

Association of KISS1R gene polymorphism (rs397515615) with idiopathic female infertility in the northern of Iran

Peghah Yousefkhah¹ , Hamid Reza Vaziri^{1*} , Tooba Mirzapour^{1*} 

¹ Dept of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

Article Info

Article type:

Research article

Article History:

Received: Dec. 14, 2023

Received in Revised Form:
Feb. 23, 2024

Accepted: May. 21, 2024

Published Online: Oct.
06, 2024

* Correspondence to:

Hamid Reza Vaziri

Tooba Mirzapour

Dept of Biology, Faculty
of Science, University of
Guilan, Rasht, Iran

Email:

vaziri@guilan.ac.ir

dr.tooba72@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Mutations in the KISS1R gene are among the most critical potential causes of infertility. This gene plays a role in the regulation of the hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis and is used in the regulation of reproductive cycles and maturation of humans. The present study aimed to investigate the relationship between the Gly56Ala genetic variation of the KISS1R gene and infertility in a population of women in northern Iran.

Materials & Methods: In this work, among the women referred to Al-Zahrai Hospital of Rasht (Gilan Province, Iran) 100 women (50 infertile and 50 healthy) with age range (35.1 ± 2.1) were examined as patient and control group, respectively. Blood samples were collected with a volume of 2 ml and poured into EDTA carrier tubes. The DNA was extracted from leukocytes using a GPP kit. Allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) was used to determine the genotype of KISS1R gene polymorphism (rs397515615).

Results: The findings indicated that there was no significant correlation in genotype distribution between patients and control subjects in the samples evaluated in Gilan Province, Iran ($P=0.216$).

Conclusion: The Gly56Ala polymorphism of the KISS1R gene is not related to an increase in the risk of female infertility in the population of Gilan Province, Iran. Moreover, this gene is not considered a risk factor for female infertility in northern Iran. The change in the sampling location or size makes it possible to obtain different results.

Keywords: Allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR), Infertility, KISS1R gene, Polymorphism

How to cite this paper: Yousefkhah P, Vaziri HR, Mirzapour T. Association of KISS1R gene polymorphism (rs397515615) with idiopathic female infertility in the northern of Iran. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2024;32(4):99-109.

ارتباط پلی مورفیسم rs397515615 ژن گیرنده KISS1 با ناباروری ایدیوپاتیک زنان در شمال ایران

پگاه یوسف خواه^۱ , حمیدرضا وزیری^{۱*} , طوبی میرزاپور^{۱*} 

^۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

مقدمه: جهش در ژن KISS1R یکی از حیاتی ترین علل بالقوه ناباروری است. این ژن در تنظیم محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد (HPG) نقش دارد و در تنظیم چرخه های تولیدمثل و بلوغ افراد به کار گرفته می شود. هدف از این ارزیابی بررسی ارتباط تنوع ژنتیکی Gly56Ala ژن KISS1R با ناباروری در جمعیتی از زنان شمال ایران بود.

مواد و روش ها: در این پژوهش، از میان زنان مراجعه کننده به بیمارستان الزهراء رشت، ۱۰۰ زن شامل ۵۰ فرد نابارور و ۵۰ فرد سالم (کنترل)، با دامنه سنی (۳۵/۱±۲/۱)، به عنوان گروه بیمار و کنترل بررسی گردیدند. نمونه های خون با حجم ۲ میلی لیتر جمع آوری و به داخل لوله های حامل EDTA ریخته شد. DNA با استفاده از کیت GPP از لکوسیت ها استخراج گردید. برای تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم ژن KISS1R (rs397515615)، از واکنش زنجیره ای پلیمرز اختصاصی آلل (AS-PCR) استفاده شد.

یافته های پژوهش: نتایج نشان داد، ارتباط معنی داری در توزیع ژنوتیپ میان بیماران و افراد کنترل در نمونه های ارزیابی شده در این استان وجود ندارد (P=0.216).

بحث و نتیجه گیری: پلی مورفیسم Gly56Ala ژن KISS1R با افزایش خطر ناباروری زنان در جمعیت استان گیلان مرتبط نیست و این ژن به عنوان عامل خطر ناباروری زنان در شمال ایران به شمار نمی آید. با تغییر مکان یا اندازه نمونه گیری احتمالاً بتوان نتایج متفاوتی به دست آورد.

واژه های کلیدی: ناباروری، ژن KISS1R، پلی مورفیسم

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۱۲/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۰۱

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۷/۱۵

نویسنده مسئول:

حمیدرضا وزیری

طوبی میرزاپور

گروه زیست شناسی، دانشکده

علوم، دانشگاه گیلان، رشت

ایران

Email:

vaziri@guilan.ac.ir

dr.tooba72@gmail.com

استاد: یوسف خواه پگاه، وزیری حمیدرضا، میرزاپور طوبی. ارتباط پلی مورفیسم rs397515615 ژن گیرنده KISS1 با ناباروری ایدیوپاتیک زنان در شمال ایران. مجله

دانشگاه علوم پزشکی ایلام، مهر ۱۴۰۳؛ ۳۲(۴): ۹۹-۱۰۹.



ناباروری به عنوان باردار نشدن پس از گذشت ۱۲ ماه، با وجود ادامه آمیزش جنسی محافظت نشده توصیف می شود (۱). علت ناباروری چندعاملی است و عوامل زنانه و مردانه در آن دخیل هستند. عوامل زنانه مرتبط با ناباروری شامل هورمون‌ها، سن، بیماری‌های عفونی، چاقی، ناهنجاری‌های گامت، اختلالات پزشکی، عوامل ناشی از سموم محیطی، سرطان، ترومبوز و بیماری‌های خودایمنی است (۲).

