

Research Paper

Relationship Between *rs3918242* Polymorphism of Matrix Metalloproteinase-9 Gene and Preeclampsia in Pregnant Women



Mehdi Sahmani^{1,2}, Nilofar Ahmadi^{1,2}, Somayeh Asadian³, Talaat Dabaghi Ghaleh³, *Amir Javadi^{4,5}

1. Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.
2. Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.
3. Department of Obstetrics and Gynecology, Kosar Hospital, School of Medicine, Qazvin University of Medical Science, Qazvin, Iran.
4. Department of Social Science, School of Medicine, Qazvin University of Medical Science, Qazvin, Iran.
5. Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.



Citation Sahmani M, Ahmadi N, Asadian S, Dabaghi Ghaleh T, Javadi A. Relationship between *rs3918242* Polymorphism of Matrix Metalloproteinase-9 Gene and Preeclampsia in Pregnant Women. Journal of Inflammatory Diseases. 2020; 24(5):434-443. <https://doi.org/10.32598/JQUMS.24.5.6>

doi <https://doi.org/10.32598/JQUMS.24.5.6>



Received: 26 Jun 2020

Accepted: 11 Nov 2020

Available Online: 01 Dec 2020

Keywords:

Preeclampsia, *rs3918242* polymorphism, Matrix metalloproteinase 9

ABSTRACT

Background Preeclampsia is a complex disorder of pregnancy with an unknown etiology. Numerous studies have shown the possible role of gene polymorphisms, especially metalloproteinases, in development of this disease, but there are no definitive results.

Objective This study aims to investigate the possible association between *rs3918242* (-1562C>T) polymorphism in Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9) gene with the risk of preeclampsia in pregnant women.

Methods In this cross-sectional study, participants were 90 pregnant women with preeclampsia and 199 healthy pregnant women (controls). The genotypes of *rs3918242* polymorphism were investigated using Polymerase Chain Reaction technique and Limited Fragment Length Polymorphism method. Logistic regression analysis was used to investigate the relationship between *rs3918242* polymorphism and preeclampsia.

Findings The frequency of CC, CT, TT genotypes of *rs3918242* polymorphism was reported 47.8%, 47.8% and 4.2% in patients and 84.8, 13.1 and 2% in controls, respectively, and the difference between groups was significant ($P<0.001$). The frequency of TT genotype in patients was significantly higher than in controls ($P<0.001$). Moreover, the frequency of T allele in patients was 52.2%, while in controls it was 15.2% and the difference between the two groups was significant ($P<0.001$).

Conclusion The *rs3918242* polymorphism of MMP9 gene plays an important role in the incidence of preeclampsia in pregnant women.

Extended Abstract

1. Introduction

Preeclampsia is a complex disorder with a prevalence of 5%-8% in pregnant women [1]. The disease is associated with hypertension, proteinuria, edema, clotting disorders in arteries, and

dysfunction of endothelial cells [1]. These disorders mostly occur after the first week of pregnancy, although in the second half of pregnancy, during and after delivery it may also be observed. The etiology of this disease is unknown. Some studies have reported the role of genetic factors in the incidence of preeclampsia, especially the genes involved in oxidative stress, angiogenesis, connective tissue disorders and coagulation system [2, 3].

*** Corresponding Author:**

Amir Javadi, PhD.

Address: Department of Social Science, School of Medicine, Qazvin University of Medical Science, Qazvin, Iran.

Tel: +98 (28) 33336001

E-Mail: javadi_a@yahoo.com

Studies have shown that matrix Metalloproteinases (MMPs) are involved in the development of some chronic connective tissue, cardiovascular, pulmonary, and autoimmune diseases [4-6]. These enzymes damage endothelial cells by destroying connective tissue components [7, 8]. MMP9 is a member of the MMP family, located on the long arm of chromosome number 20 (20q13.12), and is active in the reconstruction of placenta and uterine arteries. Functional -1562C>T polymorphism in the promoter region of MMP9 gene (*rs3918242*) is associated with high transcriptional activity and increased enzyme levels in tissue and biological fluid [9, 10]. In some studies, an association between *rs3918242* polymorphism and increased incidence of preeclampsia have been reported, while in other studies, no association has been found between them [14, 15, 17]. Considering the contradictory results, this study aims to evaluate the frequency of *rs3918242* polymorphism and its relationship with preeclampsia in pregnant women.

2. Materials and Methods

This case-control study was conducted on 100 pregnant women with preeclampsia (case group) and 100 healthy pregnant women (control group). Samples were recruited from the fertility center of Kowsar Hospital in Qazvin, Iran. The criteria for Preeclampsia was a systolic blood pressure >140 mmHg and/or a diastolic blood pressure >90 mmHg on two occasions >6 hours apart after 20 weeks of gestation but before the onset of labour, plus a proteinuria >2+ (on dipstick test) or >0.3 g/24. Exclusion criteria were: Multiple pregnancies, and a history of hypertension, cardiovascular disease, diabetes, kidney, liver and infectious diseases. Blood samples for molecular genetic assessments were collected in tubes containing EDTA as anticoagulant, and their DNAs were extracted from human leukocyte nuclei isolated from whole blood, and the target DNA was then amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) method. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) assays were designed for the identified polymorphisms. The PCR was performed by the forward primer (-5'-GCCTGGCACATAGTAGGCC-3') and reverse primer (-5'-CTTCCTAGCCAGCCGGC-3'). PCR product was digested with SphI restriction enzyme. Restriction fragments were visualized on 2% agarose gel stained with ethidium bromide. Data analysis was performed only on the data with no missing values (90 with preeclampsia and 99 healthy peers).

