

Investigation of TIMP-1 Gene Expression in Patients with Multiple Sclerosis (MS)

Marzieh Khoshbin Nazdik¹, Zeinab Khazaei Koochpar^{2*}, Arezo Sayad³

1. MSc Student in Cellular and Molecular Biology, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.
2. Assistant Professor, PhD in Cellular and Molecular Biology, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.
3. Assistant Professor, PhD in Medical Genetic, Department of Medical Genetic, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 4 Mar 2017, Accepted: 19 Jul 2017

Abstract

Background: Matrix metalloproteinases (MMPs) comprise a family of proteolytic enzymes. MMPs are capable of disrupting the blood-brain barrier (BBB), mediating the destruction of extracellular matrix and myelin components. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) are proteins which block the activity of MMPs. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) facilitates T-cell migration into the CNS while the tissue inhibitor matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) inhibits MMP-9 actions. The aim of this study was to evaluate the expression of TIMP-1 gene (in RNA level) in blood cells of relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) patients treated with IFN β .

Materials and Methods: In this study, the expression level of TIMP-1 gene was investigated in blood cells of MS patients compared to healthy subjects by Real-Time PCR.

Results: The RRMS patients manifested a lower expression level of TIMP-1 RNA than their normal counterparts, although the result was not significant ($p=0.1$).

Conclusion: The results of this study showed that there was no linear correlation between TIMP-1 expression level and risk of Expanded Disability Status Scale of Kurtzke (EDSS); nor was there any significant correlation between expression status of TIMP-1 and duration of the disease. Further studies are recommended to compare TIMP-1 RNA in patients before and after taking IFN- β .

Keywords: MMP-9, Multiple sclerosis, Real-Time PCR, TIMP-1

*Corresponding Author:

Address: Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.
Email: khazaei@toniau.ac.ir

بررسی بیان ژن TIMP1 در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس (MS)

مرضیه خوشبین نزدیک^۱، زینب خزائی کوهر^{۲*}، آرزو صیاد^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.
۲. استادیار، دکترای زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.
۳. استادیار، دکترای ژنتیک پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۱۴، تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) شامل یک خانواده از آنزیم های پروتئولیتیک هستند. آن ها قادر به تخریب سد خونی-مغزی (BBB) بوده و تخریب اجزاء میلین و ماتریکس خارج سلولی را وساطت می کنند. مهارکننده های بافتی متالوپروتئینازها (TIMPs) پروتئین هایی هستند که فعالیت MMPs را مهار می کنند. ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ (MMP-9) مهاجرت سلول T را به سیستم عصبی مرکزی (CNS) تسهیل می کند، در حالی که مهارکننده های بافتی متالوپروتئیناز ۱ (TIMP-1) عملکرد MMP-9 را مهار می کنند. هدف از این مطالعه، بررسی بیان ژن TIMP-1 (در سطح RNA) در سلول های خونی مبتلایان به مالتیپل اسکلروزیس عودکننده (RRMS) تحت درمان با IFN β بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه، سطح بیان ژن TIMP-1 در سلول های خونی مبتلایان به MS در مقایسه با افراد سالم به روش Real-Time PCR بررسی شد.

یافته ها: در بیماران RRMS سطح بیان RNA ژن TIMP-1 نسبت به افراد نرمال کمتر بوده، گرچه این کاهش معنی دار نبود ($p=0/1$).

نتیجه گیری: نتایج حاصله از این مطالعه نشان داد که ارتباط خطی بین سطح بیان TIMP-1 و خطر EDSS، هم چنین ارتباط معنی داری بین وضعیت بیان TIMP-1 و مدت بیماری وجود ندارد. مطالعات بیشتری جهت مقایسه RNA ژن TIMP-1 در بیماران، قبل و بعد از مصرف اینترفرون بتا توصیه می گردد.

واژگان کلیدی: مالتیپل اسکلروزیس، TIMP-1، Real-Time PCR، MMP-9.

*نویسنده مسئول: ایران، تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی.

