

## بررسی میزان بیان ژن‌های کدکننده ژلاتینازها در بیماران مبتلا به آندومتریوز

سپیده موسی‌زاده<sup>۱\*</sup>، فاطمه خاکسار<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت ۱۳۹۶/۰۸/۱۸ تاریخ پذیرش ۱۳۹۶/۱۱/۰۲

## چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** آندومتریوز یکی از بیماری‌های تهاجمی اما خوش‌خیم زنان است که به‌صورت حضور غدد و استرومای آندومتریال در خارج از حفره‌ی رحم شکل می‌گیرد. برای چسبیدن، تهاجم و گسترش قطعات آندومتریال، باید تغییر وضع وسیعی در لایه مزوتلیال صفاقی وجود داشته باشد، که همانند قاعدگی نرمال، این تغییر وضع نیازمند فعال شدن ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) است. ماتریکس متالوپروتئینازها خانواده‌ای از اندوپتیدازهای وابسته به روی هستند که نقش مهمی در تخریب و تغییر ماتریکس خارج سلولی (ECM) دارند. این‌طور پیشنهاد شده است که شاید افزایش در میزان بیان *MMP-2* و *MMP-9* (ژلاتینازها)، بافت آندومتری را قادر سازند تا ECM صفاقی و بافت پیوندی زیرین آن را هضم کرده و باعث ایجاد قدرت چسبندگی و تهاجم در بافت آندومتری برای ایجاد بیماری آندومتریوز گردد.

**مواد و روش‌ها:** برای این منظور، میزان بیان *MMP-2* و *MMP-9* در بافت‌های اکتوپیک و یوتوپیک مربوط به ۲۰ فرد مبتلا به بیماری آندومتریوز که در پژوهشگاه رویان تحت عمل لاپاروسکوپی قرار گرفته بودند و ۲۰ عدد بافت آندومتر مربوط به افراد کنترل انجام شد. cDNA از RNA های استخراج‌شده سنتز گردید و با فن Real time-PCR میزان بیان *MMP-2* و *MMP-9* سنجیده شد.

**یافته‌ها:** در مطالعه حاضر، افزایش بیان ژن کدکننده *MMP-2* در بافت‌های اکتوپیک و یوتوپیک نسبت به افراد کنترل مشاهده گردید، که بررسی‌های آماری انجام‌شده، تفاوت معنی‌داری را در بین گروه‌ها نشان نداد ( $P > 0.05$ ). همچنین، میزان بیان ژن کدکننده *MMP-9* در بافت‌های اکتوپیک در مقایسه با بافت‌های کنترل و یوتوپیک افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $P = 0.014$ ,  $P = 0.012$ ). میزان بیان *MMP-9* در بافت‌های یوتوپیک نیز در مقایسه با بافت‌های کنترل بیشتر بود که بررسی‌های آماری تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ( $P > 0.05$ ).

**بحث و نتیجه‌گیری:** افزایش بیان در *MMP-2* و *MMP-9* در بافت اکتوپیک بیماران مبتلا به آندومتریوز می‌تواند باعث افزایش قدرت چسبندگی، تهاجم و آنژیوژنز در بافت‌های موردنظر شده و باعث عود و تشدید بیماری آندومتریوز گردد.

**کلیدواژه‌ها:** بیماری آندومتریوز، ماتریکس متالوپروتئینازهای ۲ و ۹، ژلاتینازها، ماتریکس خارج سلولی (ECM)

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هشتم، شماره دوازدهم، ص ۸۰۴-۷۹۵، اسفند ۱۳۹۶

**آدرس مکاتبه:** مرکز درمان ناباروری قفقاز، خیابان دادگستری، میدان شهدا (بیمارستان بوعلی)، جنب مرکز مخابرات شهید قندی، اردبیل، ایران. کد پستی: ۰۴۵۳۳۲۶۱۲۲۵-۶. تلفن: ۵۶۱۳۶۱۴۴۹۱

Email: smousazadeh77@gmail.com

## مقدمه

یکی از بیماری‌های تهاجمی اما خوش‌خیم زنان است که به‌صورت وجود غدد آندومتریال و استرومای رحم در بیرون از آندومتر و عضله رحم، و در سطوح صفاقی و احشایی داخل لگن خانم‌ها شکل می‌گیرد و حدود ۲۰-۱۵ درصد از زنان در سنین باروری را درگیر

ناباروری به عدم موفقیت در حاملگی، بین زوج‌هایی که بدون هیچ روش پیشگیری به مدت یک سال تلاش برای بچه‌دار شدن داشته‌اند، تعریف می‌شود (۱). یکی از بیماری‌هایی که در ارتباط با ناباروری در زنان می‌باشد، بیماری آندومتریوز<sup>۳</sup> است (۲). آندومتریوز

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد، ژنتیک مولکولی، دانشگاه تبریز

<sup>۲</sup> آزمایشگاه ژنتیک، مرکز درمان ناباروری قفقاز، جهاد دانشگاهی واحد استان اردبیل، اردبیل، ایران (نویسنده مسئول)