3. Results

The frequency of CC, CT and TT genotypes were 84.8%, 13.1% and 2% in the control group and 47.8%, 47.8% and 4.2% in the case group, respectively. The risk of develop-

ing preeclampsia in women with CT genotype was 6.2 times higher than in women with CC genotype ($P<0.001$). Although there was no statistically significant relationship between the frequency of TT and CC genotypes and the incidence of preeclampsia, the risk of developing preeclampsia in women with TT genotype was 4.3 times higher than in women with CC genotype.

4. Discussion and Conclusion

In this study, was investigated the association of *rs3918242* polymorphism in the MMP9 gene and the risk of preeclampsia. The results showed that CT genotype and T allele of the polymorphism had association with increased risk of preeclampsia in pregnant women. Single nucleotide polymorphism of the *MMP-9 gene (rs3918242)* regulates the expression of this protein as well as its enzymatic activity by modulating the binding of transcription factors in the promoter region of MMP9 gene [18]. There are conflicting results regarding the association between this polymorphism of the *MMP-9 gene* and preeclampsia. Some studies have reported the association of CC genotype or C allele of *rs3918242* polymorphism with an increased risk of preeclampsia in pregnant women [21, 22], while no such relationship has been found in other studies [17, 21, 23]. Coleman et al. suggested that the frequency of T allele in women with preeclampsia is a factor associated with reduced the risk of preeclampsia [24], which is consistent with our findings. Pali et al. reported a significant relationship between T allele and blood pressure, but its association with preeclampsia in pregnant women was not found [5]. In the study by Leonardo et al., no significant relationship between this polymorphism and preeclampsia was observed.

The frequency of CC, CT and TT genotypes in patients in our study were 78%, 14% and 1%, respectively. Compared to the study by Leonardo et al. [25], the frequency of CC and CT genotype in our patients was lower while the frequency of TT genotype was higher. Meng et al. showed a significant association of *rs3918242* polymorphism with the incidence of preeclampsia [26]. Consistent with our results, Rahimi et al. showed that the presence of TT and CT alleles of *rs3918242* polymorphism is a biomarker of susceptibility to preeclampsia in pregnant women [17]. However, the frequency of TT and CT genotypes in patients was significantly different from those in our study. The discrepancy may be because of difference in ethnicity, race, lifestyle, diet and eating habits. Therefore, in order to investigate the effect of different genes on the incidence of preeclampsia, it is recommended that other factors and the severity of preeclampsia be examined in future studies

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

The present study obtained its ethical approval from the Research Ethics Committee of Qazvin University of Medical Sciences (Code: QUMS.REC.1396.244).

Funding

This study was extracted from MA. thesis of second author approved by Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences.

Authors' contributions

Writing – original draft, and writing – review & editing: Mehdi Sahmani and Amir Javadi; Resources and validation: Nilofar Ahmadi, Somayeh Asadian and Amir Javadi; Methodology and data analysis: Amir Javadi; Editing & review and project administration: Mehdi Sahmani , Talaat Dabaghi Ghaleh

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank the efforts of Ms. Zahra Rashvand, a laboratory expert, during the study.

بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم عملکردی rs 3918242 در ژن متالوپروتئیناز ۹ با ابتلا به پره اکلامپسی در زنان باردار استان قزوین

مهدی سهامانی^{۱،۲}، نیلوفر احمدی^{۱،۲}، سمیه اسدیان^۳، طلعت دباغی قلعه^۴، *امیر جوادی^{۱،۲،۵}

۱. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

۲. گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

۳. گروه زنان و زایمان، بیمارستان کوثر، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

۴. گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

۵. مرکز تحقیقات میکروبی شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

چکیده

زمینه: پره اکلامپسی یک اختلال پیچیده در دوران بارداری با علت ناشناخته است. مطالعات متعددی نقش احتمالی پلی مورفیسم‌های ژنی به خصوص متالوپروتئینازها را در بروز بیماری نشان داده است، ولی نتایج قطعی وجود ندارد.

هدف: از این مطالعه بررسی ارتباط احتمالی پلی مورفیسم rs 3918242 (-1562C>T) در ژن متالوپروتئیناز ۹ با خطر ابتلا به پره اکلامپسی در زنان باردار بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد و شاهدی، نود زن مبتلا به پره اکلامپسی به عنوان گروه مداخله و ۹۹ زن سالم به عنوان گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم rs 3918242 (-1562C>T) در ژن متالوپروتئیناز ۹ با استفاده از تکنیک‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و محدودیت طول قطعات پلی مورفیسم (PCR-RFLP) مورد بررسی قرار گرفتند. از آنالیز رگرسیون لجستیک به منظور بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم ژن متالوپروتئیناز ۹ با شانس ابتلا به بیماری پره اکلامپسی استفاده شد.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپ‌های CC، CT، TT پلی مورفیسم rs 3918242 (-1562C>T) در گروه مداخله به ترتیب ۴۷/۸، ۴۷/۸ و ۴/۲ درصد و در گروه شاهد ۸۴/۸، ۱۳/۱ و ۲ درصد بود که اختلاف معنی‌داری با هم داشتند ($P < 0/001$). فراوانی ژنوتیپ TT در گروه مداخله به طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد بود ($P < 0/001$). همچنین فراوانی آلل T در گروه مداخله ۵۲/۲ درصد و در گروه شاهد ۱۵/۲ درصد بود که اختلاف معنی‌داری بین دو گروه مشاهده شد ($P < 0/001$).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که پلی مورفیسم rs 3918242 (-1562C>T) در ژن متالوپروتئیناز ۹ نقش مهمی را به عنوان یک عامل مستقل در بروز بیماری پره اکلامپسی دارد.

