

## بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم rs4938723 در ژن mir-34 b/c و خطر ابتلا به نا باروری آیدیو پاتیک در مردان

هاجر مجیدی<sup>۱</sup>، لیلا کهن<sup>۲\*</sup>، اطهر راسخ جهرمی<sup>۳</sup>

۱) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد ارسنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، ارسنجان، ایران

۲) باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد ارسنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، ارسنجان، ایران

۳) گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بهره، بهره، ایران

تاریخ پذیرش ۹۵/۴/۱۲

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۱۵

### چکیده

**مقدمه:** نا باروری، اختلال پیچیده‌ای است که با علل متعدد ژنتیکی و محیطی همراه می‌باشد. نا باروری مردان، تقریباً ۱۵ درصد از زوجین را درگیر می‌کند. میکرو RNAها نقش مهمی در فرایند اسپرماتوزن دارند؛ اما این که آیا پلی مورفیسم‌های pre-miRNA با نا باروری آیدیو پاتیک مردان همراه هستند، هنوز نا مشخص باقی مانده است. در این مطالعه، ارتباط بین پلی مورفیسم rs4938723 در ژن mir-34 b/c و خطر ابتلا به نا باروری آیدیو پاتیک در مردان، مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** نمونه های خون از ۲۴۴ مرد مبتلا به نا باروری آیدیو پاتیک و ۱۰۵ مرد سالم جمع آوری شد. استخراج DNA با روش Salting out انجام شد و تعیین ژنوتیپ به وسیله تکنیک Tetra ARMS PCR صورت گرفت. هم چنین، مقایسه فراوانی ژنوتیپی و آلی در دو گروه بیمار و کنترل به وسیله آزمون رگرسیون لجستیک انجام پذیرفت.

**یافته های پژوهش:** هر دو گروه بیمار ( $\chi^2=1/8$ ,  $df=2$ ,  $P=0/17$ ) و کنترل ( $\chi^2=1/6$ ,  $df=2$ ,  $P=0/2$ ) برای توزیع ژنوتیپ ها در تعادل هاردی- واینبرگ بودند. در مدل ژنتیک مغلوب برای ژنوتیپ CC، پلی مورفیسم rs4938723 mir-34 b/c ارتباط معنی داری را با نا باروری آیدیو پاتیک در مردان نشان داد ( $OR=0/44$ ,  $95\%CI=0/2-0/9$ ,  $P=0/03$ ).

**بحث و نتیجه گیری:** در این مطالعه برای اولین بار، ارتباط بین پلی مورفیسم rs4938723 mir-34 b/c با نا باروری آیدیو پاتیک مردان بررسی شد. نتایج نشان داد که پلی مورفیسم rs4938723 mir-34 b/c با نا باروری آیدیو پاتیک مردان در ارتباط است؛ اگر چه به منظور تایید این نتایج، باید مطالعات گسترده تری با افراد کنترل و بیمار بیش تر صورت گیرد.

**واژه های کلیدی:** نا باروری مردان، mir-34 b/c، پلی مورفیسم، آیدیو پاتیک

\* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، واحد ارسنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، ارسنجان، ایران

