ارتباط پلی‌مورفیسم کدون ۸۱ ژن KISS1 با ناباروری ایدیوپاتیک در مردان

محمدرضا سمنانی (Ph.D Candidate)[۱]ـ *دکتر حمیدرضا وزیری (Ph.D)[۱]ـ دکتر زیور صالحی (Ph.D)[۱]ـ دکتر علی حمیدی مدنی (M.D)[۲]

*نویسنده مسئول: رشت، دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان، گروه زیست‌شناسی

پست الکترونیک: vaziri@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۱/۵/۲۱

چکیده

مقدمه: ناباروری یک نشانگان چند عاملی با عوامل ژنتیک و غیرژنتیک متفاوت است. به‌رغم پیشرفت‌های روش شناختی، علت متجاوز از ۲۵ درصد ناباروری‌ها ناشناخته است(ناباروری ایدیوپاتیک). در ۵۰ درصد موارد عامل مرد به نوعی در ناباروری دخیل است. KISS1 ژنی است که بر بازوی بلند کروموزوم شماره یک قرار دارد. نقش مهم این ژن در کنترل متاستاز شناخته شده ولی از سال ۲۰۰۳ به اهمیت آن در بلوغ، تخمک‌گذاری و باروری پی‌بردند.

هدف: آشکار ساختن ارتباط پلی‌مورفیسم کدون ۸۱ ژن KISS1 با ناباروری ایدیوپاتیک در مردان

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مولکولی، ۵۰ مرد نابارور ایدیوپاتیک و ۳۶ مرد سالم(به عنوان کنترل) از نظر پلی‌مورفیسم Pro81Arg مورد آزمون قرار گرفتند. DNA استخراج شده از ۲ میلی‌لیتر خون محیطی افراد بیمار و کنترل (با اخذ رضایت‌نامه کتبی از آنها) بدست آمد. جهت تعیین پلی‌مورفیسم کدون یاد شده از روش Allele-specific PCR استفاده شد.

نتایج: پس از انجام تکنیک‌های آزمایشگاهی و محاسبه آماری نتایج بدین صورت بدست آمد: از بیماران، ۵٪ هوموزیگوت Pro/Pro، ٦٪ هموزیگوت Arg/Arg و ۸٤٪ هتروزیگوت Arg/Pro و در گروه کنترل، ۰٪ هموزیگوت Pro/Pro، ۰٪ هموزیگوت Arg/Arg و ۱۰۰٪ هتروزیگوت Arg/Pro بودند. فراوانی‌های ژنوتیپی مشاهده شده بین دو گروه سالم و بیمار نشانگر تفاوت معنی‌دار بین دو گروه بود (P= ۰/۰٤۱۸) در حالی که توزیع آلل‌ها (Pro/Arg) بین دو گروه بیمار و کنترل معنی‌دار نبوده‌است(P=۰/۹۱۷۰).

نتیجه‌گیری: ژنوتیپ هموزیگوت Pro/Pro و Arg/Arg در کدون ۸۱ ژن KISS1 می‌تواند با ناباروری مرتبط باشد. شاید بتوان نقش ترکیب ژنتیکی را در ارتباط پلی‌مورفیسم و استعداد ابتلای افراد به ناباروری ایدیوپاتیک مؤثر دانست؛ ولی نتیجه‌ی بدست آمده ممکن است با تغییر خزانه‌ی ژنتیکی جمعیت مورد بررسی و یا تغییر معنی‌دار اندازه‌ی جمعیت تغییر کند. بنابراین، نتایج این پژوهش قطعی نیست و برای تائید عملکرد این پلی‌مورفیسم نیاز به بررسی بیشتری وجود دارد.

کلید واژه : پلی‌مورفیسم/ ژن/ کیس‌پپتین انسانی/ ناباروری مردان

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره بیست‌و دوم شماره ۸۵، صفحات: ۸-۱

