfamily (the Transforming Growth Factor-beta) أكثر من 35

بروتين (Knight *et al.*, 2006) تم تصنيفهم إلى عدة عائلات (families) وهم:

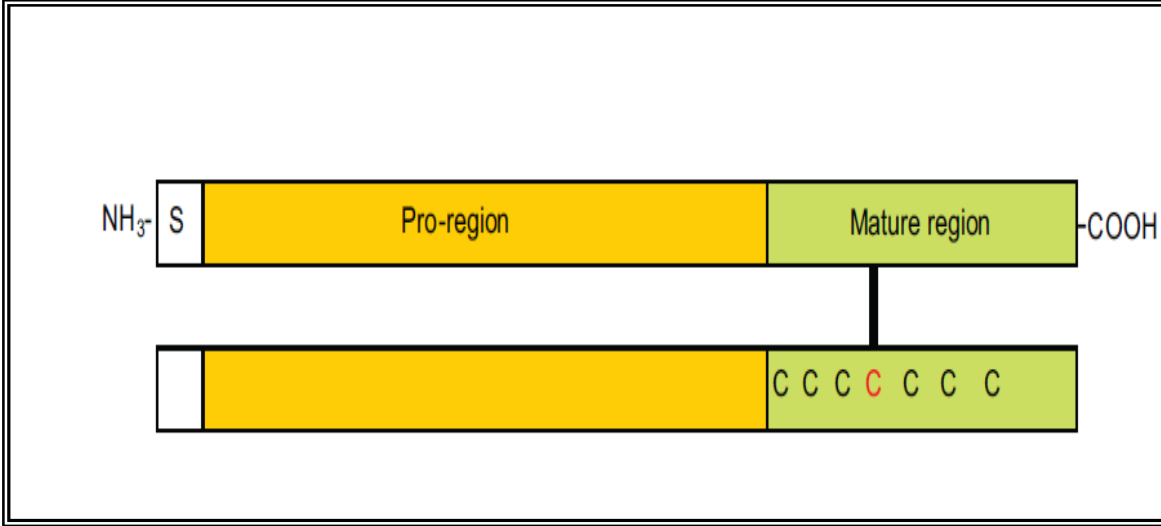
- *TGF-beta* family و تتضمن (TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3).
- *BMPs* family (the bone morphogenetic proteins) وتضم أكثر من 20 بروتين.
- *GDFs* family (the growth differentiation factors) وتضم 9 بروتينات على الأقل.
- *activin/inhibin* family و تتضمن (activins A, AB, B, inhibins A, B).
- *GDNF* family (the glial cell-derived neurotrophic factor).
- يُضاف إلى ذلك بروتينات أخرى مثل *AMH* (anti-Mullerian hormone).

تُعرف هذه البروتينات كعوامل نمو (Growth factors) متعددة الوظائف ولها أهمية كبيرة فهي تنظم

العديد من العمليات الحيوية البيولوجية في الخلية مثل: النمو، التمايز الخلوي (Differentiation)،

الإستماتة الخلوية (Apoptosis)، التنامي الجنيني و التطور الجنسي (Chang *et al.*, 2002)، يشترك أعضاء TGF- β superfamily بالعديد من الخصائص الهيكلية المميزة ومن أهمها وجود الحمض الأميني السيستئين C (cysteine) بشكل مكرر من 6 إلى 9 مرات في منطقة البروتين الناضج حيث يشارك السيستئين في طي الجزيء والحصول على البنية الفراغية ثلاثية الأبعاد شكلاً ما يُعرف بعقدة السيستئين (cysteine knot) بالإضافة إلى كونه محفوظ خلال تطور الفقاريات، ومن الخصائص الأخرى التشابه الكبير في سلسلة الحموض الأمينية المكونة لها (Kaivo-Oja, 2007). يتم تخليق أعضاء TGF- β superfamily كجزيئات طليعية كبيرة غير نشطة حيويًا (pre-pro-proteins) تتكون من الببتيد الإشعاعي (Signal peptide) له نهاية أمينية (amino (N-) terminal) يليه طليعة الببتيد (Propeptide أو Pro-region) ثم البروتين الناضج (Mature protein أو Mature region) وله نهاية كربوكسيلية (carboxy (C-) terminal) (الشكل 6)، ويتم إطلاق الجزيئات النشطة حيويًا بعد مجموعة من العمليات تتضمن أولاً إزالة الببتيد الإشعاعي المسؤول عن توجيه البروتين نحو المسلك الإفرازي ، تليها تشكيل جُزَيء مُعَقَد يُعَرَفُ بثنائي الجزيء المتماثل (Homodimer) أو المتغاير (Heterodimer) حيث يتم الإرتباط بين ثنائي الجزيء (Dimer) عن طريق رابط ثنائي السُلْفيد (Disulfide bond) يتشكل بين الحمضين الأمينين السيستئين، وأخيراً انشطار (Cleavage) البروتين الناضج (النشط حيويًا) عن طليعة الببتيد بواسطة مجموعة من الأنزيمات مثل (Furin-like endoproteases) وتحريره خارج الخلية على شكل رابط (Ligand) يشارك في الكثير من العمليات الحيوية الهامة، إن أهمية منطقة طليعة الببتيد ليست معروفة جيداً ولكن يُقْتَرَحُ أن لها دوراً في الطي السليم للبروتين الناضج.

(Shimasaki *et al.*,2004; Knight & Glister, 2003; Juengel & McNatty, 2005).



الشكل 6: شكل تخطيطي يوضح بنية أعضاء TGF- β superfamily

يتكون أعضاء TGF- β superfamily من الببتيد الإشعاعي S (Signal peptide) له نهاية أمينية (NH₃) يليه طليعة الببتيد (Propeptide أو pro-region) ثم البروتين الناضج (Mature protein أو mature region) وله نهاية كربوكسيلية (COOH) وهو النشط حيويًا، و نلاحظ وجود الحمض الأميني السيستئين C بشكل مكرر (من 6 إلى 9 مرات) في البروتين الناضج بالإضافة إلى أنه مصان بشدة في الفقاريات، يشكل أعضاء TGF- β superfamily مُعقد يُعرف بثنائي الجزيء (dimer) عن طريق رابط ثنائي السلفيد (disulphide bond) يتشكل بين الحمضين الأمينيين السيستئين والمشار إليه بخط أسود ويعتبر تشكيل المعقد (dimer) ضروري جداً من أجل النشاط الحيوي لعوامل النمو (Kaivo-Oja, 2007).

درس الكثير من الباحثين مسار إشارات التنبيغ (signal transduction) للعديد من أعضاء TGF β superfamily مثل (TGF β , activins, BMP2, BMP7) حيث تبدأ هذه الإشارات عن طريق اتحاد الرابط مع مستقبلاته النوعية التي تُدعى (serine/threonine kinase receptor) تتألف عائلة هذه المستقبلات عند الإنسان من 12 مستقبل تضم 7 مستقبلات من النمط type I تدعى (ALK 1-7)

(activin receptor-like kinase) و 5 مستقبلات من النمط II type وهم (BMPRII, TBRII)
(ActRIIB, ActRIIA, AMHRII,
(ten Dijke *et al.*, 1993; Kawabata *et al.*, 1998; Manning *et al.*, 2002).

بعد أن يتشكل مُعقد يُدعى رباعي الفُسَيْمات المتغاير (Heterotetrameric) الناتج عن الإرتباط بين
مستقبلين من النمط II type و مستقبلين من النمط I type يتحد الرابط مع هذا المُعقد وبالتالي يقوم
المستقبل من النمط II type بفسفرة المستقبل من النمط I type و تفعيله. يؤدي هذا بدوره إلى فسفرة

مجموعة من بروتينات التأشير داخل خلوية تُدعى Smads وتحديداً البروتينات R-Smads
(Receptor regulated Smads) التي ترتبط مع البروتين Co-Smad4 (Common Smad)
مشكلين مُعقد فعال يُدعى (Smad complexes) يعبر إلى داخل النواة، ويقوم بالتفاعل مع عوامل نسخ
مختلفة ومع عدد من البروتينات المنظمة المساعدة (Co-activators) لتحريض انتساخ المورثة الهدف
(Wieser *et al.*, 1995; Souchelnytskyi *et al.*, 1996) (الشكل 7)، وقد أشارت الدراسات

الوظيفية إلى تصنيف البروتينات Smads إلى ثلاث فصائل (Subfamilies) هم:

- the receptor-regulated Smads (R-Smads) وتضم (R-Smad1, 2, 3, 5, 8).
- the common Smad (Co-Smad) و تضم (Smad4).
- the inhibitory Smads (I-Smads) و تضم (Smad6 and -7).

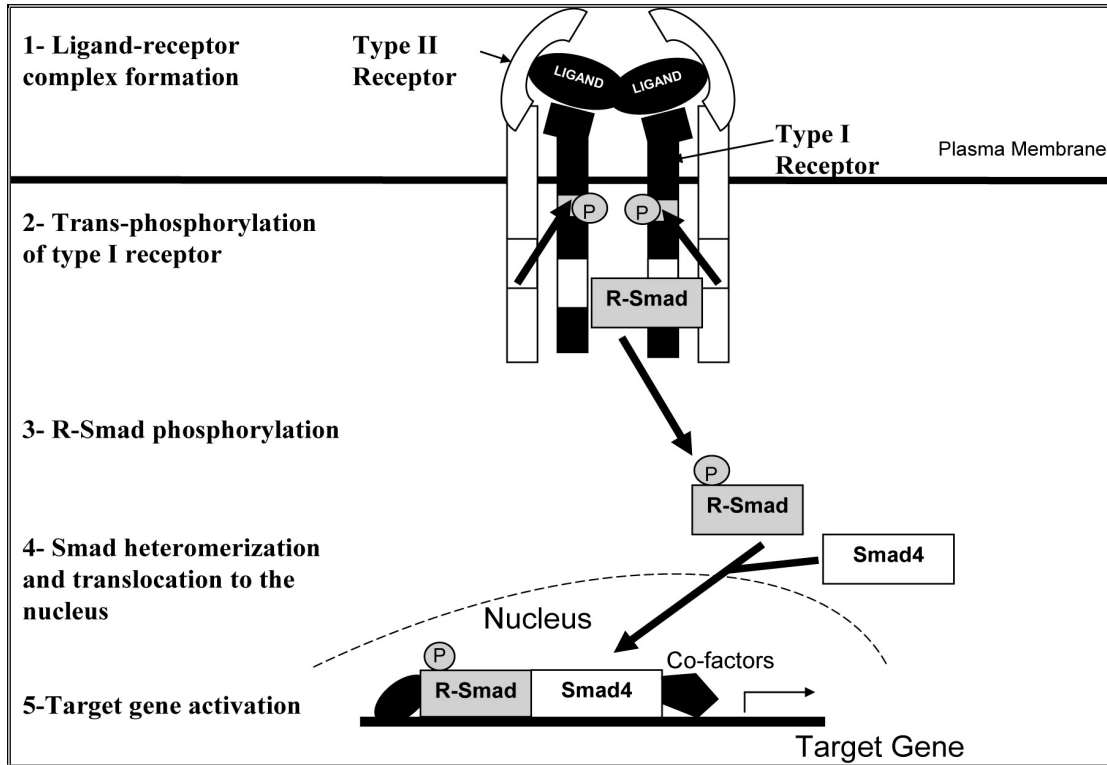
(Watanabe *et al.*, 1999; Jornvall *et al.*, 2001). تشير الدراسات الوراثية على البروتين

GDF9 إلى أن مستقبله من النمط II type هو (BMPRII) ومستقبله من النمط I type هو

(ALK5) وهما موجودان على سطح الخلايا الحُبيبية أما بروتينات R-Smads التي تم تفعيلها ضمن

هذه الخلايا نتيجة ارتباط GDF9 مع مستقبلاته فهي (R-Smad2/3). أما البروتين BMP15 فمستقبله

من النمط II هو (ActRIIA) ومستقبله من النمط I هو (ALK6) وهما أيضاً موجودان على سطح الخلايا الحبيبية أما بروتينات R-Smads التي تم تفعيلها ضمن هذه الخلايا هي (R-Smad1/5/8) (Vitt *et al.*, 2002; Roh *et al.*, 2003; Mazerbourg *et al.*, 2004).



الشكل 7: آلية عمل أعضاء TGFβ superfamily

يتحد الرابط (ligand) مع نمطين من مستقبلات serine/threonine receptors هما type I و type II حيث يتشكل معقد مكون من (ligand واثنين من مستقبلات type II و واثنين من مستقبلات type I)، و يسمح هذا الارتباط بفسفرة المستقبل type I من قبل المستقبل type II في المجال glycine- serine (GS) مما يؤدي إلى تفعيل المستقبل type I ، وبالتالي يتعرف على البروتينات R-Smad (Receptor--regulated Smads) و يسفرها ضمن الخلية الحبيبية مما يؤدي إلى تشكيل معقد مكون من البروتينين R-Smad و Co-Smad (Smad4)، ينتقل هذا المعقد إلى النواة ويرتبط إلى تسلسلات نوعية على شريط الـ DNA حيث يبدأ انتساخ المورثة الهدف وذلك تحت تأثير عوامل مشاركة نووية (nuclear co-factors) (Mazerbourg&Hsueh, 2006).

8.2- دور البروتين BMP15 في مراحل تشكل الجريبات في المبيض

ينتمي البروتين BMP15 (OMIM:300247) إلى عائلة BMPs التي تضم أكثر من عشرين بروتين والتي تنتمي بدورها إلى TGF- β superfamily تم اكتشافه لأول مرة عام 1998 وهو من البروتينات الخارج خلوية (Extracellular) يتألف من 392 حمضاً أمينياً (Dube *et al.*, 1998) وتقدر الكتلة الجزيئية للبروتين بقرابة 50 kD، يُعتبر BMP15 عامل نمو مُشتق من الخلية البيضية ويقوم بدور حاسم في تنظيم تكاثر الخلايا الحبيبية وتمايزها الخلوي من أجل تطور الجريبات وبالتالي الخصوبة (Saito *et al.*, 2008). كما يتميز بسمة بنيوية مثيرة للاهتمام وهي غياب السيستئين الرابع من أصل سبعة حموض أمينية سيستئين مصانة في معظم أعضاء TGF- β superfamily، وبما أن السيستئين الرابع هو المسؤول عن الرابط ثنائي السلفيد لتشكيل معقد ثنائي الجزيء لذلك يُفترَح أن البروتين BMP15 يمكن أن يشارك في نضج الخلية البيضية ونمو الجريبات إما كمعقد ثنائي الجزيء المتماثل و/أو من خلال تشكيل معقد ثنائي الجزيء المتغاير مع البروتين GDF9 بواسطة رابط غير تساهمي والأقل احتمالاً كجزيء أحادي (monomers) (McMahon *et al.*, 2008).

أشارت دراسة Aaltonen وزملاؤه (Aaltonen *et al.*, 1999) التي استخدمت تقانة التهجين المتألق في الموضوع إلى وجود البروتين BMP15 حصرياً في الخلايا البيضية الموجودة في المراحل المتأخرة من الجريبات الأولية بالإضافة إلى زيادة تعبيره خلال مراحل تطور الجريبات حتى مابعد الإباضة، كما أظهرت دراسات (Otsuka *et al.*, 2000; Otsuka *et al.*, 2001c) أن BMP15 يُحفز تكاثر الخلايا الحبيبية في المراحل الأولى من تطور الجريبات وبشكل مستقل عن الهرمونات النخامية.

كشفت دراسة (Galloway *et al.*, 2000) أن بعض إناث الخراف في سلالات (Inverdale وHanna) التي تميزت بوجود طفرة نقطية في المورثة *BMP15* بحالة تماثل اللواقح كانت ذات نمط ظاهري عقيم وذلك بسبب توقف نمو جريبات المبيض في المراحل الأولى وبالتالي عدم حدوث عملية الإباضة، وعلى العكس من ذلك يؤدي وجود هذه الطفرة النقطية في المورثة *BMP15* بحالة تغاير اللواقح إلى زيادة الخصوبة في إناث الخراف، ويُعتقد أن المستويات المنخفضة من البروتين *BMP15* تؤدي إلى مستويات عالية من مستقبل هرمون الـ FSH الموجود على الخلايا الحبيبية الذي يؤدي تباطؤ إلى زيادة في عدد الجريبات الناضجة وبالتالي زيادة نسبة عملية الإباضة في هذه الإناث وهذا ما أكدته دراسات لاحقة (Hanrahan *et al.*, 2004; Juengel *et al.*, 2002, 2004).

أما لدى الفئران فإنه يبدو أن عملية تشكل الجريبات لا تتأثر كثيراً بالمستويات المنخفضة من البروتين *BMP15* وربما تنحصر العيوب في عمليتي الإباضة و الإخصاب اللاحقة، و أظهرت دراسات (Gueripel *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2001; Yoshino., 2006) على إناث الفئران التي تعاني من مستويات منخفضة من البروتين *BMP15* وجود عيوب في عملية الإباضة و قدرة الخلايا البيضية على التطور إلى جنين طبيعي بالإضافة إلى ضعف في الخصوبة. و كشفت الدراسات أن بعض الخلايا البيضية كانت أكبر من الحجم الطبيعي وبقيت موجودة ضمن الجريبات ومُحاطة فقط بعدد قليل من الخلايا الزُكمية بالإضافة إلى عدم حدوث عملية الإباضة، بينما كانت ذكور الفئران التي تعاني من هذا الإنخفاض طبيعية و خصبة. أشارت الدراسات على الفئران المعدلة وراثياً (Knockout mouse) أن وجود تغيرات في المورثة *BMP15* في حالة تماثل اللواقح تؤدي إلى ضعف في الخصوبة وانخفاض في عدد الجريبات الموجودة في المبيض عند إناث الفئران فقط بينما كانت الإناث و الذكور التي تعاني من هذه التغيرات في حالة تغاير اللواقح خصبة وذات نمط ظاهري طبيعي.

أشارت دراسات (Moore *et al.*, 2005; Otsuka *et al.*, 2001) أن البروتين BMP15 يمكن أن يمنع التمايز الخلوي للخلايا الحبيبية تحت تأثير هرمون الـ FSH وذلك عن طريق تثبيط تعبير مستقبله FSH-R وهذا يؤدي بدوره إلى منع تعبير مورثات معينة في هذه الخلايا وتتضمن:

• P450 aromatase (P450arom)

• P450 side chain cleavage enzyme (P450scc)

• 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD)

• luteinizing hormone receptor (LH-R)

• inhibin, and activin

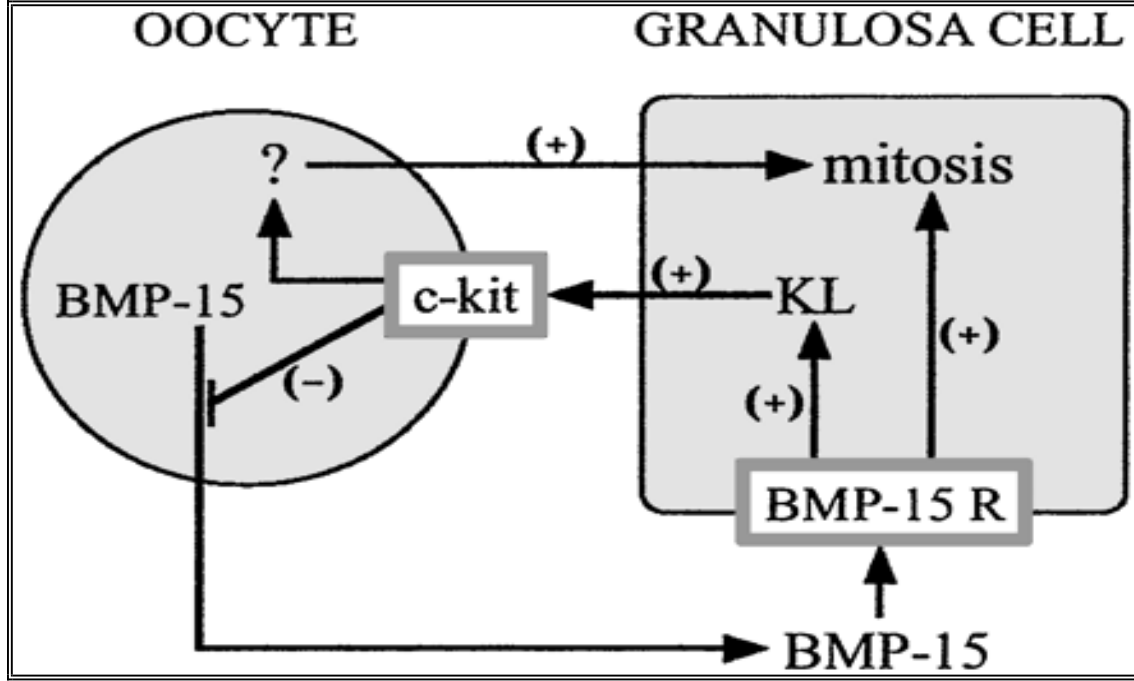
يُعد هرمون الـ FSH ضرورياً من أجل التشكل الطبيعي للجريبات في المبيض و الخصوبة عند الإناث، حيث يؤدي ارتباط هذا الهرمون مع مستقبله FSH-R الموجود على الخلايا الحبيبية إلى تفعيل المورثات السابقة الذكر من أجل البدء بعمليات التمايز الخلوي و التكاثف لهذه الخلايا و إنتاج الهرمونات الستيرويدية وبالتالي الوصول إلى مرحلة الجريبات الناضجة، مما يؤكد أهمية دور البروتين BMP15 كمنظم لحساسية الخلايا الحبيبية تجاه تأثير هرمون الـ FSH بالإضافة إلى تحديد نسبة الجريبات التي ستصل إلى مرحلة الإباضة (Persani *et al.*, 2014).

أوضحت دراسة (Otsuka & Shimasaki, 2002a) أن البروتين BMP15 يؤدي دوراً مهماً في تعزيز تعبير البروتين KL (Kit ligand) في الخلايا الحبيبية (يُحفز البروتين KL الخلية البيضية على إفراز عوامل مُحدثة للانقسام المتساوي في الخلايا الحبيبية و بالتالي له دور مهم في نمو الجريبات بالإضافة إلى دوره في نمو الخلية البيضية و المحافظة عليها) و ذلك عن طريق ارتباط البروتين BMP15 مع مستقبلاته الموجودة على الغشاء السيتوبلازمي للخلية الحبيبية و بالمقابل يرتبط البروتين

KL مع مستقبله c-kit (KL receptor) الموجود على سطح الخلية البيضية وهذا يؤدي إلى تثبيط تركيب البروتين BMP15 في الخلية البيضية وتشكيل حلقة تلقيح راجع سلبية بين عامل النمو BMP15 والبروتين KL (الشكل 8).

أوضحت دراسات (Hussein *et al.*, 2005; Yoshino_ *et al.*, 2006) أن البروتين BMP15 يساهم في خفض معدلات الإستماتة الخلوية للخلايا الزكومية، كما يؤدي دوراً حاسماً في عملية توسع هذه الخلايا وذلك عن طريق زيادة تعبير البروتين EGF (Epidermal growth factor) من خلال تحفيز مستقبله EGF receptors في الخلايا الزكومية مما يجعلها قادرة على الإستجابة لتأثير هرمون الـ LH وذلك قبل الإرتفاع الكبير في مستوى هذا الهرمون السابق لعملية الإباضة (Su *et al.*, 2010).

يمكن أيضاً للبروتين BMP15 أن يُحفز نسخ العديد من المورثات التي تشارك في عملية توسع الخلايا الزكومية وهذه المورثات هي (Ptx3, Has2, Tnfaip6, Ptgs2) (Li *et al.*, 2009) وهذا ما أكدته العديد من الدراسات التي استخدمت البروتين BMP15 المأشوب بهدف توضيح النشاط الحيوي لهذا البروتين وقدمت الكثير من البيانات المهمة في هذا المجال (Moore *et al.*, 2003; Otsuka & Shimasaki., 2002b; Otsuka *et al.*, 2000).



الشكل 8: التفاعل المقترح لعامل النمو BMP15 و البروتين KL في تنظيم الانقسام المتساوي في الخلايا الحبيبية.

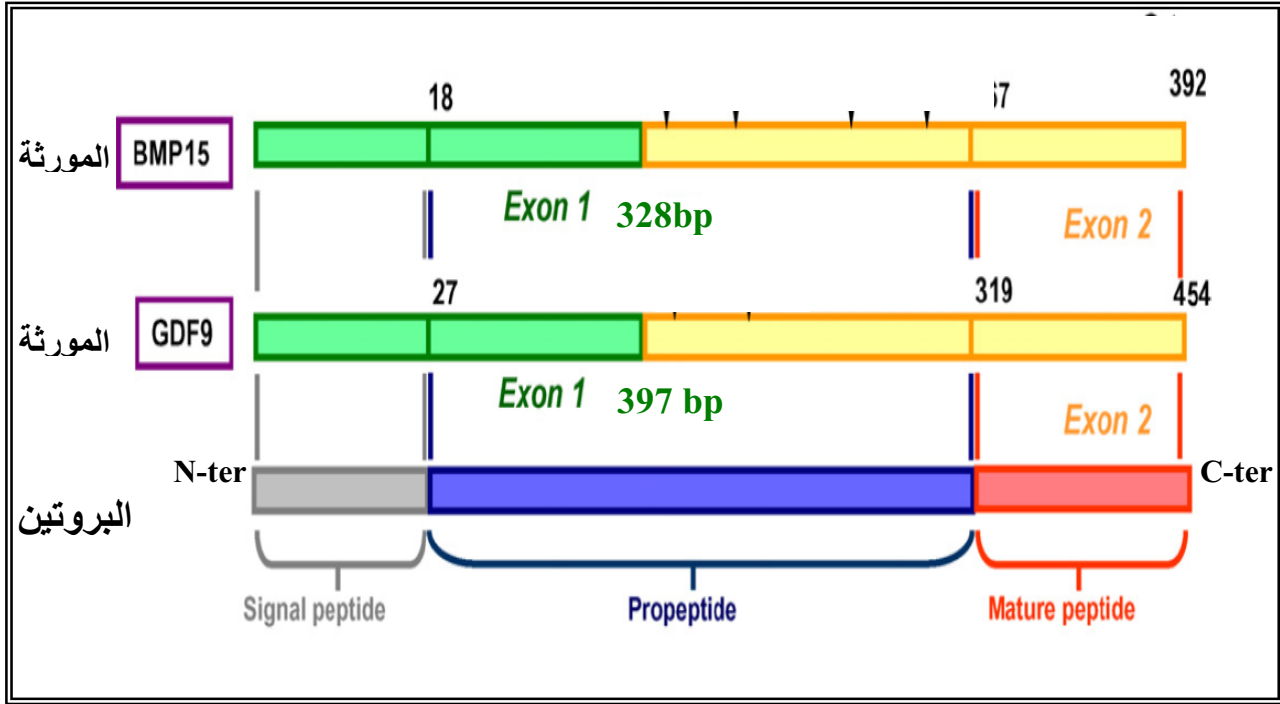
يؤثر عامل النمو المشتق من الخلية البيضية BMP15 على الخلايا الحبيبية (Granulosa cells) من خلال ارتباطه مع مستقبلاته (BMP-15 R) حيث يُحفز الانقسام المتساوي (mitosis) كما يُحفز تعبير البروتين KL وهو عامل مشتق من الخلايا الحبيبية يقوم بدور هام في نمو الجريبات ، بينما يؤدي ارتباط KL مع مستقبله c-kit الموجود على الخلية البيضية إلى منع تعبير BMP15 وتشكيل حلقة تقيم راجع سلبية، ومن جهة أخرى يسبب KL زيادة الانقسام المتساوي في الخلايا الحبيبية وذلك عن طريق تحفيز الخلية البيضية كي تُفرز عوامل (غير معروفة) مُحَدِّثة للانقسام المتساوي (Otsuka & Shimasaki, 2002a).

9.2 - المورثة *GDF9* (Growth differentiation factor 9) و بنيتها الجزيئية

تقع المورثة *GDF9* على الذراع الطويلة من الصبغي الخامس (5q31.1) الذي يمتد تقريباً بطول 181 Mbp (مليون زوج أساس) و يضم هذا الصبغي من 900 - 1300 مورثة، تعد المورثة *GDF9* مماثلة (Homologous) للمورثة *BMP15* في الإنسان وفي العديد من أنواع الثدييات بسبب التشابه الكبير بينهما في البنية الأولية و السلسلة وكذلك التشابه في الوظيفة (McPherron *et al.*, 1993; McGrath *et al.*, 1995; Jaatinen *et al.*, 1999). يبلغ طول المورثة *GDF9* تقريباً 5,46 kb وتتألف من إكزونين مفصولين عن بعضهما بإنترون يُقدر طول الإكزون الأول بقرابة 397 زوجاً من الأسس (bp) أما الإكزون الثاني فيبلغ 968 زوجاً من الأسس (bp) وهما يرمزان 454 حمضاً أمينياً في البروتين المكون من ثلاث مناطق وظيفية هامة هي (الشكل 9):

- الببتيد الإشعاعي (Signal peptide) مؤلف من 27 حمضاً أمينياً (amino acids).
 - طليعة الببتيد (Propeptide) مؤلف من 292 حمضاً أمينياً .
 - البروتين الناضج (Mature protein) مؤلف من 135 حمضاً أمينياً .
- (Aaltonen *et al.*, 1999; Dixit *et al.*, 2005).

تتميز منطقة المحضض (promoter) في المورثة *GDF9* بوجود 400 زوج أساس (bp) مصانة بشكل كبير في العديد من أنواع الثدييات وتحوي تسلسل رئيسي مصان بشكل كامل (CAGCTG) يُسمى E-box وهو يرتبط مع عامل الانتساخ bHLH (basic helix-loop-helix) مما يؤدي إلى نسخ المورثة وبالتالي يُمكن الخلية البيضية من التعبير عن البروتين *GDF9* في المبيض، وبالإضافة إلى E-box تم تحديد العديد من المواقع الرابطة لعوامل الإنتساخ في منطقة المحضض والمصانة في كل من الإنسان و الفأر (Yan *et al.*, 2006).



الشكل 9: شكل تخطيطي للمورثتين *BMP15* و *GDF9* و البروتين الذي ترمزه.

تقع المورثة *BMP15* على الذراع القصيرة من الصبغي X في الموقع Xp11.2 و يبلغ طولها تقريباً 5,82 kb ، تتألف من إكزونين يبلغ طول الإكزون الأول 328 bp وطول الإكزون الثاني 851 bp وهما يُرمزان 392 حمضاً أمينياً في البروتين المكون من ثلاث مناطق وظيفية هامة هي: الببتيد الإشعاعي (Signal peptide) مؤلف من 18 حمضاً أمينياً، طليعة الببتيد (Propeptide) مؤلف من 249 حمضاً أمينياً، البروتين الناضج (Mature protein) مؤلف من 125 حمضاً أمينياً ، كما تقع المورثة *GDF9* على الذراع الطويلة من الصبغي الخامس في الموقع 5q31.1 يبلغ طولها تقريباً 5,46 kb وتتألف من إكزونين يُقدر طول الإكزون الأول بقرابة 397 bp أما الإكزون الثاني فيبلغ طوله 968 bp وهما يرمزان 454 حمضاً أمينياً في البروتين المكون من ثلاث مناطق وظيفية هامة هي: الببتيد الإشعاعي مؤلف من 27 حمضاً أمينياً، طليعة الببتيد مؤلف من 292 حمضاً أمينياً، البروتين الناضج مؤلف من 135 حمضاً أمينياً، يشير اللون الأخضر إلى الإكزون الأول ويشير اللون الأصفر إلى الإكزون الثاني في المورثتين بينما تشير الألوان الرمادي و الأزرق و الأحمر إلى الأقسام الوظيفية الثلاثة التي يتألف منها البروتينين (Laisue et al., 2008) .

1.9.2- الطفرات في المورثة *GDF9*

تعد المورثة *GDF9* من المورثات الجسمية المرشحة لقصور المبيض المبكر وقد اهتم الباحثون كثيراً بدراسة الطفرات الموجودة فيها على اعتبار أنها مورثة حاسمة في الجريبات في المبيض كما إنه يتم ترجمتها إلى بروتين في الخلايا البيضية الموجودة في الجريبات البدئية و ذلك قبل ترجمة المورثة المماثلة لها (*BMP15*) في الخلايا البيضية الموجودة في الجريبات الأولية الكبيرة. تضم قاعدة بيانات طفرات

المورثة *GDF9* (<http://www.biobase-international.com/hgmd/GDF9>)

6 طفرات مازال ارتباطها بشكل كامل مع قصور المبيض المبكر أمر مشكوك فيه حتى الآن ويمكن إجمال هذه الطفرات في نمط الطفرات النقطية Point mutation التي تؤدي إلى تغيير حمض أميني بحمض أميني آخر.

تقترح العديد من الأبحاث إلى أن التبدلات في سلسلة المورثة *GDF9* قد تسبب تغير في وظيفة البروتين وبالتالي يمكن أن تشارك في اختلال وظيفة المبيض، أُجريت أول دراسة للبحث عن الطفرات في المورثة *GDF9* على 15 امرأة يابانية مع قصور المبيض المبكر و لم يتم العثور على أي طفرة وربما يرجع ذلك إلى صغر حجم عينة المريضات المدروسة (Takebayashi et al., 2000). تم بعد هذه الدراسة الأولى دراسة عدد أكبر من مريضات الـ POF، ففي دراسة Dixit و زملائه على مجموعة من النساء الهنديات (195 امرأة مع قصور المبيض المبكر و انقطاع الطمث الاولي و انقطاع الطمث الثانوي) وعلى مجموعة من الشواهد الإيجابية (220 امرأة) و التي تهدف إلى تحديد المخاطر المرتبطة مع الطفرات الموجودة في المنطقة المرمزة من المورثة *GDF9*، تم الكشف عن وجود طفرتين مُعَلِّطَتَيْن (missense mutations) هما: الطفرة Lys67Glu في الإكزون الأول من المورثة *GDF9*

و قد غيرت الحمض الأميني الليزين (Lysine) إلى الغلوتاميك (Glutamic) في الكودون 67، وُجدت عند 4 مريضات مع الـ POF ومريضة واحدة مع انقطاع الطمث الثانوي، الطفرة الثانية هي Val216Met وتقع في الإكزون الثاني من المورثة *GDF9* وقد غيرت الحمض الأميني الفالين (Valine) إلى الميثيونين (Methionine) في الكودون 216 وُجدت عند مريضتين مع الـ POF، ومن الملاحظ أن كلتا الطفرتين موجودتان في منطقة طليعة الببتيد من البروتين *GDF9* وبالتالي قد تؤثران على عملية التشطر في هذه المنطقة لإفراز البروتين الناضج (Dixit et al., 2005).