Email: khazaei@toniau.ac.ir

مقدمه

بیماری مولتیپل اسکلروزیس یا MS از رایج ترین بیماری های التهابی سیستم اعصاب مرکزی (CNS) می باشد. یک بیماری ناتوانی مزمن که بیشتر، افراد بین ۲۰-۴۰ سال را مبتلا می کند (۱). MS دارای چندین زیرگروه می باشد: Relapsing-remitting (RRMS) که شایع ترین فرم بوده و افراد، دوره های مختلف برگشت بیماری را دارند. Secondary Progressive (SPMS) بیماری ثانویه پیشرونده، زمانی است که به دنبال RR یک سیر پیشرونده اتفاق می افتد (۲). Primary Progressive (PPMS) بیماری اولیه پیشرونده که از ابتدای ظهور تخریب عصبی دیده می شود و ۱۵ درصد افراد مبتلا این فرم را تجربه می نمایند و Progressive-relapsing (PRMS) بیماری عودکننده پیش رونده که نوع نادر می باشد (۳). ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) یک خانواده متشکل از حداقل ۲۳ اندوپپتیداز بوده که به عنوان عوامل تغییر ماتریکس خارج سلولی در شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی عمل می کنند. MMPs شامل gelatinases, collagenases و stromelysins و سایر MMPs می باشند. فعالیت آن ها به وسیله مهار کننده های بافتی متالو پروتئینازها (TIMPs) تنظیم می شود که گروهی شامل ۴ آنتاگونیست اندوژن هستند که به جایگاه فعال MMPs متصل می شوند. مدارک زیادی دال بر نقش کلیدی MMPs در بیماری زایی بسیاری از بیماری های التهابی عصبی موجود است (۴). آزمایشات In Vitro و نتایج حاصله از مدل های جانوری مولتیپل اسکلروزیس نشان می دهد که متالو پروتئینازها عواملی هستند که در تخریب سد خونی-مغزی، ورود سلول های ایمنی به پارانشیم مغز، تشدید رهایی -TNF α و تجزیه پروتئین های میلین نقش دارند (۶-۴). از جمله ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ (MMP-9) مهاجرت سلول T را به سیستم عصبی مرکزی (CNS) تسهیل می کند، در حالی که مهارکننده های بافتی متالوپروتئیناز ۱ (TIMP-1) عملکرد

MMP-9 را مهار می کنند (۷). بر اساس بسیاری از مطالعات میزان MMP-9 در سرم بیماران RRMS بویژه در فاز حاد بیماری بالا می باشد (۸). با توجه به توضیحات فوق و نقش TIMPs در تنظیم فعالیت MMPs از جمله نقش -TIMP 1 در مهار عملکرد MMP-9، در این پژوهش بیان ژن TIMP-1 در سطح RNA در سلول های خون بیماران ایرانی مبتلا به RRMS تحت درمان با IFN β مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر یک مطالعه توصیفی تحلیلی و مورد - شاهدی می باشد. که در آن ۲۵ فرد بیمار مبتلا به MS که بر اساس معیار های Mc Donald توسط متخصص مغز و اعصاب تشخیص داده می شوند و هم چنین ۲۵ فرد سالم از نظر بیماری MS و بدون سابقه فردی یا خانوادگی بیماری اتوایمیون و همسان سازی شده از نظر جنسیت و سن با گروه بیمار، انتخاب شدند. نمونه گیری به صورت غیر تصادفی (هدف مند) انجام شد. معیار ورود به مطالعه افراد نداشتن سابقه فردی یا خانوادگی بیماری های اتوایمیون مثل لوپوس اریتماتوزو... و عدم وجود سابقه انواع بدخیمی ها و دارا بودن سطح ویتامین D نرمال بود (هم در بیماران و هم در افراد سالم). برای ورود افراد بیمار به مطالعه علاوه بر موارد فوق دو معیار دیگر نیز در نظر گرفته شد: ۱- افرادی که فقط یک دارو مصرف کرده باشند و ۲- به درمان نیز پاسخ داده باشند. افرادی که دارای معیارهای مذکور نبودند از مطالعه خارج شدند. در این مطالعه از افراد مورد بررسی با تأیید کمیته اخلاق دانشگاه شهید بهشتی بعد از تکمیل رضایت نامه، خون گیری انجام شد. هم چنین به طور همزمان پرسشنامه ای حاوی اطلاعات دموگرافیک و سابقه پزشکی برای هر بیمار تکمیل گردید.

