Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2017; 20(126): 65-75

Association of Tissue Inhibitors of Metalloproteinase 1 (TIMP 1) Gene Polymorphism and In Vitro Fertilization and Embryo Transfer Outcome

Mahsa Kazemi Roudsari[1], Farhad Mashayekhi[2*]

1. MSc, Department of Genetics, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran
2. Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Received: 27 Aug 2017, Accepted: 6 Nov 2017

Abstract

Background: Matrix metalloproteinases (MMPs) are vital for the degradation/remodeling of the extra-cellular matrix, and are involved in spiral artery formation and invasion of endometrium during implantation. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1), is expressed in the several tissues of organisms and inhibits MMP activity. The aim of this investigation was to study the association between single-nucleotide polymorphism (SNP) in the TIMP1 (rs4898) (372 T/C) with in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) outcome by AS-PCR.

Materials and Methods: A total number of 200 blood samples including 100 IVF negative and 100 IVF positive (control) were collected in this study. DNA was extracted for TIMP1 genotyping. The genotype and allele frequencies of 372T/C polymorphism were examined by Allele-Specific PCR.

Results: The genotype frequencies of CC, CT and TT in 372 T/C polymorphism of TIMP1 gene in IVF- samples were 1%, 98% and 1%, respectively, while for IVF+ group were 7%, 91% and 2%, respectively (p=0.07). The allele frequencies of C and T in the IVF- were 50%, 50%, respectively and in IVF+ were 47.5%, 52.5%, respectively. The genotype and allele frequencies of TIMP1 rs4898 (372 T/C) did not differ between the patients and the control group (p=0.07 and p=0.68, respectively).

Conclusion: The results of this study indicate that SNP 372T/C of TIMP1 may not be associated with IVF-ET outcome in this population. Further studies with larger numbers of patients and controls are needed to confirm our results.

Keywords: Gene polymorphism, Implantation, IVF-ET, TIMP-1

*Corresponding Author:
Address: Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
Email: umistbiology@yahoo.co.uk

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۲۰، شماره ۹ (شماره پیاپی ۱۲۶)، آذر ۱۳۹۶، ۷۵-۶۵

ارتباط پلی‌مورفیسم ژن مهارکننده‌ی بافتی‌متالوپروتئیناز ۱ (TIMP 1) با نتیجه‌ی لقاح مصنوعی و انتقال جنین

مهسا کاظمی رودسری[۱]، فرهاد مشایخی[۲*]

۱. کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران
۲. استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۵، تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: ماتریکس متالوپروتئینازها برای تخریب/بازسازی ماتریکس خارج سلولی ضروری بوده و در شکل گیری شریان‌های مارپیچ و حمله به آندومتر در طول لانه گزینی دخیل هستند. مهارکننده بافتی متالوپروتئیناز-۱، در بافت‌های مختلف موجودات بیان می‌شود و فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها را مهار می کند. هدف از این پژوهش، مطالعه‌ی بین ارتباط پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی درپلی مورفیسم ۳۷۲T/C ژن TIMP1 (rs4898) با لقاح مصنوعی و انتقال جنین توسط PCR ویژه آلل بود.

مواد و روش‌ها: در مجموع، تعداد ۲۰۰ نمونه خون شامل ۱۰۰ IVF منفی و ۱۰۰ IVF مثبت(کنترل) در این مطالعه جمع‌آوری شد. DNA برای ژنوتایپینگ TIMP1 استخراج شد. فراوانی ژنوتیپی و آللی پلی‌مورفیسم 372T/C از طریق روش PCR ویژه آلل مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپی CC، CT و TT در پلی‌مورفیسم ۳۷۲T/C از ژن TIMP1 در نمونه های -IVF به ترتیب، ۱، ۹۸ و ۱ درصد بود، در حالی‌که برای گروه +IVF به ترتیب، ۷، ۹۱ و ۲ درصد بود(p=۰/۰۷). فرکانس اللی C و T در-IVF به ترتیب، ۵۰ و ۵۰ درصد و در +IVF به ترتیب ۴۷/۵ و ۵۲/۵ درصد بود. فراوانی ژنوتیپی و اللی TIMP1 rs۴۸۹۸ (372T/C) بین گروه کنترل و بیماران تفاوت معنی داری نداشت(به‌ترتیب p=۰/۰۷ و p= ۰/۶۸).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می دهد که پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی 372T/C از TIMP1 ممکن است با نتیجه ی لقاح مصنوعی و انتقال جنین در این جمعیت در ارتباط نباشد. برای تایید نتایج به مطالعات بیشتر با تعداد بیشتری از بیماران و کنترل ها نیاز است.

