دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیستم، شماره ۳، صفحه ۲۶۶ - ۲۵۷ (مرداد و شهریور ۱۳۹۶)

Iran South Med J 2017;20(3): 257-266

بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم rs397515615 ژن KISS1R با ناباروری ایدیوپاتیک در مردان

آزاده پورشریف [۱]، حمیدرضا وزیری [۱*]، طوبا میرزاپور [۲]

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

(دریافت مقاله: ۹۵/۶/۳۱- پذیرش مقاله: ۹۵/۸/۵)

چکیده

زمینه: ناباروری به عدم توفیق زوجین در باروری پس از یک سال مقاربت‌های منظم و بدون بهره‌گیری از روش‌های کنترل بارداری اطلاق می‌شود. توانایی باروری در پستانداران با بلوغ و به واسطهٔ ترشح هورمون‌های ضروری گنادوتروپین‌ها (GnRH) صورت می‌گیرد. پروتئین Kisspeptin (محصول ژن KISS1) وگیرنده آن (KISS1R) به عنوان یک تنظیم کننده حیاتی در ادغام سیگنال‌های مرکزی و محیطی با آزادسازی GnRH می‌باشند. در این مقاله ارتباط بین پلی‌مورفیسم rs397515615 ژن KISS1R با ناباروری ایدیوپاتیک در مردان بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تعداد ۵۰ مرد نابارور ایدیوپاتیک و ۵۰ مرد سالم (به عنوان کنترل) مورد آزمون قرار گرفتند. جهت تعیین پلی‌مورفیسم کدون یاد شده روش Allele Specific -PCR (AS-PCR) مورد استفاده قرار گرفت. همچنین برای بررسی ارتباط بین فراوانی ژنوتیپی و آللی در دو گروه بیمار و کنترل از آزمون Chi-Square (χ^2) استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد، فراوانی‌های ژنوتیپی مشاهده شده بین دو گروه سالم و بیمار نشانگر تفاوت معنی‌داری بین دو گروه است (P=۰/۰۲) در حالی که توزیع آلل‌ها (G و -) بین دو گروه بیمار و کنترل معنی‌دار نیست (P=۰/۲۰).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که پلی‌مورفیسم rs397515615 ژن KISS1R احتمالاً با ناباروری ایدیوپاتیک در مردان مرتبط است. اگرچه برای تأیید نتایج به دست آمده، مطالعات با تعداد بیشتر افراد بیمار و کنترل و نیز در جمعیت‌های جغرافیایی مختلف مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: rs397515615، ژن KISS1R، ناباروری مردان، پلی‌مورفیسم

* گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

E-mail: vaziri@guilan.ac.ir

مقدمه

به عدم باروری زوجین پس از یک سال مقاربت‌های منظم و بدون بهره‌گیری از روش‌های پیشگیری از باروری، ناباروری اطلاق می‌شود (۱). اختلال در تولید و عملکرد اسپرم را می‌توان به عوامل مختلف مادرزادی و یا اکتسابی ربط داد که به صورت فرایندهای پیش بیضه‌ای[1]، پس بیضه‌ای[2] و یا به طور مستقیم در سطح بیضه تأثیر می‌گذارند. عوامل ژنتیکی در ۱۵ درصد از موارد شناسایی شده‌اند. این دسته از عوامل می‌توانند در هر رده اتیولوژیک مشخص شوند. با وجود پیشرفت‌هایی که به طور عمده در زمینه ژنتیک حاصل شده، حدود ۲۵ درصد از موارد ناباروری به علل ناشناخته است که ناباروری ایدیوپاتیک نامیده می‌شود. به طور کلی عوامل پیش بیضه‌ای به دو دسته از شرایط پاتولوژیکی مرتبط می‌باشد، که شامل هیپوگنادوتروپیک هیپوگنادیسم و اختلالات مقاربتی است و در نهایت موجب اختلال نعوظ و اختلال انزال می‌شوند. اختلالات پس بیضه‌ای شامل مشکلاتی از قبیل: انسداد کامل یا بخشی از مجاری منی، عفونت‌ها و یا بیماری‌های التهابی غدد ضمیمه‌ای و ناباروری خود ایمن می‌باشد. از جمله بیماری‌هایی که ممکن است منجر به نارسایی اولیه در بیضه[3] شوند، شامل: عدم انتقال بیضه به کیسه بیضه[4]، التهاب بیضه[5]، ترومای بیضه[6]، پیچ‌خوردگی بیضه[7]، گنادوتوکسیک و جراحی‌های مربوط به کشاله ران[8] و همچنین برخی از بیماری‌های سیستمک و فاکتورهای ژنتیکی مانند ناهنجاری‌های کاریوتیپ و ریزحذف‌های کروموزوم Y می‌باشند که در نهایت موجب اختلال در تولید اسپرم می‌شوند (۲).