استخراج RNA: در این مرحله، جهت بررسی میزان تغییر در بیان ژن مورد نظر، RNA کل از سلول های

(QIAGEN) (استرالیا) بود. برنامه دمایی واکنش Real Time-PCR به ترتیب شامل این موارد بود: یک مرحله واسرشت شدن اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۰ سیکل واکنش تکثیر شامل واسرشت شدن در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و اتصال پرایمرها/طویل سازی در ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه. طراحی پرایمر و پروب برای ژن هدف و ژن های خانه دار (کنترل داخلی) با کمک نرم افزار AlleleID v.7.82 انجام شد، که پرایمر به صورت Exon-Exon junction طراحی شد. توالی پروب ها و پرایمر های مورد استفاده و طول محصول در این مطالعه در جدول ۱ آمده است.

سفید خون با استفاده از کلروفرم و کیت استخراج RNA (GeneAll Hybrid-R™ Blood RNA) استخراج شد. سنتز cDNA: در این مرحله از RNA استخراج شده و کیت سنتز cDNA (Thermo Scientific Revert) (Aid First Strand cDNA Synthesis Kit Lot 00244639) استفاده شد و مواد تهیه شده در میکرو تیوب داخل دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf , Germany) قرار داده شد تا cDNA سنتز شود.

Real Time-PCR: سنجش بیان ژن مورد نظر با استفاده از Applied Biosystems TagManR Universal PCR Master Mix (امریکا) به روش quantitative Real-Time PCR انجام شد. دستگاه مورد استفاده Corbett Rotor Gene-6000

جدول ۱. توالی پروب ها و پرایمر های مربوط به ژن های HPRT1 و TIMP1 در این مطالعه (3' - 5')

نام ژن	HPRT1	TIMP1
پرایمر Forward	AGCCTAAGATGAGAGTTC	CTGCGGATACTTCCACAGGTC
پرایمر Reverse	CACAGAACTAGAACATTGATA	GCAAGAGTCCATCTGCAGTT
پروپ	Fam-CATCTGGAGTCTCTATTGACATCGC-	FAM-CACAACCGCAGCGAGGAGTTTCTC-
طول محصول	Tamra ۸۸ زوج باز	TAMRA ۸۲ زوج باز

ضمن ۲۵ نفر از گروه کنترل شامل ۱۵ نفر زن (۶۰ درصد) و (۴۰ درصد) ۱۰ نفر مرد بودند. دو گروه از نظر توزیع جنسیتی مطابق آزمون نسبی در تطابق بودند. این تحقیق در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی دارای تأییدیه به شماره ۱۳۳۳۴-۹۱-۱-۱۳۹۳ می باشد.

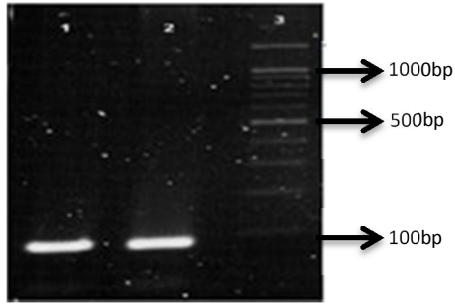
تحلیل داده های Real-Time PCR: برای آنالیز داده های Real-Time PCR از دو نرم افزار LinReg و REST استفاده شد. از نرم افزار LinReg جهت تعیین Ct و کارایی واکنش و از نرم افزار REST جهت مقایسه تغییرات بیان ژن TIMP1 در گروه های مورد مطالعه استفاده شد.

