Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2017; 20(123): 53-61

The Association of VEGF +405 C/G Polymorphism with *In vitro* Fertilization and Embryo Transfer Outcome (IVF-ET) in Iranian Population

Sara Alidadiani[1], Zivar Salehi[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: 20 May 2017, Accepted: 26 Jul 2017

Abstract

Background: Implantation of an embryo involves a complex sequence of signaling events, consisting of a large number of molecular mediators such as ovarian hormones, cytokines, adhesion molecules and growth factors. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an important angiogenic factor. VEGF is believed to play an important role in the process of implantation. The aim of this study was to evaluate the association of VEGF +405C/G polymorphism and the clinical outcomes of women who underwent IVF-ET procedures.

Materials and Methods: One hundred women with previous IVF-ET failures and 100 pregnant women as controls were genotyped for VEGF +405 C/G by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Statistical analysis was performed using the MedCalc software.

Results: Our results indicated a higher prevalence of the VEGF +405 GG genotype and G allele in patients with history of IVF-ET failure (OR=6.90; 95%CI=2.75-17.29; $p<0.0001$, OR=2.5; 95%CI=1.66-3.76, $p<0.0001$).

Conclusion: The present study revealed that the VEGF +405 GG genotype was associated with an increased risk of IVF-ET failure. However, further studies in larger populations including other genetic factors are required to achieve a definitive conclusion.

Keywords: IVF, Polymorphism, VEGF

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

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۲۰، شماره ۶ (شماره پیاپی ۱۲۳)، شهریور ۱۳۹۶، ۶۱-۵۳

پیوستگی پلی‌مورفیسم C/G ۴۰۵+ ژن VEGF با نتیجه‌ی لقاح مصنوعی و انتقال جنین در جمعیت ایران

سارا علیدادیانی[۱]، زیور صالحی[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: ۹۶/۲/۳۰، تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۴

چکیده

زمینه و هدف: لانه‌گزینی از یک جنین شامل یک توالی پیچیده از حوادث سیگنالینگ، متشکل از تعداد زیادی واسطه‌های مولکولی مانند هورمون‌های تخمدان، سایتوکاین‌ها، مولکول‌های چسبنده و فاکتورهای رشد است. فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) یک عامل مهم رگ‌زایی است. اعتقاد بر این است که VEGF نقش مهمی در روند لانه‌گزینی ایفا می‌کند. هدف از این مطالعه، بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم C/G ۴۰۵+ VEGF و نتایج بالینی از زنانی بود که تحت روش لقاح مصنوعی و انتقال جنین قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها: یکصد زن با شکست‌های قبلی لقاح مصنوعی و انتقال جنین و یکصد زن باردار به‌عنوان گروه شاهد برای ژنوتایپ C/G ۴۰۵+ VEGF توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز-پلی‌مورفیسم طول قطعه محدود کننده (PCR-RFLP) مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری به کمک نرم افزار مدکالک انجام شد.

یافته ها: نتایج ما شیوع بالاتری از ژنوتایپ G/G ۴۰۵+ VEGF و آلل G در بیماران با سابقه‌ی شکست لقاح مصنوعی و انتقال جنین را نشان داد (OR =۶/۹۰؛ ۹۵% CI =۲/۷۵–۱۷/۲۹؛ p <۰/۰۰۰۱؛ OR =۲/۵۰؛ ۹۵%CI =۱/۶۶–۳/۷۶؛ p<۰/۰۰۰۱).

نتیجه‌گیری: مطالعه‌ی حاضر نشان داد که ژنوتیپ GG ۴۰۵+ VEGF با افزایش خطر نارسایی لقاح مصنوعی و انتقال جنین همراه بود. با این وجود، مطالعات بیشتر در جمعیت‌های بزرگ تر از جمله دیگر عوامل ژنتیکی مورد نیاز برای رسیدن به یک نتیجه‌گیری قطعی است.

