

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی (گرایش سلولی تکوینی)

بررسی بیان c-Met محلول در سرم بیماران مبتلا به اندومتريوز

از

نیلوفر خوشدل راد

استاد راهنما: آقای دکتر فرهاد مشایخی

اساتید مشاور: آقای دکتر ابراهیم میرزاجانی و خانم دکتر زیبا ظهیری سروری

شهریور ۱۳۹۱

فهرست مطالب

عنوان.....	صفحه.....
چکیده فارسی	خ.....
چکیده انگلیسی.....	د.....
فصل اول : مقدمه	
۱-۱- تعریف بیماری اندومتریوز	۱.....
۲-۱- اپیدمیولوژی	۲.....
۳-۱- طبقه بندی بیماری اندومتریوز	۲.....
۴-۱- علائم و نشانه های بیماری اندومتریوز	۳.....
۱-۴-۱- مکانیسم ایجاد درد در بیماران مبتلا به اندومتریوز	۵.....
۲-۴-۱- ارتباط بیماری اندومتریوز با ناباروری	۵.....
۵-۱- سبب شناسی بیماری اندومتریوز	۷.....
۱-۵-۱- تئوری قاعدگی رو به عقب یا تئوری سمپسون	۷.....
۲-۵-۱- تئوری متاپلازی سلومی	۹.....
۳-۵-۱- تئوری القا	۹.....
۴-۵-۱- تئوری پیوند مستقیم	۹.....
۶-۱- ارتباط بیماری اندومتریوز با سرطان	۹.....
۱-۶-۱- خودکفایی در سیگنال های رشد	۱۰.....
۲-۶-۱- عدم حساسیت به سیگنال های ضد تکثیر	۱۰.....
۳-۶-۱- مقاومت به آپوپتوز	۱۱.....
۴-۶-۱- عدم محدودیت در تکثیر و همانند سازی	۱۱.....
۵-۶-۱- تقویت آنژیوژنز	۱۲.....
۶-۶-۱- مهاجم بافتی و متاستاز	۱۲.....
۷-۱- تشخیص بیماری	۱۲.....

- ۱-۷-۱- راههای غیر تهاجمی ۱۲
- ۱-۱-۷-۱- شرح حال و معاینه بالینی ۱۲
- ۱-۷-۱-۲- سونوگرافی ترانس واژینال ۱۳
- ۱-۷-۱-۳- تصویربرداری رزونانس مغناطیسی ۱۳
- ۲-۷-۱- راههای تهاجمی ۱۳
- ۱-۲-۷-۱- روش های آزمایشگاهی ۱۳
- ۲-۲-۷-۱- یافته های لاپاروسکوپی ۱۴
- ۳-۲-۷-۱- تایید بافت شناسی ۱۵
- ۸-۱- روش های درمانی ۱۵
- ۱-۸-۱- درمان دارویی ۱۵
- ۲-۸-۱- درمان ناباروری ۱۶
- ۹-۱- عوامل موثر در ایجاد اندومتریوز ۱۷
- ۱-۹-۱- فاکتورهای ژنتیکی دخیل در اندومتریوز ۱۷
- ۲-۹-۱- اختلالات قاعدگی ۱۸
- ۳-۹-۱- اختلالات آناتومیکی ۱۸
- ۴-۹-۱- نقش عوامل محیطی ۱۹
- ۵-۹-۱- عوامل ایمونولوژیک ۲۱
- ۱-۵-۹-۱- سه نوع سلول اصلی سیستم ایمنی ۲۱
- ۲-۵-۹-۱- ارتباط سایتوکاین ها با بیماری اندومتریوز ۲۲
- ۳-۵-۹-۱- ارتباط فاکتورهای رشد با بیماری اندومتریوز ۲۳
- ۱-۱۰-۱- ژن فاکتور رشد هپاتوسیتی ۲۵
- ۲-۱۰-۱- ساختار فاکتور رشد هپاتوسیتی ۲۶
- ۳-۱۰-۱- گیرنده فاکتور رشد هپاتوسیتی ۲۷
- ۴-۱۰-۱- نقش فیزیولوژیک c-Met/HGF ۲۹
- ۵-۱۰-۱- فسفریلاسیون c-Met و عمل پیام رسانی ۲۹
- ۶-۱۰-۱- فعالیت های بیولوژیکی ۳۰

۳۰	۱۰-۱-۶-۱- نقش HGF/c-Met در فرایند آنژیوژنز
۳۰	۱۰-۱-۶-۲- نقش HGF/c-MET در تهاجم و متاستاز
۳۲	۱۱-۱- ارتباط HGF/c-Met با بیماری اندومتریوز
۳۳	۱۲-۱- تشکیل فرم محلول c-Met
۳۳	۱-۱۲-۱- تولید فرم محلول پروتئین های تراغشایی
۳۳	۱-۱۲-۱- مکانیسم های مسئول تولید فرم های محلول گیرنده ها
۳۵	۱-۱۲-۱-۲- مکانیسم عملکرد گیرنده های محلول
۳۶	۱-۱۲-۲- فرم محلول c-Met
۳۷	۱-۱۲-۲-۱- عوامل موثر در ریزش اکتودومین c-Met
۳۷	۱۳-۱- اهداف تحقیق

فصل دوم : مواد و روش ها

۳۸	۱-۲- دستگاه ها و وسایل مورد استفاده
۳۹	۲-۲- مواد مورد نیاز
۴۰	۳-۲- تهیه نمونه های سرم
۴۰	۴-۲- اندازه گیری غلظت کل پروتئین
۴۰	۵-۲- بررسی الگوی الکتروفوریتیک پروتئین های سرم خون بیماران مبتلا به اندومتریوز
۴۱	۱-۵-۲- تهیه بافر مخزن یا بافر الکتروود
۴۲	۲-۵-۲- تهیه بافر نمونه
۴۱	۳-۵-۲- تهیه بافر ژل بالا
۴۲	۴-۵-۲- تهیه بافر ژل پایین
۴۳	۵-۵-۲- تهیه آکریل آمید ۳۰٪ و بیس آکریل آمید ۰/۸٪
۴۳	۶-۵-۲- تهیه آمونیوم پرسولفات ۴۰٪
۴۳	۷-۵-۲- تهیه بافر فسفات سالین (PBS)
۴۴	۶-۲- آماده سازی ژل الکتروفورز
۴۴	۱-۶-۲- تهیه ژل پایین
۴۴	۲-۶-۲- تهیه ژل بالا