جدول ۲. اطلاعات کلینیکی و پاراکلینیکی بیماران MS

بیماران MS	متغیرها (میانگین ± انحراف معیار)
۲۶/۱ ± ۱/۹	سن شروع بیماری
۵/۲ ± ۲/۶	مدت بیماری
۲/۶ ± ۱/۵	EDSS
.	سابقه فامیلی بیماری

یافته ها

اطلاعات کلینیکی و پاراکلینیکی بیماران MS در جدول ۲ آورده شده است. مطابق این جدول میانگین سن شروع بیماری ۲۶/۱ سال و میانگین مدت بیماری ۵/۲ سال می باشد. در مورد توزیع جنسیتی، از ۲۵ بیمار مبتلا به MS، ۱۴ (۵۶ درصد) نفر زن و (۴۴ درصد) ۱۱ نفر مرد بودند. در

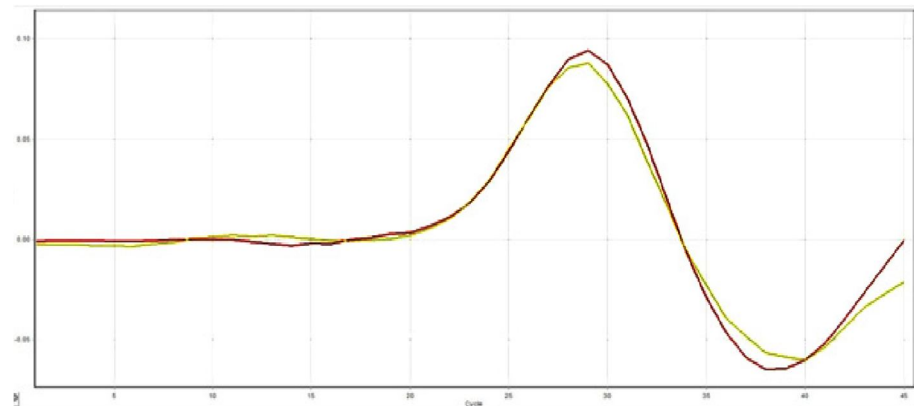


شکل ۱. نتیجه الکتروفورز محصول PCR مربوط به دو ژن HPRT1 و TIMP1 روی ژل آگارز ۱ درصد به منظور تعیین صحت و کیفیت cDNA TIMP1-۱ (82bp) و HPRT1-۳ (88bp) نشان گر با وزن مولکولی (100bp).

نتایج استخراج RNA: استخراج RNA از نمونه- های بیمار و سالم انجام گردید، سپس غلظت و خلوص RNA به وسیله دستگاه بیوفوتومتر تعیین شد. غلظت RNA در حدود $250 \mu\text{g/ml}$ و $260/280$ OD بین $1/8$ تا 2 بود که نشان دهنده ی کیفیت مطلوب RNA بود. جهت تعیین کیفیت cDNA ساخته شده واکنش PCR انجام شد و با الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد باندهای مورد نظر مربوط به محصولات PCR مشاهده گردید که نشان گر کیفیت خوب cDNA می باشد (شکل ۱).

نتایج واکنش Real-Time PCR

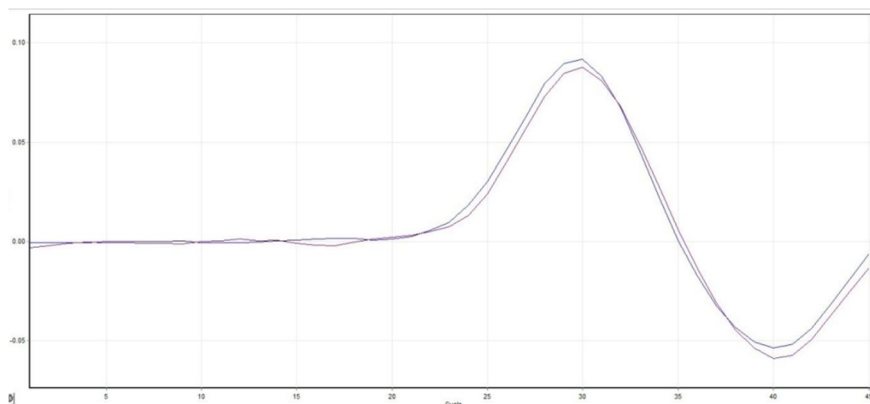
نمودار ۱ منحنی تکثیر ژن HPRT1 را نشان می دهد. واکنش به صورت دوتایی انجام شد. CT در این نمونه $16/5$ و $16/7$ بوده و کارایی ژن هدف $1/91$ ، $1/92$ می باشد.



