اثر پلی‌مورفیسم Pro12Ala ژن PPARγ بر روی اووسیت‌ها و میزان باروری در تکنیک IVF

مهدی سهمانی،[۱] ابراهیم سخی‌نیا،[۲] لعیا فرزدی،[۳] رضا نجفی‌پور،[۴] وحیده شهنازی،[۵] امیر مهدی‌زاده[۶]
مقصود شاکر،[۷] مسعود دارابی،[۸] محمد نوری[۹]

۱. دانشجوی PhD بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز
۲. استادیار ژنتیک، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز
۳. دانشیار بیماری‌های زنان و زایمان، مرکز تحقیقات بهداشت باروری زنان، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز
۴. استادیار ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی وملکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۵. کارشناس ارشد آزمایشگاه، مرکز تحقیقات بهداشت باروری زنان
۶. کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۷. کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۸. استادیار بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز
۹. دانشیار بیوشیمی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز

تاریخ دریافت مقاله:
تاریخ پذیرش مقاله:

چکیده

زمینه و هدف: نازایی یک اختلال چند فاکتوری می‌باشد. از میان این عوامل، ژن PPARγ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ) را می‌توان نام برد که نقش مهمی در باروری زنان و نمو جنینی دارند که هم‌چنین ممکن است در موفقیت تکنیک‌های کمک باروری نیز موثر باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات پلی‌مورفیسم Pro12Ala ژن PPARγ بر روی اووسیت و میزان باروری در زنان کاندید IVF بود.

مواد و روش‌کار: در این مطالعه توصیفی –مقطعی، از ۹۸ بیماری که به بیمارستان الزهرای تبریز مراجعه کرده بودند نمونه خون جمع‌آوری گردید. بررسی نوع پلی‌مورفیسم نمونه‌ها توسط تکنیک چند شکلی طول قطعه محدود (PCR-RFLP) تعیین ژنوتیپ گردید. از آنالیزهای Multivariate برای بررسی ارتباط مستقل بین تعداد تخمک‌های بالغ و تعداد تخمک‌های بارور شده و نوع پلی‌مورفیسم ژن PPARγ استفاده شد.

یافته‌ها: آنالیزهای همبستگی نشان داد که یک ارتباط معکوس معنی‌دار بین سن زنان و تعداد تخمک‌های بالغ (p=۰/۰۰۱) و میزان تخمک‌های بارورشده (p=۰/۰۱۵) وجود دارد. نسبت باروری به‌صورت معنی‌داری در حاملین آلل جهش یافته نسبت به ژنوتیپ هموزیگوت نرمال پلی‌مورفیسم Pro12Ala افزایش داشت(p=۰/۰۳۶).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد پلی‌مورفیسم Pro12Ala ژن PPARγ نقش مهمی به‌عنوان یک عامل مستقل در میزان لقاح خارج رحمی(IVF) و هم‌چنین احتمالا در میزان باروری زنان دارد .

کلیدواژه‌ها: لقاح خارج رحمی، PPAR، پلی‌مورفیسم

مقدمه

حدود ۱۰تا ۱۵ درصد زوج‌ها در سنین باروری به‌خصوص در زنان نازا هستند.[۱] همزمان با ظهور فناوری لقاح خارج رحمی (IVF) در سال ۱۹۷۸ امکان ناباروری برخی از زوج‌هایی که به‌هر دلیلی دارای گامت بوده ولی از داشتن فرزند محروم بودند فراهم شد. لقاح خارج رحمی روشی از کمک باروری است که امکان لقاح اسپرم و تخمک زوج متقاضی برای درمان ناباروری را در شرایط آزمایشگاهی فراهم می‌نماید.[۲] یک فاکتور مهم در درمان موفق توسط IVF، میزان بلوغ تخمک و میزان باروری تخمک‌ها توسط اسپرم می‌باشد.[۳]