تاریخ دریافت: ۰۶ تیر ۱۳۹۹

تاریخ پذیرش: ۲۱ آبان ۱۳۹۹

تاریخ انتشار: ۱۱ آذر ۱۳۹۹

کلیدواژه‌ها:

پره اکلامپسی، پلی مورفیسم rs 3918242

T-1562C>T)، ژن متالوپروتئیناز ۹

مقدمه

دوم حاملگی و نیز در زمان زایمان و حتی بعد از زایمان (معمولاً در ۲۴ تا ۴۸ ساعت اول بعد از زایمان) ممکن است مشاهده شود [۱]. اتیولوژی این بیماری تاکنون مشخص نشده، ولی در برخی مطالعات نقش عوامل ژنتیکی در بروز پره اکلامپسی به خصوص ژن‌هایی که در استرس اکسیداتیو، رگ‌زایی، اختلالات بافت همبند و سیستم انعقادی نقش دارند، گزارش شده است [۲، ۳].

مطالعات نشان داده که آنزیم‌های ماتریکس متالوپروتئینازها در توسعه و پیشرفت بعضی از بیماری‌ها مثل بیماری‌های قلبی عروقی،

پره اکلامپسی یک اختلال پیچیده است که شیوع آن در بین زنان حامله حدود ۵ تا ۸ درصد بوده و از عوامل اصلی مرگ‌ومیر مادران، جنین و نوزادان در کشورهای در حال توسعه است [۱]. این بیماری با تظاهرات افزایش فشارخون (۱۴۰/۹۰ میلی‌متر جیوه)، پروتئینوری (بیش از ۳۰۰ میلی‌گرم در ادرار ۲۴ ساعته)، ادم، اختلالات انعقادی در عروق و اختلال در عملکرد سلول‌های آندوتلیال همراه است [۱]. این اختلالات در بیشتر موارد بعد از هفته سی و هفتم حاملگی شروع می‌شود، ولی در هر زمانی از نیمه

* نویسنده مسئول:

دکتر امیر جوادی

نشانی: قزوین، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده پزشکی، گروه پزشکی اجتماعی.

تلفن: ۰۱۱۳۳۳۳۶۰۰۱ (۲۸) ۹۸

رایانامه: javadi_a@yahoo.com

1. Matrix Metalloproteinase (MMPs)

پلی‌مورفیسم $1562C>T$ - از ژن *MMP-9* با افزایش بروز پره اکلامپسی در تعدادی از مطالعات گذشته مرتبط بوده است، در حالی که در موارد دیگری از بررسی‌ها هیچ‌گونه ارتباطی بین پلی‌مورفیسم این ژن با بروز بیماری پره اکلامپسی مشاهده نشده است [۱۷، ۱۵، ۱۴] با توجه به نتایج متفاوت در مطالعات گذشته و تأثیر عوامل محیطی در بروز فنوتیپ‌های مختلف و از آنجایی که تاکنون مطالعه‌ای در ارتباط با این بیماری در استان قزوین به عمل نیامده، به نظر می‌رسد بررسی فراوانی پلی‌مورفیسم $1562C>T$ - از ژن *MMP-9* در زنان باردار مبتلا به پره اکلامپسی و مقایسه آن با گروه شاهد در این استان ضروری باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه مورد و شاهدی بر روی صد زن باردار مبتلا به پره اکلامپسی (گروه مداخله) و صد زن باردار سالم (گروه شاهد) انجام شد. حجم نمونه بر اساس نسبت میزان پلی‌مورفیسم دو گروه مورد مطالعه که به ترتیب ۰/۳۸ و ۰/۱۹ برای خطای نوع اول ۰/۰۵ و خطای نوع دوم ۰/۲۰ بود که با احتساب ۱۵ درصد ریزش برای هر گروه صد نمونه برآورد شد. نمونه‌ها از بین زنان مراجعه‌کننده به مرکز آموزشی درمانی کوثر در سال ۱۳۹۷ بر اساس معیارهای ورود و خروج و با استفاده از روش نمونه‌گیری آسان وارد مطالعه شدند. معیار انتخاب بیماران پره اکلامپسی شامل فشار خون سیستولی بیش از ۱۴۰ میلی‌متر جیوه یا فشار خون دیاستولی بیش از ۹۰ میلی‌متر جیوه با دوبرار تکرار با حداقل ۶ ساعت فاصله زمانی و همچنین پروتئینوری بیش از ۰/۳ گرم در ادرار ۲۴ ساعته یا بالای ۲+ در تست نواری ادرار بود. معیارهای خروج از مطالعه شامل حاملگی چندقلویی، سابقه ابتلا به بیماری فشار خون، قلبی عروقی، دیابت، کلیوی، کبدی و بیماری‌های عفونی بود.