- ۲-۷- آماده سازی نمونه ها برای انجام الکتروفورز ۴۵
- ۲-۸- نحوه انجام الکتروفورز SDS-PAGE ۴۵
- ۲-۹- رنگ آمیزی نیترا ت نقره ۴۷
- ۲-۱۱-۱- تهیه بافرهای رنگ آمیزی نیترا ت نقره ۴۷
- ۲-۱۱-۱-۱- تهیه محلول تثبیت کننده ۴۷
- ۲-۱۱-۲-۱- تهیه محلول حساس گر ۴۸
- ۲-۱۱-۳- تهیه محلول رنگ آمیزی ۴۸
- ۲-۱۱-۴- تهیه محلول ظاهر کننده ۴۸
- ۲-۱۱-۵- تهیه محلول متوقف کننده ۴۸
- ۲-۱۱-۲- انجام رنگ آمیزی نیترا ت نقره ۴۹
- ۲-۱۲- بررسی میزان پروتئین های مورد مطالعه در نمونه های سرم با استفاده از روش الایزا ۵۰
- ۲-۱۲-۱- بررسی میزان HGF انسانی در سرم افراد بیمار و کنترل با روش الایزا ۵۱
- ۲-۱۲-۱-۱- آماده کردن مواد و محلول ها ۵۲
- ۲-۱۲-۲- روش آزمایش ۵۳
- ۲-۱۲-۲- بررسی میزان c-Met محلول در سرم افراد بیمار و کنترل با روش الایزا ۵۴
- ۲-۱۲-۱-۲- آماده کردن مواد و محلول ها ۵۵
- ۲-۱۲-۲- روش آزمایش ۵۶
- ۲-۱۲-۳- آنالیز آماری ۵۷

فصل سوم : نتایج

- ۳-۱- خصوصیات نمونه ها ۵۸
- ۳-۲- بررسی محتوای غلظت کل پروتئین موجود در سرم ۵۸
- ۳-۴- بررسی میزان بیان فاکتور HGF در سرم خون افراد بیمار و کنترل ۶۰
- ۳-۵- بررسی میزان بیان فرم محلول c-Met در سرم خون افراد بیمار و کنترل ۶۱

فصل چهارم : بحث

۶۲..... بحث و نتیجه گیری.....

۶۶..... پیشنهادات.....

فصل پنجم :

۶۷..... منابع.....

۶۸..... پیوست.....

عناوین شکل ها :

شکل ۱-۱- شایعترین محل های درگیر در اندومتريوز لگنی..... ۱.....

شکل ۲-۱- طبقه بندی بیماران مبتلا به اندومتريوز ۳.....

شکل ۳-۱- تئوری قاعدگی برگشتی ۸.....

شکل ۴-۱- تصاویر لاپاروسکوپي در بیمار مبتلا به اندومتريوز..... ۱۴.....

شکل ۵-۱- ساختار شیمیایی (TCDD) 2, 3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin ۱۹.....

شکل ۶-۱- ساختار فاکتور رشد هیپاتوسیتی ۲۶.....

شکل ۷-۱- ساختار پروتئین c-Met ۲۸.....

شکل ۸-۱- مسیرهای پیام رسانی HGF/ c-Me ۳۱.....

شکل ۹-۱- مکانیسم تشکیل فرم محلول ۳۴.....

شکل ۱۰-۱- مکانیسم عملکرد گیرنده های محلول ۳۶.....

شکل ۱-۲- نحوه آماده سازی محلول های استاندارد Hu HGF ۵۲.....

شکل ۲-۲- نحوه آماده سازی محلول های استاندارد Soluble c-Met ۵۵.....

شکل ۱-۳- نمودار غلظت کل پروتئین موجود در سرم افراد بیمار و کنترل ۵۸.....

شکل ۲-۳- الگوی الکتروفورتيك نمونه های سرم افراد بیمار و کنترل ۵۹.....

شکل ۳-۳- نمودار غلظت HGF در نمونه های سرم افراد بیمار و کنترل ۶۰

شکل ۳-۴- نمودار غلظت فرم محلول c-Met در نمونه های سرم افراد بیمار و کنترل ۶۱

عناوین جدول ها :