نمودار ۱. منحنی تکثیر ژن HPRT1

شد. در بین این ژن ها ی رفرنس مورد مطالعه ژن HPRT1 به عنوان بهترین ژن در نظر گرفته شد. نمودار ۲ منحنی تکثیر ژن TIMP1 را نشان می دهد. واکنش به صورت دوتایی انجام شد. CT در این نمونه $23/9$ و 24 بوده و کارایی ژن هدف $1/96$ و $1/97$ می باشد.

انتخاب ژن HPRT1: در ابتدا از آن جایی که بافت مورد نظر در این مطالعه خون می باشد، چندین ژن رفرنس کاندید شد از جمله 18srRNA , HPRT1 , B2M ژن های مورد نظر در این مطالعه به صورت تریپلیکیت برای تعدادی از نمونه ها گذاشته شدند و از اطلاعات به دست آمده با نرم افزار GenNorm جهت انتخاب بهترین رفرنس استفاده



نمودار ۲. منحنی تکثیر ژن TIMP1

تحلیل داده های خام Real Time RT-PCR: پس از تعیین کارایی PCR و تعیین سطح پایه، داده های خام واکنش به وسیله نرم افزار LinReg و REST تحلیل شدند که نتایج در جدول ۳ آمده است.

تحلیل داده ها به وسیله نرم افزار REST در مقایسه دو گروه بیماران MS و شاهد سالم: ژن TIMP1 یا همان ژن Target مطابق جدول ۳ کاهش بیان به میزان ۰/۸ را نشان می دهد که این کاهش بیان بعد از تعیین ارزش p که به میزان ۰/۱، به دست آمد، معنی دار نمی باشد.

جدول ۳: مقایسه بیان ژن TIMP1 در گروه بیماران MS و شاهد

95% CI	Std. Error	نسبت بیان	p	تعداد بیماران RR-MS	تعداد نمونه شاهد	بیان TIMP1
۰/۶۲-۴/۰۴	۰/۴	۰/۸۱	۰/۱	۲۵	۲۵	تعداد کل
۰/۲۴-۴/۱	۰/۶	۰/۸۵	۰/۷	۱۰	۱۱	مذکر
۰/۱۷-۴/۳۲	۰/۵	۰/۹۱	۰/۸	۱۵	۱۴	مؤنث

لامینین را تجزیه می کنند. در شرایط فیزیولوژیکی فعالیتشان حاصل تعادل دقیق بین دو فرآیند است: فعال سازی پروآنزیم ها و مهار توسط مهار کننده های بافتی ویژه به نام TIMPs، تغییر در این تعادل، مستعد کننده ی حوادث پاتولوژیکی است که منجر به التهاب و دمیلینه شدن می گردد. در میان MMPs، به نظر می رسد ژلاتینازها در مکانیسم های مهاجرت سلول T به CNS و تخریب BBB دخیل باشند (۹). TIMP-1 یک مهار کننده وسیع الطیف اغلب MMPs بوده که توسط سیتوکاین ها و هورمون ها القا می شود. مشاهدات مختلف نشان داده که افزایش سطح MMPs همراه با کاهش سطح TIMP-1 در از دست دادن تمامیت سد خونی_مغزی از طریق ترویج پروتئولیز ماتریکس خارج