ناباروری بین ۸ تا ۱۲ درصد از زوج‌های بالغ در سراسر جهان را تحت تأثیر قرار می دهد. ناباروری ثانویه شناخته شده ترین نوع ناباروری زنان در سراسر جهان است که اغلب به علت عفونت‌های دستگاه تناسلی ایجاد می شود. سه عامل اصلی تأثیرگذار بر ناباروری عبارت‌اند از: استفاده از داروها برای کنترل بارداری ناخواسته، سن بیمار و بیماری‌های مربوط به تخمدان (۳). علل یا عواملی را که به ناباروری زنان منجر می گردد، می توان بر اساس اینکه آیا ارثی است و یا کاملاً بر اساس محیط هستند، طبقه‌بندی کرد؛ به عبارت دیگر، ناباروری زنان معمولاً ترکیب پیچیده‌ای از عوامل محیطی و غیرمحیطی است. انجمن پزشکی باروری آمریکا (ASRM) بیان می کند که سن، عادت سیگار کشیدن، عفونت‌هایی که از طریق جنسی منتقل می شوند، داشتن اضافه وزن یا توده بدنی کم، همگی در کنار هم می توانند بر باروری تأثیر بگذارند؛ اما به تنهایی به ناباروری منجر نمی گردند (۴).

از سویی، ژن‌های متعددی کشف شده‌اند که جهش در آن‌ها می تواند به ناباروری زنان بینجامد. این ژن‌ها می توانند به عنوان عوامل ارثی به نسل‌های بعد منتقل شوند (۵). گیرنده جفت شده به پروتئین G نوع ۵۴ GPR54 (که به عنوان گیرنده ژن KISS1 (KISS1R) نیز شناخته شده، یکی از حیاتی ترین ژن‌هایی است که در باروری نقش دارد. در انسان، ژن KISS1R بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۱۳ قرار دارد و حاوی پنج اگزون و چهار اینترون با 1197 ORF جفت باز است که یک پروتئین با ۳۹۸ اسید آمینه را کد می کند. داشتن سه محل برای گلیکوزیله شدن و هفت ناحیه گذرکننده از غشا از حوزه‌های ساختاری این ژن به شمار می آیند (۶).

کیسپتین (KP) که یک نوروپپتید مترشحه از هیپوتالاموس است و KISS1R/Kiss1r که گیرنده KP است، مهم ترین بازیگران کلیدی مسیر سیگنالینگ هیپوتالاموس هستند (۷، ۸). KP و KISS1R از محصولات کدشده ژن KISS1 و KISS1R به طور جداگانه‌اند (۹، ۱۰). پروتئینی که توسط این ژن کدگذاری می شود، به عنوان گیرنده نوروپپتیدی کیسپتین (پروتئین ژن KISS1) به شمار می آید و در خط مقدم کنترل نورواندوکرین محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد بیان می شود. بررسی‌های پیشین نشان داده است که نوروپپتید کیسپتین و گیرنده آن، GPR54، به عنوان تنظیم‌کننده‌های مهم برای ترشح هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) عمل می کنند. هورمون آزادکننده گنادوتروپین توسط کیسپتین از طریق GPR54 تحریک می گردد و به دنبال آن، ترشح هورمون LH برای شروع بلوغ اتفاق می افتد. همان‌طور که می دانیم، هورمون محرک فولیکولی (FSH) نیز بخشی از این دستگاه سیگنال‌دهی تحریک و بازخورد به شمار می آید (۱۱).

مجموعه گسترده‌ای از اطلاعات نشان داده است که بلوغ در نخستینی‌ها و غیر پریمات‌ها توسط مسیرهای سیگنالینگ KP-kiss1r تنظیم می شود (۱۲، ۶). تغییر ظرفیت ژن‌های KISS1 یا KISS1R در انسان به بالغ نشدن یا به تعویق افتادن دوره نوجوانی منجر می گردد (۱۳، ۶). جهش در ژن KISS1R برخی مشکلات بلوغ را به دنبال دارد (۱۴).

ترائو و همکاران برای اولین بار گزارش کردند که بیان mRNA کیسپتین در تخمدان موش‌های صحرایی نشان‌دهنده نقش مهم کیسپتین در بافت تولیدمثلی است (۱۵). امروزه ارتباط میان پلی مورفیسم‌های ژنتیکی و استعداد ابتلا به بیماری‌های مختلف بسیار مورد توجه قرار گرفته است. پلی مورفیسم مکان مشخصی در ژنوم است. اگر دست کم دو توالی متفاوت یا آلل در یک جمعیت رخ دهند، برای یک ناحیه‌ای که پلی مورفیک نامیده می شود، آلل نادرتر باید حداقل در ۱-۰/۵ درصد از جمعیت یافت گردد (۱۶). حذف نوکلئوتید G از کدون ۵۶ (rs397515615) یکی از چندشکلی‌های موجود (پلی مورفیسم) در ژن مطالعه شده