مقدمه

ناباروری، ناتوانی زوج در آبستنی(صرف نظر از علل آن) در طی یک سال از مقاربت‌های متوالی مطلوب و بدون بهره‌گیری از روش‌های کنترل آبستنی است. ابتلای به ناباروری می‌تواند موجب تنش‌های روحی ـ اجتماعی ـ اقتصادی در افراد نابارور و اجتماع‌شان شود. به طور کلی، انتظار می‌رود که در جهان یک هفتم زوج‌ها دچار مشکلات باروری باشند. شیوع ناباروری در اغلب کشورها مشابه هم و مستقل از میزان توسعه‌یافتگی کشور است. تخمین‌زده‌می‌شود که سالانه ۸۰-٦۰ میلیون نفر در جهان دچار ناباروری باشند. تقریباً در نیمی از موارد ناباروری، به نحوی عامل مرد دخالت دارد(بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی). ناباروری نشانگان چندعاملی بوده و عوامل مختلف غیرژنتیک و ژنتیک در آن دخالت دارند(۱). از عوامل غیرژنتیکی مؤثر بر ناباروری مردان می‌توان به مواردی همچون علل هورمونی، ناهنجاری‌های ساختاری، عفونت‌های تناسلی، ضعف جنسی، برخی جراحی‌ها، واریکوسل، برخی بیماری‌های مزمن، شیمی درمانی، داروها، عوامل ایمونولوژی و بالاخره عوامل محیطی اشاره کرد(۲). مهم‌ترین عوامل ژنتیک مؤثر بر بروز ناباروری در مردان شامل سندروم کلاین فلتر، xxmale، سندروم Noonan's، ریزحذف‌های کروموزوم Y، جهش‌های DNA میتوکندریایی، نقایص تک ژنی و نقایص چندعاملی است(۲). به‌رغم پیشرفت‌های روش‌شناختی تشخیصی، متجاوز از ۲۵ درصد مردان نابارور آنالیز منی غیرطبیعی با علت ناشناخته را نشان می‌دهند. این شرایط تحت عنوان ناباروری ایدیوپاتیک شناخته شده و با چندین عامل

۱. رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

۲. رشت، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات اورولوژی

مختلف ارتباط دارد. غیرقابل انتظار نیست که چنین بیمارانی از نظر مشخصه‌های منی، گستره وسیعی از ناهنجاری‌ها را نشان دهند(۲).

KISS1 ژنی است که در سال ۱۹۹۸ به وسیله‌ی یک گروه علاقمند در زمینه‌ی ژن‌های سرکوبگر متاستاز کلون شد(۳). سازمان‌دهی ژنومی توالی این ژن آشکار کرده که ژن یاد شده متشکل از چهار اگزون است. دو اگزون اول این ژن غیرقابل ترجمه‌اند، اگزون سوم آن ۳۸۵ جفت باز غیرکدشونده دارد که به دنبال آن جایگاه آغاز ترجمه و ۱۰۰۰ جفت باز قابل ترجمه وجود دارد. اگزون پایانی شامل ۳۳۲ جفت باز بعدی قابل ترجمه، کدون پایانی قابل ترجمه و سیگنال پلی‌آمیداسیون است. جایگاه این ژن روی بازوی بلند کروموزوم شماره‌ی ۱، ژن‌گاه ۳۲ تعیین شده‌است(۳). مهم‌ترین نواحی بیان KISS1 در مغز در هسته‌ی قوسی(Arc)، هسته‌ی پری‌ونتریکولار(PeN) و هسته‌ی آنتروونترال پری ونتریکولار (AVPV) است. سطوح پایین‌تر بیان این ژن را می‌توان در ناحیه‌ی پری‌اپتیک، آنترودورسال و هسته‌ی bed از stria terminalis دید(٤).

KISS1 در جفت(به میزان بالا)، پانکراس، کلیه، کبد، شش، پروستات و روده‌ی باریک نیز بیان می‌شود(۵).

Kisspeptin (Kp) محصول پروتئینی رمز شده به وسیله‌ی ژن KISS1 است که به عنوان لیگاند طبیعی GPR54، محسوب می‌شود. در ابتدا عملکرد بیولوژی Kp را محدود به توانایی آن در سرکوب متاستاز تومور می‌دانستند، از این رو به آن متاستین اطلاق کردند(٦). در سال‌های اخیر سیستم KISS1-GPR54 به عنوان دروازه‌بان نورون‌های GnRH که در فعال‌سازی بلوغ و تنظیم آن توسط استروئیدهای گونادی و احتمالاً فاکتورهای متابولیک دخیلند؛ ضروری دانسته شده‌است. Kp متشکل از ١٤٥ اسید آمینه است که طی پردازش منجر به تولید نوروپپتیدهای فعال مختلف می‌شود. در ابتدا، Kp-54 تولید شده، سپس این فرآورده به پپتیدهای kp-10 و kp-13 و kp-14 تبدیل می‌شود(۷). بررسی جنبه‌های مختلف عملکرد تولیدمثلی Kp نشانگر ارتباط آن با بسیاری از عوامل عصبی، هورمونی و محیطی است. فعالیت نورون‌های ترشح کننده‌ی Kp در مسیر واکنش‌های عصبی در هسته‌ی Arc با برداشتن غده‌های جنسی تحریک و با استروئیدهای جنسی مهار می‌شود(۸).