بحث

مالتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری دمیلینه کننده التهابی سیستم عصبی مرکزی (CNS) است که اولین حوادث ایمونوپاتوژنیک شناخته شده در آن مهاجرت لنفوسیت ها به ماده سفید CNS و تخریب سد خونی_مغزی (BBB) می باشد. ماتریکس متالوپروتئینازها در تخریب BBB و مهاجرت سلول ایمنی در MS نقش دارند. تمامیت ماتریکس خارج سلولی با تعادل دینامیک بین سنتز و پروتئولیز اجزایشان حفظ می شود که این امر به طور عمده توسط MMPs و مهار کننده های آن ها انجام می شود (۷). MMPs آنزیم های شناخته شده ای هستند که اجزای ماتریکس خارج سلولی مثل کلاژن، الاستین، فیبرونکتین و

سلولی اندوتلیال مغزی در MS نقش دارد (۱۰). با توجه به توضیحات فوق و نقش TIMPs در تنظیم فعالیت MMPs مطالعه بیان این ژن ها در بیماران ایرانی می تواند حایز اهمیت باشد، چون علاوه بر عوامل محیطی، ژنتیک نیز در این بیماری دخیل است (۱۱، ۱۲) و یافتن ژن های مهم تاثیرگذار در ایجاد بیماری یا پیشرفت آن می تواند در نهایت به بحث تشخیص یا درمان بیماری کمک کند. به علاوه با توجه به وجود تناقض در نتایج مقالات مختلف در رابطه با بیان ژن TIMP-1 در مبتلایان MS و در تکمیل مطالعات دیگران در مطالعه فعلی بیان ژن TIMP-1 در سلول های لنفوسیت T خون، در ۲۵ بیمار مبتلا به MS و ۲۵ فرد سالم به عنوان کنترل با تکنیک Real-Time PCR بررسی شد. همه بیماران HLA-DRB1*15 ویتامین D پاسخگو بودند (۸). مطالعه حاضر Mathced Case-control بوده است چون افراد بر اساس سن و جنسیت همسان سازی شده اند. تکنیک Real-Time PCR به کار رفته در این مطالعه، تکنیک حساسی بوده و دارای تکرارپذیری (Reproducibility) بالایی است اما نکته قابل ذکر اینکه همیشه تغییرات بیان در سطح RNA نمی تواند نشان دهنده تغییرات در سطح پروتئین باشد. در این مطالعه، پروب های طراحی شده برای تکنیک Real-Time PCR می توانند همه واریانت های ژن را در برگیرند و این نکته نیز بسیار حایز اهمیت است تا همه واریانت ها در صورتی که در پاتورژن بیماری نقش دارند، مورد بررسی قرار گیرند. در این مطالعه بیان ژن TIMP1 در افراد مبتلا به MS در مقایسه با افراد نرمال تفاوت معنا داری را نشان نداد ($p=0/1$). لیچتینگ هاگن و همکاران در سال ۱۹۹۹ با مطالعه بیان ماتریکس متالوپروتیناز ۹ و مهارکننده های بافتی آن در سلول های خونی تک هسته ای از بیماران مبتلا به MS نشان دادند که هیچ تغییر معنی داری در بیان mRNA ژن TIMP-1 مشاهده نشد. در این مطالعه میانگین نسبت TIMP-1/MMP-9 در بیماران MS فعال در مقایسه با گروه کنترل به