أجرى Laissue وزملاؤه سلسلة كاملة للمورثتين *BMP15* و *GDF9* بهدف التحري عن وجود الطفرات فيهما وذلك في دراسة على 203 امرأة مع قصور المبيض المبكر و 54 امرأة كشواهد ايجابية، و قد كشف عن وجود طفرتين مُغلّطتين إحداهما في الإكزون الثاني من المورثة *GDF9* وهي الطفرة ser186tyr وقد وُجدت عند مريضة واحدة مع انقطاع الطمث الثانوي وقد غيرت الحمض الأميني السيرين (Serine) إلى التيروسين (Tyrosine) في الكودون 186، خلصت هذه الدراسة إلى أن غياب هذه الطفرة في النساء ذوات الخصوبة الطبيعية يقترح التأثير المُمرض المحتمل لها وبالتالي من الممكن مشاركة هذه الطفرة في مرض قصور المبيض المبكر وخاصةً أن الحمض الأميني السيرين مُصان في 17 نوع من الفقاريات (Laissue et al., 2006).

تم وصف الطفرات في المورثة *GDF9* في مجموعات عرقية مختلفة من النساء مثل: النساء من أصول إفريقية قوقازية أوروبية وأسيوية وغيرها ومن ضمن هذه الدراسات دراسة Zhao وزملائه على 100 امرأة صينية مع قصور المبيض المبكر و 96 امرأة كشواهد إيجابية، و قد كشفت عن وجود طفرة مُغلّطة في الإكزون الثاني من المورثة *GDF9* عند مريضة واحدة مع انقطاع الطمث الثانوي و هذه الطفرة هي:

Thr238Ala وقد غيرت الحمض الأميني الثريونين (Threonine) إلى الألانين (Alanine) في الكودون 238، وقد يؤدي هذا الإستبدال إلى عرقلة وظيفة البروتين GDF9 كما جاء في هذه الدراسة (Zhao *et al.*, 2007).

ومن المثير للاهتمام اكتشاف بعض الطفرات في المورثة *GDF9* عند مجموعة من أمهات التوائم غير الحقيقية (dizygotic twins) كما في دراسة Palmer وزملائه على 915 عائلة تضم كل عائلة اثنتين أو أكثر من الأخوات اللواتي أنجبين التوائم بشكل عفوي (spontaneous)، وقد كشفت هذه الدراسة وجود ثلاث طفرات مُغلّطة هم: الطفرة Pro103Ser وقد غيرت الحمض الأميني البرولين (Proline) إلى السيرين (Serine) في الكودون 103، والطفرة الثانية هي Pro374Leu وغيرت الحمض الأميني البرولين (Proline) إلى اللوسين (Leucine) في الكودون 347، أما الطفرة الثالثة فهي Arg454Lys حيث غيرت الحمض الأميني الأرجنين (Arginine) إلى الليزين (Lysine) في الكودون 454، ومن الملاحظ توضع الطفرة Pro103Ser في منطقة طليعة الببتيد من البروتين GDF9 في حين توضع الطفرتان Pro374Leu و Arg454Lys في منطقة البروتين الناضج، بالإضافة إلى ذلك كشفت هذه الدراسة عن وجود اثنتين من طفرات الحذف و الإدخال هما: الطفرة 1268-1269delAA و تم فيها حذف أساسين من الإكزون الثاني في الموقعين 1268 و 1269 أما الطفرة الثانية فهي 392-393insT و تم فيها إضافة أساس في الإكزون الأول في الموقع 393، واقترحت هذه الدراسة أن بعض الطفرات في المورثة *GDF9* المرتبطة مع أمهات التوائم غير الحقيقية التي ظهرت بتواتر عالي في هؤلاء النساء قرابة 4 % مقارنةً بعينات الشواهد الإيجابية قد يكون لها ارتباط مع النمط الظاهري متعدد الإباضة وبالتالي من الممكن أن يكون لهذه التبدلات دور محتمل في تحديد الحصة الإباضية عند البشر (Palmer *et al.*, 2006).

10.2- دور البروتين GDF9 في مراحل تشكل الجريبات في المبيض

ينتمي البروتين GDF9 (OMIM:601918) إلى عائلة GDFs التي تضم 9 بروتينات على الأقل والتي تنتمي بدورها إلى TGF- β superfamily وهو من البروتينات الخارج خلوية (extracellular) تُقدر الكتلة الجزيئية له بقرابة 51 kD ويتألف من 454 حمض أميني، يتم تخليقه كجزء طليعي كبير غير نشط حيوياً يتألف من ثلاث مناطق وظيفية هامة (pre-pro-proteins) تقوم بأدوار رئيسية في فعالية البروتين ووظيفته كما شرحنا سابقاً (McPherron *et al.*, 1993). يتم إطلاق الشكل النشط حيوياً وهو البروتين الناضج (Mature protein) بعد مجموعة من العمليات تؤدي في النهاية إلى تشكيل مُعقد يُعرف بثنائي الجزيء المتماثل (homodimer) الناتج عن ارتباط بروتينين GDF9 ببعضهما أو مُعقد يُعرف بثنائي الجزيء المتغاير (heterodimer) الناتج عن ارتباط البروتين GDF9 مع البروتين BMP15 و يتم تحرير المعقد ثنائي الجزيء (dimer) خارج الخلية البيضية ليقوم بالكثير من الوظائف الهامة نتيجة ارتباطه مع مستقبلاته الموجودة على سطح الخلايا الحبيبية، وتجدر الإشارة إلى غياب السيستيين الرابع في البروتين GDF9 من أصل سبعة حموض أمينية سيستيين مصانة في معظم أعضاء TGF- β superfamily والذي يُعتبر مسؤول عن تشكيل الرابط ثنائي السلفيد في المعقد (dimer) كما هو الحال في البروتين BMP15 (Mazerbourg&Hsueh, 2006).

يتم التعبير عن البروتين GDF9 بمستويات عالية جداً في الخلايا البيضية الموجودة في جريبات المبيض (Elvin *et al.*, 2000b) وكان يُعتقد بوجود هذا البروتين حصراً في المبيض حتى تم اكتشافه بمستويات أقل بكثير في نسيج أخرى مثل الخصية وتحت المهاد (Fitzpatrick *et al.*, 1998b).

أشارت الدراسات إلى وجود RNA المرسال (mRNA) الناتج عن نسخ المورثة GDF9 في الجريبات الأولية والجريبات الأكبر حجماً عند القوارض (McGrath *et al.*, 1995; Dong *et al.*, 1996;) و كذلك الإنسان (Aaltonen *et al.*, 1999) (Jaatinen *et al.*, 1999; Hayashi *et al.*, 1999) بينما أظهرت دراسات أخرى وجود RNA المرسال (mRNA) في الجريبات الإبتدائية عند الأغنام والأبقار (Bodensteiner *et al.*, 1999; Prochazka *et al.*, 2004; Spicer *et al.*, 2008).

لقد ساهمت الدراسات على الفئران المعدلة وراثياً في توضيح دور البروتين GDF9 فقد كشفت أنه ضروري من أجل التشكل الطبيعي لجريبات المبيض حيث تبين أن غيابه أدى إلى توقف تطور الجريبات في مرحلة الجريب الأولي وربما هذا يعود إلى فقدان الخلايا الحبيبية القدرة على الإنقسام، كما أظهرت أن وجود تغيرات في المورثة GDF9 في حالة تماثل اللواقح يؤدي إلى العقم الكامل عند إناث الفئران بينما تُظهر الإناث في حالة تغاير اللواقح نمط ظاهري طبيعي أما ذكور الفئران فلا تتأثر الخصوبة عندها بتغيرات في المورثة GDF9 (Dong *et al.*, 1996)، كما أشارت الدراسات أنه في حالة النقص في مستويات البروتين GDF-9 فإن الخلية البيضية تنمو بسرعة أكبر مقارنة مع عينة الشواهد بالإضافة إلى أنها تعاني من بعض التشوهات في البنية الهيكلية الدقيقة، أما الانتقال من مرحلة الجريب الإبتدائي إلى مرحلة الجريب الأولي فلم تتأثر بوجود هذا النقص مما يوحي بأنه ربما ليس هناك حاجة لوجود البروتين GDF9 في بداية نمو الجريبات، وقد أظهرت الفئران في هذه الدراسات عدم تشكل طبقة الخلايا القرايية هذا بالإضافة أنها تعاني من مستويات مرتفعة من هرموني الـ FSH و الـ LH (Carabatsos *et al.*,) (1998; Elvin *et al.*, 1999b).

1.10.2- دور البروتين GDF9 في مراحل الجريبات الإبتدائية والأولية وقبل الغارية

تشير الدراسات أن البروتين GDF9 قد يكون له دور في تشكيل الجريبات الإبتدائية كما إنه يُحفز نمو و تطور الجريبات الأولية في القوارض ويزيد من تعبير البروتين CYP17 في مرحلة الجريب قبل الغاري حتى المراحل المبكرة من الجريب الغاري وهو أنزيم أساسي يشارك في مسار إنتاج الهرمونات الستيروئيدية في الخلايا القريبية، كما يمنع GDF9 عملية الإستماتة الخلوية للخلايا الحبيبية في الجريب قبل الغاري من خلال تثبيط تفعيل مسار PI-3K/Akt ، ويعتبر وجوده ضروري من أجل الحفاظ على تعبير مستقبل هرمون ال-FSH خلال الإنتقال من الجريب قبل الغاري إلى الجريب الغاري (Hayashi *et al.*, 1999; Vitt *et al.*, 2000; Nilsson & Skinner, 2002; Orisaka *et al.*, 2009 ، تقترح بعض الدراسات على المواشي أن البروتين GDF-9 يعزز تكاثر الخلايا الحبيبية في كلاً من الجريبات الصغيرة والكبيرة بوجود هرمون ال-FSH وفي نفس الوقت يمنع التمايز المبكر لهذه الخلايا كما يعزز أيضاً تكاثر الخلايا القريبية (Spicer *et al.*, 2006; Spicer *et al.*, 2008). أما في الإنسان يعزز نمو وتطور وبقاء جريبات المبيض الإبتدائية وصولاً إلى مرحلة الجريبات قبل الغارية (Hreinsson *et al.*, 2002).

2.10.2- دور البروتين GDF9 في مرحلة الجريبات الغارية حتى مرحلة ما بعد الإباضة

يؤدي البروتين GDF9 دوراً مهماً في تنظيم العديد من وظائف الخلايا الحبيبية خلال المراحل التي تسبق عملية الإباضة فقد أشارت دراسات (Orisaka *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2009) أن البروتين GDF9 يعزز نمو الجريبات الغارية في المراحل المبكرة عن طريق حماية الخلايا الحبيبية من

عملية الإستماتة الخلوية ، كما إنه ينظم الإنقسام المتساوي للخلايا الحبيبية وبالتالي يحث على تكاثرها، بالإضافة إلى ذلك فإن وجوده ضروري للحفاظ على تعبير مستقبل هرمون الـ FSH (FSHR) خلال الإنتقال من مرحلة الجريب قبل الغاري حتى المرحلة المبكرة من الجريب الغاري. أظهرت دراسات (Sugiura *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2008) أن للبروتين GDF9 دور هام في المراحل النهائية من نمو الجريبات وذلك عن طريق التحكم باستقلاب الخلايا الرُكمية وخاصة التخليق البيولوجي للكولسترول وبالتالي يُعتبر GDF9 منظم مهم لتطور الخلايا الرُكمية ووظيفتها قبل الإزدياد الكبير لمستوى هرمون الـ LH السابق لعملية الإباضة، كما بينت دراسات (Shi *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2010) على الخلايا الحبيبية اللوتينية أن البروتين GDF9 له تأثير غير مباشر على إنتاج البروجستيرون تحت تأثير هرمون الـ LH وذلك عن طريق زيادة مستويات تعبير البروتين B inhibin الذي يُخَفِّف من تأثير البروتين Activin A (البروتين Activin A يثبط تعبير البروتين StAR الذي يشارك بدوره في مسار إنتاج البروجستيرون).

3.10.2- دور GDF9 في تَوَسُّع الخلايا الرُكمية

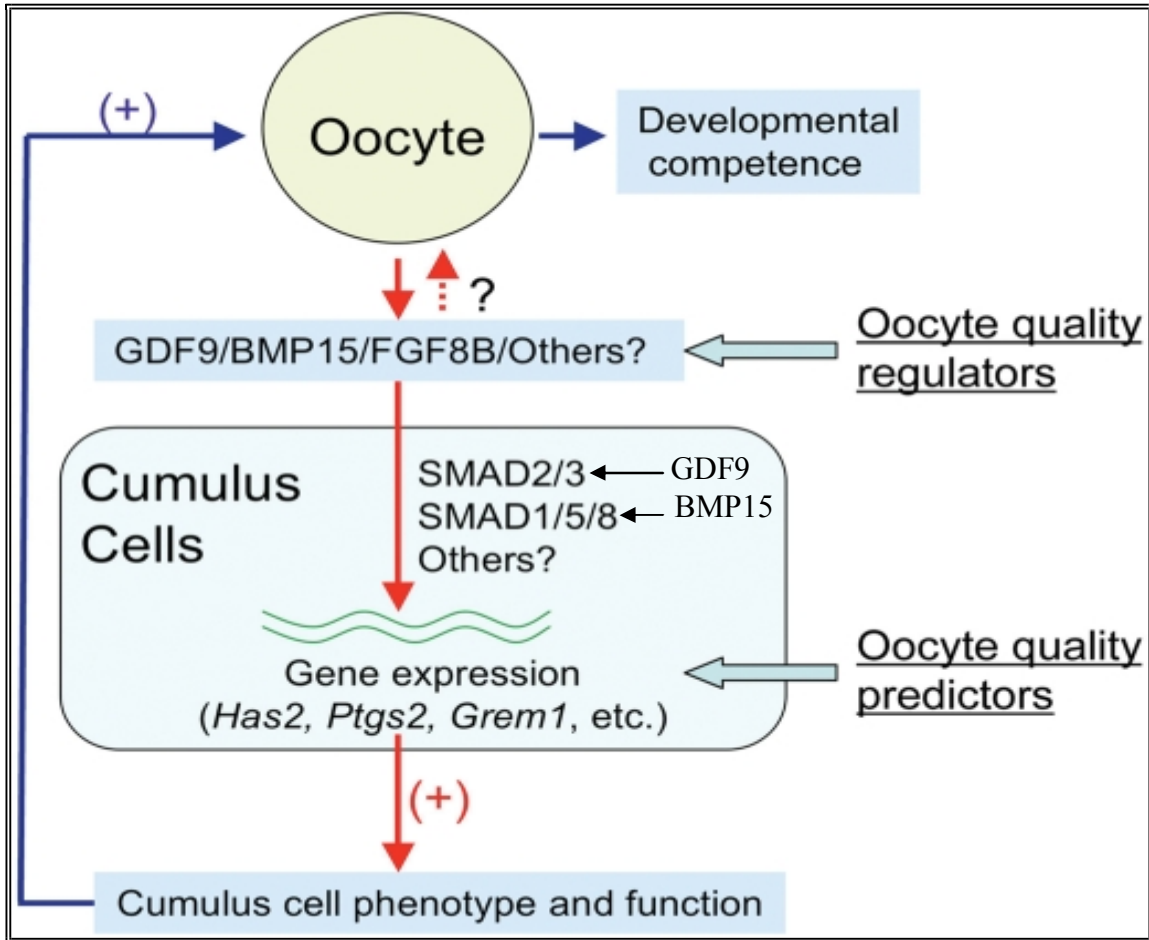
ما إن تتشكل الجريبات الإبتدائية في المبيض حتى يرتبط نمو و تطور الخلية البيضية بشكل مباشر مع الخلايا الحبيبية التي تحيط بها حيث يوجد اتصال بينهما في كلا الإتجاهين وذلك عن طريق ممرات تُدعى مَوَصِلَ فَجْوِي، تربط هذه الممرات سيتوبلازما الخلية البيضية مباشرةً مع سيتوبلازما الخلايا الحبيبية المحيطة بها مما يسمح بمرور مختلف البروتينات بحرية وسهولة بين الخلايا (Albertini *et al.*, 2003) وبشكل خاص عوامل النمو مثل BMP15 و GDF9 نظراً لدورهما المهم خلال مراحل تطور الجريبات في المبيض.

يطراً على الخلايا الرُكمية التي تحيط بالخلية البيضية في الفترة التي تسبق عملية الإباضة سلسلة من العمليات تؤدي إلى تَوْسُّع هذه الخلايا وذلك من أجل تمكين الخلية البيضية مع الإكليل المشع الذي يحيط بها من الخروج من الجريب و بالتالي حدوث عملية الإباضة، وقد دفعت التجارب التي أُجريت في الزجاج (vitro) إلى الاعتقاد أن الخلية البيضية التي نمت بشكل كامل تُفرز عامل يُدعى عامل تمكين تَوْسُّع الخلايا الرُكمية CEEF (the Cumulus Expansion-Enabling Factor) الذي يحث هذه الخلايا على التوسع تحت تأثير هرمون الـ FSH (Buccione *et al.*, 1990; Vanderhyden *et al.*, 1990)، وقد تبين أن البروتين GDF9 من بين أكثر المرشحين كـ CEEF لأنه أول عامل يُشاهد في الخلية البيضية يحث على نسخ مجموعة معينة من المورثات التي ستترجم إلى بروتينات مشاركة و ضرورية لعملية توسع الخلايا الرُكمية (الشكل 10) (Salustri *et al.*, 1990; Elvin *et al.*, 2003; Vanderhyden *et al.*, 1999a) و هذه البروتينات تتضمن :

- hyaluronan synthase 2 (Has2)
- prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2)
- pentraxin 3(Ptx3)
- tumor necrosis factor alpha induced protein 6 (Tnfaip6)
- cyclo-oxygenase 2 (COX-2)
- steroidogenic acute regulatory protein (StAR)

يُعبّر عن البروتين Has2 في الخلايا الرُكمية بعد الإرتفاع الكبير في مستوى هرموني (LH و FSH) السابق للإباضة وهو أنزيم أساسي يُشارك في تركيب حمض الهيالورونيك الضروري لتوسع الخلايا الرُكمية (Camaioni *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1993)، يعد Ptgs2 بروتين ضروري من أجل

أن تتوسع الخلايا الرُكمية إلى أقصى حد ممكن (Lim et al., 1997).
بينما يعد Ptx3 بروتين ضروري لتحقيق استقرار البروتين Tnfaip6 الذي يُعتبر بدوره مسؤول عن تحقيق الارتباط بين حمض الهيالورونيك و ITI (inter- α trypsin inhibitor) لتشكيل معقد ضروري لعملية توسع الخلايا الرُكمية (Varani et al., 2002; Salustri et al., 2004)، ينظم البروتين StAR نقل الكولسترول من الغشاء الخارجي للميتوكوندريا إلى الغشاء الداخلي خلال تركيب الهرمونات الستيرويدية و التي يبدأ إنتاجها ابتداءً من الكولسترول في الخلايا الحبيبية و القرابية، يُحفز البروتين COX-2 تركيب prostaglandins وخاصةً (prostaglandin E2) والذي يمكن أن يشارك في تحريض الإباضة و تَوَسُّع الخلايا الرُكمية وانغراس البيضة الملقحة (Davis et al., 1999; Elvin et al., 2000).



الشكل 10: دور البروتين GDF9 في توسع الخلايا الرُكمية

تفرز الخلية البيضية عوامل نمو مثل البروتينات GDF9 و BMP15 و FGF8B بالإضافة إلى عوامل غير معروفة، تؤثر عوامل النمو على الخلايا الرُكمية المحيطة بالخلية البيضية من خلال تفعيل شلال من البروتينات داخل خلوية (Smad factors) التي تحفز التعبير المورثي للمورثات الهدف الضرورية لعملية توسع الخلايا الرُكمية مثل (Has2، Ptgs2)، كما تقوم عوامل النمو بتنظيم العديد من وظائف الخلايا الرُكمية مثل الإستماتة الخلوية، الإستقلاب الخلوي (تحلل وتركيب الكوليسترول)، وتعتبر هذه الوظائف حاسمة في تطوير كفاءة الخلية البيضية (Li et al., 2008).
 prostaglandin) Ptgs2، (hyaluronan synthase 2) Has2، (fibroblast growth factor 8B) FGF8B
 .(endoperoxide synthase 2

مما سبق يمكن تلخيص أهم الوظائف الأساسية التي يقوم بها البروتين **BMP15** خلال المراحل المختلفة من تطور الجريبات في المبيض بالتالي:

- يُحفز تكاثر الخلايا الحبيبية في المراحل الأولى من تطور الجريبات وبشكل مستقل عن الهرمونات النخامية.
 - ينظم حساسية الخلايا الحبيبية تجاه تأثير هرمون الـ **FSH**.
 - يمنع إنتاج هرمون البروجستيرون في الخلايا الحبيبية دون أن يؤثر على إنتاج هرمون الإستراديول قبل عملية الإباضة.
 - يحث على توسع الخلايا الرُكمية.
 - يخفض معدلات الإستماتة الخلوية للخلايا الرُكمية.
- وأيضاً يمكن تلخيص أهم الوظائف التي يقوم بها البروتين **GDF9** خلال مراحل تطور الجريبات في المبيض بعدة نقاط هي:

- يعزز تطور الجريبات الإبتدائية و يحفز تكاثر الخلايا الحبيبية مما يؤدي إلى نمو الجريبات.
 - يمنع الإستماتة الخلوية للخلايا الحبيبية.
 - ينظم تعبير البروتين **Star** وإطلاق البروجستيرون من الخلايا الحبيبية و الخلايا القرابية تحت تأثير هرمون الـ **LH**.
 - يضبط إنتاج هرمون البروجستيرون عن طريق زيادة تعبير البروتين **inhibin B**.
 - يحث على توسع الخلايا الرُكمية.
- نظراً لأهمية تحديد دور المورثتين **BMP15** و **GDF9** في ظهور مرض قصور المبيض المبكر الذي يسبب العقم عند النساء و لإمكانية التدخل المبكر قبل الشروع في إجراءات إخصابية مكلفة، وجدنا أن نقوم بتحري وجود طفرات وتغيرات هاتين المورثتين في سورية بهدف نشر المعرفة العلمية وتجنيد السيدات و العائلات تكاليف مادية باهظة بالإضافة إلى تحديد تواتر هذه التغيرات المرافقة للـ **POF** في مجتمعنا، أجرينا دراسة متكاملة شملت الصيغة الصبغية وتركيز هرمون الـ **FSH** ودراسة وراثية تضمنت سلسلة الـ **DNA** لمريضات الـ **POF** و الشواهد.

الفصل الثالث

الدراسة العملية

3- العينة المدروسة و طرائق البحث

1.3- العينة المدروسة:

أُخِذَت عينات الدم من 80 امرأة سورية مصابة بقصور المبيض المبكر (POF) موزعة كالتالي:
 55 امرأة تعاني من انقطاع الطمث الأولي (PA) و 25 امرأة تعاني من انقطاع الطمث الثانوي (SA)،
 تم جمع العينات من قسم التوليد و الأمراض النسائية في مشفى التوليد الجامعي و من العيادات النسائية
 في مشفى الزهراوي بالإضافة إلى العديد من العيادات الخاصة وذلك ما بين عامي 2011-2013 وقد تم
 الحصول على الموافقة الخطية المسبقة من جميع المريضات.

تضمنت معايير الإشتمال inclusion criteria لمريضات الـ POF مايلي: (1) العمر أقل من 40
 عاماً، (2) توقف الدورة الحيضية لأكثر من ستة أشهر مع عدم وجود مشاكل في الحيض قبل الانقطاع،
 (3) مستوى مرتفع من هرمون الـ FSH أكثر من 40 IU/L، (4) عدم وجود جريبات احتياطية في كلا
 المبيضين نتيجة الفحص بالأموح فوق الصوتية، (5) عدم وجود أمراض المناعة الذاتية أو خلل في
 وظائف الكلية و الكبد. تم تسجيل التاريخ الطبي المفصل لكل مريضة في ملف مستقل تضمن القصة
 السريرية والعائلية، مشاكل الإنجاب، زواج الأقارب في العائلة، كما وأجري الفحص السريري من أجل
 تحديد المشاكل التشريحية، أما معايير الإستبعاد exclusion criteria لمريضات الـ POF فكانت:
 العلاج الشعاعي أو الكيميائي، جراحة المبيض، العلاج بالهرمونات البديلة، الصيغة الصبغية غير
 الطبيعية. بلغ عدد الشواهد 200 امرأة سورية مع دورة حيضية منتظمة، ومستوى طبيعي من هرمون الـ
 FSH، لديهم طفل واحد على الأقل ولا توجد قصة عائلية مع العقم أو أمراض المناعة الذاتية.

2.3- طرائق البحث:

تمت الدراسة العملية من خلال إجراء عدة مراحل وهي:

1.2.3- الدراسة الوراثية الخلوية (Cytogenetics):

وهي تهدف إلى تحديد الصيغة الصبغية (Karyotype) لكل مريضة عن طريق إظهار الصبغيات ودراستها في الطور الإستوائي (Metaphase) من الإنقسام المتساوي لكريات الدم البيضاء بهدف استبعاد حالات الزيوغ الصبغية من العينة المدروسة وتتم وفق الخطوات التالية:

1.1.2.3- الزراعة الخلوية وتجهيز المحضرات الصبغية:

أخذنا عينات الدم المحيطي بشكل عقيم من وريد الساعد بمعدل 5-7 مل ووضعنا في أنابيب مفرغة من الهواء سعة 7-10 مل معقمة وتحوي على مادة الهيبارين كمانع للتخثر، اعتمدنا في عملنا على الطريقة التقليدية المتبعة لاستنبات لمفاويات الدم المحيطي (Verma & Babu, 1995) وتتلخص هذه الطريقة بالتالي: أضفنا 500 ميكرو لتر من الدم المحيطي لكل أنبوب يحتوي على 10 مل وسط زرع صناعي كامل Chromosome B يشتمل على (سيروم جنين البقر، هيبارين، صادات حيوية، محرض انقسامي يحرض الكريات البيضاء على الإنقسام) تمت عملية الإستنبات بشكل عقيم تحت خيمة عقيمة ذات ضخ هوائي شاقولي، تركنا الأنابيب لمدة 72 ساعة في الحاضنة بدرجة الحرارة 37° (يُستنبت لكل مريضة أربعة أنابيب)، أضفنا قبل نهاية عملية الزراعة بـ 1 - 1.5 ساعة 100 ميكرو لتر من محلول الكولشيسين (يتركيز 4 ميكروغرام/مل) لإيقاف الإنقسامات الخلوية في الطور التالي من الدورة الخلوية عن طريق تعطيل مغزل الإنقسام، ثفلت الأنابيب مدة 10 دقائق بسرعة 1500 دورة / دقيقة ثم سحبنا الطافي وأضفنا إلى الخلايا المترسبة في أسفل الأنبوب نحو 300 مل من محلول كلور البوتاسيوم بهدف

تفجير الخلايا وبعثرة الصبغيات، تركنا المزيج في الحاضنة مدة 20 دقيقة بدرجعة حرارة 37° ثم أضفنا لكل أنبوب حوالي 0.5 مل من مثبت كارنوا (مزيج من الإيتانول وحمض الخل الثلجي بنسبة 1:3). ثقلنا الأنابيب لمدة 10 دقائق بسرعة 1500 دورة / دقيقة ثم أزلنا الطافي وأضفنا حوالي 2 مل من مثبت كارنوا مع مزج أنابيب الإستنبات بالرجاجة المغناطيسية ثم ثقلنا الأنابيب من جديد وأعدنا عملية إضافة الكارنوا حوالي 3-4 مرات، أضفنا حوالي 2 مل من حمض الخل الثلجي مع المزج بالرجاجة المغناطيسية ووضعنا الأنابيب بعدها في البراد لمدة ساعتين تقريباً، ثقلنا الأنابيب من جديد لمدة 10 دقائق بسرعة 1500 دورة / دقيقة ثم أزلنا الطافي مع الإبقاء على بضعة قطرات من حمض الخل الثلجي مع الراسب بغية الحصول على التركيز المناسب ، وبعدها يُحول الراسب إلى معلق خلوي باستعمال ممص باستور زجاجي سعة 3 مل و يُنشر بعدها المعلق الخلوي على شرائح زجاجية وتُترك لتجف وتصبح جاهزة للتلوين والدراسة.

2.1.2.3- دراسة الصيغة الصبغية باستخدام تقانة التعصيب G و التلوين بغيما:

تُعتبر تقانة التعصيب G (G-banding) الأكثر استخداماً في معظم المختبرات لتحديد الصيغة الصبغية أو الطابع النووي (karyotype) وتتم وفق الخطوات التالية:

وضعنا المحضرات الصبغية في محلول التريسين تركيز 0.25% لمدة 20 - 25 ثانية (يُحل 0.035 غرام من التريسين في 70 مل من محلول الـ PBS) رفعنا المحضرات مباشرةً ووضعناها في محلول PBS، لَوْنَا المحضرات بملون غيمزا تركيز 3% مدة 3 - 5 دقائق ثم غسلناها بالماء الجاري و الماء المقطر على التوالي، يقوم أنزيم التريسين والذي يعمل في وسط قلوي ضعيف بهضم نوعي سريع لبروتينات الصبغيات الأضعف ارتباطاً بها، أما ملون غيمزا فهو يرتبط بالـ DNA و يظهر لدينا نتيجة

لذلك نوعين من العصابات: عصابات عالية الكثافة (داكنة) G-dark bands وهي المناطق غير المهضومة من مادة الصبغي بواسطة أنزيم الترسين نظراً للكثافة الشديدة للبروتينات النووية كما إنها فقيرة بالمورثات وتبدأ بالتضاعف متأخرة وهي منطقة الكروماتين المتغاير الغنية بأشفاغ الأسس الأزوتية التيمين - الأدينين (A-T).

عصابات ذات كثافة لونية منخفضة (فاتحة) G-light bands وهي المناطق المهضومة من مادة الصبغي بواسطة أنزيم الترسين نظراً للكثافة الضئيلة للبروتينات النووية كما إنها غنية بالمورثات وتبدأ بالتضاعف باكراً وهي منطقة الكروماتين الحقيقي الغنية بأشفاغ الأسس الأزوتية السيتوزين - غوانين (G-C).

يبلغ عدد هذه العصابات حوالي 400 عصابة في المجموعة الصبغية الأحادية (23 صبغي) وتصل ثخانة العصابة الواحدة 5-10 megabases (Barrett, 2003; Strachan&Read, 2004).

بعد تطبيق مراحل طريقة عصابات G باستخدام أنزيم الترسين والتلوين بملون غيمزا درسنا المحضرات الصبغية تحت المجهر الضوئي باستخدام العدسة الغاطسة ذات قوة التكبير 10 X 100، وتم التقاط صور للمحضرات بواسطة كاميرا رقمية ثم تحليل الصور باستخدام برنامج حاسوبي خاص Cytovision يتعرف على كل صبغي و يقوم بترتيب الصبغيات وفقاً لنمط العصابات التي تظهر عليها. درسنا لكل مريضة 20 انقسام خلوي على الأقل ورفعنا العدد إلى 50 انقسام خلوي عند الشك بوجود خلل في الصيغة الصبغية وفي النهاية يتم مقارنة الطابع النووي لكل مريضة مع المرجع (ISCN, 2005) لتحديد الصيغة الصبغية وكشف التبدلات الصبغية في حال وجودها.

2.2.3- عزل الـ DNA الجينومي (genomic DNA):

سُحبت عينات الدم حوالي (5 مل) على أنابيب مفرغة من الهواء تحوي مادة مضادة للتخثر EDTA (ethylene diamine-tetra acetic acid) ، و عُزل الـ DNA من الدم المحيطي باستخدام طاقم جاهز (QIAGEN, Hilden, Germany) وفقاً لتعليمات الشركة الصانعة على النحو التالي:

- وضعنا 20 ميكرو لتر من انزيم البروتيناز K في أنبوب ابندورف سعة 1.5 مل.
- أضفنا 200 ميكرو لتر من عينة الدم و 4 ميكرو لتر من أنزيم الـ RNase A (100ملغ/مل) لتحطيم جزيئات الـ RNA.
- أضفنا 200 ميكرو لتر من المحلول AL إلى العينة و مزجنا لمدة 15 ثانية باستخدام الرجاجة.
- حضنا المزيج في حمام مائي بدرجة حرارة $56^{\circ}C$ لمدة 20 دقيقة.
- ثقلنا المزيج قليلاً ثم أضفنا 200 ميكرو لتر من الايتانول المطلق (96-100%) إلى المزيج و مزجنا من جديد لمدة 15 ثانية.
- وضعنا المزيج على عمود فلتر (QIAamp Mini spin column) موجود في أنبوب تجميع سعة 2 مل وثقلنا بسرعة 8000 rpm لمدة دقيقة.
- نقلنا QIAamp Mini spin column إلى أنبوب تجميع جديد، و تخلصنا من الأنبوب المشتمل على الرشاحة.
- فتحنا QIAamp Mini spin column بحذر وأضفنا 500 ميكرو لتر من المحلول AW1 دون ترطيب حافة الأنبوب ثم ثقلنا بسرعة 8000 rpm لمدة دقيقة.
- وضعنا QIAamp Mini spin column في أنبوب تجميع جديد، و تخلصنا من أنبوب التجميع المشتمل على الرشاحة.
- فتحنا QIAamp Mini spin column بحذر وأضفنا 500 ميكرو لتر من المحلول AW2 دون ترطيب حافة الأنبوب وثقلنا بسرعة عالية 14000 rpm لمدة 3 دقائق.
- وضعنا QIAamp Mini spin column في أنبوب تجميع جديد وثقلنا بسرعة عالية لمدة دقيقة

(لإزالة آثار AW2) ثم أضفنا 100 ميكرو لتر من الماء المقطر لحل الـ DNA.