جدول ۲-۱- محلول های ژل پایین ۴۴

جدول ۲-۲- محلول های ژل بالا ۴۴

جدول ۲-۳- مواد کیت الیزا Hu HGF ۵۱

جدول ۲-۴- مواد کیت الیزا Soluble c-Met ۵۴

بررسی بیان c-Met محلول در سرم بیماران مبتلا به اندومتريوز

نیلوفر خوشدل راد

اندومتريوز از لحاظ بافت شناسی بوسیله حضور و رشد غدد و استرومای اندومتريومی در خارج از حفره ی رحم مشخص می شود. زنان مبتلا به اندومتريوز از علایمی از جمله درد مزمن لگن، درد قاعدگی و درد مقاربت رنج می برند. اندومتريوز یک بیماری پلی ژنیک با اتیولوژی چند عاملی پیچیده است. مکانیسم مسئول شروع و پیشرفت این بیماری به میزان زیادی ناشناخته باقی مانده است. یکی از مولکول هایی که پیشنهاد می شود که در اندومتريوز دخیل باشد c-Met است. c-Met یک گیرنده تیروزین کینازی است که بدنبال اتصال لیگاند طبیعی اش یعنی فاکتور رشد هپاتوسیتی، فسفریله شده و مسیره های سیگنال رسانی مختلف دخیل در تکثیر، تحرک، مهاجرت و تهاجم را فعال می کند. بسیاری از پروتئین های سرتاسری غشا طی فرایند پروتئولیز از سطح سلول ها جدا می شوند که به این حالت ریزش جایگاه خارجی گویند. ریزش در حالت های طبیعی رخ داده و در حالت های بیماری ممکن است تغییر کند. در میان گیرنده های زیادی که متحمل ریزش جایگاه خارج سیتوپلاسمی می شوند می توان به c-Met اشاره کرد. هدف از این تحقیق، بررسی میزان c-Met محلول در سرم بیماران مبتلا به اندومتريوز است. به همین منظور از ۲۵ زن مبتلا به اندومتريوز و ۱۵ زن داوطلب سالم نمونه خون تهیه شد. در این بررسی غلظت کل پروتئین و میزان c-Met محلول در نمونه های سرم بیماران مبتلا به اندومتريوز با استفاده از Biuret و الایزا اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که تفاوت معنی داری در غلظت کل پروتئین در سرم بیماران و گروه کنترل وجود ندارد، اما میزان c-Met محلول در سرم بیماران مبتلا به اندومتريوز بطور معنی داری بالاتر از میزان آن در نمونه های سالم بود و میزان آن به ترتیب $246/87 \pm 62$ ng/ml و $195/33 \pm 62$ ng/ml محاسبه شد. به طور کلی نتیجه گیری میشود که سیگنال HGF/c-Met ممکن است در پاتوفیزیولوژی اندومتريوز نقش داشته باشد.

کلید واژه : c-Met محلول، فاکتور رشد هپاتوسیتی، اندومتريوز، سرم

Abstract

Expression of soluble c-Met in the serum of patients with endometriosis

Niloofar Khoshdel rad

Endometriosis, characterized histologically by the presence and growth of endometrial glands and stroma outside the uterine cavity. Women with endometriosis suffer from symptoms such as chronic pelvic pain, dysmenorrhea and dyspareunia. Endometriosis is a polygenic disease with a complex, multifactorial etiology. The mechanism responsible for the initiation and development of this disease remains largely unknown. One of the molecule suggested that involved in endometriosis is c-Met. c-Met is a tyrosine kinase receptor that, upon binding of its natural ligand, the hepatocyte growth factor (HGF), is phosphorylated and subsequently activates different signalling pathways involved in proliferation, motility, migration and invasion. Many proteins are proteolytically release from the cell surface by a process known as ectodomain shedding. shedding occurs under normal physiologic conditions and can be increased in certain pathologies. c-Met can be seen among many receptors for wich ectodomain shedding has been shown. The aim of the present study was to investigate of the expression of soluble c-Met in the serum of patients with endometriosis. For this study, blood samples were collected from 25 women with endometriosis and 15 healthy volunteers. In this study, total protein concentration and soluble c-met level in serum samples from patients with endometriosis were measured using a dye-based protein assay and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) respectively. It was shown that the total protein concentration of all samples was within the normal range and no significant change has been seen between two groups. However there was significant increase in the serum soluble c-met concentration in the patients with endometriosis as compared to normal subjects which was 246.87 ± 62 ng/ml and 195.33 ± 62 ng/ml respectively. In conclusion the results of this study showed that HGF/c-Met system is involved in the pathophysiology of endometriosis.

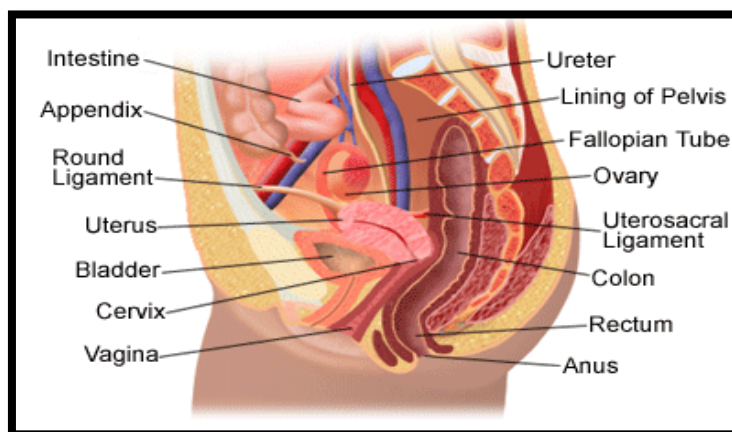
Keyword: soluble c-met, HGF , endometriosis, serum

۱- مقدمه:

اندومتریوز یکی از دلایل اصلی ناباروری در زنان است بطوریکه ۱۵-۷٪ از جمعیت کل زنان به این بیماری مبتلا هستند. در این بیماران، در نتیجه وجود درد، تاثیر عاطفی ناشی از ناباروری، نگرانی ناشی از عود بیماری و عدم اطمینان از آینده، کیفیت زندگی تحت تاثیر قرار می گیرد (Wu et al., 2010). بعلاوه اندومتریوز در حالات پیشرفته می تواند پیش ساز بدخیمی و سرطان گردد (Varma et al., 2004). با توجه به موارد فوق، در این تحقیق به بررسی بیان فاکتور رشد هیپاتوسیستی^۱ و فرم محلول گیرنده آن در سرم بیماران مبتلا به اندومتریوز پرداخته شده است و در ابتدا به بررسی ویژگی های این بیماری پرداخته می شود.

۱-۱- تعریف بیماری اندومتریوز

اندومتریوز^۲ یک بیماری زنانه است که بوسیله حضور و رشد بافت اندومتریومی^۳ در مکان نابجا در خارج از رحم مشخص می شود. محل های شایع ظهور به طور عمده در حفره لگن و در تخمدان ها، صفاق، لیگامنتهای یوتروساکرال، بن بست داگلاس و دیواره رکتوواژینال است و ممکن است در میزنا و مثانه هم مشاهده شود (Farquhar, 2000) (شکل ۱-۱). اندومتریوز خارج لگنی در برخی نواحی نظیر عصب سیاتیک، شش و حتی مغز نیز گزارش شده است (Bedaiwy and Falcone, 2004).