واژگان کلیدی: لقاح مصنوعی، پلی‌مورفیسم، VEGF

***نویسنده مسئول:** ایران، رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

Email: geneticzs@yahoo.co.uk

مقدمه

ناباروری، ناتوانی زوج در آبستنی (صرف نظر از علل آن) پس از یک سال رابطه جنسی بدون استفاده از روش‌های پیش گیری گفته می‌شود (۱). بر اساس مطالعات اپیدمیولوژیک تخمین زده می‌شود که حدود ۳۰-۴۰ درصد ناباروری مربوط به عوامل مردانه و حدود ۴۰-۵۰ درصد به عوامل زنانه مربوط است و در حدود ۱۰ درصد موارد ناشی از علل ناشناخته در هر دو جنس می‌باشد (۲). ابتلا به ناباروری می‌تواند موجب مشکلات روحی، اجتماعی و اقتصادی در افراد نابارور و اجتماع شود؛ در سرتاسر جهان سالانه حدود ۸۰-۶۰ میلیون نفر دچار مشکلات ناباروری می‌شوند (۳) شیوع ناباروری در ایران ۱۷/۳ درصد است، که این میزان بالاتر از روند جهانی ناباروری می‌باشد (۴). اختلالات تخمک‌گذاری، بیماری های تخمدان و لوله‌های رحمی، آندومتریوز، اختلالات کروموزومی و ناباروری ایدیوپاتیک از شایع ترین علل ناباروری می باشند (۵). با توجه به علل ناباروری، روش‌های درمانی مختلفی برای آن وجود دارد که از آنجمله می‌توان به درمان‌های دارویی، جراحی و روش‌های کمک باروری اشاره نمود. لقاح مصنوعی یا IVF یکی از مهم‌ترین و اساسی‌ترین روش‌های کمک باروری می‌باشد که امروزه به طور گسترده در تمام دنیا برای کمک به باردار شدن زوج‌های نابارور به‌کار می‌رود(۶). عدم موفقیت در لقاح مصنوعی می‌تواند ناشی از پاسخ ضعیف به تحریک تخمدان، عدم موفقیت در لقاح، اختلال در انتقال جنین و عدم موفقیت در لانه‌گزینی جنین باشد (۷). فاکتورهای مختلفی مانند شیوه‌ی زندگی، عادات فردی، چاقی، استرس، مصرف دخانیات و سن مادر می‌توانند در نتیجه‌ی لقاح مصنوعی تاثیرگذار باشند (۸). بنابراین لانه‌گزینی موفق جنین به تکثیر تروفوبلاست، مهاجرت و در نتیجه تهاجم به آندومتر بستگی دارد. فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)، مهم ترین فاکتور رگزایی در تهاجم به آندومتراست (۹).

