

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

Mahsa Kazemi Roudsari<sup>1</sup>, Farhad Mashayekhi<sup>2\*</sup>

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](mailto:umistbiology@yahoo.co.uk)

## ارتباط پلی مورفیسم ژن مهارکننده بافتی متالوپروتئیناز ۱ (TIMP 1) با نتیجه ی لقاح مصنوعی و انتقال جنین

مهسا کاظمی رودسری<sup>۱</sup>، فرهاد مشایخی<sup>۲\*</sup>

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 شریان های ماریپیچ و حمله به آندومتر در طول لانه گزینی دخیل هستند. مهارکننده بافتی متالوپروتئیناز-۱، در بافت های مختلف موجودات بیان می شود و فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها را مهار می کند. هدف از این پژوهش، مطالعه ی بین ارتباط پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در پلی مورفیسم ۳۷۲T/C ژن TIMP1 (rs4898) با لقاح مصنوعی و انتقال جنین توسط PCR ویژه آل بود.

**مواد و روش ها:** در مجموع، تعداد ۲۰۰ نمونه خون شامل ۱۰۰ IVF منفی و ۱۰۰ IVF مثبت (کنترل) در این مطالعه جمع آوری شد. DNA برای ژنوتایپینگ TIMP1 استخراج شد. فراوانی ژنوتیپی و آلی پلی مورفیسم 372T/C از طریق روش PCR ویژه آل مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته ها:** فراوانی ژنوتیپی CC، CT و TT در پلی مورفیسم ۳۷۲T/C از ژن TIMP1 در نمونه های IVF- به ترتیب، ۹۸، ۱ و ۱ درصد بود، در حالی که برای گروه IVF+ به ترتیب، ۷، ۹۱ و ۲ درصد بود (p=۰/۰۷). فرکانس آلی 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 آلی TIMP1 rs4898 (372T/C) بین گروه کنترل و بیماران تفاوت معنی داری نداشت (به ترتیب p=۰/۰۷ و p=۰/۶۸).

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشان می دهد که پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی 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 متالوپروتئیناز ۱، پلی مورفیسم 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 کارآمد 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 حدوداً 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 متالوپروتینازها (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 متالوپروتینازها (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 حدوداً ۳ کیلو باز دارای ۶ اگزون بوده و در بازوی کوتاه کروموزوم X (xpll.3-p11.23) 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 مجدداً 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 خصوصاً اندام‌های تناسلی بیان می‌شود و هم‌چنین بیان این پروتئین در سیستم عصبی مرکزی به نواحی اعصاب پذیری مانند هیپوکامب، پیاز بویایی و مخچه محدود می‌گردد (۱۴). TIMP-1 در تنظیمات مختلف بیولوژیکی مثل رشد سلولی و آپاپتوزیس نقش بازدارندگی داشته و هم‌چنین در بیماری‌های مختلفی مثل انواع سرطان‌ها و بافت‌های فیروزه 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 DNA افراد یا جمعیت‌ها گفته می‌شود که می‌توانند نتیجه‌ی فرآیندهای تصادفی مانند خطای

## 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، کاربوتیپ غیر طبیعی و بیماری ژنتیکی شناخته شده، تخمدان پلی کیستیک 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 نمونه‌ها 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. نمونه‌ها جهت محفوظ ماندن از انعقاد تا زمان استخراج در لوله‌های استریل آغشته به EDTA و در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره شدند. فرآیند استخراج DNA به کمک کیت محللول GPP (شرکت ژن پژوهان، ایران) و بر اساس دستورالعمل مربوطه انجام پذیرفت. کیفیت باندهای حاصل از استخراج DNA به وسیله الکتروفورز آگارز مورد بررسی قرار گرفت.

در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) مربوط به ژن TIMP1، از دستگاه ترموسایکلر ۴۸ چاهکی (بیورد، آمریکا) 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.