مطالعات اخیر نقش آلاینده‌های محیطی شامل: آلودگی هوا، آب‌های آلوده به فلزات سنگین، استروژن محیطی، سموم کارخانه‌ها و سایر آلاینده‌های محیطی را در ناباروری مردان آشکار ساخته است. به علاوه امواج رادیویی، ماکرو ویو و پارازیت‌ها نیز در کاهش کیفیت اسپرم مؤثر هستند. شغل افراد نیز به عنوان یکی عامل مؤثر در تعداد و کیفیت اسپرم مطرح می‌باشد. به عنوان مثال کیفیت اسپرم در افرادی که در هوای گرم کار می‌کنند و یا به مدت طولانی در آب‌های گرم قرار می‌گیرند، نسبت به سایر افراد پایین‌تر می‌باشد (۳ و ۴). توانایی باروری در پستانداران با بلوغ آغاز می‌شود. بلوغ به واسطهٔ هورمون‌های ضروری گنادوتروپین‌ها[9] که از تعداد محدودی از سلول‌های عصبی در هیپوتالاموس ترشح می‌شود، صورت می‌گیرد. گنادوتروپین‌ها از هیپوتالاموس به هیپوفیز ترشح شده و بر قسمت قدامی هیپوفیز اثر می‌کند و موجب ترشح هورمون LH و FSH می‌شود. هورمون‌های گنادوتروپیک با عمل بر روی غدد جنسی، بلوغ جنسی و گامتوژنز (اسپرماتوژنز در مرد و اووژنز در زن) را تحریک می‌کنند. غدد جنسی، استروئیدهای جنسی (تستوسترون در مردان، استروژن و

[1] Pre-testicular
[2] Post-testicular
[3] Primitive testicular dysfunction
[4] Cryptorchidism
[5] Orchitis
[6] Testis Trauma
[7] Torsions
[8] Inguinal Surgery
[9] GnRH

پروژسترون در زنان) را تولید می‌کنند که برای گامتوژنز، بلوغ اندام‌های جنسی و سایر تغییراتی که در طی بلوغ رخ می‌دهد ضروری می‌باشد. بنابراین سلول‌های عصبی GnRH یک جزء حیاتی از محور تولید مثل می‌باشند. اخیراً مشخص شده است که پروتئین Kisspeptin (محصول ژن KISS1) و گیرنده آن[10] به عنوان یک تنظیم کننده حیاتی در ادغام سیگنال‌های مرکزی و محیطی با آزادسازی گنادوتروپین‌ها عمل می‌کنند؛ بنابراین نقشی اساسی در کنترل باروری دارند (۵).

GPR54[11] که همچنین با نام KISS1R و یا AXOR12 نیز معرفی می‌شود، برای اولین بار در سال ۱۹۹۹ از مغز موش صحرایی[12] کلون شد (۶). ژن KISS1R انسانی بر روی کروموزوم ۱۹ (19q13.3) واقع شده است. دارای ۵ اگزون و ۴ اینترون می‌باشد؛ و طولی برابر 1197bp دارد که پروتئینی به طول ۳۶۸ اسیدآمینه را کد می‌کند. این پروتئین حاوی ۷ قطعه گذرنده از غشاء و نیز سه جایگاه گلیکوزیلاسیون می‌باشد (۷ و ۸). جهش‌هایی که در جهت افزایش بیان ژن KISS1R هستند، منجر به بلوغ زودرس مرکزی (CPP)[13] در انسان می‌شوند اما جهش‌هایی که در جهت غیرفعال کردن KISS1R هستند منجر به HH[14] و عدم بلوغ در انسان می‌شوند (۹ و ۱۰). در اثر حذف گوانین در موقعیت ۳۲۶ mRNA گیرنده، KISS1R تبدیل اسید آمینه گلایسین به آلانین در موقعیت ۵۶ اسیدآمینهٔ پروتئین KISS1R رخ می‌دهد (۱۱) به دنبال این موتاسیون تغییر چارچوب اتفاق می‌افتد. به تفاوت در توالی DNA میان افراد، گروه‌ها یا جمعیت‌ها پلی‌مورفیسم ژنتیکی گفته می‌شود که می‌تواند در سطح فنوتیپ یا ژنوتیپ بررسی شود. SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) ساده‌ترین منبع پلی‌مورفیسم ژنتیکی در ژنوم انسان محسوب می‌شود. در این مقاله ارتباط بین پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs397515615 در ناحیه اگزون شماره ۱ ژن KISS1R با ناباروری ایدیوپاتیک در مردان بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