Email: Kohan@iaua.ac.ir

Copyright © 2017 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

## مقدمه

نا باروری به حالتی اطلاق می‌شود که زوجین پس از یک سال مقاربت های متوالی، منظم و بدون استفاده از روش‌های پیشگیری، با عدم موفقیت مواجه می‌شوند (۱). نا باروری، یکی از مشکلات عدیده پزشکی در دنیای امروز است؛ به گونه‌ای که میزان آن در جهان از سال ۱۹۵۵ تاکنون ۵۰٪ افزایش یافته است و هم اکنون ۱۵-۱۰٪ زوجین از این مشکل رنج می‌برند (۲). در جوامع بشری تقریباً در نیمی از موارد نا باروری به نحوی عامل مردانه دخیل است (۳). با وجود تلاش‌های صورت گرفته در یافتن دقیق طبیعت نا باروری در مردان، بیش‌تر مردان مبتلا به نا باروری با منشا ناشناخته (آیدیو پاتیک) هستند. پیشنهاد شده است که این نوع نا باروری می‌تواند حاصل جهش‌ها و یا تغییرات دیگر در ژن‌های درگیر در اسپرماتوزن باشد (۴). میکرو RNA ها (miRNA) زیر گروه بزرگی از RNA های غیر کد کننده ۱۸ تا ۲۵ نوکلئوتیدی هستند که از نظر تکاملی حفاظت شده می‌باشند (۵). این RNA های کوچک غیر کد کننده، تنظیم بیان ژن‌ها را در سطح پس از رونویسی انجام می‌دهند. این تنظیم، با تجزیه و یا با جلوگیری از ترجمه mRNA هدف صورت می‌گیرد (۶). حضور miRNA در بیضه در سال ۲۰۰۴ تایید شد (۷). پس از آن محققان بر یافتن نقش عملکردی miRNA درون سیستم تولید مثل تمرکز کردند (۸). miRNA ها علاوه بر این که درون سلول‌ها وجود دارند، در مایعات خارج سلولی از جمله پلاسما، بزاق، خون قاعدگی، ترشحات واژینال و منی نیز گزارش شده‌اند (۹). miR-34 متعلق به یک خانواده از miRNA های حفاظت شده در طی تکامل است که دارای سه عضو 34a، 34b و 34c می‌باشد و بیان آن‌ها توسط تومور ساپرسور P53 تنظیم می‌شود (۱۰). بیان بالای mir-34c در سلول‌های زایای کشت داده شده، باعث آپوپتوز می‌شود. در بسیاری از سلول‌های سرطانی، mir-34c یک ژن پرو آپوپتیک است که به وسیله P53 تنظیم می‌شود. در بیضه ی موش‌ها، mir-34c تا حد زیادی مستقل از P53 است و در اواخر اسپرماتوزن دخالت دارد (۱۱).

پلی مورفیسم های متعددی در ژن miR-34b/c گزارش شده است که برخی از این پلی مورفیسم‌ها می‌توانند با تاثیر بر بیان، تکامل و یا عملکرد این میکرو RNA، بر فعالیت تنظیمی آن موثر باشند. پلی مورفیسم rs4938723 در ژن miR-34b/c منجر به جایگزینی C به جای T می‌شود (T>C)، که این تغییر نوکلئوتیدی در جایگاه پروموتور رخ می‌دهد (۱۲).

در این تحقیق با توجه به اهمیت عملکردی miRNA در فرآیند اسپرماتوزن، به بررسی اثر واریانت ژنتیکی rs4938723 mir-34b/c بر نا باروری آیدیو پاتیک مردان پرداخته شده است. به نظر می‌رسد تا این زمان در این درباره مطالعه ای صورت نگرفته است و تحقیق حاضر برای نخستین بار به بررسی این ارتباط می‌پردازد.

## مواد و روش‌ها

این تحقیق از نوع مورد-شاهدی (case-control) بوده که در آن ۳۴۹ مرد (شامل ۲۴۴ مرد مبتلا به نا باروری آیدیو پاتیک که بیماری آن‌ها توسط پزشک متخصص تأیید شده و ۱۰۵ مرد سالم به عنوان گروه شاهد)، مورد مطالعه قرار گرفتند. افراد گروه کنترل و بیمار از لحاظ سن (۵± سال) همسان سازی شدند. گروه کنترل شامل مردانی بودند که حداقل یک فرزند داشته و پزشک متخصص عدم وجود هر گونه اختلال مربوط به باروری را در آن‌ها تأیید کرده بود. معیار‌های خروج از مطالعه عبارت بودند از: واریکوسل، عفونت دستگاه تناسلی، مصرف دارو، نا هنجاری کروموزومی و ریزحذف‌های کروموزوم Y. به منظور تعیین ژنوتیپ، پس از اخذ رضایت آگاهانه، از افراد مورد مطالعه ۵ سی سی خون گرفته شد و درون تیوپ‌های حاوی EDTA منتقل گردید. نمونه‌های جمع‌آوری شده به همراه پرسشنامه‌ای که مشخصات افراد را نشان می‌داد، به آزمایشگاه منتقل شده و نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