VEGF، در وسکولوژنز (ایجاد رگ‌های خونی جنینی)، لنف آنژیوژنز (ایجاد سیستم لنفاوی) و آنژیوژنز (شکل گیری رگ‌های خونی جدید از رگ‌های موجود) نقش دارد (۱۰). این فاکتور، یک پروتئین همودیمر باند شونده به هپارین با وزن مولکولی ۴۵ کیلو دالتون است که توانایی فعالیت آنژیوژنیک را در شرایط درون سلولی و برون سلولی دارد (۱۱).VEGF ، دارای ۷ عضو به نامهای ,VEGF-F VEGF-E, VEGF-D, VEGF-C, VEGF-B, VEGF-A و فاکتور رشد جفتی PIGF است. VEGF-A مهم‌ترین عضو این خانواده است و اعمال VEGF به آن نسبت داده می‌شود. بیان بیش از حد این آن، اثرات آنژیوژنیک قدرتمندی را در بافت‌های مختلف ایجاد می‌کند و هم چنین سبب افزایش نفوذ پذیری و گشاد شدن عروق می‌گردد (۱۲). عوامل مختلفی بر میزان تولید VEGF موثر می باشند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به هایپوکسی، انقباض و کشش عضله، کاهش غلظت گلوکز خون و انواع سایتوکاین‌ها اشاره نمود (۱۳،۱۴). VEGF از طریق گیرنده‌های تیروزین کینازی ,VEGFR-1 (flt-1) VEGFR-2 (flk-1/KDR), VEGFR-3 (flt-4) و نوروپیلین‌ها باعث رشد، تکثیر، زنده ماندن و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال و افزایش نفوذ پذیری عروق می‌شود (۱۵). پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی ژن VEGF که در ناحیه راه انداز یا UTR واقع شده اند می توانند بر میزان بیان VEGF موثر باشند. پلی‌مورفیسم C/G 405+ یا rs2010963 در ژنVEGF در ناحیه 5'UTR واقع شده است. مطالعات نشان می دهند که آلل C با کاهش بیان VEGF همراه است (۱۶). تا کنون هیچ مطالعه ای در خصوص اهمیت تغییرات تک نوکلئوتیدی VEGF در موفقیت بارداری پس از IVF صورت نگرفته است. با توجه به اهمیت VEGF در لانه گزینی رویان، این مطالعه با هدف بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم C/G ۴۰۵+ ژن VEGF با نتیجه‌ی لقاح مصنوعی و انتقال جنین صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه مورد- شاهدی در طی ۱۵ ماه و از تیر ۱۳۹۴ تا مهر ۱۳۹۵ انجام شد. ۲۰۰ زن مورد بررسی قرار گرفتند. این افراد، بنا به تشخیص پزشک معالج از روش IVF برای درمان ناباروری خود استفاده کردند. افراد مورد بررسی در دو گروه قرار داده شدند. گروه اول شامل ۱۰۰ زن که پس از استفاده از این روش موفق به بارداری شدند تحت عنوان +IVF، گروه دوم شامل ۱۰۰ زن بود که موفق به بارداری نشدند تحت عنوان -IVF. در این تحقیق گروه +IVF به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. تمامی افراد قبل از انجام IVF، از نظر وضعیت هورمون‌های FSH، LH و استروژن مورد ارزیابی قرار گرفتند. معیارهای خروج از مطالعه شامل سابقه شیمی درمانی، جراحی تخمدان، کاریوتیپ غیر طبیعی و بیماری ژنتیکی شناخته شده، اندومتریوز و تخمدان پلی کیستیک بودند. کلیه افراد قبل از ورود به مطالعه، فرم رضایت نامه تدوین شده را امضا نمودند. میانگین سنی در دو گروه زنان +IVF و -IVF بین ۴۵-۳۰ سال بود. از افراد مورد مطالعه، ۲ میلی‌لیتر خون محیطی برای بررسی ژنتیک و استخراج DNA استفاده شد. نمونه‌ها در لوله‌های استریل حاوی EDTA قرار گرفتند. استخراج DNA با کیت Gpp Solution (شرکت ژن پژوهان، ایران) و براساس پروتکل مربوطه صورت گرفت. کیفیت باندهای حاصل از DNA استخراج شده توسط الکتروفورز آگارز بررسی شد. تعیین ژنوتیپ‌ها به کمک تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز- پلی‌مورفیسم طولی قطعه محدود (PCR-RFLP) صورت گرفت. به منظور تکثیر ژن VEGF از یک جفت پرایمر اختصاصی استفاده گردید (شرکت Generay، چین). خصوصیات پرایمرها به همراه ویژگی آنزیم مورد نیاز در جدول ۱ آورده شده است.

جدول۱. پرایمرها و آنزیم به کارگرفته شده برای تعیین ژنوتیپ C/G ٤٠٥+ VEGF

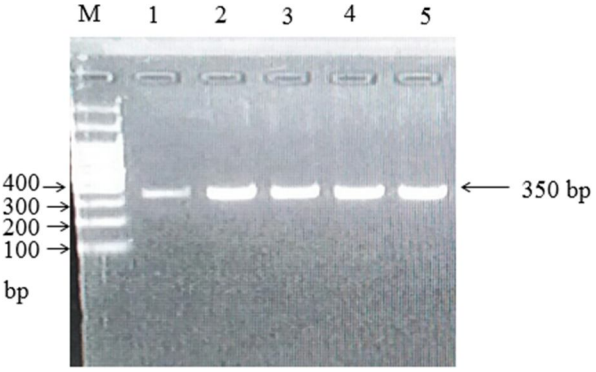
آنزیم محدود کننده	آنیلینگ	پرایمر	گونه NCBI SNP Cluster ID
(BSMFI), 37°C, 4h	53°C, 45 Sec	F: 5′AGCTCCAGAGAGAAGTCGAG3′ R: 5′GAACAGCCCAGAAGTTGGAC3′	C/G+۴۰۵ (rs 2010963)