جهت آزمایشات مولکولی ۳ سی‌سی خون کامل حاوی ضدانعقاد اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید EDTA از هر یک از داوطلبین شرکت‌کننده در پژوهش گرفته شد و در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمایش نگهداری شد. نمونه DNA با استفاده از کیت (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) ساخت کشور آلمان استخراج شد. برای تعیین نوع پلی‌مورفیسم از روش PCR-RFLP استفاده شد. واکنش PCR توسط پرایمرهای زیر انجام گرفت [۱۱]:

Forward-5'-GCCTGGCACATAGTAGGCC-3'

Reverse-5'-CTTCCTAGCCAGCCGGC-3'

شرایط دمایی ترموسیکلر پس از بهینه‌سازی عبارت بود از: دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه جهت دناتوراسیون اولیه، سپس ۲۹ سیکل شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه جهت دناتوراسیون، دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به

بیماری‌های ریوی، بیماری‌های مزمن بافت همبند و بیماری‌های خودایمنی مثل روماتیسم و لوپوس نقش دارند [۶-۴]. این آنزیم‌ها با عمل تخریب اجزای تشکیل‌دهنده بافت همبند مثل کلاژن نوع IV، فیبرونکتین و پروتئوگلیکان‌ها باعث آسیب به سلول‌های آندوتلیال می‌شوند [۸، ۷]. خانواده *MMP* در انسان، خانواده‌ای از آندوپپتیدازهای وابسته به روی (Zn) هستند که دارای حداقل ۲۶ عضو هستند که به دلیل شکسته شدن قسمت انتهایی آمینی خود توسط پروتئازها فعال شده و به صورت موضعی باعث آسیب به کل ماتریکس خارج سلولی در آن ناحیه می‌شوند. همچنین می‌توانند تعدادی از مولکول‌های بیواکتیو از قبیل گیرنده عامل رشد و پروتئین باندشونده به عامل رشد که نقش مهمی در مهار آپوپتوزیس و تمایز سلولی دارند را پردازش کنند [۱۰، ۹]. آنزیم *MMP* نقش عمده‌ای در رفتارهای سلولی مانند تکثیر، مهاجرت، رشد جنینی، تمایز، رگ‌زایی و تولید مثل دارند [۸].

MMP-9 (ژلاتیناز B) یکی از اعضای مهم خانواده *MMP* هاست که در بازسازی جفت و شریان‌های رحمی فعالیت دارد. ژن *MMP-9* روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۲۰ (20q13.12) قرار دارد. پلی‌مورفیسم عملکردی $1562C>T$ - از ژن *MMP-9* در ناحیه پروموتوری با فعالیت بالای رونویسی ژن و افزایش سطح آنزیم در بافت‌ها و مایع بیولوژیکی در ارتباط است [۱۰، ۹]. این پلی‌مورفیسم در اصل یک تغییر تک‌نوکلئوتیدی سیتوزین با تیمین در ناحیه AP-12 در ناحیه تنظیمی است که این جابه‌جایی معمولاً باعث افزایش بیان این آنزیم می‌شود [۱۱].

مطالعه ونگ^۳ و همکاران (۲۰۱۳) و راستری جینا^۴ و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که کاهش سطح بیان ژن *MMP-9* باعث اختلال در تنظیم مهاجرت و تهاجم سلول‌های تروفوبلاست جنینی شده و می‌تواند در پاتولوژی بیماری پره اکلامپسی نقش داشته باشد [۱۳، ۱۲]. علاوه بر آن مطالعه لاک وود^۵ و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد افزایش بیان ژن *MMP-9* در بافت آندومتریم دوران حاملگی در توسعه پره اکلامپسی نقش دارد [۱۴]. در حالی که در مطالعات مکیردی و مارکز^۶ (۲۰۱۲) نشان داده شده که افزایش بیان *MMP-9* در مراحل اولیه حاملگی وجود دارد، ولی ارتباط معنی‌داری در افزایش بیان این پروتئین با خطر پره اکلامپسی در زنان باردار وجود ندارد [۱۵]. هائو فنگ^۷ و همکاران (۲۰۱۶) طی مطالعات خود در چین به این نتیجه رسیدند که *MMP-9* و *MMP-2* به‌تنهایی در افزایش ابتلا به پره اکلامپسی نقش ندارند، بلکه افزایش نسبت *MMP-9* / *MMP-2* خطر ابتلا به این بیماری را زیاد می‌کند [۱۶].

2. Activated Protein 1
3. Wang
4. Rastrigina
5. Lockwood
6. Mckirdy and Marks
7. Hao feng

یافته‌ها

مشخصات جمعیت‌شناختی و بالینی افراد مورد مطالعه شامل سن مادر، هفته بارداری، شاخص توده بدن مادر، وزن جنین، فشار خون سیستولی و دیاستولی و همچنین نوع زایمان مادر و دارای فرزند بودن در **جدول شماره ۱** نشان داده شده است. از آنجا که دو گروه مورد مطالعه از نظر سن همسان‌سازی شده بودند میانگین سن مادران در دو گروه اختلاف آماری معنی‌داری نداشت ($P=0/104$). یافته‌ها نشان می‌دهد که متوسط شاخص توده بدن، فشار خون سیستولی و دیاستولی مادر و وزن جنین دو گروه مداخله و شاهد با یکدیگر اختلاف آماری معنی‌داری دارد ($P<0/001$). همچنین بین نوع زایمان مادران و گروه مداخله مطالعه ارتباط آماری معنی‌داری وجود دارد ($P=0/027$).