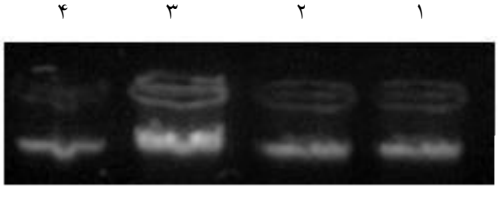
خصوصیات نمونه‌ها: در این پژوهش نمونه‌گیری از خون افراد بیمار شامل ۵۰ مرد مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک و ۵۰ مرد سالم (به عنوان گروه کنترل) که در بازهٔ زمانی آبان ماه ۱۳۹۳ لغایت اسفند ۱۳۹۳ به بخش ناباروری بیمارستان الزهرا، رشت، مراجعه نمودند صورت گرفت. ملاک باروری دارا بودن حداقل یک فرزند بدون مشکلات درمانی بوده است. محدودهٔ سنی مردان در این بررسی ۲۵ تا ۴۵ سال بود. نتیجهٔ آزمایش اسپرموگرام افراد بیمار حالت لوکواسپرمی (Leucospermia)، الیگواسپرمی (Oligozoospermia)، تراتوزواسپرمی (Teratozoospermia)، استنوزواسپرمی (Asthenozoospermia) و نرمواسپرمی (Normospermia) را نشان داد. این افراد حداقل دو سال تحت درمان پزشک معالج خود بوده‌اند. افراد شاهد و بیمار در این بررسی سابقهٔ بیماری‌های خاص مانند سرطان و

[10] KISS1R
[11] G protein-coupled receptor
[12] Rat
[13] Central Precocious Puberty
[14] Hypogonadotrophic Hypogonadism

سایر بیماری‌های حاد را نداشتند و از مشروبات الکلی و مواد مخدر استفاده نمی‌کردند. از تمام افراد شرکت کننده در این مطالعه رضایت نامهٔ کتبی بر اساس توافقنامه اخلاقی هلسینکی فنلاند دریافت شد. پس از اخذ رضایت‌نامه، از هر نفر ۲ میلی‌لیتر خون گرفته شد و جهت استخراج DNA در لوله‌های حاوی EDTA به آزمایشگاه انتقال داده شد.

استخراج DNA ژنومی

DNA ژنومی توسط کیت Gpp Solution، محصول شرکت ژن پژوهان ایران و بر اساس پروتکل کیت از نمونه‌های خون افراد استخراج گردید. پس از ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده توسط ژل آگارز ۱ درصد (شکل ۱)، DNA تا قبل از بررسی‌های مولکولی به فریزر ۷۰- انتقال داده شد.



DNA

شکل ۱) DNA استخراج شده (ژل آگارز ۱ درصد)

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)[15]

در واکنش PCR مربوط به ژن مورد نظر، از دستگاه ترموسایکلر ۴۸ چاهکی (Bio Rad ،England) و از دو جفت پرایمر اختصاصی طراحی شده جهت تکثیر محدوده ژنی قطعه پلی‌مورفیک استفاده گردید (جدول ۱). شناسایی پلی‌مورفیسم کدون ۵۶ ژن KISS1R توسط تکنیک AS-PCR[16] صورت گرفت و برای هر الل به صورت مجزا واکنش PCR (واکنش دو تیوبی مجزا، در یک تیوب واکنش همراه پرایمرهای Forward و Reverse الل حذف و تیوب دیگر واکنش به وسیله پرایمرهای Forward و Reverse الل G) انجام گردید. بدین منظور ۲/۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده با ۵ میکرولیتر کیت مخصوص (PCR Master Mix ،Cinnagene ،Iran) PCR، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر رو به جلو، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر رو به عقب و ۱,۵ میکرولیتر آب مقطر مخلوط شد و تحت AS-PCR قرار گرفت. سپس صحت واکنش PCR انجام شده، توسط ژل آگارز ۲ درصد ارزیابی گردید. شرایط PCR جهت تکثیر قطعهٔ ۵۲۱ جفت نوکلئوتیدی که برای نشان دادن حذف گوانین و قرار گرفتن آلانین به جای گلایسین در پروتئین KISS1R طراحی شد، به شرح زیر می‌باشد:

سیکل اول این چرخه شامل یک دور بوده و در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. طی این سیکل یک واسرشت اولیه از DNA الگو صورت گرفت. سیکل دوم این چرخه خود شامل سه مرحله بود که ۳۴ دور نیز تداوم یافت. در مرحلهٔ اول واسرشت سازی کامل DNA الگو در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد، پس از آن طی مرحلهٔ دوم که در دمای ۶۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام گرفت، اتصال پرایمرهای رو به جلو و رو به عقب صورت پذیرفت. مرحلهٔ سوم این سیکل مرحلهٔ بسط پلیمراز می‌باشد که به مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سیکل سوم یا گسترش نهایی شامل یک دور و یک مرحله بود که در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت.

[15] Polymerase Chain Reaction
[16] Allele-Specific PCR

شرایط PCR جهت تکثیر قطعهٔ ۳۰۰ جفت نوکلئوتیدی که برای نشان دادن آلل وحشی (نوکلئوتید گوانین) و قرار گرفتن گلایسین در پروتئین KISS1R طراحی شد نیز مشابه تکثیر قطعهٔ ۵۲۱ جفت نوکلئوتیدی می‌باشد با این تفاوت که سیکل دوم مرحلهٔ دوم در دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه انجام گرفت.

جدول ۱) پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر قطعه پلی مورفیک

پلی مورفیسم	الل	اندازه قطعه تکثیر شده (bp)	توالی آغازگرها
Gly56Alafs	G	۳۰۰	F: 5´- CGAGCCCCTTCCTGAGTTCC -3´ R: 5´- CGAGTTCCCCACCAGGCCC -3´
Gly56Alafs		۵۲۱	F: 5´- GCTCTCACTCCGACCTTGC -3´ R: 5´- CGAGTTCCCCACCAGGCCA -3´

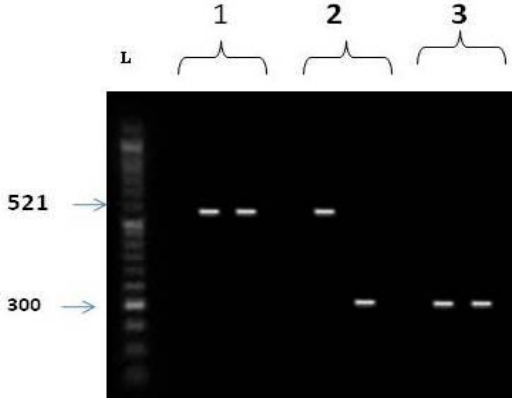
آنالیز آماری

آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار MedCalc (۱۴/۸/۱) انجام گرفت. جهت بررسی معنی‌دار بودن تفاوت بین ژنوتیپ‌ها در دو گروه بیمار و کنترل از آزمون‌های آماری Chi-Square (χ^2) و Odds Ratio (OR) استفاده شد و همچنین پارامترهای P-value و Confidence Interval (CI) تعیین گردید. در این آزمون $P\leq ۰/۰۵$ نشانگر معنی‌دار بودن اختلاف نتایج بین دو گروه می‌باشد.

آزمون Odds Ratio (OR) میزان تأثیر یک فاکتور خطر احتمالی در بروز یک بیماری خاص را نشان می‌دهد. اما برای تفسیر OR به دست آمده، نیاز به محاسبه پارامتر CI یا فاصله اطمینان است که مقدار این پارامتر به صورت یک بازهٔ عددی بیان می‌شود. تنها هنگامی که میزان OR بزرگ‌تر از یک باشد و حداقل بازهٔ CI هم یک باشد، می‌توان فاکتور خطر پیشنهاد شده را به عنوان یک فاکتور خطر مؤثر در بروز بیماری در نظر گرفت.

یافته‌ها

نتایج بررسی‌های مولکولی در این تحقیق پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs397515615 در ناحیه اگزون شمارهٔ ۱ ژن *KISS1R* مورد بررسی قرار گرفت. این پلی‌مورفیسم دارای سه ژنوتیپ -/-، G/- و G/G است. برای تشخیص نوع ژنوتیپ نمونه‌ها، از تکنیک AS-PCR استفاده شد. پس از انجام PCR به منظور بررسی کیفیت محصولات آن، از ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد و سپس عکسبرداری از ژل‌ها انجام گرفت. باندهای روشن و واضح بیانگر کیفیت مطلوب PCR می‌باشند. محصول PCR، قطعاتی با طول‌های ۳۰۰ جفت باز و ۵۲۱ جفت باز بودند که شامل جایگاه پلی‌مورفیک مذکور است. انواع ژنوتیپ‌های مشاهده شده در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲) محصولات PCR با پرایمرهای حذف و درج کدون ۵۶ فرد ۱ ژنوتیپ هموزیگوت G/G، فرد ۲ هتروزیگوت G/- و فرد ۳ دارای ژنوتیپ هموزیگوت -/- می باشند. L= مارکر ۵۰bp