واژگان کلیدی: لانه گزینی، لقاح مصنوعی، مهارکننده ماتریکس متالوپروتئیناز۱ ، پلی‌مورفیسم ژنی

***نویسنده مسئول:** ایران، رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی
Email: umistbiology@yahoo.co.uk

مقدمه

ناباروری، عدم موفقیت زوجین در باروری پس از یک سال مقاربت متوالی و منظم، بدون بهره‌گیری از روش‌های پیش‌گیری از بارداری است(۱). این مشکل، قشر جوان و کار آمد اجتماع را در بر می‌گیرد؛ از این رو خسارات وارده به این طبقه انعکاس وسیعی در جامعه دارد. ناباروری یک سندروم چند عاملی بوده و با عوامل ژنتیکی و غیر ژنتیکی در ارتباط است. این مشکل جمعیتی بالغ بر ۶۰ تا ۸۰ میلیون نفر یا به عبارتی ۹ تا ۱۰ درصد از زوجین در سن باروری را در سرتاسر جهان شامل می‌شود(۲، ۳). اما شیوع این معضل در ایران حدودا ۱۷/۳ درصد بوده که این میزان بالاتر از نرخ جهانی ناباروری می‌باشد(۴). برای درمان ناباروری روش‌های متفاوتی وجود دارد که یکی از رایج‌ترین و موفق‌ترین این روش‌ها، لقاح آزمایشگاهی یا IVF است. با این وجود این روش نیز درصد موفقیت پایینی داشته و تعداد قابل توجهی از زوجین استفاده کننده از این تکنیک با شکست روبه‌رو می‌شوند(۵).

لانه‌گزینی جنین فرآیندی پیچیده و چند مرحله‌ای است که طی آن، جنین چند سلولی و آندومتر مادر با یکدیگر واکنش می‌دهند. این فرآیند شامل تهاجم سلول‌های جنینی به آندومتر مادر و رگ‌زایی می‌باشد(۶). شکست در لانه‌گزینی از شایع‌ترین علل عدم موفقیت در بارداری پس از لقاح مصنوعی و انتقال جنین است(۷). ژن‌های زیادی در فرآیند لانه‌گزینی جنین ایفای نقش می‌کنند که شناخت این ژن‌ها به منظور بالا بردن شانس موفقیت در IVF بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

خانواده‌ی ژنی ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs)، از جمله ژن‌های دخیل در روند لانه‌گزینی هستند که از بزرگترین دسته آنزیم‌های پروتئولیتیکی می‌باشند. این خانواده، ۲۶ عضو وابسته به روی(Zn) داشته و نقش مهمی در تجزیه‌ی غشا پایه و ماتریکس خارج سلولی(ECM) ایفا می‌کنند(۸). بیان نابه‌جا و تنظیم نشده‌ی این پروتئین‌ها می‌تواند باعث تخریب کنترل نشده‌ی ماتریکس خارج سلولی شود و این فرآیند ارتباط تنگاتنگی با ناهنجاری‌هایی مثل بیماری‌های قلبی-عروقی، تورم مفاصل و انواع مختلفی از سرطان‌ها دارد(۹).

خانواده ژنی مهارکننده‌های بافتی متالوپروتئینازها(TIMPs)، مهارکننده‌های فیزیولوژیک MMPها بوده و امروزه ۴ نوع از آن‌ها شناسایی شده است(TIMP1,2,3,4)(۱۰).

ژن TIMP-1 انسانی با طول حدودا ۳ کیلو باز دارای ۶ اگزون بوده و در بازوی کوتاه کروموزوم X (xpll.3-pll.23) واقع شده است(۱۱). اولین اگزون این ژن رونویسی شده اما ترجمه نمی‌شود؛ بنابراین ترجمه‌ی ژن TIMP-1 از اگزون شماره ۲ آغاز می‌گردد(۱۲). هیبرید سلول‌های سوماتیکی حاوی X غیرفعال نشان داد که این ژن حتی ممکن است در کروموزوم X غیرفعال نیز مجددا فعال شود، بنابراین بررسی‌ها روی پلی‌مورفیسم‌های مختلف این ژن باید در زن و مرد به طور مجزا صورت گیرد(۱۳). TIMP1 برای نخستین بار در سال ۱۹۸۵ کلون شد و محققان دریافتند که این پروتئین‌ها دارای فعالیت‌های بالقوه‌ی اریتروئیدی می‌باشند. محصول این ژن گلیکوپروتئینی بوده و به صورت محلول یا در سطح سلولی مشاهده می‌شود. TIMP-1 به طور گسترده در بسیاری از اندام‌های پستانداران خصوصا اندام‌های تناسلی بیان می‌شود و هم‌چنین بیان این پروتئین در سیستم عصبی مرکزی به نواحی انعطاف پذیری مانند هیپوکامب، پیاز بویایی ومخچه محدود می‌گردد(۱۴). TIMP-1 در تنظیمات مختلف بیولوژیکی مثل رشد سلولی و آپاپتوزیس نقش بازدارندگی داشته و هم‌چنین در بیماری‌های مختلفی مثل انواع سرطان ها و بافت‌های فیبروزه شده، افزایش میزان mRNA و پروتئین این ژن مشاهده می‌شود(۱۰، ۱۵).

پلی‌مورفیسم یا چند شکلی ژنتیکی به تفاوت بیشتر از ۱ درصد در توالی DNAی افراد یا جمعیت‌ها گفته می‌شود که می‌توانند نتیجه‌ی فرآیندهای تصادفی مانند خطای

DNA پلی‌مراز در همانندسازی باشند یا توسط عوامل خارجی مانند تشعشعات و ویروس‌ها ایجاد شده باشند(۱۶، ۱۷).

پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی رایج‌ترین نوع واریانت DNA هستند که تغییر تنها یک باز در DNA باعث ایجاد آن‌ها می‌شود. SNPها تا حدی باعث تغییر غلظت و عملکرد پروتئین‌ها می‌شوند، بنابراین حضور چند SNP می‌تواند در تعیین استعداد ابتلا به بیماری‌های چندژنی اثرگذار باشد (۱۶، ۱۸). یکی از پلی‌مورفیسم‌های مهم ژن TIMP-1، phe 124 phe (rs.4898) واقع در اگزون شماره ۵ است. با جایگزینی T به C در این ناحیه، اسیدآمینه فنیل‌آلانین جایگزین فنیل‌آلانین می‌شود(۱۹). تاکنون نقش این پلی‌مورفیسم در افزایش خطر ابتلا به برخی از بیماری‌ها از جمله سرطان سینه، سرطان ریه و پارکینسون مشخص شده است(۲۲-۲۰). به منظور ارتقاء کیفیت و شانس موفقیت تکنیک‌های ART، شناسایی و بررسی ژن‌های دخیل در روند لانه‌گزینی هم‌چون ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) و مهارکننده‌های آن‌ها یعنی TIMPs که نقش بسیار کلیدی در تخریب و بازسازی ماتریکس خارج سلولی و هم‌چنین رگ‌زایی دارند، بسیار مهم و حیاتی می‌باشد. چون پلی‌مورفیسم‌های ژنی در برخی موارد باعث تغییر فعالیت در محصولات حاصل از آن ژن می‌شوند، بنابراین امکان ارتباط پلی‌مورفسیم‌های این ژن‌ها و افزایش استعداد این افراد به بعضی از ناهنجاری‌ها مثل ناباروری وجود دارد که یکی از پلی‌مورفیسم‌های ژن TIMP-1 در زنان، پلی‌مورفیسم ۳۷۲T/C (rs4898) این ژن می‌باشد. از این رو با توجه به نقش مهم این ژن در لانه‌گزینی جنین، این پروژه با هدف بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم ژن TIMP-1 بر نتیجه لقاح مصنوعی و انتقال جنین در گروهی از زنان نابارور که از روش لقاح مصنوعی برای بارداری استفاده نمودند اجرا شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه مورد- شاهدی طی ۱۵ ماه و از تیر ۱۳۹۴ تا مهر ۱۳۹۵ انجام شد. نمونه‌های خون ۲۰۰ زن که بنا به تشخیص پزشک معالج توسط روش IVF تحت درمان قرار گرفته بودند جمع‌آوری شد. جمعیت مورد مطالعه شامل ۲ گروه بود. گروه اول شامل ۱۰۰ زن که پس از انجام IVF موفق به بارداری شدند تحت عنوان +IVF، گروه دوم شامل ۱۰۰ زن بود که موفق به بارداری نشدند تحت عنوان -IVF دسته بندی شدند. در این تحقیق گروه +IVF به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. هم‌چنین معیارهایی شامل، سابقه شیمی درمانی، جراحی تخمدان، کاریوتیپ غیر طبیعی و بیماری ژنتیکی شناخته شده، تخمدان پلی‌کیستیک و اندومتریوز مورد ارزیابی قرار گرفته و از مطالعه خارج شدند. محدوده سنی در دو گروه کنترل و بیمار بین ۳۰ تا ۴۵ سال بود و نمونه ها یک ماه بعد از انجام IVF، از زنان مراجعه کننده به مرکز ناباروری مهر استان گیلان تهیه شد. از تمام داوطلبان شرکت کننده، رضایت‌نامه آگاهانه کتبی گرفته شد. از افراد مورد مطالعه، ۲ میلی‌لیتر خون محیطی برای بررسی ژنتیک و استخراج DNA گرفته شد. نمونه ها جهت محفوظ ماندن از انعقاد تا زمان استخراج در لوله های استریل آغشته به EDTA و در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره شدند. فرآیند استخراج DNA به کمک کیت محلول GPP(شرکت ژن پژوهان، ایران) و بر اساس دستورالعمل مربوطه انجام پذیرفت. کیفیت باندهای حاصل از استخراج DNA به وسیله‌ی الکتروفورز آگارز مورد بررسی قرار گرفت.

در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) مربوط به ژن TIMP1، از دستگاه ترموسایکلر ۴۸ چاهکی (بیورد، امریکا) و برای ناحیه‌ی پلی‌مورفیک از ۲ جفت پرایمر اختصاصی طراحی شده(شرکت Generay، چین) به منظور تکثیر محدوده ژنی قطعه پلی‌مورفیک استفاده شد. خصوصیات پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول۱. مشخصات پرایمرهای الل CوT

توالی $5' \rightarrow 3'$	طول nt	دمای ذوب(MT)	محتوای GC (درصد)	آلل
CACATCACTACCTGCAGTTTT پرایمر Forward الل T	۲۱	۵۶/۹	۴۲/۹	T
GATCACACGGTATTGGACACA پرایمر Reverse الل T	۲۱	۵۶/۷	۴۷/۶	
CACATCACTACCTGCAGTTTC پرایمر Forward الل C	۲۱	۵۶/۰	۴۷/۶	C
GAGAACATTCTGGGGAACCAA پرایمر Reverse الل C	۲۱	۵۶/۵	۴۷/۶	