<sup>۳</sup> دانشجوی دکتری، زیست سلولی و مولکولی، دانشگاه محقق اردبیلی

می‌سازد (۳). آندومتريوز یک بیماری چندعاملی<sup>۱</sup> است که ترکیبی از اثرات متقابل عوامل ژنتیکی و فاکتورهای محیطی باعث بروز آن می‌گردد (۳). از آنجائی که منشأ بافت نابجای آندومتريوزی و پاتوژنز آن بسیار مورد بحث است، اتیولوژی‌های مختلفی در مورد آن مطرح شده است (۴). پذیرفته‌شده‌ترین آن‌ها تئوری بازگشت خون قاعدگی<sup>۲</sup> است (۴). این تئوری، Implantation نیز نامیده می‌شود (۵) و به‌موجب آن بافت و خون قاعدگی از طریق لوله‌های فالوپ پس‌زده شده و بر روی بخش‌های لگنی قرار گرفته و شروع به رشد و تکثیر در همان ناحیه می‌کند که منجر به بروز بیماری آندومتريوز می‌گردد (۴). نظریه‌های دیگر شامل تئوری متاپلازی سلومیک<sup>۳</sup> (۴)، تئوری بقایای جنینی (۴)، متاستازی لنفی- عروقی<sup>۴</sup> (۶، ۷)، فاکتورهای هورمونی (۸)، آلودگی محیط‌زیست (۹) و زمینه‌های ژنتیکی در ابتلا به بیماری آندومتريوز می‌باشند (۳). این بیماری دارای مدل وراثتی چندعاملی و پلی ژنیک<sup>۵</sup> بوده و به‌عنوان یک بیماری که دارای زمینه خانوادگی ست شناخته شده است (۱۰، ۱۱). در مطالعه‌های انجام‌شده آندومتريوز با عدم تخمک‌گذاری، تکامل و رشد غیرطبیعی تخمک و کاهش میزان استرادیول قبل از مرحله تخمک‌گذاری همراه است (۲، ۱۲). عوامل یادشده موجب می‌شوند که مراحل فولیکولوژنز، لقاح و لانه‌گزینی جنین در خانم‌هایی که در مرحله پیشرفته بیماری هستند، دچار اشکال شود (۲). به‌گونه‌ای که شیوع آندومتريوز در زنان ناباروری که تحت عمل لاپاروسکوپی قرار می‌گیرند ۵۰-۳۵ درصد می‌باشد (۱۳). برای چسبیدن، تهاجم و گسترش قطعات آندومتريال، باید تغییر وضع وسیعی در لایه مزوتلیال صفاقی وجود داشته باشد، که همانند قاعدگی نرمال، این تغییر وضع نیازمند فعال شدن ماتریکس متالوپروتئینازها<sup>۶</sup> (MMPs) است (۱۴). ماتریکس متالوپروتئینازها یا ماتریکسین‌ها<sup>۷</sup>، خانواده‌ای از اندوپپتیدازهای وابسته به روی هستند که نقش مهمی در تخریب و تغییر ماتریکس خارج سلولی (ECM)<sup>۸</sup> دارند (۱۵). به دلیل اثرات مخرب بالقوه‌ی این آنزیم‌ها روی Microenvironment سلول، MMP ها معمولاً در مقادیر کمی بیان می‌شوند (۱۶). این‌طور پیشنهاد شده است که MMP ها بافت آندومتري می‌تواند مهاجم را قادر می‌سازند تا ECM صفاقی و بافت پیوندی زیرین آن را هضم کند (۱۷). در نتیجه، افزایش سطح MMP

ها در بافت نا به جای<sup>۹</sup> آندومتريوزی باعث تشدید فعالیت‌های رگ‌زایی<sup>۱۰</sup> و متاستازی<sup>۱۱</sup> در بافت موردنظر شده و موجب عود بیماری می‌گردد (۱۷). مهار MMPs ممکن است منافع درمانی داشته باشد که در این زمینه از مهارکننده‌های سنتتیک MMP ها استفاده می‌شود (۱۸). این مهارکننده‌ها با محدود کردن فعالیت‌های متاستازی، آنژیوژنزی و تهاجمی بافت‌های توموری از عود بیماری ایجادشده توسط MMP ها جلوگیری می‌کنند (۱۸). پروتئین ماتریکس متالوپروتئیناز ۲، ژلاتیناز نوع A، که ژن کدکننده ی آن در انسان بر روی کروموزوم ۱۶q۱۲،۲ قرار دارد (۱۹). تحقیقات نشان داده است که MMP-2 در تخریب بافت آندومتر در حین چرخه‌ی قاعدگی نقش مهمی دارد (۲۰). این آنزیم به علت فعالیت‌های پروتئولیتیکی که بر روی کلانن نوع IV موجود در غشای پایه ایفا می‌کند، می‌تواند فرآیندهایی همچون هضم غشای پایه، رگ‌زایی، چسبندگی سلول‌ها، مکانیسم‌های پروتئولیتیک، تخریب بافت‌ها، متاستاز و در نهایت فرآیندهای التهابی را تحت تأثیر قرار دهد (۲۱). پروتئین ماتریکس متالوپروتئیناز ۹، ژلاتیناز نوع B، که ژن کدکننده ی آن در انسان بر روی کروموزوم ۲۰q۱۳،۱۲ قرار دارد (۲۱). محققان نشان دادند که برای تهاجم توموری و آنژیوژنز، حضور MMP-9 در سطح سلول، لازم و ضروری می‌باشد (۲۲). بنابراین، آنزیم‌های حاصل از این خانواده ژنی می‌توانند در ایجاد آندومتريوز دخیل باشند، بنابراین بررسی میزان بیان MMPs در بیماران مبتلا به آندومتريوز و مقایسه آن با سطح بیان همین ژن‌ها در افراد نرمال می‌تواند اطلاعات پایه‌ای لازم را برای سایر مطالعاتی که در زمینه تشخیص و درمان این بیماری طراحی می‌گردند را فراهم نماید. هدف از این مطالعه بررسی میزان بیان MMP-2 و MMP-9 در بافت آندومتريوماي بیماران مبتلا به آندومتريوز در مقایسه با بافت آندومتر گروه کنترل می‌باشد، که این مطالعات می‌تواند چشم‌اندازهای خوبی را برای پیشبرد اهداف درمانی ایجاد نماید.