شکل ۱-۱: شایعترین محل های درگیر در اندومتریوز لگنی (گرفته شده از Weillcornell.org)

- 1- Hepatocyte growth factor
- 2- Endometriosis
- 3- Endometrium

۲-۱- اپیدمیولوژی:

تعیین دقیق میزان شیوع این بیماری مشکل است به این دلیل که جراحی برای تشخیص صحیح لازم است و معمولاً در همه افراد انجام نمی‌شود. این بیماری در ۳٪ از زنان یائسه، ۷-۱۵٪ از جمعیت کل زنان در سن تولید مثل و در ۸۰-۶۰٪ از زنان با درد لگن و ناباروری و ۴۰-۶۰٪ از زنان مبتلا به درد شدید قاعدگی مشاهده می‌شود و ۲۲-۲٪ از زنان بدون نشانه نیز مبتلا به اندومتریوز هستند (Farquhar, 2000). در افرادی که خویشاوندان نزدیک آنها به این بیماری مبتلا هستند، خطر ابتلا به شش برابر افزایش می‌یابد (Vigano et al., 2004). فراوانی کمتری در زنانی که عمل هیسترکتومی^۴ انجام داده‌اند مشاهده شده است. مطالعات متعدد نشان می‌دهد که فراوانی اندومتریوز در جمعیت‌های مختلف متفاوت است، به عنوان نمونه این بیماری در جمعیت‌های سیاه پوست آفریقایی نسبت به جمعیت‌های آسیای شرقی شیوع کمتری دارد. اما به طور کلی در تمام جمعیت‌ها وقوع آن دیده می‌شود. این بیماری در بین زنان با سطح اجتماعی بالاتر فراوانی بیشتری دارد که شاید در نتیجه این باشد که این افراد توجه بیشتری به درد لگنی یا ناباروری دارند و تشخیص بیماری در این افراد سریعتر است. به تأخیر انداختن حاملگی در این زنان نیز عامل دیگری برای توسعه و پیشرفت اندومتریوز در آنها محسوب می‌شود (Cramer et al., 1986).

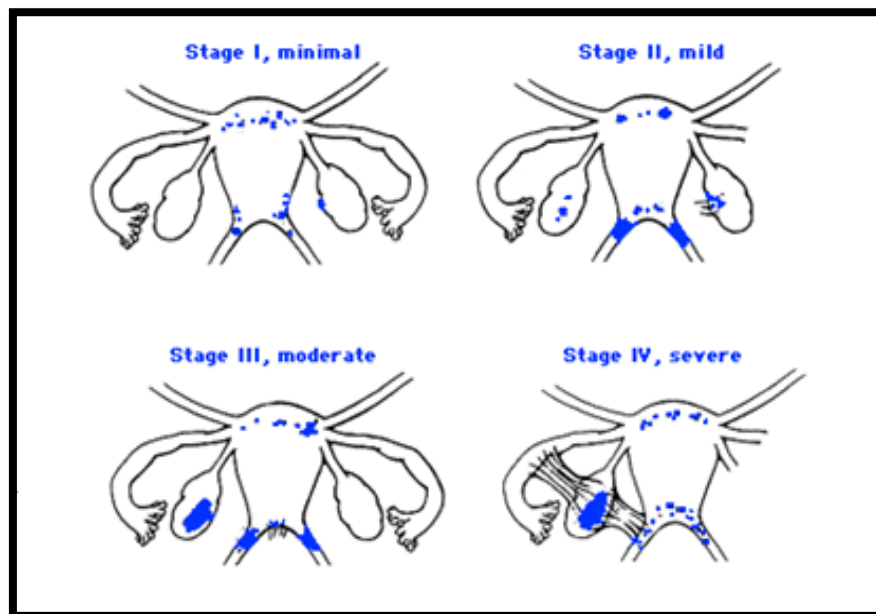
۳-۱- طبقه بندی بیماری اندومتریوز:

انجمن باروری آمریکا^۵ سیستمی جهت طبقه بندی مراحل اندومتریوز ارائه نموده است. این طبقه بندی براساس ظاهر، اندازه و عمق ایمپلنت‌ها و وجود، وسعت و نوع چسبندگی‌ها می‌باشد. در این سیستم اندومتریوز به چهار مرحله تقسیم می‌شود: مرحله ۱- بیماری جزئی^۶: در این مرحله لکه‌ها و زخم‌های سطحی در سطح صفاق و اندام‌ها مشاهده می‌شود. مرحله ۲- بیماری خفیف^۷: این مرحله همراه با زخم‌های نسبتاً وسیع، برجستگی‌های سطحی و عمقی و چسبندگی‌های خفیف می‌باشد.

مرحله ۳- بیماری متوسط^۸: در این مرحله کیست‌های اندومتریوتیک کوچک و سطحی و چسبندگی‌های نسبتاً وسیع مشاهده می‌شود.

-
- 1- Hysterectomy
 - 2- American Fertility Society
 - 3- Minimal
 - 4- Mild
 - 1- Moderate

مرحله ۴ - بیماری شدید^۱: در این مرحله کیست های اندومتریوتیک (اندومتریوما^۱) بسیار بزرگ و عمقی و چسبندگی های وسیع در بیشتر اندام ها قابل رویت است (American Fertility Society classification of endometriosis, (1985) (شکل ۱-۲).



شکل ۱-۲: طبقه بندی بیماران مبتلا به اندومتریوز (گرفته شده از Dvpcenter.com).