است. از آنجاکه حذف آلل G در موقعیت mRNA 326 گیرنده KISS1 رخ می‌دهد، ممکن است تغییرات چشمگیری در پروتئین کدگذاری شده ایجاد کند. این حذف می‌تواند به ایجاد جهش تغییر قاب منجر گردد و ترتیب رمزگذاری اسید آمینه پس از این موقعیت کاملاً تغییر نماید؛ بنابراین، این پلی‌مورفیسم پروتئین KISS1R را تغییر می‌دهد. با وجود اهمیت این جهش، هیچ ارتباطی میان این تنوع ژنتیکی و ناباروری ایدیوپاتیک در مردان گزارش نشده است. تا به امروز، هیچ مطالعه‌ای درباره پلی‌مورفیسم کدون ۵۶ ژن KISS1R در زنان انجام نشده است. در دهه‌های اخیر، تولید و استفاده از مواد شیمیایی مختلف در سراسر جهان به‌طور چشمگیری افزایش یافته است. برخی از این مواد شیمیایی فعال‌کننده‌های زیستی مانند شبه‌هورمون‌ها هستند و می‌توانند عملکرد فیزیولوژیکی هورمون‌های درون‌زا را مختل کنند. به دنبال آن، دستگاه‌های بیولوژیکی از جمله متابولیسم، تبادل انرژی، تولیدمثل، رشد، پیری و مرگ تحت تأثیر این مختل‌کننده‌های شیمیایی غدد درون‌ریز قرار می‌گیرند (۱۷). اختلال در فعالیت غدد درون‌ریز می‌تواند بر تخمک‌گذاری، رشد، بلوغ فولیکول و پارگی آن تأثیر بگذارد. این حالت در ۲۰ درصد از زوج‌های نابارور وجود دارد. گاهی اوقات در افراد رحم، حفره رحم و صفاق و لوله‌های فالوپ تحت تأثیر قرار می‌گیرند و چسبندگی‌های مختلف لگنی در دستگاه تناسلی زنانه اتفاق می‌افتد. این مشکلات رحمی در حدود ۳۰ درصد از زوج‌های نابارور مشاهده می‌شود (۱۸). البته ناباروری را می‌توان به‌عنوان یک بیماری چندعاملی تعریف کرد که در آن، عوامل مختلف ژنتیکی و محیطی دخیل هستند. در این تحقیق به بررسی ارتباط میان پلی‌مورفیسم ژن GPR54 و ناباروری ایدیوپاتیک در زنان پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

در ارزیابی حاضر، ۱۰۰ زن شامل ۵۰ فرد نابارور و ۵۰ فرد سالم (کنترل) به‌ترتیب به‌عنوان گروه‌های بیمار و شاهد ارزیابی گردیدند. افرادی که برای کنترل وضعیت خود به بیمارستان الزهرای گیلان (واقع در شمال ایران) مراجعه کرده بودند و آزمایش‌های مربوط به شاخص‌های ناباروری را در

بیمارستان طی یک سال گذشته انجام داده بودند، به‌عنوان شاهد و بیمار وارد مطالعه شدند. افرادی که پس از معاینات بالینی و انجام آزمایش‌های مختلف، هیچ‌گونه بیماری در آنان تشخیص داده نشد، به‌عنوان سالم (کنترل) و سایر به‌عنوان بیمار در نظر گرفته شدند. متخصصان آموزش‌دیده افراد بیمار را شناسایی کردند. بررسی سابقه خانوادگی افرادی که مصاحبه‌شده بودند و همچنین سوابق بالینی به‌عنوان یک شاخص مناسب برای تعیین ناباروری استفاده گردید. گروه شاهد شامل افراد بزرگ‌سال دارای حداقل یک فرزند در نظر گرفته شد. پیش از ورود آزمودنی‌ها به مطالعه حاضر، همه آنان برگه‌های رضایت آگاهانه را پر کردند و رضایت خود را برای شرکت در مطالعه اعلام نمودند. تمام مراحل انجام کار مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه گیلان قرار گرفت (شناسه اخلاق IR.IUMS.FMD.REC 1396.33110). معمولاً در پژوهش‌های ژنتیک، هرچه مطالعه بر روی نمونه‌های بیشتری صورت گیرد، اطمینان بیشتری حاصل می‌شود که نتایج از نظر آماری قابل اعتماد و تعمیم‌پذیر است. بر اساس منظور اصلی این پژوهش که تشخیص آثار کوچک پلی‌مورفیسم یک ژن خاص است و همچنین میزان تنوع ژنتیکی جمعیت استان گیلان، سطح اهمیت آماری و قدرت آماری، بودجه و زمان انجام پژوهش و نیز بر اساس نتایج مقالات پیشین انجام‌شده، تعداد ۵۰ نمونه بیمار و ۵۰ نمونه سالم (کنترل) برای این پژوهش در نظر گرفته شد. درواقع، نقش تنوع ژنتیکی KISS1R Gly56Ala در ۵۰ بیمار نابارور و ۵۰ فرد سالم (کنترل) ارزیابی گردید.

نمونه‌های خون با حجم ۲ میلی‌لیتر از افراد گرفته شد و در لوله‌هایی با پوشش EDTA (بلژیک Venoject) نگهداری گردید. استخراج DNA از نمونه‌های خون محیطی (لکوسیت‌ها) با استفاده از روش استخراج کیت (ایران GPP, Gen Pajooohan)، بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. حضور DNA استخراج‌شده با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید تأیید گردید. DNA استخراج‌شده برای انجام کارهای مولکولی بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

است.

کیفیت محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد و با استفاده از دستگاه ژل داک تعیین گردید. در این تحقیق، rs397515615 از ژن KISSIR در ناحیهٔ اگزون شمارهٔ یک بررسی شد. این پلی مورفیسم سه ژنوتیپ GG، G- و -/ دارد (منظور از خط تیره آلل حذف شده است).