برنامه PCR با واسرشت سازی اولیه‌ی ۵ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۳۵ سیکل در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۴۵ ثانیه در دمای: ۵۷ درجه‌ی سانتی‌گراد برای آلل T و۵۴ درجه‌ی سانتی گراد برای آلل C ، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. شناسایی پلی‌مورفیسم 372T/C ژن TIMP1 توسط تکنیک AS-PCR صورت گرفت و برای هر الل به صورت مجزا واکنش PCR(واکنش دو تیوپی مجزا، یک تیوپ حاوی واکنش همراه پرایمرهای Forward و Reverse الل T و تیوپ دیگر واکنش توسط پرایمرهایForward و Reverse الل C) انجام شد.

بدین منظور ۲/۵ میکرولیتر از DNAی استخراج شده، ۵ میکرولیتر کیت مخصوص PCR (PCR Master Mix, 2x، محصول شرکت سینا ژن)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر رو به جلو(F)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر رو به عقب(R) و ۱/۵ میکرولیتر آب مقطر را مخلوط و تحت AS-PCR قرار دادیم. سپس صحت واکنش PCR انجام شده توسط ژل آگارز ۲ درصد مورد سنجش قرار گرفت(شکل‌های ۱و۲).

جهت محاسبه قدرت آماری از نرم‌افزار OpenEpi (www.OpenEpi.com) استفاده گردید؛ قدرت مطالعه ۸۰ درصد برآورد شد و هم‌چنین آزمون آماری کای مربع ($\chi 2$)، با استفاده از نرم‌افزار مدکالک (نسخه ۱۲.۱.۴.۰) صورت گرفت و پارامتر p نیز تعیین شد. مقدار p کمتر از ۰/۰۵، معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بعد از استخراج DNA ژنومی از نمونه خون افراد مورد مطالعه، تعیین ژنوتیپ به روش AS-PCR انجام شد.

در این روش برای تشخیص آللی و هم‌چنین هتروزیگوت یا هموزیگوت بودن هر نمونه، دو بار PCR صورت گرفت. PCR اول مربوط به آلل C، با استفاده از پرایمرهای C-F و C-R بود که در صورت وجود آلل C، قطعه‌ای به طول ۴۲۷ bp تکثیرمی‌شود و در صورت وجود آلل T، تکثیری صورت نمی‌گیرد. PCR دوم مربوط به پرایمر T-F و T-R می‌باشدکه در صورت وجود آللT، قطعه‌ای به طول ۳۲۱bp تکثیر می‌شود و در صورت وجود آلل C تکثیری صورت نمی‌گیرد.

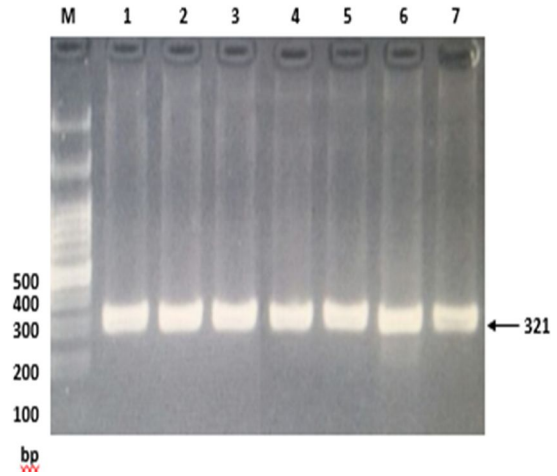
بر این اساس، سه ژنوتیپ CC،CT،TT در ژن TIMP-1در ناحیه ۳۷۲T/C قابل تشخیص خواهند بود(در این پلی‌مورفیسم، آللT فرم طبیعی و آلل C فرم جهش یافته است).

شکل‌های ۱و۲ سنجش صحت واکنش PCR انجام شده توسط ژل آگارز ۲ درصد را نشان می دهند. نتایج ژنوتیپی وآللی به شرح زیر به دست آمد.از میان افراد +IVF، ۷نفر (۷ درصد) دارای ژنوتیپ هموزیگوت TT، ۹۱ نفر(۹۱ درصد) دارای ژنوتیپ هتروزیگوت CT و ۲ نفر (۲ درصد) دارای ژنوتیپ هموزیگوت CC بودند.

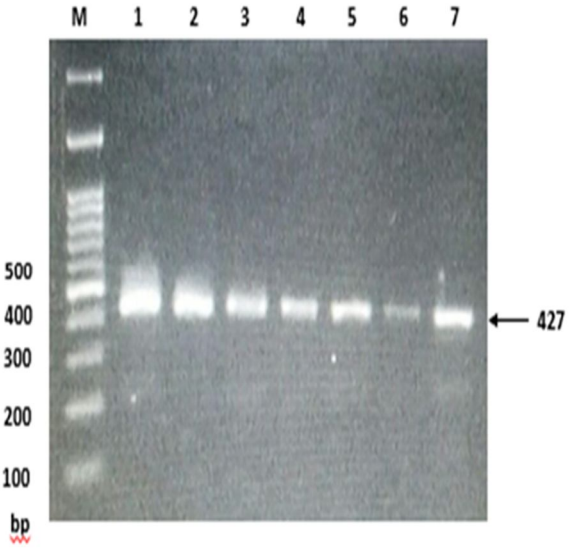
هم‌چنین در بین افراد -IVF، ۱ نفر(۱ درصد) دارای ژنوتیپ هموزیگوت TT، ۹۸ نفر(۹۸ درصد) دارای ژنوتیپ هتروزیگوت CT و ۱ نفر(۱ درصد) دارای ژنوتیپ هموزیگوت CC بودند(جدول ۲).