استخراج DNA از خون محیطی به کمک روش salting out انجام گرفت و سپس با استفاده از تکنیک Tetra-ARMS PCR و پرایمرهای اختصاصی که با

ارتباط بین ریسک فاکتور های مختلف و استعداد ابتلا به نا باروری با استفاده از آنالیز آماری رگرسیون لجستیک و محاسبه OR با فاصله اطمینان ۹۵٪ انجام شد. در آنالیز آماری  $P < 0/05$  به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد. هم چنین مقایسه میانگین ها با استفاده از t-test به وسیله نرم افزار SPSS ویراست ۱۷، مورد بررسی قرار گرفت.

### یافته های پژوهش

دامنه سنی کل افراد مورد مطالعه در این تحقیق، ۵۸-۲۲ سال و میانگین سنی آن ها  $35/6 \pm 7/4$  بود. میانگین سنی افراد در گروه بیمار  $35/1 \pm 7/1$  و در گروه کنترل  $36/7 \pm 7/9$  بود؛ مقایسه میانگین سنی در دو گروه سالم و بیمار نشان داد که اختلاف آماری معنی داری بین میانگین سن دو گروه وجود ندارد ( $P = 0/07$ ).

استفاده از نرم افزار Oligo 7 طراحی شده بود (جدول ۱)، قسمتی از ژن mir34 b/c تکثیر شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرو لیتر شامل ۰/۵ میلی مولار از  $MgCl_2$ ، ۱۰ پیکومول از پرایمر های FO و RO، ۵ پیکو مول از پرایمر های FI و RI، ۰/۲۵ میلی مولار از dNTP، ۱/۵ واحد از Taq DNA polymerase، ۱ میکرو لیتر از DNA انجام شد. برنامه PCR به صورت یک مرحله دناتوراسیون اولیه، ۹۵ درجه سانتی گراد برای مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی گراد برای مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر ۶۲ درجه سانتی گراد برای مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای مدت ۳۰ ثانیه به منظور گسترش انجام شد. این مرحله با ۱ سیکل شامل ۷۲ درجه سانتی گراد برای مدت ۱۰ دقیقه به منظور تولید سازی نهایی دنبال شد. به منظور تعیین ژنوتیپ از الکتروفورز و دستگاه تصویر برداری از ژل (Gel Documentation)، استفاده گردید.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام Tetra - ARMS PCR

پلی مورفیسم	پرایمر	توالی ( ۵' به ۳')
MIr-34b/c	FI	CTCTGGGAACCTTCTTTGACCTCTC
rs3735590	RI	GAGGTCCTCAATGAGAGCTTTA
	FO	GGAATCAATCTATAGGTGGGAAGT
	RO	CCTGGGCCTTCTAGTCAAATAGT

مجموع تحرک اسپرم، غلظت اسپرم و نا باروری وجود دارد ( $P < 0/05$ ). بین سایر پارامتر های مایع منی و نا باروری ارتباط معنی داری مشاهده نشد ( $P < 0/05$ ).

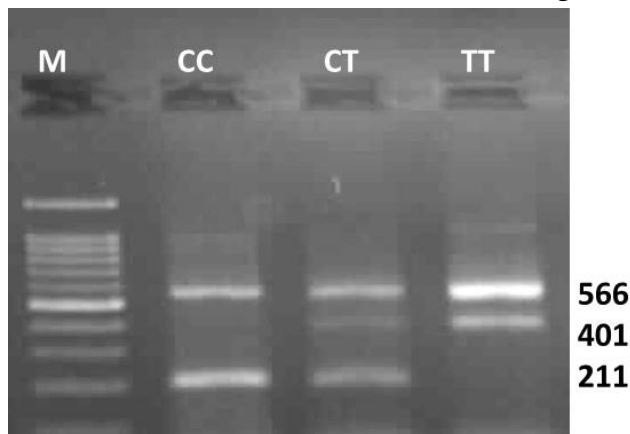
جدول ۲، بررسی پارامتر های مایع منی را در دو گروه کنترل و بیمار نشان می دهد. نتایج این مطالعه نشان داد که ارتباط معنی داری بین تعداد کل اسپرم ها،