## مواد و روش کار

این طرح با همکاری آزمایشگاه‌های ژنتیک و ناباروری زنان پژوهشگاه رویان انجام شد. ۲۰ فرد از بیمارانی (Stage III, IV) که

<sup>7</sup> Matrixins

<sup>8</sup> Extra Cellular Matrix

<sup>9</sup> Ectopic

<sup>10</sup> Angiogenesis

<sup>11</sup> Metastasis

<sup>1</sup> Multifactorial

<sup>2</sup> Retrograde Menstruation

<sup>3</sup> Coelomic Metaplasia Theory

<sup>4</sup> Lymphovascular Metastasis Theories

<sup>5</sup> Polygenic

<sup>6</sup> Matrix Metalloproteinase

به مدت ۵-۷ دقیقه در دمای  $65^{\circ}\text{C}$  انکوبه شدند تا موجب غیرفعال شدن آنزیم DNase I گردد. در مطالعه حاضر به منظور سنتز cDNA از کیت سنتز (K1632- Fermentas, Thermo cDNA scientific, Germany) و مطابق با پروتکل آن استفاده شد. سپس از طریق انجام واکنش Control-PCR کیفیت و عدم آلودگی نمونه‌های cDNA سنتز شده نسبت به DNA سنجیده شد و در نهایت cDNA های سنتز شده در دمای  $20^{\circ}\text{C}$ - نگهداری شدند.

**بررسی کمی میزان بیان MMP-2 و MMP-9 با روش Quantitative Real-time PCR:** برای بررسی میزان بیان MMP-2 و MMP-9 به‌طور کمی، پرایمرهایی با نرم‌افزارهای Primer 3، Primer Blast و Generunner طراحی گردید و کیفیت پرایمرها، در سایت‌های Primer Blast، Nucleotide Blast، UCSC (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov.com>) و UCSC (<https://genome.ucsc.edu>) چک شد. پرایمرهای  $\beta$ -Actin نیز به‌عنوان پرایمر House Keeping برای کنترل میزان بیان ژن‌ها طراحی شد. توالی و اطلاعات پرایمرها در جدول ۱ ارائه شده است. واکنش‌ها با استفاده از سایبرگرین (Applied Biosystems, USA) و سیستم آشکارساز (Applied Biosystems, USA) SYBR<sup>®</sup> 7500 انجام شد. هر واکنش دارای  $10\ \mu\text{l}$  از Premix Ex Taq II،  $5\ \text{pmol}$  از پرایمر MMP-9 یا  $3\ \text{pmol}$  از پرایمر MMP-2 و  $25\ \text{ng}/\mu\text{l}$  از cDNA سنتز شده بود که با آب به حجم  $20\ \mu\text{l}$  رسانیده شد. غلظت پرایمرهای  $\beta$ -Actin نیز برابر با غلظت همان پرایمر بیانی، برای هر واکنش در نظر گرفته شد. هر واکنش با شرایط دمایی واسرشت شدن ابتدایی در  $95^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد به مدت  $10$  دقیقه و در ادامه،  $40$  چرخه شامل  $95^{\circ}\text{C}$  درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت  $15$  ثانیه و  $60^{\circ}\text{C}$  درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت  $1$  دقیقه انجام شد. برای افزایش دقت، تمامی واکنش‌ها  $2$  بار تکرار و در هر بار آزمایش کنترل مثبت و منفی نیز انجام شد. اطلاعات به‌دست‌آمده به‌وسیله نرم‌افزار 7500 نسخه 2.0.1 پردازش شد. در نهایت با استفاده از نتایج به‌دست‌آمده، مقادیر CT (چرخه‌ای که مقدار فلورسانس از مقدار زمینه بالاتر می‌روز) محاسبه شد.

به مرکز مراجعه می‌کردند و در سونوگرافی مشکوک به وجود کیست آندومتریومی تخمدانی (جدار کیست تخمدان) بودند و یا افرادی که مبتلا به درد مزمن لگنی بدون تشخیص قطعی بودند، تحت عمل لاپاروسکوپی قرار گرفتند و در صورت تأیید با دیدمستقیم و سپس تأیید بافت‌شناسی، مبنی بر تشخیص آندومتریوز، در مطالعه وارد شدند. بافت آندومتریومی (آندومتریوز تخمدانی) بیماران مبتلا به آندومتریوز که از طریق بخش درمان پژوهشگاه رویان تحت عمل لاپاراسکوپی قرار گرفته بودند، طی سال‌های ۹۳-۱۳۹۲ جمع‌آوری شد. همچنین از این افراد، نمونه بافت آندومتر (یوتوپیک) نیز با استفاده از پایپل برداشته شد. گروه کنترل  $20$  خانم با سیکل قاعدگی منظم و بدون علائم بیماری آندومتریوز بودند که حداقل دارای یک فرزند به‌طور طبیعی بوده و نیز به بیماری‌های التهابی، خود ایمنی، اندوکراین و سرطان‌ها نیز مبتلا نبودند. از این افراد نیز نمونه بافت آندومتر با استفاده از پایپل در همین مرکز برداشته شد. برای هر دو گروه بیمار و کنترل، فرم رضایت‌نامه از همکاری در طرح و اطلاع از اینکه اسامی و اطلاعات فردی آن‌ها در اختیار عموم قرار نمی‌گیرد توسط فرد مطالعه و امضاء شد که در پژوهشگاه رویان نگهداری می‌گردد. هر بافت به قطعات  $100-50\ \text{mg}$  تقسیم گردید. سپس به‌منظور محافظت از ماده ژنتیکی بافت و نگهداری بهتر آن، حدوداً  $500$  میکرولیتر مایع RNA Later بر روی نمونه‌ها ریخته شد. بلافاصله بافت‌ها به فریزر  $-80^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

