عدم ارتباط بین رد مکرر لانه‌گزینی جنین به دنبال IVF با پلی-مورفیسم ژن (P53 Arg72Pro)

سمیه علافان[۱]، دکتر محمد حسن زاده نظرآبادی[۲]، محبوبه انقلابی فر[۱]، دکتر جینا خیاط زاده[۳]، خدیجه شاهرخ آبادی[۳]، فهیمه مرادی[۴]، دکتر محسن جلالی[۵]، دکتر نزهت موسوی فر[۶]، دکتر جواد زوار رضا[۷]، دکتر مجید مجرد[۸*]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی تکوینی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، مشهد، ایران.
۲. استاد گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۳. استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، مشهد، ایران.
۴. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۵. پزشک، مرکز تحقیقاتی و درمان ناباروری منتصریه، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۶. استادیار گروه زنان و مامایی، مرکز تحقیقات سلامت زنان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۷. استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.
۸. استادیار گروه ژنتیک پزشکی، مرکز تحقیقات ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۵/۶ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۴/۹/۸

خلاصه

مقدمه: شکست مکرر در لانه‌گزینی (RIF)، شایع ترین علت عدم موفقیت بارداری بعد از لقاح آزمایشگاهی است. از میان علل مختلف RIF، نقش عوامل ژنتیکی مادر به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل است. یکی از پلی‌مورفیسم های مطرح در این زمینه، پلی‌مورفیسم کدون ۷۲ ژن P53 می‌باشد. با توجه به مدارک موجود در مورد ارتباط این پلی مورفیسم با افزایش خطر وقوع RIF در جمعیت های مختلف در صورت اثبات این ارتباط در جمعیت ایرانی می توان از این پلی مورفیسم برای پیش بینی میزان موفقیت IVF استفاده نمود. مطالعه حاضر با هدف بررسی ارتباط این پلی‌مورفیسم با وقوع RIF انجام شد.

روش کار: این مطالعه مورد- شاهدی در سال ۱۳۸۹ بر روی ۸۰ زوج نابارور در مرکز درمان ناباروری منتصریه مشهد انجام شد. در این مطالعه زوجین نابارور به سه گروه کنترل، RIF-1 و RIF-2 تقسیم شدند. گروه کنترل شامل ۴۰ نفر از زنانی بود که بعد از IVF موفق به حاملگی شدند. بیماران گروه یک شامل ۲۰ نفر از زنانی بود که با وجود ۲ بار IVF، هیچ نوع بارداری در آن‌ها مشاهده نشده بود و بیماران گروه دو ۲۰ نفر از زنانی بودند که با حداقل ۳ بار IVF موفق به بارداری نشدند. با استفاده از تکنیک ARMS-PCR ژنوتیپ ژن P53 (آلل Arg72Pro) تعیین شد. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶) و آزمون مربع کای پیرسون انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها: شیوع ژنوتیپ Arg/Pro در گروه کنترل، گروه اول بیماران، گروه دوم بیماران و کل بیماران به ترتیب ۹۲/۵٪، ۷۵٪، ۸۰٪ و ۷۷/۵٪ و شیوع ژنوتیپ Arg/Arg در این گروه ها به ترتیب ۷/۵٪، ۲۵٪، ۲۰٪ و ۲۲/۵٪ بود. ژنوتیپ Pro/Pro در هیچ یک از گروه‌ها مشاهده نشد. بر اساس نتایج بدست آمده از آزمون آماری مربع کای پیرسون توزیع ژنوتیپ‌ها بین گروه های اول و دوم بیمار و همچنین کل بیماران با گروه کنترل تفاوت معنی داری وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج مطالعه حاضر در جمعیت مورد بررسی، پلی‌مورفیسم کدون ۷۲ ژن p53 ارتباطی با وقوع RIF ندارد و در نتیجه از این پلی مورفیسم نمی توان برای محاسبه خطر وقوع RIF استفاده نمود.

کلمات کلیدی: باروری در شرایط آزمایشگاهی، شکست مکرر لانه‌گزینی، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر مجید مجرد؛ مرکز تحقیقات ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. **تلفن:** ۰۵۱-۳۸۰۰۲۲۴۳؛ **پست الکترونیک:** mojaradm@mums.ac.ir

مقدمه

باروری در شرایط آزمایشگاهی (IVF[1]) یکی از پیشرفت‌های شگفت‌انگیز در علم ناباروری است که تحت عنوان باروری در محیط آزمایشگاه شناخته می شود، تا حدی که مبتکر این روش موفق به دریافت جایزه نوبل پزشکی در سال ۲۰۱۰ شد (۱).

IVF اغلب بهترین درمان برای زوجین مبتلا به ناباروری چند عاملی است و یکی از گزینه‌های درمانی برای زنان مبتلا به کاهش باروری است (۲).

