Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2017; 20(123): 22-30

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

Marzieh Khoshbin Nazdik[1], Zeinab Khazaei Koohpar[2]*, Arezo Sayad[3]

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. Asistant 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. Asistant 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 activitiy 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 IFNb.

***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-beta.

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

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۲۰، شماره ۶ (شماره پیاپی ۱۲۳)، شهریور ۱۳۹۶، ۳۰-۲۲

بررسی بیان ژنTIMP1در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس (MS)

مرضیه خوشبین نزدیک[۱]، زینب خزائی کوهپر[۲*]، آرزوصیاد[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاداسلامی، تنکابن، ایران.
۲. استادیار، دکترای زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاداسلامی، 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 متالوپروتئیناز۹ (MMP-9) مهاجرت سلول Tرا به سیستم عصبی مرکزی (CNS) تسهیل می کند، در حالی که مهارکننده های بافتی متالوپروتئیناز۱(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 IFNb بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، سطح بیان ژن TIMP-1 درسلول 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($p=۰/۱$).

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 واحدتنکابن، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی.
Email: khazaei@toniau.ac.ir

مقدمه

بیماری مولتیپل اسکلروزیس یاMS 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 وافراد،دوره های مختلف برگشت بیماری را دارند. Secondary Progressive(SPMS) بیماری ثانویه پیشرونده، زمانی است که به دنبالRRیک 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 ازحداقل ۲۳ اندوپپتیداز بوده که به عنوان عوامل تغییر ماتریکس خارج سلولی در شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی عمل می کنند. MMPs شامل gelatinases,collagenases stromelysins و سایر MMPs می باشند. فعالیت آن ها به وسیله مهار کننده های بافتی متالو پروتئینازها(TIMPs)تنظیم می شود که گروهی شامل۴ آنتاگونیست اندوژن هستند که به جایگاه فعال MMPs متصل می شوند. مدارک زیادی دال بر نقش کلیدیMMPs 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 دهدکه متالو پروتئینازها عواملی هستند که در تخریب سد خونی-مغزی، ورود سلول های ایمنی به پارانشیم مغز،تشدید رهایی TNF-α وتجزیه پروتئین های میلین نقش دارند(۶-۴). ازجمله ماتریکس متالوپروتئیناز۹ (MMP-9)مهاجرت سلول T را به سیستم عصبی مرکزی (CNS) تسهیل می کند، در حالی که مهارکننده های بافتی متالوپروتئیناز۱(TIMP-1) عملکرد MMP-9 را مهار می کنند(۷). بر اساس بسیاری از مطالعات میزان MMP-9 در سرم بیمارانRRMS بویژه در فاز حاد بیماری بالا می باشد(۸). باتوجه به توضیحات فوق ونقش TIMPsدر تنظیم فعالیتMMPs از جمله نقش-TIMP 1در مهار عملکردMMP-9 ، در این پژوهش بیان ژنTIMP-1 در سطح RNA در سلول های خون بیماران ایرانی مبتلا به RRMS تحت درمان باIFNb 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 ورودبه مطالعه افراد نداشتن سابقه فردی یا خانوادگی بیماری های اتوایمیون مثل لوپوس اریتماتوزو... و عدم وجودسابقه 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 برموارد 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

سفید خون با استفاده از کلروفرم و کیت استخراج RNA (GeneAll Hybrid-R^{TM} Blood RNA) استخراج شد. سنتز cDNA: در این مرحله ازRNA 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 تیوپ داخل دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf , Germany) قرار داده شد تا cDNA سنتز شود.