DNA پلی‌مرز 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، اسید آمینه فنیل آلانین جایگزین فنیل آلانین 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 (۲۰-۲۲). به منظور ارتقاء کیفیت و شانس موفقیت تکنیک‌های ART، شناسایی و بررسی ژن‌های دخیل در روند لانه‌گزینی هم‌چون ماتریکس متالوپروتینازها (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 پلی‌مورفیسم‌های 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.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای الل T و C

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

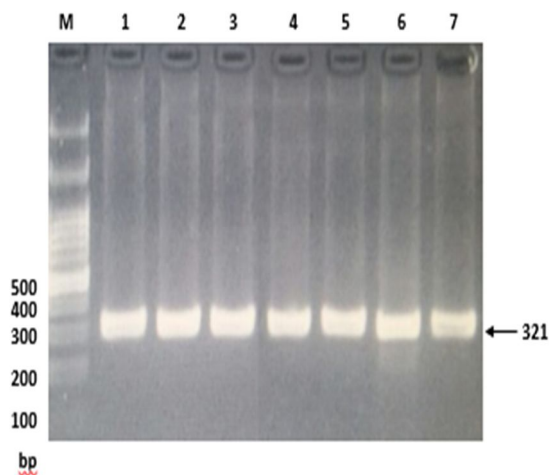
جهت محاسبه قدرت آماری از نرم افزار OpenEpi (www.OpenEpi.com) استفاده گردید؛ قدرت مطالعه ۸۰ درصد برآورد شد و هم چنین آزمون آماری کای مربع (2 $\chi$ )، با استفاده از نرم افزار مد کالک (نسخه ۱۲.۱.۴۰) صورت گرفت و پارامتر p نیز تعیین شد. مقدار p کمتر از ۰/۰۵، معنی دار در نظر گرفته شد.

#### یافته ها

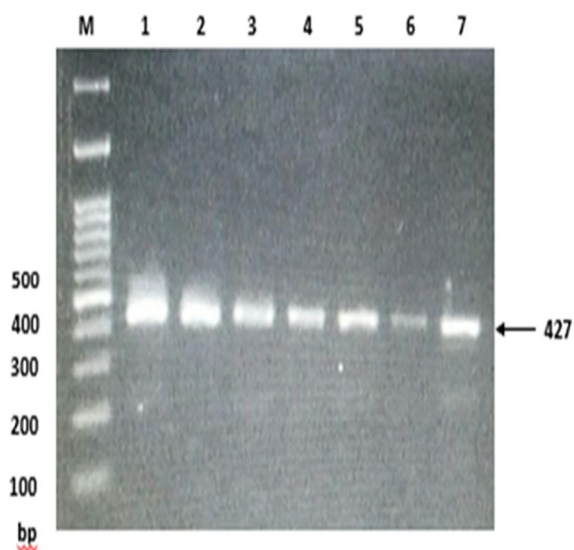
بعد از استخراج DNA ژنومی از نمونه خون افراد مورد مطالعه، تعیین ژنوتیپ به روش AS-PCR انجام شد. در این روش برای تشخیص آللی و هم چنین هتروزیگوت یا هموزیگوت بودن هر نمونه، دو بار PCR صورت گرفت. PCR اول مربوط به آلل C، با استفاده از پرایمرهای C-F و C-R بود که در صورت وجود آلل C، قطعه ای به طول ۴۲۷ bp تکثیر می شود و در صورت وجود آلل T، تکثیری صورت نمی گیرد. PCR دوم مربوط به پرایمر T-F و T-R می باشد که در صورت وجود آلل T، قطعه ای به طول ۳۲۱ bp تکثیر می شود و در صورت وجود آلل C تکثیری صورت نمی گیرد.

برنامه PCR با واسرشت سازی اولیه ی ۵ دقیقه ای در دمای ۹۴ درجه ی سانتی گراد، ۳۵ سیکل در دمای ۹۴ درجه ی سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۷ درجه ی سانتی گراد برای آلل T و ۵۴ درجه ی سانتی گراد برای آلل C، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه ی سانتی گراد و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد بود. شناسایی پلی مورفیسم 372T/C ژن TIMP1 توسط تکنیک AS-PCR صورت گرفت و برای هر الل به صورت مجزا واکنش PCR (واکنش دو تیوبی مجزا، یک تیوب حاوی واکنش همراه پرایمرهای Forward و Reverse الل T و تیوب دیگر واکنش توسط پرایمرهای Forward و Reverse الل C) انجام شد.