مطالعات مختلف نشان داده که عوامل مختلفی در این پروسه نقش دارند که یکی از این عوامل نقش ژن‌ها می‌باشد.[۴] یکی از این ژن‌ها که بسیار اهمیت دارد ژن PPARγ (Peroxisome Prolifrative-Activated Receptor γ) می‌باشد که در سال ۱۹۹۰ شناسایی شد.[۵،۶] ژن PPARγ در ناحیه ۲۵ بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۳ قرار دارد و حاوی ۹ اگزون می‌باشد و اندازه آن بیش از ۱۰۰ کیلو باز است.[۶] PPAR جزو گروهی از رسپتورهای داخل سلولی (هسته‌ای) می‌باشد که نقش مهمی در تنظیم متابولیسم گلوکز و لیپیدها و هم‌چنین در تمایز سلولی دارد. PPAR دارای چندین زیر گروه می‌باشد شامل انواع α، β/δ و نوع γ.[۵،۷] PPAR در قسمت‌های مختلف از سیستم تولیدمثلی مانند تخمدان، رحم و بیضه‌ها بیان می‌شوند.[۷] PPARγ میزان حساسیت انسولینی را افزایش داده و باعث کاهش میزان گلوکز خون در افراد دیابتی تیپ دو می‌گردد.[۷-۱۰] هر چند ارتباط بین PPARγ و ناباروری متناقض می‌باشد.[۱۱] موتاسیون‌های مختلفی در مورد ژن PPARγ وجود دارد که اثرات منفی بر روی باروری در خانم‌ها می‌گذارد.[۶] مطالعات انسانی نشان داده که حداقل ۷ نوع پلی‌مورفیسم در مورد ژن PPARγ وجود دارد. یکی از پلی‌مورفیسم‌هایی که در مورد ژن PPARγ گزارش شده Pro12Ala (rs1801282) می‌باشد. این پلی‌مورفیسم یک موتاسیون جانشینی نوکلئوتیدی C به G می‌باشد که باعث جایگزین شدن اسید آمینه آلانین در کدون ۱۲ به‌جای پرولین می‌گردد.[۳،۶،۱۲] علاوه بر آن ارتباط مثبتی بین پلی‌مورفیسم Pro12Ala با Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) وجود دارد.[۶،۱۳،۱۴] به‌نظر می‌رسد که پلی‌مورفیسم Pro12Ala در ژن PPARγ می‌تواند باعث تعدیل مقاومت انسولینی در زنان

۳۶ آدرس نویسنده مسئول: دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی
email: mmdnoori@gmail.com

مبتلا به PCOS شود که اثر مهمی بر روی ناباروری در این خانم‌ها دارد.[۱۵،۱۶] علی‌رغم این مطالعات هنوز مشخص نشده که واریانت‌های ژن PPARγ چگونه بر روی باروری زنان موثرند. این فرضیه‌ها پیشنهاد می‌کند که تغییرات در میزان بیان ژن PPARγ و یا کاهش فعالیت آن در طی پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی ممکن است باعث افزایش خطر ابتلا به ناباروری در افراد گردد. به این ترتیب در این مطالعه اثرات پلی‌مورفیسم Pro12Ala ژن PPARγ به‌عنوان یک عامل ژنتیکی در ناباروری در زنانی که تحت درمان با IVF قرار گرفته بودند مورد مطالعه قرار گرفت.

روش‌کار

در این مطالعه توصیفی–مقطعی پس از موافقت کمیته اخلاق دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و کسب رضایت از بیماران، تعداد ۹۸ نفر از زنان (با مشکل نازایی) مراجعه کننده به بیمارستان الزهرای تبریز بین دی ۱۳۷۸ تا اسفند ۱۳۸۷ جهت IVF انتخاب شد. میانگین سنی افراد ۳۲ سال بود و هیچ‌گونه علایم بیماری وجود نداشت. دارا بودن همسر سالم با اسپرموگرام طبیعی و بدون عادت به سیگار کشیدن از معیارهای ورود به مطالعه بودند. وجود هرگونه اختلال رحمی، سابقه ابتلا به بیماری اندوکرینی و بیماری التهابی از قبیل اختلالات تیروئیدی، آدرنال، اختلال در سیستم ایمنی و هورمون‌های جنسی جزو معیارهای خروج از مطالعه قرار گرفت. تمامی نمونه‌هایی که از بیماران اخذ گردید در روز چهاردهم از سیکل قاعدگی آن‌ها بود.