جهت بررسی تفاوت فراوانی ژنوتیپی بین گروه کنترل و بیمار از آزمون مربع کای استفاده شد و با توجه به نتیجه‌ی آزمون، ۵/۰۹= χ^2 و ۰/۰۷ =p مورد محاسبه قرار گرفت. بنابراین تفاوت معنی‌داری در فراوانی‌های ژنوتیپی بین دو گروه +IVF و -IVF وجود ندارد.

از سوی دیگر، در افراد +IVF فراوانی آلل T، ۵۲/۵ درصد و آلل C، ۴۷/۵ درصد و در افراد -IVF نیز فراوانی آلل‌های Tو C برابر و ۵۰ درصد بوده است. بر این اساس و با توجه به نتیجه‌ی آزمون ۰/۱۶= χ^2 و p=۰/۶۸ تفاوت معنی‌داری در فراوانی آللی بین دو گروه مورد بررسی نیز دیده نشد(جدول۳).



شکل۱. ژل آگارز۲ درصد مربوط به الکتروفورز محصول PCR(اللT). در چاهک اول مارکر (M) با وزن مولکولی ۱۰۰bp جهت تشخیص طول قطعات تکثیر شده استفاده شده است. باند هایی که در ناحیه ی (۳۲۱bp) دیده می شود، نشان دهنده ی آلل T می باشد.



شکل۲. ژل آگارز ۲ درصد مربوط به الکتروفورز محصول PCR(آلل C). باند هایی که در ناحیه ی (٤٢٧bp) دیده می شود، نشان دهنده ی آلل C می باشد.

جدول ۲. فراوانی ژنوتیپی پلی‌مورفیسم 372T/C ژن TIMP1 در افراد +IVF و-IVF.

Gene	Genotypes	Pregnancy(IVF^+) n (درصد)	NO Pregnancy(IVF^-) n (درصد)	χ^2	p
TIMP1	TT	۷(۷)	۱(۱)	۵/۰۹	۰/۷
	CT	۹۱(۹۱)	۹۸(۹۸)		
	CC	۲(۲)	۱(۱)		

جدول۳. فراوانی آللی پلی‌مورفیسم 372T/C ژن TIMP-1 در افراد +IVF و -IVF.

Allele	(IVF^+) n(%)	(IVF^-) n(%)	χ^2	p
C	(۴۷/۵) ۹۵	۱۰۰(۵۰)	۰/۱۶	۰/۶۸
T	(۵۲/۵) ۱۰۵	۱۰۰(۵۰)		

بحث

در این مطالعه ی مورد-شاهدی، به بررسی اهمیت پلی مورفیسم ۳۷۲T/C ژن TIMP۱، بر نتیجه ی لقاح مصنوعی و انتقال جنین در ۱۰۰ نمونه ی کنترل و ۱۰۰ فرد با شکست IVF-ET پرداخته شد. فراوانی ژنوتیپی و اللی TIMP1 (372T/C) بین گروه کنترل و بیمار تفاوت معنی داری نداشت(به ترتیب p=۰/۰۷ و p=0/68). بنابراین نتایج این مطالعه نشان داد که پلی‌مورفیسم ۳۷۲T/C ژن TIMP-1 ارتباط معنی‌داری با نتیجه‌یIVF-ET در جمعیت مورد مطالعه ندارد.

امروزه عدم موفقیت در لانه گزینی پس از انتقال جنین از مهم ترین مراحل محدودکننده در فرآیند لقاح مصنوعی میباشد. درطی لانه گزینی، ابتدا جنین توسط مولکول های چسبنده سلولی به دیواره ی رحم متصل شده و سپس بوسیله ی ماتریکس متالو پروتئینازها (MMPs) به داخل آندومتر نفوذ می کند؛ بنابراین به منظور ارتقاء کیفیت و شانس موفقیت تکنیک لقاح مصنوعی، بررسی ژن‌های دخیل در روند لانه‌گزینی همچون ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) و مهارکننده‌های آن‌ها یعنی TIMPs که نقش بسیار مهمی در تخریب و بازسازی ماتریکس خارج سلولی و هم‌چنین رگ‌زایی دارند، بسیار حیاتی است (۱۵).