**استخراج RNA و سنتز cDNA:** استخراج RNA از نمونه بافت‌های فریز شده توسط تریزول (Invitrogen, USA) و مطابق با پروتکل انجام شد. برای بررسی کمی و کیفی خلوص RNA های استخراج‌شده از دستگاه نانودراپ (Thermo scientific) استفاده شد. برای انجام مراحل بعدی، نمونه‌های RNA باید عاری از آلودگی نسبت به DNA ژنومی باشد. قبل از سنتز cDNA نمونه‌های RNA استخراج‌شده توسط آنزیم DNase I (Fermentas, DNase I #EN0521) (Thermo scientific, Germany) به مدت  $30$  دقیقه در ترموستات (Eppendorf, USA) و در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  تیمار شدند. سپس  $2\ \mu\text{l}$  EDTA (Fermentas, Thermo)  $50\ \text{mM}$  (scientific, Germany) به هر یک از نمونه‌ها افزوده شد و مجدداً

**جدول (۱):** توالی پرایمر های بیانی طراحی‌شده برای ژن‌های MMP-2، MMP-9 و  $\beta$ -Actin

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول محصول PCR
$\beta$ -Actin (Forward)	5'-CAAGATCATTGCTCCTCCTG-3'	90
$\beta$ -Actin (Reverse)	5'-ATCCACATCTGCTGGAAGG-3'	
MMP-2 (Forward)	5'-GCAACCTGTTTGTGCTGAAG-3'	198
MMP-2 (Reverse)	5'-GTAGCCAATGATCCTGTATGTG-3'	
MMP-9 (Forward)	5'-TCCAGTACCGAGAGAAAGCCTA-3'	114
MMP-9 (Reverse)	5'-GCAGGATGTCATAGGTCACG-3'	

اطلاعات بالینی افراد مورد مطالعه، که نمونه بافت از آن‌ها تهیه شد، در جدول (۲) ارائه شده است. همه ۲۰ فرد مبتلا به آندومتريوز در این مطالعه نابارور بودند. فاز قاعدگی، میانگین سن و BMI (Body Mass Index) گروه بیمار و کنترل در جدول (۲) آورده شده است که آنالیزهای آماری انجام شده برای پارامترهای مذکور تفاوت معنی‌داری را در بین دو گروه مورد مطالعه نشان نداد ( $P > 0.05$ ).

**آنالیزهای آماری:** پس از جمع‌آوری داده‌ها بیان ژن‌ها در گروه بیماران آندومتريوزی (Eutopic و Ectopic) و گروه کنترل گزارش شد. برای بررسی معنی‌دار بودن داده‌ها، از نرم‌افزار SPSS و روش آماری One-Way ANOVA استفاده شد. همچنین برای مقایسه متغیرهای کیفی از آزمون کای اسکوئر استفاده شد. برای تمام آنالیزها  $P$ -value کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها**

**بررسی ویژگی‌های بالینی زنان مورد مطالعه:**

**جدول (۲):** ویژگی‌های بالینی بیماران آندومتريوزی و گروه کنترل مورد مطالعه

سن (سال)	BMI (kg/m2)	فاز قاعدگی (%)	گروه‌های مورد مطالعه
۳۰ ± ۸	۲۵/۸ ± ۵	تکثیری (۸۰) ترشحي (۲۰)	آندومتريوز (n=۲۰)
۲۹ ± ۹	۲۴/۳ ± ۴	تکثیری (۸۰) ترشحي (۲۰)	کنترل (n=۲۰)
NS	NS	NS	P-value

افزایش بیان داشتند که این افزایش نیز معنی‌دار نبود ( $P = 0.48$ ). در مقایسه بافت‌های یوتوپیک با بافت‌های اکتوپیک نیز افزایش بیان در ژن کد کننده MMP-2 مشاهده شد که این افزایش بیان نیز در بین دو گروه معنی‌دار نبود ( $P = 0.91$ ).

**بیان ژن MMP-2 در بیماران آندومتريوزی و مقایسه آن با گروه کنترل:**

طبق آنالیزهای انجام شده، بافت‌های یوتوپیک نسبت به بافت‌های کنترل افزایش در بیان ژن کد کننده MMP-2 را نشان دادند، اما تفاوت معنی‌داری در بین این دو گروه مشاهده نشد.

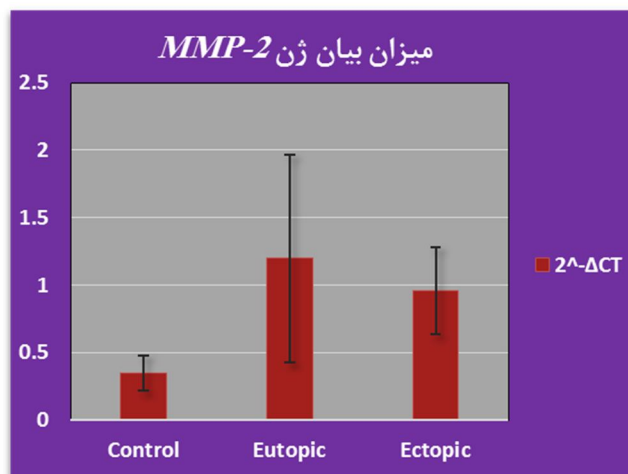
**جدول (۳):** میزان بیان MMP-2 و MMP-9 در سه نوع بافت آندومتر کنترل، یوتوپیک و اکتوپیک بیماران آندومتريوزی

ژن‌ها	بافت کنترل	بافت یوتوپیک	بافت اکتوپیک	ANOVA
MMP-2	۰/۳۵ ± ۰/۱۳	۱/۲ ± ۰/۷۷	۰/۹۶ ± ۰/۳۲	$P > 0.05$
MMP-9	۰/۰۰۱۷ ± ۰/۰۰۱	۰/۰۰۲۷ ± ۰/۰۰۱	۰/۰۱۴ ± ۰/۰۰۶	$P = 0.01$

داده‌های ارائه شده به صورت  $2^{-\Delta CT}$  means ± SEM می‌باشند.