با وجود پیشرفت‌های مداوم در تکنیک IVF و افزایش میزان موفقیت این تکنیک، تنها حدود یک سوم زنان تحت درمان با IVF باردار خواهند شد و در حدود ۶۰٪ موارد این تکنیک با شکست مواجه می‌شوند.

عوامل متعددی در میزان موفقیت تکنیک IVF نقش دارند که شامل: سن، تعداد بارداری قبلی، تعداد بارداری‌های موفق قبلی، سطح سرمی برخی هورمون‌ها، تعداد فولیکول‌های آنترال قبل از تحریک، ضخامت آندومتر، کیفیت جنین، موقعیت و طول رحم و تکنیک انتقال جنین می باشد (۳).

شکست در لانه‌گزینی، شایع‌ترین علت عدم موفقیت بارداری پس از القاح آزمایشگاهی و انتقال جنین است که در برخی بیماران این اختلال به صورت شکست مکرر لانه‌گزینی (RIF[2]) ذکر می‌شود (۳).

بر اساس تعاریف استاندارد بین المللی، عدم وقوع حاملگی به دنبال حداقل ۲ بار انتقال جنین که در هر بار حداقل ۲ جنین با کیفیت و تعداد تقسیمات سلولی قابل قبول منتقل می‌شود، به عنوان شکست مکرر در لانه گزینی مطرح شده است (۴، ۵). البته امروزه با گرایشی که به انتقال ۱ یا ۲ جنین در هر بار انتقال به داخل رحم وجود دارد، این تعریف در هاله ای از ابهام می باشد (۵، ۶).

شکست مکرر لانه‌گزینی می‌تواند مربوط به علل آناتومی، ایمنولوژی، ترومبوفیلی، عفونی و نقش غدد درون‌ریز، ژنتیک یا غیرقابل توجیه باشد (۳).

به منظور ارتقاء کیفیت و شانس موفقیت تکنیک‌های کمک باروری، شناسایی ژن‌های دخیل در روند لانه گزینی و فرآیندهای مرتبط با این ژن‌ها از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردارند. در سال‌های اخیر پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در زمینه شناسایی وقایع سلولی و مولکولی روند لانه گزینی حاصل شده است (۷).

لانه‌گزینی جنین، یک فرآیند چند مرحله‌ای و بسیار پیچیده است که در طی آن جنین چندسلولی و بافت آندومتر مادر با یکدیگر ممزوج می شوند (۷). این فرآیند شامل اتصال جنین به آندومتر، تهاجم سلول‌های جنینی به بافت آندومتر و رگزایی است که ژن‌های متعددی از طرف مادر و جنین در این وقایع نقش ایفا می‌کنند (۸، ۹).

نقص در هر یک از این ژن‌ها می‌تواند منجر به اختلال در روند لانه‌گزینی و عدم باروری شود، با این حال از آنجایی که وقایع سلولی و مولکولی دخیل در این روند در بسیاری از وقایع فیزیولوژیک و تکاملی دیگر نیز نقش دارند، نقص کامل این ژن‌ها منجر به علائم دیگری نیز خواهند شد که قبل از رسیدن فرد به سن باروری به صورت بیماری‌های دیگر قابل شناسایی خواهند بود.

در سال‌های اخیر تفاوت‌های ژنتیکی به ظاهر بی اثر که به عنوان پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی در بین افراد سالم اجتماع محسوب می‌شوند، کانون توجه مطالعات در زمینه بسیاری از بیماری‌های چندعاملی از جمله سقط جنین و شکست در لانه‌گزینی شده است.

پلی‌مورفیسم ژنتیکی در واقع به تفاوت‌های ژنتیکی بین افراد یک جامعه اطلاق می‌شود که این تفاوت‌ها منجر به اثرات واضح در فنوتیپ افراد نمی‌شود. با این حال احتمال ابتلاء افراد به بیماری‌های مختلف و به خصوص بیماری‌های چندعاملی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. پلی مورفیسم‌های ژنتیکی اشکال مختلفی دارند که یکی از انواع مهم آن‌ها، تغییر یک واحد نوکلئوتیدی است که در برخی مواقع منجر به تغییر در کدون اسیدآمینه پروتئین نیز می‌شود و پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP[3]) نام دارد (۱۰).

[1] In Vitro Fertilization
[2] Recurrent Implantation Failure
[3] Single Nucleotide Polymorphism

تاکنون مطالعات متعددی بر روی اثرات SNP های مختلف بر جنبه‌های مختلف تولید مثل انسان از جمله سقط مکرر، ناباروری و همچنین شکست لانه گزینی جنین انجام شده است که در این میان ارتباط SNPها در ژن‌های مختلفی از جمله ژن MTHFR، گیرنده پروژسترون، گیرنده FSH، فاکتور مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن (PAI-1) و ژن گیرنده استروژن با جنبه‌های مختلف باروری مشاهده شده است (۱۱-۱۷).