برنامه PCR با واسرشت سازی اولیه ۵ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۳۵ سیکل با برنامه ۹۴°C (۴۵ ثانیه)، ۵۳°C (۴۵ ثانیه)، ۷۲°C (۴۵ ثانیه) و در نهایت به مدت ۵ دقیقه در ۷۲°C در دستگاه ترموسایکلر (محصول شرکت BioRad) تنظیم شد. طی فرآیند PCR قطعه‌ای به طول ۳۵۰ جفت باز حاوی ناحیه‌ی پلی‌مورفیک ژن VEGF تکثیر می‌شود. در مرحله‌ی بعد محصول PCR تحت تاثیر هضم آنزیمی با آنزیم محدود کننده FaqI (BsmFI) (شرکت فرمنتاز، آمریکا) قرار گرفت. جهت شناسایی محصولات حاصل از RFLP، از ژل آگارز ۲ درصد استفاده گردید. در افراد هموزیگوت CC به علت عدم حضور جایگاه شناسایی، قطعه‌ی ۳۵۰ جفت بازی حاصل از PCR بدون برش باقی خواهند ماند. در افراد هموزیگوت GG، به علت حضور جایگاه شناسایی آنزیم *FaqI* (*BsmFI*)، دو باند به طول ۸۵ و ۲۶۵ جفت باز ایجاد خواهد شد. بدیهی است که در افراد هتروزیگوت GC سه باند ۸۵، ۲۶۵ و ۳۵۰ جفت بازی دیده خواهد شد. در این تحقیق، جهت محاسبه قدرت آماری از نرم‌افزار OpenEpi (www.OpenEpi.com) استفاده شد؛ قدرت مطالعه ۸۰ درصد برآورد شد و هم چنین آزمون‌های آماری کای مربع ($\chi 2$) و نسبت شانس (OR) با استفاده از نرم‌افزار مدکالک (نسخه ۱۲.۱.۴.۰) انجام گرفت و هم‌چنین

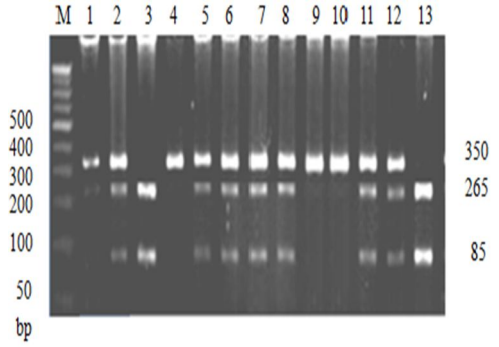
پارامترهایی مانند p و بازه اطمینان نیز تعیین شد. مقدار p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

پس از استخراج DNA ژنومی از نمونه خون تمامی افراد مورد مطالعه، تعیین ژنوتیپ به روش PCR-RFLP انجام شد. به دنبال هضم قطعه ۳۵۰ جفت بازی، بررسی آلل ها و در نهایت تعیین ژنوتیپ نمونه ها انجام شد. شکل ۱و۲ به ترتیب تصاویر حاصل از PCR و واکنش RFLP را نشان می‌دهند. از ۱۰۰ نفر با سابقه شکست لقاح مصنوعی (IVF^-) در این تحقیق، ۹ نفر (۹ درصد) ژنوتیپ هموزیگوت CC، ۴۵ نفر (۴۵ درصد) ژنوتیپ هتروزیگوت CG و ۴۶ نفر (۴۶ درصد) ژنوتیپ هموزیگوت GG بودند. در ۱۰۰ فرد IVF^+، ۲۷ نفر(۲۷ درصد) دارای ژنوتیپ CC، ۵۳ نفر (۵۳ درصد) دارای ژنوتیپ CG و ۲۰ نفر (۲۰ درصد) دارای ژنوتیپ GG بودند. جهت بررسی تفاوت فراوانی ژنوتیپی بین گروه کنترل و بیمار از آزمون مربع کای استفاده شد. مقدار آن با سطح معنی‌دار $p<$ ۰/۰۰۰۱ برابر با ۱۹/۸۹ به دست آمد. بنابراین از آن جا که مقدار p کمتر از ۰/۰۵ می‌باشد، تفاوت معنی‌داری در توزیع ژنوتیپی پلی‌مورفیسم C/G ۴۰۵+ در دو گروه بیمار و کنترل مشهود بود. با بهره‌گیری از آزمون OR، مشخص شد که ژنوتیپ‌های GG و GC به ترتیب به میزان ۶/۹ و ۲/۵۴ خطر شکست IVF را افزایش می‌دهند. آنالیز ترکیبی این دو ژنوتیپ نشان می دهد که وجود حداقل یک آلل G، می‌تواند خطر شکست IVF را افزایش دهد (OR =۳/۷۳، ۸/۴۴– =95%CI ۱/۶۵، $p<$ ۰/۰۰۱۵). در افراد کنترل و افراد IVF منفی تعداد آلل C به‌ترتیب ۱۰۷ و ۶۳ و فراوانی آلل G به ترتیب ۹۳ و ۱۳۷ بود. تفاوت توزیع آللی در دو گروه برابر x^2 =۱۸/۹۱ بود و سطح معنی‌داری برابر با $p<$۰/۰۰۰۱ محاسبه گردید. بنابراین تفاوت معنی‌داری در فراوانی آللی بین دو گروه مورد بررسی، نیز دیده شد(جدول ۲).