علامت × نشانگر  $P < 0.05$  در مقایسه بافت اکتوپیک با بافت کنترل می‌باشد.

علامت Δ نشانگر  $P < 0.05$  در مقایسه بافت اکتوپیک با بافت یوتوپیک می‌باشد.



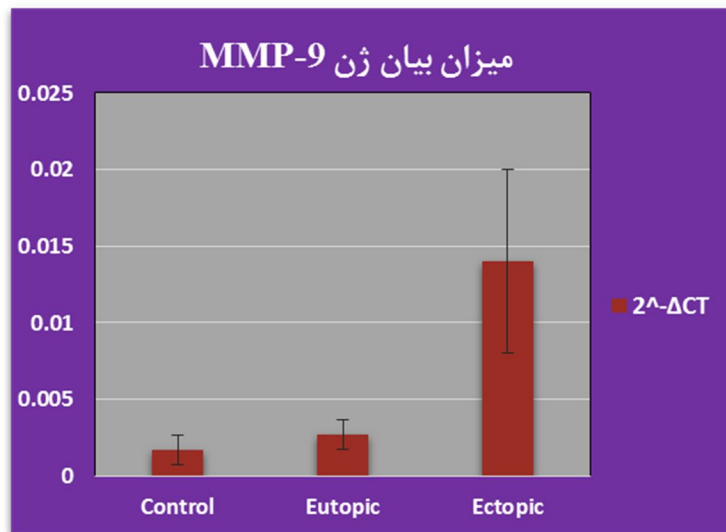
**نمودار (۱):** میزان بیان MMP-2 در سه نوع بافت آندومتر کنترل، یوتوپیک و اکتوپیک بیماران آندومتريوزی

این تفاوت را نشان داد ( $P=0/014$ ). همچنین، بافت‌های اکتوپیک در مقایسه با بافت‌های یوتوپیک نیز افزایش بیان معنی‌داری را نشان دادند ( $P=0/012$ ). لازم به ذکر است که بافت‌های یوتوپیک در مقایسه با بافت‌های کنترل بیان ژن بیشتری داشتند که این افزایش بیان معنی‌دار گزارش نشد ( $P=0/099$ ).

### بیان ژن *MMP-9* در بیماران آندومتريوزی و مقایسه آن

#### با گروه کنترل:

طبق آنالیزهای آماری انجام‌شده، بافت‌های اکتوپیک نسبت به بافت‌های کنترل افزایش چشمگیری را در میزان بیان ژن کد کننده *MMP-9* نشان دادند، که آنالیزهای انجام‌شده نیز معنی‌دار بودن



نمودار (۲): میزان بیان *MMP-9* در سه نوع بافت آندومتر کنترل، یوتوپیک و اکتوپیک بیماران آندومتريوزی

### بررسی تأثیر و نقش *MMP-2* در بروز بیماری آندومتريوز:

نقش *MMP-2* در ابتلا به بیماری آندومتريوز هنوز در حال بحث و بررسی است. تحقیقات نشان داده است که *MMP-2* در تخریب بافت آندومتر در حین چرخه‌ی قاعدگی نقش مهمی دارد (۲۰). بیان *MMP-2,9* به فاز قاعدگی محدود نمی‌شود و فعالیت آن‌ها نیاز به کنترل در دیگر فازهای چرخه نیز دارد (۲۳). پروتئین *MMP-2* در بافت رحمی به هر دو فرم نهفته و فعال در طی چرخه یافت می‌شود و فرم فعال *MMP-2* در فاز قاعدگی بسیار فراوان است (۲۳). این آنزیم به علت فعالیت‌های پروتئولیتیکی که بر روی کلاژن نوع IV موجود در غشای پایه ایفا می‌کند، می‌تواند فرآیندهایی همچون هضم غشای پایه، رگ زایی، چسبندگی سلول‌ها، مکانیسم‌های پروتئولیتیک، تخریب بافت‌ها، متاستاز و درنهایت فرآیندهای التهابی را تحت تأثیر قرار دهد (۲۴). همچنین این آنزیم‌های پروتئولیتیک کننده، نقش کلیدی را در کنترل وقایع تولیدمثلی، همچون تخمک‌گذاری، لانه‌گزینی جنین، تنظیم سیکل‌های قاعدگی و تکثیر آندومتر بر عهده دارد (۲۴). عدم تعادل در میزان بیان این آنزیم، می‌تواند با دخالت در فرآیندهای بیولوژیکی ذکرشده، تشدید و عود بسیاری از بیماری‌ها را سبب شود (۲۵-۲۷).