همان طور که در جدول ۲ آورده شده بررسی نتایج نشان داد که در پلی‌مورفیسم rs397515615، از ۵۰ فرد بیمار، ۳ نفر (۶ درصد) دارای ژنوتیپ هموزیگوت G/G، ۴۱ نفر (۸۲ درصد) دارای ژنوتیپ هتروزیگوت G/-، ۶ نفر (۱۲ درصد) دارای ژنوتیپ هموزیگوت -/- بودند. در گروه کنترل نیز ژنوتیپ G/G در ۷ نفر (۱۴ درصد) ژنوتیپ G/- در ۴۳ نفر (۸۶ درصد) مشاهده گردید، و هیچ فردی با ژنوتیپ -/- مشاهده نشد. جهت بررسی معنی‌دار بودن نتایج، P-value با استفاده از آزمون Chi-square محاسبه شد، χ^2 =۷/۶۴ و P=۰/۰۲ به دست آمد. با توجه به معنی‌دار بودن P، محاسبهٔ CI و OR با استفاده از آزمون Odds-Ratio انجام شد. با توجه به OR=۲/۲۲ و CI=۰/۵۴–۹/۱۹ در ژنوتیپ G/- چون حداقل بازهٔ CI کمتر از ۱ است، نمی‌توان این ژنوتیپ را به عنوان فاکتور خطر در نظر گرفت؛ در حالی که در ژنوتیپ -/-، OR=۲۷/۸۵ و CI=۱/۲۰–۶۴۶/۱۱ می‌باشد. یعنی حداقل بازهٔ CI بیش از ۱ می‌باشد، می‌توان با توجه به OR در نظر گرفت که ژنوتیپ -/-، ۲۷/۸۵ برابر خطر ناباروری را افزایش داده است. همچنین بررسی فراوانی اللی افراد بیمار و سالم نشان داد که در ۵۰ مرد نابارور، ۴۷درصد الل G و ۵۳ درصد الل حذف و در ۵۰ مرد سالم، ۵۷ درصد الل G و ۴۳ درصد الل حذف وجود داشت. که با توجه به P=۰/۲۰ و χ^2=۱/۶۲ تفاوت معنی‌داری بین فراوانی آللی افراد بیمار و سالم مشاهده نشد. و همچنین دیگر نیازی به محاسبهٔ CI و OR نبود.

جدول ۲) توزیع ژنوتیپی پلی مورفیسم rs397515615 ژن *KISS1R* در افراد بیمار و کنترل

Genotype	Cases No.(٪)	Controls No.(٪).	Odds-Ratio	(۹۵٪ -CI)
G/G	۶	۱۴	–	–
G/-	۸۲	۸۶	۲/۲۲	(۰/۵۴–۹/۱۹)
-/-	۱۲	۰	۲۷/۸۵	(۱/۲۰–۶۴۶/۱۱)

بحث

ناباروری با طیف وسیعی از مشکلات اجتماعی، روانی، جسمی و اقتصادی در ارتباط می‌باشد (۱۲). طبق گزارشات سازمان بهداشت جهانی (WHO)، ۱۳ تا ۱۸ درصد از زوجین در جهان از ناباروری رنج می‌برند؛ که این میزان در کشورهای مختلف از ۷ تا ۳۰ درصد متفاوت است (۱۳).

سالها هورمون GnRH هیپوتالاموس جهت تنظیم و آزادسازی FSH و LH از هیپوفیز پیشین ضروری شناخته می‌شد اما کنترل این فرایندها تا زمان کشف ژن *KISS1* ناشناخته بود. KISS1 تنظیم کننده رهاسازی GnRH و به دنبال آن بلوغ و تولید مثل می‌باشد. محصول این ژن (KP) بر روی گیرندهٔ *KISS1*R) عمل می‌کند (۱۴).