ارتباط kp و فعالیت سایر هم خانواده‌های درون‌زاد GnRH نظیر آمینواسیدهای تحریکی(یعنی گلوتامات)، پپتید شبه‌گالانین و وازوپرسین بسیار اهمیت دارد؛ زیرا امکان دارد تأثیر این انتقال دهنده‌های عصبی بر ترشح GnRH از طریق مسیر پیام‌دهی Kisspeptin –GPR54 میانجی‌گری شود(۹). مطالعات چندین گروه تحقیق نشان داده است که تزریق Kp چه به صورت مرکزی و چه به صورت محیطی، موجب تحریک ترشح گونادوتروپین‌ها می‌شود. توانایی Kp در افزایش ترشح GnRH در موش صحرایی گزارش شده؛ همچنین نشان داده شده که Kp موجب القای آزاد شدن GnRH در مایع مغزی نخاعی موش می‌شود(۱۰). پیشنهاد شده Kp قادر به فعال‌سازی نورون‌های GnRH به طور مستقیم بوده، همچنین در حضور استرادیول قادر به فعال سازی نورون‌های یاد شده از طریق شبکه‌ی ترانس سیناپسی باشد(۱۱). گزارش شده دوز بسیار پایین kisspeptin تزریق شده به درون بطن‌های جانبی مغز موش باعث افزایش سریع و قوی ترشح FSH و LH شده‌است. یافته‌های مشابه در موش صحرایی، گوسفند، میمون و انسان بدست آمده است(۱۲). باید افزود؛ Kp قادر به تحریک آزادسازی LH در موش‌های ناک اوت از نظر KISS1R نیست؛ لذا پیشنهاد شده اثر تحریکی این پپتید تنها با میانجی‌گری گیرنده‌ی یاد شده است که صورت می‌گیرد(۱۳). نتایج تحقیق حاکی از اثر مستقیم Kp بر بیضه‌ها نیز هست(١٤). تداوم مزمن تزریق Kp در موش‌های صحرایی نر موجب کاهش وزن بیضه‌ها و تحلیل لوله‌های اسپرم‌ساز شده‌است؛ این یافته منجر به شکل‌گیری این فرضیه شده که ممکن است Kp جریان خون بیضوی را تغییر دهد(۱۵). شواهد اخیر پیشنهاد کننده‌ی امکان نقش kisspeptin در کشیدن ماشه‌ی بلوغ در پریمات‌هاست. تزریق مرکزی kisspeptin موجب تحریک ترشح LH در میمون‌های نر فاقد گناد پیش از بلوغ شده است. ثانیاً، محتوای هیپوتالاموسی mRNAی ژن KISS1 طی بلوغ هم در نرهای فاقد گوناد و هم در ماده میمون‌های سالم افزایش می‌یابد. افزایش تولید Kp می‌تواند به فعالیت نوروآندوکرینی محور تولید مثلی به هنگام بلوغ در گونه‌های پریمات نسبت داده شود(١٦). یافته‌ها مبین آن است که افزایش کارآیی مسیر پیام‌دهی -Kisspeptin

GPR54 در شروع بلوغ بوقوع می‌پیوندد؛ گرچه ممکن است مکانیسم مولکولی آن وابسته به گونه باشد(۱۷و۱۸).

تاکنون چندین نقطه پلی‌مورفیسم در ژن یاد شده گزارش شده‌است که از شایع‌ترین آنها می‌توان به پلی‌مورفیسم Pro81Arg ، Gln36Arg،Glu20Lys و حذف ۷ اسیدآمینه از بخش انتهای کربوکسیلی اشاره کرد (۱۹و۲۰). پلی‌مورفیسم بررسی شده در مطالعه‌ی ما مربوط به کدون ۸۱ واقع در اگزون شماره‌ی ۳ این ژن است که طی آن با تبدیل نوکلئوتید دارای سیتوزین به نوکلئوتید حاوی گوانین، اسید آمینه‌ی پرولین به آرژنین تبدیل می‌شود(P81 R).

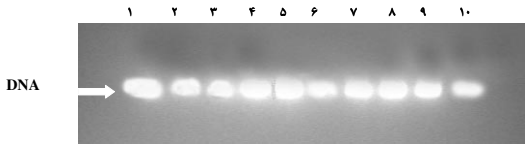
هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم(P81R) در ژن KISS1 و استعداد ابتلای به ناباروری ایدیوپاتیک در جمعیتی از مردان استان گیلان بوده است. به نظر می‌رسید که تبدیل اسیدآمینه پرولین به آرژینین حاصل پلی‌مورفیسم یاد شده، از طریق اثرگذاری بر کلیواژ پروتئین متصل شونده به GPR54 بر مسیر پیام‌دهی آن موثر باشد. از این رو پس از مقایسه‌ی تفاوت بین پلی‌مورفیسم یاد شده میان دو گروه بیمار و شاهد، در پی یافتن ارتباطی معنی‌دار بین این تفاوت ژنتیکی و ابتلای مردان مورد مطالعه به ناباروری ایدیوپاتیک بوده‌ایم.