Real Time-PCR: سنجش بیان ژن مورد نظر با استفاده از Applied BiosystemsTagManR Universal PCR Master Mix (امریکا) به روش quantitative Real-Time PCR انجام شد. دستگاه مورد استفاده Corbett Rotor Gene-6000 (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 دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه واتصال پرایمرها/طویل سازی در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه. طراحی پرایمر و پروب برای ژن هدف و ژن های خانه دار (کنترل داخلی) باکمک نرم افزارAlleleIDv.7.82 انجام شد، که پرایمر به صورتExon-Exon junction طراحی شد. توالی پروب ها و پرایمر های مورد استفاده وطول محصول در این مطالعه در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱.توالی پروب ها و پرایمر های مربوط به ژن های HPRT1 و TIMP1دراین مطالعه(′3→′5)

نام ژن	HPRT1	TIMP1
پرایمر Forward	AGCCTAAGATGAGAGTTC	CTGCGGATACTTCCACAGGTC
پرایمر Reverse	CACAGAACTAGAACATTGATA	GCAAGAGTCCATCCTGCAGTT
پروب	Fam-CATCTGGAGTCCTATTGACATCGC-Tamra	FAM-CACAACCGCAGCGAGGAGTTTCTC-TAMRA
طول محصول	۸۸زوج باز	۸۲زوج باز

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 TIMP1درگروه های مورد مطالعه استفاده شد.

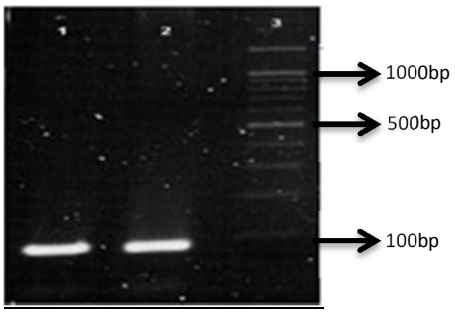
یافته ها

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)۱۱نفر مرد بودند. در ضمن ۲۵ نفر از گروه کنترل شامل ۱۵ نفر زن (۶۰ درصد) و(۴۰ درصد)۱۰نفر مرد بودند. دوگروه از نظر توزیع جنسیتی مطابق آزمون نسبیت در تطابق بودند. این تحقیق در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی دارای تائیدیه به شماره ۱۳۳۳۴-۹۱-۱-۱۳۹۳ می باشد.

جدول۲. اطلاعات کلینیکی و پاراکلینیکی بیماران MS

متغیرها (میانگین± انحراف معیار)	بیماران MS
سن شروع بیماری	۲۶/۱±۱/۹
مدت بیماری	۵/۲± ۲/۶
EDSS	۲/۶ ± ۱/۵
سابقه فامیلی بیماری	۰

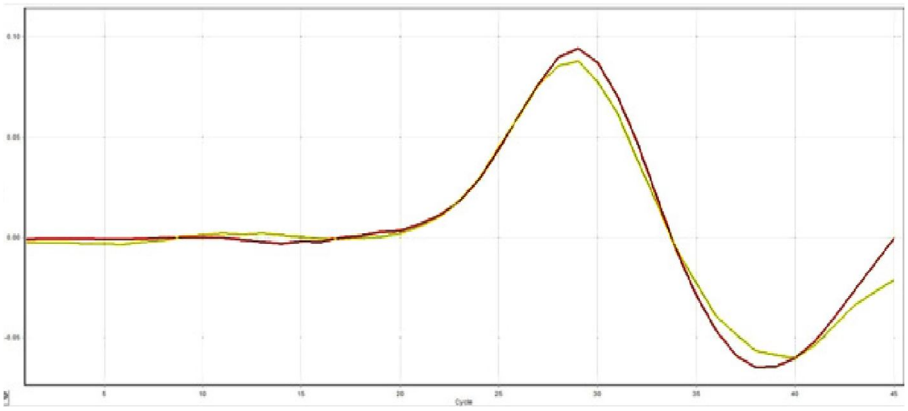
نتایج استخراج RNA: استخراج RNA ازنمونه-های بیمار و سالم انجام گردید، سپس غلظت و خلوص RNA به وسیله دستگاه بیوفوتومتر تعیین شد. غلظت RNA درحدود ۲۵۰ µg/ml و ۲۶۰/۲۸۰ OD بین ۱/۸ تا ۲ بودکه نشان دهنده ی کیفیت مطلوب RNA بود. جهت تعیین کیفیت cDNA ساخته شده واکنش PCR انجام شد و با الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد باندهای مورد نظر مربوط به محصولات PCR مشاهده گردید که نشان گر کیفیت خوب cDNA می باشد(شکل ۱).