- ثقلنا بسرعة 8000 rpm لمدة دقيقة ثم وضعنا الـ DNA في أنبوب إندورف سعة 0.5 مل وحفظنا الأنبوب في درجة حرارة (+4°C) لحين الإستعمال.

3.2.3 - التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR (Polymerase Chain Reaction):

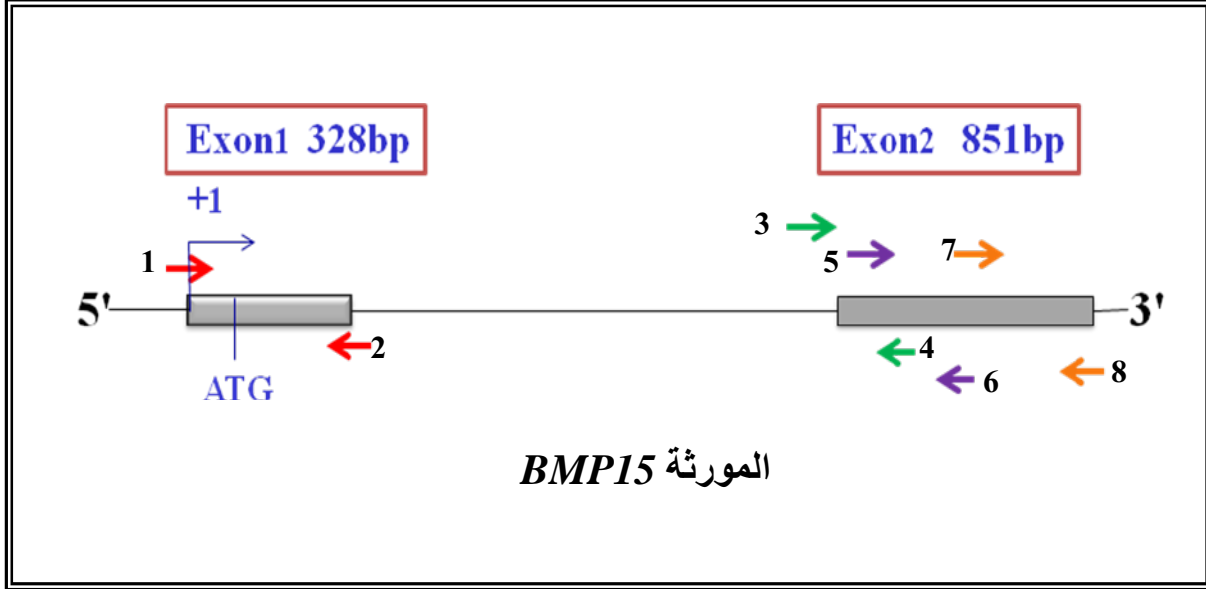
أجرينا تفاعلات PCR مفردة على الـ DNA الجينومي لتضخيم إكزونات كلاً من المورثتين *BMP15*

و *GDF9* وذلك باستخدام بادئات (primers) نوعية لكل إكزون، أما مراحل تفاعل الـ PCR فهي:

- التمسح Denaturation: يتم في هذه المرحلة تحطيم الروابط الهيدروجينية بين سلسلتي الـ DNA وتحويل البنية الثانوية للحمض النووي إلى البنية الأولية (سلاسل مفردة) .
 - البناء Annealing : يتم فيها توضع البادئات وأنزيم التضاعف في مواقعها على سلسلتي الـ DNA.
 - الإستطالة Extension : يتم فيها نسخ سلسلتي الـ DNA المفردتين .
- تكرر هذه المراحل بين 25 - 40 دورة بهدف الحصول على كمية كافية من نسخ الـ DNA.

1.3.2.3- تضخيم المورثة BMP15:

تتألف المورثة BMP15 من إكزونين يُقدر طولهما بـ 1179 زوجاً من الأسس (bp) ومفصولين عن بعضهما بإنترون يبلغ طول الإكزون الأول 328 زوجاً من الأسس (bp) وطول الإكزون الثاني 851 زوجاً من الأسس. أجرينا تفاعلات الـ PCR المفردة لتضخيم المناطق المرمزة من المورثة باستعمال أربعة أزواج من بادئات خاصة صُممت بالاستعانة ببنك المورثات (GenBank Accession NC) وقد ضخمنا الإكزون الأول كشدفة PCR واحدة بينما ضخمنا الإكزون الثاني كثلاث شدف PCR (الشكل 11) و يوضح الجدول رقم 2 تسلسل البادئات وأطوال شدف الـ PCR.



الشكل 11: رسم تخطيطي يوضح تضخيم المورثة *BMP15* بواسطة التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR تتألف المورثة *BMP15* من إكزونين وقد ضخمنا الإكزون الأول كشدفة PCR واحدة باستعمال زوج من البادئات (1 و 2)، بينما ضخمنا الإكزون الثاني كثلاث شدف PCR باستعمال ثلاثة أزواج من البادئات هي: (3 و 4) لتضخيم الشدفة الأولى و(5 و 6) لتضخيم الشدفة الثانية و (7 و 8) لتضخيم الشدفة الثالثة، وتشير الأسهم إلى أماكن توضع أزواج البادئات واتجاهها ويشير الرمز +1 إلى موضع بداية الإنتساخ في حين يشير الرمز ATG إلى موضع بداية الترجمة.

الجدول 2: تسلسل البادئات المستخدمة لتضخيم الإكزونين في المورثة BMP15

الرقم	البادئة	التسلسل 5'-3'	طول الشدفة
1	F	AGTGACGTCCCTTGGGCTTG	478bp
2	R	AC AAAGCCT GACAGT AAA CCC	
3	F	CTATCAGTCTATATCAAGACAG	422bp
4	R	GCTCAAGACCACCACTATCT	
5	F	GGTTCTGGAATAACAAGGGAC	468bp
6	R	CCACCAACTGATTGATAAGG	
7	F	ACTGTAAAGGAAGTGTCTCC	323bp
8	R	AACCTACAGATTGGTACAGGAT	

احتوى كل تفاعل PCR (الحجم النهائي 25µl) على مزيج من المواد المستعملة كما هو موضح في الجدول رقم 3 أضفنا إلى المزيج 3µl من الـ DNA الجينومي بتركيز (100 ng). استخدمنا البادئتين 1 و 2 لتضخيم الإكزون الأول من المورثة و البادئتين 3 و 4 لتضخيم الشدفة الأولى من الإكزون الثاني بينما الشدفة الثانية من الإكزون الثاني فتم تضخيمها بواسطة البادئتين 5 و 6 أما تضخيم الشدفة الثالثة فتم بواسطة البادئتين 7 و 8. بعد الإنتهاء من تحضير المزيج وضعنا الأنابيب في جهاز الـ PCR وقد أجري تفاعل الـ PCR بالنسبة للإكزون الأول و الشدفة الثالثة من الإكزون الثاني وفقاً للشروط الآتية:

- 1- تسخين أولي بدرجة حرارة 94° لمدة 5 دقائق.
- 2 - Denaturation (التمسخ) بدرجة حرارة 94° لمدة 30 ثانية.
- 3 - Annealing (ربط البادئات) بدرجة حرارة 60° لمدة 60 ثانية.
- 4 - Extension (استطالة البادئات) بدرجة حرارة 72° لمدة 60 ثانية.
- 5 - عدد الدورات 40 دورة حيث تكرر الخطوات 2 و 3 و 4 (40 مرة).

6 - الإستطالة النهائية بدرجة حرارة 72° لمدة 7 دقائق.

استخدمنا الشروط الآتية بالنسبة للشدفة الأولى و الثانية من الإكزون الثاني:

1- تسخين أولي بدرجة حرارة 94° لمدة 5 دقائق.

2 - Denaturation (التمسخ) بدرجة حرارة 94° لمدة 30 ثانية.

3 - Annealing (ربط البادئات) بدرجة حرارة 58° لمدة 45 ثانية.

4 - Extension (استطالة البادئات) بدرجة حرارة 72° لمدة 60 ثانية.

5 - عدد الدورات 40 دورة حيث تكرر الخطوات 2 و 3 و 4 (40 مرة).

6 - الإستطالة النهائية بدرجة حرارة 72° لمدة 7 دقائق.

تضمن كل واحد من تفاعلات الـ PCR الأربعة لتضخيم الإكزونين الأول و الثاني في المورثة شاهداً

سلبياً لمراقبة التلوث استعضنا فيه عن الـ DNA الجينومي بالحجم نفسه من الماء المقطر (شاهد خالي

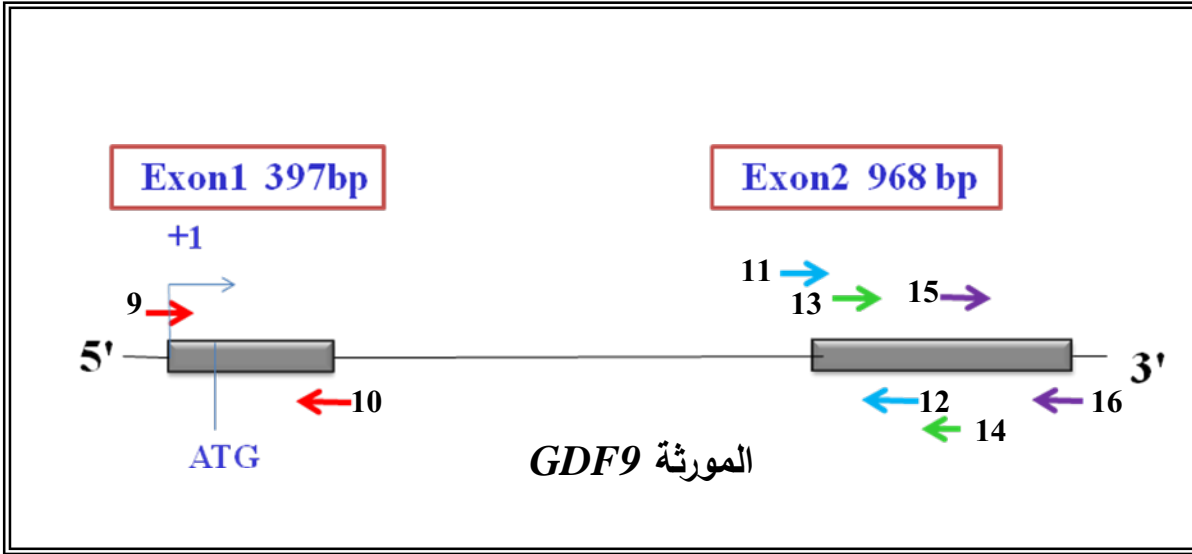
من الركيزة non-template control).

الجدول 3: مزيج المواد المستعملة في تفاعل الـ PCR وتركيزها وحجمها بالمايكروليتر (µl)

المواد	التركيز	الحجم من أجل عينة واحدة (µl)
PCR Buffer	1x	2.5µl
DNTPs	0.2 mM	1µl
Taq polymerase	5U/ µl	0.5µl
Primers	1µM each	1 µl each
MgCl ₂	1.5mM	1.5 µl
H ₂ O	-	14.5µl
DNA	50 - 100ng/ µl	3 µl
Total	-	25 µl

2.3.2.3- تضخيم المورثة GDF9:

تتألف المورثة GDF9 من إكزونين مفصولين عن بعضهما بإنترون يبلغ طول الإكزون الأول 397 زوجاً من الأسس (bp) أما طول الإكزون الثاني 968 زوجاً من الأسس (bp)، ضخمنا المناطق المرمزة من المورثة بواسطة أربعة أزواج من البادئات الخاصة التي صُممت بالاستعانة ببنك المورثات (GenBank Accession NC)، و استعملنا زوج من البادئات لتضخيم الإكزون الأول و ثلاثة أزواج من البادئات لتضخيم الإكزون الثاني (الشكل 12)، يوضح الجدول رقم 4 تسلسل البادئات وأطوال شدف الـ PCR.



الشكل 12: رسم تخطيطي يوضح تضخيم المورثة GDF9 بواسطة التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR تتألف المورثة GDF9 من إكزونين وقد ضخمنا الإكزون الأول كشفدة PCR واحدة باستعمال زوج من البادئات (9 و 10)، بينما ضخمنا الإكزون الثاني كثلاث شدف PCR باستعمال ثلاثة أزواج من البادئات هي: (11 و 12) لتضخيم الشدفة الأولى و(13 و 14) لتضخيم الشدفة الثانية و (15 و 16) لتضخيم الشدفة الثالثة، وتشير الأسهم إلى أماكن توضع أزواج البادئات واتجاهها ويشير الرمز +1 إلى موضع بداية الإنتساخ في حين يشير الرمز ATG إلى موضع بداية الترجمة.

الجدول 4: تسلسل البادئات المستخدمة لتضخيم الإكزونين في المورثة GDF9

الرقم	البادئة	التسلسل 5'-3'	طول الشدفة
9	F	AGAGACCAAGCTAGGCTCTTCCT	579bp
10	R	AA TACA ATT CAA GGA ACT AGG	
11	F	AGTACTAATTCTTTGACTTGA	454bp
12	R	AGAGTCATGTAAACAAAC	
13	F	GACCAGCCTCCTTCAACCT	433bp
14	R	AAGT CTAAAGTCATGGAG	
15	F	AGTTCTGAATTGAAGAAGCC	459bp
16	R	AAGGCACACATAGGCACACA	

أجرينا تفاعلات الـ PCR المفردة في أنابيب سعة 0.2 مل واحتوى كل تفاعل على مزيج من المواد المستعملة كما هو موضح في الجدول رقم 5، أضفنا إلى المزيج 3µl من الـ DNA الجينومي بتركيز (100 ng) ليصبح الحجم النهائي لتفاعل الـ PCR (25µl)، استخدمنا البادئتين 9 و 10 لتضخيم الإكزون الأول و البادئتين 11 و 12 لتضخيم الشدفة الأولى من الإكزون الثاني بينما استخدمنا البادئتين 13 و 14 لتضخيم الشدفة الثانية من الإكزون الثاني أما الشدفة الثالثة فتم تضخيمها بواسطة البادئتين 15 و 16، بعد الإنتهاء من تحضير المزيج السابق وضعنا الأنابيب في جهاز الـ PCR .

الجدول 5: مزيج المواد المستعملة في تفاعل الـ PCR وتركيزها وحجمها بالمايكروليتر (μl)

المواد	التركيز	الحجم من أجل عينة واحدة (μl)
PCR Buffer	1x	2.5μl
DNTPs	0.2 mM	1μl
Taq polymerase	5U/ μl	0.5μl
Primers	1μM each	1 μl each
MgCl ₂	1.5mM	1.5 μl
H ₂ O	-	14.5μl
DNA	50 - 100ng/ μl	3 μl
Total	-	25 μl

أجري تفاعل الـ PCR بالنسبة للإكزون الأول و الشدفة الثالثة من الإكزون الثاني وفقاً للشروط الآتية:

- 1 - تسخين أولي بدرجة حرارة 94° لمدة 5 دقائق.
- 2 - تسخين بدرجة حرارة 94° لمدة 60 ثانية.
- 3 - ربط البادئات بدرجة حرارة 60° لمدة 60 ثانية.
- 4 - استطالة البادئات بدرجة حرارة 72° لمدة 60 ثانية.
- 5 - عدد الدورات 40 دورة حيث تكرر الخطوات 2 و 3 و 4 (40 مرة).
- 6 - الإستطالة النهائية بدرجة حرارة 72° لمدة 7 دقائق.

استخدمنا الشروط الآتية بالنسبة للشدفة الأولى و الثانية من الإكزون الثاني:

- 1- تسخين أولي بدرجة حرارة 94° لمدة 5 دقائق.
- 2 - تسخين بدرجة حرارة 94° لمدة 60 ثانية.

3 - ربط البادئات بدرجة حرارة 57° لمدة 45 ثانية.

4 - استطالة البادئات بدرجة حرارة 72° لمدة 60 ثانية.

5 - عدد الدورات 40 دورة حيث تكرر الخطوات 2 و 3 و 4 (40 مرة).

6 - الإستطالة النهائية بدرجة حرارة 72° لمدة 7 دقائق.

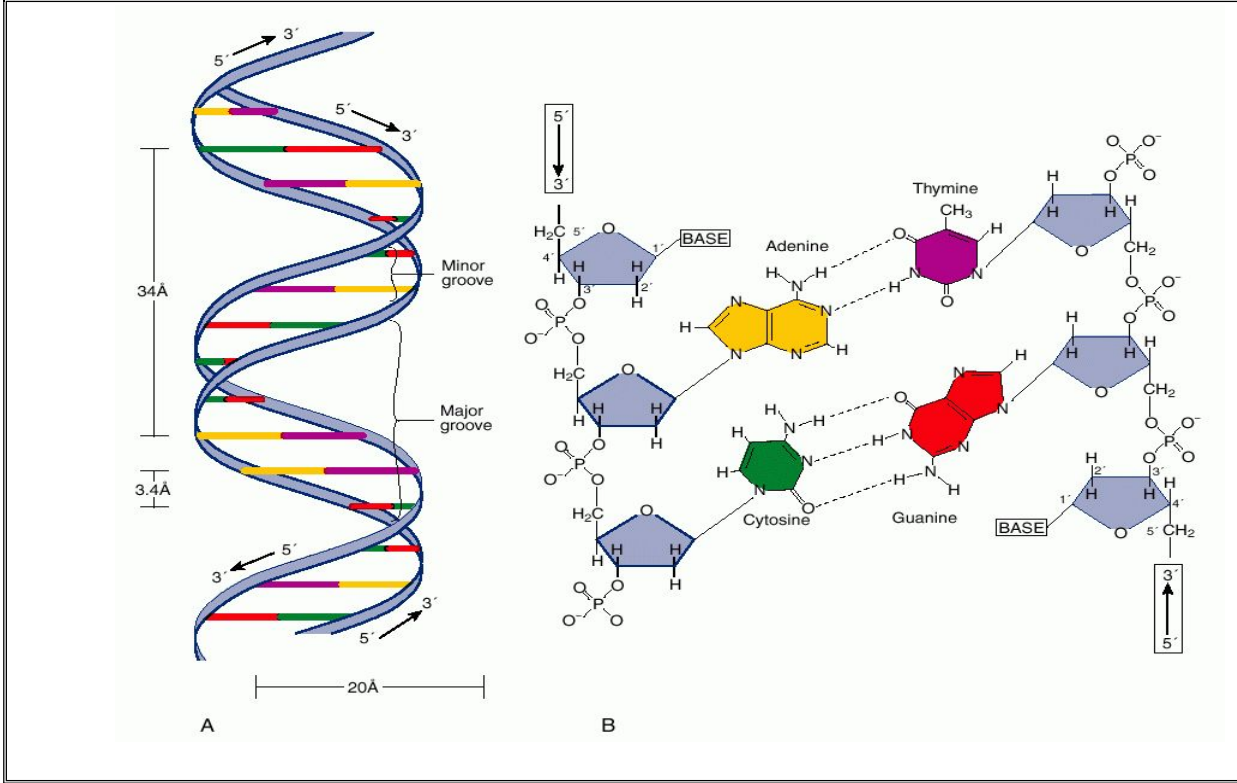
تضمن كل واحد من تفاعلات الـ PCR الأربعة لتضخيم الإكزونين الأول و الثاني شاهداً سلبياً استبدلنا فيه الـ DNA الجينومي بالحجم نفسه من الماء المقطر (شاهد خالي من الركيزة non-template control) وذلك لمراقبة التلوث.

4.2.3- الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز:

بعد الإنتهاء من تفاعل الـ PCR وللتأكد من وجود منتج التضخيم مزجنا 6µl من كل تفاعل مع 3 µl من موقى الترحيل Loding (30% glycerin, 0.01% w/w bromophenol blue) ووضعنا المزيج في بئر على هلامة الأغاروز 2% الحاوية على بروم الإيثيديوم. وضعنا في بئر آخر على نفس الهلامة مزيج مكون من 6µl من السلم الوزني الجزيئي حجمه 1kb (molecular weight marker,) (MWM) الذي يمثل الـ DNA المعياري (DNA Ladder, Fermentas) مع 3 µl من موقى الترحيل Loding، ثم أجرينا الرحلان الكهربائي في الموقى 1X TAE المؤلف من (Tris base 40 mM,) لمدة ساعة وتحت فرق كمون 100 فولت باستخدام جهاز الرحلان الكهربائي (Biorad midi electrophoresis). قرأنا بعد الإنتهاء من عملية الترحيل النتائج بواسطة جهاز توثيق الهلامات Gel doc الذي يعتمد على الأشعة فوق البنفسجية كما قارنا عصابات شدة الـ DNA الناتجة مع عصابات السلم الوزني الجزيئي من أجل تحديد الوزن الجزيئي لنواتج تفاعل الـ PCR والتأكد من تضخيم الشدفة المطلوبة.

5.2.3- السلسلة الآلية للـ DNA (DNA Sequencing):

يأخذ الـ DNA وهو الحمض الريبي النووي منقوص الأكسجين (deoxyribonucleic acid) شكلاً حلزونياً (helix) مزدوجاً، يتألف من سلسلتين متعاكستين تجتمعان معاً عبر روابط هيدروجينية ضعيفة ولكل سلسلة بنية هيكلية مكونة من نيكليوتيدات منقوصة الأوكسجين مرتبطة ببعضها بروابط فوسفاتية ثنائية الإستر، تختلف هذه النيكليوتيدات بنمط الأساس الآزوتي حيث يمكن أن يكون الأدينين ، الغوانين (هما من الأسس البورينية التي تحوي حلقتين نتروجينيتين)، التيمين، السيتوزين (هما من الأسس البيريميدينية التي تحوي حلقة نتروجينية واحدة)، وتحدد المعلومات الوراثية في سلسلة الـ DNA بنمط تتالي هذه الأسس. ترتبط الأسس الموجودة على كل سلسلة مع الأسس المقابلة لها على السلسلة الأخرى لتشكل حلقات ضمن الحلزون و لا يزدوج الأدينين إلا من التيمين برابطتين هيدروجينيتين في حين يزدوج الغوانين مع السيتوزين بثلاث روابط هيدروجينية (الشكل 13) ، وتعتبر الروابط الهيدروجينية ضعيفة نسبياً ففي درجات الحرارة العالية تتفصل سلسلتا الـ DNA نتيجة انصهار هذه الروابط وهذا ما يُعتمد عليه في التفاعل السلسلي للبوليميراز ، أما الروابط الإستيرية التي تجمع الهيكل الأساسي الحلزوني فتكون أقوى ولا تنصهر ولكن يمكن شطرها باستخدام أنزيمات مأخوذة من الجراثيم يمكن لها أن تقطع الهيكل الأساسي في مواضع محددة وتدعى أنزيمات الاقتطاع. يشكل ارتباط الأساس مع السكر مع الفوسفات النيكليوتيد و بالإضافة إلى كونها الكتل البنائية للـ DNA تعد النيكليوتيدات الحاملة لرابطين أو ثلاثة من الفوسفات مخازن هامة للطاقة الكيميائية وتجدر الإشارة إلى أن الصفة الحمضية للحموض النووية تعود إلى وجود استرات الفوسفات التي تعد حموض قوية نسبياً.



الشكل 13: بنية الحمض الريبي النووي منقوص الأكسجين الـ DNA

يوجد الـ DNA على شكل حلزون مزدوج يتألف من سلسلتين متوازيتين متعاكستين تكملان بعضهما بحيث يمكن استنتاج متوالية الأسس على أحد السلسلتين من متوالية الأسس على السلسلة الأخرى وتحمل كل سلسلة بمفردها المعلومات المطلوبة لتشكيل حلزون مزدوج يتميز بوجود أثلام صغيرة (Minor groove) و أثلام كبيرة (Major groove) كما هو موضح في A.

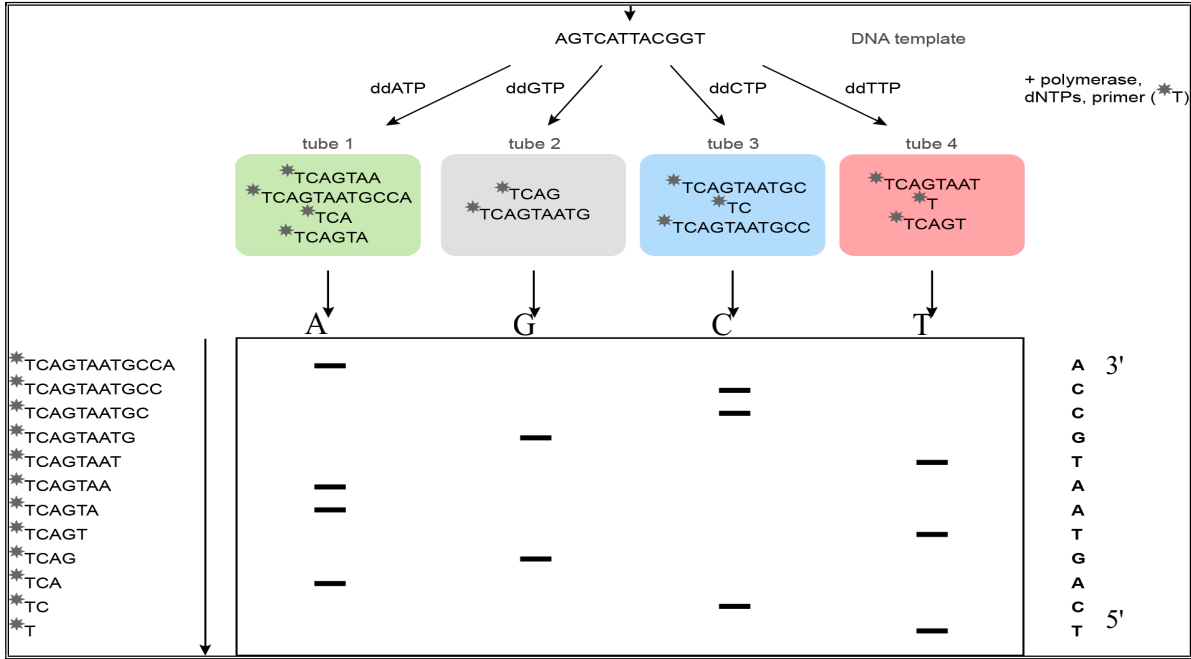
يتألف الهيكل الأساسي لمحيط حلزون الـ DNA من الريبوز منقوص الأكسجين متناوب مع الفوسفات وتكون الأسس الأزوتية مرتبطة مع الريبوز منقوص الأكسجين وتشكل حلقات الحلزون و يوجد في الـ DNA أربعة أسس أزوتية: السيتوزين (C) والثيمين (T) وهما من الأسس البيريميدينية التي تحوي حلقة نتروجينية واحدة و الأدينين (A) والغوانين (G) وهما من الأسس البورينية التي تحوي حلقتين نتروجينيتين ويرتبط الأدينين مع الثيمين برابطتين هيدروجينيتين في حين يرتبط الغوانين مع السيتوزين بثلاثة روابط هيدروجينية كما هو موضح في B.

1.5.2.3- سلسلة الـ DNA بطريقة سانجر التقليدية:

تعد قراءة سلسلة الـ DNA الطريقة المعيارية لتحديد ترتيب النكليوتيدات ضمن المادة الوراثية أي تحديد التسلسل الدقيق للأسس الأزوتية وهذا يمكننا من معرفة تسلسل المورثات و الكشف عن الطفرات النقطية التي تحدث على مستوى المورثة و تحديد نوع الطفرة بدقة. يعتبر العالم الإنكليزي سانجر (Sanger) من الأوائل في اكتشاف طريقة لسلسلة الـ DNA دعيت بطريقة سانجر وهي تعتمد على إضافة كمية من نكليوتيدات ثنائية منقوص الأكسجين (ddNTPs) إلى تفاعلات بلمرة الـ DNA، و تتميز هذه المركبات المعدلة عن (dNTPs) السوية بغياب الزمرة OH في الموقع '3 في جزئ سكر الريبوز مما لا يسمح بحصول أي ارتباط بنكليوتيدات لاحقة مما يؤدي إلى توقف بناء سلسلة الـ DNA عند هذا الحد وإنهاء البلمرة بضم نيكليوتيد ثنائي منقوص الأكسجين (Sanger et al., 1977).

اعتمد سانجر في طريقته على توزيع مزيج التفاعل على أربعة أنابيب منفصلة يحتوي كل أنبوب على الـ DNA المرصاف المطلوب قراءته و يكون على شكل سلسلة مفردة وبأدئة نوعية و أنزيم الـ DNA بوليميراز و dNTPs الأربعة وواحد من ddNTPs. في تفاعل البلمرة وبعد ارتباط البادئة ببداية منطقة الـ DNA يقوم الأنزيم ببناء سلسلة الـ DNA إلى أن يتم إضافة أحد النكليوتيدات ثنائية منقوص الأكسجين إلى النهاية '3 بشكل عشوائي مما يؤدي إلى توقف إضافة نكليوتيد جديد وبالتالي سنحصل على شدة متفاوتة في أطوالها في نفس الأنبوب بسبب اختلاف مكان إضافة ddNTPs إلى السلسلة الجديدة، يتم فصل الشدة بإجراء الرحلان الكهربائي وذلك بعد وضع محتوى كل أنبوب في بئر منفصل على هلامة بولي أكريلاميد مُمسَخة وهي تحوي عوامل تحافظ على بقاء شدة الـ DNA مفردة السلسلة، وفي النهاية يتم قراءة تسلسل نكليوتيدات الـ DNA على اعتبار أن الشدة تتوزع حسب حجمها من

الأطول إلى الأقصر بحيث يكون الاختلاف في نكليوتيد واحد كافيا لفصل الشدفة عن الشدفة التي تزيد عليها بنكليوتيد وعن الشدفة التي تنقص عنها بنكليوتيد (الشكل 14) .



الشكل 14: طريقة سانجر التقليدية لسلسلة الـ DNA

تعتمد هذه الطريقة على إضافة نكليوتيدات ثنائية منقوصة الأكسجين (ddNTPs) إلى تفاعلات البلمرة وتتميز ddNTPs بغياب جذر الـ OH في الموقع 3' في جزئ سكر الريبوز، يتألف تفاعل سانجر من سلسلة الـ DNA المرصاف (template) وبادئة (primer) واحدة مشعة ترتبط ببداية سلسلة الـ DNA و أنزيم البوليميراز و dNTPs الأربعة وواحد فقط من ddNTPs وهو في مثالنا ddATP في الأنبوب الأول و ddGTP في الأنبوب الثاني و ddCTP في الأنبوب الثالث و ddTTP في الأنبوب الرابع، يقوم أنزيم البوليميراز ببناء سلسلة جديدة و عندما يقوم بإدخال أحد النكليوتيدات ثنائية منقوصة الأكسجين يتم التوقف عن إضافة نكليوتيد جديد آخر لغياب جذر الـ OH مما يؤدي إلى إنهاء التفاعل بشكل عشوائي، نلاحظ أن كل أنبوب يحتوي على شدة تنتهي بنفس الأساس ولكن مختلفة الأطوال وذلك بسبب اختلاف المكان الذي يتم فيه إدخال الـ ddNTPs في السلسلة الجديدة ، بعد انتهاء التفاعل يوضع محتوى كل أنبوب في بئر منفصل على هلامة بولي أكريلاميد ويتم فصل الشدفة وفقاً لحجمها بواسطة الرحلان الكهربائي ثم يوضع فوق الهلامة فيلم حساس للأشعة لمدة معينة وبعد تحميض الفيلم تظهر الشدفة على شكل عصابات سوداء ويتم قراءة التسلسل النكليوتيدي من الأسفل إلى الأعلى فنحصل على تسلسل السلسلة المتممة للـ DNA المرصاف وهو في المثال .TCAGTAATGCCA

2.5.2.3- السلسلة الآلية للـ DNA باستخدام الرحلان الكهربائي ضمن الأنابيب الشعرية:

تعتبر طريقة سانجر التقليدية في سلسلة الـ DNA مشابهة لعملية التضاعف الطبيعي للـ DNA التي تحدث في كل الخلايا كما تعتبر الأساس الذي انطلقت منه الطريقة الحديثة وهي السلسلة الأوتوماتيكية للـ DNA. حيث مكن التطور التقني لعلم الحاسوب من أتمتة تحليل الرحلان في طريقة سانجر بسهولة و دقة أكثر كما مكن تطور علم الكيمياء الحيوية من وسم الأسس النكليوتيدية الأربعة (ddNTPs) بألوان متفورة مختلفة و خلط الأسس الموسومة مع بعضها في تفاعل واحد وتمرير ناتج التفاعل على قارئ الكروني قادر على الفصل بين ألوان الأسس النكليوتيدية المختلفة. وبذلك أصبحت طريقة السلسلة الأوتوماتيكية للـ DNA شائعة في معظم المخابر و مراكز الأبحاث الجزيئية لأنها مؤتمتة سريعة وأكثر دقة كما إنها لا تستخدم المواد المشعة أما خطوات العمل بهذه الطريقة فهي كالتالي:

1.2.5.2.3- تنقية شدة الـ PCR:

يتميز تفاعل سلسلة الـ DNA بوجود بادئة واحدة بالإضافة إلى أن تراكيز الـ dNTPs والـ ddNTPs يجب أن تكون ضمن مجال معين، وفي دراستنا العملية ضخمنا في مرحلة سابقة الإكزون الأول للمورثة BMP15 كشدفة واحدة و الأكزون الثاني كثلاثة شدة PCR (الفقرة 1.3.2.3)، كما ضخمنا الإكزون الأول للمورثة GDF9 أيضاً كشدفة واحدة و الأكزون الثاني كثلاثة شدة PCR (الفقرة 2.3.2.3). وبما أن تفاعل الـ PCR يحوي فائض من البادئات و النكليوتيدات فقد تمت معالجته وتنقيته باستخدام طاقم جاهز (ExoSAP-IT,USB,Affymetrix) مؤلف من أنزيم الإكزونوكلياز (Exonuclease I) الذي يقوم بتهضيم البادئات و أنزيم الفوسفاتاز القلوي (Shrimp Alkaline Phosphatase) لتهضيم النكليوتيدات، أما طريقة تحضير المزيج فهي: وضعنا في أنبوب سعة 0.2 مل 5 µl من شدفة الـ PCR و 2 µl من الطاقم الجاهز وليتم التفاعل حضنا بدرجة حرارة 37° لمدة 15 دقيقة ثم رفعنا درجة

الحرارة إلى 80° لمدة 15 دقيقة بهدف تعطيل عمل الأنزيمات.