در IVF ابتدا برای روند تحریک تخمدان سیکل قاعدگی زن برای حدود یک ماه با دارو متوقف گردید. سپس برای به‌دست آوردن تخمک‌های متعدد تحریک کنترل شده تخمدان با استفاده از داروهای شبه هورمون تحریک کننده فولیکول (rFSH, Gonal-F; Serono, Switzerland) در روز سوم سیکل قاعدگی صورت گرفت. پس از این‌که رشد خوبی از فولیکول‌ها توسط سونوگرافی مشاهده شد (۲۰-۱۸ mm) هزار واحد هورمون hCG به‌صورت داخل عضلانی تجویز شد. این هورمون سبب بلوغ تخمک‌ها و ایجاد تخمک‌گذاری می‌شود. ۳۶ ساعت بعد مایع فولیکولی طی عمل سونوگرافی از واژن خارج گردید. تخمک‌های جمع‌آوری شده از مایع فولیکولی در انکوباتور ۳۷ درجه با دی‌اکسیدکربن ۶ درصد به‌مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. بلوغ تخمک‌ها براساس حجم و تجمع سلول‌های کومولوس و حضور جسم قطبی و کرونای اطراف آن‌ها تعیین می‌شود.[۱۴] اسپرم‌ها با روش swim-up جهت بارور کردن تخمک‌ها برای عمل لقاح در IVF آماده گردید هر تخمک در مجاورت ۲۵۰۰۰۰ اسپرم قرار گرفت. معمولا ۳-۱ ساعت بعد از تماس لقاح صورت می‌گیرد. بعد از ۲۴ ساعت سلول‌های گرانولوزا از اطراف جنین جدا گردید و بلافاصله مرحله تقسیم 2PN (تخمک‌های بارور شده‌ای که دارای دو هسته پرونوکلئوس هستند) مورد مطالعه قرار گرفت. ۲۴ ساعت بعد جنین ۸-۴ سلولی انتخاب و به تعداد ۳ عدد به‌وسیله کاتتر به داخل رحم منتقل شد. حاملگی بالینی با اندازه‌گیری β-hCG در روز چهاردهم بعد از انتقال جنین مشخص شد.از تمام افراد مورد مطالعه در حین سونوگرافی ۳ میلی‌لیتر خون جهت آزمایشات مولکولی به لوله آزمایش حاوی EDTA منتقل شد. DNA تمام نمونه‌ها پس از لیز شدن گلبول‌های سفید خون با بافر مناسب، به‌روش استاندارد فنل–کلروفرم استخراج شد[۹] و سپس با استفاده از دستگاه نانودراپ (Nanodrap) مقدار و کیفیت آن تخمین زده شد. پلی‌مورفیسم Pro12Ala ژن PPARγ بر روی نمونه‌ها با روش PCR-RFLP با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (ABI مدل VERITY-آمریکا) به‌ترتیب زیر تعیین گردید. یک قطعه از DNA ژنومی شامل ۲۹۷ bp به‌روش PCR توسط پرایمر 5'- F: CTGATGTCTTGACTCATGGG -3' و پرایمر 5'- R: GGAAGACAAACTACAAGAGC -3' تکثیر گردید.

شرایط دمایی ترموسیکلر پس از بهینه‌سازی در مراحل مختلف عبارت بود از: مرحله واسرشت اولیه (Initial denaturation) ۹۵ درجه به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه (Denaturation) به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۳ درجه (Annealing) به‌مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه (Extension) به‌مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت طویل‌سازی نهایی (Extension final) در ۷۲ درجه به‌مدت ۷ دقیقه. به‌منظور انجام PCR-RFLP ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR تحت تاثیر آنزیم محدودکننده HgaI (تهیه شده از Fermentase) به‌مدت یک شب در ۳۷ درجه قرار گرفت. پس از برش آنزیم قطعاتی به‌طول ۱۷۸ bp و ۱۱۷ bp حاصل گردید. که در نهایت محصولات هضم شده با استفاده از ژل آگاروز ۳ درصد الکتروفورز شده و با ایتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردید. آزمون *t* اختلاف آماری در میانگین متغیرها بین ژنوتیپ‌ها نشان داد از آنالیز Multivariate برای پارامترهای متغیر در مقایسه بین گروه‌ها و درصد آن‌ها استفاده شد. آنالیز همبستگی به‌وسیله متد Pearson correlation coefficient انجام شد. $p<۰/۰۵$ اختلاف معنی‌دار را نشان می‌داد.تمامی آنالیزها با استفاده از نرم افزار SPSS-11 انجام شد.