در مطالعه هریس رمضان (Harris Ramazan) و همکاران مشخص شد که سطح kisspeptin سرم به‌طور معنی‌داری در افراد نابارور در مقایسه با افراد بارور کاهش می‌یابد. بنابراین این نتیجه نشان می‌دهد کمبود این پروتئین با مشکلات باروری در مردان مرتبط است. در این مردان کاهش سطح LH و تستوسترون سرم هم مشاهده می‌شود (۱۵). ژن KISS1 از مدت‌ها قبل به عنوان یک ژن مهم در کنترل متاستاز معرفی شده بود ولی از سال ۲۰۰۳ به اهمیت آن در بلوغ و تخمک‌گذاری و باروری پی بردند. سمنانی و همکاران

مشخص نمودند که ژنوتیپ هموزیگوت Pro/Pro و Arg/Arg در کدون ۸۱ ژن *KISS1* پلی مورفیسمی است که می‌تواند با ناباروری مرتبط باشد (۱۶).

در یک مطالعه متاآنالیز که توسط تیوتلمن (Tuttelmann) و همکاران انجام شد، ارتباط معنی‌دار بین پلی‌مورفیسم بعضی ژن‌ها مثل AZF و ناباروری مردان مشخص شد (۱۷). امروزه ارتباط میان برخی از جهش‌های به وقوع پیوسته در ژن *KISS1R* و بعضی از اختلالات تولید مثلی از جمله ناباروری آشکار شده است. از آن جمله می‌توان به حذف ۱۵۵ جفت بازی در محل پذیرنده اسپلایسینگ ناحیهٔ اتصال اینترون ۴ به اگزون ۵ اشاره کرد که در مطالعات صورت گرفته ارتباط این جهش با بیماری HH مورد تأیید قرار گرفته است (۱۰). جهش نقطه‌ای Leu148Ser در توالی ژن *KISS1R* در حالت هموزیگوت در اعضای یک خانوادهٔ عربستانی با سابقهٔ بیماری HH شناسایی شد (۹). جهش Leu102Pro در بیماران مبتلا به HH مادرزادی مشاهده شد. این جهش منجر به کاهش عملکرد در ژن *KISSIR* می‌شود (۱۵).

سمینارا (Seminara) و همکاران در یک مرد مبتلا به IHH که حامل جهش‌های R331X و X399R به صورت هتروزیگوت بود، را شناسایی کردند. این جهش‌ها منجر به کاهش بیان گیرنده در فرد بیمار می‌شوند (۹). اخیراً جهش هموزیگوت Phe272Ser در *KISS1R* در ۵ مرد و یک زن از دو خانواده با نیای مشترک شناسایی شد (۱۶). این جهش در مراحل ابتدایی در مردان با کریپتورکدیسم و اندازه کوچک آلت تناسلی ظاهر می‌شود، بعد از آن عدم توسعهٔ بلوغ مشاهده می‌شود؛ ولی در زنان در سن ۱۸ سالگی با عدم بلوغ و Amenorrhea اولیه ظاهر می‌شود. مطالعات کاربردی جهش Phe272Ser در *KISS1R* نشان داد که این جهش باعث کاهش در سطح بیان ژن می‌شود. موتاسیون یاد شده منجر به طولانی شدن فعالیت درون سلولی مسیرهای پیام‌دهی در پاسخ به Kisspeptin می‌گردد (۱۶). جهش Arg368pro مرتبط با بلوغ زودرس مرکزی می‌باشد (۱۷). جهش Pro313His با تغییر مسیر سیگنالینگ MAP کیناز رهایی کلسیم داخل سلولی را مختل می‌کند. این جهش نیز منجر به کاهش عملکرد ژن شده و باعث HH مادرزادی می‌شود (۱۵). در آخر می‌توان به جهش‌های Missene هتروزیگوت در Cys223Arg و Arg297Leu که منجر به کاهش بیان ژن *KISS1R* می‌گردند، اشاره نمود (۱۸).

در سال ۲۰۱۷ مطالعه‌ای بیوانفورماتیکی دربارهٔ پلی‌مورفیسم کدون ۵۶ ژن *KISS1R* صورت گرفته است. با توجه به اینکه در پلی‌مورفیسم مورد مطالعه حذف گوانین صورت می‌گیرد، یک جهش تغییر قالب محسوب می‌شود و تمام اسیدآمینه‌های بعدی تغییر می‌کنند. بنابراین انتظار می‌رود این جهش باعث تغییر در چهارچوب پروتئین KISS1R گردد. لذا بررسی حاضر تأییدی بر اثر این تغییر بر ناباروری می‌باشد (۱۹).