برای تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم ژن KISSIR (rs397515615)، از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز اختصاصی آلل (AS-PCR) استفاده گردید. با استفاده از دو جفت پرایمر اختصاصی در واکنش PCR، محدودهٔ ژنی حاوی پلی مورفیسم مدنظر تقویت شد. با استفاده از نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز اختصاصی آلل، ژنوتیپ KISSIR تعیین گردید. توالی پرایمرها در جدول شمارهٔ ۱ نشان داده شده

جدول شماره ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده در این پلی مورفیسم

Rs397515615	Tm (°C)	Base Paired (bp)	توالی آغازگرها (5' → 3')
Gly56Ala (Mutant)	64	521	F: 5' CGAGCCCCTTCCTGAGTTCC 3' R: 5' CGAGTTCCCCACCAGGCC 3'
Gly56Ala (Healthy)	63	300	F: 5' GCTCTCACTCCGACCTTGC 3' R: 5' CGAGTTCCCCACCAGGCCA 3'

دقیقه، ۳۴ چرخه در ۹۵ درجهٔ سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، دمای اتصال در ۶۲ درجهٔ سانتی گراد برای ۴۰ ثانیه. مؤلفه‌های واکنش PCR برای آلل G به آلل حذف شده (-) شباهت داشت؛ اما دمای اتصال برای آن ۶۳ درجهٔ سانتی گراد بود. محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد ارزیابی شد و برای مشاهدهٔ محصولات از رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده گردید. در نهایت برای تأیید، همهٔ قطعات تکثیر شده توالی یابی و تجزیه و تحلیل شدند. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار MedCalc vol.15.8 استفاده گردید. فراوانی آلل و ژنوتیپ پلی مورفیسم KISSIR در افراد نابارور و سالم (کنترل) با استفاده از آزمون χ^2 بررسی شد. سطح معنی داری از نظر آماری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌های پژوهش

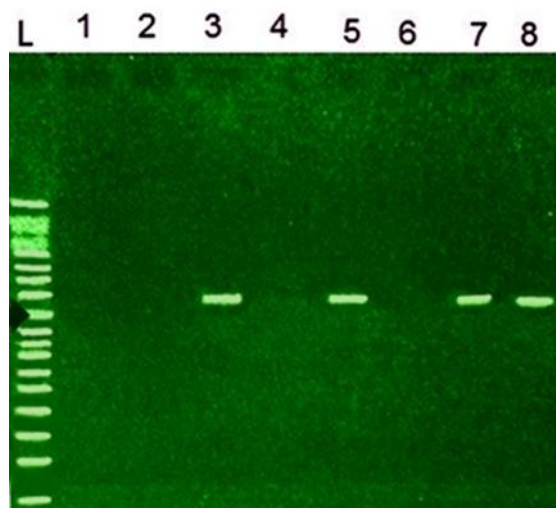
پژوهش حاضر شامل ۵۰ زن نابارور (به عنوان بیمار) و ۵۰ زن سالم به عنوان گروه کنترل بود. محدودهٔ سنی افراد نابارور و سالم (کنترل) 21 ± 3.5 بود که تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند ($P < 0.05$). ژنوتیپ Gly56Ala به روش AS-PCR تکثیر گردید. اندازهٔ مولکولی محصولات Gly56Ala PCR (پرایمر طراحی شده برای این ژن) که تکثیر شده بود، برای آلل چندشکلی ۵۲۱ جفت باز بود (شکل

محصولات PCR حاصل از ژن KISSIR دو قطعهٔ ۳۰۰ جفت بازی و ۵۲۱ جفت بازی بودند. واکنش PCR برای هر نمونهٔ استخراج شده به طور جداگانه انجام شد و ژنوتیپ‌ها برای هر فرد شناسایی گردیدند. محصولات PCR با یک Ladder با وزن مولکولی ۵۰ جفت باز، روی ژل آگارز ۲ درصد بارگذاری شدند. افراد (سالم و بیمار) که هر دو قطعه را پس از واکنش PCR با پرایمرهای سالم و جهش یافته تکثیر کردند، هتروزیگوت در نظر گرفته شدند و کسانی که تنها یک قطعهٔ ۵۲۱ جفت بازی یا تنها یک قطعهٔ ۳۰۰ جفت بازی را تکثیر کردند، به ترتیب هموزیگوت جهش یافته و هموزیگوت سالم ارزیابی گردیدند.

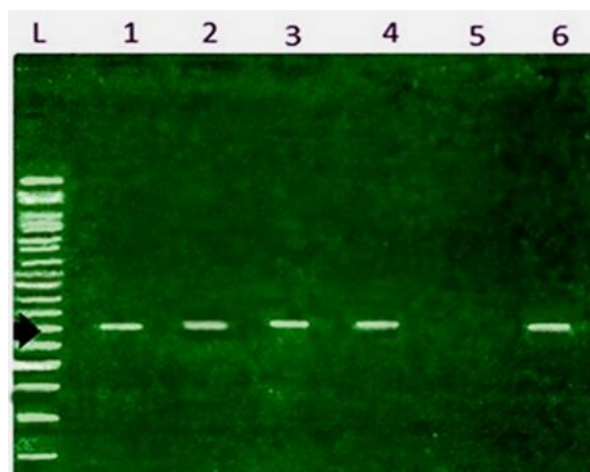
ابتدا توالی DNA ژن KISSIR از بانک ژن به دست آمد (NM_032551.4)؛ سپس نرم افزار الیگوانالایزر (نسخهٔ ۷/۵۴) برای طراحی پرایمرها استفاده شد که پلی مورفیسم کدون ۵۶ KISSIR را تقویت می کند. حجم کل واکنش ۱۰ PCR میکرولیتر بود (DNA استخراج شده ۲/۵ میکرولیتر، PCR Master Mix ۵ میکرولیتر، پرایمر فوروارد ۰/۵ میکرولیتر، پرایمر معکوس ۰/۵ میکرولیتر، آب ۱/۵ میکرولیتر). در دستورالعمل ما، شرایط PCR برای آلل حذف شده (-) به شرح زیر بود: ۹۵ درجهٔ سانتی گراد برای ۵