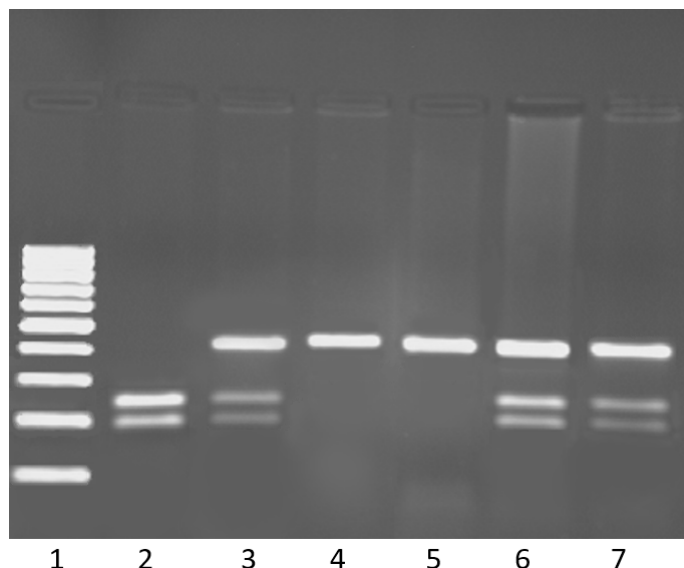
جدول شماره ۲ فراوانی ژنوتیپی و آلی پلی‌مورفیسم $1562C>T$ - $MMP-9$ را به تفکیک دو گروه نشان می‌دهد. در گروه شاهد میزان فراوانی ژنوتیپ CC برابر ۸۴/۸ درصد، CT برابر ۱۳/۱ درصد و TT برابر ۲ درصد بود و در گروه مداخله فراوانی ژنوتیپ CC برابر ۴۷/۸ درصد، CT برابر ۴۷/۸ درصد و TT برابر ۴/۲ درصد بود؛ به طوری که شانس ابتلا به پره اکلامپسی در زنان با ژنوتیپ CT به میزان ۶/۱ برابر بیشتر از زنان با ژنوتیپ CC بود ($P<0/001$). علی‌رغم آنکه ارتباط آماری معنی‌داری بین ژنوتیپ TT و CC با دو گروه مورد مطالعه، وجود نداشت ولی شانس ابتلا به پره اکلامپسی ۴/۳ برابر نسبت به ژنوتیپ CC بیشتر بود.

مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال پرایمرها و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه جهت طویل‌سازی و در نهایت دمای نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه جهت گسترش نهایی. در مرحله بعد، محصول PCR ۴۶۰ جفت بازی تحت اثر آنزیم SphI (تهیه شده از شرکت فرمنتاس کشور آمریکا) قرار گرفت. در اثر فعالیت آنزیم در فرم هموزیگوت CC (قطعه 460bp) هیچ‌گونه بُرش‌ی نداشت. در فرم هتروزیگوت CT (قطعات 258bp، 460bp و 202bp) و در فرم هموزیگوت TT (قطعات 258bp و 202bp) ایجاد شد. قطعات برش‌یافته روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و مشاهده شد (**شکل شماره ۱**).

برای توصیف داده‌ها از میانگین \pm انحراف معیار و جدول فراوانی استفاده شد. نرمالیتی داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف بررسی شد. برای تحلیل داده‌ها از آزمون‌های آماری مجذور کای و تی مستقل استفاده شد. سطح معنی‌داری کمتر از ۵ درصد در نظر گرفته شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ استفاده شد.

از صد بیمار و صد شاهد مورد مطالعه، تجزیه و تحلیل داده‌ها تنها روی داده‌های فاقد مقادیر گمشده^۸ انجام شد. بر این اساس تجزیه و تحلیل داده‌ها روی اطلاعات ۹۰ زن باردار مبتلا به پره اکلامپسی (گروه مداخله) و ۹۹ زن باردار سالم (گروه شاهد) انجام شد. کلیه شرکت‌کنندگان در مطالعه با آگاهی کامل از اهداف پژوهش و پس از تکمیل برگه رضایت‌نامه آگاهانه به صورت داوطلب وارد مطالعه شدند.

8. Missing values



جدول ۱. مقایسه خصوصیات جمعیت‌شناختی و بالینی در دو گروه شاهد و پره اکلامپسی

سطح معنی داری	تعداد (درصد) / میانگین ± انحراف معیار		متغیرها
	مداخله (n=۹۰)	شاهد (n=۹۹)	
۰/۱۰۴	۲۹/۸±۶/۴	۲۸/۴±۵/۹	سن (سال)
<۰/۰۰۰۱	۲۹/۷±۵/۳	۲۶/۴±۴/۴	شاخص توده بدن (Kg/m ²)
۰/۲۸۹	۳۵/۶±۳/۳	۳۶/۲±۳/۹	هفته بارداری
<۰/۰۰۰۱	۱۴۸/۹±۸/۸	۱۱۰/۹±۹/۴	فشار خون سیستولی (میلی‌متر جیوه)
<۰/۰۰۰۱	۱۰۳/۶±۱۴/۷	۷۱/۴±۸/۴	فشار خون دیاستولی (میلی‌متر جیوه)
<۰/۰۰۰۱	۲۶۷۴/۷±۶۶۲/۶	۳۰۹۹/۸±۶۹۷/۵	وزن جنین (گرم)
۰/۹۷۸	۵۲ (۵۷/۸)	۵۷ (۷۵/۵)	دارای فرزند بودن
۰/۰۲۷	۶۴ (۷۱/۲)	۵۵ (۵۵/۶)	سزارین
	۲۶ (۲۸/۸)	۴۴ (۴۴/۴)	واژینال

مجله
بیماری‌های التهابی

جدول ۲. ارتباط بین پروموتور ژن MMP-9 حاصل از پلی‌مورفیسم (C/T) ۱۵۶۲- با استعداد ابتلا به پره اکلامپسی