۱ - علائم و نشانه های بیماری اندومتریوز

علائم و نشانه های بیماری برحسب محل درگیر و شدت بیماری متغیر است (Vigano *et al.*, 2004). به طور کلی علائم و نشانه های شایع این بیماری عبارتند از:

(۱) اختلال در قاعدگی: قاعدگی شدیدتر و افزایش طول مدت خونریزی و مدت کم سیکل های قاعدگی در زنان مبتلا به

اندومتریوز مشاهده می شود (Vercellini *et al.*, 1997).

(۲) دیسمنوره^۱: درد در زمان قاعدگی که اغلب قبل از شروع خونریزی آغاز می شود و در طول قاعدگی ادامه می یابد.

(۳) دیس پارونیا^۲: درد در هنگام مقاربت.

- 2- Sever
- 3- Endometrioma
- 1- Dysmenorrhea
- 2- Dyspareunia

۴) درد لگنی: ۳۰٪ بیماران دچار درد شدید لگن به اندومتريوز مبتلا هستند. این درد ممکن است یک طرفه و یا دو طرفه باشد و در بسیاری از بیماران ممکن است همراه با کمر درد و یا احساس فشار در رکتوم باشد.

۵) علائم مجاری گوارشی: اندومتريوز ممکن است با علائم شدید دستگاه گوارش از جمله درد در زمان خروج مدفوع^{۱۳}، تهوع، استفراغ، سیری زود هنگام، نفخ و اتساع شکم همراه باشد. این علائم بیشتر بصورت چرخه ای بوده و به طور معمول قبل و در زمان قاعدگی افزایش می یابند، اما ممکن است غیرقابل پیش بینی و نا منظم باشند.

۶) علائم مجاری ادرار: وجود خون در ادرار و تکرر ادرار.

۷) علائم ریوی: خلط های خونی.

۸) اختلالات اندوکرینولوژیک: عدم تخمک گذاری، تکامل غیرطبیعی فولیکول، سندرم فولیکول لوتئینیزه پاره نشده^{۱۴}، کاهش میزان پروستاگلاندین E₂ در گردش خون در طی مرحله قبل از تخمک گذاری، لکه بینی قبل از قاعدگی از جمله اختلالات اندوکرینولوژیک همراه با اندومتريوز هستند (Bergqvist, 1993).

۹) اختلالات باروری: میزان احتمال باروری در زوج های طبیعی ۲۰-۱۵٪ است، اما در افراد مبتلا به اندومتريوز این میزان به ۱۰-۲٪ کاهش می یابد. بررسی ها نشان می دهد که ۵۰-۲۵٪ از زنان نابارور مبتلا به اندومتريوزند و ۵۰-۳۰٪ از زنان مبتلا به اندومتريوز نابارورند (Strathy et al., 1982).

۱-۴-۱- مکانیسم ایجاد درد در بیماران مبتلا به اندومتريوز:

ضایعات فعال می توانند به میزان زیادی باعث ایجاد ناراحتی شوند. احتمالاً انواع مختلف ضایعات می توانند بواسطه راههای مختلف سبب ایجاد درد شوند. ممکن است درد توسط تنظیم کننده های التهابی و تحریک نورولوژیک ایجاد شود. ضایعات اولیه نسبت به ضایعات قدیمی تر دارای میزان زیادی پروستاگلاندین هستند. این پروستاگلاندین ها مسیرهای عصبی آوران را

3- Dyschezia

4- LUFSS = Luteinized Unrupted Follicle Syndrome

فعال می کنند. ضایعات عمیق نیز به درون صفاق نفوذ می کنند و با تحریک مستقیم اعصاب لگنی سبب ایجاد درد می شوند. بررسی ها افزایش تعداد رشته های عصبی موجود در اندومتریوم زنان مبتلا به اندومتریوز را نشان می دهد (Lebovic *et al.*, 2005). به علاوه افزایش تعداد و فعالیت ماکروفاژها در مایع صفاقی زنان مبتلا به اندومتریوز سبب افزایش تولیدات آنها از قبیل سایتوکاین ها، فاکتور های رشد، لیزوزیم ها و پروستاگلاندین E2 می شود که باعث شیمیوتاکسی و جذب بیشتر ماکروفاژها، گشاد شدن عروق و هجوم خون به لگن، افزایش حجم مایع صفاقی، تخریب بافتی در محل و ایجاد چسبندگی و فیبروم در سطح اندامها می شود. این عوامل در نهایت سبب کشیدگی صفاق و ایجاد درد شدید در بیماران می شوند (Vercellini *et al.*, 1996).

۱-۴-۲- ارتباط بیماری اندومتریوز با ناباروری^{۱۵}

(۱) تغییر آناتومی طبیعی لگن

در مراحل III و IV اندومتریوز، مخصوصاً در افرادی که تخمدان ها و اوویداکت ها درگیر چسبندگی هستند، میزان باروری کاهش می یابد. بررسی ها نشان می دهند که که انسداد مکانیکی بین تخمدان و لوله تخم بر و در نتیجه نقص در انتقال گامت ها به ناحیه آمپول لوله در کاهش باروری این افراد موثر است. همچنین در زمان جراحی در این بیماران، برای خارج کردن ضایعات از سطح تخمدان ممکن است مقداری از بافت فعال تخمدان برداشته شود که این خود سبب کاهش باروری می شود (Schenken *et al.*, 1984).

(۲) تغییر در مایع صفاقی^{۱۶}

حفره صفاقی به طور طبیعی دارای یک لایه مایع است که رطوبت سطح را حفظ می کند. مایع صفاقی، محیطی ایمنولوژیکی دینامیک است که با سیستم های ایمنی و تولیدمثلی مرتبط است. حجم مایع صفاقی بسته به شرایط فیزیولوژیکی و نیز پاتولوژیکی از ۵ تا ۲۰ میلی لیتر متغیر است. بررسی ها نشان می دهد که در زنان مبتلا به اندومتریوز میزان مایع صفاقی افزایش می یابد که افزایش تعداد ماکروفاژهای فعال و افزایش پروستاگلاندین ها، اینترلوکین -۱، فاکتور نکروزه کننده آلفا و

پروتئازها را به همراه دارد. این عوامل سبب ایجاد محیطی سیتوتوکسیک می شوند که اثرات منفی بر بیشتر جنبه های تولید مثل دارد که از جمله سبب تغییر رشد و بلوغ فولیکول، تخریب تخمک، آسیب ساختاری DNA، کاهش بقای اسپرماتوزو، کاهش قابلیت لقاح، نقص در عملکرد لوله ها و کاهش قدرت پذیرش اندومتریوم می شود (Oral et al., 1996b).