2.2.5.2.3- تفاعل السلسلة الحلقي:

يعتمد تفاعل السلسلة الحلقي على استخدام محلول مزيج جاهز (Big Dye Terminator v3.1) مكون من النكليوتيدات dNTPs و buffer و أنزيم تاك بوليميراز (Taq-polymerase) المقاوم للحرارة (تستخدم طريقة سانجر التقليدية أنزيم T4-DNA- polymerase الحساس للحرارة)، كما يحوي المزيج النكليوتيدات ثنائية منقوص الأكسجين (ddNTPs) الأربعة موسومة بزمر كيميائية متفلورة تختلف عن بعضها بطول موجات الإصدار الخاصة بها بحيث يتم رسم كل واحد من الـ ddNTPs بزمرة متفلورة واحدة و يمكن زيادة إشارة الفلورة عن طريق تكرار تفاعل السلسلة الحلقي نفسه من 30 إلى 40 مرة. من أجل البدء بالتفاعل، وحسب تعليمات الصانع، يوضع في أنبوب سعة 0.2 مل البادئة (إما Forward أو Reverse بتركيز 300nM) و 2µl من شدة الـ PCR الذي تمت تنقيته في المرحلة السابقة و 8µl من محلول المزيج الجاهز ويُضاف الماء المقطر لنكمل الحجم النهائي إلى 20 µl ثم يوضع الأنبوب في جهاز الـ PCR وفق البرنامج التالي:

1- تسخين أولي بدرجة حرارة 95°C لمدة 4 دقائق.

2 - Denaturation (التمسخ) بدرجة حرارة 96° لمدة 10 ثوانٍ.

3 - Annealing (ربط البادئات) بدرجة حرارة 50° لمدة 5 ثوانٍ.

4 - Extension (استطالة البادئات) بدرجة حرارة 60° لمدة 4 دقائق.

5 - عدد الدورات 30 دورة حيث تكرر الخطوات 2 و 3 و 4 (30 مرة).

عادةً تكون درجة الحرارة في مرحلة استطالة البادئات 72°، ولكن على اعتبار استخدام نكليوتيدات

موسومة بمادة متفلورة فإن درجة الحرارة الفعالة المعتمدة لعمل الأنزيم تاك بوليميراز هي 60°.

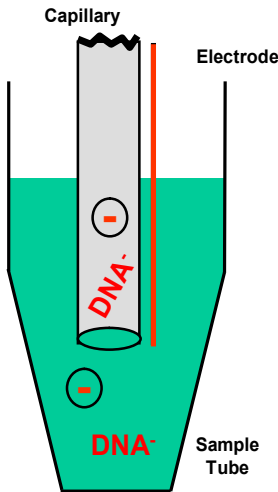
3.2.5.2.3- تنقية شدف تفاعل السلسلة الحلقي:

بعد انتهاء تفاعل السلسلة الحلقي يتم التخلص من الفائض من ddNTPs الذي يشوش عملية القراءة بسبب تشكيله قمم فلورة قوية و غير نوعية وذلك عن طريق استخدام طاقم جاهز (Centri-spin- Column, Applied Biosystems)، مكون من بودة السيفادكس التي توضع بمقدار 1g في عمود بلاستيكي ثم يضاف إليها 600 µl من الماء المقطر وتترك لمدة نصف ساعة ثم تُثقل لإزالة الماء الزائد لنحصل على حبيبات السيفادكس حسب تعليمات الصانع. تتم عملية التنقية بوضع 20 µl من نتاج تفاعل السلسلة الحلقي على سطح حبيبات السيفادكس ثم تثقل العمود بسرعة 300 rpm لمدة دقيقتين و أخيراً نقل النتاج إلى أنبوب ابندورف سعة 1.5 مل، ومن الجدير ذكره أن حبيبات السيفادكس تسمح بمرور الجزيئات الكبيرة عبرها في حين تمنع مرور الجزيئات الصغيرة لاحتوائها على مسامات مجهرية.

4.2.5.2.3- فصل شدف الـ DNA بواسطة الرحلان الكهربائي ضمن الأنبوب الشعري:

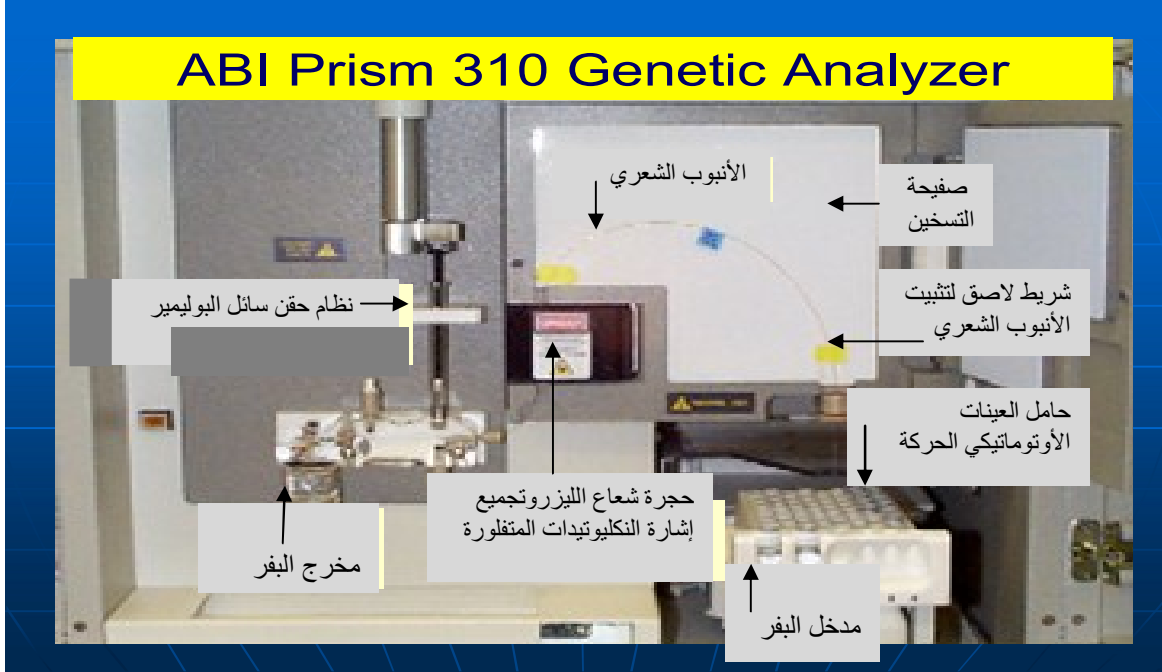
يعمل جهاز السلسلة الأوتوماتيكية (ABI PRISM 310, Applied Biosystems) وفقاً لمبدأ الرحلان الكهربائي (Electrophoresis)، و ذلك من خلال حقن شدف الـ DNA المتفلورة السالبة الشحنة داخل الأنبوب الشعري (capillary) الذي يحتوي على بوليمير (POP- 4) وهو الوسط الذي يتم بداخله عملية الفصل (الشكل 15) حيث تهجر الشدف الأصغر بشكل أسرع من تلك الأكبر. تصدر شدف الـ DNA المتفلورة موجات ضوئية مختلفة الأطوال نتيجة تعرضها لشعاع ليزر عند مرورها أمام نافذة شفافة موجودة في نهاية الأنبوب الشعري، يتم التقاط الموجات الضوئية الخاصة بكل لون عن طريق آلة تصوير فائقة الحساسية (الشكل 16) تنقلها بعد ذلك إلى برنامج خاص على الحاسوب (Sequencing Analysis v5.4, Applied Biosystems) يقوم بتحويل هذه البيانات إلى أربع قمم

(Peaks) مختلفة الألوان كل لون حسب طول الموجة الصادرة عنه بحيث تقابل كل قمة أساس ضمن تسلسل الـ DNA على النحو التالي: يظهر الأدينين (A) باللون الأخضر، التيمين (T) باللون الأحمر، السيتوزين (C) باللون الأزرق، الغوانين (G) باللون الأسود، ونحصل في النهاية على تسلسل النكليوتيدات ضمن شدة الـ DNA المطلوبة والتي يتم مقارنتها مع تسلسل الـ DNA المرجعي بهدف كشف الطفرات. أما طريقة تحضير المزيج من أجل الرحلان الكهربائي الشعري فكانت على النحو التالي: وضعنا في أنبوب سعة 0.5 مل مقدار 10 µl من نتاج تفاعل السلسلة الحلقية المنقى ثم أضفنا 10 µl من فورم-أميد عالي النقاوة (Hi-Di formamide, Applied Biosystems) بهدف تسيخ الـ DNA وتم حضن الأنبوب بدرجة حرارة 96°C مدة 5 دقائق ثم وضعناه مباشرة على الثلج، بعد ذلك نقلنا الأنبوب إلى حامل العينات الموجود بجهاز السلسلة الأتوماتيكية كي تبدأ عملية الرحلان وفق الشروط التالية: تم حقن العينة كهربائياً ضمن أنبوب شعري بفرق كمون 2.5kV لمدة 45 ثانية ثم رحلت العينة كهربائياً مدة 45-90 دقيقة بفرق كمون 14kV وبعد الإنتهاء تمت معالجة البيانات بواسطة برنامج خاص على الحاسوب ليتم تحديد تسلسل الأسس في شدة الـ DNA.



الشكل 15: حقن شدة الـ DNA داخل الأنبوب الشعري

تعتبر الطريقة الحركية الكهربائية الطريقة المثلى لحقن عينات نواتج تكثير المواقع الوراثية داخل الأنبوب الشعري، تشتمل عملية الحقن على نقل الأيونات السالبة الشحنة (شدة الـ DNA) عن طريق القوة الحركية الكهربائية عندما يسري التيار الكهربائي من القطب السالب إلى القطب الموجب، بجانب الأنبوب الشعري يوجد طرف القطب السالب (Electrode) الذي يعمل على جذب أيونات الحمض النووي السالبة إلى الأنبوب.



الشكل 16 : جهاز السلسلة الآلية و أقسامه المختلفة.

يعمل الجهاز وفقاً لمبدأ الرحلان الكهربائي حيث يتم ترحيل شدة الـ DNA المتفلورة المختلفة الأطوال ضمن الأنبوب الشعري ولدى سقوط شعاع الليزر على هذه الشدة تصدر كل واحدة طيف خاص يختلف تبعاً للزمرة الكيميائية المتفلورة الواسمة للنكليوتيدات ثنائية منقوص الأكسجين (ddNTPs) التي يؤدي وضعها في شدة الـ DNA إلى إنهاء تفاعل البلمرة، في النهاية يتم تحليل هذه البيانات بواسطة برنامج خاص على الحاسوب وقراءة تسلسل النكليوتيدات.

3.3- التحليل الإحصائي

تم إدخال البيانات إلى برنامج (Excel Microsoft Office 2007)، أجرينا التحاليل الإحصائية باستخدام البرنامج الإحصائي (SPSS, version 17.0) من أجل حساب الإنحراف المعياري SD (Std.Deviation) لأعمار المريضات و الشواهد، و لتقدير احتمال وجود فروق معنوية (significant differences) بين عينة المرضى والعينة الشاهدة لكل من التغيرات الوراثية المشاهدة و ارتباطها مع مرض الـ POF استخدمنا الإختبار Chi-squared لإيجاد قيمة p (p-value) بحيث تكون قيمة $P < 0.05$ ذات معنى إحصائي (statistically significant).

4.3- المواد و التجهيزات المستخدمة

1.4.3- المحاليل و المواد المستخدمة: تم استعمال المواد التالية من المصادر المشار إليها في الجدول رقم 6 كما يلي:

الجدول 6: أسماء المواد المستخدمة في العمل واسم الشركة المنتجة

اسم الشركة المنتجة	اسم المادة
Biochrom-ألمانيا	وسط زرعى صناعى كامل Chromosome medium B
Biochrom-ألمانيا	كولشيسين (10 µg/ ml in PBS)
Biochrom-ألمانيا	تريسين بودرة (1/250)
Merck - ألمانيا	ملون غيمزا
Riedel - ألمانيا	كلوريد الصوديوم
BDH - ألمانيا	سيترات ثلاثية الصوديوم
Merck - ألمانيا	فوسفات ثنائية الصوديوم

ألمانيا - Merck	فوسفات أحادية البوتاسيوم الحامضية KH_2PO_4
ألمانيا -BDH	كلوريد الصوديوم NaCl
ألمانيا - Riedel	كلوريد البوتاسيوم
ألمانيا - Merck	حمض الخل الثلجي
لتوانيا -Frementas	أنزيم تهضيم البروتين Proteinase K
ألمانيا - Merck	ايتانول مطلق
ألمانيا -Applichem	Tris-HCL
ألمانيا -Applichem	Na-EDTA
إيطاليا -Euroclone	Sodium Dodecyl Sulfate
ألمانيا -Applichem	محلول موفي TAE
إيطاليا -Euroclone	أسيتات الصوديوم $C_2H_3NaO_2$ (3M)
ألمانيا -Applichem	فينول - Tris
ألمانيا -Qiagene	طاقم جاهز لعزل الـ DNA (كيت)
	بادئات (Primers) عالية النقاوة HPLC
أميركا -Applied Biosystems	مزيج جاهز للـ PCR (AmpliTaq Gold PCR Master Mix)
فرنسا -Eurobio	هلامة (Agarose)
ألمانيا -Qiagene	طاقم جاهز لتنقية منتج الـ PCR
لتوانيا -Frementas	عيارى للوزن الجزيئي للدنا - DNA molecular weight
إيطاليا -Euroclone	طاقم أنزيم الـ Taq
أميركا -Applied Biosystems	طاقم خاص بسلسلة الدنا Big day Terminator v3.1 cycle sequencing kit
انكلترا -GE Healthcare	أنزيم خاص بتنظيف منتج الـ PCR من أجل السلسلة Exo-Star 1- step
ألمانيا -Qiagene	أعمدة تنقية من أجل السلسلة DyeEx 2.0 spin

2.4.3- الأدوات: أجري العمل باستخدام الأدوات التالية :

- أنابيب سحب دم معقمة تحوي على مضاد تخثر K3 EDTA (Vacuette 4-9 ml)
- ممصات بلاستيكية سعة 3 مل معقمة (Kima- ايطاليا).
- ممصات و رؤوس ممصات قياس من 5 إلى 25 ميكروليتر.
- ممصات و رؤوس ممصات قياس من 20 إلى 100 ميكروليتر.
- ممصات و رؤوس ممصات قياس من 100 إلى 500 ميكروليتر.
- شرائح زجاجية مجهرية نظيفة.
- حوامل شرائح زجاجية مجهرية.
- أنابيب تثقل ذات قعر مخروطي سعة 15مل (TPP, sweizerland).
- أنابيب بلاستيكية معقمة 2 مل ، 1.5 مل ، 0.5 مل (Eppendorf - ألمانيا).
- حامل الأنابيب 15 مل (TPP, sweizerland).
- حامل الأنابيب 0.5 مل (Applied Biosystem - أميركا).
- حامل الأنابيب 1.5 مل (TPP, sweizerland).
- أنابيب PCR 0.2 مل من شركة (Biobasec - كندا) .
- حامل الأنابيب PCR 0.2 مل (TPP, sweizerland).
- أنابيب PCR ثمانية 0.2 مل PCR strip (Biobasec - كندا).
- كفوف لاتكس (DeltaLab) .

3.4.3- التجهيزات المستخدمة: تم العمل على الأجهزة المشار إليها في الجدول رقم 7 كما يلي:

الجدول 7: أسماء التجهيزات المستخدمة في العمل واسم الشركة المنتجة

اسم الجهاز	المواصفات والشركة المنتجة
خيمة زرع عقيمة	Gelaire-TC60 - ايطاليا
معقمة جافة	Memmert - UM500 - ألمانيا
معقمة رطبة	Amesco - Eagle Ten - أميركا
مثقلة	Eppendorf 14500 rpm - ألمانيا
ميزان الكتروني رقمي (0,0001 غرام)	Sartorius - A 210 P - ألمانيا
هزاز أنابيب مخبرية	Reamix : 2789 - Assistant - ألمانيا
حمام مائي قابل للضبط بشكل دقيق	Grant - ألمانيا
مجهر مع نظام تصوير ضوئي وتضاد الأطوار	Leica-Mirostar IV Diastar - ألمانيا
محلل الإنقسامات الأوتوماتيكي مزود ببرنامج Chantal	Leica - ألمانيا
جهاز ترحيل الهلامات	Bio-Rad - أميركا
جهاز توثيق الهلامة Gel documentation system	Bio-Rad - أميركا
جهاز PCR	Techne TC-512 - المملكة المتحدة
جهاز سلسلة أوتوماتيكي (ABI Prism 310 Genetic Analyzer)	Applied Biosystems - أميركا
حواضن الكترونية	Eppendorf - ألمانيا
ممصات دقيقة Micropipete	Eppendorf - ألمانيا
خيمة كيميائية Chemical hood	Telstar - اسبانيا
خيمة PCR	Telstar - اسبانيا
جهاز قياس تركيز الـ DNA	Amersham

الفصل الرابع

النتائج

4- النتائج

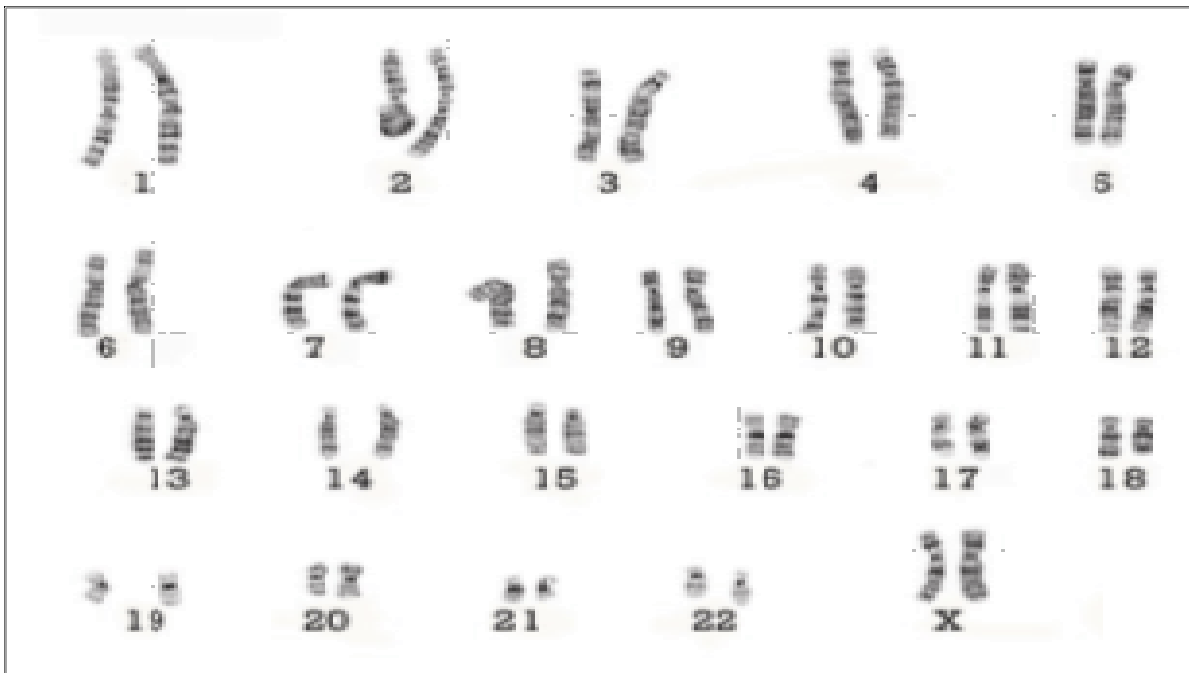
يضم الجدول رقم 8 ملخصاً للنتائج التي حصلنا عليها في دراستنا عن طريق سلسلة المناطق المرمزة في المورثتين *BMP15* و *GDF9* عند 80 مريضة مصابة بقصور المبيض المبكر وعند 200 شاهد على النحو التالي:

الجدول 8: ملخص لنتائج سلسلة المناطق المرمزة في المورثتين *BMP15* و *GDF9*

عدد الشواهد	عدد المريضات	الموقع	التغير الوراثي	المورثة
200/1	80/1	الإكزون الأول	Asn103Ser	<i>BMP15</i>
-	80/1	الإكزون الثاني	Ala180Thr	
-	80/1	الإكزون الثاني	263 insLeu [+]Ser284Ser	
200/3	80/2	الإكزون الثاني	Ser284Ser	
-	80/1	الإنترون [+] الإكزون الثاني	851+13G>A جديد [+]Ser284Ser	
-	80/1	الإكزون الثاني	Asn177 Lys جديد	<i>GDF9</i>
-	80/1	الإكزون الثاني	Asp411Asn جديد	
200/15	80/17	الإكزون الثاني	Thr149Thr	
200/1	80/1	الإكزون الثاني	Glu182Glu	
-	80/3	الإكزون الثاني	Thr149Thr [+]Glu182Glu	

1.4- الدراسة الوراثية الخلوية و تحديد الطابع النووي للعينات المدروسة:

تمّت دراسة الطابع النووي لـ 80 امرأة يعانين من قصور المبيض المبكر POF بهدف استبعاد جميع المريضات اللاتي لديهن زيوغ صبغية وخصوصاً متلازمة تيرنر ذلك أن هذه الإضطرابات الوراثية تؤدي إلى قصور المبيض المبكر وتسبب العقم. و قد أظهرت جميع حالات الـ POF صبغة صبغية طبيعية (46,XX) استناداً إلى تقانة التعصيب التريسيني والتلوين بغيمازا (GTG- banding) العالية الدقة (الشكل 17).



الشكل 17: الصيغة الصبغية السوية المدروسة بطريقة عصاب G باستخدام التريسين والتلوين بغيمازا (GTG- banding) عند إحدى مريضات الـ POF.

تحتوي نوى الخلايا الجسمية في الإنسان في الحالة السوية على 46 صبغياً أي 23 زوجاً منها 22 زوج مسؤول عن الصفات الجسمية و زوج واحد مسؤول عن الصفات الجنسية و تحديد جنس الفرد وهو الزوج XX عند الأنثى و xy عند الذكر، وقد تم تصنيف الصبغيات في 7 مجموعات وفقاً لطول الصبغي و موقع الجزء المركزي (centromere) ونمط عصاب G الناتجة عن التلوين كما تم ترقيم الصبغيات حيث يأخذ كل زوج صبغي رقم معين وتهدف دراسة الطابع النووي إلى كشف حالات الزيوغ الصبغية .

2.4- الدراسة السريرية:

ضمت عينة الدراسة 80 امرأة تعاني من قصور المبيض المبكر POF موزعة على النحو التالي:

55 امرأة لديهن انقطاع طمث أولي PA و 25 امرأة لديهن انقطاع طمث ثانوي SA، بلغ متوسط عمر النساء 23.26 ± 4.32 عاماً و تراوحت الأعمار بين 18-38 عاماً ، أظهرت جميع المريضات في كل حالات الـ POF ارتفاعاً في مستوى هرمون الـ FSH حيث تراوحت قيمته بين 40 IU/L - 90 IU/L مع متوسط بلغ 50 IU/L ، وتبين نتيجة الفحص الذي قام به المختصون باستخدام الأمواج فوق الصوتية (ايكو) وجود مبايض شريطية عند بعض المريضات ويوضح الجدول رقم 9 الخصائص السريرية لمريضات الـ POF الحاملات للتغيرات الوراثية.

أما بالنسبة للشواهد فكان لديهن دورة حيضية منتظمة (28-32 يوم) ، تراوحت أعمارهن بين 25-44 عاماً مع متوسط بلغ 29.25 ± 6.4 عاماً، كان مستوى الهرمون المُنبَّه للجريب الـ FSH طبيعي تراوحت قيمته بين 3 IU/L - 10 IU/L .

الجدول 9: الخصائص السريرية لمريضات الـ POF الحاملات للتغيرات الوراثية

رقم المريضة	النمط الظاهري	عمر انقطاع الحيض	مستوى هرمون الـ FSH	معلومات إضافية
72	PA	-	50 IU/L	مبيضان شريطيان
41	PA	-	55 IU/L	مبيضان شريطيان
22	PA	-	65 IU/L	مبيضان شريطيان
35	PA	-	47 IU/L	-
50	PA	-	73 IU/L	-
16	SA	20 عاماً	79 IU/L	مبيضان بدون جريبات
32	PA	-	56 IU/L	رحم صغير
69	PA	-	65 IU/L	-
6	PA	-	52 IU/L	مبيضان صغيران
49	PA	-	68 IU/L	مبيضان صغيران
60	PA	-	58 IU/L	مبيضان صغيران
19	SA	32 عاماً	66 IU/L	-
11	SA	29 عاماً	59 IU/L	-
3	SA	26 عاماً	77 IU/L	-
55	PA	-	54 IU/L	-
<u>14 مريضة</u>	PA	-	<u>40 IU/L <</u>	-

3.4- الكشف عن الطفرات في المورثة *BMP15*:

ضخنا الإكزونين الأول و الثاني للمورثة *BMP15* بواسطة التفاعل السلسلي للبوليمراز PCR باستخدام بادئات نوعية لكل إكزون و كانت نتائج التضخيم كالتالي:

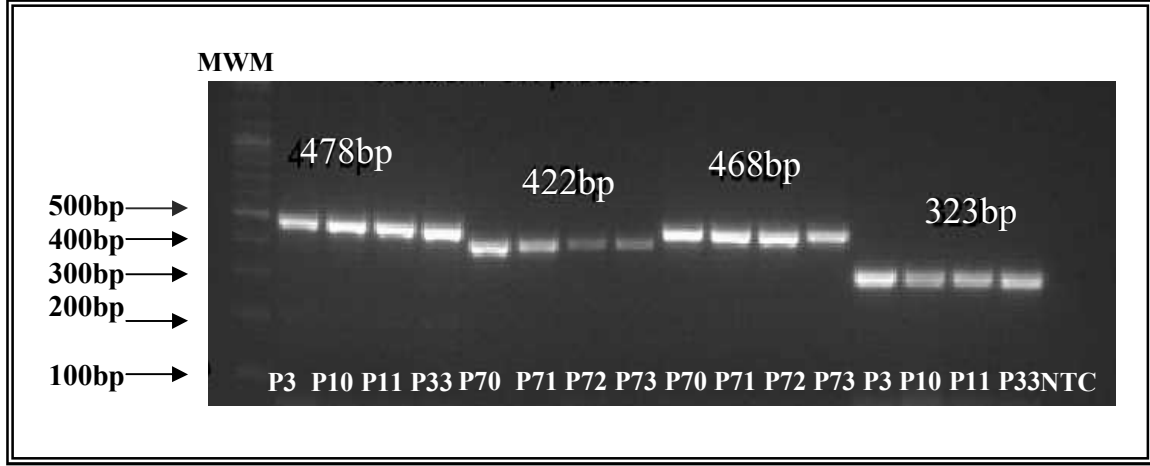
1.3.4- تضخيم الإكزون الأول للمورثة *BMP15*:

ضخنا الإكزون الأول الذي يبلغ طوله 328 زوجاً من الأسس كشدفة PCR واحدة حجمها 478bp باستخدام البادئتين 1 و 2 (الشكل 15).

2.3.4- تضخيم الإكزون الثاني للمورثة *BMP15*:

يبلغ طول الإكزون الثاني 851 زوجاً من الأسس وقد ضخمناه كثلاث شدف PCR وفق مايلي:

- ضخمت الشدفة الأولى باستخدام البادئتين 3 و 4 وكان حجم شدفة الـ PCR الناتجة 422bp.
 - تم تضخيم الشدفة الثانية باستخدام البادئتين 5 و 6 وكان حجم الشدفة الناتجة 468 bp.
 - أما الشدفة الثالثة فقد ضخمت باستخدام البادئتين 7 و 8 وكان حجم الشدفة الناتجة 323bp.
- ويوضح (الشكل 18) صورة الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل الـ PCR عند بعض المريضات.



الشكل 18: صورة الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز 2% لنواتج تفاعل تضخيم الإكزون الأول للمورثة *BMP15* كشفة واحدة (478bp) والإكزون الثاني كثلاث شدف (422bp، 468bp، 323bp)، ونلاحظ ظهور جميع الشدف بالحجم المطلوب عند جميع المريضات بينما لم يظهر ناتج لتفاعل الـ PCR عند الشاهد السلبي وذلك يدل على عدم وجود تلوث (يدل الرمز P على المريضة ورقمها، يدل الرمز NTC على الشاهد الخالي من الركيزة، ويدل الرمز MWM على السلم الوزني الجزيئي)

3.3.4- نتائج قراءة السلسلة الآلية للإكزونين الأول و الثاني في المورثة *BMP15*

قمنا بإجراء سلسلة للمناطق المرمزة في المورثة *BMP15* للكشف عن وجود طفرات وتغيرات محتملة و قد وجدنا طفرة نقطية معروفة وهي طفرة مُعْطَطة عند مريضة واحدة وثلاثة تغيرات عند أربع مريضات تم وصفهم في دراسات سابقة كتعدد شكلي (Polymorphism) وأيضاً وجدنا تغير واحد جديد (novel) في الإنترون ظهر عند مريضة واحدة ، كما لاحظنا بعض هذه التغيرات في عدد من عينات الشواهد وقد تم تصنيف النتائج كالتالي:

1.3.3.4- الطفرة *Ala180Thr*: وهي طفرة مُعْطَطة ظهرت في الإكزون الثاني عند مريضة واحدة ولم تظهر عند الشواهد.

2.3.3.4- التغير *Asn103Ser*: وهو تعدد شكلي وحيد النيكليوتيد (SNP) ظهر في الإكزون الأول عند مريضة واحدة وعند شاهد واحد.

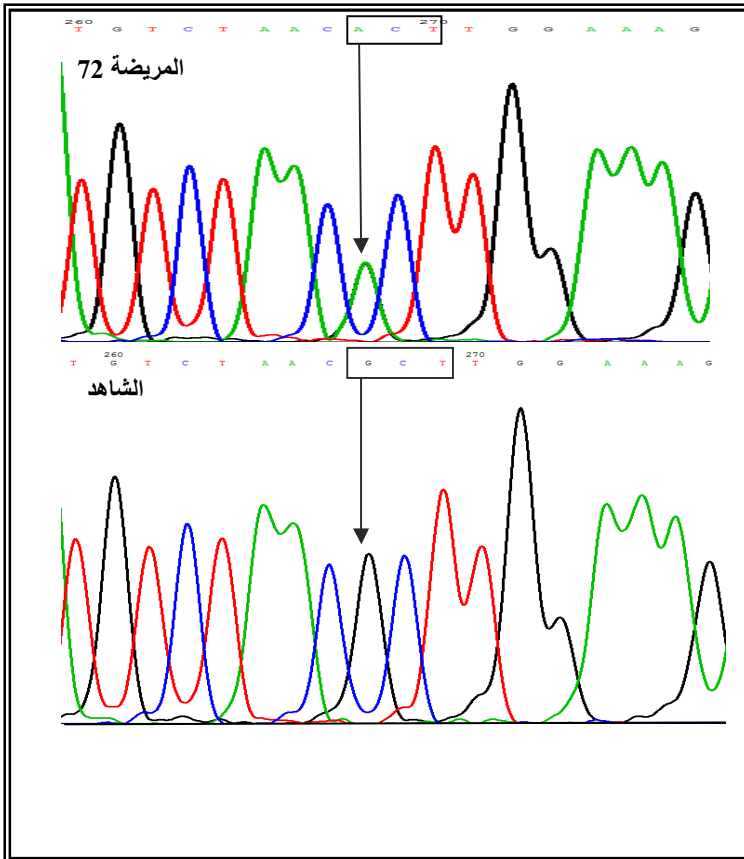
3.3.3.4- التغير *263 insLeu*: وهو تعدد شكلي ظهر في الإكزون الثاني عند مريضة واحدة ولم يظهر عند الشواهد، وكان مترافقاً مع التغير *Ser284Ser* .

4.3.3.4- التغير *Ser284Ser*: وهو صامت ظهر في الإكزون الثاني عند مريضتين وعند ثلاثة شواهد.

5.3.3.4- التغير الجديد *c.851+13G>A*: ظهر في الإنترون عند مريضة واحدة ولم يظهر عند الشواهد، وكان مترافقاً مع التغير *Ser284Ser* .