در این مقاله به بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم کدون ۵۶ در ژن *KISS1R* با ناباروری ایدیوپاتیک در مردان، با استفاده از روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR، پرداخته شد. ۵۰ مرد نابارور ایدوپاتیک (مردانی که علت ناباروری آنها نامشخص بود) و ۵۰ مرد سالم (به عنوان شاهد) مورد بررسی قرار گرفتند، که از محاسبه نتایج حاصل از بررسی ژنوتیپی مقدار χ^2=۷/۶۴ و P=۰/۰۲ به دست آمد. از آنجا که P محاسبه شده کوچک‌تر از ۰/۰۵ بود، تفاوت معنی‌دار بین دو گروه کنترل و بیمار مشاهده شد. بنابراین ژنوتیپ -/- (منظور از خط تیره یعنی فاقد نوکلئوتید خاص در محل مورد نظر روی ژن بودند) موردنظر به عنوان فاکتور خطر بود، از این رو در افراد کنترل مشاهده نمی‌شود. در

نتیجه می‌توان احتمال داد ژنوتیپ هموزیگوت -/- در استعداد ابتلای افراد بیمار به ناباروری ایدیوپاتیک دخیل باشد. نتایج حاصل از بررسی فراوانی اللی تفاوت معنی‌داری بین افراد بیمار و سالم از لحاظ آماری نشان نداد (P=۰/۲ و χ^2=۱/۶۲). بنابراین نمی‌توان الل حذف را به عنوان فاکتور خطر دانست. از این رو الل حذف در هر دو گروه کنترل و بیمار مشاهده شد. در نتیجه می‌توان گفت، در حالت هتروزیگوت الل G الل حذف را جبران می‌کند. به همین علت ژنوتیپ G/- هم در افراد سالم و هم در افراد بیمار مشاهده شد. با توجه به اینکه در پلی‌مورفیسم مورد مطالعه حذف گوانین صورت می‌گیرد، یک جهش تغییرقالب محسوب می‌شود و تمام اسیدآمینه‌های بعدی تغییر می‌کنند. بنابراین انتظار می‌رود این جهش باعث تغییر در چهارچوب پروتئین KISS1R گردد. برای بررسی این تغییر باید از روش Real time PCR استفاده شود و اندازه‌گیری پروتئین KISS1R با تست‌های بیوشیمیایی مثل الایزا صورت گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش حاکی از ارتباط پلی‌مورفیسم rs397515615 با ناباروری ایدئوپاتیک در مردان می‌باشد (P=۰/۰۲) و احتمال ابتلای افراد دارای ژنوتیپ -/- به ناباروری بیشتر است. البته باید توجه داشت که ناباروری یک بیماری چند عاملی است؛ هم عوامل ژنی و هم عوامل محیطی می‌توانند در این امر نقش داشته باشند. در این تحقیق به بررسی یک وجه از عوامل دخیل در ناباروری پرداخته شد. لذا نقش سایر ژن‌ها، عوامل محیطی و حتی سایر پلی‌مورفیسم‌های شناخته شده در ژن مورد مطالعه در ناباروری قابل تأمل می‌باشد. در مجموع شاید بتوان نقش ترکیبات ژنتیکی را در ارتباط بین پلی‌مورفیسم مورد بررسی و استعداد ابتلای افراد مورد مطالعه به ناباروری ایدیوپاتیک مؤثر دانست و لازم به ذکر است که نتیجهٔ به دست آمده می‌تواند با تغییر خزانهٔ ژنتیکی جمعیت و یا تغییر معنی‌دار اندازه جمعیت تغییر کند (۲۰).

سپاس و قدردانی

ضمن تشکر صمیمانه از دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان در فراهم آوردن تجهیزات، و همکاری کارکنان بخش ناباروری بیمارستان الزهرا (س) در تهیه نمونه‌ها، مقاله حاضر بخشی از پایانامه کارشناسی ارشد آزاده پورشریف، دانشجوی رشته زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، پردیس بین‌الملل دانشگاه گیلان می‌باشد. این پژوهش توسط معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه گیلان مورد حمایت مالی قرار گرفته است.

تضاد منافع

هیچ گونه تضاد منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Olooto WE. Infertility in male; risk factors, causes and management-A review. J Microbiol Biotech Res 2012; 2(4): 641-5.
2.Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 201; 25(2): 271-85.
3.Wald A, Zeh J, Selke S, et al. Virologic characteristics of subclinical and symptomatic genital herpes infections. N Engl J Med 1995; 333(12): 770-5.
4.Zorgniotti AW, Sealfon AL, Toth A. Further clinical experience with testis hypothermia for infertility due to poor semen. Urology 1982; 19(6): 636-40.
5.d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH. The role of kisspeptin signaling in