امروزه بحث در مورد ارتباط پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی و استعداد ابتلا به بعضی از بیماری‌ها از جمله مباحث پراهمیت محسوب می‌شود(۲۳). پلی‌مورفیسم‌ها می‌توانند مسئول بروز تفاوت‌های دیده شده در زمینه‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژی، پاسخ به داروها و استعداد ابتلای افراد به بعضی از بیماری‌ها باشند و در بسیاری از بیماری‌ها نقش ایفا کنند. در این مطالعه به بررسی ارتباط بین یک پلی مورفیسم شناخته شده در ژن TIMP1 و نتیجه‌ی لقاح مصنوعی و انتقال جنین پرداخته شده است. پیرامون مطالعات انجام شده درمورد پلی‌مورفیسم های ژن TIMP1 می‌توان به بررسی چگونگی بیان MMP-9 و mRNAی TIMP-1 آندومتری در اواسط فاز لوتئال اشاره کردکه توسط وو و همکارانش در سال ۲۰۰۳ بر روی زنان مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک انجام شد. آن ها دریافتند که میزان بیان MMP-9 و mRNAی TIMP-1 آندومتری که نقش مهمی در روند لانه گزینی بازی می کند، در افراد بیمار به میزان قابل توجهی کمتر از گروه کنترل می باشد و کاهش بیان این ژن‌ها ممکن است یکی از دلایل عمده ی ناباروری ایدیوپاتیک باشد(۲۴).

اسکزی پزک و همکارانش در سال ۲۰۰۷ با بررسی غلظت TIMP1 و MMP9 و سایر فاکتورها در مایع رحمی زنان مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک و سقط های مکرر ناشناخته

دریافتند که تغییر در عملکرد ماتریکس خارج سلولی ممکن است دلیلی بر تغییر حالت نامناسب آندومتر و ایجاد لانه گزینی معیوب باشد(۲۵). کیو و همکارانش در سال ۲۰۱۱ دریافتند که عدم تعادل بین بیان MMPs و TIMPs در مکان هایی که لانه گزینی نابه جا وجود دارد ممکن است به تخریب زیان‌آور گسترده ای از ماتریکس خارج سلولی منجر شود(۲۶).

مطالعات سینگ و همکارانش در سال ۲۰۱۲ نشان داد که بین پلی مورفیسم ۱۵۶۲C/T ژن MMP-9 با ریسک ابتلا به سقط اولیه ی مکرر(REPL)ارتباط معناداری وجود ندارد(۲۷). نتایج مشاهدات پرزا و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان می دهد که پلی مورفیسم ۷۳۵C/T- ژن MMP-2 و ۱۵۶۲C/T- MMP-9 ممکن است با افزایش خطر سقط جنین مکرر خودبه خودی ایدیوپاتیک(IRSA) در زنان همراه باشد، اما اختلاف آماری معنی داری در توزیع ژنوتیپی و اللی این پلی مورفیسم ها بین مردان و شاهدان IRSA وجود نداشت(۲۸).

تاپیا- پیزار و همکارانش در سال ۲۰۱۴ دریافتند که با کاهش هورمون گنادوتروپین جفتی انسان(HCG)، TIMP1و MMP9 ترشح می‌شود، بنابراین حمله‌ی تروفوبلاست به آندومتر مادر در شرایط آزمایشگاهی تسهیل شده که این امر نقش مهمی را در لانه‌گزینی موفق جنین و جفت بازی می‌کند(۲۹). شعبانی پور و همکارانش در سال ۲۰۱۵، نشان دادند که پلی مورفیسم 1562C/T از ژن MMP-9 در جمعیت ایران تاثیری بر انتقال جنین با روش IVF ندارد(۳۰). کوزافسکی و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند، اگرچه پلی مورفیسم ژن های MMP2، MMP9 و TIMP2 روی برخی از ویژگی های اسپرم اثرگذار هستند، اما ارتباط معنی داری بین این پلی مورفیسم ها و باروری مردان لهستانی مورد مطالعه دیده نشده است(۳۱).

هم‌چنین اهمیت بررسی پلی‌مورفیسم‌های مختلف ژن TIMP1 با سایر بیماری‌ها نیز مورد ارزیابی واقع شده است. در تحقیقاتی که در سال ۲۰۱۶ در تایوان انجام گرفت، ارتباط معنا داری بین پلی‌مورفیسم372T/C ژن TIMP1 و بیماری پارکینسون مشاهده شد(۲۲). طی مطالعاتی که توسط چانگ و همکاران در سال ۲۰۱۶ روی عده ای از زنان تایوانی انجام گرفت، مشاهده شد که احتمالا پلی‌مورفیسم ژن TIMP-1 به طور معناداری با سرطان پستان در ارتباط می‌باشد(۲۰). تاکنون پلی‌مورفیسم‌های متعددی در ژن یاد شده گزارش شده است، پلی‌مورفیسم مورد بررسی در این مطالعه از نوع Single Nucleotide polymorphism (SNP) و شامل تبدیل نوکلئوتید دارای تیمین به سیتوزین در کدون ۱۲۴ از اگزون ۵ ژن TIMP1 بوده است که با این تبدیل اسیدآمینه‌ی فنیل‌آلانین مجددا به فنیل‌آلانین تبدیل می‌شود(phe 124 phe)(۱۹).