### بحث و نتیجه‌گیری

به‌طور کلی هدف از این تحقیق مقایسه بیان ژن‌ها به دو حالت مختلف می‌باشد: ۱- مقایسه بیان ژن در بافت یوتوپیک فرد بیمار با بافت اکتوپیک در همان فرد. ۲- مقایسه بیان ژن در بافت اکتوپیک فرد بیمار با بافت آندومتر فرد کنترل. هدف دو روش فوق متفاوت است. زمانی که بافت‌های یوتوپیک و اکتوپیک در بیماران مقایسه می‌شوند، هدف شناسایی ویژگی‌های منحصربه‌فردی از بافت اکتوپیک است که می‌تواند در درک دقیق پاتولوژی بیماری کمک نماید و ممکن است هدف یافتن فاکتورهایی باشد که در زمان آزادسازی قطعات آندومتر از رحم، باعث ایجاد آندومتريوز می‌شوند (در حمایت از این تئوری که بافت اکتوپیک زنان مبتلا به آندومتريوز در مقایسه با بافت یوتوپیک آن‌ها متفاوت است). از طرف دیگر هنگامی که مقایسه بیان ژن‌ها در بافت اکتوپیک و آندومتر رحمی فرد کنترل صورت می‌گیرد، ممکن است هدف دستیابی به پارامترهای تشخیصی برای تعیین احتمال ابتلا به بیماری آندومتريوز باشد. در این بررسی‌ها شناسایی ژن‌هایی که بیان آن‌ها کم یا زیاد می‌شود، ممکن است بتواند در تعیین مکانیسم پاتوژنز بیماری کمک‌کننده باشد.

می‌کند. در نتیجه مایع فولیکولی اطراف تخمک بر فرآیند لقاح و رشد جنین تأثیر می‌گذارد (۲). اثرات نامطلوب بیماری آندومتریوز بر کیفیت مایع فولیکولی اطراف تخمک سبب شده توسعه تخمک ضعیف بوده و تشکیل جنین با مشکل مواجه شود (۲). مطالعات نشان داده است که *MMP-2* و *MMP-9* در مایعات فولیکولی اثر مستقیم بر رشد فولیکول و پارگی دیواره فولیکول طی چرخه قاعدگی دارند (۳۵). سطح بالای بیان MMPs طی بیماری آندومتریوز می‌تواند محیط اطراف و مایع فولیکولی تخمک را تحت تأثیر قرار داده و باعث ناباروری حاصل از آندومتریوز گردد (۳۶). مطالعات نشان داده است که آنزیم‌های پروتئولیتیک در رشد عروق و آنژیوژنز نیز دخیل هستند (۳۷). بررسی‌های صورت گرفته نیز افزایش بیان *MMP-9* را در بافت‌های اکتوپیک نسبت به بافت‌های یوتوپیک نشان داده است. سطح بالای *MMP-9* طی بیماری آندومتریوز، ممکن است در بافت‌های خارج رحمی نقش مهمی در تهاجم و لانه‌گزینی بافت‌های آندومتری در موقعیت نا به جا را داشته باشد (۳۳). همچنین مطالعات انجام شده کاهش اووسیت‌های بالغ و در نهایت کاهش کیفیت جنین را در اثر افزایش بیان *MMP-2* و *MMP-9* در بیماران آندومتریوزی که تحت IVF قرار گرفته بودند را نشان داده است (۳۳). افزایش بیان *MMP-2* و *MMP-9* می‌تواند تأثیر بسزایی بر Microenvironment فولیکول‌های در حال بلوغ داشته و کیفیت اووسیت و جنین حاصل از آن را تحت تأثیر قرار دهد. در نتیجه، همین تغییرات می‌توانند موجب ناباروری حاصل از بیماری آندومتریوز گردند.

یکی از عمده‌ترین علل ناباروری در زنان، بیماری آندومتریوز است. این بیماری موجب عدم تخمک‌گذاری، تکامل و رشد غیرطبیعی تخمک و کاهش میزان استرادیول در مرحله قبل از تخمک‌گذاری می‌گردد. بیماری آندومتریوز یک بیماری التهابی است که خروج بافت آندومتر از لوله‌های رحمی، طی فرآیند قاعدگی پس رونده، علت اصلی روند ایجاد بیماری به حساب می‌آید. بافت آندومتر خارج شده معمولاً در سطح لگن و یا صفاق قرار گرفته و یکسری عوامل مستعدکننده باعث ایجاد قدرت تهاجم و چسبندگی در بافت موردنظر می‌گردد. چسبیدن، تهاجم و گسترش قطعات آندومتریال، نیازمند فعال شدن MMPها است. افزایش میزان بیان پروتئین‌های این خانواده آنزیمی در بافت نا به جای آندومتریوزی در تحقیقات گذشته تأیید شده است. در این مطالعه نیز فرض بر آن بود که تغییرات ژنتیکی می‌تواند باعث افزایش میزان بیان *MMP-2* و *MMP-9* در این بیماری گردد. در مطالعه حاضر، افزایش بیان *MMP-2* در بافت‌های اکتوپیک و یوتوپیک نسبت به افراد کنترل مشاهده شد که این افزایش به لحاظ آماری معنی‌دار گزارش نشد. در صورتی که، افزایش معنی‌داری در بیان ژن کدکننده *MMP-9* در