مواد و روش‌ها

بیماران: دامنه‌ی سنی مردان دچار ناباروری ایدیوپاتیک در این تحقیق ۴۸-۲۵ سالگی بوده‌است. همچنین، افراد شاهد نیز مردانی بارور با دامنه‌ی سنی ۴۵-۲۵ ساله بوده‌اند. در این پروژه از ۵۰ مرد که بنا به تشخیص پزشک متخصص به عنوان نابارور ایدیوپاتیک شناخته شده بودند و ۳۶ مرد سالم(به عنوان کنترل یا شاهد) که دارای حداقل یک فرزند بدون استفاده از روش‌های کمکی تولیدمثلی بودند با اخذ رضایت‌نامه کتبی، ۲ میلی‌لیتر نمونه‌ی خون تهیه شد. آنگاه نمونه‌های خون در ونوجکت‌های حاوی EDTA ریخته شد. نمونه‌ها به مدت چندین ماه در دمای ۲۰°c- قابل نگهداری هستند. افراد مورد مطالعه سابقه مصرف دخانیات، مواد مخدر و الکل نداشتند. همچنین، بیماری دیگری نداشتند. همگی ساکن استان گیلان بودند و طی دوره‌ای یک‌ساله از مطب پزشک متخصص اورولوژی ارجاع شده بودند.

استخراج DNA: برای استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت DNGTM-Plus نمونه خون باکیت و ایزوپروپانول مخلوط و حاصل سانتریفوژ شد(10 min, 12000RPM).

آنگاه پس از دور ریختن محلول بالایی با اتانول ۹۰ درجه دو مرحله پیاپی شستشو صورت گرفت. پس از هر دور شستشو سانتریفیوژ(10min,12000RPM) و رسوب باقی‌مانده در انکوباتور(۶۵°cو1min) قرار داده شد. در پایان با افزودن ۵۰µl آب مقطر به رسوب پس از سانتریفیوژ (30S, 12000RPM) DNAی حاصل در دمای ۷۰°c- نگهداری پس از استخراج DNA برای ارزیابی صحت استخراج و کیفیت DNAی استخراج شده، الکتروفورز افقی با ژل آگارز ۰/۸٪ انجام شد. نمونه DNA استخراج شده از افراد بیمار و سالم روی ژل آگارز ۰/۸ درصد در شکل ۱ نشان داده شده‌است.



شکل ۱: نمونه DNA استخراج شده از افراد بیمار و سالم روی ژل آگارز ۰.۸٪

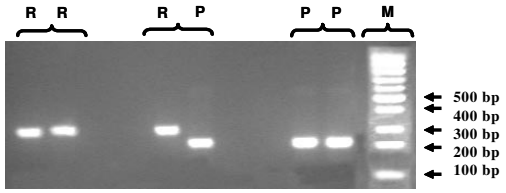
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR): برای بررسی پلی‌مورفیسم مورد نظر، DNA ژنومی به روش PCR تکثیر شد. با توجه به پلی‌مورفیسم یاد شده که حاصل تبدیل نوکلئوتید دارای سیتوزین به نوکلئوتید حاوی گوانین در کدون ۸۱ اگزون سوم ژن KISS1 بود؛ دو جفت پرایمرهای رو به جلو(Forward) و رو به عقب(Reverse) طراحی و تهیه شدند. بدین منظور برای بررسی وجود نوکلئوتید دارای سیتوزین که حاصل بیان آن در ژن مورد بررسی کد نمودن اسیدآمینه‌ی پرولین است، یک پرایمر رو به جلو و یک پرایمر رو به عقب طراحی و محصول PCR دارای ۲۰۷ جفت نوکلئوتید شد. همچنین، در بررسی وجود نوکلئوتید دارای گوانین که حاصل بیان آن در ژن مورد نظر اسیدآمینه‌ی آرژنین است؛ یک پرایمر روبه جلو اختصاصی و یک پرایمر رو به عقب با فاصله‌ای مشخص از آن طراحی و محصول PCR دارای ۳۰۴ جفت نوکلئوتید شد.

توالی‌های الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای Forward/pro و Reverse/pro برای تکثیر قطعه‌ی ۲۰۷ جفت نوکلئوتیدی

به‌ترتیب به‌صورت TCCGGGAGCCCCCAGCAGC و CACTGCCCCGCACCTGCG بوده و نیز توالی‌های الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای Forward/Arg و Reverse/Arg جهت تکثیر قطعه‌ی ۳۰٤ جفت نوکلئوتیدی به ترتیب به صورت TCCGGGAGCCGCCAGCAGC و GCCTCGGGTTGGAAGCTC بودند.