یکی از ژن‌های مهمی که در تنظیم فرآیندهای مختلف فیزیولوژیک از جمله باروری نقش مهمی ایفا می کند، ژن P53 می‌باشد. این ژن در کنترل و تنظیم فرآیندهای مختلف سلولی و تکاملی پیری سلولی[1]، رگزایی[2]، مهاجرت سلولی[3]، شکل‌گیری استخوان‌ها[4] و همچنین باروری نقش مهم و حیاتی ایفا می‌کند (۲۲-۱۸). این ژن با تنظیم بیان ژن LIF-1[5] که نقش حیاتی را در روند لانه‌گزینی ایفا می کند، نقش مهمی در باروری دارد (۲۳).

وقوع جهش‌های مخرب در ژن P53 باعث سندرم کاملاً شناخته شده لی- فرامنی[6] می‌شود که با وقوع سرطان‌های متنوع در افراد خانواده، حامل این جهش می‌شود. از سوی دیگر مطالعات مختلف پیشنهاد می‌کنند که پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی ژن P53 منجر به تغییرات جزئی در مسیرهای تحت کنترل این ژن می‌شود که در نهایت منجر به استعداد برای ابتلاء به اختلالات مختلف و متنوع می‌شود (۲۴، ۲۵).

از میان ۴/۵ میلیون SNP شناخته شده تاکنون، حدود ۱/۵ میلیون مربوط به ۸۲ ژن درگیر در انتقال سیگنال در مسیر ژنp53 می‌باشد (۲۶، ۲۷). به نظر می‌رسد SNP های این ژن‌ها منجر به تغییر میزان کنترل مسیر P53 بر فرآیندهای فیزیولوژیک می‌شود. این یافته جالب توجه این سؤال جذاب را ایجاد می کند که حال اگر خود ژن P53 دچار تغییرات ژنتیکی شود، چه اتفاقی می‌افتد.

تاکنون حداقل ۳۷ پلی‌مورفیسم در ژن P53 کشف شده است که شایع‌ترین آن‌ها پلی مورفیسم کدون ۷۲ و اینترون ۳ و اینترون ۶ می‌باشد (۲۴، ۲۸).

آلل پلی مورفیک کدون ۷۲ در اگزون ۴ قرار دارد و یکی از دو اسید آمینه آرژنین (CGC) و یا پرولین (CCC) را کد می‌کند. تحقیقات نشان داده‌اند که آلل‌های مختلف این پلی‌مورفیسم دارای عملکرد تنظیمی و رونویسی متفاوت است (۲۹-۳۳).

سطوح LIF در اکثر زنان مبتلا به ناباروری با علت ناشناخته به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد، تنظیم LIF و لانه‌گزینی بلاستوسیت توسط P53 در موش، نقش بالقوه P53 را در باروری انسان نشان می‌دهد (۳۴).

برخی مطالعات پیشنهاد می‌کنند شیوع پلی‌مورفیسم کدون ۷۲ در P53 تأثیر قابل توجهی در میزان رد لانه‌گزینی در سیکل های لقاح IVF دارد (۳۷-۳۵).

با این حال مطالعات دیگری نیز وجود دارند که در آن‌ها وجود ارتباط بین این پلی‌مورفیسم و میزان موفقیت IVF رد شده است (۳۸).

با توجه به نقش مهم زمینه ژنتیکی جمعیت‌های مختلف در تعیین اهمیت این پلی‌مورفیسم در موفقیت تکنیک‌های کمک باروری، لزوم بررسی ارتباط این پلی‌مورفیسم و احتمال موفقیت IVF در جمعیت ایران نیز احساس می‌شود. مطالعه حاضر با هدف بررسی فراوانی آلل های این پلی‌مورفیسم و ارتباط آن‌ها با شکست مکرر لانه‌گزینی در میان زنان نابارور مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری منتصریه مشهد انجام شد.