1.3.3.4- الطفرة Ala180Thr

وجدنا هذه الطفرة المعروفة بحالة تغاير اللواقح عند المريضة 72 ولم نجدها في أي من عينات الشواهد و ذلك من خلال قراءة تسلسل الـ DNA في شدة الـ PCR الأولى من الإكزون الثاني و التحقق منه (يتم التأكد من الإسم الصحيح للأساس من خلال مشاهدة قمة الفلورة الموافقة له) ومقارنته بالتسلسل المرجعي المأخوذ من قاعدة البيانات الـ NCBI (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) وكذلك مقارنته بالتسلسل الموافق لبعض عينات الشواهد، وقد حصلت هذه الطفرة (c.538G>A(p.Ala180Thr) في الكودون 180 وتم فيها استبدال الأدينين بالغوانين مما أدى إلى استبدال الحمض الأميني الثريونين Threonine بالألانين Alanine ، تميزت المريضة 72 بانقطاع الطمث الأولي PA ومستوى مرتفع من هرمون الـ FSH (50 IU/L) كما أظهر الفحص وجود رحم طفولي و مبايض شريطية (الشكل 19)

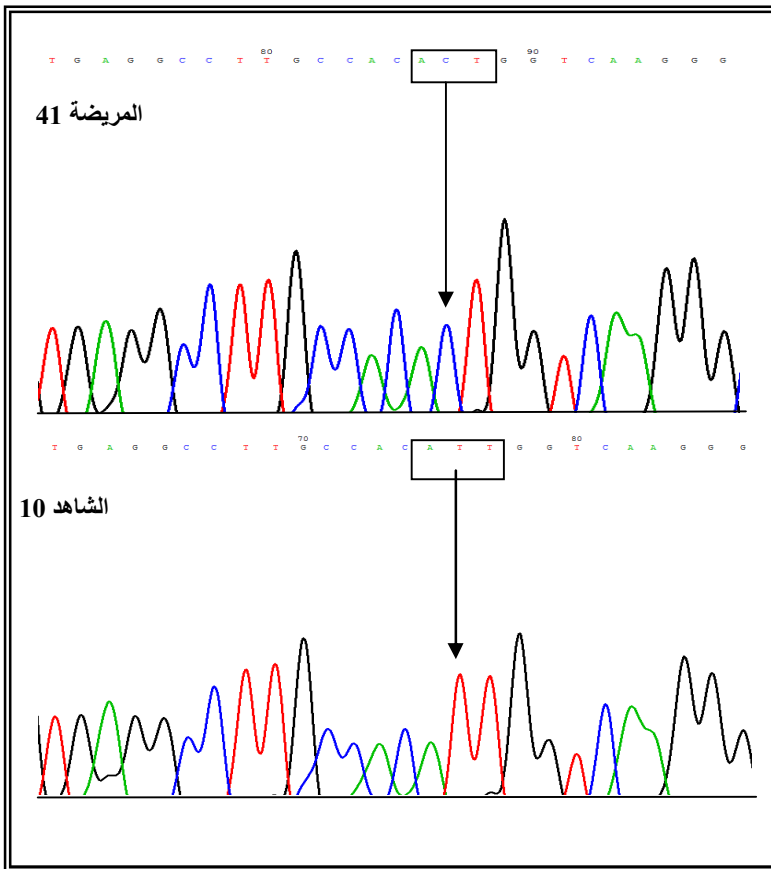


الشكل 19: الطفرة Ala180Thr

نلاحظ قمم الفلورة الناتجة عن سلسلة الـ DNA في موقع التغير باستخدام البادئة الأمامية 3 حيث يظهر أنه في المريضة 72 تم استبدال الأدينين A بالغوانين G في الكودون 180 المحاط بمسقطيل و يشير السهم إلى موضع التغير مقارنةً بالشاهد السوي.

2.3.3.4- التغير Asn103Ser

وجدنا هذا التغير المعروف بحالة تماثل اللواقح في الإكزون الأول للمورثة *BMP15* عند المريضة 41 و الشاهد 70 وذلك من خلال قراءة تسلسل الـ DNA والتحقق منه ومقارنته بالتسلسل المرجعي المأخوذ من قاعدة البيانات الـ NCBI وكذلك مقارنته بالتسلسل الموافق لبعض عينات الشواهد، وقد حصل هذا التغير في الكودون 103 (p.Asn 103Ser) $c.308A>G$ وتم فيه استبدال الغوانين بالأدينين مما أدى إلى استبدال الحمض الأميني السيرين Serine بالأسبارجين Asparagine ، تميزت المريضة 41 بانقطاع الطمث الأولي PA ومستوى مرتفع من هرمون الـ FSH (55 IU/L) كما أظهر الفحص وجود مبايض شريطية (الشكل 20).

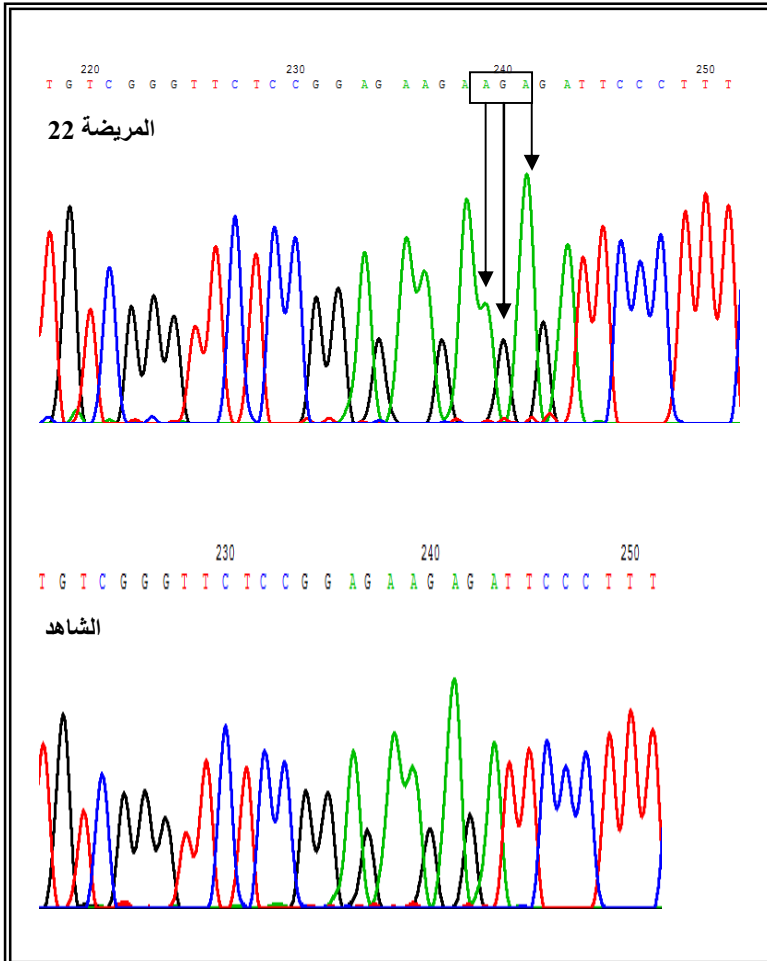


الشكل 20: التغير Asn103Ser

نلاحظ قمم الفلورة الناتجة عن سلسلة الـ DNA في موقع التغير باستخدام البادئة العكسية 2 حيث يظهر أنه في المريضة 41 تم استبدال السيتوزين C بالتيمين T في الكودون 103 المحاط بمستطيل الذي يرمز الحمض الأميني غوانين و يشير السهم إلى موضع التغير مقارنةً بالشاهد السوي

3.3.3.4- التغيير 263 insLeu

وجدنا هذا التغيير المعروف عند المريضة 22 ولم نجده في أي من عينات الشواهد وذلك من خلال قراءة تسلسل الـ DNA في شدة الـ PCR الثانية من الإكزون الثاني ومقارنته بالتسلسل المرجعي المأخوذ من قاعدة البيانات الـ NCBI وكذلك مقارنته بالتسلسل الموافق لبعض عينات الشواهد، و تم في هذا التغيير (c.788insTCT(p.263insLeu) إدخال ثلاثة أسس نكليوتيدية جديدة إلى سلسلة الـ DNA هم التيمين والسيتوزين و التيمين على التوالي مما أدى إلى إضافة الحمض الأميني لوسين Leucine في الكودون 263 تميزت المريضة 22 بانقطاع الطمث الأولي ومستوى مرتفع من هرمون الـ FSH (65 IU/L) كما أظهر الفحص وجود مبايض شريطية (الشكل 21).

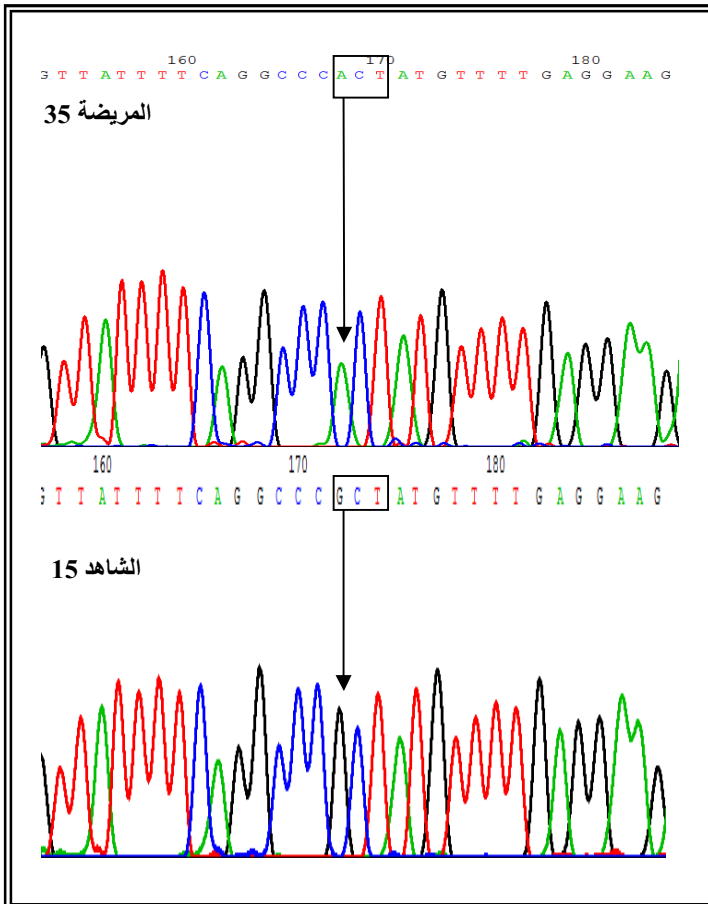


الشكل 21: التغيير 263 Ins Leu

نلاحظ قمم الفلورة الناتجة عن سلسلة الـ DNA في موقع التغيير باستخدام البادئة العكسية 6 حيث يظهر أنه في المريضة 22 تم إدخال ثلاثة أسس نكليوتيدية جديدة هم الأدينين A و الغوانين G و الأدينين A على التوالي مما أدى إلى إضافة الكودون 263 المحاط بمسقطيل الذي يرمز الحمض الأميني لوسين و تشير الأسهم إلى الأسس الثلاثة المضافة مقارنة بالشاهد السوي.

4.3.3.4- التغيير Ser284Ser

وجدنا هذا التغيير المعروف الصامت عند المريضين رقم 35 و 50 بحالة تغاير اللواقح و عند المريضة رقم 22 بحالة تماثل اللواقح و كان مترافقاً مع التغيير 788insTCT/ Ins263Leu (الفقرة 3.3.3.4) و كذلك عند المريضة رقم 16 بحالة تماثل اللواقح و كان مترافقاً مع التغيير الجديد c.851+13G>A (الفقرة 5.3.3.4)، كما وجدنا التغيير Ser284Ser عند ثلاثة شواهد أرقامهم 13 و 65 و 110، لقد لاحظناه من خلال قراءة تسلسل الـ DNA في شدة الـ PCR الثانية من الإكزون الثاني ومقارنته بالتسلسل المرجعي المأخوذ من قاعدة البيانات الـ NCBI وكذلك مقارنته بالتسلسل الموافق لبعض عينات الشواهد، و قد حصل هذا التغيير (p. Ser284Ser) c.852C>T في الكودون 284 و تم فيه استبدال التيمين بالسيتوزين ولكن لم يؤدي إلى تغيير الحمض الأميني السيرين Serine ، تميزت المريضتان 35 و 50 بانقطاع الطمث الأولي PA و مستوى مرتفع من هرمون الـ FSH وهو على التوالي 47 IU/L و 73 IU/L الشكل (22).

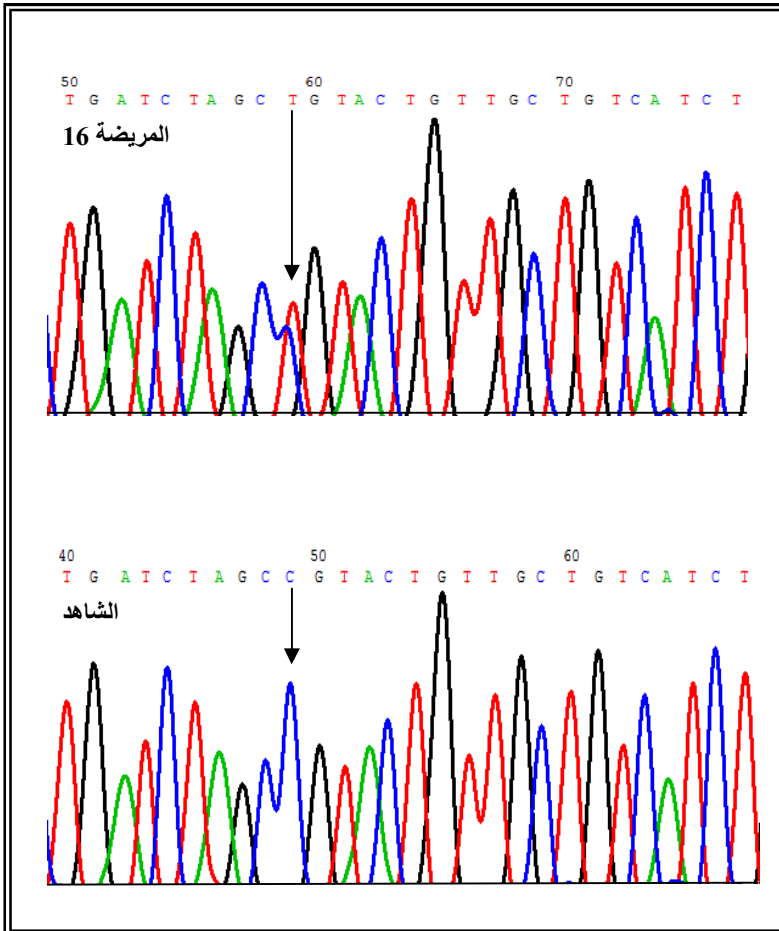


الشكل 22: التغيير Ser284Ser

نلاحظ قمم الفلورة الناتجة عن سلسلة الـ DNA في موقع التغيير باستخدام البادئة العكسية 6 حيث يظهر أنه في المريضة 35 تم استبدال الأدينين A بال Guanine G في الكودون 284 المحاط بمسقطيل الذي يرمز الحمض الأميني سيرين و يشير السهم إلى موضع التغيير مقارنةً بالشاهد السوي.

5.3.3.4- التغير الجديد c.851+13G>A

وجدنا هذا التغير الجديد بحالة تغاير اللواقح في الإنترون عند المريضة 16 ولم نجده في أي من عينات الشواهد و كان مترافقاً مع التغير (p.Ser284Ser) c.852G>A (الفقرة 4.3.3.4) وذلك من خلال قراءة تسلسل الـ DNA في شدة الـ PCR من الإكزون الأول ومقارنته بالتسلسل المرجعي المأخوذ من قاعدة البيانات الـ NCBI و كذلك مقارنته بالتسلسل الموافق لبعض عينات الشواهد، وتم فيه استبدال الأدينين بالغوانين في الموضع 13 في الإنترون ، تميزت المريضة 16 بانقطاع الطمث الثانوي SA في عمر 20 عام ومستوى مرتفع من هرمون الـ FSH (79 IU/L) و أظهر الفحص وجود رحم صغير وأشارت خزعة المبيض إلى فرط التنسج مع عدم وجود الجريبات (الشكل 23).



الشكل 23: التغير c.851+13G>A

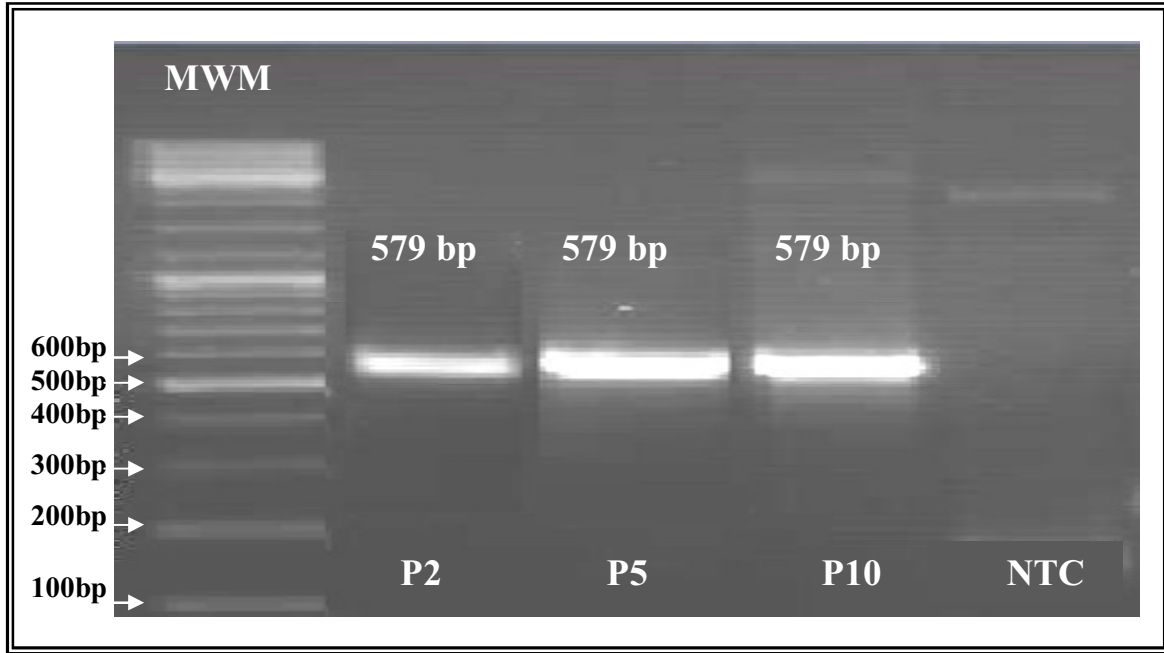
نلاحظ قمم الفلورة الناتجة عن سلسلة الـ DNA في موقع التغير الجديد باستخدام البادئة العكسية 8 حيث يظهر أنه في المريضة 16 تم استبدال التيمين T بالسيٲوزين C في الموضع 13 في الإنترون ويشير السهم إلى موضع التغير مقارنةً بالشاهد السوي.

4.4 - الكشف عن الطفرات في المورثة *GDF9*

ضخنا الإكزونين الأول و الثاني للمورثة *GDF9* بواسطة التفاعل السلسلي للبوليمراز PCR باستخدام بادئات نوعية لكل إكزون و كانت نتائج التضخيم كالتالي:

1.4.4- تضخيم الإكزون الأول للمورثة *GDF9*

ضخنا الإكزون الأول الذي يبلغ طوله 397 زوجاً من الأسس bp كشفة PCR واحدة حجمها 579bp باستخدام البادئتين 9 و10 كما هو موضح في (الشكل 24).



الشكل 24: صورة الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز 2% لنواتج تفاعل تضخيم الإكزون الأول للمورثة *GDF9* كشفة واحدة (579bp) عند بعض المريضات، ونلاحظ ظهور شذفة واحدة وفقاً للحجم المطلوب عند جميع المريضات بينما لم يظهر ناتج لتفاعل الـ PCR عند الشاهد السليبي وذلك يدل على عدم وجود تلوث (يدل الرمز P على المريضة ورقمها، يدل الرمز NTC على الشاهد الخالي من الركيزة، ويدل الرمز MWM على السلم الوزني الجزيئي)

2.4.4- تضخيم الإكزون الثاني للمورثة *GDF9*

يبلغ طول الإكزون الثاني 968 زوجاً من الأسس bp وقد ضخمناه كتلات شدف PCR وفق مايلي:

- ضخمت الشدفة الأولى باستخدام البادنتين 11 و12 وكان حجم شدف الـ PCR الناتجة 454bp

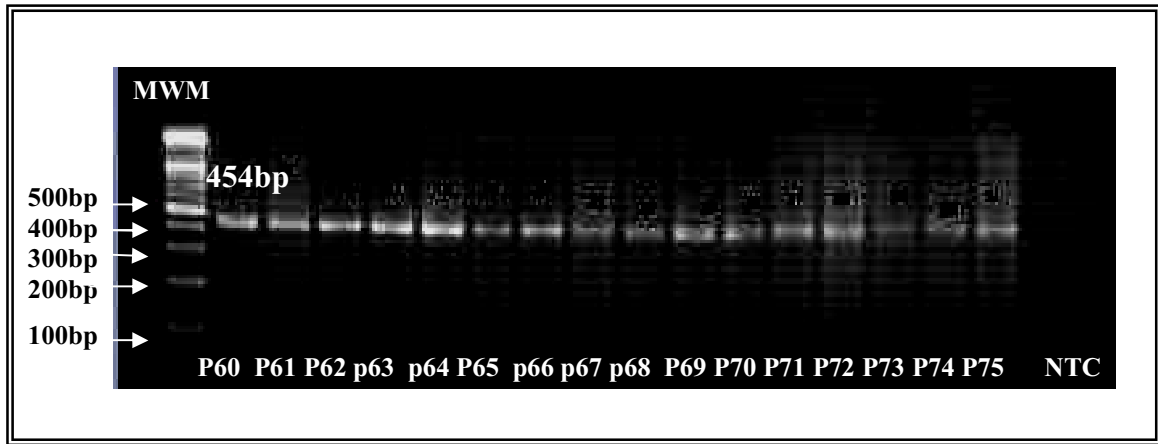
(الشكل 25)

- تم تضخيم الشدفة الثانية باستخدام البادنتين 13 و14 وكان حجم شدف الـ PCR الناتجة 433 bp

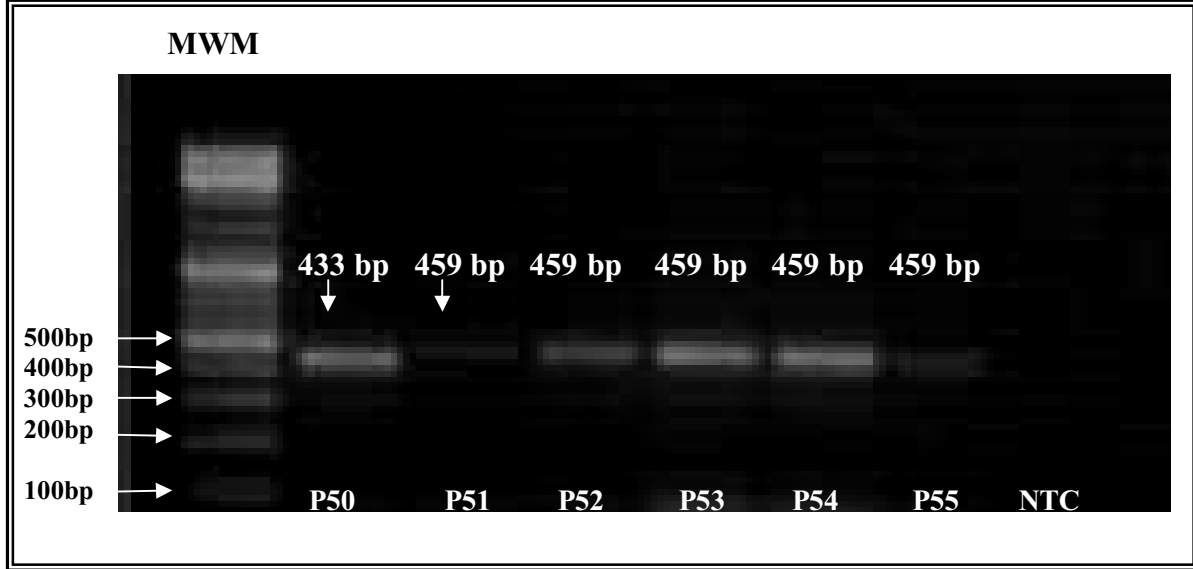
(الشكل 26)

- أما الشدفة الثالثة فقد ضخمت باستخدام البادنتين 15 و16 وكان حجم الشدفة الناتجة 459 bp

(الشكل 26)



الشكل 25: صورة الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز 2% لنواتج تفاعل تضخيم الشدفة الأولى من الإكزون الأول للمورثة *GDF9*، ونلاحظ ظهور شدف واحدة وفقاً للحجم المطلوب (454bp) عند جميع المريضات مما يدل أن نتاج التفاعل نوعي في حين لم يظهر ناتج لتفاعل الـ PCR عند الشاهد السلبي وذلك يدل على عدم وجود تلوث (يدل الرمز P على المريضة ورقمها، يدل الرمز NTC على الشاهد الخالي من الركيزة، ويدل الرمز MWM على السلم الوزني الجزيئي)



الشكل 26: صورة الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز 2% لنواتج تفاعل تضخيم الشدفة الثانية (433bp) والثالثة (459bp) من الإكزون الثاني للمورثة GDF9 ، ونلاحظ ظهور جميع الشدف وفقاً للحجم المطلوب عند جميع المريضات مما يدل أن ناتج التفاعل نوعي كما أن عدم ظهور نتاج لتفاعل الـ PCR عند الشاهد السلبي يدل على عدم وجود تلوث (يدل الرمز P على المريضة ورقمها، يدل الرمز NTC على الشاهد الخالي من الركيزة، ويدل الرمز MWM على السلم الوزني الجزيئي)

3.4.4- نتائج السلسلة الآلية للإكزونين الأول و الثاني في المورثة *GDF9*

قمنا بإجراء سلسلة كاملة للمناطق المرمزة في المورثة *GDF9* للكشف عن وجود طفرات وتغيرات محتملة وقد وجدنا أربعة تغيرات عند 23 مريضة: اثنان من التغيرات جديداً (novel) لم يتم وصفهما في دراسات سابقة ظهرا عند مريضتين ولم نلاحظهما في أي من عينات الشواهد من المحتمل أن يكونا طفرات مسببة لقصور المبيض المبكر POF عند النساء، أما التغيران الباقيان فقد تم وصفهما في دراسات سابقة كتعدد شكلي وحيد النيكليوتيد و هذه التغيرات الأربعة هي:

1.3.4.4- التغير الجديد *Asn177 Lys*: ظهر في الإكزون الثاني عند مريضة واحدة ولم يظهر عند الشواهد.

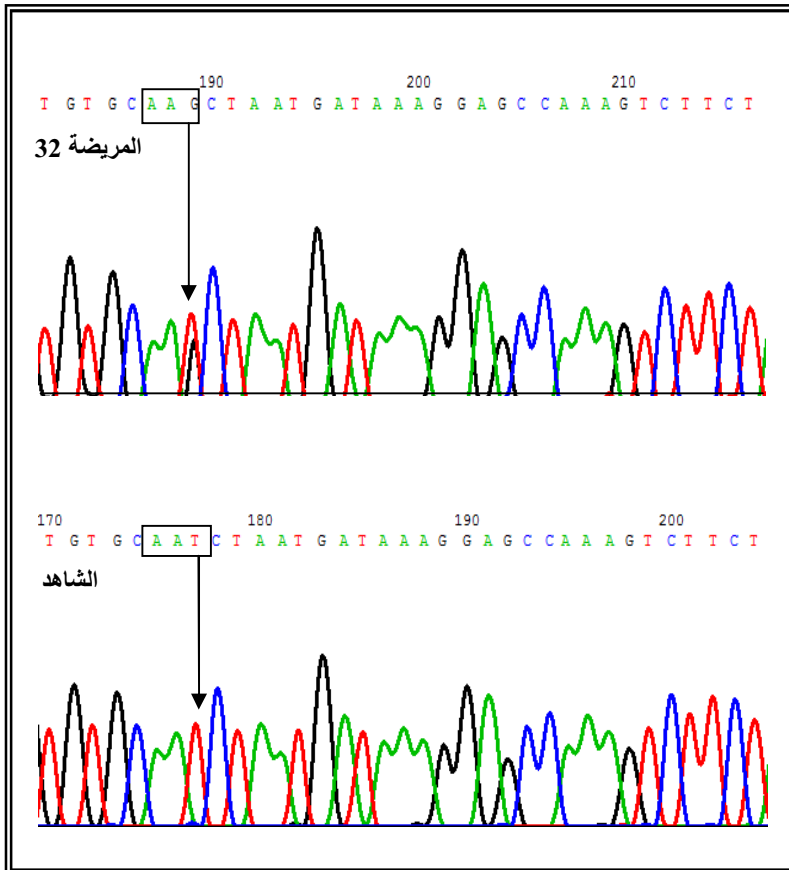
2.3.4.4- التغير الجديد *Asp411Asn*: ظهر في الإكزون الثاني عند مريضة واحدة ولم يظهر عند الشواهد.

3.3.4.4- التغير *Thr149Thr*: وهو تعدد شكلي وحيد النيكليوتيد (صامت) ظهر في الإكزون الثاني عند 17 مريضة وحيداً وعند 15 شاهد، كما وجدناه مترافقاً مع التغير *Glu182Glu* عند ثلاثة مريضات.

4.3.4.4- التغير *Glu182Glu*: وهو تعدد شكلي وحيد النيكليوتيد (صامت) ظهر في الإكزون الثاني عند مريضة واحدة وعند شاهد واحد، كما وجدناه مترافقاً مع التغير *Thr149Thr* عند ثلاثة مريضات.

1.3.4.4- التغيير الجديد Asn177 Lys

وجدنا هذا التغيير الجديد بحالة تغاير اللواقح عند المريضة 32 ولم نجده في أي من عينات الشواهد وذلك من خلال قراءة تسلسل الـ DNA في شدة الـ PCR الأولى من الإكزون الثاني ومقارنته بالتسلسل المرجعي المأخوذ من قاعدة البيانات الـ NCBI وكذلك مقارنته بالتسلسل الموافق لبعض عينات الشواهد، وقد حصل هذا التغيير في الكودون 177 (p. Asn177 Lys) c.531T >G وتم فيه استبدال الغوانين بالتيمين مما أدى إلى استبدال الحمض الأميني الليزين Lysine بالأسبارجين Asparagine ، تميزت المريضة 32 بانقطاع الطمث الأولي PA ومستوى مرتفع من هرمون الـ FSH (56 IU/L) و أظهر الفحص وجود رحم صغير (الشكل 27).

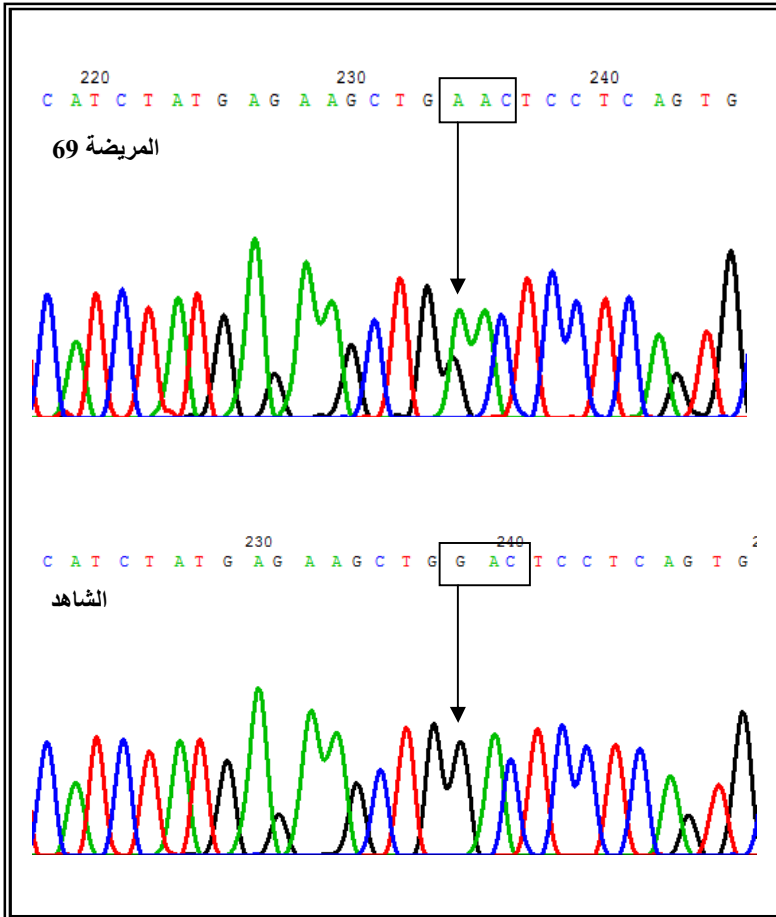


الشكل 27: التغيير الجديد Asn177 Lys

نلاحظ قمم الفلورة الناتجة عن سلسلة الـ DNA في موقع التغيير باستخدام البادئة الأمامية 9 حيث يظهر أنه في المريضة 32 تم استبدال الغوانين G بالتيمين T في الكودون 177 المحاط بمسقطيل و يشير السهم إلى موضع التغيير مقارنةً بالشاهد السوي.

2.3.4.4- التغير الجديد Asp411Asn

وجدنا هذا التغير الجديد بحالة تغاير اللواقح عند المريضة 69 ولم نجده في أي من عينات الشواهد وذلك من خلال قراءة تسلسل الـ DNA في شدة الـ PCR الثالثة من الإكزون الثاني ومقارنته بالتسلسل المرجعي المأخوذ من قاعدة البيانات الـ NCBI وكذلك مقارنته بالتسلسل الموافق لبعض عينات الشواهد، وقد حصل هذا التغير في الكودون 411 (p. Asp 411 Asn) c.1231G >A وتم فيه استبدال الأدينين بالغوانين مما أدى إلى استبدال الحمض الأميني الأسبارجين Asparagine بالأسبارتك أسيد Aspartic Acid، تميزت المريضة 69 بانقطاع الطمث الأولي PA ومستوى مرتفع من هرمون الـ FSH (65 IU/L) و أظهر الفحص وجود رحم صغير ومبيضين صغيري الحجم بدون جريبات (الشكل 28).