یافته‌ها

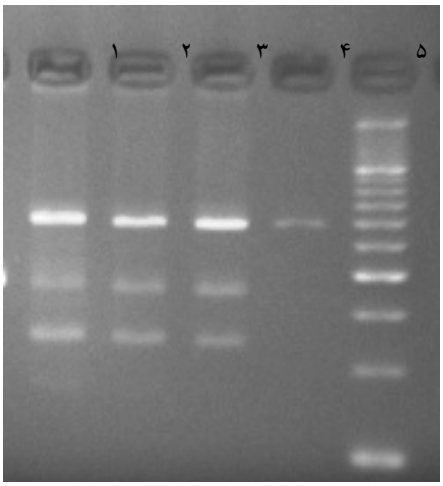
مشخصات افراد شامل سن، BMI و میزان بلوغ و باروری تخمک‌ها و درصد حاملگی به‌همراه اسپرموگرام همسر در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: مشخصات عمومی و آزمایشگاهی افراد مورد مطالعه و اسپرموگرام همسر

متغیر	Mean±SD
سن (سال)	۳۱/۴±۵
نمای توده بدنی BMI (kg/m^2)	۳۲/۶۸±۱/۴
تعداد تخمک بالغ	۹/۲±۵/۲
تعداد تخمک بارور شده	۴/۹۸±۳/۲
درصد حاملگی	۳۲/۳
تعداد اسپرم	۶۱/۴±۱۵/۸
درصد تحرک اسپرم	۷۸/۴±۹/۱

میانگین تعداد تخمک‌های بالغ و بارور شده به‌ترتیب در حدود ۹ و ۵ عدد بود. میزان وقوع حاملگی در جمعیت مورد مطالعه ۳۲ درصد بود. آنالیز همبستگی ارتباط معکوس معنی‌داری بین سن زنان و تعداد تخمک‌های بالغ ($p=۰/۰۰۱$) و میزان تخمک‌های بارور شده نشان داد ($p=۰/۰۱۵$).

پس از برش در ژن PPARγ قطعاتی به طول ۱۸۵ bp و ۱۲۵ bp حاصل شد (تصویر ۱).



تصویر ۱: برش قطعات تکثیر شده با آنزیم HgaI، ردیف‌های ۳-۱ هتروزیگوت؛ (CG) ردیف ۴ هموزیگوت wild type (CC) ردیف ۵، مارکر ۵۰bp

حاملگی بالینی با اندازه‌گیری میزان β-hCG در روز ۱۴ بعد از انتقال جنین به‌دست آمد. ارتباط بین ژنوتیپ با پارامترهای باروری نشان داده شد. هیچ ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم با تعداد تخمک‌های بالغ و یا بارور دیده نشد. هر چند نسبت باروری در افراد با پلی‌مورفیسم Pro12Ala به‌طور معنی‌داری بیشتر (p=۰/۰۳۶) بود. بعد از همسان‌سازی از نظر سن، BMI و شمارش وتحرک اسپرم، این اختلاف بیشتر معنی‌دار گردید (جدول ۲).

جدول ۲: پارامترهای باروری در گروه‌های ژنوتیپی مورد مطالعه

Pro12Ala	تعداد	تخمک‌های بالغ	تخمک‌های بارورشده	نسبت باروری
CC	۷۶	۹/۵۹±۵/۲۲	۵/۰۴±۳/۲۶	۰/۵۴±۰/۱۹
CG	۲۲	۸/۴±۵/۰۱	۴/۷۷± ۳/۱۸	۰ /۶۴±۰/۲۴
p		۰/۲۵۰	۰/۷۳۵	۰/۰۳۶
p*		۰/۲۷۸	۰/۸۲۲	۰/۰۱۹