جدول ۲. بررسی پارامتر های مایع منی در افراد کنترل و بیمار

پارامترهای مایع منی	کنترل	بیمار	P
Semen volume	$24/9 \pm 3/6$	$25/5 \pm 4/4$	0/2
Sperm morphology (Normal Form%)	$46/5 \pm 22/8$	$42/5 \pm 25/7$	0/58
Total sperm number ( $10^6$ per ejaculate)	$130 \pm 133$	$95/2 \pm 130$	0/04
Progressive motility (PR, %)	$60/2 \pm 45$	$52/3 \pm 52/7$	0/39
Vitality (Live sperm, %)	$40/9 \pm 24$	$41/7 \pm 33$	0/89
Total motility (PR+NP, %)	$47/3 \pm 16/8$	$32/6 \pm 23$	<0/001
Sperm concentration ( $10^6$ per ml)	$75/9 \pm 44/4$	$45/1 \pm 45/8$	<0/001

آلل C، قطعه 211bp و کنترل داخلی، قطعه 566bp، را روی ژل آگارز 2٪ نشان دادند.

نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ های پلی مورفیسم rs4938723 در ژن mir-34 b/c در شکل 1 آمده است. پس از الکتروفورز نمونه ها آلل T، قطعه 401bp،



شکل 1. بررسی پلی مورفیسم rs4938723 در ژن mir-34 b/c با استفاده از تکنیک Tetra ARMS PCR

غالب و مغلوب مورد بررسی قرار گرفت (جدول 3). نتایج بیانگر این بود که ژنوتیپ CC در مدل مغلوب (مقایسه ژنوتیپ CC در مقابل CT+TT) با کاهش خطر ابتلا به نا باروری همراه می باشد (P=0/03، OR=0/9-).

بررسی توزیع ژنوتیپ ها در دو گروه کنترل (P=0/2،  $\chi^2=1/8$ ، df=2) و بیمار (P=0/17،  $\chi^2=1/6$ ، df=2) انحرافی را از تعادل هاردی-واینبرگ نشان نداد. ارتباط ژنوتیپ های پلی مورفیسم rs4938723 ژن mir-34 b/c و ابتلا به نا باروری، در سه مدل ژنتیکی هم باز،

جدول 3. ارتباط بین پلی مورفیسم rs4938723 ژن mir-34 b/c و ابتلا به نا باروری

ژنوتیپ	کنترل (%)	بیمار (%)	OR (%95CI)	P
هم باز				
TT	47(44/8)	114(46/7)	1	-
CT	42(40)	112(45/9)	1/1(-0/7-1/8)	0/7
CC	16(15/2)	18(7/4)	0/46(-0/2-1)	0/046
غالب				
TT	47(44/8)	114(46/7)	1	-
CT+CC	58(55/2)	130(53/3)	0/92(-0/58-1/5)	0/7
مغلوب				
TT+CT	89(84/8)	226(92/6)	1	-
CC	16(15/2)	18(7/4)	0/44(-0/2-0/9)	0/03
آلل				
T	136	340	1	-
C	74	148	0/18(-0/6-1/1)	0/2

از مسایل مهم زوج هاست و این امر از آن نظر قابل توجه است که علت نا باروری مردان فقط در 40 درصد موارد قابل تشخیص است و در 60 درصد موارد از نظر پاتولوژیکی قابل تشخیص نیستند. بنابراین درمان نا باروری در مردان مشکل تر از زنان است؛ به خصوص در کشور های در حال توسعه که با توجه به هزینه بالای

### بحث و نتیجه گیری

در حدود 12-8 درصد از زوج ها بدون فرزند هستند که تقریباً 35 درصد از نا باروری آنان فقط مربوط به مرد می شود و در 25 درصد موارد علاوه بر مردان، زنان نیز نقش دارند و زوج ها هر دو نا بارور هستند. نا باروری و مشکلات فردی و اجتماعی ناشی از آن به عنوان یکی

درمان، امکان انجام آن کم تر است (۱۳). بنا بر این تشخیص عوامل ژنتیکی که در مستعد کردن افراد به نا باروری نقش دارند، می تواند، نقش موثری در فهم بهتر اتیولوژی این عارضه داشته باشد.