شکل۱. نتیجه الکتروفورز محصول PCR مربوط به دو ژن HPRT1 و TIMP1 روی ژل آگارز ۱ درصد به منظور تعیین صحت و کیفیت cDNA ۱-TIMP1(82bp),۲-HPRT1(88bp) ۳- نشان گر با وزن مولکولی(100bp).

نتایج واکنش Real-Time PCR

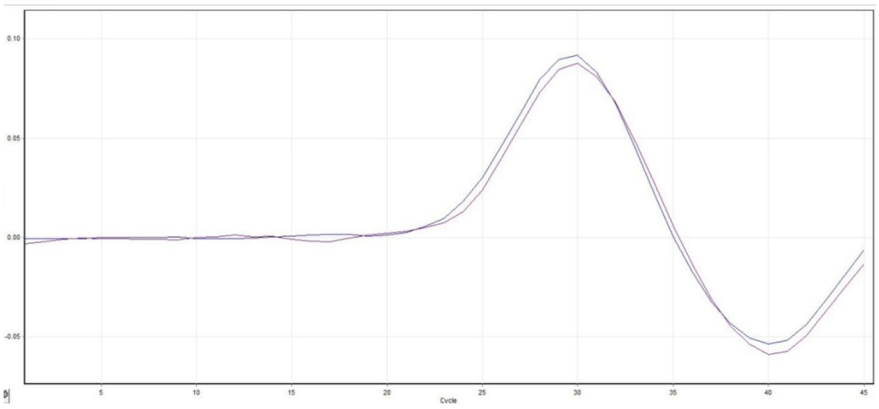
نمودار۱ منحنی تکثیر ژن HPRT1 را نشان می دهد. واکنش به صورت دوتایی انجام شد. CT در این نمونه ۱۶/۵ و ۱۶/۷ بوده وکارایی ژن هدف ۱/۹۱، ۱/۹۲ می‌باشد.



نمودار۱. منحنی تکثیر ژنHPRT1

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 شد. در بین این ژن ها ی رفرنس مورد مطالعه ژن HPRT1 به عنوان بهترین ژن در نظر گرفته شد.

نمودار۲ منحنی تکثیرژن TIMP1را نشان می دهد. واکنش به صورت دوتایی انجام شد.CT در این نمونه ۲۳/۹ و ۲۴ بوده وکارایی ژن هدف ۱/۹۶ و ۱/۹۷ می‌باشد.



نمودار۲. منحنی تکثیر ژنTIMP1

تحلیل داده‌ها به وسیله نرم افزار REST در مقایسه دوگروه بیماران MS و شاهد سالم: ژنTIMP1یا همان ژن Target مطابق جدول ۳ کاهش بیان به میزان ۸/. را نشان می دهد که این کاهش بیان بعد از تعیین ارزش p که به میزان۱/. به دست آمد، معنی دار نمی‌باشد.

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 شدندکه نتایج درجدول ۳ آمده است.