p*: مقادیر بعد از همسان‌سازی از نظر سن،BMI، تعداد و تحرک اسپرم

بحث

در این مطالعه نشان داده شد که پلی‌مورفیسم Pro12Ala ژن PPARγ می‌تواند اثر مهمی در باروری زنانی که داوطلب IVF هستند، داشته باشد. اثر سن بر روی تعداد تخمک‌های به‌دست آمده موافق با مطالعات قبلی بود که نشان داد سن بالا می‌تواند باعث کاهش میزان باروری در زنان گردد.[۱۷] هر چند که در مطالعات ما افراد سن کمتری در مقایسه با مطالعات مشابه داشتند.[۱۸] احتمالا این باعث کم شدن اثر سن بر روی سیستم تولیدمثلی می‌شود. در مقایسه با مطالعه ما، افزایش بیشتری از نسبت‌های تخمک‌های بارور به تعداد تخمک‌های بالغ و درصد حاملگی در مطالعات قبلی گزارش شده است. برای مثال مطالعه Mutsubayashi وهمکاران[۱۹] نشان داد که نسبت تعداد تخمک‌های بارور به تعداد تخمک‌های بالغ حدود ۷۰ درصد و در یک مطالعه دیگر[۲۰] میزان حاملگی ۴۵ درصد گزارش شد. این ممکن است به‌علت وجود شرایط سخت محیطی یا فاکتورهای خطر ژنتیکی بین افراد سنین تولیدمثلی در بین جمعیت آن منطقه باشد. IVF به‌طور کلی به‌عنوان یک تکنیک برجسته جهانی در زمینه درمان ناباروری شناخته شده است. این روش دارای مزایایی می‌باشد، از جمله کارایی بالا در زمینه‌های مختلف نا باروری، مانند انسداد لوله‌های رحمی، چسبندگی‌های حفره لگنی، تعداد کم اسپرم و تحرک پایین اسپرم. علاوه بر آن هیچ‌گونه عوارضی در افرادی که با این روش به‌دنیا آمدند در طولانی‌مدت دیده نشده است.[۱۵،۱۶]

مطالعه پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی در ارتباط با درصد موفقیت لقاح خارج رحمی می‌تواند فهم بهتری از نقش عوامل ژنتیکی در بروز، تشخیص و مدیریت ناباروری در زنان به ما بدهد. فعالیت PPARγ نقش کلیدی در پروسه‌هایی از قبیل تعدیل در برداشت اسیدهای چرب، متابولیسم لیپیدها و مصرف انرژی در کبد دارد[۲۱] علاوه بر نقش آن در متابولیسم و مصرف انرژی هم‌چنین در تنظیم رشد و نمو فولیکول‌های تخمدان، اوولاسیون و بلوغ تخمک هم از طریق القا و هم از طریق مهار در مراحل استروئیدوژنز، آنژیوژنز و حتی آپوپتوزیس نقش دارد.[۲۲،۲۳] این مراحل برای نمو و توسعه فولیکول و باروری در زنان ضروری است.

به‌طور واضح به‌نظر می‌رسد که مراحل نمو و توسعه فولیکول و باروری در زنان تحت تاثیر واریانت‌های ژنتیکی PPARγ باشند که ممکن است باعث تغییر در میزان بیان ژن و یا در فعالیت این رسپتور هسته‌ای گردد.

یافته‌های ما نشان داد در گروهی که پلی‌مورفیسم دیده نشده، در مقایسه با بیماران هتروزیگوت 12Ala نسبت باروری کمتر بوده است. هم‌چنین مطالعات نشان داده که فعال‌کننده‌های PPARγ باعث مهار بیان و فعالیت آنزیم آروماتاز در انسان در رده سلولی گرانولوزا می‌گردند.[۲۴] علاوه بر آن فعال‌کننده PPARγ باعث القای تغییر مسیر از سنتز آندروژن‌ها به بیوسنتز پروژستین در سلول‌های تکا می‌گردند که این قابل مقایسه با وضعیت انتقالی استروئیدوژنیک در محیط in-vivo متعاقب افزایش میزان LH می‌باشد.[۲۵] این وضعیت پیشنهاد می‌کند که پاسخ گرانولوزا سل‌ها به آگونیست‌های PPARγ ممکن است وابسته به مراحل تمایز فولیکولی باشد.[۲۶] اگر چه پلی‌مورفیسم Pro12Ala در اگزون ۲ باعث جابجایی یک اسیدآمینه به یک اسیدآمینه دیگر در ساختار پروتئین می‌گردد ولی اثر مستقیم این پلی‌مورفیسم بر روی ژن PPARγ هنوز کاملا مشخص نشده است. ارتباط مستقل پلی‌مورفیسم Pro12Alaژن PPARγ با نسبت باروری تخمک‌ها حتی بعد از همسان‌سازی با فاکتور های مداخله‌کننده ممکن است این فرضیه را پیشنهاد کند که این پلی‌مورفیسم با دیگر موتاسیون‌ها و یا واریانت‌های دیگر ژن PPARγ یک linkage disequilibrium دارد که می‌تواند نقش مهمی در عملکرد تخمک در طول IVF داشته باشد. این ارتباط نشان می‌دهد که مطالعه مارکرهای ژنتیکی در ارتباط با میزان موفقیت IVF می‌تواند زمینه‌های مطالعاتی بعدی اثرات ژنتیک بر ناباروری را فراهم کرده تا گام مهمی در بهبود و پیشرفت IVF با کارایی بیشتر در درمان ناباروری داشته باشیم.