روش کار

این مطالعه مورد شاهدی طی سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۸۵ بر روی۸۰ زن نابارور (سن کمتر از ۳۵ سال) که تحت درمان با IVF قرار گرفته بودند، در مرکز درمان ناباروری منتصریه مشهد، وابسته به دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شد. در این بررسی زوجین نابارور

[1] cellularscencesence
[2] angiogenesis
[3] cell migration
[4] remodeling bone
[5] leukemia inhibitory factor-1
[6] Li-Fraumeni

به دو گروه تقسیم شدند. ۴۰ نفر از زنانی که بعد از IVF، باردار شده بودند، به عنوان گروه کنترل وارد مطالعه شدند. ملاک تأیید حاملگی، مشاهده ساک حاملگی در سونوگرافی ۲۰ روز بعد از انجام عمل IVF بود. از سوی دیگر ۴۰ زن نابارور که با وجود ۲ بار IVF و دریافت ۶ جنین، هیچ بارداری یا تشکیل ساک حاملگی در آن‌ها مشاهده نشده بود و تست حاملگی آن‌ها منفی بود نیز به عنوان گروه بیمار وارد مطالعه شدند. گروه بیماران به دو زیر گروه تقسیم شدند، بیماران گروه ۱ شامل ۲۰ نفر از زنانی بود که با وجود ۲ بار IVF، هیچ نوع بارداری در آن‌ها مشاهده نشده بود و بیماران گروه ۲ شامل ۲۰ نفر از زنانی بود که با حداقل ۳ بار IVF موفق به بارداری نشدند.

این افراد از نظر ذخیره تخمدانی، سابقه بیماری خود ایمنی، آناتومی غیر نرمال رحم بر اساس بررسی لاپاروسکوپی، وجود کیست های تخمدانی، انسداد لوله‌های فالوپ، آندومتریوز و همچنین وجود ناهنجاری کروموزومی مورد بررسی قرار گرفتند و زنانی که از نظر این موارد طبیعی بودند برای انجام مطالعه انتخاب شدند.

تعیین ژنوتیپ

پس از کسب رضایت آگاهانه بیمار، مقدار ۲/۵ میلی لیتر خون از ورید براکیال افراد گرفته و در لوله حاوی EDTA ریخته شد. نمونه‌های خون پس از انتقال به گروه ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی مشهد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. با استفاده از کیت استخراج DNA از خون (GENET BIO)، DNA استخراج شد. با استفاده از تکنیک ARMS-PCR ژنوتیپ ژن P53 تعیین شد. پرایمرهای مورد استفاده شامل دو پرایمر داخلی اختصاصی آلل و دو پرایمر خارجی به عنوان کنترل داخلی واکنش به منظور تأیید موقع واکنش PCR بود. برای هر بیمار در دو لوله مجزا واکنش انجام شد که یکی حاوی پرایمرهای اختصاصی آلل G و دیگری حاوی پرایمرهای اختصاصی آلل C بود. هر دو لوله حاوی پرایمر کنترل داخلی بودند. سکانس مربوط به پرایمرها در جدول ۱ لیست شده است.

مواد مورد استفاده در واکنش PCR شامل بافر مخصوص PCR با غلظت ۱ برابر[1]، کلرید منیزیم با غلظت ۲ میلی مولار، مخلوط dNTP با غلظت ۰/۲ میلی مولار و ۰/۴ میکرومولار برای هر پرایمر بود. به هر واکنش مقدار ۱۰۰ نانوگرم DNA و ۲ واحد از آنزیم DNA پلی مراز اضافه شده و با استفاده از آب مقطر حجم محلول واکنش به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد.

واکنش PCR شامل مرحله واسرشته شدن اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، و سپس ۳۵ تکرار شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. در مرحله آخر نیز ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه به عنوان مرحله تکثیر نهایی مورد استفاده قرار گرفت. محصولات واکنش روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شده و بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، وجود باند محصولات PCR زیر نور ماوراء بنفش مورد ارزیابی قرار گرفت.

به منظور تأیید صحت واکنش ARMS-PCR در تعیین ژنوتیپ به طور تصادفی سه نمونه با ژنوتیپ‌های مختلف مورد تعیین توالی قرار گرفتند که نتایج حاصل از تعیین توالی در هر سه نمونه با نتایج به دست آمده از واکنش ARMS-PCR مطابقت داشت.

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶) و آزمون مربع کای پیرسون انجام شد). میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج حاصل از واکنش ARMS-PCR برای دو نمونه هتروزیگوت Arg/Pro در شکل ۱ آورده شده است. بر اساس شکل ۱، در محصولات PCR، باند ۲۷۹ نوکلئوتیدی نشان‌دهنده تکثیر پرایمرهای کنترل داخلی و ۱۷۸ نوکلئوتیدی نشان‌دهنده تکثیر پرایمرهای مربوط به پرایمرهای اختصاصی آلل G است. از سوی دیگر باند ۱۳۶ نوکلئوتیدی مربوط به پرایمرهای اختصاصی آلل C است.