شکل۱. بررسی محصولات PCR پلی‌مورفیسم C/G ٤٠٥+ در ژن VEGF بر روی ژل آگارز ۲ درصد. M: مارکرbp۱۰۰ می باشد. نمونه های ۱-۵ محصول PCR ژن VEGF. فلش محل قطعه تکثیر شده را نشان می‌دهد.



شکل ۲. بررسی اثر هضم آنزیمی توسط آنزیم (*FaqI (BsmFI* بر روی محصولات PCR قطعه مورد نظر ژن VEGF روی ژل آگارز۲ درصد. ستون اول (M)، مارکر با وزن مولکولی bp ۱۰۰ را نشان می‌دهد. با توجه به باندهای مشاهده شده در تصویر می‌توان ژنوتیپ هر یک از نمونه‌ها را تعیین کرد. شماره‌های ٤، ۹ و ۱۰: فرد هموزیگوت CC و شماره‌های: ۱، ۲، ۵، ٦، ۷، ۸، ۱۱ و ۱۲: فرد هتروزیگوت GC و شماره‌های ۳ و ۱۳: فرد هموزیگوت GG را نشان می‌دهند.

جدول ۲. فراوانی ژنوتیپی و آللی پلی‌مورفیسم C/G ٤٠٥+ VEGF بین دو گروه کنترل و بیمار و ارتباط آن با لقاح مصنوعی

ژنوتیپ و آلل	بیماران(IVF^-) تعداد (درصد)	کنترل ها (IVF^+) تعداد (درصد)	فاکتور خطر (٪۹۵ فاصله اطمینان) OR (95%CI)	p
ژنوتیپ				
CC	۹ (۹)	۲۷ (۲۷)	۱/۰۰	–
CG	٤٥ (٤٥)	٥۳ (٥۳)	۲/٥٤ (۱/۰۸ – ٥/۹۷)	p =۰/۰۳۱
GG	٤٦ (٤٦)	۲۰ (۲۰)	٦/۹۰ (۲/۷٥ – ۱۷/۲۹)	p < ۰/۰۰۰۱
GG+CG	۹۱ (۹۱)	۷۳ (۷۳)	۳/۷۳ (۱/٦٥ – ۸/٤٤)	p < ۰/۰۰۱٥
آلل				
آلل C	٦۳ (۰/۳۱)	۱۰۷(۰/٥۳)	۱/۰۰	–
آلل G	۱۳۷(۰/٦۸)	۹۳(۰/٤٦)	۲/٥۰(۱/٦٦ – ۳/۷٦)	p <۰/۰۰۰۱