PCR به کمک دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad و در میکروتیوپ‌های ۰/۲ میلی‌متری حاوی2µl Templet DNA، 2.5µl DNTP (0.2mM)، 2.5µl PCR buffer (10x)، 0.7µl MgCl2(2mM)، 2µl Forward primer (10Pmol)، 2µl Reverse Primer (10Pmol)، 0.5µl Taq DNA polymerase (1.5u/ml)، 12.8µL آب مقطر تزریقی و (2٪) 0.5µl DMSO انجام شد. برای تکثیر قطعه‌های مورد نظر در دستگاه ترموسایکلر از برنامه‌ی Touch down استفاده‌شد. علت استفاده از برنامه‌ی یاد شده حذف باندهای غیراختصاصی و نیز افزایش کیفیت محصولات PCR بوده‌است. سیکل‌های مختلف برنامه‌ی تکثیر قطعه‌ی ۳۰٤ جفت نوکلئوتیدی بدین صورت بود: سیکل اول(٤minو۹۵˚c)، سیکل دوم سه مرحله و ۱۰ دور؛ مرحله‌ی اول(۳۰sو۹۵˚c)، مرحله‌ی دوم(۳۰sو٦۵˚c)، آنگاه پس از کاهش یک درجه‌ای حرارت به ازای هر دور مرحله‌ی سوم(٤۵Sو۷۲˚C). سیکل سوم نیز شامل سه مرحله و ۳۰ دور بود؛ مرحله‌ی اول(۳۰sو۹۵˚c)، مرحله‌ی دوم(۳۰s و ۵۵˚c) مرحله‌ی سوم(٤۵Sو۷۲˚c)، سیکل چهارم شامل یک دور و یک مرحله(۵minو۷۲˚c)، سیکل پنجم نیز شامل یک دور و یک مرحله بود که طی آن محصول PCR در دمای ٤˚c به مدت بی‌نهایت قابل نگهداری است.

سیکل‌های مختلف برنامه‌ی تکثیر قطعه‌ی ۲۰۷ جفت نوکلئوتیدی نیز بدین صورت بود: سیکل اول(٤minو۹۵˚c)، سیکل دوم سه مرحله و ۱۰ دور؛ مرحله‌ی اول(۳۰Sو۹۵˚c)، مرحله‌ی دوم(٤۵s و ۷۰˚c)، آنگاه پس از کاهش یک درجه‌ای حرارت به ازای هر دور مرحله‌ی سوم(٤۵sو۷۲˚c). سیکل سوم نیز شامل سه مرحله و ۳۰ دور بوده است؛ مرحله‌ی اول (۳۰sو۹۵˚c)، مرحله‌ی دوم(٤۵sو٦۰˚c)، مرحله‌ی سوم(٤۵sو۷۲˚c)، سیکل چهارم شامل یک دور و یک مرحله(۵minو۷۲˚c)، سیکل پنجم نیز شامل یک دور و یک مرحله بود که طی آن محصول PCR در دمای ٤˚c به مدت بی‌نهایت قابل نگهداری است. پس از تکثیر قطعه‌های مورد نظر، جهت بررسی قطعات تکثیر شده الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۲ درصد انجام شد. نمونه محصول PCR قطعات ۲۰٤ و ۳۰۷ جفت نوکلئوتیدی روی ژل آگارز ۲ درصد در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲: محصول PCR قطعات ۲۰٤ و ۳۰۷ جفت نوکلئوتیدی روی ژل آگارز ۲٪

M: وزن مولکولی PP: هر دو الل پرولین
RP: یک الل آرژنین و دیگری پرولین RR: هر دو الل آرژنین

تحلیل‌های آماری

آنالیز آماری با آزمون χ^2 و برنامه‌ی Medcalc نسخه‌ی ۹/۳ انجام شد. Odd ratios با Confidence intervals (CI)، ۹۵ درصد محاسبه و مقدار P<۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

پس از PCR بر DNAی استخراج شده نمونه‌های ۵۰ فرد نابارور ایدیوپاتیک و ۳٦ فرد سالم(به عنوان کنترل) و بردن محصول آن روی ژل، نتایج ژنوتیپی و آللی بدین شرح بدست آمد: از ۵۰ فرد نابارور ایدیوپاتیک، ۳ نفر(٦ درصد) ژنوتیپ هموزیگوت RR، ٤۲ نفر(۸٤ درصد) ژنوتیپ هتروزیگوت RP و ۵ نفر(۱۰ درصد) ژنوتیپ هموزیگوت PP داشتند. همچنین، تمام ۳٦ فرد سالم(۱۰۰ درصد) دارای ژنوتیپ هتروزیگوتRP بودند(جدول ۱).

جدول ۱: فراوانی ژنوتیپی کدون ۸۱ ژن KISS1 در مردان سالم و نابارور ایدیوپاتیک

گروه	ژنوتیپ		
	PP تعداد(درصد)	RP تعداد(درصد)	RR تعداد(درصد)
کنترل سالم	۰(۰٪)	۳٦(۱۰۰٪)	۰(۰٪)
نابارور ایدیو پاتیک	۵(۱۰٪)	٤۲(۸٤٪)	۳(٦٪)

PP: هر دو الل پرولین RP: یک الل آرژنین و دیگری پرولین RR: هر دو الل آرژنین

فراوانی آللی افراد نابارور ایدیوپاتیک و سالم نیز بدین صورت بود: در افراد نابارور ایدیوپاتیک فراوانی آلل R، ٤٨ درصد و فراوانی آلل P، ٥٢ درصد و در افراد سالم این فراوانی‌های آللی یکسان و به میزان ٥٠ درصد برای هر آلل بوده است(جدول ٢).