[1] 1X

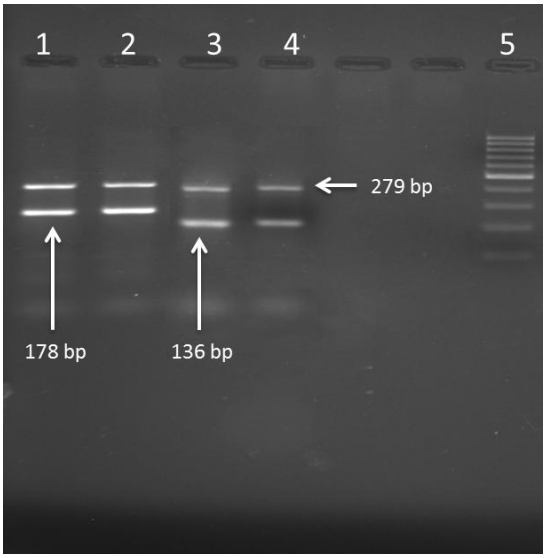
در این مطالعه متوسط سن افراد گروه کنترل ۳۰,۱±۰,۵ سال، گروه یک بیماران ۳۳±۲ سال و گروه دو بیماران ۳۳,۹±۱ سال بود که این تفاوت در میان گروه بیماران و کنترل از نظر آماری معنادار بود (p=۰,۰۳). میانگین طول دوره ناباروری در گروه کنترل ۷/۵±۲ سال و در گروه بیماران ۱۱/۵±۳ سال بود که تفاوت آماری معناداری در طول دوره ناباروری گروه کنترل وRIF مشاهده شد (p=۰/۰۱). در این مطالعه ازدواج خویشاوندی در ایجاد شکست مکرر لانه‌گزینی از اهمیت آماری برخوردار نبود (p=۰/۷۸)؛ به طوری که بین ۴۰٪ زوجین گروه کنترل و ۳۷/۵٪ زوجین گروه RIF ارتباط خویشاوندی وجود داشت.

فراوانی آلل Arg در گروه گروه کنترل، گروه اول بیماران، گروه دوم بیماران و کل بیماران به ترتیب ۵۳/۷۵٪، ۶۲/۵٪، ۶۰٪ و ۶۱/۲۵٪ بود. فراوانی ژنوتیپ Arg/Arg در گروه کنترل، گروه اول بیماران، گروه دوم بیماران و کل بیماران به ترتیب ۷/۵٪، ۲۵٪، ۲۰٪ و ۲۲/۵٪ بود. فراوانی آلل Pro در گروه کنترل، گروه اول بیماران، گروه دوم بیماران و کل بیماران به ترتیب ۴۶/۲۵٪، ۳۷/۵٪، ۴۰٪ و ۳۸/۷۵٪ بود. فراوانی ژنوتیپ Arg/Pro در گروه کنترل، گروه اول بیماران، گروه دوم بیماران و کل بیماران به ترتیب ۹۲/۵٪، ۷۵٪، ۸۰٪ و ۷۷/۵٪ بود. نکته جالب در این مطالعه این بود که ژنوتیپ Pro/Pro در هیچ یک از گروه‌ها مشاهده نشد.

بر اساس آزمون آماری مربع کای پیرسون، در بررسی تفاوت فراوانی ژنوتیپ‌های هموزیگوت Arg/Arg و هتروزیگوت Arg/Pro در گروه بیمار ۱ و کنترل و نیز بیمار ۲ با کنترل و مجموع بیماران با گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری بین فراوانی این ژنوتیپ‌ها در میان گروه‌ها وجود نداشت (p>۰/۰۵).

جدول ۱- لیست پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR ژنوتایپینگ کدون ۷۲ ژن P53. پرایمرهای P1 و P2 مربوط به تکثیر آلل پرولین و پرایمرهای A1 و A2 مربوط به آلل آرژنین می‌باشد. علاوه بر این پرایمرهای P2 و A1، نقش پرایمرهای کنترل داخلی را نیز دارند.

GCCAGAGGCTGCTCCCC	p53-p1
CGTGCAAGTCACAGACTT	p53-p2
TCCCCCTTGCCGTCCCAA	p53-a1
CTGGTGCAGGGGCCACG	p53-a2



شکل ۱- نتایج حاصل از واکنش PCR ژنوتایپینگ کدون ۷۲ ژن P53. نمونه های شماره ۱ و ۲ مربوط به لوله‌های واکنش مربوط به لوله‌های واکنش PCR برای آلل G و لاین‌های شماره ۳ و ۴ مربوط به لوله‌های واکنش PCR برای آلل C در دو فرد می‌باشد. لوله‌های ۱ و ۳ متعلق به یک بیمار و لوله های ۲ و ۴ مربوط به یک بیمار دیگر است. همانطور که در متن توضیح داده شد بر اساس این نتایج، این دو بیمار هردو دارای ژنوتیپ هتروزیگوت می باشند.