سطح معنی داری	OR (95 CI)	تعداد (درصد)		ژنوتیپ
		مداخله (n=۹۰)	شاهد (n=۹۹)	
<۰/۰۰۰۱	۱/۱۲ (۱/۰۷-۱/۲۳)			شاخص توده بدن (Kg/m ²)
<۰/۰۰۰۱				ژنوتیپ MMP-9-1562 C/T
	۱	۴۳ (۴۷/۸)	۸۴ (۸۴/۸)	CC
<۰/۰۰۰۱	۶/۱۲ (۲/۸۸-۱۳/۰۰)	۴۳ (۴۷/۸)	۱۳ (۱۳/۱)	CT
۰/۱۶۸	۴/۳۳ (۰/۶۶-۲۸/۵۷)	۴ (۴/۲)	۲ (۲/۰)	TT
-	۱	۸۶ (۹۶/۶)	۹۷ (۹۷/۰)	C
<۰/۰۰۰۱	۳/۵۳ (۱/۸۵-۶/۷۷)	۴۷ (۵۲/۲)	۱۵ (۱۵/۲)	T آلل

مجله
بیماری‌های التهابی

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات قبلی ارتباط بین این پلی‌مورفیسم که یک پلی‌مورفیسم عملکردی از ژن MMP-9 است با بیماری‌هایی از قبیل آندومتريوز، بیماری‌های قلبی عروقی، ملائوما، سرطان پستان و سرطان معده مورد بررسی قرار گرفته است [۱۸-۲۰].

در مورد ارتباط بین این پلی‌مورفیسم از ژن MMP-9 با بیماری پره اکلامپسی نتایج متناقضی وجود دارد. بعضی از مطالعات نشان داده که ژنوتیپ CC یا آلل C از پلی‌مورفیسم T>1562C با افزایش خطر ابتلا به پره اکلامپسی در زنان باردار ارتباط دارد [۲۱، ۲۲]؛ در حالی که در مطالعات دیگر بین آلل C و بیماری پره اکلامپسی در زنان باردار ارتباط معنی‌داری دیده نشده است [۱۷، ۲۱، ۲۳]. در مطالعه کولمن^{۱۰} و همکاران (۲۰۰۷) فراوانی آلل T در زنان دارای پره اکلامپسی پایین بود و به عنوان عامل مرتبط با کاهش خطر پره اکلامپسی پیشنهاد شد [۲۴]. توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های CT، CC و TT در این مطالعه در گروه بیمار تقریباً با یافته‌های مطالعه حاضر هم‌خوانی داشت. در حالی که در مطالعه پالی^{۱۱} و

مطالعات نشان می‌دهد که پلی‌مورفیسم در بعضی از ژن‌ها از قبیل (MMP-2، MMP-7) می‌تواند نقش مهمی در بروز بیماری پره اکلامپسی داشته باشد [۱۴، ۱۷]. از این رو در این مطالعه ارتباط بین پلی‌مورفیسم T>1562C ژن MMP-9 با خطر ابتلا به پره اکلامپسی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که ژنوتیپ CT و آلل T از پلی‌مورفیسم T>1562C ژن MMP-9 با افزایش خطر ابتلا به بیماری پره اکلامپسی در زنان باردار ارتباط دارد. پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی^۹ در موقعیت T>1562C ژن MMP-9 با تعدیل در اتصال عوامل رونویسی در ناحیه پروموتوری ژن MMP-9 باعث تنظیم در بیان این پروتئین و همچنین فعالیت آنزیمی آن می‌شود [۱۸].

جابه‌جایی نوکلئوتید سیتوزین با تیمین در موقعیت ۱۵۶۲- پروموتور ژن، کاهش فعالیت ژنوتیپ C/C و افزایش فعالیت برای ژنوتیپ C/T و T/T را در مرحله رونویسی به همراه دارد. در

10. Coolman
11. Palei

9. Single-Nucleotide Polymorphism (SNP)

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

در این مطالعه اصول اخلاق در پژوهش‌های پزشکی طبق بیانیه هلسینکی و کمیته کشوری اخلاق در پژوهش‌های پزشکی در نظر گرفته شد. این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی با کد IR.QUMS.REC.1396.244 مورد تأیید قرار گرفت.

حامی مالی

مقاله حاضر برگرفته از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی بالینی سرکار خانم نیلوفر احمدی در گروه بیوشیمی بالینی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین است.

مشارکت نویسندگان

نوشتن مقاله: مهدی سهمانی و امیر جوادی؛ منابع و اعتبارسنجی: نیلوفر احمدی، سمیه اسدیان و امیر جوادی؛ روش‌شناسی و تحلیل داده‌ها: امیر جوادی؛ ویرایش و مدیریت پروژه: مهدی سهمانی و طلعت دباغ.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این تحقیق هیچ‌گونه تعارض منافی ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله از کارشناس محترم آزمایشگاه رفرانس، سرکار خانم زهرا رشوند بابت همکاری صمیمانه در پیشبرد مراحل عملی تحقیق تشکر و قدردانی می‌کنند.

همکاران (۲۰۱۲) در کشور برزیل ارتباط معنی‌داری بین آلل T از پلی‌مورفیسم $1506C>T$ با فشار خون گزارش شده، ولی ارتباط بین این پلی‌مورفیسم با بروز پره اکلامپسی در زنان باردار تأیید نشده است [۱۵].