بر طبق مطالعات انجام‌شده، بافت اکتوپیک در مقایسه با بافت یوتوپیک رحمی ظرفیت بسیار بالایی جهت تولید *MMP-2* را دارا می‌باشد (۲۸). تحقیقات نیز، الگوهای تغییریافته‌ی بیان *MMP*ها و *TIMP*ها را در بافت‌های اکتوپیک و یوتوپیک گزارش کرده‌اند (۲۹). نتایج نشان داده است که پروتئین‌های *MMP-1,2*، در بافت‌های یوتوپیک در مقایسه با بافت نرمال به میزان بالایی بیان می‌شوند، و بیان پروتئین‌های *TIMP-1,2* در بافت بیماران به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد (۲۹). از طرفی مطالعات انجام شده نشان داده است که *MMP-1,2* دچار افزایش بیان در بافت‌های اکتوپیک و یوتوپیک در مقایسه با آندومتر افراد نرمال می‌شوند، که تفاوت‌های بیانی این فاکتورها، در افراد بیمار و کنترل به‌طور چشمگیری معنی‌دار می‌باشد (۳۰). نتایج حاصل از این تحقیق نیز نشان داد که میزان بیان *MMP-2* در بافت یوتوپیک و اکتوپیک بیماران آندومتریوزی نسبت به آندومتر افراد سالم افزایش می‌یابد که بر طبق آنالیزهای آماری انجام‌شده، این افزایش در بین گروه‌ها معنی‌دار نبود. بنابراین افزایش بیان *MMP-2* در بافت آندومتریومای بیماران آندومتریوزی در مقایسه با گروه کنترل می‌تواند منجر به پروتئولیز ماتریکس خارج سلولی و تخریب ماتریکس بینابینی بافت میزبان (تخمدان) شده و موجب افزایش تهاجم سلولی در بافت اکتوپیک گردد.

### بررسی اهمیت و نقش *MMP-9* در ابتلای به بیماری

#### آندومتریوز:

محققان نشان داده‌اند که بافت‌های اکتوپیک و یوتوپیک مربوط به بیماران آندومتریوزی قدرت تهاجم و تمایل به لانه‌گزینی بیشتری را در صفاق نشان می‌دهند و این به علت افزایش در میزان بیان *MMP-9* و کاهش در سطح بیان *TIMP-3* در مقایسه با آندومتریوم زنان سالم می‌باشد (۳۱). بیان *MMP-9* mRNA توسط پروژسترون مهار می‌شود (۲۳). باین وجود، پروتئین آن در طی چرخه قاعدگی، در بافت رحمی دیده می‌شود و *MMP-9* فعال را نیز، در طی فاز قاعدگی می‌توان دید (۲۳). همچنین یک کنترل بسیار قوی برای فعالیت *MMP-9* در فازهای ترشخی و تکثیری از چرخه اعمال می‌شود (۲۳). چندین مطالعه‌ای که اخیراً انجام شده است نشان می‌دهد *MMP-9* را در متاستاز و تهاجم توموری با تأکید بیان کرده است (۱۸، ۳۲، ۳۳). در آندومتریوز نیز، فعالیت بالای ژلاتینازها در بافت‌های اکتوپیک در مقایسه با بافت‌های یوتوپیک دیده می‌شود (۳۴). طبق آنالیزهای آماری انجام شده در این مطالعه، میزان بیان *MMP-9* در بافت‌های اکتوپیک و یوتوپیک بیماران آندومتریوزی در مقایسه با بافت آندومتر افراد سالم به‌صورت چشمگیری افزایش یافته و این تغییر کاملاً معنی‌دار گزارش شد. در بافت تخمدانی مایع اطراف تخمک در حال توسعه، نقش مهمی در رشد و نمو تخمک ایفا

### تشکر و قدردانی

در پایان لازم است از تمام زنانی که در انجام این مطالعه همکاری داشتند تشکر شود. این طرح پژوهشی با همکاری آزمایشگاه‌های ژنتیک و ناباروری زنان پژوهشگاه رویان انجام شد. ضروری است تأکید شود انجام این مطالعه تنها با مساعدت خانم‌ها دکتر فریبا رضاعلی و منصوره ارومیه چی که در اتاق عمل رویان بافت‌ها را در اختیار ما قرار می‌دادند امکان‌پذیر شد. از تمام همکارانی که ما را در انجام این طرح یاری نمودند صمیمانه تقدیر و تشکر می‌کنیم.

بافت‌های اکتوپیک در مقایسه با بافت‌های کنترل و یوتوپیک مشاهده شد. این افزایش بیان می‌تواند با تشدید فرآیندهایی همچون آنژیوژنز در بافت اکتوپیک، موجب پیشرفت و تکامل بیماری گردد. همچنین افزایش فعالیت این آنزیم‌ها می‌تواند محیط اطراف تخمک و جنین را در طی لقاح و لانه‌گزینی تحت تأثیر قرار داده و موجب پیشبرد ناباروری حاصل از آندومتریوز گردد. از آنجائی که تنظیم بیان ژن‌های خانواده *MMPs* تحت کنترل هورمون پروژسترون می‌باشد و طی بیماری آندومتریوز مقاومت به پروژسترون وجود دارد و همچنین گیرنده‌ی این هورمون به‌عنوان فاکتور رونویسی در تنظیم بیان ژن‌ها نقش ایفا می‌کند، بنابراین بررسی میزان بیان و حضور گیرنده‌ی پروژسترون در بیماران آندومتریوزی پیشنهاد می‌گردد.