بدین منظور ۲/۵ میکرولیتر از DNA ی 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 (شکل های ۱ و ۲).



شکل ۱. ژل آگارز ۲ درصد مربوط به الکتروفورز محصول PCR (آلل T). در چاهک اول مارکر (M) با وزن مولکولی ۱۰۰۰ bp جهت تشخیص طول قطعات تکثیر شده استفاده شده است. باندهایی که در ناحیه ی (۳۲۱bp) دیده می شود، نشان دهنده ی آلل T می باشد.



شکل ۲. ژل آگارز ۲ درصد مربوط به الکتروفورز محصول PCR (آلل C). باندهایی که در ناحیه ی (۴۲۷bp) دیده می شود، نشان دهنده ی آلل C می باشد.

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

شکل های ۱ و ۲ سنجش صحت واکنش PCR انجام شده توسط ژل آگارز ۲ درصد را نشان می دهند. نتایج ژنوتیپی و آللی به شرح زیر به دست آمد. از میان افراد IVF+، ۷ نفر (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 نتیجه ی آزمون،  $\chi^2 = 5/09$  و  $p = 0/07$  مورد محاسبه قرار گرفت. بنابراین تفاوت معنی داری در فراوانی های 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 آلل های T و C برابر و ۵۰ درصد بوده است. بر این اساس و با توجه به نتیجه ی آزمون  $\chi^2 = 0/16$  و  $p = 0/68$  تفاوت معنی داری در فراوانی آللی بین دو گروه مورد بررسی نیز دیده نشد (جدول ۳).

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

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

جدول ۳. فراوانی آللی پلی مورفیسم 372T/C ژن TIMP-1 در افراد IVF+ و IVF-.

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

## بحث

در این مطالعه ی مورد-شاهدی، به بررسی اهمیت پلی مورفیسم 372T/C ژن TIMP1، 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 آللی TIMP1 (372T/C) بین گروه کنترل و بیمار تفاوت معنی داری نداشت (به ترتیب  $p=0/68$  و  $p=0/07$ ). بنابراین نتایج این مطالعه نشان داد که پلی مورفیسم 372T/C ژن TIMP-1 ارتباط معنی داری با نتیجه ی IVF-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. در طی لانه گزینی، ابتدا جنین توسط مولکول های چسبنده سلولی به دیواره ی رحم متصل شده و سپس بوسیله ی ماتریکس متالو پروتینازها (MMPs) به داخل آندومتر نفوذ می کند؛ بنابراین به منظور ارتقاء کیفیت و شانس موفقیت تکنیک لقاح مصنوعی، بررسی ژن های دخیل در روند لانه گزینی همچون ماتریکس متالوپروتینازها (MMPs) و مهارکننده های آن ها یعنی TIMPs که نقش بسیار مهمی در تخریب و بازسازی ماتریکس خارج سلولی و هم چنین رگ زایی دارند، بسیار حیاتی است (۱۵).

امروزه بحث در مورد ارتباط پلی مورفیسم های ژنتیکی و استعداد ابتلا به بعضی از بیماری ها از جمله مباحث پراهمیت محسوب می شود (۲۳). پلی مورفیسم ها می توانند مسئول بروز تفاوت های دیده شده در زمینه های بیوشیمیایی، فیزیولوژی، پاسخ به داروها و استعداد ابتلای افراد به بعضی از بیماری ها باشند و در بسیاری از بیماری ها نقش ایفا کنند. در این مطالعه به بررسی ارتباط بین یک پلی مورفیسم شناخته شده در ژن TIMP1 و نتیجه ی لقاح مصنوعی و انتقال جنین پرداخته شده است. پیرامون مطالعات انجام شده در مورد پلی مورفیسم های ژن TIMP1 می توان به بررسی چگونگی بیان MMP-9 و TIMP-1 mRNA آندومتری در اواسط فاز لوتئال اشاره کرد که 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 TIMP-1 mRNA 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 ژن ها ممکن است یکی از دلایل عمده ی ناباروری ایدیوپاتیک باشد (۲۴). اسکرزی 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