بحث

در این مطالعه مورد –شاهدی، به بررسی اهمیت پلی‌مورفیسم عملکردی C/G ۴۰۵+ ژن VEGF در شکست IVF-ET در ۱۰۰ نمونه کنترل و ۱۰۰ فرد با شکست IVF-ET پرداخته شد. نتیجه این مطالعه نشان داد که پلی‌مورفیسم مورد نظر با نتیجهIVF-ET در جمعیت مورد بررسی مرتبط می‌باشد. به عبارت دیگر، ژنوتیپ‌های GG و CG در مقایسه با ژنوتیپ CC، با افزایش قابل توجه خطر شکست IVF-ET همراه بود. فراوانی آلل G در گروه IVF منفی در مقایسه با گروه کنترل بالاتر بود و آلل G نسبت به آلل C، بیش از ۵ برابر افزایش خطر شکست IVF-ET را به‌همراه داشت. امروزه عدم موفقیت در لانه‌گزینی بعد از انتقال جنین یکی از مراحل اصلی محدود کننده‌ی روش‌های کمک باروری و لقاح مصنوعی می‌باشد (۱۷). بیش از ۵۰ درصد جنین‌های ناشی از روش‌های کمک باروری پس از انتقال لانه‌گزینی پیدا نمی‌کنند (۷). علل عمده‌ی عدم موفقیت در لقاح مصنوعی می‌تواند به دلایلی مانند نقص جنینی، کاهش پذیرش آندومتر و یا هر دو مرتبط باشد (۱۸). هم چنین به‌دنبال تهاجم بلاستوسیت به آندومتر برای لانه‌گزینی، باید آندومتر را برای تامین خون خود تحریک کند، که این تحریک شامل سیگنالینگ VEGF برای افزایش رگ‌زایی عروق است (۲۰،۱۹). تاکنون مطالعات مختلفی در مورد نقش سایر پلی‌مورفیسم‌های ژن VEGF در شکست مکرر لانه‌گزینی صورت گرفته است. در سال ۲۰۰۸، مطالعه‌ای در خصوص اهمیت پلی‌مورفیسم G/A ۱۱۵۴ - ژن VEGF در شکست مکرر لانه‌گزینی صورت گرفت. نتیجه این تحقیق نشان داد که ژنوتیپ AA جایگاه پلی‌مورفیک G/A ۱۱۵۴- در ژن VEGF، با شکست مکرر لانه‌گزینی همراه بود (۲۱). همچنین، مطالعه ای توسط بودجناه و همکاران در مورد ارتباط پلی‌مورفیسم C/G ۴۰۵+ VEGF و رابطه‌ی آن با شکست مکرر لانه‌گزینی بعد از ICSI صورت گرفت. در مطالعه این محققین، ۴۰ زن با سابقه‌ی شکست مکرر لانه‌گزینی و ۱۳۱ زن سالم به عنوان گروه کنترل بررسی شدند. توزیع ژنوتیپی در این جایگاه ژن VEGF، در زنان با شکست مکرر لانه‌گزینی نسبت به گروه کنترل متفاوت بود (به‌ترتیب ۱۷/۵ درصد و ۵/۳ درصد، p=۰/۰۱). نتایج آنان ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ CC ۴۰۵+ ژن VEGF و شکست مکرر لانه‌گزینی نشان داد (۹). مطالعه‌ی دیگری در سال ۲۰۱۵، توسط جانگ و همکاران در رابطه با واریانت‌های VEGF و شکست مکرر لانه‌گزینی بر جمعیت زنان کره‌ای صورت گرفت. در این