طور معنی داری بالاتر بود. نتایج این مطالعه حاکی از ارتباط معنی دار میانگین نسبت MMP-9/TIMP-1 با MS فعال بود (۱۳). گارسیا موتوجو و همکاران در سال ۲۰۱۰ با مطالعه ۵۰ بیمار MS تحت درمان با INF-beta طی یک دوره دو ساله شاهد کاهش دو برابر در نسبت MMP9/TIMP1 بودند. به نظر می رسد که نسبت MMP9/TIMP1 نشان گر زیست پذیری بالای INF-beta باشد (۱۴). در مطالعه لیوزی و همکاران در سال ۲۰۰۲ یک ارتباط معنی دار معکوس بین MMP-9 و مهار کننده اندوژن آن TIMP-1 در RR-MS مشاهده شد که این یافته حاکی از آن است که در بیماران مبتلا به MS هر دو، هم افزایش MMP-9 و هم کاهش TIMP-1 در سطوح سرمی در تخریب BBB و ورود لنفوسیت T به CNS نقش دارند (۹). از یافته های ترنتینی و همکاران در سال ۲۰۱۵ به نظر می رسد که MMP-9 مقاوم به TIMP-1 ایزوform فعال دخیل در فعالیت بیماری MS باشد (۱۵). هم چنین نتایج مطالعه یزدان دوست همدانی و همکاران در سال ۲۰۱۶ حاکی از افزایش معنی دار بیان ژن MMP-9 در بیماران RR-MS نسبت به افراد سالم بود (۸). کارابوداک و همکاران در سال ۲۰۰۴ با مطالعه اثر IFN- β 1a روی MMP-9 و TIMP-1 در بیماران RRMS طی یک دوره یک ساله نشان دادند که سطح MMP-9 تغییر معنی داری نداشت، در حالی که سطح TIMP-1 به تدریج طی درمان در مقایسه با سطح قبل از درمان افزایش معنی داری داشته است (۷). کرمود و همکاران در سال ۱۹۹۰، کان و پریز در سال ۱۹۹۴ و هارتونگ در سال ۱۹۹۷ براین باور بودند که نشن سد خونی مغزی کانونی و به دنبال آن نشن سلول های ایمنی به درون مغز از مراحل اولیه ی پاتورژن مالتیپل اسکلروز است (۴). لیندبرگ و همکاران در سال ۲۰۰۱ بیان رونوشت شش MMP و چهار TIMP را در ضایعات و ماده ی سفیدبه ظاهر طبیعی (NAWM) بافت مغز مالتیپل اسکلروز بعد از مرگ با Real-Time PCR اندازه گیری کرده و سطوح آن را با سطوح موجود در بافت مغزی شش بیمار

در انجام این پژوهش همکاری صمیمانه داشته اند سپاس -
گزارای می نمایند.

منابع

1. Crocker S. J, Pagenstecher A, Campbell I.L. The TIMPs tango with MMPs and more in the central nervous system. *Journal of neuroscience research* 2004; 75(1): 1-11.
2. Ebrahim Q, Hua Qi J, Sugimoto M, Ali M, Sears J.E, Cutler A et al. Increased neovascularization in mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *Investigative ophthalmology & visual science* 2011 52(9): 6117-6123.
3. Althoff E.M, Wolfer D. P, Timmesfeld N, Kanzler B, Schrewe H, Pagenstecher A . Long-term expression of tissue-inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in the murine central nervous system does not alter the morphological and behavioral phenotype but alleviates the course of experimental allergic encephalomyelitis. *The American journal of pathology* 2010; 177(2): 840-853.
4. Lindberg R.L.P, De Groot C.J.A, Montagne L, Freitag P, Valk P, Kappos L et al. The expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in lesions and normal appearing white matter of multiple sclerosis. *Brain* 2001; 124(9): 1743-1753.
5. Lee M.A, Palace J, Stabler G, Ford J, Gearing A, Miller K. Serum gelatinase B, TIMP-1 and TIMP-2 levels in multiple sclerosis : A longitudinal clinical and MRI study . *Brain* 1999; 122(2): 191-197.
6. O zenci V, Rinaldi L, Teleshova N, Matusevicius D, Kivisa'kk P, Kouwenhoven M et al. Metalloproteinases and their Tissue Inhibitors in Multiple Sclerosis. *Journal of Autoimmunity* 1999; 12: 297-303
7. Karabudak R, Kurne A, Guc D, Sengelen M, Canpinar H, Kansu