۳) تغییر در عملکرد سیستم ایمنی

در اندومتریوم زنان مبتلا به اندومتریوز میزان لنفوسیت ها و آنتی بادی های IgA و IgG افزایش می یابد، این ناهنجاری ها می تواند قدرت پذیرش اندومتریوم و لانه گزینی^{۱۷} جنین را تحت تاثیر قرار دهد. اتوانتی بادی ها بر علیه آنتی ژنهای اندومتریوم در برخی از افراد مبتلا افزایش می یابد (Lebovic et al., 2001) و این امر سبب اختلال در لانه گزینی، حمل گامت و سایر فرایندهای تولیدمثلی می شود (Steel et al., 1984).

۴) ناهنجاری های اندوکرینی و تخمک گذاری

زنان مبتلا به اندومتریوز اغلب دارای ناهنجاری های اندوکرینی از جمله تخمک گذاری غیر طبیعی، سندرم فولیکول لوتئینیزه پاره نشده، فاز لوتئال غیر طبیعی، رشد و بلوغ غیر طبیعی فولیکول هستند (Schenken et al., 1984).

۵) لانه گزینی غیر طبیعی

کاهش میزان بیان اینترگین $\alpha_v \beta_3$ اندومتریوم در زمان لانه گزینی در زنان مبتلا به اندومتریوز گزارش شده است (Lessey et al., 1994). همچنین کاهش بسیار زیاد یک آنزیم دخیل در سنتز لیگاند اندومتریومی برای L-سلکتین در زنان نابارور مبتلا به اندومتریوز مشاهده شده است (Kao et al., 2003). این عوامل بر فرایند لانه گزینی تأثیری منفی دارند.

۶) تأثیر بر فرایند لقاح

افزایش تولید گونه های اکسیژن فعال (^1ROS) در افراد مبتلا به اندومتريوز منجر به از دست رفتن ثبات غشای اسپرمتوزوا و غیر فعال کردن آنزیم های غشایی می شود و بدین ترتیب بر قابلیت لقاح تاثیر می گذارد. کاهش تحرک اسپرم و کاهش توانایی اتصال اسپرم به ناحیه شفاف^{۱۹} نیز از عواملی هستند که بر قابلیت لقاح تاثیر گذارند (Oral *et al.*, 1996a).

۱-۵- سبب شناسی بیماری اندومتريوز

۱-۵-۱- تئوری قاعدگی رو به عقب^{۲۰} یا تئوری سمپسون^{۲۱}

بهترین تئوری در خصوص پاتوژنز بیماری اندومتريوز در سال ۱۹۲۷ توسط فردی به نام سمپسون ارائه شد که بیان می کند اندومتريوز در نتیجه برگشت تکه های اندومتريومی ریزش یافته در طی قاعدگی از طریق لوله فالوپ به حفره لگنی آغاز می شود، ایجاد این بیماری در لگن مستلزم چسبیدن قطعات اندومتريومی به اپیتلیوم صفاق یا اندامها، تهاجم به اپیتلیوم، ایجاد منبع خونی و پاسخ ایمنی پایین تر از حد طبیعی است که به میزان مناسبی قدرت پاکسازی ایمپلنتها را ندارد (Sampson, 1927) (شکل ۱-۳). دلایل حمایت کننده از این فرضیه عبارتند از:

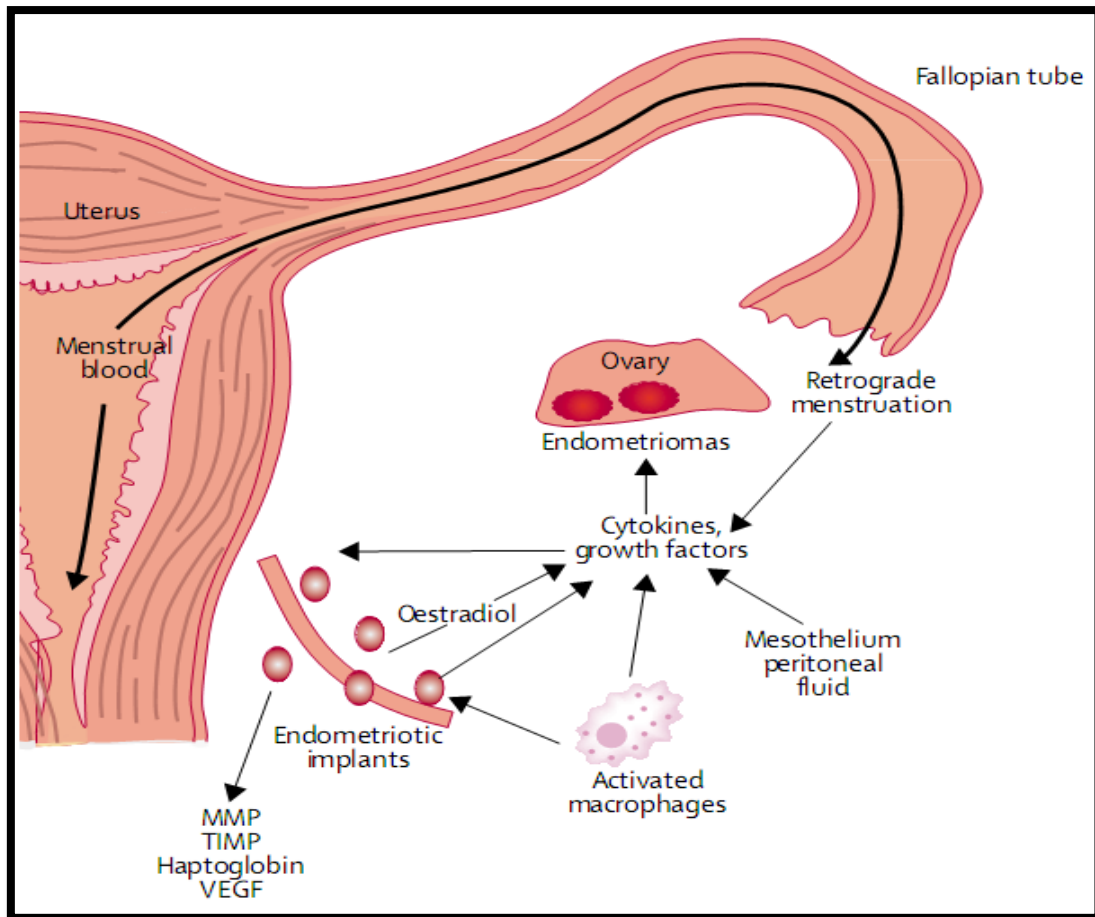
الف) در تمام زنان درجاتی از قاعدگی برگشتی وجود دارد (Halme *et al.*, 1984).