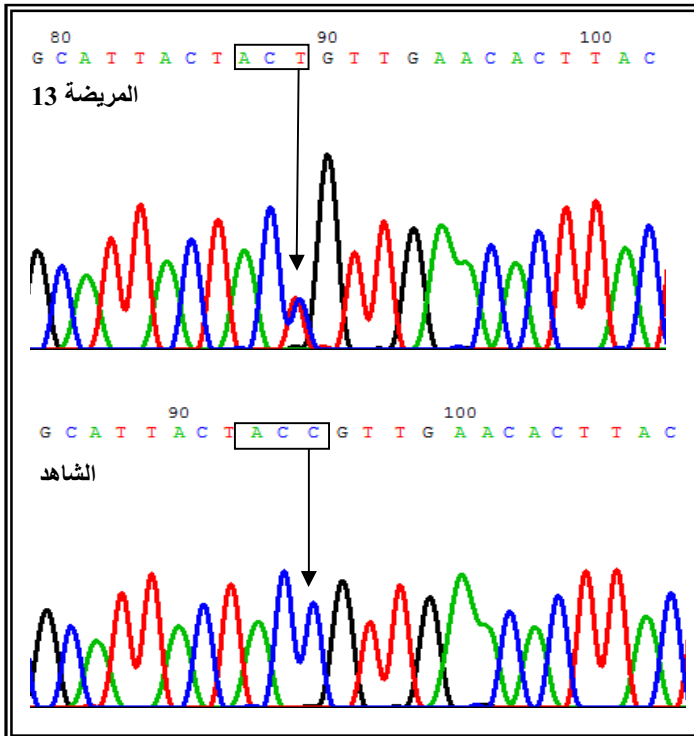


الشكل 28: التغير الجديد Asp411Asn

نلاحظ قمم الفلورة الناتجة عن سلسلة الـ DNA في موقع التغير باستخدام البادئة الأمامية 13 حيث يظهر أنه في المريضة 69 تم استبدال الأدينين A بالغوانين G في الكودون 411 المحاط بمستطيل و يشير السهم إلى موضع التغير مقارنةً بالشاهد السوي.

3.3.4.4 - التغير Thr149Thr

وجدنا هذا التغير المعروف الصامت بحالة تغاير اللواقح عند 17 مريضة وحيدا وعند ثلاث مريضات هن 6 و 49 و 60 مترافقا مع التغير (p.Glu182Glu) c.546G>A (الفقرة 4.3.4.4) كما وجدناه وحيداً عند 15 شاهد و ذلك من خلال قراءة تسلسل الـ DNA في شدة الـ PCR الأولى من الإكزون الثاني ومقارنته بالتسلسل المرجعي المأخوذ من قاعدة البيانات الـ NCBI وكذلك مقارنته بالتسلسل الموافق لبعض عينات الشواهد، و قد حصل هذا التغير (p. Thr149Thr) c.447C>T في الكودون 149 و تم فيه استبدال التيمين بالسيروزين ولكن لم يؤدي إلى تغير الحمض الأميني الثريونين Threonine، تميزت المريضات 6 و 49 و 60 بانقطاع الطمث الأولي PA ومستوى مرتفع من هرمون الـ FSH وهو على التوالي (58 IU/L, 68 IU/L, 52 IU/L) كما أظهر الفحص وجود رحم صغير ومبيضين صغيري الحجم أما الـ 17 مريضة فقد توزعوا كالتالي: 14 مريضة لديهن انقطاع طمث أولي PA و 3 مريضات هن (3، 11، 19) لديهن انقطاع طمث ثانوي SA وكان مستوى هرمون الـ FSH مرتفعاً أكثر من (40 IU/L) في كل الحالات (الشكل 29).

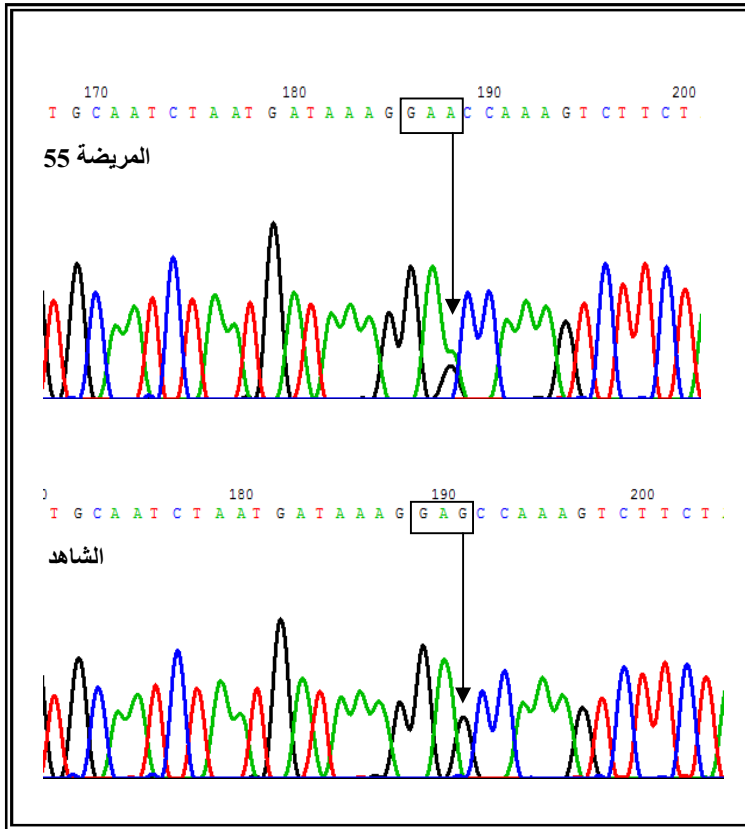


الشكل 29: التغير Thr149Thr

نلاحظ قمم الفلورة الناتجة عن سلسلة الـ DNA في موقع التغير باستخدام البادئة الأمامية 9 حيث يظهر أنه في المريضة 13 تم استبدال التيمين T بالسيروزين C في الكودون 149 المحاط بمستطيل و يشير السهم إلى موضع التغير مقارنةً بالشاهد السوي.

4.3.4.4- التغير Glu182Glu

وجدنا هذا التغير المعروف الصامت بحالة تغاير اللواقح عند المريضة 55 وحيداً وعند ثلاث مريضات هن 6 و 49 و 60 مترافقاً مع التغير (p. Thr149Thr) c.447C>T (الفقرة 3.3.4.4) كما وجدناه وحيداً في الشاهد 125 ولقد لاحظناه من خلال قراءة تسلسل الـ DNA في شدة الـ PCR الأولى من الإكزون الثاني ومقارنته بالتسلسل المرجعي المأخوذ من قاعدة البيانات الـ NCBI وكذلك مقارنته بالتسلسل الموافق لبعض عينات الشواهد، وقد حصل هذا التغير (p. Glu182Glu) c.546G>A في الكودون 182 و تم فيه استبدال الأدينين بالغوانين ولكن لم يؤدي إلى تغير الحمض الأميني الغلوتاميك أسيد Glutamic Acid تميزت المريضة 55 بانقطاع الطمث الأولي PA و مستوى مرتفع من هرمون الـ FSH (54 IU/L) (الشكل 30).



الشكل 30: التغير Glu182Glu

نلاحظ قمم الفلورة الناتجة عن سلسلة الـ DNA في موقع التغير باستخدام البادئة الأمامية 9 حيث يظهر أنه في المريضة 55 تم استبدال الأدينين A بالغوانين G في الكودون 182 المحاط بمستطيل الذي يرمز الحمض الأميني غلوتاميك أسيد و يشير السهم إلى موضع التغير مقارنةً بالشاهد السوي.

5.4- التحليل الإحصائي

أظهرت نتيجة الإختبار Chi-squared وجود فروق معنوية بين عينة المرضى والعينة الشاهدة لكل من التغيرين الصامتين c.447C>T و c.546G>A حيث كانت قيمة P أصغر من 0.05.

وهذا قد يشير إلى وجود خطر عالي لنشوء أو تطور مرض الـ POF عند النساء السوريات الحاملات لهذين التغيرين الوراثيين نتيجة ارتباطهما المباشر مع المرض. يوضح الجدول رقم 10 ملخصاً للبيانات الإحصائية الناتجة وهي تواتر التغيرات الوراثية وتواتر الأليل الطافر بالإضافة إلى قيمة P (P-value).

الجدول 10: ملخص البيانات الإحصائية

P-value	تواتر الأليل الطافر %		تواتر التغير الوراثي		التغير الوراثي	المورثة
	الشواهد	المريضات	الشواهد	المريضات		
>0.05	0.002	0.006	(200/1)%0.5	(80/1)%1.2	c.308A>G	BMP15
>0.05	-	0.006	-	(80/1)%1.2	c.538G>A	
>0.05	-	0.006	-	(80/1)%1.2	c.788insTCT	
>0.05	0.007	0.02	(200/3)%1.5	(80/4)%5	c.852C>T	
>0.05	-	0.006	-	(80/1)%1.2	851+13G>A	
>0.05	-	0.006	-	(80/1)%1.2	c.531T>G	GDF9
>0.05	-	0.006	-	(80/1)%1.2	c.1231G >A	
<0.05	0.03	0.1	(200/15)%7.5	(80/20)%25	c.447C>T	
<0.05	0.002	0.02	(200/1)%0.5	(80/4)%5	c.546G>A	

الفصل الخامس

المناقشة

1.5- ارتفاع مستوى هرمون الـ FSH وقصور المبيض المبكر

قصور المبيض المبكر (POF) هو مجموعة من الاضطرابات غير المتجانسة يتميز بانقطاع الطمث السابق لموعده قبل عمر 40 عاماً ولمدة أكثر من ستة أشهر مترافقاً مع زيادة في مستوى هرمون الـ FSH تزيد عن 40IU/L (Dixit *et al.*, 2006; Ledig *et al.*, 2008).

يُعتبر التشخيص النهائي لقصور المبيض المبكر عند النساء صعباً نظراً لوجود أسباب كثيرة تؤدي لانقطاع الطمث مثل: متلازمة المبيض المتعدد الكيسات وارتفاع مستوى هرمون البرولاكتين والخلل في وظيفة الغدة الدرقية (Panay & Kalu, 2009). يعتمد الأطباء في تشخيص الـ POF على معيارين أساسيين هما: انقطاع الحيض قبل عمر 40 عاماً ولمدة أكثر من ستة أشهر و الارتفاع في مستوى

هرمون الـ FSH أكثر من 40 IU/L (يتراوح مستوى هرمون الـ FSH في الحالة الطبيعية بين 3 IU/L - 10 IU/L) والذي يجب تكرار قياسه بعد 4-6 أسابيع لأكثر من مرة وخلال فترات متقطعة من أجل استبعاد ضعف نشاط المبيض كمسبب لهذا الارتفاع و لتأكيد قصور الغدد التناسلية. يضاف إلى المعايير السابقة الإنخفاض في مستوى هرمون الإستروجين والذي يجب أن يكون أقل من 20 pmol/L (Woad *et al.*, 2006). من المعروف أن الغدة النخامية تفرز في بداية كل دورة حيضية هرمون الـ FSH الذي يقوم بتحفيز عدد من الجريبات في المبيض لتنمو وتنضج وعادةً ينجح جريب واحد في بلوغ مرحلة النضج التام ويصبح الجريب المسيطر وتقوم الخلايا الحبيبية في هذا الجريب بإنتاج كميات من هرموني الإستروجين و الإنهيبين و ارتفاع الإثنين معاً هو رسالة موجهة إلى الغدة النخامية كي توقف إفراز هرمون الـ FSH عن طريق آلية التلقم الراجع السلبية، وفي حال لم ينمو أي من الجريبات في المبيض بشكل تام لن يتم إفراز كميات كافية من هرموني الإستروجين و الإنهيبين و بالتالي لن تتوقف

الغدة النخامية عن إفراز هرمون الـ FSH و ربما هو سبب ارتفاع مستوى هرمون الـ FSH في مرض قصور المبيض المبكر. لقد أشارت بعض الدراسات إلى أن الإضطراب في آلية التلقيح الراجع السلبية أو وجود طفرات في المورثة INHa (Inhibin alpha) تسبب انخفاض في كمية هرمون الإنهيبين وبالتالي تسبب ارتفاع في مستوى هرمون الـ FSH، كما ان الانخفاض المبكر في إحتياطي المبيض من الجريبات أو نفاذ الجريبات يسبب هذا الإرتفاع يضاف إلى ما سبق الخلل في نمو الجريبات و تطورها تحت تأثير عوامل النمو المختلفة (Marozzi *et al.*, 2002; Kokcu, 2010; Prakash *et al.*, 2010).

وقد أظهرت نتائج دراستنا لـ 80 مريضة مصابة بقصور المبيض المبكر مستوى مرتفعاً لهرمون الـ FSH في جميع الحالات وقد تراوحت قيمته بين 40 IU/L-90 IU/L وهو يعتبر معيار تشخيصي مهم للـ POF وفقاً لجميع الدراسات.

2.5- أنماط الطفرات و التغيرات في المورثة *BMP15* و ارتباطها مع قصور المبيض المبكر

يعد البروتين *BMP15* عامل نمو و تمايز مُشتَق من الخلية البيضية و يقوم بدور حاسم في تشكل الجريبات في المبيض من خلال تنظيمه لكثير من عمليات الخلايا الحبيبية و خاصةً تكاثر هذه الخلايا بدءاً من المراحل الأولية إلى المراحل التي تعتمد على تأثير هرمون الـ *FSH*، كما أن له دور في تحديد معدل الإباضة و الخصوبة عند الثدييات (Shimasaki *et al.*, 2004; Fabre *et al.*, 2006). أظهرت الدراسات على النماذج الحيوانية أن وجود البروتين *BMP15* في المبيض ضروري من أجل تشكل الجريبات الطبيعي و تم تحديد الكثير من الطفرات الطبيعية في المورثة *BMP15* في عدة سلالات من الأغنام تبين أن لها آثار متباينة على الخصوبة، حيث أدت هذه الطفرات في حالة تماثل اللواقح إلى زيادة معدل الإباضة مقارنةً بالنمط السوي وفي حالة تغاير اللواقح إلى العقم لأنها منعت تشكل الجريبات في المرحلة الأولية. أما ارتفاع معدلات الإباضة ربما يكون بسبب النضج للعديد من الجريبات النامية نتيجة زيادة استجابة الخلايا الحبيبية لتأثير هرمون الـ *FSH* والتشكل المبكر لمستقبلات هرمون الـ *FSH* على هذه الخلايا (Galloway *et al.*, 2000; McNatty *et al.*, 2005). في المقابل تميزت الفئران المعدلة وراثياً التي تعاني من نقص البروتين *BMP15* بضعف الخصوبة بسبب عيوب في عملية الإباضة و قدرة الخلايا البيضية على التطور إلى جنين طبيعي، و حتى الوقت الحاضر لم يتم فهم الإختلافات الملاحظة بين النمط الظاهري للأغنام الحاوية على طفرات في المورثة *BMP15* وبين الفئران المعدلة وراثياً (Yan *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2004).

في الإنسان تم وصف أول طفرة في المورثة *BMP15* عند أختين لديهما قصور مبيض مبكر وقد حملتا طفرة نقطية بحالة تغاير اللواقح (p.Tyr235Cys) c.704A>G تم فيها استبدال الحمض الأميني السيستيئين بالتيروزين في الكودون 235 وكان لها تأثير سلبي مهيم على البروتين الناتج الذي منع تكاثر الخلايا الحبيبية في جريبات المبيض (Di Pasquale *et al.*, 2004). ومنذ نشر هذه النتائج تسارعت الدراسات الوراثية على مجموعات كبيرة من النساء ممن لديهن قصور مبيض مبكر و كشفت مزيداً من التغيرات في المورثة *BMP15* المحتمل ارتباطها مع الـ POF، وتعتبر بعض طفرات هذه المورثة (p.Arg68Trp, p.Leu148Pro, p.Glu211X, p.Tyr235Cys) المتوضعة في منطقة طليعة الببتيد (propeptide) في البروتين من أكثر المرشحين لقصور المبيض المبكر عند النساء لأن لها آثار مسببة لهذا المرض تتمثل في الإنتاج المعيوب للمعقد ثنائي الجزيء (dimer) النشط حيويًا، وقد دعمت هذه النتائج فكرة أن إفراز كميات كافية من البروتين *BMP15* أمر بالغ الأهمية لخصوبة المرأة، وبالرغم من ذلك يبقى دور هذه التغيرات في نشوء الـ POF بحاجة إلى المزيد من الإختبارات الوظيفية (Ledig *et al.*, 2008; Rossetti *et al.*, 2009).

قمنا في دراستنا الحالية بمسح شامل للمناطق المرمزة في المورثة *BMP15* عند 80 مريضة مصابة بـ قصور المبيض المبكر الصريح مجهول السبب موزعين على الشكل التالي: 55 مريضة لديهن انقطاع طمث أولي PA و 25 مريضة لديهن انقطاع طمث ثانوي SA مع تأكيد عدم وجود أي صلة قرابة بين المريضات. أظهرت النتائج وجود طفرة واحدة معروفة عند مريضة و ثلاثة تغيرات عند أربع مريضات تم وصفهم في دراسات سابقة وتغير واحد جديد في الإنترنتون عند مريضة واحدة.

كشفت دراستنا نتيجة سلسلة المناطق المرمزة في المورثة *BMP15* وجود الطفرة النقطية *Ala180Thr* في الإكزون الثاني عند مريضة واحدة بحالة تغاير اللواقح، تميزت بانقطاع الطمث الأولي PA و مستوى مرتفع من هرمون الـ FSH (50 IU/L) وقد بلغ تواتر الطفرة 1.2% ولم تلاحظ في أي من عينات الشواهد. تكرر وصف هذه الطفرة عند مريضات قصور المبيض المبكر من قبل مجموعات مختلفة من الباحثين (Di Pasquale *et al.*, 2006; Dixit *et al.*, 2006; Laissue *et al.*, 2006; Tiotiu *et al.*, 2010)، وقد كشفت دراسة Ledig و زملائه (Ledig *et al.*, 2008) وجود هذه الطفرة عند أختين من أصول أوروبية إحداهما لديها قصور مبيض مبكر تميزت بانقطاع طمث ثانوي مع فرط مؤجّهة الغدد التناسلية (FSH 103 mU/mL) وقد ترافقت الطفرة *Ala180Thr* مع وجود الطفرة النقطية *Ile 160 Thr* في الإكزون السادس من المورثة *FSHR*، بينما كانت الأخت الأخرى غير متأثرة بالـ POF وقد ورثت الأختان هذا التغيير من الأم غير المتأثرة بالمرض أيضاً. اقترحت هذه الدراسة أن تغيير الحمض الأميني الألانين إلى الثريونين في الكودون 180 في المورثة *BMP15* يُنقص تكاثر الخلايا الحبيبية في الجريبات النامية ويتم تضخيم هذا التأثير بسبب انخفاض تعبير *FSHR* في الخلايا الحبيبية نتيجة وجود الطفرة *Ile160Thr* في المورثة *FSHR*. وجد Moron و زملائه Moron (2007) الطفرة *Ala180Thr* في دراستهم لعينة كبيرة من النساء من أصول إسبانية عندهن خصوبة مثبتة و حدث لديهن انقطاع الطمث الطبيعي (menopause) بعد عمر الأربعين عاماً وقد بلغ تواترها 0.3% في النساء الإسبان وفقاً لهذه الدراسة، والتي اقترحت أن التغيرات في المورثة *BMP15* قد تساهم بطريقة معقدة في اختلاف عمر انقطاع الطمث الطبيعي بين النساء لكن هذا التفسير يجب أن يُنظر إليه بحذر وهو بحاجة إلى مزيد من الدراسات على مجموعات سكانية مختلفة.

وصف Zhao و زملاؤه (Zhao *et al.*, 2008) هذه الطفرة في 46 من الأمهات تميزن بإنجاب التوائم بشكل تلقائي وبلغ تواترها 0.014 كما ظهرت في 32 شاهد بنسبة تواتر 0.016، اقترحت هذه الدراسة أن الطفرة Ala180Thr من المرجح أن تكون تعدد شكلي نادر polymorphism وليست طفرة مرتبطة بالمرض. كما أظهرت دراسة فريق Rossetti (Rossetti *et al.*, 2009) وجود الطفرة ذاتها في 6 نساء قوقازيات لديهن قصور مبيض مبكر و كشفت أن توضعها في منطقة طليعة الببتيد Propeptide في البروتين قد يكون له آثار ضارة طفيفة جداً على البروتين الطافر.

تعتبر الطفرة Ala180Thr الأكثر تواتراً بين مريضات الـ POF في حالات انقطاع الطمث الأولي و الثانوي وهذا ما أكدته دراسة Pu و زملاؤه (Pu *et al.*, 2014) التي كانت تهدف إلى التحقق من الارتباط بين بعض الطفرات والتغيرات في المورثة BMP15 ومورثات أخرى وبين خطر الإصابة بمرض قصور المبيض المبكر، وقد اقترحت هذه الدراسة أن النساء اللواتي لديهن الطفرة Ala180Thr هن أكثر احتمالاً لتطور هذا المرض بحدود خمس مرات مقارنةً مع النساء بدون هذه الطفرة وهذا بحاجة إلى مزيد من الدراسات في المستقبل وعلى عدد كبير من العينات لتأكيد هذا الارتباط.

أكدت نتائج دراستنا أن الطفرة Ala180Thr موجودة بين مريضات قصور المبيض المبكر في مجتمعنا السوري وقد بلغ تواترها 1.2% وكان مماثلاً تقريباً لدراسات عالمية باستثناء دراسة Ledig على عينة من النساء الألمانيات حيث بلغ تواترها 10% و ربما التباين في التواتر بسبب الاختلافات العرقية أو بسبب حجم العينة المدروسة يضاف إلى ذلك دور العوامل البيئية ، ويوضح الجدول رقم 11 تواتر هذا الطفرة في عدد من الدراسات العالمية بهدف مقارنتها مع نتائجنا.

الجدول 11: الطفرة Ala180Thr في المورثة *BMP15* وتواترها وفقاً لدراسات على نساء لديهن قصور مبيض مبكر

الطفرة	الحمض الأميني المُستبدل	الدراسة السكانية	تواتر الطفرة في مريضات الـ POF	النسبة المئوية	المرجع
c.538G.A	p.Ala180Thr	American and European women	5/166	%3	Di Pasquale et al., 2006
c.538G.A	p.Ala180Thr	Indian women	3/202	%0.99	Dixit et al., 2006
c.538G.A	p.Ala180Thr	French and Finland women	2/203	%0.98	Laissue et al., 2006
c.538G.A	p.Ala180Thr	German women	2/20	%10	Ledig et al., 2008
c.538G.A	p.Ala180Thr	Caucasian women	6/300	%2	Rossetti et al., 2009
c.538G.A	p.Ala180Thr	Belgium women	2/50	%4	Tiotiu et al., 2010
<u>c.538G.A</u>	<u>p.Ala180Thr</u>	<u>Syrian women</u>	<u>1/80</u>	<u>%1.2</u>	<u>دراستنا الحالية 2015</u>

وجدنا التغير **Asn103Ser** في الإكزون الأول بحالة تماثل اللواقح وهو تعدد شكلي وحيد النكليوتيد (rs41308602) ظهر عند مريضة واحدة تميزت بانقطاع الطمث الأولي PA ومستوى مرتفع من هرمون الـ FSH (55 IU/L) وبلغ تواتره 1.2% ، كما ظهر هذا التغير عند عينة واحدة من الشواهد (200 عينة) بنسبة تواتر 0.5% أكدت معظم الأبحاث أن هذا التغير شائع بين مريضات قصور المبيض المبكر حيث وصفه Dixit وزملاؤه (Dixit *et al.*, 2006) لأول مرة عند 19 مريضة لديهن الـ POF من أصل 202 مريضة مشمولة بالدراسة وكان تواتره 9.4% ، كما تم تسجيله لدى 10 من أصل 197 شاهد بنسبة 5%. تكرر وصف هذا التبدل ولكن بنسبة تواتر أعلى بلغت 99% عند مريضات الـ POF و عند الشواهد و ذلك في دراسة فريق Laissue التي ضمت 203 مريضة و 54 شاهد (Laissue *et al.*, 2006) ، كما وجد فريق Tiotiu (Tiotiu *et al.*, 2010) هذا التغير عند 7 مريضات من أصل 50 مريضة مدروسة عندهم قصور مبيض مبكر بتواتر 14% وأيضاً ظهر عند بعض عينات الشواهد والتي بلغ عددها 214 عينة بنسبة تواتر 11.6%، أما دراسة Zhao و زملاؤه (Zhao *et al.*, 2008) فقد وجدت هذا التغير في بعض أمهات التوائم الطبيعية، وفقاً لنتائج الدراسات السابقة فإن التغير **Asn103Ser** الذي يتم فيه استبدال الحمض الأميني السيرين بالأسبارجين له تواتر عالي في المجتمعات المدروسة وبشكل خاص المجتمع الأوروبي (Laissue *et al.*, 2006) أما انخفاض نسبة تواتره في دراستنا الحالية فيمكن تفسيره بأنه أليل غير شائع في المجتمع السوري .

أما التغير **263insLeu** وهو تعدد شكلي (rs79377927) فقد ظهر في الإكزون الثاني عند مريضة واحدة مشمولة بالدراسة مترافقاً مع التغير Ser284Ser، تميزت الحالة بانقطاع الطمث الأولي PA و مستوى مرتفع من هرمون الـ FSH (65 IU/L) كما بلغت نسبة تواتره 1.2% ولم يلاحظ في أي من عينات الشواهد.

تم وصف التغير 263insLeu في مجموعات سكانية مختلفة عند مريضات أظهرن قصور المبيض المبكر وعند عدد من عينات الشواهد (Di Pasquale *et al.*, 2006; Dixit *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2008) هذا التغير في 16 من الأمهات تميزن بإنجاب التوائم بشكل تلقائي وأيضاً في بعض الشواهد، ووفقاً لدراسة Laissue *et al.*, 2006) فقد ظهر التغير ذاته في 10 مريضات لديهن قصور مبيض مبكر، 60% منهم ذوات أصول إفريقية كما ظهر في 9 عينات من الشواهد أيضاً ذوات أصول إفريقية، و تقترح هذه النتائج أن 263insLeu تغير شائع جداً في المجموعات السكانية الإفريقية.

وجد فريق Tiotiu *et al.*, 2010) هذا التغير في 3 مريضات لديهن قصور مبيض مبكر وكان في واحدة منهم مترافقاً مع الطفرة Leu148Pro وهي حالة مماثلة لمريضة تحمل نفس التغيرين في دراسة (Laissue *et al.*, 2006). خُصّ فريق Tiotiu أن التغير 788insTCT الذي تم فيه إدخال ثلاثة نكليوتيدات في الموقع 788 مما أدى إلى إدراج الحمض الأميني اللوسين في الكودون 263 من المحتمل أن يكون له تأثير حيوي ضعيف على البروتين الناتج أو قد لا يكون له تأثير وهذا ما أكدته دراسات (Laissue *et al.*, 2006; Rossetti *et al.*, 2009). هذا ولم يتم تسجيل أي حالة لديها قصور مبيض مبكر تحمل التغير 263insLeu مترافقاً مع التغير Ser284Ser في الدراسات السابقة

كما وجدنا في دراستنا الحالية ويبقى السؤال حول إمكانية وجود ارتباط بين هذين التغيرين (263insLeu و Ser284Ser) أو التغيرين (263insLeu و Leu148Pro) عند مريضات الـ POF واحتمال مشاركتهما سوبياً في الآلية المسببة لهذا المرض غير محسوم وبحاجة إلى مزيد من الدراسات.

يظهر في الجدول رقم 12 تواتر التغير 263insLeu في عدد من الدراسات العالمية بهدف مقارنته مع دراستنا الحالية، ونلاحظ أن نتائجنا كانت مشابهة لنتائج دراسة Di Pasquale على عينة من النساء الأوروبيات و الأمريكيات حيث بلغ تواتر هذا التغير 1.2% بينما نلاحظ ارتفاع تواتره في الدراسات الأخرى وخاصةً في دراسة Tiotiu على عينة من النساء البلجيكيات وبلغ التواتر 6% وربما يعود التباين في النسب إلى الإختلافات العرقية أو حجم العينة المدروسة يضاف إلى ذلك العوامل البيئية.

الجدول 12: التغير في المورثة *BMP15* وتواتره وفقاً لدراسات على نساء لديهن قصور مبيض مبكر

المرجع	النسبة المئوية	تواتر التغير في مريضات الـ POF	الدراسة السكانية	الحمض الأميني المضاف	التغير
Di Pasquale et al., 2006	%1.2	2/166	American and European women	p.263insLeu	c.788insTCT
Dixit et al., 2006	%4.4	9/202	Indian women	p.263insLeu	c.788insTCT
Laissue et al., 2006	%4.9	10/203	French and Finland women	p.263insLeu	c.788insTCT
Rossetti et al., 2009	%5.6	17/300	Caucasian women	p.263insLeu	c.788insTCT
Tiotiu et al., 2010	%6	3/50	Belgium women	p.263insLeu	c.788insTCT
Wang et al., 2010a	%2	2/100	Chinese women	p.263insLeu	c.788insTCT
<u>دراستنا الحالية 2015</u>	<u>%1.2</u>	<u>1/80</u>	<u>Syrian women</u>	<u>p.263insLeu</u>	<u>c.788insTCT</u>

وُصِفَ التغير Ser284Ser في دراسات سابقة كتعدد شكلي وحيد النكليوتيد (rs17003221) عند مريضات قصور المبيض المبكر وعند بعض عينات الشواهد وهو موجود في الإكزون الثاني وتم تسجيله لأول مرة في دراسة Takebayashi وزملاؤه (Takebayashi *et al.*, 2000) لعينة صغيرة من النساء اليابانيات بهدف الكشف عن الطفرات في كلاً من المورثتين *BMP15* و *GDF9* في حالات قصور المبيض المبكر وكانت نتيجتها عدم وجود أي طفرة باستثناء هذا التغير الصامت.

كما وجده فريق Dixit (Dixit *et al.*, 2006) التغير ذاته عند 15 مريضة وبلغت نسبة تواتره 7.4% (202/15) وكذلك عند بعض عينات الشواهد بنسبة تواتر 10% (197/20)، بينما كان تواتره في دراسة Laissue و زملاؤه (Laissue *et al.*, 2006) أقل حيث وُجد عند 4 مريضات بتواتر 1.97% (203/4) ولم يظهر في أي من عينات الشواهد (54 عينة)، تكررت مشاهدة هذا التغير في دراسة Tiotiu وزملاؤه (Tiotiu *et al.*, 2010) عند مريضات الـ POF بتواتر بلغ 6% (50/3) وعند الشواهد بنسبة 2.3% (214/5).

أما في دراستنا فقد وجدنا التغير Ser284Ser عند 4 حالات بتواتر 5% (80/4) أما عند الشواهد فكان تواتره أقل 1.5% (200/3)، ونلاحظ من خلال هذه النتائج أن تواتر التغير Ser284Ser مرتفع نسبياً في مجتمعنا بين حالات قصور المبيض المبكر وبذلك تكون نتائجنا مماثلة تقريباً لنتائج دراسة فريق Tiotiu (Tiotiu *et al.*, 2010).

وقد أظهرت دراستنا أن هذا التغير سُجل عند مريضتين تميزتا بانقطاع الطمث الأولي PA و مستوى مرتفع من هرمون الـ FSH وهو على التوالي (73 IU/L) و (47IU/L) في حين ظهر عند مريضة ثالثة مترافقاً مع التغير Ser284Ser 263insLeu و (263insLeu) كما ذكرنا سابقاً. أما عند المريضة

الرابعة فقد كان مترافقاً مع التغير الجديد **c.851+13G>A** و Ser284Ser (c.851+13G>A)

الموجود في الإنترنت ولم يتم تسجيل هذه الحالة في أي من الدراسات السابقة، تميزت هذه المريضة بانقطاع الطمث الثانوي SA في عمر 20 عام ومستوى مرتفع من هرمون الـ FSH (79 IU/L). يمكن للتغيرات الواقعة في منطقة غير مشفرة للبروتين أن تلعب دوراً في مختلف العمليات المشاركة في إنتاج البروتين من المورثة كعملية ربط قطع الـ mRNA (mRNA Splicing) أو عملية نسخ الـ mRNA التي تؤثر على كمية البروتين الناتج، كما يمكن أيضاً أن ينتج عن هذه التغيرات كودون توقف مما يؤدي إلى تغير في طول سلسلة الببتيدات في البروتين الناتج.

نلاحظ من خلال هذه الدراسة أن التغيرات في المورثة *BMP15* منتشرة في المجتمع السوري بين نساء لديهن قصور مبيض مبكر وقد جاءت هذه النتائج مخالفة لدراسة مشابهة مصر (Hassan et al., 2012) على عينة من النساء المصريات بلغت 20 مريضة: تميزت 12 منهن بانقطاع طمث أولي PA و 8 بانقطاع طمث ثانوي SA بالإضافة إلى وجود 20 عينة كشواهد. وقد خلصت هذه الدراسة إلى عدم وجود تغيرات في المورثة *BMP15* وربما يعود ذلك إلى صغر حجم العينة المدروسة، بالإضافة إلى وجود طفرة واحدة في المورثة *INHα* ذات تواتر عالي بين مريضات قصور المبيض المبكر اللواتي تميزن بانقطاع الطمث الأولي. وتجدر الإشارة إلى وجود دراسة ليست على المستوى الجزيئي لتحديد العوامل المحتملة كمسببات لحدوث قصور المبيض المبكر في مجموعه فرعية من نساء محافظة بابل في العراق (Al-tae, 2014) تضمنت 53 امرأة من بينهم 26 مريضة أظهرن الـ POF أما الباقي توزعن بين 12 امرأة في سن اليأس الطبيعي و 15 امرأة معروفات بالخصوبة، وكانت نتيجة الدراسة أنه لا يشكل عمر الأمهات عند وصولهن سن اليأس عامل خطورة في حدوث سن اليأس عند بناتهن المدروسات في الفريق الأول المؤلف من 26 مريضة، كما أن وجود العقم السابق و عدم انتظام نمط الحيض ممكن أن يشكل عامل خطورة في حدوث قصور المبيض المبكر.