است که در محدوده ۵۰ جفت باز بود. شکل شماره ۲ اندازه مولکولی محصول PCR Gly56Ala تکثیرشده برای آلل وحشی در افراد بیمار و سالم (کنترل) را نشان می‌دهد. برای آلل وحشی اندازه این ژن ۳۰۰ جفت باز بود. پیکان روی شکل محدوده ۳۰۰ جفت باز را نشان می‌دهد. باندهای ۱، ۲، ۳ و ۴ مربوط به افراد سالم (کنترل) و باندهای ۵ و ۶ مربوط به بیماران است.

شماره ۱) و برای آلل وحشی ۳۰۰ جفت باز (شکل شماره ۲). شکل شماره ۱ اندازه مولکولی محصول پرایمر Gly56Ala برای آلل جهش‌یافته را نشان می‌دهد. اندازه این ژن برای آلل جهش‌یافته ۵۲۱ جفت باز بود. نوک پیکان در شکل شماره ۱، محدوده ۵۰۰ جفت باز را نشان می‌دهد. باندهای ۱، ۲، ۳ و ۴ مربوط به افراد سالم (کنترل) و باندهای ۵، ۶، ۷ و ۸ مربوط به افراد بیمار است. حرف L نشان‌دهنده ladder به کار گرفته شده



شکل شماره ۱. اندازه مولکولی محصول PCR Gly56Ala تکثیرشده در افراد بیمار و سالم (کنترل) برای آلل چندشکلی؛ DNA Ladder: Allele:- (521 bp) و 50 bp



شکل شماره ۲. اندازه مولکولی محصول PCR Gly56Ala تکثیرشده در افراد بیمار و سالم (کنترل)؛ DNA Ladder: 50 bp و Allele:G (300 bp)

سالم (کنترل) که شامل ۵۰ نفر بود، ۱۰ نفر (۲۰ درصد) ژنوتیپ G/G و ۴۰ نفر (۸۰ درصد) ژنوتیپ -/G داشتند. با استفاده از آزمون کای اسکور، تفاوت معنادار میان دو گروه از نظر آماری بررسی شد. مقدار χ^2 که نشان‌دهنده اختلاف

نتایج به‌دست‌آمده از ۵۰ زن نابارور نشان داد که ۸ بیمار (۱۶ درصد) ژنوتیپ G/G هموزیگوت، ۳۹ بیمار (۷۸ درصد) ژنوتیپ -/G هتروزیگوت و ۳ بیمار (۶ درصد) ژنوتیپ هموزیگوت -/- دارند (جدول شماره ۲). در گروه

چندشکلی و ناباروری در این جمعیت از زنان شمال ایران وجود ندارد (جدول شماره ۲).

فراوانی ژنوتیپ میان دو گروه است، در این تحقیق برابر با ۳/۰۶۲ و مقدار P برابر ۰/۲۱۶ به دست آمد. با مقدار P به دست آمده می توان نتیجه گرفت که هیچ ارتباطی میان این

جدول شماره ۲. نتایج آزمون کای اسکوتر و نیز فراوانی ژنوتیپ های مشاهده شده در گروه های بیمار و کنترل

ژن	ژنوتیپ	بیماران (درصد)	کنترل (درصد)	P	χ^2
KISS1R Gly56Ala	G/G	۸ (درصد ۱۶)	۱۰ (درصد ۲۰)	-	۳/۰۶۲
	G/-	۳۹ (درصد ۷۸)	۴۰ (درصد ۸۰)	-	
	-/-	۳ (درصد ۶)	۰ (درصد ۰)	۰/۲۱۶	

حذف شده ۰ درصد (۰ نفر) بود. با توجه به مقدار P به دست آمده از نتایج ($P=0.88$)، میان فراوانی آلل افراد سالم (کنترل) و بیمار تفاوت معنی داری مشاهده نشد (جدول شماره ۳).

در گروه بیماران، فراوانی افراد دارای آلل G 94 درصد (۴۷ نفر) و فراوانی افراد دارای آلل حذف شده ۶ درصد (۳ نفر) بود. در افراد سالم (گروه کنترل)، فراوانی افراد دارای آلل G 100 درصد (۵۰ نفر) و فراوانی افراد دارای آلل

جدول شماره ۳. نتایج آزمون کای اسکوتر و نیز فراوانی آلل های مشاهده شده در گروه های بیمار و کنترل

ژن	ژنوتیپ	بیماران (%)	کنترل (%)	P	χ^2
KISS1R	G	۴۷ (درصد ۹۴)	۵۰ (درصد ۱۰۰)	-	۰/۰۲۲۶
	Deletion	۳ (درصد ۶)	۰ (درصد ۰)	۰/۸۸۰	

و همکاران در سال ۲۰۲۳، روی جمعیت زنان عربستان سعودی نیز نشان داد که هیچ ارتباطی میان Q36R SNP و ژن KISS1 و ناباروری در این زنان وجود ندارد (۲۵). رحمان و همکاران با مطالعه روی جهش های خاموش ژن های KISS1 و KISS1R نیز نشان دادند که ارتباطی میان این جهش ها و ناباروری وجود ندارد (۲۶). در پژوهشی دیگر، وزیری و همکاران با مطالعه روی جمعیت زنان شمال ایران نشان دادند که Q36R (rs3543622) ژن KISS1 با ناباروری زنان در شمال ایران مرتبط نیست (۲۷).