در مطالعه لئوناردو^{۱۲} و همکاران (۲۰۱۵) روی جمعیت اسپانیایی، ارتباط معنی‌داری بین این پلی‌مورفیسم با بیماری پره اکلامپسی مشاهده نشد. فراوانی ژنوتیپ‌های CT، CC و TT در گروه بیمار در این مطالعه به ترتیب ۷۸، ۱۴ و ۱ درصد بود که نسبت به فراوانی ژنوتیپ CC و CT در گروه مداخله در مطالعه ما کمتر و فراوانی ژنوتیپ TT در مطالعه ما بیشتر از جمعیت اسپانیایی بود [۲۵]. مطالعه منگ^{۱۳} و همکاران (۲۰۱۵) در چین ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم $1506 C>T$ ژن *MMP-9* با ابتلا به پره‌اکلامپسی نشان داد. همچنین متوسط وزن جنین و فشار خون بین دو گروه با یکدیگر نسبت آماری معنی‌داری داشتند، ولی سن مادر و هفته بارداری بین دو گروه با یکدیگر اختلاف نداشتند [۲۶]. نزدیک‌ترین یافته‌ها با مطالعه حاضر مربوط به مطالعه رحیمی و همکاران در استان کرمانشاه است. یافته‌های این مطالعه نشان داد که حضور آلل TT و CT از پلی‌مورفیسم $1562C>T$ ژن *MMP-9* یک بیومارکر در استعداد ابتلای زنان باردار به پره اکلامپسی است [۱۷]. البته میزان فراوانی ژنوتیپ‌های TT و CT در افراد بیمار با افراد مورد مطالعه ما تفاوت معنی‌داری داشت. مشابه با همین نتایج توسط لاسکوسکا^{۱۴} و همکارانش (۲۰۱۷) در لهستان به دست آمده که ارتباط بین پلی‌مورفیسم و بیماری را تأیید می‌کند [۲۷].

نتایج این مطالعه نشان داده که پلی‌مورفیسم $1562C>T$ ژن *MMP-9* با خطر ابتلا به بیماری پره اکلامپسی ارتباط دارد، ولی تاکنون هیچ مکانیسم مشخصی برای این ارتباط بیان نشده است. فراوانی ژنوتیپ‌های CT، CC و TT در بین بیماران مبتلا به پره اکلامپسی و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشت. ضمناً فراوانی افراد با هموزیگوت T در گروه مداخله و شاهد اختلاف معنی‌داری داشت. با توجه به عدم تطابق یافته‌ها در مطالعات به نظر می‌رسد که سایر عوامل از قبیل تفاوت‌های قومی، نژادی، سبک زندگی، نوع تغذیه و عادات غذایی می‌توانند در این خصوص نقش داشته باشند؛ بنابراین توصیه می‌شود برای بررسی اثر ژن‌های مختلف در بروز پره اکلامپسی در مطالعات آتی سایر عوامل و شدت بیماری پره اکلامپسی مورد توجه قرار گیرد.