بحث

ناباروری یکی از مشکلات عدیده پزشکی در دنیای امروز است؛ به طوری که با صنعتی شدن جوامع و تغییر شیوه زندگی، به مرور زمان بر انواع گوناگون عوامل خطرساز محیطی افزوده شده و منجر به بروز اختلالاتی در ارگان های مختلف بدن انسان شده است. همه این عوامل ممکن است به طور مستقیم و غیرمستقیم بر کاهش باروری در انسان و شیوع ناباروری تأثیر بگذارند (۳۹).

یکی از رایج ترین و موفق ترین روش‌ها برای درمان مشکلات ناباروری، لقاح "برون‌تنی" است که در درمان بسیاری از موارد ناباروری به کار می رود. با این حال این روش نیز میزان موفقیت پایینی دارد و درصد قابل توجهی از زوجین استفاده کننده از این روش با شکست مواجه می‌شوند. به طور کلی تخمین‌زده می شود که ۸۵٪ جنین‌های ناشی از روش‌های کمک باروری پس از انتقال، موفق به لانه گزینی نمی‌شوند.

شکست در لانه‌گزینی، شایع‌ترین علت عدم موفقیت بارداری پس از لقاح آزمایشگاهی و انتقال جنین است (۳). از میان عوامل مؤثر در شکست لانه‌گزینی، مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش سن مادر، احتمال لانه گزینی جنین و موفقیت عمل IVF کاهش می‌یابد. علل این امر این است که با گذشت زمان، احتمال موفقیت روش‌های درمان ناباروری به خصوص IVF کاهش می‌یابد، زیرا فرآیندهایی که منجر به عدم موفقیت IVF و کاهش لانه‌گزینی می‌شود، به طور کامل شناخته نشده است. در مطالعه حاضر که بخشی از یک طرح مربوط به پلی مورفیسم ژن های مؤثر در لانه‌گزینی بود، نقش پلی‌مورفیسم کدون ۷۲ ژنp53 در رد لانه‌گزینی جنین در سیکل‌های لقاح IVF مورد بررسی قرار گرفت. در این پلی‌مورفیسم، اسید آمینه آرژنین به اسید آمینه پرولین تبدیل می‌شود. Arg72 برای القاء آپوپتوزورگزایی توسط p53 بهتر از Pro72 نشان داده شد (۳۰).

سطوح فاکتور مهارکننده لوسمی [1](LIF) در اکثر زنان مبتلا به ناباروری با علت ناشناخته به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد، تنظیم LIF و لانه‌گزینی بلاستوسیست توسط p53 در موش، نقش بالقوه p53 را در باروری انسان نشان می‌دهد (۳۴).

در این مطالعه از بین ژن‌های مؤثر بر لانه‌گزینی جنین، شیوع پلی‌مورفیسم کدون ۷۲ در ژن p53 اثر قابل توجهی در میزان رد لانه‌گزینی جنین در سیکل‌های لقاح IVF در زنان نابارور مراجعه‌کننده به مرکز درمانی منتصریه نداشت.

جورج پاتوناکیس و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی شیوع شکست مکرر لانه‌گزینی در ۱۰۵۶ زن که جمعاً ۲۶۰۰ جنین به آن‌ها منتقل شده بود، ارتباط بین پلی مورفیسم کدون ۷۲ در ژن P53 با وقوع RIF را مورد بررسی قرار دادند. نتایج پژوهش نشان‌دهنده عدم وجود ارتباط بین این پلی مورفیسم و وقوع RIF بود (۳۸). در این مطالعه ژنوتیپ Pro/Pro نیز در گروه بیماران مشاهده شد، اما در مطالعه ما این ژنوتیپ مشاهده نشد که شاید علت آن محدویت تعداد بیماران جامعه آماری مطالعه حاضر باشد.

در مطالعه کارولین گودمن و همکاران (۲۰۰۸) نتایج نشان دهنده وجود ارتباط معنی دار بین پلی مورفیسم کدون ۷۲ ژن P53 و وقوع RIF بود. البته می‌توان اینطور نتیجه گرفت که علت به دست آوردن این نتیجه در مطالعه مزبور ناشی از استفاده از زنان بارور با حداقل دو تولد زنده به عنوان جامعه کنترل (بجای زنان نابارور دارای IVF موفق) بود (۳۷).

با توجه به مطالعات انجام شده، در مطالعه حاضر به نظر می‌رسد تغییرات نژادی و جغرافیایی در عملکرد پلی مورفیسم ژن p53 بر روی زنان نابارور مراجعه کننده به مرکز منتصریه دخیل بوده باشد و به دلیل محدودیت هایی از قبیل تعداد نمونه‌ها و عدم امکان دسترسی مجدد به نمونه‌های تخریب شده و یا پرونده برخی بیماران، مطالعات وسیع‌تری با تعداد نمونه‌های بیشتر در جمعیت‌های متفاوت مورد نیاز است.