کنترل بدون بیماری عصبی مقایسه کردند. بیان mRNA می
MMP7 و 9 اما نه سایر متالوپروتئینازها [MMP-2 و 3 و
آنزیم مبدل عامل نکروز تومور آلفا (TNF)] در طول تمامی
مراحل تشکیل ضایعه با التهاب فعال و در اکثر بافت های
NAWM همسان به یک اندازه افزایش یافته بود. رونویسی
سیتوکین های TNF-alpha/beta و IL (اینتروکین) ۲
تعدیل کننده های شناخته شده MMP ها، تنها در مراحل
خاص تشکیل ضایعه افزایش یافته بود، در حالی که گیرنده
های آن ها به هیچ وجه القا نشدند که نشان می دهد مولکول
های سیگنالینگ دیگری در افزایش پایدار MMP-7 و 9 در
مالتیپل اسکلروز مشارکت دارند. هیچ کدام از TIMP ها
القای قابل توجهی بیش از بیان پایه ی کنترل ها نشان ندادند.
آن ها فرض کردند که عدم تعادل بین بیان MMP و TIMP
ممکن است منجر به بیش فعالی پروتئولیتیک مداوم در مالتیپل
اسکلروز گردد که خود ممکن است عاملی برای تخریب
مداوم بافت و در نتیجه پیشرفت ثانویه ی بیماری باشد(۴).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش بیان گر عدم تفاوت
معنی دار بیان ژن TIMP1 در بیماران MS نسبت به افراد
سالم کنترل می باشد. اما برای نتیجه گیری قطعی نیاز به
مطالعات وسیع تر با حجم نمونه بیشتر و مقایسه RNA ژن
TIMP-1 در بیماران، قبل و بعد از مصرف اینترفرون بتا می
باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله تحقیقاتی حاصل پایان نامه دانشجویی در
مقطع کارشناسی ارشد تحت عنوان بررسی بیان
ژن TIMP(tissue inhibitor matrix metalloproteinase)
در بیماران ایرانی مبتلا به مولتیپل
اسکلروز (MS) می باشد. نویسندگان مقاله از کلیه کسانی که

- E. Effect of interferon β -1a on serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP-1) in relapsing remitting multiple sclerosis patients One year follow-up results. *J Neurol* 2004; 251: 279-283
8. Yazdandoost Hamedani S, Taheri M, Sajjadi E, Omrani MD, Mazdeh M, Shahram Arsang-Jang S, Tabatabaei Panah AS and Sayad A. Up regulation of MMP9 gene expression in female patients with multiple Sclerosis. *Human Antibodies* 2016; 24: 59-64
9. Liuzzi G.M, Trojano M, Fanelli M, Avolio C, Fasano A, Livrea P et al. Intrathecal synthesis of matrix metalloproteinase-9 in patients with multiple sclerosis: implication for pathogenesis. *Multiple Sclerosis* 2002; 8: 222 - 228
10. Alexander J.S, Harris M.K, Wells S.R, Mills G, Chalamidas K, Ganta V.C et al. Alterations in serum MMP-8, MMP-9, IL-12p40 and IL-23 in multiple sclerosis patients treated with interferon- β 1b. *Multiple Sclerosis* 2010; 16(7): 801-809
11. Fukazawal T, Sasaki H, Kikuchi S, Hamada T, Tashiro K. Genetics of multiple sclerosis. *Biomed & Pharmacother* 2000; 54 : 103-6
12. Zuvich RL, McCauley JL, Pericak-Vance MA, Haines JL. Genetics and Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Semin Immunol* 2009; 21(6): 328-333
13. Lichtinghagen R, Seifert T, Kracke A, Marckmann S, Wurster U, Heidenreich F. Expression of matrix metalloproteinase-9 and its inhibitors in mononuclear blood cells of patients with multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 1999; 99: 19-26
14. Garcia-Montojo M, Dominguez-Mozo MI, Heras V, Bartolome M, Garcia-Martinez A, Arroyo R and Alvarez-Lafuente R. Neutralizing antibodies, MxA expression and MMP-9/TIMP-1 ratio as markers of bioavailability of interferon-beta treatment in multiple sclerosis patients: a two-year follow-up study. *European Journal of Neurology* 2010, 17: 470-478
15. Trentini A, Manfrinato M.C, Castellazzi M, Tamborino C, Roversi G, Volta C.A et al. TIMP-1 resistant matrix metalloproteinase-9 is the predominant serum active isoform associated with MRI activity in patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* 2015; 21(9) : 1121-1130.