ب) وجود سلول های اندومتريومی با قابلیت بقا در جریان قاعدگی و در مایع صفاقی (Keettel and Stein, 1951).

پ) شیوع بالای اندومتريوز لگنی در زنان مبتلا به انسداد مادرزادی مسیر خروج جریان قاعدگی (Sanfilippo *et al.*, 1986).

این نظریه اندومتريوز داخل لگنی را به خوبی توضیح می دهد اما پاسخی برای بروز اندومتريوز خارج لگنی ندارد و به این سوال نیز پاسخ نمی دهد که با توجه به اینکه قاعدگی برگشتی یک رویداد فیزیولوژیکی معمول در اکثر زنان است، چرا اندومتريوز فقط در ۱۵-۱۰٪ از جمعیت کل زنان ایجاد می شود (Vigano *et al.*, 2004). همچنین این تئوری قادر به توضیح ابتلای دختران نابالغ و زنان یائسه به این بیماری نمی باشد، هر چند فراوانی ابتلای این افراد به اندومتريوز بسیار کم است (Barton-Smith *et al.*, 2006).

- 1- Reactive oxygen species
- 2- Zona Pellucida
- 3- Retrograde Menstruation
- 4- Sampson



شکل ۱-۳: تصویر مربوط به تئوری قاعدگی برگشتی (Giudice and Kao, 2004).

۱-۵-۲- تئوری متاپلازی سلومی^{۲۲}

این تئوری در سال ۱۹۱۹ توسط Meyer پیشنهاد شد که بیان می کند که آسیب شدید در حفره صفاقی بوسیله عفونت ها یا مواد شیمیایی سبب القا متاپلازی سلول های همه توان و تبدیل به بافت اندومتریوم می شود. اطلاعات کلینیکی و تجربی در حمایت از این فرضیه اندک است و این حقیقت که اندومتریوز عمدتاً وقتی رخ می دهد که اندومتریوم وجود دارد و این که مردان به این بیماری مبتلا نمی شوند، قدرت مفهوم متاپلازی را برای توضیح اندومتریوز ضعیف می کند (Ramey and Archer, 1993).

۱-۵-۳- تئوری القا^{۲۲}

- 1- Coelomic Metaplasia Theory
- 2- Induction Theory

تئوری القا مکمل نظریه متاپلازی سلومیک است. طرفداران این نظریه معتقدند که سلول های اندومتريومی برگشتی به حفره صفاقی فاکتورهای درون زا آزاد می کنند که سبب تحریک متاپلازی سلولهای تمایز نیافته صفاق و اندامها و ایجاد بافت اندومتريومی می شود (Levander and Normann, 1955).

۱-۵-۴- تئوری پیوند مستقیم^{۲۴}

این تئوری برای توجیه اندومتريوز خارج لگنی مطرح می شود و پیشنهاد می کند که اندومتريوز از مهاجرت سلول های اندومتري توسط عروق خونی یا رگ های لنفاوی طی سزارین یا اعمال جراحی ایجاد می شود (Bergqvist, 1993).

۱-۶- ارتباط بیماری اندومتريوز با سرطان

بررسی ها نشان می دهد ریسک ابتلا به انواع سرطان ها به خصوص سرطان های تخمدان و سینه در زنان مبتلا به اندومتريوز بالاتر است. رویداد اندومتريوز همراه با سرطان تخمدان و کارسینوماي clear – cell (۴۱٪) و اندومتريوئید (۳۸٪) تبدیل ترکیبات اندومتريوزی به سلول های توموری را پیشنهاد می کند. این تبدیل می تواند در نتیجه فقدان هتروزیگوسیتی^{۲۵} و جهش در ژن های سرکوبگر تومور^{۲۶} باشد. همانند سرطان، اندومتريوز ویژگی های انحراف از حالت طبیعی^{۲۷}، چسبیدن، تهاجم و متاستاز را نشان می دهد (Giudice and Kao, 2004).

تشابهات ژنتیکی و مولکولی اندومتريوز و سرطان

۱-۶-۱- خودکفایی در سیگنال های رشد

همانند سرطان رحم و سینه، اندومتريوز مثل یک نئوپلاسم وابسته به استروژن رفتار می کند و به طور ویژه ای با پیام رسانی تحریکی توسط استروژن سازگار شده است از جمله می توان به موارد زیر اشاره کرد:

الف) افزایش تولید موضعی استروژن از طریق افزایش بیان سیتوکروم P450 آروماتاز و کاهش بیان ۱۷بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز نوع ۲ (Bulun *et al.*, 2000b).