12. Leonardo
13. Meng
14. Laskowska

References

- [1] Mayrink J, Costa ML, Cecatti JG. Preeclampsia in 2018: Revisiting concepts, physiopathology, and prediction. *Sci World J*. 2018; 2018:6268276. [DOI:10.1155/2018/6268276] [PMID] [PMCID]
- [2] Ahmed NA, Hamdan HZ, Kamis AH, Adam I. The association of the prothrombin G20210A single-nucleotide polymorphism and the risk of preeclampsia: Systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2020; 253:162-9. [DOI:10.1016/j.ejogrb.2020.08.005] [PMID]
- [3] Hill LD, York TP, Kusanovic JP, Gomez R, Eaves LJ, Romero R, et al. Epistasis between COMT and MTHFR in maternal-fetal dyads increases risk for preeclampsia. *PLoS One*. 2011; 6(1):e16681. [DOI:10.1371/journal.pone.0016681] [PMID] [PMCID]
- [4] Sakowicz A, Lisowska M, Biesiada L, Rybak-Krzyszowska M, Gach A, Sakowicz B, et al. Association of maternal and fetal single-nucleotide polymorphisms in metalloproteinase (MMP1, MMP2, MMP3, and MMP9) genes with preeclampsia. *Dis Markers*. 2018; 2018:1371425. [DOI:10.1155/2018/1371425] [PMID] [PMCID]
- [5] Palei ACT, Sandrim VC, Amaral LM, Machado JSR, Cavalli RC, Lacchini R, et al. Matrix metalloproteinase-9 polymorphisms affect plasma *MMP-9* levels and antihypertensive therapy responsiveness in hypertensive disorders of pregnancy. *Pharmacogenomics J*. 2012; 12(6):489-98. [DOI:10.1038/tpj.2011.31] [PMID]
- [6] Valenzuela FJ, Pérez-Sepúlveda A, Torres MJ, Correa P, Repetto GM, Illanes SE. Pathogenesis of Preeclampsia: The Genetic component. *J Pregnancy*. 2012; 2012:632732. [DOI:10.1155/2012/632732] [PMID] [PMCID]
- [7] Aas PA, Otterlei M, Falnes PØ, Vågbo CB, Skorpen F, Akbari M, et al. Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature*. 2003; 421(6925):859-63. [DOI:10.1038/nature01363] [PMID]
- [8] Bartek J, Lukas J. DNA repair: Damage alert. *Nature*. 2003; 421(6922):486-8. [DOI:10.1038/421486a] [PMID]
- [9] Farina AR, Mackay AR. Gelatinase B/*MMP-9* in tumour pathogenesis and progression. *Cancers*. 2014; 6(1):240-96. [DOI:10.3390/cancers6010240] [PMID] [PMCID]
- [10] Awakura Y, Ito N, Nakamura E, Takahashi T, Kotani H, Mikami Y, et al. Matrix metalloproteinase-9 polymorphisms and renal cell carcinoma in a Japanese population. *Cancer Lett*. 2006; 241(1):59-63. [DOI:10.1016/j.canlet.2005.10.005] [PMID]
- [11] Gai X, Lan X, Luo Z, Wang F, Liang Y, Zhang H, et al. Association of *MMP-9* gene polymorphisms with atrial fibrillation in hypertensive heart disease patients. *Clin Chim Acta*. 2009; 408(1-2):105-9. [DOI:10.1016/j.cca.2009.07.020] [PMID]
- [12] Wang L, Zhang D, Yu Y, Guan H, Qiao C, Shang T. RNA interference-mediated silencing of Laminin Receptor 1 (LR1) suppresses migration and invasion and down-regulates Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and *MMP-9* in trophoblast cells: Implication in the pathogenesis of preeclampsia. *J Mol Histol*. 2013; 44(6):661-8. [DOI:10.1007/s10735-013-9515-6] [PMID]
- [13] Rasstrigina IM, Milovanov AP, Fokina TV, Kadyrov M. The intensity of expression of matrix metalloproteinases type 2 and type 9 by invasive trophoblast cells in uncomplicated pregnancy and preeclampsia. *Arkh Patol*. 2014; 76(3):24-9. [In Russian] [PMID]
- [14] Lockwood CJ, Basar M, Kayisli UA, Guzeloglu-Kayisli O, Murk W, Wang J, et al. Interferon- γ protects first-trimester decidual cells against aberrant matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 expression in preeclampsia. *Am J Pathol*. 2014; 184(9):2549-59. [DOI:10.1016/j.ajpath.2014.05.025] [PMID] [PMCID]
- [15] Mckirdy A, Marks L. PP060. Matrix metalloproteinases-2 and -9 and their inhibitors: A role in the development of preeclampsia? *Pregnancy Hypertens Int J Womens Cardiovasc Health*. 2012; 2(3):274-5. [DOI:10.1016/j.pregphy.2012.04.171] [PMID]
- [16] Feng H, Wang L, Zhang M, Zhang Z, Guo W, Wang X. Ratio of matrix metalloproteinase-2 to -9 is a more accurate predictive biomarker in women with suspected pre-eclampsia. *Biosci Rep*. 2017; 37(2):BSR20160508. [DOI:10.1042/BSR20160508] [PMID] [PMCID]
- [17] Rahimi Z, Kazemian L, Malek-Khosravi Sh, Najafi F, Rahimi Z. Matrix metalloproteinase-7 A-181G and its interaction with matrix metalloproteinase-9 C-1562T polymorphism in preeclamptic patients: Association with malondialdehyde level and severe preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet*. 2015; 291(1):45-51. [DOI:10.1007/s00404-014-3376-4] [PMID]
- [18] Verma S, Kesh K, Gupta A, Swarnakar S. An overview of matrix metalloproteinase 9 polymorphism and gastric cancer risk. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015; 16(17):7393-400. [DOI:10.7314/APJCP.2015.16.17.7393] [PMID]
- [19] Zhang Z, Wu X, Cai T, Gao W, Zhou X, Zhao J, et al. Matrix metalloproteinase 9 gene promoter (*rs 3918242*) mutation reduces the risk of diabetic microvascular complications. *Int J Environ Res Public Health*. 2015; 12(7):8023-33. [DOI:10.3390/ijerph120708023] [PMID] [PMCID]
- [20] Cotignola J, Reva B, Mitra N, Ishill N, Chuai Sh, Patel A, et al. Matrix Metalloproteinase-9 (*MMP-9*) polymorphisms in patients with cutaneous malignant melanoma. *BMC Med Genet*. 2007; 8:10. [DOI:10.1186/1471-2350-8-10] [PMID] [PMCID]
- [21] Kang L, Chen CH, Yu CH, Chang CH, Chang FM. An association study of interleukin-4 gene and preeclampsia in Taiwan. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2014; 53(2):215-9. [DOI:10.1016/j.tjog.2014.04.017] [PMID]
- [22] Sun C, Zhang Q, Hu B, Zhang K. Investigation of the association between matrix metalloproteinase-9 genetic polymorphisms and development of pre-eclampsia in Chinese pregnant women. *Genet Mol Res*. 2016; 15(3):gmr.15038355. [DOI:10.4238/gmr.15038355]
- [23] Luizon MR, Palei ACT, Sandrim VC. Polymorphisms and haplotypes in candidate genes related to angiogenesis and endothelial dysfunction in preeclampsia. *J Pregnancy*. 2012; 2012:914704. [DOI:10.1155/2012/914704] [PMID] [PMCID]
- [24] Coolman M, de Maat M, Van Heerde WL, Felida L, Schoormans S, Steegers EAP, et al. Matrix metalloproteinase-9 gene -1562C/T polymorphism mitigates preeclampsia. *Placenta*.

2007; 28(7):709-13. [DOI:10.1016/j.placenta.2006.06.017]
[PMID]

[25] Leonardo DP, Albuquerque DM, Lanaro C, Baptista LC, Ceccati JG, Surita FG, et al. Association of nitric oxide synthase and matrix metalloprotease single nucleotide polymorphisms with preeclampsia and its complications. PLoS One. 2015; 10(8):e0136693. [DOI:10.1371/journal.pone.0136693]
[PMID] [PMCID]

[26] Meng H, Qi M, Liu Y, Xu L, Li Q. Research on correlation between *MMP-9* and early-onset preeclampsia. Int J Clin Exp Med. 2016; 9(9):17442-8. <http://www.ijcem.com/files/ijcem0034617.pdf>

[27] Laskowska M. Altered maternal serum Matrix Metalloproteinases *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, and *MMP-13* in severe early- and late-onset preeclampsia. Biomed Res Int. 2017; 2017:6432426. [DOI:10.1155/2017/6432426] [PMID] [PMCID]