در مطالعه حاضر، اثر پلی مورفیسم rs4938723 در ژن mir-34 b/c بر ابتلا به نا باروری آیدیو پاتیک در مردان، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه نشان داد ژنوتیپ CC در مدل ژنتیکی غالب اثر حفاظتی بر ابتلا به نا باروری دارد ( $P=0/03$ ). نتایج حاصل از مطالعات نشان می دهد که سه عضو خانواده miR-34 در کنترل منفی چرخه سلولی از جمله توقف چرخه سلولی، پیری سلولی و القای آپتوز نقش دارند (۱۰). Mir34 b/c با متصل شدن به NOTCH1 و DAZL باعث تمایز و بقا سلول های ژرمینال شده و با اتصال به مولکول های bcl2 و ATF1 باعث آپتوز سلول های زایا در روند اسپرماتوژنز می شود (۱۴). mir-34c، مولکول ویژه ای است که به دلیل این که بیان بالایی در اسپرماتوسیت و اسپرماتید دارد، به نظر می رسد برای مراحل آخر اسپرماتوژنز مهم باشد (۱۵،۱۶). در سال ۲۰۱۴، Yang و همکاران پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs4938723 ( $T > C$ ) در منطقه پروموتور miR-34b/c که درون جزایر CPG است، را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که این جایگزینی فاکتور رونویسی GATA-X را تحت تاثیر قرار می دهد (۱۷)، در نتیجه بیان بسیاری از ژن های مربوط به تمایز تومور و سرطان تحت تاثیر قرار می گیرد (۱۸). این گروه تحقیقاتی، برای اولین بار به ارتباط بین TP53 rs4938723 miR-34b/c و پلی مورفیسم Arg72Pro و خطر ابتلا به سرطان معده در جمعیت چینی پرداختند. آن ها دریافتند که افراد با ژنوتیپ

### سپاسگزاری:

این مقاله مستخرج از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد می باشد. بدینوسیله از همکاری کارشناسان محترم آزمایشگاه ژنتیک سرکار خانم ها نسیم جعفری و نجمه نوروزی و هم چنین کلیه افراد شرکت کننده در تحقیق تشکر و قدردانی می شود.

### References:

1. Stevenson EL, Hershberger PE, Bergh PA. Evidence based care for couples with infertility. J Obstet Gynecol Neonatal Nurs 2016; 45:100-10.
2. Oliva A, Spira A, Multigner L. Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. Hum Reprod 2001; 16:1768-76.
3. Ferlin A, Arredi B, Foresta C. Genetic causes of male infertility. Reprod Toxicol 2006; 22:133-41.
4. Baazeem A, Belzile E, Ciampi A, Dohle G, Jarvi K, Salonia A, et al. Varicocele and male factor infertility treatment a new meta-analysis and review of the role of