جدول ٢: فراوانی اللی کدون ٨١ ژن KISS1 در مردان سالم و نابارور ایدیوپاتیک

گروه	الل	
	R تعداد(درصد)	P تعداد(درصد)
کنترل سالم	٣٦(٥٠٪)	٣٦(٥٠٪)
نابارور ایدیو پاتیک	٤٧(٥١٪)	٤٥(٤٩٪)

P: الل پرولین R: الل آرژنین

با توجه به میزان P-Value مورد محاسبه جهت مقایسه‌ی فراوانی ژنوتیپی (P=٠/٤١٨) و آللی(P=٠/٩١٧٠) می‌توان نتیجه گرفت که میزان فراوانی‌های ژنوتیپی سه نوع ژنوتیپ RR، RP و PP بین دو جمعیت نابارور ایدیوپاتیک و شاهد با یکدیگر تفاوت معنی‌داری داشت. در صورتی که فراوانی‌های آللی بین افراد نابارور ایدیوپاتیک و سالم تفاوت معنی‌داری نشان نداد.

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه، بحث ارتباط میان پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی و استعداد ابتلای به برخی بیماری‌ها از بحث‌های مهم و قابل توجه محسوب می‌شود. پلی‌مورفیسم به الل‌های مختلف یک ژن در جمعیت یک گونه که ممکن است موجب فنوتیپ‌های مختلف شود؛ اطلاق می‌شود. حاصل این پلی‌مورفیسم‌ها می‌تواند مسئول بروز تفاوت‌های فیزیولوژی، بیوشیمی، پاسخ به داروها و بالاخره استعداد ابتلای افراد به برخی بیماری‌ها باشد(٢١). ناباروری یکی از معضل‌های بزرگ سلامت جهانی است که ١٥ درصد زوج‌ها به آن دچارند. تقریبا در نیمی از موارد ناباروری، به نوعی عامل مرد دخیل است. حدود ٢٥ درصد مردان به دلایل ناشناخته ای نابارورند. در این مطالعه به ارتباط بین یک پلی‌مورفیسم شناخته شده در ژنی موسوم به KISS1 و ناباروری ایدیوپاتیک مردان پرداخته شده‌است. در ابتدا نقش KISS1 به عنوان سرکوب کننده‌ی متاستاز مورد توجه قرار گرفت تا این‌که در سال‌های اخیر به نقش‌های مهم این ژن در سیستم تولیدمثلی پی برده شد(٧و١٠). ژن یاد شده روی بازوی بلند کروموزوم شماره ١ ژن گاه ٣٢ قرار داشته و چهار اگزون دارد(٣). محصول ژن KISS1 پروتئین Kp است. چون در ابتدا عملکرد بیولوژی Kp را تنها در سرکوب متاستاز می‌دانستند؛ به آن متاستین اطلاق می‌شد(٦).

پیرامون مطالعات انجام شده در مورد پلی‌مورفیسم در ژن KISS1 می‌توان به تحقیق بر دختران چینی اشاره کرد. در این تحقیق بر ٢٧٢ دختر چینی دچار بلوغ زودرس مرکزی(CPP) و ٢٨٨ فرد کنترل؛ تنها بین پلی‌مورفیسم(P110T) در این ژن و بلوغ زودرس مرکزی ارتباط معنی‌داربدست آمد ولی بین سایر پلی‌مورفیسم‌ها ارتباط معنی‌دار نبود(١٩). برعکس در مطالعه‌ای دیگر در دختران کره‌ای، پلی‌مورفیسم ذکر شده نقش محافظتی در برابر بلوغ زودرس نشان داد(٢٠).

تاکنون پلی‌مورفیسم‌های متعددی در ژن یاد شده گزارش شده‌است، پلی‌مورفیسم مورد بررسی در مطالعه‌ی ما، از نوع Single Nucleutide polymorphism (SNP) و شامل تبدیل نوکلئوتید دارای سیتوزین به گوانین در کدون ٨١ از اگزون سوم ژن KISS1 بوده‌است که با این تبدیل اسید آمینه پرولین به آرژینین مبدل می‌شود(P81 R).