نتایج مطالعات بالا در مغایرت با نتایجی است که نشان می دهد این ژن نقش مهمی در بلوغ و باروری، به ویژه در زنان دارد (۲۸، ۶). در تحقیقات سیاهپوش و همکاران در سال ۲۰۲۱، میان ناباروری و پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP)rs587777844 ژن KISS1R ارتباط معناداری

بحث و نتیجه گیری

با توجه به اهمیت باروری در همه جوامع، این تحقیق به منظور درک ارتباط میان پلی مورفیسم های ژنی KISS1R (Gly56Ala) و ناباروری در جمعیتی از زنان شمال ایران انجام شد. نتایج نشان داد که ارتباط معنی داری در توزیع ژنوتیپ میان گروه های بیمار و کنترل دیده نمی شود ($P=0.216$). درواقع، بررسی ژنوتیپ هتروزیگوت در افراد نابارور و سالم (کنترل) نشان داد که میزان این پلی مورفیسم در بیماران، به اندازه گروه کنترل است و به نظر نمی رسد که توزیع آللی آن تأثیر چشمگیری بر خطر کلی ناباروری زنان شمال کشور داشته باشد ($P=0.880$). در توافق با پژوهش حاضر، مطالعه وزیری و همکاران در سال ۲۰۱۴، بر روی جمعیت زنان شمال ایران نشان داد که میان جهش پلی مورفیسم T305C گیرنده KISS1 با ناباروری ایدیوپاتیک زنان ارتباط معنی داری وجود ندارد (۲۴). از سویی، نتایج پژوهش المطواع

به دست آمد (۲۹). مطالعات تنن بام و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داد، تغییر نوکلئوتید در اگزون ۵ باعث جایگزینی لوسین با آرژنین (Arg297Lue)) در انتهای سیتوپلاسمی سومین حلقه (domain) خارجی KISS1R خواهد شد (۲۱). این تغییر می تواند به نوع خاصی از ناباروری منجر شود.

در مغایرت با مطالعه ما، در تحقیقی دیگر، سمپل و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند، جهش تک نوکلئوتیدی در اگزون ۴ KISS1R باعث جایگزینی اسید آمینه آرژنین با سیستئین (Cys223Arg) در انتهای سیتوپلاسمی KISS1R می گردد. راکووار و همکارانش یک جهش هموزیگوت در موقعیت ۳۰۵ را گزارش کردند که باعث جایگزینی تیمیدین به سیتوزین می شود. این تعویض نوکلئوتیدی به جایگزینی لوسین با پرولین در کدون ۱۰۲ در اولین حلقه (domain) خارج سلولی منجر می گردد که در نهایت، به کاهش عملکرد ژن KISS1R می انجامد (۲۳). در توصیف بیوانفورماتیکی این جهش ها می توان عنوان کرد، حذف بعضی آلل ها (مثل حذف آلل G در موقعیت کدون ۵۶) ممکن است به تغییر قالب در ژن GPR54 منجر شود که در نهایت، به بیان پروتئینی منجر گردد که ناحیه N ترمینال ندارد. تحقیقات پیشین نشان داده است، ناحیه N ترمینال پروتئین یادشده نقش مهمی در اتصال کیسپتین دارد (۲۳). احتمالاً نبود ناحیه N ترمینال ممکن است علت ناباروری در بیمارانی باشد که ژنوتیپ (-/-) دارند.

در مغایرت با مطالعه ما، مطالعه بلاسکو و همکاران نیز نشان داد، ناباروری زنان با بیان تغییر یافته دستگاه های kisspeptin/KISS1R در سلول های گرانولوزای تخمدان و کومولوس همراه است (۳۰). در واقع، KISS1R (GPR54) یک گیرنده غشایی جفت شده با پروتئین G است و جهش در ژنی که گیرنده های گنادوتروپین را کد می کند، می تواند موجب بروز ناباروری گردد (۱۹). نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که کیسپتین فعال کننده اصلی نورون های GnRH است و هدفی برای غدد درون ریز و متابولیک محسوب می شود. این پروتئین به عنوان پیش نیازی برای شروع بلوغ و حفظ عملکرد طبیعی تولید مثل به شمار می آید؛ زیرا دستگاه غیر طبیعی KISS1/GPR54 در هر دو مدل انسانی و

حیوانی می تواند موجب ناباروری از طریق هیپوگنادیسم هیپوگنادوتروپیک ایدیوپاتیک (IHH) و سندرم تخمدان پلی کیستیک گردد (۳۲). در واقع، کمترین نقش KISS1R در تنظیم تولید مثل، آزادسازی هورمون های گنادوتروپینی (GnRH) است؛ زیرا KISS1R روی نورون های GnRH بیان می شود و به کیسپتین متصل می گردد. این ارتباط به تحریک گنادوتروپین ها و ترشح GnRH منجر می شود (۲۰). در موش هایی که KISS1R وجود ندارد، کاهش هورمون های آستروئیدی و گنادوتروپینی، گامتوژنز ناقص و نبود چرخه قاعدگی مشاهده می گردد (۶). گیتن و همکاران نشان دادند، جهش هایی که در نهایت موجب کمبود KISS1R می شوند، می توانند موجب بروز یک فنوتیپ تخمدانی قابل تشخیص گردند که با کاهش ذخیره فولیکولی تخمدان و نبود تخمک گذاری زودرس مشخص می شود (۳۱).