مطالعه ۱۱۹ زن با سابقه‌ی شکست مکرر لانه‌گزینی و ۲۳۶ زن به عنوان گروه کنترل، جهت بررسی اهمیت جایگاه‌های پلی‌مورفیک ژن VEGF شامل rs ۸۳۳۰۶۱ ، rs ۲۵۶۴۸ ، rs ۳۰۲۵۰۲۰ پرداختند. نتایج نشان داد در rs ۸۳۳۰۶۱ آلل C و در rs ۲۵۶۴۸ آلل T به‌طور قابل توجهی با افزایش خطر شکست لانه‌گزینی همراه بودند{ p=۰/۰۵، (۳/۹۰۳-۱/۲۵۴) OR=۲/۲۱۳ و p=۰/۰۹، (۲/۸۳۱-۱/۱۶۱) OR=۱/۸۱۳ } و همچنین ژنوتیپ‌های ترکیبی TC/CT+TT و TC/CT، rs ۲۵۶۴۸ /rs ۸۳۳۰۶۱ و TC+CC/TT rs ۳۰۲۵۰۲۰ /rs ۸۳۳۰۶۱ در افراد مبتلا به شکست مکرر لانه‌گزینی نسبت به گروه کنترل بالاتر بود {به‌ترتیب p=۰/۰۲۵، (۴/۱۵۶-۱/۰۹۲) OR=۲/۱۳۰ و (۴/۱۵۶-۱/۰۹۲) OR=۲/۱۳۰ و p=۰/۰۲۸، (۱۵/۶۲۰-۱/۱۶۳) OR=۴/۲۶}. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که دو جایگاه پلی‌مورفیک مذکور، با افزایش خطر شکست مکرر لانه‌گزینی همراه بودند (۲۲). اهمیت بررسی پلی‌مورفیسم‌های مختلف ژن VEGF با سایر بیماری‌ها نیز مورد ارزیابی واقع شده است. کلای‌نیا و همکاران، در مطالعه‌ای به بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم C/G ۴۰۵+ ژن VEGF با بیماری عروق کرونر در جمعیت ایران بر روی ۳۴۷ فرد بیمار و ۱۷۳ فرد کنترل پرداختند. نتایج نشان داد که جایگاه پلی‌مورفیکC/G ۴۰۵+ VEGF می‌تواند به عنوان یک عامل خطر ژنتیکی برای بیماری عروق کرونر در نظر گرفته شود (۲۳). آلتینکایا و همکاران، در مطالعه‌ای به بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم C/G ۴۰۵+ ژن VEGF با افزایش خطر ابتلا به اندومتریوز در زنان ترکیه بر روی ۹۸ زن بیمار و ۹۴ زن به عنوان گروه کنترل پرداختند. نتایج نشان داد که ژنوتیپ GC ۴۰۵+ VEGF و آلل G ۴۰۵+ ممکن است با خطر ابتلا به اندومتریوز اولیه و مراحل پیشرفته در جمعیت ترکیه در ارتباط باشد (۲۴). هندی و همکاران، در مطالعه‌ای به بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم C/G ۴۰۵+ ژن VEGF و خطر اندومتریوز در زنان تونس بر روی ۱۰۵ زن با بیماری اندومتریوز و ۱۵۰ زن به عنوان گروه کنترل پرداختند. نتایج نشان داد که بین این جایگاه پلی‌مورفیک و خطر اندومتریوز ارتباطی وجود ندارد (۲۵). از علل تفاوت در نتایج حاصل از مطالعات پلی‌مورفیسم‌های ژنی می‌توان به خزانه ژنتیکی متفاوت جمعیت‌های مورد بررسی، اندازه جمعیت مورد بررسی، و حتی تفاوت در روش های مولکولی مورد استفاده در پژوهش‌های مختلف اشاره نمود. با توجه به این که در مطالعه حاضر تنها به بررسی یک جایگاه پلی‌مورفیک ژن VEGF پرداخته شد و جمعیت مورد بررسی به اندازه کافی بزرگ نبود، این موارد می‌تواند از محدودیت‌های این پژوهش باشد. در ضمن نمی‌توان برهم کنش عوامل محیطی و ژن ها را در این مقوله نادیده گرفت.

نتیجه‌گیری

به طورکلی، در این تحقیق، به بررسی ارتباط پلی مورفیسم C/G ۴۰۵+ ژن VEGF با نتیجه IVF-ET در۱۰۰ فرد با سابقه موفقیت و ۱۰۰ فرد با سابقه شکست در IVF-ET با استفاده از روش PCR-RFLP پرداخته شد. نتایج حاصل از این مطالعه همراهی ژنوتیپ GG و آلل G را با خطر شکست IVF پیشنهاد می کند. اگرچه، حصول نتیجه‌ی قطعی نیازمند مطالعات با جامعه‌ی آماری بزرگ تر و سایر جمعیت است.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد سارا علیدادیانی، دانشجوی رشته ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان از حمایت‌های اداره تحصیلات تکمیلی دانشگاه تنکابن و آزمایشگاه تکوین و ژنتیک دانشگاه گیلان، هم‌چنین از تمامی بیماران و افراد سالم شرکت کننده در این تحقیق سپاس‌گزاری می‌نمایند.