در این مطالعه بر ٥٠ مرد نابارور ایدیوپاتیک و ٣٦ مرد سالم(کنترل) در جمعیتی از مردان ایران، استان گیلان؛ پس از روش یاد شده و محاسبه آماری جهت پی‌بردن به تأثیر پلی‌مورفیسم مذکور بر استعداد ابتلای مردان به ناباروری، نتایجی بدین صورت بدست آمد: از ٥٠ فرد نابارور ایدیوپاتیک ٣ نفر هموزیگوت RR، ٤٢ نفر هتروزیگوت RP و ٥ نفر هموزیگوت PP بودند. بنابراین، فراوانی کدون ٨١ در مردان دچار ناباروری ایدیوپاتیک به ترتیب برای ژنوتیپ‌های RR، RP و PP، ٦، ٨٤ و ١٠ درصد بود. همچنین، تمام ٣٦ فرد سالم دارای ژنوتیپ هتروزیگوت RP بودند. بنابراین، فراوانی کدون ٨١ در افراد سالم به ترتیب برای ژنوتیپ‌های RR، RP و PP، صفر، ١٠٠ و صفر درصد بود. تفاوت جمعیت سالم و بیمار با توجه به نتیجه آزمون χ^2:٦/٣٥١ و P-value: ٠/٠٤١٨ مورد محاسبه در مقایسه‌ی فراوانی ژنوتیپی افراد بیمار و سالم نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار فراوانی‌های ژنوتیپی بین دو

گروه بوده است. چون ژنوتیپ تمام افراد کنترل هتروزیگوت بوده و ژنوتیپ‌های هموزیگوت RR و PP نیز در آنان وجود نداشت؛ شاید بتوان احتمال داد که ژنوتیپ‌های هموزیگوت در استعداد ابتلای افراد بیمار به ناباروری ایدیوپاتیک دخیل باشند. از سوی دیگر، در افراد بیمار فراوانی الل R، ۴۸ و آلل P، ۵۲ درصد و در افراد سالم نیز فراوانی آلل‌های R و P برابر و ۵۰ درصد بوده‌است. بر این اساس، با توجه به نتیجه آزمون χ^2:۰/۰۱۱ و P-value: ۰/۹۱۷۰ تفاوت معنی‌دار نیست.

البته، ناباروری همچون سایر بیماری‌های چندعاملی، حاصل بر هم‌کنش عوامل مختلف ژنی و محیطی است که در این مطالعه تنها به بررسی یک وجه از یکی از عوامل دخیل پرداخته شده لذا همچنان نقش سایر ژن‌ها، عوامل محیطی و حتی سایر پلی‌مورفیسم‌های شناخته شده در ژن مورد مطالعه، در ایجاد و بروز ناباروری قابل تأمل و دخیل است.

در مجموع، شاید بتوان نقش ترکیب ژنتیک را در ارتباط پلی‌مورفیسم و استعداد ابتلای به ناباروری ایدیوپاتیک مؤثر دانست؛ ولی ممکن است نتیجه‌ی بدست آمده با تغییر خزانه‌ی ژنتیکی یا تغییر معنی‌دار اندازه‌ی جمعیت تغییر کند.

منابع

1. Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S Genetics of Human Male Infertility. Med J 2009; 50(4): 336.

2. Wein AJ, Kavo LR, Novick AC, Latin AW Campbel – Walsh Urology 10th Edition Philadelphia; W B Saunders, 2010.

3. West A, Vojta PJ Welch DR, Weissman BE Chromosome Localization and Genomic Structure of the KiSS-1Metastasis Suppressor Gene (KISS1). Genomics 1998; 54: 145–148.

4. Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Castellano JM, Roa J, Mayen A,Barreiro ML, Gaytan F, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C Advanced Vaginal Opening and Precocious Activation of the Reproductiveaxis by, KiSS-1 Peptide, the Endogenous Ligand of GPR54. Physiology 2004; 561:379-386.

5. Kevin T Nash, Danny R Welch. The KISS1 Metastasis Suppressor: Mechanistic Insights and Clinical Utility.Front Biosci. 2006; 11: 647–659.

6. Cho SG, Li D, Tan K, Siwko SK, Liu M. KiSS1 and Its G-protein-coupled Receptor GPR54 in Cancer Development and Metastasis. Cancer Metastasis Rev. [in press]

7. Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. Kisspeptins and Reproduction: Physiological Roles and Regulatory Mechanisms. Physiol Rev 2012; 92(3):1235-316.

8. García-Galiano D, Pinilla L, Tena-Sempere M. Sex Steroids and the Control of the Kiss1 System: Developmental Roles and Major regulatory Actions. J Neuroendocrinol 2012; 24(1):22-33.

9. Heather M. Dungan, Donald K Clifton, Robert A. Steiner. Minireview: Kisspeptin Neurons as Central Processors in the Rregulation of Gonadotropin-releasing Hormone Secretion. Endocrinology 2006; 147(3):1154–1158.

10. Tena-Sempere Manuel. GPR54 and Kisspeptin in Reproduction. Human Reproduction 2006; 12(5):631–639.

11. Pielecka-Fortuna J, Chu Z, Moenter SM. Kisspeptin Acts Directly and Indirectly to Increase Gonadotropin-releasing Hormone Neuron Activity and Its Effects are Modulated by Estradiol. Endocrinology 2007; 149(4):1979–1986.