تحقیقات مینگ و همکاران روی واریانت های ژن KISS1 نشان داد که واریانت های rs12998 G>A و rs4889 C>G موجب از دست دادن امکان حاملگی های مکرر می گردد و ممکن است به عنوان عامل خطر برای این بیماری محسوب شود (۳۳). مطالعات فارسی مدن و همکاران نیز نشان داد که واریانت های rs12998 G>A و rs4889 C>G ژن KISS1 ممکن است باعث تغییرات پاتوفیزیولوژی در تخمدان گردد و در نهایت، موجب سندرم تخمدان پلی کیستیک شود (۳۴).

در مطالعه حاضر، در جمعیت استان گیلان ارتباط میان پلی مورفیسم ژن KISS1R و ناباروری مشاهده نگردید. در این مطالعه، هیچ یک از افراد سالم (کنترل) ژنوتیپ هموزیگوت آلل جهش یافته نداشتند. این امر حاکی از این است که وجود یک آلل سالم (کنترل) در فرد می تواند نقش محافظتی داشته باشد؛ یعنی در جمعیت مطالعه شده با وجود آلل جهش یافته در افراد سالم (کنترل) و بیمار، اختلاف معنی دار در توزیع ژنوتیپ و فراوانی آلل ها میان گروه های بیمار و کنترل مشاهده نشد. این امر می تواند به علت اندازه جمعیت و یا موقعیت جغرافیایی نمونه (شهر رشت) از نظر تنوع ژنتیکی باشد. شاید در جمعیت های بزرگ تر یا در نقاط

مقاله توسط دانشجو نوشته شد. ویرایش نهایی و امادگی برای چاپ توسط اساتید مربوطه انجام گرفت.

جغرافیایی وسیع‌تر، نتایج دیگری به دست آید. برخی از محدودیت‌های مطالعه کنونی این است که ما تنها یک تنوع ژنتیکی را در ژن KISS1R ارزیابی کردیم که برای ارزیابی خطر ناباروری زنان برای ژن مطالعه شده کافی نیست. با افزایش حجم نمونه یا تغییر محل نمونه‌گیری و بررسی‌های ژنتیکی، نتایج متفاوتی حاصل می‌شود. به همین ترتیب، مطالعات بیشتر با مقیاس وسیع در جمعیت‌های مختلف برای تأیید نتایج پیشنهاد می‌گردد. ناباروری زنان نوعی عارضه چندعاملی است و عوامل متعددی کشف شده‌اند که بر این ناتوانی چه از نظر ارثی و چه از نظر محیطی تأثیر می‌گذارند (۳۵). مطالعات تکمیلی برای به دست آوردن نتایج قطعی از عملکرد ژن KISS1R و نیز تغییرات پلی مورفیسم این ژن در جمعیت‌های مختلف، عملکرد واقعی این ژن را در کنار عوامل ژنتیکی مرتبط دیگر با ناباروری مشخص خواهد کرد.

سپاس‌گزاری

از همکاری کارشناسان محترم آزمایشگاه زیست‌شناسی تکوینی و ژنتیک دانشگاه گیلان برای فراهم آوردن بستر مناسب به منظور انجام کار و نیز تهیه نمونه‌های انسانی تشکر می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان این پژوهش هیچ‌گونه تعارض منافع در انجام این کار نداشتند.

کد اخلاق

این مطالعه دارای تاییدیه اخلاق به شماره IR.IUMS.FMD.REC 1396.33110 از کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه گیلان می‌باشد.

حمایت مالی

حمایت مالی مربوط به انجام کار توسط دانشجو و اساتید مربوطه انجام گرفت.

مشارکت نویسندگان

ایده اصلی کار توسط دکتر حمیدرضا وزیری مطرح گردید. با کمک‌های ایشان و همراهی دکتر میرزاپور انجام کار به خانم پگاه یوسف خواه دانشجوی ارشد دانشگاه گیلان واگذار شد. بررسی صحت داده‌ها، کنترل تکرارها و انجام کار آماری توسط اساتید راهنما انجام گرفت. پیش نویس اولیه