منابع

1. Kara E, Simoni M. Genetic screening for infertility : When should it be done ? Middle East Fertil Soc J [Internet]. 2010;15(3):139–45. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.mefs.2010.06.002
2. 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.
3. Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. Singapore Med J. 2009 Apr;50(4):336–47.
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. Homan GF, Davies M, Norman R. The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. Hum Reprod Update. 2007;13(3):209–23.
6. Wang J, Sauer M V. In vitro fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement. Ther Clin Risk Manag. 2006 Dec;2(4):355–64.
7. Sher G, Keskintepe L, Nouriani M, Roussev R, Batzofin J. Expression of sHLA-G in supernatants of individually cultured 46-h embryos: a potentially valuable indicator of "embryo competency" and IVF outcome. Reprod Biomed Online. 2004 Jul;9(1):74–8.
8. Klonoff-Cohen H. Female and male lifestyle habits and IVF: what is known and unknown. Hum Reprod Update. 2005;11(2):179–203.
9. Boudjenah R, Molina-Gomes D, Wainer R, de Mazancourt P, Selva J, Vialard F. The vascular endothelial growth factor (VEGF) +405 G/C polymorphism and its relationship with recurrent implantation failure in women in an IVF programme with ICSI. J Assist Reprod Genet. 2012 Dec;29(12):1415–20.
10. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Endocr Rev. 2004 Aug;25(4):581–611.
11. Martin A, Komada MR, Sane DC. Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. Med Res Rev. 2003 Mar;23(2):117–45.
12. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. Nature. 2011 May;473(7347):298–307.
13. Suhr F, Rosenwick C, Vassiliadis A, Bloch W, Brixius K. Regulation of extracellular matrix compounds involved in angiogenic processes in short- and long-track elite runners. Scand J Med Sci Sports. 2010 Jun;20(3):441–8.
14. Kojda G, Hambrecht R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? Cardiovasc Res. 2005 Aug;67(2):187–97.
15. Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. Blood Cells Mol Dis. 2007;38(3):258–68.
16. Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. Cytokine. 2000 Aug;12(8):1232–5.
17. Ola B, Li T-C. Implantation failure following in-vitro fertilization. Curr Opin Obstet Gynecol. 2006 Aug;18(4):440–5.
18. Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M, Eldar-Geva T. Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. Hum Reprod. 2006 Dec;21(12):3036–43.
19. Torry DS, Leavenworth J, Chang M, Maheshwari V, Groesch K, Ball ER, et al. Angiogenesis in implantation. J Assist Reprod Genet. 2007 Jul;24(7):303–15.
20. Coulam CB, Jeyendran RS. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. Am J Reprod Immunol. 2008 Apr;59(4):301–5.

21. Goodman C, Jeyendran RS, Coulam CB. Vascular endothelial growth factor gene polymorphism and implantation failure. Reprod Biomed Online. 2008 May;16(5):720–3.
22. Jung YW, Kim JO, Rah H, Kim JH, Kim YR, Lee Y, et al. Genetic variants of vascular endothelial growth factor are associated with recurrent implantation failure in Korean women. Reprod Biomed Online. 2016 Feb;32(2):190–6.
23. Kalayi Nia S, Ziaee S, Boroumand MA, Sotudeh Anvari M, Pourgholi L, Jalali A. The impact of vascular endothelial growth factor +405 C/G polymorphism on long-term outcome and severity of coronary artery disease. J Clin Lab Anal. 2016 Oct;
24. Altinkaya SO, Ugur M, Ceylaner G, Ozat M, Gungor T, Ceylaner S. Vascular endothelial growth factor +405 C/G polymorphism is highly associated with an increased risk of endometriosis in Turkish women. Arch Gynecol Obstet. 2011 Feb;283(2):267–72.
25. Henidi B, Kaabachi W, Naouali A, Kaabachi S, Zhioua A, Haj Sassi F, et al. Vascular endothelial growth factor (-460 C/T, +405 G/C, and +936 C/T) polymorphisms and endometriosis risk in Tunisian population. Syst Biol Reprod Med. 2015;61(4):238–44.