12. Smith JT, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of the Neuroendocrine Reproductive Axisby Kisspeptin-GPR54 Signaling. Reproduction 2006; 131: 623–630.

13. Messager S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, ThresherRR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA. Kisspeptin Directly Stimulates Gonadotropin-releasing Hormone Release Via G Protein-coupled Receptor 54. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102:1761–1766.

14. Mead EJ, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Kisspeptins: a Multifunctional Peptide System with a Role in Reproduction, Cancer and the Cardiovascular System. British Journal of Pharmacology 2007; 151: 1143–1153.

15. Thompson EL, Patterson M, Murphy KG, Smith KL, Dhillo WS, Todd JF, Ghatei MA, Bloom SR. Central and Peripheral administration of Kisspeptin-10 Stimulates the Hypothalamic-pituitary-Gonadal Axis. J Neuroendocrinol 2004; 16:850–858.

16. Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM. Increased Hypothalamic GPR54 Signaling: a Potential Mechanism for Initiation of Puberty in primates. PNAS 2005; 102:2129–2134.

17. Topalogu AK, Tello JA, Kotan LD, Ozbek MN, Yilmaz BY, Erdogan S, Gurbuz F, Temiz F, Millr RP, Yuksel B. Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. N Engl J Med 2012; 366: 629-635.

18. Tena-Sempere M. Kisspeptin Signaling in the Brain: Recent Developments and Future Challenges. Molecular and Cellular Endocrinology 2010; 314: 154-159.

19. Luan X, Zhou Y, Wang W, Yu H, Li P, Gan X, Wei D, Xiao J. Association Study of the Polymorphisms in the KISS1 Gene with Central Precocious Puberty in Chinese Girls . European Journal of Endocrinology 2007; 157:113–118.

20. Ko JM, Lee HS, Hwang JS. KISS1 Gene Analysis in Korean Girls with Central Precocious Puberty: a Polymorphism, p. P110T, Suggested to Exert a Protective Effect. Endocrine Journal 2010; 57(8), 701-709.

21. Frazier ME , Johnson GM , Thomassen DG , Oliver CE , Patrions A . () Realizing the Potential of the Genome Revolution: The Genomes to Life Program Science 2003; 300: 290-293.

The Association of Codon 81 Polymorphism of KISS1 Gene with Idiopathic Male Infertility

Semnani M. (Ph.D Candidate)[1] –*Vaziri H. (Ph.D.)[1] – Salehi Z. (Ph.D)[1] – Hamidi Madani A. (M.D)[2]

***Corresponding Address:** Department of Biology, Faculty of Sciences, Guilan University, Rasht, IRAN

Email: Vaziri@guilan.ac.ir

Received: 7/Apr/2012 Accepted: 11/Aug/2012

Abstract

Introduction: Infertility is a multifactorial syndrome with various genetic and non-genetic factors. Despite methodological advancements, the possible causes for infertility are still unknown for more than 25 percent of cases (idiopathic infertility). Male factor infertility accounts for 50 percent of infertile couples. The human *KISS1* GENE is located on the long arm of chromosome 1 and has a pivotal role in metastasis control. Since 2003, its importance in puberty, ovulation and fertility has been revealed.

Objective: This study was conducted to investigate the relationship between codon 81 polymorphism of the gene and male idiopathic male infertility.

Materials and Methods: In this molecular study, 50 patients and 36 healthy fertile men (as controls) were tested for polymorphism of pro 81 Arg. DNA was extracted from 2ml of peripheral blood samples from the patients and controls (having obtained written informed consents from them). Allele specific PCR method was applied to determine the codon polymorphism.

Results: Among infertile cases, the distribution of genotypes was as follows: 5% were Pro/Pro, 84% were Arg/Pro and 5% were pro/pro. As for the controls, the distributions were: 0% Pro/Pro, 100% Arg/Pro and 0% Arg/Arg. The results and statistical analyses revealed that the genotype frequencies observed between healthy and patient groups, were significantly different between the two groups (P = 0.0418). However, difference in the distributions of alleles (Pro/Arg) in patient and control groups was not significant (P = 0.9170).

Conclusion: In this study, Pro/Pro and Arg/Arg homozygote genotypes in 81 codon of KISS1 gene can be attributed to idiopathic male infertility. Overall, the role of genetic composition between the studied polymorphism and susceptibility to male idiopathic infertility may be considered as effective. However, the results may be different when selecting different genetic pools or significant changes in a population size. Thus, the conclusion was not solid and more studies are needed for functional validation of the polymorphism.

Key words: Gene/ Infertility, Male/ Kisspeptin/ polymorphism

_____Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 85, Pages: 1-8

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, IRAN

^ 2. Urology Research center, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, IRAN