References

1. Kara E, Simoni M. Genetic screening for infertility: When should it be done? *Middle East Fertil Soc J* 2010; 15:139-45. doi: 10.1016/j.mefs.2010.06.002.
2. Tinneberg HR, Gasbarrini A. Infertility today: the management of female medical causes. *Int J Gynaecol Obstet* 2013; 123: S25-30. doi: 10.1016/j.ijgo.2013.09.004.
3. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem* 2018; 62:2-10. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012.
4. Corander MP, Challis BG, Thompson EL, Jovanovic Z, Loraine Tung YC, Rimmington D, et al. The effects of neurokinin B upon gonadotrophin release in male rodents. *J Neuroendocrinol* 2010; 22:181-7. doi: 10.1111/j.1365-2826.2009.01951.x.
5. Sultan C, Biason-Lauber A, Philibert P. Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: recent clinical and genetic findings. *Gynecol Endocrinol* 2009; 25:8-11. doi: 10.1080/09513590802288291.
6. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno Jr JS, Shagoury JK, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003; 349:1614-27. doi: 10.1056/NEJMoa035322.
7. Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev* 2009; 30:713-43. doi: 10.1210/er.2009-0005.
8. Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 2012; 92:1235-316. doi: 10.1152/physrev.00037.2010.
9. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett*. 1999; 446:103-7. doi:10.1016/S0014-5793(99)00009-5.
10. Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001; 276:34631-6. doi: 10.1074/jbc.M104847200.
11. d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH. The Role of Kisspeptin Signaling in Reproduction. *Physiology* 2010; 25: 207-17. doi: 10.1152/physiol.00009.2010.
12. Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Nogueiras R, Tovar S, Roa J, et al. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology* 2005; 146:3917-25. doi:10.1210/en.2005-0337.
13. Chan YM, Broder-Fingert S, Paraschos S, Lapatto R, Au M, Hughes V, et al. GnRH-deficient phenotypes in humans and mice with heterozygous variants in KISS1/Kiss1. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: E1771-81. doi: 10.1210/jc.2011-0518.
14. Teles MG, Bianco SD, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, et al. A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med* 2008; 358:709-15. doi: 10.1056/NEJMoa073443.
15. Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Hattori M, Nishimura A, Ohtaki T, et al. Expression of KiSS-1, a metastasis suppressor gene, in trophoblast giant cells of the rat placenta. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1678:102-10. doi: 10.1016/j.bbaexp.2004.02.005.
16. Kelada SN, Eaton DL, Wang SS, Rothman NR, Khoury MJ. The role of genetic polymorphisms in environmental health. *Environ Health Perspect* 2003; 111:1055-64. doi:10.1289/ehp.6065.
17. Giwercman A, Giwercman YL. Environmental factors and testicular function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; 25:391-402. doi: 10.1016/j.beem.2010.09.011.
18. Cohen B. Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America. Saunders, Philadelphia. USA 1991; 317-31.
19. Brugo-Olmedo S, Chillik C, Kopelman S. Definition and causes of infertility. *Reprod Biomed Online* 2001; 2:173-85. doi:10.1016/S1472-6483(10)62193-1.
20. Smith JT, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction* 2006; 131:623-30. doi: 10.1530/rep.1.00368.
21. Semple RK, Achermann JC, Ellery J, Farooqi IS, Karet FE, Stanhope RG, et al. Two novel missense mutations in g protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:1849-55. doi:10.1210/jc.2004-1418.
22. Tenenbaum-Rakover Y, Commenges-Ducos M, Iovane A, Aumas C, Admoni O, de Roux N. Neuroendocrine phenotype analysis in five patients with isolated hypogonadotropic hypogonadism due to a L102P inactivating mutation of GPR54. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:1137-44. doi:10.1210/jc.2006-2147.
23. Millar RP, Roseweir AK, Tello JA, Anderson RA, George JT, Morgan K, et al. Kisspeptin antagonists: unraveling the role of kisspeptin in reproductive physiology. *Brain Res* 2010; 1364:81-9. doi: 10.1016/j.brainres.2010.09.044.

24. Vaziri H, Sayar Z, Faraji R. Relationship between idiopathic female infertility with KISS1receptor gene mutation in northern Iranian women. *MBD* 2014; 1:177-83.
25. Al-Mutawa J. Role of the Q36R polymorphism in the KISS1 gene in female infertility. *J King Saud Univ Sci* 2023; 35:102442. doi: 10.1016/j.jksus.2022.102442.
26. Rehman R, Jamil Z, Fatima SS, Alam F. Silent mutation in KISS1and KISS1R and unexplained infertility. *Avicenna J Med Biochem* 2015;3: e30138. doi: 10.17795/ajmb-30138.
27. Vaziri H, Rafeie A, Siapoosh Z. Q36R (rs 35431622) Polymorphism in KISS1 gene and idiopathic female infertility in a Northern Iranian population. *Gene Cell Tissue* 2017;4. doi:10.5812/gct.12355.
28. De Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:10972-6. doi:10.1073/pnas.1834399100.
29. Siahpoosh Z, Farsimadan M, Pazhohan M, Vaziri H, Mahmoudi Gomari M. KISS1R polymorphism rs587777844 (Tyr313His) is linked to female infertility. *Br. J Biomed Sci* 2021; 78:98-100. doi:10.1080/09674845.2020.1856496.
30. Blasco V, Pinto FM, Fernández-Atucha A, González-Ravina C, Fernández-Sánchez M, Candenas L. Female infertility is associated with an altered expression of the neurokinin B/neurokinin B receptor and kisspeptin/kisspeptin receptor systems in ovarian granulosa and cumulus cells. *Fertil Steril* 2020; 114:869-78. doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.05.006.
31. Gaytan F, Garcia-Galiano D, Dorfman MD, Manfredi-Lozano M, Castellano JM, Dissen GA, et al. Kisspeptin receptor haplo-insufficiency causes premature ovarian failure despite preserved gonadotropin secretion. *Endocrinol* 2014; 155:3088-97. doi:10.1210/en.2014-1110.
32. Nejad SZ, Tehrani FR, Zadeh-Vakili A. The role of kisspeptin in female reproduction. *Int J Endocrinol Metab* 2017;15: e44337. doi:10.5812%2Fijem.44337.
33. Meng F, Zhao A, Lu H, Zou D, Dong B, Wang X, et al. KISS1 Gene Variations and Susceptibility to Idiopathic Recurrent Pregnancy Loss. *Reprod Sci* 2023; 28:1-7. doi:10.1007/s43032-023-01203-1.
34. Farsimadan M, Moammadzadeh Ghosi F, Takamoli S, Vaziri H. Association analysis of KISS1 polymorphisms and haplotypes with polycystic ovary syndrome. *Br J Biomed Sci* 2021; 78:201-5. doi: 10.1080/09674845.2020.1864109.
35. Thébaut A, Amouyal M, Besançon A, Collet M, Selbonne E, Valentin C, et al. Puberty, fertility and chronic diseases. *Arch Pediatr* 2013; 20:673-84. doi: 10.1016/j.arcped.2013.03.015.