سپاسگزاری

این مقاله ماحصل پایان‌نامه دوره تخصصی شماره ۳/۴-۸۸/۴ مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تبریز است.

References

1. World Health Organization. Infertility, a tabulation of available data on prevalence of primary and secondary infertility. Geneva: WHO programme on maternal and child health and family planning, division of family health; 1991.
2. Rees WD, McNeil CJ, Maloney CA. The roles of PPARs in the fetal origins of metabolic health and disease. PPAR Res 2008; 2008: 459030.
3. Fournier T, Tsatsaris V, Handschuh K and Evain-Brion D. PPARs and the placenta. Placenta 2007; 28(2-3): 65-76.
4. Gremlich S, Fratta S, Rebellato E, et al. Interleukin-1 receptor antagonist gene (IL-1RN) polymorphism is a predictive factor of clinical pregnancy after IVF. Hum Reprod 2008; 23(5): 1200-1206.
5. Froment P, Gizard F, Defever D, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors in reproductive tissue: From gametogenesis to parturition. J Endocr 2006; 189(2): 199-209.
6. Minge CE, Robker RL, Norman RJ. PPAR gamma: Coordinating metabolic and immune contributions to female fertility. PPAR Res 2008; 2008: 243791.
7. Chinetti-Gbaguidi G, Fruchart JC, Staels B. Role of the PPAR family of nuclear receptors in the regulation of metabolic and cardiovascular homeostasis: New aproaches to therapy. Curr Opin Pharmacol 2005; 5(2): 177-183.
8. Perret B, Mabile L, Martinez L, et al. Hepatic lipase: Structure/function relationship, synthesis, and regulation. J Lipid Res 2002; 43(8): 1163-1169.
9. Antoine HJ, Pall M, Trader BC, et al. Genetic variants in peroxisome proliferator-activated receptor gamma influence insulin resistance and testosterone levels in normal women, but not those with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2007; 87(4): 862-869.
10. Cui Y, Miyoshi K, Claudio E. Loss of the peroxisome proliferation-activated receptor gamma (PPARgamma) does not affect mammary development and propensity for tumor formation but leads to reduced fertility. J Biol Chem 2002; 277(20): 17830-17835.
11. Gu BH, Baek KH. Pro12Ala and His447His polymorphisms of PPAR-gamma are associated with polycystic ovary syndrome. Reprod Biomed Online 2009; 18(5): 644-650.
12. Minge CE, Ryan NK, Van Der Hoek KH, et al. Troglitazone regulates peroxisome proliferator-activated receptors and inducible nitric oxide synthase in murine ovarian macrophages. Biol Reprod 2006; 74(1): 153-160.
13. Tok EC, Aktas A, Ertunc D, et al. Evaluation of glucose metabolism and reproductive hormones in polycystic ovary syndrome on the basis of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma2 Pro12Ala genotype. Hum Reprod 2005; 20(6): 1590-1595.
14. Weiss NS, Ure CL, Ballard JH, et al. Decreased risk of fractures of the hip and lower forearm with postmenopausal use of estrogen. N Engl J Med 1980; 303(21): 1195-1198.
15. Shoupe D. Hormone replacement therapy: Reassessing the risks and benefits. Hosp Pract (Minneap) 1999; 34(8): 97-103.
16. Baird DT, Collins J, Egozcue J, et al. Fertility and ageing. Hum Reprod Update 2005; 11(3): 261-276.
17. Thyzel E, Siegling S, Tinneberg HR, et al. Age dependent assessment of TFPI levels in follicular fluid of women undergoing IVF. Clin Chem Acta 2005; 361(1-2): 176-181.
18. Matsubayashi H, Sugi T, Arai T. IgG-antiphospholipid antibodies in follicular fluid of IVF-ET patients is related to low fertilization rate of their oocytes. Am J Reprod Immunol 2006; 55(5): 341-348.
19. Von WT, Monisova Y, Hacker MR. Age-related variations in follicular apolipoproteins may influence human oocyte maturation and fertility potential. Fertil Steril 2010; 93(7): 2354-2361
20. Auwerx J, Cock TA, Knouff C. PPAR-gamma: A thrifty transcription factor. Nucl Recept Signal 2003; 1: e006.
21. Froment P, Gizard F, Defever D, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors in reproductive tissues: From gametogenesis to parturition. J Endocrinol 2006; 189(2): 199-209.
22. Kwintkiewicz J, Nishi Y, Yanase T and Giudice LC. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma mediates bisphenol a inhibition of FSH-stimulated IGF-1, aromatase, and estradiol in human granulosa cells. Environ Health Perspect 2010; 118(3): 400-406.
23. Mu YM, Yanase T, Nishi Y, et al. Insulin sensitizer, troglitazone, directly inhibits aromatase activity in human ovarian granulosa cells. Biochem Biophys Res Commun 2000; 271(3): 710-3.
24. Schoppee PD, Garmey JC, Veldhuis JD. Putative activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma impairs androgen and enhances progesterone biosynthesis in primary cultures of porcine theca cells. Biol Reprod 2002; 66(1): 190-8.
25. Komar CM, Curry TE Jr. Inverse relationship between the expression of messenger ribonucleic acid for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and P450 side chain cleavage in the rat ovary. Biol Reprod 2003; 69(2): 549-555.