در این مطالعه که بر روی ۱۰۰ زن +IVF(کنترل) و ۱۰۰ زن -IVF(بیمار) در جمعیتی از زنان ایران صورت گرفت، پس از روش یاد شده و محاسبه ی آماری جهت پی بردن به تأثیر پلی‌مورفیسم مذکور بر نتیجه ی لقاح مصنوعی و انتقال جنین، نتایجی بدین صورت به دست آمد:

از ۱۰۰ زن +IVF، ۷ نفر هموزیگوت TT، ۹۱ نفر هتروزیگوت CT و ۲ نفر هموزیگوت CC بودند. بنابراین، فراوانی کدون ۱۲۴ در زنان +IVF به ترتیب برای ژنوتیپ های CC,CT,TT، ۲، ۹۱ و ۷ درصد بود. همچنین از ۱۰۰ زن -IVF، ۱ نفر هموزیگوت TT، ۹۸ نفر هتروزیگوت CT و ۱ نفر هموزیگوت CC بودند. بنابراین، فراوانی کدون ۱۲۴ در زنان -IVF به ترتیب برای ژنوتیپ های CC,CT,TT، ۱، ۹۸ و ۱ درصد بود. با توجه به نتیجه‌ی آزمون، ۵/۰۹= 2 χ و p=۰/۰۷ مورد محاسبه قرار گرفت، بنابراین تفاوت معنی‌داری در فراوانی‌های ژنوتیپی بین دو گروه +IVF و -IVF وجود ندارد؛ از سوی دیگر، در افراد +IVF فراوانی آلل T، ۵۲/۵ درصد و آلل C ۴۷/۵ درصد و در افراد -IVF نیز فراوانی آلل‌های Tو C برابر و ۵۰ درصد بوده است. بر این اساس، با توجه به نتیجه‌ی آزمون (۰/۱۶= 2 χ و p=۰/۶۸) و

نزدیکی داده‌ها ارتباط معنی داری در فراوانی آللی ژن TIMP-1 و نتیجه لقاح مصنوعی مشاهده نشده است. بنابراین ارتباط معناداری بین پلی‌مورفیسم ۳۷۲T/C ژن TIMP-1 و نتیجه لقاح مصنوعی وجود ندارد(p>۰/۰۵).

البته میزان موفقیت لقاح مصنوعی حاصل برهم‌کنش عوامل متعدد ژنتیکی و محیطی است که در این مطالعه به بررسی یک وجه از عوامل دخیل پرداخته شد.بنابراین نقش سایر ژن‌ها، عوامل محیطی و حتی سایر پلی‌مورفیسم‌های شناخته شده در ژن مورد مطالعه در میزان موفقیت روش لقاح مصنوعی و انتقال جنین قابل تامل است. در مجموع شاید بتوان نقش این پلی‌مورفیسم را با نتیجه‌ی لقاح مصنوعی و انتقال جنین بی‌ارتباط دانست؛ ولی ممکن است نتیجه‌ی به دست آمده با تغییر خزانه‌ی ژنتیکی یا تغییر معنی‌دار اندازه‌ی جمعیت تغییر نماید.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده، از آن‌جایی که مقدار p بیشتر از ۰/۰۵ می‌باشد (p>۰/۰۵)، نتیجه‌گیری می‌شود که پلی‌مورفیسم ۳۷۲T/C ژن TIMP-1 ارتباط معنی‌داری با نتیجه‌ی IVF-ET در جمعیت مورد مطالعه ندارد؛ هرچند حصول نتیجه‌ی قطعی نیازمند مطالعات با جامعه‌ی آماری بزرگتر و سایرجمعیت ها است.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد مهسا کاظمی رودسری، دانشجوی رشته ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان از حمایت‌های اداره تحصیلات تکمیلی دانشگاه تنکابن به دلیل تکمیل بخشی از پروژه و هم‌چنین از تمامی بیماران و افراد سالم شرکت کننده در این تحقیق سپاس‌گزاری می‌نمایند. از آزمایشگاه بیولوژی سلولی و تکوینی دانشگاه گیلان نیز قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. Hum Reprod. 2009 Nov;24(11):2683–7.
2. Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. Singapore Med J. 2009 Apr;50(4):336–47.
3. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. Hum Reprod. 2007 Jun;22(6):1506–12.
4. Kazemijaliseh H, Ramezani Tehrani F, Behboudi-Gandevani S, Hosseinpanah F, Khalili D, Azizi F. The Prevalence and Causes of Primary Infertility in Iran: A Population-Based Study. Glob J Health Sci. 2015 Apr;7(6):226–32.
5. Velez MP, Connolly MP, Kadoch I-J, Phillips S, Bissonnette F. Universal coverage of IVF pays off. Hum Reprod. 2014 Jun;29(6):1313–9.
6. Zhang S, Lin H, Kong S, Wang S, Wang H, Wang H, et al. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. Mol Aspects Med. 2013 Oct;34(5):939–80.
7. van Hoogenhuijze NE, Torrance HL, Mol F, Laven JSE, Scheenjes E, Traas MAF, et al. Endometrial scratching in women with implantation failure after a first IVF/ICSI cycle; does it lead to a higher live birth rate? The SCRaTCH study: a randomized controlled trial (NTR 5342). BMC Womens Health. 2017 Jul;17(1):47.
8. Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. Amino Acids. 2011 Jul;41(2):271–90.
9. Nalluri S, Ghoshal-Gupta S, Kutiyanawalla A, Gayatri S, Lee BR, Jiwani S, et