باختصار، تعتبر التغيرات في المورثة *BMP15* موجودة عند مريضات قصور المبيض المبكر في سورية ومن الممكن لهذه التغيرات أن تساهم في تطور الـ *POF* إضافة إلى عوامل مساعدة أخرى لكن الآلية الحيوية المؤثرة مازالت غامضة و يحتاج توضيحها المزيد من الدراسات السكانية و الوظيفية لتأكيد أن المورثة *BMP15* هي علامة وراثية لقصور المبيض المبكر عند النساء.

3.5- أنماط التغيرات في المورثة *GDF9* و ارتباطها مع قصور المبيض المبكر

GDF9 بروتين متعدد الوظائف ينتمي إلى β (TGF- β) transforming growth factor superfamily تفرزه الخلايا البيضية بشكل انتقائي ويتحكم بالكثير من عمليات المبيض عند الثدييات (Paulini & Melo., 2011). فهو يؤثر مباشرة على تشكل الجريبات من خلال تحفيز الخلايا الحبيبية على التكاثر والتمايز، كما ينظم إفراز هرمونات المبيض مثل *inhibin B*، بالإضافة إلى تنسيق المراحل المؤدية لعملية الإباضة ومن ضمنها تنظيم تمايز الخلايا الحبيبية إلى الخلايا الزكومية (Hussein et al., 2008; Li et al., 2006). يؤدي نقص البروتين *GDF9* عند إناث الفئران إلى العقم الكامل والذي يعود إلى عيوب متعددة في المبيض تؤدي إلى منع تطور الجريبات في المرحلة الأولية، تنكس الخلية البيضية، ضعف تمايز الخلايا الحبيبية وزيادة مستويات هرمون الـ *FSH*، وفي المقابل تكون ذكور الفئران المعدلة وراثياً خصبة و لا تتأثر بهذا النقص (Dong et al., 1996).

وقد تم أيضاً تحديد اثنتين من الطفرات النقطية التي تحدث بشكل طبيعي في الأغنام (*S395F*, *S427R*) وتؤدي إلى العقم في حالة تماثل اللواقح حيث يُتوقع أنها تعطل تأثير المستقبلات مع البروتين، ومن المثير للاهتمام أن الأغنام الحاملة لهذه الطفرات في حالة تغير اللواقح زادت عندها معدلات الإباضة، والجدير ذكره أن المستويات الضرورية للبروتين *GDF9* من أجل الخصوبة الطبيعية تختلف بين أنواع الثدييات (Hanrahan et al., 2004; Nicol et al., 2009).

من العوامل الرئيسية في تحديد عمر المبيض عند المرأة هو عدد الجريبات الابتدائية عند الولادة ومعدل فقدان أو نفاذ الجريبات قبل البلوغ و خلال فترة الحياة الإنجابية، وبما أن البروتين GDF9 يعزز نمو وتطور جريبات المبيض الابتدائية وصولاً إلى مراحل الجريبات الثانوية ويساهم في خفض معدل الجريبات التي تخضع لعملية الرتق الجريبي فهو ضروري من أجل الخصوبة الطبيعية والحفاظ على وظيفة المبيض (Hreinsson *et al.*, 2002). ومن هنا تكمن أهمية دراسة الطفرات في المورثة GDF9 والتي ارتبطت مع نمط ظاهري إنجابي غير سوي عند النساء مثل قصور المبيض المبكر ومتلازمة المبيض متعدد الكيسات، كما ظهرت بعض الطفرات عند أمهات التوائم الطبيعية غير الحقيقية ويُعتقد أن التعديل في مستويات البروتين GDF9 النَّشِط حيوياً قد يزيد من معدل الإباضة عند الأمهات كما لوحظ في الأغنام (Dixit *et al.*, 2005; Palmer *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010b).

تضم قاعدة بيانات طفرات المورثة GDF9 أربع عشرة طفرة من بينهم 6 طفرات ارتبطت مع قصور المبيض المبكر عند النساء وتقع في المنطقة المرمزة لطيعة الببتيد Propeptide.

كانت أول دراسة لكشف الطفرات في هذه المورثة عند نساء يابانيات أظهرن الـ POF ولكنها لم تسجل وجود تغيرات في المناطق المرمزة من المورثة و يمكن أن يعود ذلك لصغر حجم العينة المدروسة التي تضمنت 20 مريضة (Takebayashi *et al.*, 2000). بعد ذلك كشف فريق Dixit (*et al.*, 2005) الطفرتين المُعَلِّطَتَيْن (Val216Met و Lys67Glu) عند مجموعة من النساء الهنديات المصابات بالـ POF، واقترحت هذه الدراسة احتمال تنوع طفرات المورثة GDF9 المرتبطة مع الـ POF بين المجموعات السكانية المختلفة بدلاً من وجود طفرة واحدة شائعة عند جميع السكان وربما ذلك يعود إلى الاختلافات العرقية. أشارت دراسة حديثة لـ Simpson وزملائه (Simpson *et al.*, 2014) أن الطفرة Lys67Glu تؤدي إلى انخفاض كبير في إفراز البروتين GDF9.

لقد وجدنا في مجموعتنا المؤلفة من 80 مريضة مصابة بقصور المبيض المبكر أربعة تغيرات في المورثة GDF9 عند 23 مريضة، اثنان من هذه التغيرات جديان (novel) لم يتم وصفهما في دراسات سابقة عند مريضات الـ POF، أما التغيران الباقيان فقد تم وصفهما من قبل كتعدد شكلي وحيد النكليوتيد.

ظهر التغير الجديد الأول Asn177Lys عند مريضة واحدة بحالة تغاير اللواقح وقد توضع في الإكزون الثاني من المورثة الذي يرمز جزء منه منطقة طليعة الببتيد propeptide في البروتين GDF9 وترافق مع قصور المبيض المبكر مع غياب كامل عند الشواهد، وتم فيه استبدال الغوانين بالتيمين مما أدى إلى استبدال الليزين (K) وهو حمض أميني قطبي موجب الشحنة قاعدي بالأسبارجين (N) وهو حمض أميني قطبي متعادل في الكودون 177 (p. Asn177 Lys) c.531T >G .

من المرجح أن يؤثر استبدال الحموض الأمينية على وظيفة البروتين الناتج والذي يعود إلى اختلاف كبير في الخواص الكيميائية بينهما خاصة إذا كان الحمض الأميني المستبدل محفوظ بشدة في الأنواع المختلفة من الثدييات خلال مراحل التطور (Zhao *et al.*,2007). ظهر التغير Asn177Lys عند مريضة واحدة تميزت بانقطاع الطمث الأولي PA ومستوى مرتفع من هرمون الـ FSH (56 IU/L) وأظهر الفحص وجود رحم صغير و مبايض صغيرة خالية من الجريبات، تميز الأخ بصفات ثانوية أنثوية ووجدنا حالة عقم عند العمة التي أظهرت رحم طفولي ومبايض شريطية الشكل (لم يتم إجراء Genotype للعمة بسبب العديد من المصاعب و بالتالي لا يمكننا أن نحكم إذا كان يوجد ارتباط بين العقم عندها و الـ POF).

أما التغير الجديد الثاني Asp411Asn فقد ظهر بحالة تغاير اللواقح في الإكزون الثاني من المورثة الذي يرمز جزء منه منطقة البروتين الناضج mature peptide في البروتين GDF9 وقد وجدناه عند مريضة واحدة مترافقاً مع قصور المبيض المبكر مع غياب كامل عند الشواهد، تم فيه استبدال الأدينين بالغوانين مما أدى إلى استبدال الحمض الأميني القطبي المتعادل الأسبارجين (N) بالحمض الأميني القطبي سالب الشحنة الأسبارتيك (D) في الكودون 411 (p. Asp 411 Asn) c.1231G >A .

كان النمط الظاهري لمريضتنا متوافق مع النمط الظاهري لمريضات لديهن طفرات في المورثة *GDF9* حيث تميزت بانقطاع الطمث الأولي PA ومستوى مرتفع من هرمون الـ FSH (65 IU/L)، و أظهر الفحص وجود رحم صغير و مبيضين صغيري الحجم بدون جريبات كما لم يتم مشاهدة حالة أخرى لقصور المبيض المبكر في هذه العائلة.

مثل كل أعضاء TGF- β superfamily يتم تخليق البروتين GDF9 على شكل preproprotein مكون من 3 وحدات فرعية (subunit) هم: Signal peptide ، Propeptide ، Mature protein وتُعتبر كل وحدة فرعية ضرورية من أجل التخليق السليم و الإفراز الطبيعي.

يتم تحرير الشكل الناضج من البروتين وهو Mature protein الذي يكون على شكل مُعقد ثنائي الجزيء (dimer) بعد سلسلة من العمليات تتضمن أولاً إزالة Signal peptide ثم تشكيل مُعقد ثنائي الجزيء المتماثل (homodimer) مع بروتين GDF9 آخر أو مُعقد ثنائي الجزيء المتغاير (heterodimer) مع البروتين BMP15 و أخيراً انشطار منطقة propeptide بواسطة أنزيمات نوعية مؤدية إلى إطلاق Mature protein (Juengel & McNatty, 2005). و نخلص مما سبق أن التغيرين الجديدين Asp411Asn و Asn177Lys ربما هما طفرتين لهما تأثير سلبي على عمليات الطي السليمة للبروتين، أو تشكيل المُعقد ثنائي الجزيء، أو تنظيم البروتين GDF9 لنفسه على اعتبار

أنهما غير موجودين في قواعد بيانات التعدد الشكلي وحيد النكليوتيد (SNP databases) وخاصةً التغيير الجديد Asp411Asn الموجود في منطقة البروتين الناضج ، وهي أول مرة يتم فيها الإبلاغ عن طفرة محتملة في هذه المنطقة قد تكون مرتبطة مع الـ POF، يضاف إلى ذلك أن غيابهما في النساء ذوات الخصوبة الطبيعية يقترح وجود تأثير مُمرض محتمل لهما يؤدي أو يشارك في حدوث قصور المبيض المبكر عند النساء وتعتبر الدراسات الوظيفية في المستقبل ضرورية جداً لتحديد أهمية الطفرتين المحتملتين وتأثيرهما على البروتين الناتج.

كشفت دراستنا الحالية أن 25% من مريضات قصور المبيض المبكر من أصل 80 مريضة مدروسة ظهر لديهن التغيير Thr149Thr وقد تم وصفه سابقاً كتعدد شكلي وحيد النكليوتيد (rs254286) في مجموعات سكانية مختلفة عند مريضات أظهرن الـ POF وعند عدد من عينات الشواهد.

فقد وجد فريق Dixit (Dixit *et al.*, 2005) هذا التغيير عند مجموعة من النساء الهنديات بنسبة تواتر 85% (127/108) وكذلك عند بعض عينات الشواهد بتواتر 77.7% (220/171)، وفي دراسة Laissue و زملاؤه (Laissue *et al.*, 2006) تم وصفه عند مجموعة من النساء الأوروبيات وكان تواتره 75.9% (203/154) كما ظهر عند عينات من الشواهد بتواتر 55.5% (54/30).

أشار Zaho و زملاؤه (Zhao *et al.*, 2007) أيضاً إلى وجود التغيير ذاته عند مجموعة من النساء الصينيات لديهن الـ POF بتواتر 56% (100/56) بينما كان تواتره عند عينات الشواهد 58.3% (96/56). أما فريق Kovanci و زملاؤه (Kovanci *et al.*, 2007) فقد أكد أن التغيير الصامت Thr149Thr شائع في المجموعات السكانية المختلفة بتواتر يتراوح بين (13%-50%).

في دراستنا الحالية كان تواتر هذا التغيير مرتفع في مريضات الـ POF 25% (80/20) مقارنةً مع عينات الشواهد 7.5% (200/15) وكانت قيمة $P > 0.05$ وهذا يشير إلى أن التغيير الصامت Thr149Thr

قد يرتبط مباشرةً مع مرض قصور المبيض المبكر عند النساء السوريات.

ظهر التغير الصامت **Glu182Glu** في دراستنا الحالية وحيداً عند مريضة تميزت بانقطاع الطمث الأولي PA ومستوى مرتفع من هرمون الـ FSH (54 IU/L) ، كما وجدناه عند 3 مريضات مترافقاً مع التغير الصامت **Thr149Thr** وبلغ تواتره 5% عند مريضات الـ POF المدروسات ، أما عند الشواهد فقد ظهر لوحده بتواتر 0.5% وكانت قيمة $P > 0.05$ وهذا قد يشير إلى وجود ارتباط مباشر بين التغير **Glu182Glu** و مرض قصور المبيض المبكر عند النساء السوريات ، وقد توافقت هذه النتائج مع دراسة عالمية حديثة في الصين والتي أشارت إلى ارتباط التغير ذاته مع مرض قصور المبيض المبكر عند النساء الصينيات (Ma L et al. 2015).

تم وصف هذا التغير كتعدد شكلي وحيد النكليوتيد (rs10491279) عند نساء تميزن بقصور المبيض المبكر (Dixit et al., 2005; Laissue et al., 2006; Kovanci et al., 2007; Zhao et al., 2007) فقد بلغ تواتره في دراسة Dixit 3.1% و في دراسة Laissue 23% و كان 26% في دراسة Zhao . ووفقاً للدراسات السابقة يُعتبر التغير **Glu182Glu** شائعاً في المجموعات العرقية المختلفة لكن تواتره أقل من تواتر التغير **Thr149Th** وهذا ما توافق مع نتائج دراستنا.

ومن الأمور الملفتة و المهمة هو أننا كشفنا في هذه الدراسة بين حالات قصور المبيض المبكر التغير **Glu182Glu** مترافقاً مع التغير **Thr149Th** عند 3 مريضات وكان هذا النمط الوراثي غائباً عند الشواهد، وقد تميزت المريضات الثلاث بانقطاع الطمث الأولي PA والرحم والمبايض الصغيرة .

يشير هذا الترافق بين التغيرين إلى احتمال وجود خطر عالي لحدوث أو تطور الـ POF عند النساء علماً بأنه لم يتم الإبلاغ عن هذا الترافق في دراسات سابقة.

وبالخلاصة، فقد وجدنا تغييرين جديدين في المورثة *GDF9* عند مريضتين من بين 80 امرأة سورية مصابة بقصور المبيض المبكر هما *p. Asp411Asn* و *p. Asn177Lys* ولم نجدهما عند الشواهد، وقد بلغت نسبة تواتر كل منهما 1.2%، ربما هما طفرتين محتملتين قد تؤثران على البروتين الناتج مما يستدعي إجراء العديد من الدراسات الوظيفية بهدف تحديد أهميتهما كعوامل مهمة في حدوث أو تطور ال-POF، كما وجدنا تغييرين صامتين هما *c.447C>T* و *c.546G >A* قد يرتبطان مع مرض قصور المبيض المبكر عند النساء السوريات.

الفصل السادس
الخاتمة والتوصيات

استطعنا من خلال هذه الدراسة تقصي ترافق طفرات وتغيرات موجودة في المورثتين BMP15 و GDF9 مع مرض قصور المبيض المبكر المسبب للعقم عند عينة من النساء السوريات حيث تمثل الإضطرابات الوراثية الأسباب الأكثر شيوعاً لهذا المرض و تُقدر نسبتها بين 8.8-33% من الحالات وفقاً لمعظم الدراسات العالمية (Goswami & Conway, 2007).

تعتبر دراستنا الأولى في سوريا لمرض الـ POF على المستوى الجزيئي وقد أجريناها على 80 مريضة وقارنا النتائج مع 200 عينة شاهدة ووجدنا في المورثة *BMP15* خمسة تغيرات عند 6 مريضات: طفرة تم وصفها في دراسات سابقة و أربعة تغيرات تم وصفهم سابقاً كتعدد شكلي وتغير واحد جديد (novel) كما وجدنا في المورثة *GDF9* أربعة تغيرات عند 23 مريضة اثنان من التغيرات جديان (novel) لم يتم وصفهما في دراسات سابقة ولم نلاحظهما في أي من عينات الشواهد.

تشكل هذه التغيرات جزءاً بسيطاً من الأسباب التي تؤدي لقصور المبيض عند النساء وقد استطعنا تسجيل نتائجنا في ورقات عالمية، إن اعتماد هذه الإختبارات كإجراء روتيني يترافق مع تقصي حالات الـ POF في سوريا ضروري جداً وبما أن هذا المرض متعدد العوامل يشارك في تطوره العديد من المواقع الوراثية لابد لنا من دراسة طفرات في مورثات أخرى و هنا ننصح بمايلي:

1- وضع خطة عمل مستقبلية على المستوى السكاني لتشمل عدد أكبر من مريضات الـ POF و الشواهد بهدف تحري انتشار التغيرين الجديدين في المورثة *GDF9* في المجتمع السوري، وأيضاً وضع خطة عمل مستقبلية على المستوى الجزيئي لإجراء دراسات على مستوى الـ RNA و البروتين لمعرفة دور التغيرين الجديدين المحتمل في مرض الـ POF.

2- وضع قاعدة بيانات خاصة بالمجتمع السوري تطال المورثات المرشحة لهذا المرض و الطفرات التي قد تساهم في نشوء أو تطور الـ POF وتحديد نمط الطفرة.

3- ضرورة توفر مراكز تشخيص وراثي جزيئي توفر للمريضات فرصة لكشف الطفرات وتقديم الإستشارات الوراثية المناسبة قبل الخوض في إجراءات التلقيح الصناعي.

4- ضرورة وضع العائلات و الأزواج بواقع الإصابة المحتملة بطفرات قد تسبب الـ POF من أجل اتخاذ قرارات مهمة تتعلق بالحمل أو من أجل استخدام تقنيات تحفظ الخصوبة بهدف الحمل في مرحلة لاحقة مثل تجميد الخلايا البيضية الناضجة أو تجميد نسيج المبيض.

5- اعتماد تسلسل علمي منطقي لإمكانيات اعتماد الدراسات العلمية و الجزيئية كالدراسة الهرمونية أولاً تليها دراسة الصيغة الصبغية ثم التوجه لدراسة طفرات في مورثات محددة بحسب تواتر تواجدها عالمياً وذلك قبل الشروع بإجراءات تقنية مكلفة.

6- ننصح السيدات اللواتي لديهن مؤشرات سريرية للـ POF أن يجاهرن به لدى الأطباء و التوجه للتشخيص الجزيئي قبل الإنخراط بمعالجات لاحقة .

7- نقترح القيام بحملات توعية وندوات عامة بهدف التعريف بمرض قصور المبيض المبكر و أسبابه وشرح أهمية التشخيص الوراثي الجزيئي للكشف المبكر عن هذا المرض بالإضافة إلى التصورات المتاحة لإمكانية المعالجة الجينية في المستقبل القريب.

قائمة المصطلحات العلمية

A	<p>Acquired factors</p> <p>Antral follicle</p> <p>Apoptosis</p>	<p>عوامل مكتسبة</p> <p>جريب غاري</p> <p>الإستماتة الخلوية</p>
B	<p>Breakpoints</p>	<p>نقاط الكسر</p>
C	<p>Chromosomal aberrations</p> <p>Chromosome pairing</p> <p>Corpus luteum</p> <p>Critical regions</p> <p>Cytogenetics</p>	<p>الزويوغ الصبغية</p> <p>الإزدواج الصبغي</p> <p>الجسم الأصفر</p> <p>مناطق حرجة</p> <p>علم الوراثة الخلوي</p>
D	<p>Deletion</p> <p>Dimer</p> <p>Dysgenesis</p> <p>Dynamic mutations</p>	<p>حذف، خبن</p> <p>معقد ثنائي الجزيء</p> <p>خلل التكون</p> <p>طفرات ديناميكية</p>
E	<p>Expansion</p> <p>Endometriosis</p>	<p>توسّع كبير</p> <p>انتبأذ بَطْنِي رَجْمِي</p>
F	<p>Fallopian tube</p> <p>Follicle</p> <p>Follicle stimulating hormone</p> <p>Follicular phase</p> <p>Fragile X Syndrome</p> <p>Frameshift mutation</p>	<p>قناة فالوب</p> <p>جريب</p> <p>الهرمون المنبه للجريب</p> <p>الطور الجُريبي</p> <p>متلازمة الصبغي X الهش</p> <p>طفرة الإزاحة</p>
G	<p>Gap junction</p> <p>Germ cells</p> <p>Granulosa cells</p>	<p>مَوْصِلٌ فَجْوِيّ</p> <p>الخلايا الجنسية المنشئة</p> <p>الخلايا الحُبَيْبِيَّة</p>

	Growth differentiation factor	عامل التمايز والنمو
H	Haploinsufficiency Heterotetrameric Heterozygous Homologous Homozygous Hypergonadotropic Hypoestrogenism Hypothalamus	القصور الفردي رباعي القسيمات المتغاير متغاير اللواقح مماثل، صنو مماثل اللواقح فرط موجهات الأقتاد قصور هرمون الإستروجين تحت المهاد، الوطاء
I	Idiopathic Infertility Insertion Intervening segment Inversions Isochromosome	مجهول السبب العقم إدخال، غرز القطعة البينية انقلاب، انعكاس صبغي متساوي الأذرع
K	Karyotype Knockout	الصيغة الصبغية، الطابع النووي، النمط الصبغي معدل وراثياً
L	Ligand Luteinizing hormone	رابط الهرمون الملوتين
M	Mature Graafian follicle Meiosis Menopause Metaphase	جريب غراف الناضج الإنقسام المنصف، الإنتصافي سن الإياس الطور الإستوائي، الطور التالي

	<p>Missense mutation</p> <p>Mitosis</p> <p>Monosomy</p> <p>Mutation</p>	<p>طفرة مُعَلَّطة</p> <p>الإنقسام الفتيلي، المتساوي، الخيطي</p> <p>وحدانية الصبغي</p> <p>طفرة</p>
N	Nonsense mutation	طفرة عديمة المعنى
O	<p>Oligomenorrhea</p> <p>Oogonia</p> <p>Ovulation factors</p>	<p>ندرة الحيض</p> <p>بزررة البيضة</p> <p>عوامل متعلقة بالإباضة</p>
P	<p>Pachytene</p> <p>Pituitary gland</p> <p>Point mutation</p> <p>Polycystic Ovary Syndrome</p> <p>Polymerase Chain Reaction</p> <p>Preantral follicle</p> <p>Premature ovarian failure</p> <p>primer</p> <p>Primary amenorrhea</p> <p>Primary ovarian insufficiency</p> <p>Primordial follicle</p> <p>Prophase</p>	<p>التنَّخَن</p> <p>الغدة النخامية</p> <p>طفرة نقطية، موضعية</p> <p>متلازمة المبيض متعدد الكيسات</p> <p>التفاعل السلسلي البوليميرازي</p> <p>الجريب قبل الغاري</p> <p>قصور المبيض المبكر</p> <p>البادئ، المرئس</p> <p>انقطاع الطمث الأولي</p> <p>عدم كفاءة المبيض المبكر</p> <p>جريب ابتدائي</p> <p>الطور الطليعي</p>
R	Reading frame	إطار القراءة
S	<p>Secondary amenorrhea</p> <p>Silent mutation</p> <p>Spontaneous</p> <p>Stop codons</p>	<p>انقطاع الطمث الثانوي</p> <p>طفرة صامتة</p> <p>عفوي، تلقائي</p> <p>كودونات التوقف</p>

	Substitution	استبدال
T	Theca cells Translocations Trisomy Turner Syndrome	الخلايا القِرابِيَّة إنتقالات، إزفاءات ثلاثية الصبغي متلازمة تيرنر
U	Uterine factors	عوامل متعلقة بالرحم
V	Variations	تغيرات

إهداء

إلى قدوتي و مثلي الأعلى في الحياة ...أبي الحبيب

إلى نبع العطاء و الحنان و الحب الكبير ...أمي الحبيبة

إلى من كانوا بجانبني دوماً في كل خطوة ...أخواتي الأعزاء

إلى سندي وشريكي في درب الحياة والعلم ..زوجي الغالي

إلى حبات قلبي وأغلى ماأملك ...أولادي الأحباء

شكر وتقدير

أتوجه بالشكر الكبير و التقدير للأستاذ الدكتور عصام قاسم المدير العام للهيئة العامة للتقانة الحيوية والمشرف على البحث لدعمه المتواصل لي طوال سنوات دراستي في الماجستير و الدكتوراه، و الذي وضع ثقته بي و لم يبخل علي يوم بمشورته العلمية و توجيهاته القيمة فكان وسيبقى ملأً يحتذى به في العلم و التفاني في العمل.

وكذلك أتوجه بالشكر الكبير و العرفان للأستاذ الدكتور وليد الأشقر الباحث الرئيسي في هيئة الطاقة الذرية و المشرف المشارك الذي أغنى هذا البحث بخبرته و دقته العلمية و انتقاداته البناءة، والذي قدم كل مساعدة ممكنة من حيث المواد أو من حيث استعمال التجهيزات المخبرية في سبيل دعم وإنجاز هذا البحث.

الشكر الكبير إلى جامعة دمشق لجهودها المستمرة في تشجيع و دعم البحث العلمي ورعاية طلاب الدراسات العليا و الشكر لرئيسها الأستاذ الدكتور حسان الكردي، والشكر الخاص إلى قسم علم الحياة الحيوانية في كلية العلوم ممثلاً بالأستاذ الدكتور حسن ناصر الدين لتعاونه الكبير، وأيضاً السادة أعضاء الهيئة التدريسية و التعليمية و أخص الدكتور شادي سكرية الذي أفادني بمعلوماته وخبراته الكبيرة.

وأتقدم بكل الشكر والامتنان للأستاذ الدكتور ابراهيم عثمان المدير العام لهيئة الطاقة الذرية والأستاذ الدكتور نزار مير علي رئيس قسم البيولوجيا الجزيئية و التقانة الحيوية لإحتضانهم الأبحاث العلمية وإتاحة الفرصة لطلاب الدراسات للعمل ضمن مخابر الهيئة.

والشكر موصول إلى كل من ساعدني في مخبر البصمة الوراثية وخاصة السيد باسل الحلبي و
الأنسة فاتن معسعس على الجهود الكبيرة التي قدماها من الناحية العلمية و التقنية، و الزميل الدكتور
حسام مراد على المشورة العلمية و النصائح المفيدة، وكذلك السيد أيمن الأبلوج و السيد هاني سعيد و
السيد صياح نويدر و السيد أمير دبول و السيدة سهير الميداني والسيدة منار على الجهود الطيبة
وكافة كوادر دائرة الوراثة البشرية في هيئة الطاقة الذرية .

شكر خاص إلى كل من ساعدني في تأمين عينات الدم .

إلى كل من شجعني من أجل متابعة تحصيلي العلمي و الوصول إلى درجة الدكتوراه و لم يتوقف

عن مساعدتي حتى في الأوقات الصعبة التي واجهتني أثناء العمل اعتزازي و تقديري.

المراجع

Reference

A

Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppa L, Louhio H, Tuuri T, Sjoberg J, Butzow R. (1999) Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 84: 2744–2750.

ACOG committee opinion. No. 338: Screening for fragile X syndrome. *Obstet Gynecol* 2006, 107: 1483-1485.

Albertini DF, Barrett SL.(2003) Oocyte-somatic cell communication. *Reprod Suppl.* 61:49-54.

Al-taee HA.(2014) Risk Factors for Premature Ovarian Failure in Women from Babylon/ Iraq. *Medical Journal of Babylon.* 11: 130-138.

American Society for Reproductive Medicine.(2008) Smoking and Infertility. *Fertil Steril.* 90 (5 Suppl): S254–9.

American Society for Reproductive Medicine. (2009) Fertility fact Female Risks .

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. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 89: 2745–2749.

B

Bakalov VK, Anasti JN, Calis KA, Vanderhoof VH, Premkumar A, Chen S. (2005) Autoimmune oophoritis as a mechanism of follicular dysfunction in women with 46,XX spontaneous premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 84:958–965.

Bandyopadhyay S, Chakrabarti J, Banerjee S, Pal AK, Bhattacharyya D, Goswami SK, Chakravarty BN, Kabir SN.(2003) Prenatal exposure to high galactose adversely affects initial gonadal pool of germ cells in rats. *Hum Reprod.* 18:276-82.

Barrett DS. (2003) A software tool to straighten cured chromosome images. *Chromosome research.* 11:83-88.

Baronchelli S, Villa N, Redaelli S, Lissoni S, Saccheri F, Panzeri E, Conconi D, Bentivegna A, Crosti F, Sala E, Bertola F, Marozz A, Pedicini A, Ventruto M,

Police MA, Dalpra L. (2012) Investigating the role of X chromosome breakpoints in premature ovarian failure. *Molecular Cytogenetics*. 5:32.

Beke A, Piko H, Haltrich I, Csomor J, Matolcsy A, Fekete G, Rigo J, Karcagi V. (2013) Molecular cytogenetic analysis of Xq critical regions in premature ovarian failure. *Mol Cytogenet*. 6:62. doi: 10.1186/1755-8166-6-62.

Bione S, Rizzolio F, Sala C, Ricotti R, Goegan M, Manzini MC, attaglia R, Marozzi A, Vegetti W, Dalpra L, Crosigniani PG, Ginelli E, Nappi R, Bernabini S, Bruni V, Torricelli F, Zuffardi O, Toniolo D. (2004) Mutation analysis of two candidate genes for premature ovarian failure, DACH2 and POF1B. *Hum Reprod*. 19:2759-2766.

Bione S, Sala C, Manzini C, Arrigo G, Zuffardi O, Banfi S, Borsani G, Jonveaux P, Philippe C, Zuccotti M, Ballabio A, Toniolo D. (1998) A human homologue of the *Drosophila melanogaster* diaphanous gene is disrupted in a patient with premature ovarian failure: evidence for conserved function in oogenesis and implications for human sterility. *Am J Hum Genet*. 62:533-541.

Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL, Sawyer HR. (1999) Molecular cloning of the ovine Growth/Differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol Reprod*. 60:381-386.

Bone morphogenetic protein 15 gene mutations database: www.biobase-international.com/hgmd/BMP15

Bretherick KL, Hanna CW, Currie LM, Fluker MR, Hammond GL, Robinson WP. (2008) Estrogen receptor alpha gene polymorphisms are associated with idiopathic premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 89: 318-324.

Buccione R, Vanderhyden BC, Caron PJ, Eppig JJ. (1990) FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Dev Biol*. 138:16-25.

Bulletti C, Coccia ME, Battistoni S, Borini A. (2010) Endometriosis and infertility. *J Assist Reprod Genet*. 27: 441–447.

Burger HG, Groome NP, Robertson DM. (1998) Both inhibin A and B respond to exogenous follicle-stimulating hormone in the follicular phase of the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 83:4167-4169.

C

Chand AL, Harrison CA, Shelling AN. (2010) Inhibin and premature ovarian failure. *Molecular Human Reproduction*. 16: 39–50.

Chang H, Brown CW, Matzuk MM. (2002) Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocrine Reviews*. 23: 787–823.

Camaioni A, Camaioni VC, Hascall M, Yanagishita A, Salustri. (1993) Effects of exogenous hyaluronic acid and serum on matrix organization and stability in the mouse cumulus cell-oocyte complex. *J. Biol. Chem.* 268: 20473–20481.

Carabatsos MJ, Elvin J, Matzuk MM, Albertini DF. (1998) Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9- deficient mice. *Developmental Biology.* 204:373–384.

Chachamovich JR, Chachamovich E, Ezer H, Fleck MP, Knauth D et al. (2010) Investigating quality of life and health-related quality of life in infertility: a systematic review. *J Psychosom Obstet Gynaecol.* 31: 101–110.

Chang H, Brown CW, Matzuk MM. (2002) Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev.* 23:787–823.

Charlton H. (2008) Hypothalamic control of anterior pituitary function: a history. *J Neuroendocrinol.* 20: 641–646.

Clement-Jones M, Schiller S, Rao E, Blaschke RJ, Zuniga A, Zeller R, Robson SC, Binder G, Glass I, Strachan T. (2000) The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol Genet.* 9:695-702.

Chen PT, Russell WJ, Larsen. (1993) Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Mol. Reprod.* 34: 87–93.

Corrêa FJ, Tavares AB, Pereira RW, Abrão MS. (2010) A new FOXL2 gene mutation in a woman with premature ovarian failure and sporadic blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome. *Fertil Steril.* 93:1006.e3-6.

Cox L, Liu J H. (2014) Primary ovarian insufficiency: an update. *Int J Womens Health.* 6: 235–243.

Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S, Serafina Ristaldi M, Marzella R, Rocchi M, Nicolino M, Lienhardt-Roussie A, Nivelon A, Verloes A, Schlessinger D, Gasparini P, Bonneau D, Cao A, Pilia G. (2001) The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis /ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet.* 27: 159-166.

Cordts EB, Christofolini DM, Dos Santos AA, Bianco B, Barbosa CP. (2011) Genetic aspects of premature ovarian failure: a literature review. *Arch Gynecol Obstet.* 283:635-643.

D

Dewailly D, Lujan ME, Carmina E, Cedars MI, Laven J, Norman RJ, Escobar-Morreale HF. (2014) Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Hum Reprod Update.* 20: 334–352.

Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L. (2004) Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet.* 75:106–111.

Di Pasquale E, Rossetti R, Marozzi A, Bodega B, Borgato S, Cavallo L, Einaudi S, Radetti G, Russo G, Sacco M, Wasniewska M, Cole T, Beck-Peccoz P, Nelson LM, Persani L. (2006) Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 91:1976–1979.

Dixit H, Deendayal M, Singh L. (2004) Mutational analysis of the mature peptide region of inhibin genes in Indian women with ovarian failure. *Hum Reprod.* 19:1760-1764.

Dixit H, Rao LK, Padmalatha V, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, Chakravarty B, Singh L. (2005) Mutational screening of the coding region of growth differentiation factor 9 gene in Indian women with ovarian failure. *Menopause.* 12: 749–754.

Dixit H, Rao LK, Padmalatha VV, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, Chakrabarty B, Singh L. (2006) Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Hum Genet.* 119:408–415.

Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. (1996) Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature.* 383:531-535.

Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM. (1998) The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol.* 12:1809-1817.

Ebrahimi M, Akbari Asbagh F. (2011) Pathogenesis and causes of premature ovarian failure: an update. *Int J Fertil Steril.* 5:54-65.

E

Eggermann T, Meschede D, Schuler H, Palm S, Glaser D, Horsthemke B, Eggermann K, Haverkamp F, Zerres K. (2005) Premature ovarian failure associated with a small terminal Xq deletion: narrowing the POF1 region down to Xq27.2/Xq27.3-qter. *Clin Genet.* 67:434-437.

Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM. (1999a) Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol.* 13:1035-1048.

Elvin JA, Yan C, Wang P, Nishimori K, Matzuk MM. (1999 b) Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Mol Endocrinol.* 13:1018-1034.

Elvin JA, Yan C, Matzuk MM. (2000a) Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:10288-10293.

Elvin JA, Yan C, Matzuk MM. (2000b) Oocyte-expressed TGF- β superfamily members in female fertility. *Mol Cell Endocrinol.* 159:1-5.

Ennis S, Ward D, Murray A. (2006) Nonlinear association between CGG repeat number and age of menopause in FMR1 premutation carriers. *Eur J Hum Genet.* 14:253-255.

F

Fabre S, Pierre A, Mulsant P, Bodin L, Di Pasquale E, Persani L, Monget P, Monniaux D. (2006) Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reprod Biol Endocrinol.* 4:20.

Farquhar CM, Sadler L, Harvey SA, Stewart AW. (2005) The association of hysterectomy and menopause: a prospective cohort study. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology.* 112: 956–962.

Fassnacht W, Mempel A, Strowitzki T, Vogt PH. (2006) Premature ovarian failure (POF) syndrome: towards the molecular clinical analysis of its genetic complexity. *Curr Med Chem.* 13:1397-410.

Ferin M. (2008) The Hypothalamic-Hypophyseal-Ovarian Axis and the Menstrual Cycle. *Glob libr women's med* ISSN: 1756-2228; DOI 10.3843/GLOWM.10283.

Ferreira SI, Matoso E, Pinto M, Almeida J, Liehr T, Melo JB, Carreira IM. (2010) X-chromosome terminal deletion in a female with premature ovarian failure: Haploinsufficiency of X-linked genes as a possible explanation. *Molecular Cytogenetics.* 3:14 doi:10.1186/1755-8166-3-14.

Fimiani G, Laperuta C, Falco G, Ventruto V, D'Urso M, Ursini MV, Miano MG. (2006) Heterozygosity mapping by quantitative fluorescent PCR reveals an interstitial deletion in Xq26.2-q28 associated with ovarian dysfunction. *Hum Reprod.* 21:529-535.

Fitzpatrick SL, Sindoni DM, Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler IJ, Frail DE. (1998a) Expression of growth differentiation factor-9 messenger ribonucleic acid in ovarian and nonovarian rodent and human tissues. *Endocrinology.* 139:2571-2578.

Fitzpatrick SL, Sindoni DM, Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler IJ. (1998b) ribonucleic acid in ovarian and nonovarian rodent and human tissues. *Endocrinology.* 139:2571-2578.

Forabosco A, Sforza C, De Pol A, Vizzotto L, Marzona L, Ferrario VF. (1991) Morphometric study of the human neonatal ovary. *Anat Rec.* 231:201-208.

Cadauid AL, Ginzel A, Fischer JA. (2000) The function of the Drosophila fat facets deubiquitinating enzyme in limiting photoreceptor cell number is intimately associated with endocytosis. *Development* 127: 1727-1736.

G

Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MPE, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Ritvos O. (2000) Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat. Genet.* 25: 279–283.

Gershon E, Plaks V, Dekel N. (2008) Gap junctions in the ovary: expression, localization and function. *Mol Cell Endocrinol.* 282:18-25.

Gnoth C, Godehardt E, Frnk-HerrmannP, Friol K, Tigges J, Freundl G.(2005) Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum Reprod.* 20:1144-1147.

Goswami D, Conway GS. (2005) Premature ovarian failure. *Hum Reprod Update.* 11: 391-410.

Goswami D, Conway GS. (2007) Premature ovarian failure. *Horm Res.* 68:196–202.

Goswami R, Goswami D, Kabara M, Gupta N, Dubey S, DadhwalV. (2003) Prevalence of the triple X syndrome in phenotypically normal women with premature ovarian failure and its association with autoimmune thyroid disorders. *Fertil Steril.* 80: 1052-1054.

Gougeon A: (1996) Regulation of ovarian follicular development in primates. facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 17:121-155.

Growth differentiation factor 9 gene mutations database: www.biobase-international.com/hgmd/GDF9

Gueripel X, Brun V, Gougeon A. (2006) Oocyte bone morphogenetic protein 15, but not growth differentiation factor 9, is increased during gonadotropin-induced follicular development in the immature mouse and is associated with cumulus oophorus expansion. *Biol Reprod.* 75:836–843.

H

Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM. (2004) Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod.* 70:900–909.

Harris SE, Chand AL, Gersak K, Aittomaki K, Winship I, Shelling AN. (2002) Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. *Molecular Human Reproduction.* 8: 729–733.

Hashimoto O, Moore RK , Shimasaki S. (2005) Posttranslational processing of mouse and human BMP-15: potential implication in the determination of ovulation quota. *PNAS*. 102: 5426–5431.

Hassan FA, Mandour I, Mohey A, Nasr AS, Zeyada R, Bishr E.(2012) Mutational Analysis of Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) and Inhibin Alpha Gene in Egyptian Females with Ovarian Failure. *Acta Endo (Buc)*. 8: 345-356.

Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, van Duin M, Hsueh AJ. (1999) Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology*. 140:1236–1244.

Hernando C, Plaja A, Catala V, Sarret E, Egozcue J, Fuster C. (2004) Primary amenorrhea in a women with a cryptic complex chromosome rearrangement involving the critical regions Xp11. 2 and Xq 24. *Fertil Steril*. 82:1666-1671.

Hreinsson JG, Scott JE, Rasmussen C, Swahn ML, Hsueh AJ, Hovatta O.(2002) Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab*. 87:316-321.

Huang Q, Cheung AP, Zhang Y, Huang HF, Auersperg N, Leung PC. (2009) Effects of growth differentiation factor 9 on cell cycle regulators and ERK42/44 in human granulosa cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 296: 1344–1353.

Huang A, Brennan K, Azziz R. Prevalence of hyperandrogenemia in the polycystic ovary syndrome diagnosed by the National Institutes of Health 1990 criteria. *Fertil Steril*. 93: 1938–1941.

Hurles M.(2004) Gene duplication: The genomic trade in spare parts. *PLoS Biol* 2 (7): E206.doi:10.1371/journal.pbio.0020206.

Hussein TS, Froiland DA, Amato F, Thompson JG, Gilchrist RB.(2005)Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci*. 118: 5257–5268.

I

ISCN, 2005 An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Shaffer L.G., Tommerup N.(eds); S.Karger,Basel.

J

Jaatinen R, Laitinen MP, Vuojolainen K, Aaltonen J, Louhio H, Heikinheimo K, Lehtonen E, Ritvos O. (1999) Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homolog GDF-9B. *Mol Cell Endocrinol*. 156:189–193.

Jeong HJ, Cho SW, Kim HA, Lee SH, Cho JH, Choi DH. (2008) G769 A variation of inhibin alpha -gene in Korean women with premature ovarian failure. *Yonsei Med J.* 45: 479-482.

Jin P, Zarnescu DC, Zhang F, Pearson C, Lucchesi JC, Moses K. (2003) RNA -mediated neurodegeneration caused by the fragile X permutation rCGG repeats in *Drosophila*. *Neuron.* 39: 739-747.

Johnstone O, Deuring R, Bock R, Linder P, Fuller MT, Lasko P. (2005) Belle is a *Drosophila* DEAD-box protein required for viability and in the germ line. *Dev Biol.* 277: 92-101.

Jornvall H, Blokzijl A, ten Dijke P, Ibanez CF. (2001) The orphan receptor serine/threonine kinase ALK7 signals arrest of proliferation and morphological differentiation in a neuronal cell line. *J Biol Chem.* 276:5140–5146.

Joyce IM, Clark AT, Pendola FL, Eppig JJ. (2000) Comparison of recombinant growth differentiation factor-9 and oocyte regulation of KIT ligand messenger ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles. *Biol Reprod.* 63:1669-1675.

Juengel JL, Hudson NL, Heath DA, Smith P, Reader KL, Lawrence SB, O'Connell AR, Laitinen MPE, Cranfield M, Groome NP, Ritvos O, McNatty KP. (2002) Growth differentiation factor-9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol Reprod.* 67: 1777–1789.

Juengel JL, Hudson NL, Whiting L, McNatty KP. (2004) Effects of immunization against bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 on ovulation rate, fertilization, and pregnancy in ewes. *Biol Reprod.* 70: 557–561.

Juengel JL, McNatty KP. (2005) The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Human Reproduction Update.* 11: 143–160.

K

Kaivo-Oja N. (2007) Growth Differentiation Factor 9 Signalling in the Ovary. Helsinki University Biomedical Dissertations. 86:1- 82.

Kaufman FR, Reichardt JK, Ng WG, Xu YK, Manis FR, McBride-Chang C. (1994) Correlation of cognitive, neurologic, and ovarian, outcome with the Q188R mutation of galactose-1-phosphate uridyltransferase gene. *J Pediatr.* 125: 225-227.

Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. (1998) Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9:49–61.

Knight PG, Glistler C. (2003) Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Animal Reproduction Science.* 78: 165–183.

Knight PG, Glister C. (2006) TGF-beta superfamily members and ovarian development. *Reproduction*. 132:191–206.

Kim JH, Park KC, Chung SS, Bang O, Chung CH. (2003) Deubiquitinating enzymes as cellular regulators. *J Biochem*. 134 :9-18.

Kokcu A.(2010) Premature ovarian failure from current perspective. *Gynecol Endocrinol*. 26: 555-562.

Kovanci E, Rohozinski J, Simpson JL, Heard MJ, Bishop CE, Carson SA. (2007) Growth differentiating factor-9 mutations may be associated with premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 87:143-146.

Krauss CM, Turksoy RN, Atkins L, McLaughlin C, Brown LG,Page DC. (1987) Familial premature ovarian failure due to an interstitial deletion of the long arm of the X chromosome. *N Engl J Med*. 317:125-131.

L

Lachlan KL, Youings S, Costa T, Jacobs PA, Thomas NS. (2006) A clinical and molecular study of 26 females with Xp deletions with special emphasis on inherited deletions. *Hum Genet*. 118:640-651.

Lacombe A, Lee H, Zahed L, Choucair M, Muller JM, Nelson SF, Salameh W, Vilain E. (2006).Disruption of POF1B binding to nonmuscle actin filaments is associated with premature ovarian failure. *Am J Hum Genet*. 79: 113-119.

Laissue P, Christin-Maitre S, Touraine P, Kuttann F, Ritvos O, Aittomaki K, Bourcigaux N, Jacquesson L, Bouchard P, Frydman R, Dewailly D, Reyss AC, Jeffery L, Bachelot A, Massin N, Fellous M, Veitia RA. (2006) Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol*. 154:739–744.

Laissue P, Vinci G, Veitia RA, Fellous M. (2008) Recent advances in the study of genes involved in non-syndromic premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol*. 282:101-111.

Laitinen M, Vuojolainen K, Jaatinen R, Ketola I, Aaltonen J, Lehtonen E, Heikinheimo M, Ritvos O. (1998) A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mech Dev*. 78:135-140.

Lakhal B, Laissue P, Braham R, Elghezal H, Saa'd A, Fellous M, Veitia RA. (2009) A novel BMP15 variant, potentially affecting the signal peptide, in a familial case of premature ovarian failure. *Clin Endocrinol*. 71:752–753.

Laml T, Preyer O, Umek W, Hengstschlager M, Hanzal H. (2002) Genetic disorders in premature ovarian failure. *Hum Reorod Update*. 8: 483-491.

Ledig S, Roöpke A, Haeusler G, Hinney B, Wieacker P. (2008) BMP15 mutations in XX gonadal dysgenesis and premature ovarian failure. *Am J Obstet Gynecol.* 198:84e1–85.

Liao WX, Moore RK, Shimasaki S. (2004) Functional and molecular characterization of naturally occurring mutations in the oocyte-secreted factors bone morphogenetic protein-15 and growth and differentiation factor-9. *J Biol Chem.* 279:17391–17396.

Li Q1, McKenzie LJ, Matzuk MM. (2008) Revisiting oocyte-somatic cell interactions: in search of novel intrafollicular predictors and regulators of oocyte developmental competence. *Mol Hum Reprod.* 14:673-678.

Li Q, Pangas SA, Jorgez CJ, Graff JM, Weinstein M, Matzuk MM . (2008) Redundant roles of SMAD2 and SMAD3 in ovarian granulosa cells in vivo. *Mol Cell Biol.* 28:7001-7011.

Li Q, Rajanahally S, Edson MA, Matzuk MM. (2009) Stable expression and characterization of N-terminal tagged recombinant human bone morphogenetic protein 15. *Mol Hum Reprod.* 15:779–788.

Lim BC, Paria SK, Das JE, Dinchu kR, Langenbach JM, Trzaskos SK, Dey.(1997) Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell.* 91: 197–208.

Locatelli N, Camelin K, Bodega B, Bione S, Toniolo D, Santoro C. (2008) Molecular characterization of premature ovarian failure associated with FMR1 premutation. *Eur JHum Genet.* 2: 275-283.

Luoh SW, Bain PA, Polakiewicz RD, Goodheart ML, Gardner H, Jaenisch R, Page DC. (1997) Zfx mutation results in small animal size and reduced germ cell number in male and female mice. *Development.* 124: 2275-2284.

M

Macklon NS, Fauser BC. (2001) Follicle-stimulating hormone and advanced follicle development in the human. *Arch Med Res.* 32:595-600.

Ma L, Chen Y, Mei S, Liu C, Ma X, Li Y, Jiang Y, Ha L, Xu X.(2015) Single nucleotide polymorphisms in premature ovarian failure-associated genes in a Chinese Hui population. *Mol Med Rep.* 12:2529-2538.

Mancini T, Casanueva FF, Giustina A. (2008) Hyperprolactinemia and Prolactinomas. *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America.* 37: 67.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter, Sudarsanam S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 298:1912–1934.

Mansouri MR, Schuster J, Badhai J, Stattin EL, Lösel R, Wehling M, Carlsson B, Hovatta O, Karlström PO, Golovleva I, Toniolo D, Bione S, Peluso J, Dahl N. (2008) Alterations in the expression, structure and function of progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) in premature ovarian failure. *Hum Mol Genet.* 17:3776-3783.

Marozzi A, Manfredini E, Tibiletti MG, Furlan D, Villa N, Vegetti W, Crosignani PG, Ginelli E, Meneveri R, Dalpra L. (2000) Molecular definition of Xq common-deleted region in patients affected by premature ovarian failure. *Hum Genet.* 107:304-311.

Mazerbourg S, Hsueh AJ. (2006) Genomic analyses facilitate identification of receptors and signalling pathways for growth differentiation factor 9 and related orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands. *Hum Reprod Update.* 12: 373-383.

Mazerbourg S, Klein C, Roh J, Kaivo-Oja N, Mottershead DG, Korchynski O, Ritvos O, Hsueh AJ. (2004) Growth differentiation factor-9 signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5. *Mol Endocrinol.* 18:653-665.

Mc Grath SA, Esqueda AF, Lee SJ . (1995) Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol.* 9:131-136.

McNatty KP, Smith P, Moore LG, Reader K, Lun S, Hanrahan JP, Groome NP, Iitinen M, Ritvos O, Juengel JN. (2005) Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate. *Mol Cell Endocrinol.* 234:57-66.

McMahon HE, Sharma S, Shimasaki S. (2008) Phosphorylation of bone morphogenetic protein-15 and growth and differentiation factor-9 plays a critical role in determining agonistic or antagonistic functions. *Endocrinology.* 149:812-817.

McPherron AC, Lee SJ. (1993) GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J Biol Chem.* 268:3444-3449.

Meduri G, Touraine P, Beau I, Lahuna O, Desroches A, Vacher-Lavenu MC. (2003) Delayed puberty and primary amenorrhea associated with a novel mutation of the follicle-stimulating hormone receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 88:3491-3498.

Mills RE, Luttig CT, Larkins CE, Beauchamp A, Tsui C, Pittard WS, Devine SE. (2006) An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. *Genome Res.* 16:1182-1190.

Mills RE, Pittard WS, Mullaney JM, Farooq U, Creasy TH, Mahurkar AA, Kemeza DM, Strassler DS, Ponting CP, Webber C, Devine SE. (2011) Natural genetic variation caused by small insertions and deletions in the human genome. *Genome Res.* 21:830-839.

Moore RK, Shimasaki S. (2005) Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 234 :67-73.

Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S. (2003) Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *J Biol Chem.* 278:304–310.

Moran LJ, Misso ML, Wild RA, Norman RJ. (2010) Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 16: 347–363.

Morón FJ, Mendoza N, Quereda F, Vázquez F, Ramírez-Lorca R, Velasco J, Gallo JL, Salinas A, Martínez-Astorquiza T, Sánchez-Borrego R, Sáez ME, Ruiz A. (2007) Pyrosequencing technology for automated detection of the BMP15 A180T variant in Spanish postmenopausal women. *Clin Chem.* 53:1162-1164.

Mullaney JM, Mills RE, Pittard WS, Devine SE. (2010) Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes. *Hum Mol Genet.* 2010, 19: 131-136.

N

Nelson LR, Bulun SE. (2001) Estrogen production and action. *J. Am. Acad. Dermatol.* 45: 116–124.

Nicol L, Bishop SC, Pong-Wong R, et al. (2009) Homozygosity for a single base-pair mutation in the oocyte-specific GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep. *Reproduction.* 138:921–933.

Nilsson EE, Skinner MK.(2002) Growth and Differentiation Factor-9 Stimulates Progression of Early Primary but Not Primordial Rat Ovarian Follicle Development. *Biology of Reproduction.* 67:1018–1024.

Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, Houck GE Jr, Gargano AD, ullivan A, Biancalana V, Brondum-Nielsen K, Hjalgrim H, Holinski-Feder E . (2003) Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am J Hum Genet.* 72:454-464.

O

Ogata T, Matsuo N. (1995) Turner syndrome and female sex chromosome aberrations: deduction of the principal factors involved in the development of clinical features. *Hum Genet.* 95:607-629.

Orisaka M, Jiang JY, Orisaka S, Kotsuji F, Tsang BK. (2009) Growth differentiation factor 9 promotes rat preantral follicle growth by up-regulating follicular androgen biosynthesis. *Endocrinology.* 150: 2740–2748.

Orisaka M, Orisaka S, Jiang JY, Craig J, Wang Y, Kotsuji F, Tsang BK. (2006) Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Mol Endocrinol.* 20:2456-2468.

Otsuka F, Shimasaki S. (2002a) A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:8060-8065.

Otsuka F, Shimasaki S. (2002b) A novel function of bone morphogenetic protein-15 in the pituitary: selective synthesis and secretion of FSH by gonadotropes. *Endocrinology.* 143:4938–4941.

Otsuka F, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. (2001) Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *J Biol Chem.* 276:11387–11392.

Otsuka F, Yao Z, Lee TH, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. (2000) Bone morphogenetic protein-15: Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem.* 275:39523–39528.

P

Palmer JS, Zhao ZZ, Hoekstra C, Hayward NK, Webb PM, Whiteman DC, Martin NG, Boomsma DI, Duffy DL, Montgomery GW. (2006) Novel variants in growth differentiation factor 9 in mothers of dizygotic twins. *J Clin Endocrinol Metab.* 91:4713–4716.

Paulini F& Melo EO. (2011) The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. *Reprod Domest Anim.* 46:354-361.

Persani L, Rossetti R, Cacciatore C, Bonomi M. (2009) Primary Ovarian Insufficiency: X chromosome defects and autoimmunity. *J Autoimmun.* 33:35-41.

Persani L, Rossetti R, Cacciatore C. (2010) Genes involved in human premature ovarian failure. *J Mol Endocrinol.* 45: 257-279.

Persani L, Rossetti R, Di Pasquale E, Cacciatore C, Fabre S.(2014) The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Hum Reprod Update.* 20: 869-883.

Picton H, Briggs D, Gosden R: (1998) The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol.* 145:27-37.

Picton HM, Harris SE, Muruvoi W, Chambers EL. (2008) The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction.* 136: 703–715.

Portnoi MF, Aboura A, Tachdjian G, Bouchard P, Dewailly D. (2006) Molecular cytogenetic studies of Xq critical regions in premature ovarian failure patients. *Hum Reprod.* 21: 2329-2334.

Pouresmaeill F, Fallahian M, Azizi F, Azargashb E, Arian N, Shirafkan A. (2007) Chromosomal abnormalities in women with premature ovarian failure. *J Reprod Infertil.* 8: 142-148.

Prabhakar VK, Shalet SM. (2006) Aetiology, diagnosis, and management of hypopituitarism in adult life. *Postgrad Med J.* 82: 259–266.

Prochazka R, Nemcova L, Nagyova E, Kanka J. (2004) Expression of growth differentiation factor 9 messenger RNA in porcine growing and preovulatory ovarian follicles. *Biol Reprod.* 71:1290–1295.

Prueitt RL, Chen H, Barnes RI, Zinn AR. (2002) Most X;autosome translocations associated with premature ovarian failure do not interrupt X-linked genes. *Cytogenet Genome Res.* 97:32-38.

Prueitt RL, Ross JL, Zinn AR. (2000) Physical mapping of nine Xq translocation breakpoints and identification of XPNPEP2 as a premature ovarian failure candidate gene. *Cytogenet Cell Genet* 89:44-50.

Pu D, Xing Y, Gao Y, Gu L, Wu J.(2014) Gene variation and premature ovarian failure: a meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 182:226–237

Q

Quilter CR, Karcanias AC, Bagga MR, Duncan S, Murray A. (2010) Analysis of X chromosome genomic DNA sequence copy number variation associated with premature ovarian failure (POF). *Hum Reprod.* 25: 2139-150.

R

Rocak S, Linder P. (2004) DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 232-241.

Roh JS, Bondestam J, Mazerbourg S, Kaivo-Oja N, Groome N, Ritvos O, Hsueh AJ. (2003) Growth differentiation factor-9 stimulates inhibin production and activates Smad 2 in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology.* 144:172–178.

Rosendahl M, Andersen C, La Cour Freiesleben N, Juul A, Løssl K, Andersen A. (2010) Dynamics and mechanisms of chemotherapy-induced ovarian follicular depletion in women of fertile age. *Fertility and Sterility.* 94: 156–166.

Rong Li, David F. (2013) The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 14: 141-152

Rossetti F, Rizzolio F, Pramparo T, Sala C, Bione S, Bernardi F, Goegan M, Zuffardi O, Toniolo D. (2004) A susceptibility gene for premature ovarian failure (POF) maps to proximal Xq28. *Eur J Hum Genet.* 12:829-834.

Rossetti R, Di Pasquale E, Marozzi A, Bione S, Toniolo D, Grammatico P, Nelson L M, Beck-Peccoz P, Persani L. (2009) BMP15 mutations associated with primary

ovarian insufficiency cause a defective production of bioactive protein. *Hum Mutat.* 30: 804-810.

Russell DL, Robker RL. (2007) Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update.* 13: 289-312.

S

Saito S, Yano K, Sharma S, McMahon HE, Shimasaki S. (2008) characterization of the post-translational modification of recombinant human BMP-15 mature protein. *Protein Sci.* 17:362-370.

Salustri A, Ulisse S, Yanagishita M, Hascall VC. (1990) Hyaluronic acid synthesis by mural granulosa cells and cumulus cells in vitro is selectively stimulated by a factor produced by oocytes and by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* 265:19517-19523.

Salustri A, Maccagno G, Siracusa C, Garlanda B, Bottazi A, Doni A, Bastone A, Mantovani E, Hirsch M, De Acetis G, Mantovani PB, Peccoz G, Salvatori DJ, Mahoney AJ, Day L, Romani.(2004)PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. *Development.* 131:1577–1586.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.* 74: 5463–5467.

Shelling AN. (2010) Premature ovarian failure. *Reproduction.* 140: 633-641.

Schlessinger D, Herrera L, Crisponi L, Mumm S, Percesepe A, Pellegrini M, Pilia G, Forabosco A. (2002) Genes and translocations involved in POF. *Am J Med Genet.* 111:328-333.

Schneider HJ, Aimaretti G, Kreitschmann-Andermahr I, Stalla GK, Ghigo E. (2007) Hypopituitarism. *Lancet.* 369: 1461–1470.

Sherman SL. (2000) Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 97:189–194.

Shi FT, Cheung AP, Klausen C, Huang HF, Leung PC. (2010) Growth Differentiation Factor 9 Reverses Activin A Suppression of Steroidogenic Acute Regulatory Protein Expression and Progesterone Production in Human Granulosa-Lutein Cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 95: 72-80.

Shi FT, Cheung AP, Leung PC. (2009) Growth differentiation factor 9 enhances activin a-induced inhibin B production in human granulosa cells. *Endocrinology.* 150: 3540–3546.

Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. (2004) The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine Reviews.* 25: 72–101.

Simpson C M, Robertson DM, Al-Musawi S L, Heath D A, McNatty K P, Ritter L J, Mottershead DG, Gilchrist R B. (2014) Aberrant GDF9 Expression and Activation Are Associated With Common Human Ovarian Disorders. *J Clin Endocrinol Metab.* 99:E615–E624.

Shuiqing M, Xuming B, Jinghe L. (J 2002) Pregnancy and its outcome in women with malformed uterus . *Chin Med Sci.* 17: 242–245.

Simpson JL . (2008) Genetic and phenotypic heterogeneity in ovarian failure: overview of selected candidate genes. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1135 :146–154.

Souchelnytskyi S, ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH. (1996) Phosphorylation of Ser165 in TGF-beta type I receptor modulates TGF-beta1-induced cellular responses. *EMBO J.* 15:6231–6240.

Spicer LJ, Aad PY, Allen DT, Mazerbourg S, Hsueh AJ. (2006) Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. *J Endocrinol.* 189:329-339.

Spicer LJ, Aad PY, Allen DT, Mazerbourg S, Payne AH, Hsueh AJ. (2008) Growth differentiation factor 9 (GDF9) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis by bovine theca cells: influence of follicle size on responses to GDF9. *Biol Reprod.* 78: 243–253.

Stigliani S, Anserini P, Nicoletti AJ, Di Luca M, Sozzi F, Venturini PL, Scaruffi P. (2013) Insight into the Genomics of Premature Ovarian Failure. *J Mol Genet Med.* 7:78.

Strachan T, Read A. (2004) *Human Molecular Genetics* 3rd ed. Garland Science publishing.

Sugino N, Suzuki T, Sakata A. (2005) Angiogenesis in the human corpus luteum: changes in expression of angiopoietins in the corpus luteum throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 90 :6141-6148.

Sullivan AK, Marcus M, Epstein MP, Allen EG, Anido AE, Paquin JJ, Yadav-Shah M, Sherman SL. (2005) Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction. *Hum Reprod.* 20:402-412.

Su YQ, Sugiura K, Li Q, Wigglesworth K, Matzuk MM, Eppig JJ. (2010) Mouse oocytes enable LH-induced maturation of the cumulus-oocyte complex via promoting EGF receptor-dependent signaling. *Mol Endocrinol.* 24:1230–1239.

Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Affourtit JP, Pangas SA, Matzuk MM, Eppig JJ. (2008) Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development.* 135: 111–121.

Su K, Pendola FL, Eppig JJ. (2005) Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Dev Biol.* 279:20–30.

Sybert VP, McCauley E. (2004) Turner's syndrome. *N Engl J Med.* 351: 1227- 1238.

T

Takebayashi K, Takakura K, Wang H, Kimura F, Kasahara K, Noda Y . (2000) Mutation analysis of the growth differentiation factor-9 and -9B genes in patients with premature ovarian failure and polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility.* 74 :976–979.

Teede H, Deeks A, Moran L.(2010) Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC Med.* 8: 41.

Tejada MI, Garcia-Alegria E, Bilbao A, Marti`nez-Bouzas C, Beristain Eoch M, Ramos-Arroyo MA, Lo`pez B, Fernandez Carvajal I, Ribate MP, Ramos F. (2008) Analysis of the molecular parameters that could predict the risk of manifesting premature ovarian failure in female premutation carriers of fragile X syndrome. *J North Am Menop Soc.* 15:945–949.

Ten Broek RPG, Kok- Krant N, Bakkum EA, Bleichrodt RP, Van Goor H. (2012) Different surgical techniques to reduce post-operative adhesion formation: A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update.* 19: 12–25.

ten Dijke P, Ichijo H, Franzen P, Schulz P, Saras J, Toyoshima H, Heldin CH, Miyazono K. (1993) Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene.* 8:2879–2887.

Tiotiu D, Alvaro Mercadal B, Imbert R, Verbist J, Demeestere I, De Leener A, Englert Y, Vassart G, Costagliola S, Delbaere A. (2010) Variants of the BMP15 gene in a cohort of patients with premature ovarian failure. *Hum Reprod.* 25:1581-1587.

Toniolo D. (2006) X-linked premature ovarian failure: a complex disease. *Curr Opin Genet Dev.* 16: 293-300.

V

van den Hurk R, Zhao J. (2005) Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology.* 63:1717-1751.

Van Esch H. (2006) The fragile X permutation: new insights and clinical consequences. *Eur J Med Genet.* 49:1-8.

Vanderhyden BC, Caron PJ, Buccione R, Eppig JJ. (1990) Developmental pattern of the secretion of cumulus expansion-enabling factor by mouse oocytes and the role of oocytes in promoting granulosa cell differentiation. *Dev Biol.* 140:307-317.

Vanderhyden BC, Macdonald EA, Nagyova E, Dhawan A. (2003) Evaluation of members of the TGFbeta superfamily as candidates for the oocyte factors that control mouse cumulus expansion and steroidogenesis. *Reprod Suppl.* 61:55-70.

Väli U, Brandström M, Johansson M, Ellegren H. (2008) "Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations. *BMC Genetic.* 9:8.

Varani S, Elvin C, Yan J, DeMayo FJ, DeMayo HF, Horton MC, Byrne MM, Matzuk. (2002) Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility. *Mol. Endocrinol.* 16 :1154–1167.

Verma RS&, Babu A. (1995) *Human chromosomes: Principles and techniques*, 2nd edition. McGraw-Hill, New York, 419 p.p.

Vilodre LC, Moretto M, Kohek MB, Spritzer PM. (2007) Premature ovarian failure: present aspects. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 51:920–929.

Vitt UA, McGee EA, Hayashi M, Hsueh AJ: (2000) In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology.* 141: 3814-3820.

Vitt UA, Mazerbourg S, Klein C, Hsueh AJ. (2002) Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. *Biol Reprod.* 67:473–480.

Vujović S, Ivočić M, Tancić-Gajić M, Marina L, Barać M, Arizanović Z, Nenezić A, Ivanisević M, Micić J, Sajić S, Micić D.(2012) Premature ovarian failure. *Srp Arh Celok Lek.* 140:806-811.

W

Wang B, Wen Q, Ni F, Zhou S, Wang J, Cao Y, Ma X. (2010a) Analyses of growth differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) mutation in Chinese women with premature ovarian failure. *Clin Endocrinol.* 72:135–136.

Wang B, Zhou S, Wang J., (2010b) Identification of novel missense mutations of GDF9 in Chinese women with polycystic ovary syndrome. *Reprod Biomed Online.* 21:344–348.

Woad KJ, Pearson S M, Harris SE, Gersak K, Shelling AN. (2009) Investigating the association between inhibin alpha gene promoter polymorphisms and premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 91: 62-66.

Woad KJ, Watkins WJ, Prendergast D, Shelling AN. 2006 The genetic basis of premature ovarian failure. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 46: 242–244.

Wallace WHB, Kelsey TW. (2010) Human Ovarian Reserve from Conception to the Menopause. *PLOS ONE*. 5(1).

Watanabe R, Yamada Y, Ihara Y, Someya Y, Kubota A, Kagimoto S, Kuroe A, Iwakura T, Shen ZP, Inada A et al. (1999) The MH1 domains of smad2 and smad3 are involved in the regulation of the ALK7 signals. *Biochem Biophys Res Commun*. 254:707–712.

Weber JL, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, Marth G. (2002) Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 71:854-862.

Wieser R, Wrana JL, Massague J. (1995) GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *EMBO J*. 14:2199–2208.

Wittenberger MD, Hagerman RJ, Sherman SL, McConkie-Rosell A, Welt CK. (2007) The FMR1 premutation and reproduction. *Fertil Steril*. 87: 456-465.

World Health Organization. WHO Global prevalence of infertility, infecundity and childlessness. *PLOS Med*. 2012, 9 (12).

Y

Yan C, Elvin JA, Lin YN, Hadsell LA, Wang J, DeMayo FJ, Matzuk MM: (2006) Regulation of growth differentiation factor 9 expression in oocytes in vivo: a key role of the E-box. *Biol Reprod*. 74:999-1006.

Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL, Celeste AJ, Matzuk MM. (2001) Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol*. 15:854–866.

Yamoto M, Shima K, Nakano R. (1992) Gonadotropin receptors in human ovarian follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycle. *Horm Res* 37 Suppl. 1:5-11.

Yoshino O, McMahon HE, Sharma S, Shimasaki S. (2006) A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103 :10678–10683.

Z

Zhao H, Qin Y, Kovanci E, Simpson JL, Chen ZJ, Rajkovic A. (2007) Analyses of GDF9 mutation in 100 Chinese women with premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 88:1474–1476.

Zhao ZZ, Painter JN, Palmer JS, Webb PM, Hayward NK, Whiteman DC, Boomsma DI, Martin NG, Duffy DL, Montgomery GW. (2008) Variation in bone morphogenetic protein 15 is not associated with spontaneous human dizygotic twinning. *Hum Reprod.* 23:2372–2379.