با توجه به مطالعات انجام شده و اهمیت نقش ژن‌های دخیل در لانه‌گزینی جنین به نظر می رسد انجام بررسی‌هایی بر روی مسیرهای مولکولی درگیر در

[1] Leukemia Inhibitory Factor

فرآیند لانه‌گزینی، به ویژه مطالعات و مشاوره‌های ژنتیکی قبل از عمل IVF، می‌تواند در تشخیص میزان لانه‌گزینی قبل از انتقال جنین کمک بسزایی داشته باشد و از تحمیل هزینه های سنگین IVF و فشارهای روحی بر زوجین نابارور جلوگیری شود. بدین وسیله شاید بتوان راهکارهای مناسب و کم هزینه‌تری برای درمان ناباروری پیشنهاد داد. در ضمن شایسته است که در کشور ما نیز مشابه بسیاری از کشورها، اطلاعات مربوط به عدم لانه‌گزینی جنین به دنبال IVF از مراکز مختلف جمع‌آوری و به صورت آمارهای کشوری ارائه شود تا علل شایع مربوط به عدم لانه‌گزینی و عوامل مؤثر بر پیش‌آگهی آن شناسایی و با انتخاب دقیق بیمار و درمان مناسب، اقدامی مفید برای زنان مبتلا به RIF و زوجین نابارور انجام شود.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده بنظر می رسد در جمعیت ایرانی، پلی‌مورفیسم کدون ۷۲ ژن p53 ارتباطی با وقوع RIF ندارد و در نتیجه از این پلی مورفیسم نمی توان برای محاسبه خطر وقوع RIF استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تحت گرنت شماره ۹۰۰۹۱۲ انجام شد. بدین وسیله از ریاست و کارکنان محترم مرکز درمان ناباروری منتصریه مشهد و اساتید و پرسنل محترم گروه ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی مشهد که ما را در انجام این مطالعه یاری کردند، تشکر و قدردانی می شود.

منابع

1. Edwards RG. IVF, IVM, natural cycle IVF, minimal stimulation IVF–time for a rethink. Reprod Biomed Online 2007; 15(1):106-19.
2. Speroff L, Fritz MA. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
3. Fiedler K, Wurfel W. Effectively of heparin in assisted reproduction. Eur J Med Res 2004; 9(4):207-14.
4. Raziel A, Friedler S, Schachter M, Kasterstein E, Strassburger D, Ron-El R. Increased frequency of female partner chromosomal abnormalities in patients with high-order implantation failure after in vitro fertilization. Fertil steril 2002; 78(3):515-9.
5. Oliveira FG, Abdelmassih VG, Diamond MP, Dozortsev D, Nagy ZP, Abdelmassih R. Uterine cavity findings and hysteroscopic interventions in patients undergoing in vitro fertilization–embryo transfer who repeatedly cannot conceive. Fertil steril 2003; 80(6):1371-5.
6. De Klerk C, Macklon NS, Heijnen EM, Eijkemans MJ, Fauser BC, Passchier J, et al. The psychological impact of IVF failure after two or more cycles of IVF with a mild versus standard treatment strategy. Hum Reprod 2007; 22(9):2554-8.
7. Bagchi IC, Kumar S. Steroid-regulated molecular markers of implantation. Semin Reprod Endocrinol 1999; 17(3):235-40.
8. Hines RS. Molecular analysis of implantation. Semin Reprod Med 2000; 18(1):91-6.
9. Paria BC, Lim H, Das SK, Reese J, Dey SK. Molecular signaling in uterine receptivity for implantation. Semin Cell Dev Biol 2000; 11(2):67-76.
10. Kalemi TG, Lambropoulos AF, Gueorguiev M, Chrisafi S, Papazisis KT, Kotsis A. The association of p53 mutations and p53 codon 72, Her 2 codon 655 and MTHFR C677T polymorphisms with breast cancer in Northern Greece. Cancer Lett 2005; 222(1):57-65.
11. Haggarty P, McCallum H, McBain H, Andrews K, Duthie S, McNeill G, et al. Effect of B vitamins and genetics on success of in-vitro fertilisation: prospective cohort study. Lancet 2006; 367(9521):1513-9.
12. Dobson A, Davis RM, Rosen MP, Shen S, Rinaudo P, Chan J, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C variants do not affect ongoing pregnancy rates following IVF. Hum Reprod 2007; 22(2):450-6.
13. Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. Multiple thrombophilic gene mutations are risk factors for implantation failure. Reprod Biomed Online 2006; 12(3):322-7.
14. Wunsch A, Ahda Y, Banaz-Yaşar F, Sonntag B, Nieschlag E, Simoni M, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the promoter region influence the expression of the human follicle-stimulating hormone receptor. Fertil Steril 2005; 84(2):446-53.