- varicocele repair. *Eur Urol* 2011; 60:796-808.
5. Carissimi C, Fulci V, Macino G. Micro RNAs novel regulators of immunity. *Autoimmun Rev* 2009; 8:520-24.
  6. Bartel DP. Micro RNAs target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136: 215-33.
  7. Barad O, Meiri E, Avniel A, Aharonov R, Barzilai A, Bentwich I, et al. Micro RNA expression detected by oligonucleotide microarrays system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res* 2004; 14:2486-94.
  8. Papaioannou MD, Nef S. Micro RNAs in the testis: building up male fertility. *J Androl* 2010; 31: 26-33.
  9. Hanson EK, Lubenow H, Ballantyne J. Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed micro RNAs. *Anal Biochem* 2009; 387: 303-14.
  10. Corney DC, Fleskennikitin A, Godwin AK, Wang W, Nikitin AY. Micro RNA-34b and micro RNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion independent growth. *Cancer Res* 2007; 67: 8433-38.
  11. Kotaja N. Micro RNAs and spermatogenesis. *Fertil Steril* 2014; 101: 150-8.
  12. Yang X, Liu L, Liu J, Zhang Y, Zhu J, Chen J, et al. A potentially functional polymorphism in the promoter region of miR-34b/c is associated with an increased risk for primary hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2011; 128:412-7.
  13. Bayasgalan G, Naranbat D, Radnaabazar J, Lhagvasuren T, Rowe PJ. Male infertility risk factors in Mongolian men. *Asian J Androl* 2004; 6:305-11.
  14. Liang X, Zhou D, Wei C, Luo H, Liu J, Fu R, et al. Micro RNA-34c enhances murine male germ cell apoptosis through targeting ATF1. *PLoS One* 2012; 7: 33861.
  15. Comazzetto S, Giacomo M, Rasmussen KD, Much C, Azzi C, Perlas E, et al. Oligo astheno teratozoo spermia and infertility in Mice deficient for miR-34b/c and miR-449 loci. *PLoS Genet* 2014;10: 1004597.
  16. Bouhallier F, Allioioli N, Lavial F, Chalmel F, Perrard MH, Durand P, et al. Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis. *RNA* 2010;16:720-31.
  17. Yang C, Xiang M, Liu D, Wang Y, Tang R, Zhu Y, et al. Promoter polymorphisms of miR-34b/c are associated with risk of gastric cancer in a Chinese population. *Res Article* 2014;35:12545-554.
  18. Vineeth VS, Malini S. a journey on Y chromosomal genes and Male Infertility. *Int J Hum Genet* 2011; 11: 203-15.
  19. Song R, Walentek P, Sponer N, Klimke A, Lee JS, Dixon G, et al. MiR-34/449 miRNAs are required for motile ciliogenesis by repressing cp110. *Nature* 2014; 510:115-20.
  20. Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 2007; 26:745-52.

## Association between Mir-34 b/c rs4938723 Gene Polymorphism and the Risk of Male Infertility

Majidi H<sup>1</sup>, Kohan L<sup>1,2</sup>, Rasekh A<sup>3</sup>

(Received: May 4, 2016 Accepted: July 2, 2016)

### Abstract

**Introduction:** Infertility is a complex disorder with multiple genetic and environmental causes. Male factor infertility affects 15% of all couples. MicroRNA plays an important role in spermatogenesis. Whether pre-miRNAs polymorphisms are associated with idiopathic male infertility is unknown. In this study, the association between mir-34 b/c rs4938723 gene polymorphism and the risk of idiopathic male infertility was investigated.

**Materials & methods:** Blood Samples were collected from 244 patients diagnosed with idiopathic male infertility and 105 control subjects. DNA extraction was performed by salting out method and genotype determination was done by Tetra-ARMS PCR technique. However, the comparison between genotype and allele frequencies in cases and controls, were assessed by logistic regression analysis.

**Findings:** Both of the cases ( $\chi^2= 1.8$ , df=2, P=0.17) and control ( $\chi^2= 1.6$ , df=2, P=0.2) groups were in Hardy-Weinberg equilibrium for genotype distribution. In a recessive genetic model for CC genotype, mir-34 b/c rs4938723 showed significant association with idiopathic male infertility (OR= 0.44, 95% CI= 0.2-0.9, P= 0.03).

**Discussion & conclusions:** In this study, for the first time, the association between mir-34 b/c rs4938723 and idiopathic male infertility was investigated. The results showed that mir-34 b/c rs4938723 polymorphism is associated with idiopathic male infertility; more studies should be considered with larger number of patient and control subjects to confirm these results.

**Keywords:** Male infertility, Mir-34 b/c, Polymorphism, Idiopathic

1. Dept of Biology, Faculty of Science, Arsanjan branch, Islamic Azad University, Arsanjan, Iran

2. Young researchers and elite club, Arsanjan Branch, Islamic Azad University, Arsanjan, Iran

3. Dept of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran

\* Correspondin author Email: Kohan@iaua.ac.ir