al. TIMP-1 Inhibits Apoptosis in Lung Adenocarcinoma Cells via Interaction with Bcl-2. PLoS One. 2015;10(9):e0137673.
10. Chao C, Ghorpade A. Production and Roles of Glial Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 in Human Immunodeficiency Virus-1-Associated Dementia Neuroinflammation: A Review. Am J Infect Dis. 2009;5(4):314–20.
11. Murphy G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. Genome Biol. 2011 Nov;12(11):233.
12. Dean G, Young DA, Edwards DR, Clark IM. The human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 gene contains repressive elements within the promoter and intron 1. J Biol Chem. 2000 Oct;275(42):32664–71.
13. Anderson CL, Brown CJ. Polymorphic X-chromosome inactivation of the human TIMP1 gene. Am J Hum Genet. 1999 Sep;65(3):699–708.
14. Rivera S, Khrestchatisky M, Kaczmarek L, Rosenberg GA, Jaworski DM. Metzincin proteases and their inhibitors: foes or friends in nervous system physiology? J Neurosci. 2010 Nov;30(46):15337–57.
15. Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. Sci Signal. 2008 Jul;1(27):re6.
16. Vignal E, De Toledo M, Comunale F, Ladopoulou A, Gauthier-Rouviere C, Blangy A, et al. Characterization of TCL, a new GTPase of the rho family related to TC10 andCcdc42. J Biol Chem. 2000 Nov;275(46):36457–64.
17. Genc MR, Schantz-Dunn J. The role of gene-environment interaction in predicting adverse pregnancy outcome. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2007 Jun;21(3):491–504.
18. Licastro F, Caruso C. Predictive diagnostics and personalized medicine for the prevention of chronic degenerative diseases. Immun Ageing. 2010 Dec;7 Suppl 1:S1.
19. Skarmoutsou E, D'Amico F, Marchini M, Malaponte G, Scorza R, Mazzarino MC. Association of TIMP-1 +372 SNP with digital ulcer manifestation in female systemic sclerosis patients. Hum Immunol. 2012 Sep;73(9):950–3.
20. Chang W-S, Liu L-C, Hsiao C-L, Su C-H, Wang H-C, Ji H-X, et al. The contributions of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 genotypes to triple negative breast cancer risk. BioMedicine. 2016 Mar;6(1):4.
21. Lai C-Y, Chang W-S, Hsieh Y-H, Hsu C-M, Tsai C-W, Chen A-C, et al. Association of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Genotypes with Lung Cancer Risk in Taiwan. Anticancer Res. 2016 Jan;36(1):155–60.
22. Chen Y-C, Wu Y-R, Mesri M, Chen C-M. Associations of Matrix Metalloproteinase-9 and Tissue Inhibitory Factor-1 Polymorphisms With Parkinson Disease in Taiwan. Medicine (Baltimore). 2016 Feb;95(5):e2672.
23. Miyamoto T, Tsujimura A, Miyagawa Y, Koh E, Namiki M, Sengoku K. Male infertility and its causes in human. Adv Urol. 2012;2012:384520.
24. Wu R, Zhou F. [Expression of matrix metalloproteinases-9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 mRNA in the endometrium during mid- luteal phase in women with unexplained infertility]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2003 Jun;38(6):346–9.
25. Skrzypczak J, Wirstlein P, Mikolajczyk M. Could the defects in the endometrial extracellular matrix during the implantation be a cause for impaired fertility? Am J Reprod Immunol. 2007 Jan;57(1):40–8.
26. Qiu X, Xie Y, Chen L, Gemzell-Danielsson K. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the feto-maternal interface in unruptured ectopic tubal pregnancy. Acta Obstet Gynecol Scand. 2011 Sep;90(9):966–71.
27. Singh K, Nair RR, Khanna A. Functional SNP -1562C/T in the promoter region of MMP9 and recurrent early pregnancy loss. Reprod Biomed Online. 2012 Jan;24(1):61–5.
28. Pereza N, Ostojic S, Volk M, Kapovic M, Peterlin B. Matrix metalloproteinases 1, 2, 3 and 9 functional single-nucleotide

polymorphisms in idiopathic recurrent spontaneous abortion. Reprod Biomed Online. 2012 May;24(5):567–75.
29. Tapia-Pizarro A, Figueroa P, Brito J, Marin JC, Munroe DJ, Croxatto HB. Endometrial gene expression reveals compromised progesterone signaling in women refractory to embryo implantation. Reprod Biol Endocrinol. 2014 Sep;12:92.
30. Shabanipour S, Mashayekhi F, Bahadori MH, Soruri ZZ. The relationship between MMP-9 promoterpolymorphism and IVF outcome. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2015 Mar;61(1):64–7.
31. Kurzawski M, Kaczmarek M, Klysz M, Malinowski D, Kazienko A, Kurzawa R, et al. MMP2, MMP9 and TIMP2 polymorphisms affect sperm parameters but not fertility in Polish males. Andrologia. 2017 Jun; 49(5).