ب) افزایش پاسخ به استروژن از طریق افزایش بیان گیرنده ی استروژن ($ER\alpha$) در ضایعات فعال (قرمز) اندومتريوز در مقایسه با ضایعات غیرفعال (سیاه) (Matsuzaki *et al.*, 2001).

- 3- Direct transplantation
- 4- Loss of heterozygosity
- 1- Tumour suppressor genes
- 2- Atipia

ج) پلی مورفیسیم های ژنتیکی وراثتی در گیرنده های استروژن و پروژسترون که زمینه را برای ابتلا به اندومتريوز مهیا می کند (Kitawaki *et al.*, 2001; Wieser *et al.*, 2002).

د) افزایش پلی مورفیسیم ژنی وراثتی در آنزیم های متابولیز کننده ی دارو (CYP1A1 , CYP19 , GSTM1) که فرد را مستعد ابتلا به اندومتريوز (Baranova *et al.*, 1999; Nakago *et al.*, 2001) و سرطان های اندومتروئید و تخمدان می کنند (Baxter *et al.*, 2001).

۱-۶-۲- عدم حساسیت به سیگنال های ضد تکثیر

تقسیم سلولی بستگی به فعالیت سایکلین ها^{۲۸} دارد که این سایکلین ها به کینازهای وابسته به سایکلین (cdk)^{۲۹} متصل شده شده و سبب القا پیشرفت چرخه سلولی می شود. فعالیت کنترل نشده cdk ها اغلب منجر به سرطان در انسان می شود. کاهش عملکرد فاکتورهای مهارکننده cdk در سرطان سبب پیشرفت غیر طبیعی چرخه سلولی می شود (Matsuzaki *et al.*, 2001). در بافت های اندومتريوزی نوعی مقاومت به اثر ضد تکثیری پروژسترون وجود دارد. اثر ضد تکثیری پروژسترون بر روی اندومتريوم بوسیله ایزوفرم A کنترل می شود و فعال شدن ایزوفرم B در نبود گیرنده نوع A منجر به افزایش تکثیر در اپیتلیوم می شود. نسبت بیان ایزوفرم A به B برای پاسخ سلول به پروژسترون حائز اهمیت است، این نسبت در افراد مبتلا به اندومتريوز کاهش می یابد و منجر به تکثیر نابجا در ضایعات اندومتريوزی می شود (Costa *et al.*, 2011).

۱-۶-۳- مقاومت به آپوپتوز

مرگ سلولی برنامه ریزی شده فرایند فیزیولوژیکی اساسی است. در زنان سالم بیشتر سلول های اندومتريومی ریزش یافته در زمان قاعدگی متحمل آپوپتوز می شوند و باقی نمی مانند. در زنان مبتلا به اندومتريوز میزان سلول های قاعدگی که متحمل آپوپتوز می شوند به میزان زیادی کاهش می یابند (Gebel *et al.*, 1998). کاهش آپوپتوز می تواند منجر به بقا و کاشته شدن سلول های اکتوپیک شود (Dmowski and Braun, 2004). از جمله عواملی که سبب کاهش آپوپتوز می شود، می توان به موارد زیر اشاره کرد:

الف) افزایش بیان Bcl-2 به عنوان یک فاکتور ضد آپوپتوز و کاهش بیان فاکتور پروآپوپتوزی BAX (Meresman *et al.*, 2000).

3- Cyclins

4- Cyclin – dependent Kinases

ب) غیرفعال سازی ژن P53 توسط جهش. P53 یک ژن سرکوبگر تومور (TSG) است که پروتئین کد شده توسط این ژن (TP53) پرو آپوپتوزی است (Bischoff *et al.*, 2002).

۱-۶-۴- عدم محدودیت در تکثیر و همانند سازی

تومورها معمولاً آنزیم تلومراز را بیان می کنند که تلومرها را از کوتاه شدن حفظ می کند و بدین ترتیب مانع پیری سلولی می شود. استروژن و پروژسترون باعث تحریک و تاموکسیفن باعث مهار فعالیت تلومراز در سلولهای سرطان سینه و اندومتريوم می شوند (Vidal *et al.*, 2002). اگرچه هیچ مدرکی در مورد عملکرد تلومراز در اندومتريوز منتشر نشده، جالب توجه است که نئوپلاسم های وابسته به استروژن ذاتاً مستعد به کنترل تلومراز هستند (Varma *et al.*, 2004).

۱-۶-۵- تقویت آنژیوژنز

مشاهدات در زمان لاپاراسکوپی نشان می دهند که بیشتر ضایعات اندومتريوزی توسط عروق خونی احاطه شده اند و ضایعات وسیعتر در نواحی که منبع خونی غنی تری دارند رشد می کنند (Vernon and Wilson, 1985). بررسی ها پلی مورفیسم های ژنتیکی در ژن های واسط آنژیوژنز در اندومتريوز و سرطان را نشان می دهند (Vigano, 2003).

۱-۶-۶- تهاجم بافتی و متاستاز

تومورها پروتئازهای مثل ماتریکس متالوپروتئینازها (MMP^۲) را برای تخریب غشای پایه و استرومای احاطه کننده ترشح می کنند. تشکیل اولیه ضایعات اندومتريوزی نیز رویدادی تهاجمی است که نیازمند تخریب ماتریکس خارج سلولی است و تخریب و بازسازی ماتریکس خارج سلولی عمدتاً توسط MMP ها تنظیم می شود. بیان ماتریکس متالوپروتئینازهای مثل MMP2 و MMP9 در بسیاری از سرطان ها مشاهده شده است (Mizumoto *et al.*, 2002) و همچنین فعالیت MMP در ضایعات اندومتريوزی در حد بالایی تنظیم شده است. افزایش بیان MMP ها در ایمپلنتهای نابجا به آنها قابلیت بیشتری برای تهاجم می دهد (Collette *et al.*, 2004).

۱-۷- تشخیص بیماری

۱-۷-۱- راههای غیر تهاجمی