است. در تحقیقاتی که در سال ۲۰۱۶ در تایوان انجام گرفت، ارتباط معنا داری بین پلی مورفیسم 372T/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 احتمالاً پلی مورفیسم ژن TIMP-1 به طور معنا داری با سرطان پستان در ارتباط می باشد (۲۰). تاکنون پلی مورفیسم های متعددی در ژن یاد شده گزارش شده است، پلی مورفیسم مورد بررسی در این مطالعه از نوع (SNP) Single Nucleotide polymorphism و شامل تبدیل نوکلئوتید دارای تیمین به سیتوزین در کدون ۱۲۴ از اگزون ۵ ژن TIMP1 بوده است که با این تبدیل اسید آمینه ی فنیل آلانین مجدداً به فنیل آلانین تبدیل می شود (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 پلی مورفیسم 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 TT، CT، CC، 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 TT، CT، CC، ۱، ۹۸ و ۱ درصد بود. با توجه به نتیجه ی آزمون،  $\chi^2 = 5/09$  و  $p = 0/07$  مورد محاسبه قرار گرفت، بنابراین تفاوت معنی داری در فراوانی های 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 آلل های T و C برابر و ۵۰ درصد بوده است. بر این اساس، با توجه به نتیجه ی آزمون ( $\chi^2 = 0/16$  و  $p = 0/68$ ) و

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 زیان آور 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 معنا داری 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).

تایا-بیزار و همکارانش در سال ۲۰۱۴ دریافتند که با کاهش هورمون گنادوتروپین جفتی انسان (HCG)، TIMP1 و MMP9 ترشح می شود، بنابراین حمله ی تروفوبلاست به آندومتر مادر در شرایط آزمایشگاهی تسهیل شده که این امر نقش مهمی را در لانه گزینی موفق جنین و جفت بازی می کند (۲۹). شعبانی پور و همکارانش در سال ۲۰۱۵، نشان دادند که پلی مورفیسم 1562C/T از ژن MMP-9 در جمعیت ایران تأثیری 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 پلی مورفیسم های مختلف ژن TIMP1 با سایر بیماری ها نیز مورد ارزیابی واقع شده



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. Kazemijalish 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, Kutiyawalla A, Gayatri S, Lee BR, Jiwani S, et

نزدیکی داده‌ها ارتباط معنی داری در فراوانی آلی ژن TIMP-1 و نتیجه لقاح مصنوعی مشاهده نشده است. بنابراین ارتباط معناداری بین پلی مورفیسیم ۳۷۲T/C ژن TIMP-1 و نتیجه لقاح مصنوعی وجود ندارد ( $p > 0.05$ ).

البته میزان موفقیت لقاح مصنوعی حاصل برهم کنش 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 پلی مورفیسیم‌های شناخته شده در ژن مورد مطالعه در میزان موفقیت روش لقاح مصنوعی و انتقال جنین قابل تامل است. در مجموع شاید بتوان نقش این پلی مورفیسیم را با نتیجه ی لقاح مصنوعی و انتقال جنین بی‌ارتباط دانست؛ ولی ممکن است نتیجه ی به دست آمده با تغییر خزانه ی ژنتیکی یا تغییر معنی دار اندازه ی جمعیت تغییر نماید.

### نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده، از آنجایی که مقدار  $p$  بیشتر از ۰/۰۵ می‌باشد ( $p > 0.05$ )، نتیجه گیری می‌شود که پلی مورفیسیم ۳۷۲T/C ژن TIMP-1 ارتباط معنی داری با نتیجه ی IVF-ET در جمعیت مورد مطالعه ندارد؛ هرچند حصول نتیجه ی قطعی نیازمند مطالعات با جامعه ی آماری بزرگتر و سایر جمعیت 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

- 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 and Ccdc42. *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, Mazarino 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 fetomaternal 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 promoter polymorphism 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).

Archive of SID