15. Cramer DW, Hornstein MD, McShane P, Powers RD, Lescault PJ, Vitonis AF, et al. Human progesterone receptor polymorphisms and implantation failure during in vitro fertilization. Am J Obstet Gynecol 2003; 189(4):1085-92.
16. Georgiou I, Konstantelli M, Syrrou M, Messinis IE, Lolis DE. Oestrogen receptor gene polymorphisms and ovarian stimulation for in-vitro fertilization. Hum Reprod 1997; 12(7):1430-3.
17. Klinkert ER, te Velde ER, Weima S, van Zandvoort PM, Hanssen RG, Nilsson PR, et al. FSH receptor genotype is associated with pregnancy but not with ovarian response in IVF. Reprod Biomed Online 2006; 13(5):687-95.
18. Liu H, Li B. P53 control of bone remodeling. J Cell Biochem 2010; 111(3):529-34.
19. Wang X, Kua HY, Hu Y, Guo K, Zeng Q, Wu Q, et al. P53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis, osteoblast-dependent osteoclastogenesis, and bone remodeling. J Cell Biol 2006; 172(1):115-25.
20. Sakai A, Sakata T, Tanaka S, Okazaki R, Kunugita N, Norimura T, et al. Disruption of the p53 gene results in preserved trabecular bone mass and bone formation after mechanical unloading. J Bone Miner Res 2002; 17(1):119-27.
21. Darzynkiewicz Z. Another "Janus paradox" of p53: induction of cell senescence versus quiescence. Aging (Albany NY) 2010; 2(6):329-30.
22. Kailong L, Du X, Yani H, Lin Z, Jvrong Y, Ruihua S, et al. P53-Rb signaling pathway is involved in tubular cell senescence in renal ischemia/reperfusion injury. Biocell 2007; 31(2):213-23.
23. Hu W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ. P53 regulates maternal reproduction through LIF. Nature 2007; 450(7170):721-4.
24. Varley J. Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. Hum Mutat 2003; 21(3):313-20.
25. Brenna S, Silva ID, Zeferino LC, Pereira JS, Martinez EZ, Syrjänen KJ. Prognostic value of P53 codon 72 polymorphism in invasive cervical cancer in Brazil. Gynecol Oncol 2004; 93(2):374-80.
26. Jin S, Levine AJ. The p53 functional circuit. J Cell Sci 2001; 114(Pt 23):4139-40.
27. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. Nature 2000; 408(6810):307-10.
28. Riley KJ, Maher LJ 3rd. P53–RNA interactions: new clues in an old mystery. RNA 2007; 13(11):1825-33.
29. Singh V, Rastogi N, Mathur N, Singh K, Singh MP. Association of polymorphism in MDM-2 and p53 genes with breast cancer risk in Indian women. Ann Epidemiol 2008; 18(1):48-57.
30. Soussi T, Wiman KG. Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. Cancer cell 2007; 12(4):303-12.
31. Bernardini S, Adessi GL, Billerey C, Chezy E, Carbillet JP, Bittard H. Immunohistochemical detection of p53 protein overexpression versus gene sequencing in urinary bladder carcinomas. J urol 1999; 162(4):1496-501.
32. Rosai J. Female reproductive system. Rosai and Ackermans. Surgical pathology. 2th ed. St Louis: Editorial Mosby; 1996.
33. Vousden KH, Lane DP. P53 in health and disease. Nat Rev Mol Cell Biol 2007; 8(4):275-83.
34. Strandell A, Lindhard A, Waldenström U, Thorburn J, Janson PO, Hamberger L. Hydrosalpinx and IVF outcome: a prospective, randomized multicentre trial in Scandinavia on salpingectomy prior to IVF. Hum Reprod 1999; 14(11):2762-9.
35. Kang HJ, Feng Z, Sun Y, Atwal G, Murphy ME, Rebbeck TR, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106(24):9761-6.
36. Kay C, Jeyendran RC, Coulam CB. P53 tumour suppressor gene polymorphism is associated with recurrent implantation failure. Reprod Biomed Online 2006; 13(4):492-6.
37. Goodman C, Jeyendran RS, Coulam C. P53 tumor suppressor factor, plasminogen activator inhibitor, and vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and recurrent implantation failure. Fertil Steril 2009; 92(2):494-8.
38. Patounakis G, Treff N, Tao X, Lonczak A, Scott RT Jr, Frattarelli JL. The p53 codon 72 single nucleotide polymorphism lacks a significant effect on implantation rate in fresh in vitro fertilization cycles: an analysis of 1,056 patients. Fertil Steril 2009; 92(4):1290-6.
39. Aryanpur M, Heydari G, Tarahomi M, Akhondi MM, Zeraati H, Masjedi MR. Prevalence of tobacco smoking among infertile couples in Tehran. J Reprod Infertil 2009; 9(4):342-9. (Persian).