جدول۳: مقایسه بیان ژن TIMP1در گروه بیماران MS و شاهد

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

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 سفیدCNS وتخریب سد خونی_مغزی (BBB) می‌باشد. ماتریکس متالوپروتئینازهادر تخریب BBBو مهاجرت سلول ایمنی در MSنقش دارند. تمامیت ماتریکس خارج سلولی با تعادل دینامیک بین سنتز وپروتئولیزاجزایشان حفظ می شودکه این امر به طور عمده توسط MMPs و مهارکننده های آن ها انجام می شود (۷).MMPsآنزیم های شناخته شده ای هستندکه اجزای ماتریکس خارج سلولی مثل کلاژن ، الاستین، فیبرونکتین و لامینین را تجزیه می کنند. درشرایط 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 MMPsبوده که توسط سیتوکاین ها و هورمون ها القا می شود. مشاهدات مختلف نشان داده که افزایش سطح MMPs همراه با کاهش سطحTIMP-1 در از دست دادن تمامیت سد خونی_مغزی از طریق ترویج پروتئولیز ماتریکس خارج

سلولی اندوتلیال مغزی در MS نقش دارد(۱۰). باتوجه به توضیحات فوق ونقش TIMPsدر تنظیم فعالیتMMPs مطالعه بیان این ژن ها در بیماران ایرانی می تواند حایز اهمیت باشد، چون علاوه بر عوامل محیطی، ژنتیک نیزدر این بیماری دخیل است (۱۲،۱۱) 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 منفی بوده و به اینتر فرون بتا با سطح طبیعی ویتامین D پاسخگوبودند(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، پروب‌های طراحی شده برای تکنیک Real-Time PCR می‌توانند همه واریانت های ژن را در برگیرند و این نکته نیز بسیار حایز اهمیت است تا همه واریانت ها در صورتی که در پاتوژنز 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=۰/۱). لیچتینگ هاگن و همکاران در سال ۱۹۹۹ با مطالعه بیان ماتریکس متالوپروتئیناز۹ و مهارکننده های بافتی آن در سلول های خونی تک هسته ای از بیماران مبتلا به MS نشان دادند که هیچ تغییرمعنی داری در بیان mRNA ژن TIMP-1مشاهده نشد. در این مطالعه میانگین نسبت TIMP-1/ MMP-9 دربیماران MS فعال درمقایسه 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 مونتوجو و همکاران در سال ۲۰۱۰با 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 آنTIMP-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 TبهCNS نقش دارند(۹). ازیافته های ترنتینی و همکاران در سال ۲۰۱۵ به نظر می رسد کهMMP-9 مقاوم به TIMP-1 ایزوفرم فعال دخیل درفعالیت بیماری MSباشد (۱۵). هم چنین نتایج مطالعه یزدان دوست همدانی و همکاران در سال ۲۰۱۶ حاکی از افزایش معنی دار بیان ژن MMP-9در بیماران RR-MS نسبت به افراد سالم بود (۸). کارابوداک و همکاران در سال۲۰۰۴ با مطالعه اثر IFN-β1a روی MMP-9 و TIMP-1در بیماران RRMS طی یک دوره یک ساله نشان دادند که سطح MMP-9 تغییر معنی داری نداشت، در حالی که سطحTIMP-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 وپرینز در سال ۱۹۹۴ و هارتونگ در سال ۱۹۹۷ براین باور بودند که نشت سد خونی مغزی کانونی و به دنبال آن نشت سلول های ایمنی به درون مغز از مراحل اولیه ی پاتوژنز 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

کنترل بدون بیماری عصبی مقایسه کردند. بیان mRNAی MMP7 و9 اما نه سایر متالوپروتئینازها [MMP-2و 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 (اینترلوکین)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 TIMP1در بیماران MS نسبت به افراد سالم کنترل می باشد. اما برای نتیجه گیری قطعی نیاز به مطالعات وسیع تربا حجم نمونه بیشتر و مقایسه RNA ژن TIMP-1در 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 ازکلیه کسانی که در انجام این پژوهش همکاری صمیمانه داشته اند سپاس-گزاری 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. Ebrahem 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 courseof experimental allergic encephalomyelitis. The American journal of pathology 2010; 177(2): 840-853.
4. Lindberg RL.P, De Groot CJ.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

E.Effect of interferon β-1a on serum matrixmetalloproteinase–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-β1b. 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.