reproduction. Physiology (Bethesda) 2010; 25(4): 207-17.
6.Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. Febs Lett 1999; 446(1): 103-7.
7.Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, et al. A locus for autosomal recessive idiopathic hypogonadotropic hypogonadism on chromosome 19p13.3. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88(6): 2947-50.
8.Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. J Biol Chem 2001; 276(31): 28969-75.
9.Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. N Engl J Med 2003; 349(17): 1614-27.
10.de Roux N, Genin E, Carel JC, et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100(19): 10972-6.
11.Kirby HR, Maguire JJ, Colledge WH, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVII. Kisspeptin receptor nomenclature, distribution, and function. Pharmacol Rev 2010; 62(4): 565-78.
12.Greil AL, Slauson-Blevins K, McQuillan J. The experience of infertility: a review of recent literature. Sociol Health Illness 2010; 32(1): 140-62.
13.Vayena E, Organization WH. Current practices and controversies in assisted reproduction. Geneva: World Health Organization 2002: 15-21.
14.Tena-Sempere M. Kisspeptin signaling in the brain: recent developments and future challenges. Molecul Cell Endocrinol 2010; 314(2): 164-9.
15.Tenenbaum-Rakover Y, Commenges-Ducos M, Iovane A, et al. Neuroendocrine phenotype analysis in five patients with isolated hypogonadotropic hypogonadism due to a L102P inactivating mutation of GPR54. J Clin Endocrinol Metab 2007; 92(3): 1137-44.
16.Nimri R, Lebenthal Y, Lazar L, et al. A novel loss-of-function mutation in GPR54/KISS1R leads to hypogonadotropic hypogonadism in a highly consanguineous family. J Clin Endocrinol Metab 2010; 96(3): E536-45.
17.Teles MG, Bianco SD, Brito VN, et al. A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. N Engl J Med 2008; 358(7): 709-15.
18.Lanfranco F, Gromoll J, von Eckardstein S, et al. Role of sequence variations of the GnRH receptor and G protein-coupled receptor 54 gene in male idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. Eur J Endocrinol 2005; 153(6): 845-52.
19.Poursharif A, Shabani S, Vaziri HR, et al. polymorphism in KISS1 receptor gene was correlated with idiopathic male infertility in Guilan province, Iran. Gene Reports, 2017; 6: 112-115.
20.Tahmasbi fard Z, Hasanzad M, Nafisi N. Study of Fas 1377 G>A polymorphism in breast cancer of Iranian patients. Iran South Med J 2016; 18(6): 1132-1139.

Original Article

Investigation of Association Between KISS1R rs397515615 Polymorphism with Idiopathic Male Infertility

A. Poursharif [1], HR. Vaziri [2*], T. Mirzapour [3]

[1] Department of Biology, School of Science, University of Guilan, Guilan, Iran

[2] Department of Biology, School of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

(Received 21 Sep 2016 Accepted 26 Oct 2016)

Abstract

Background: Infertility refers to the inability of a couple to conceive over an average period of one year with unprotected sexual intercourse. In mammals, Fertility is initiated at puberty by the pulsatile secretion of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH). Kisspeptin (product of Kiss1 gene) and its receptor (KISS1R) are as vital upstream regulators in integrating of central and peripheral signals with GnRH release. In this paper, we studied an association between polymorphism rs 397515615 in the *KISS1R* gene and idiopathic male infertility.

Material and Methods: In this research, we evaluated a total of 50 men with idiopathic infertility and 50 healthy men (control group). The AS-PCR method was applied for the determination of the codon polymorphism. Also, we used chi-square (χ^2) test to study of an association between genotype and allele frequencies in cases and control groups.

Results: The results showed that the genotypic frequencies between two groups revealed a significant difference between the patients and control group (P=0.02), while the allele distribution (G/-) between case and control groups showed no significant difference (P=0.20).

Conclusion: The results of this study show that the polymorphism of *rs* 397515615 *KISS1R* gene probably associated with idiopathic infertility in men. However, further studies with larger sample size and diverse geographical distribution are required for more conclusive results.

Key words: rs 397515615, *KISS1R* gene, Male-factor Infertility, Polymorphism

©Iran South Med J. All rights reserved.

Cite this article as: Poursharif A, Vaziri HR, Mirzapour T. Investigation of Association Between KISS1R rs397515615 Polymorphism with Idiopathic Male Infertility. Iran South Med J 2017; 20(3): 257-266

Copyright © 2017 Poursharif , et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

[*]*Address for correspondence:* Department of Biology, School of Science, University of Guilan , Rasht, Iran. Email: vaziri@guilan.ac.ir