Effect of Pro12Ala PPARγ gene polymorphism on oocytes and fertilization in IVF technique

Mehdi Sahmani,[1] Ebrahim Sakhinia,[2] Laya Farzadi,[3] Reza Najafipour,[4] Vahideh Shahnazi,[3] Amir Mehdizadeh,[5] Maghsod Shaaker,[5] Masoud Darabi,[5] Mohammad Noori[2]

Background: Infertility is a multifactorial disorder. One of these factors that is effective on fertility and embryonic development is Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPARγ) gene, which may also contribute to the efficacy of assisted reproduction techniques. The aim of this study was to investigate the effect of Pro12Ala PPARγ gene polymorphism on oocytes and fertilization in women undergoing IVF.

Materials and Method: In this cross-sectional study, blood samples were obtained from 98 IVF patients referred to Tabriz Al-Zahra hospital. Samples were analyzed for polymorphism of PPARγ gene using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism-based methods. Multivariate analyses were used to test the independence of associations between the number of mature oocytes and number of oocytes fertilized as outcome variables, and polymorphism of PPARγ gene.

Results: Correlation analysis showed significantly inverse correlation between the age of women and the number of mature oocytes retrieved (r=-0.37, *p*=0.001) and oocytes fertilized (r=-0.25, *p*=0.015). Fertilization ratio was significantly (*p*=0.036) increased in carriers versus homozygous wild-type genotype for Pro12Ala PPARγ polymorphism.

Conclusion: This study presents evidence that PPARγ Pro12Ala polymorphism affect on fertilization in vitro, which possibly play an important role in female fertility.

Keywords: Fertilization in vitro, PPAR gamma, polymorphism

1. **Phd Student of Clinical Biochemistry, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.**
2. **Assistant Professor of Genetic, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.**
3. **Associate Professor of Obstructs and Gynecology, Women's Reproductive Health Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.**
4. **Assistant Professor of Genetic, Molecular and Cellular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.**
5. **MSc of Chromatography Laboratory, Women's Reproductive Health Research Center, Tabriz University of Medical Sciences**
6. **MSc of Biochemistry, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.**
7. **BSc of Laboratory Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.**
8. **Assistant Professor of Biochemistry, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.**
9. **Associate Professor of Biochemistry, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.**