### References:

- Pincus G. The control of fertility: Elsevier; 2013.
- Bulletti C, Coccia ME, Battistoni S, Borini A. Endometriosis and infertility. *J Assist Reprod Genet* 2010;27(8):441-7.
- Rahmioglu N, Missmer SA, Montgomery GW, Zondervan KT. Insights into assessing the genetics of endometriosis. *Current obstetrics and gynecology reports* 2012;1(3):124-37.
- Sasson IE, Taylor HS. Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1127(1):106-15.
- Sampson JA. Intestinal adenomas of endometrial type: their importance and their relation to ovarian hematomas of endometrial type (perforating hemorrhagic cysts of the ovary). *Arch Surg* 1922;5(2):217-80.
- Giudice LC. Endometriosis. *N Engl J Med* 2010;362(25):2389-98.
- Maruyama T, Masuda H, Ono M, Kajitani T, Yoshimura Y. Human uterine stem/progenitor cells: their possible role in uterine physiology and pathology. *Reproduction* 2010;140(1):11-22.
- Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2012;98(3):511-9.
- Bruner-Tran KL, Yeaman GR, Crispens MA, Igarashi TM, Osteen KG. Dioxin may promote inflammation-related development of endometriosis. *Fertil Steril* 2008;89(5):1287-98.
- Kennedy S. The genetics of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;82(2):129-33.
- Hansen KA, Eyster KM. Genetics and genomics of endometriosis. *Clin Obstet Gynecol* 2010;53(2):403.
- Lin X, Wei M, Tong X, Xu W, Zhou F, Huang Q, et al. Outcome of in vitro fertilization in endometriosis-associated infertility: a 5-year database cohort study. *Chin Med J (Engl)* 2012;125(15):2688-93.
- Macer ML, Taylor HS. Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2012;39(4):535-49.
- Braundmeier A, Fazleabas A, Lessey B, Guo H, Toole B, Nowak R. Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates metalloproteinases in human uterine endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(6):2358-65.
- Szamatowicz J, Ludański P, Tomaszewska I. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1: a possible role in the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reproduction* 2002;17(2):284-8.
- Chernov AV, Strongin AY. Epigenetic regulation of matrix metalloproteinases and their collagen

- substrates in cancer. *Biomol Concepts* 2011;2(3):135-47.
17. Chevronnay HPG, Selvais C, Emonard H, Galant C, Marbaix E, Henriet P. Regulation of matrix metalloproteinases activity studied in human endometrium as a paradigm of cyclic tissue breakdown and regeneration. *Biochim Biophys Acta* 2012;1824(1):146-56.
  18. Amălinei C, Căruntu I-D, Giușcă SE, Bălan RA. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol* 2010;51(2):215-28.
  19. Huhtala P, Chow LT, Tryggvason K. Structure of the human type IV collagenase gene. *J Biol Chem* 1990;265(19):11077-82.
  20. Irwin J, Kirk D, Gwatkin R, Navre M, Cannon P, Giudice L. Human endometrial matrix metalloproteinase-2, a putative menstrual proteinase. Hormonal regulation in cultured stromal cells and messenger RNA expression during the menstrual cycle. *J Clin Invest* 1996;97(2):438.
  21. Huhtala P, Tuutila A, Chow L, Lohi J, Keski-Oja J, Tryggvason K. Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92-and 72-kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells. *J Biol Chem* 1991;266(25):16485-90.
  22. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- $\beta$  and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000;14(2):163-76.
  23. Gaide Chevronnay HP, Selvais C, Emonard H, Galant C, Marbaix E, Henriet P. Regulation of matrix metalloproteinases activity studied in human endometrium as a paradigm of cyclic tissue breakdown and regeneration. *Biochim Biophys Acta* 2012;1824(1):146-56.
  24. Hadler-Olsen E, Fadnes B, Sylte I, Uhlin-Hansen L, Winberg JO. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS J* 2011;278(1):28-45.
  25. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010;141(1):52-67.
  26. Mannello F, Tonti GA, Bagnara GP, Papa S. Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24(3):475-81.
  27. Malesud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* 2006;11:1696-701.
  28. Wenzl RJ, Heinzl H. Localization of matrix metalloproteinase-2 in uterine endometrium and ectopic implants. *Gynecol Obstet Invest* 1998;45(4):253-7.
  29. Gottschal C, Malberg K, Arndt M, Schmitt J, Roessner A, Schultze D, et al. Matrix metalloproteinases and TACE play a role in the pathogenesis of endometriosis. *Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases 2*. Springer; 2002. p. 483-6.
  30. Liu R, Pu D, Yang D. Investigation of Matrix Metalloproteinase-1, 2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 in Endometriosis. *J Nanjing Med Univ* 2007;21(3):159-64.
  31. Chung H-W, Wen Y, Chun S-H, Nezhad C, Woo B-H, Polan ML. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 mRNA expression in ectopic and eutopic endometrium in women with endometriosis: a rationale for endometriotic invasiveness. *Fertil Steril* 2001;75(1):152-9.
  32. Turner H, Nagy Z, Esiri M, Harris A, Wass J. Role of matrix metalloproteinase 9 in pituitary tumor behavior. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(8):2931-5.
  33. Abhay Kumar Singh RC, Baidyanath Chakravarty, and Koel Chaudhury. Altered circulating levels of



- matrix metalloproteinases 2 and 9 and their inhibitors and effect of progesterone supplementation in women with endometriosis undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2013;100(1):127-35.
34. Liu X-J, He Y-L, Peng D-X. Expression of metalloproteinase-9 in ectopic endometrium in women with endometriosis. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2002;22(5):467-9.
35. D'Ascenzo S, Giusti I, Millimaggi D, Marci R, Tatone C, Colonna RC, et al. Intrafollicular expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in normally ovulating women compared with patients undergoing in vitro fertilization treatment. *Eur J Endocrinol* 2004;151(1):87-91.
36. Mannello F, Medda V. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. *Prog Histochem Cytochem* 2012;47(1):27-58.
37. Collette T, Bellehumeur C, Kats R, Maheux R, Mailloux J, Villeneuve M, et al. Evidence for an increased release of proteolytic activity by the eutopic endometrial tissue in women with endometriosis and for involvement of matrix metalloproteinase-9. *Hum Reprod* 2004;19(6):1257-64.

## GENE EXPRESSION LEVELS OF GELATINASES IN ENDOMETRIOSIS

Sepideh Mousazadeh<sup>1,2\*</sup>, Fatemeh Khaksar<sup>3</sup>

Received: 09 Nov, 2017; Accepted: 22 Jan, 2018

### Abstract

**Background & Aims:** Endometriosis is defined as the presence of tissue resembling endometrium outside the uterine cavity. Extensive remodeling existence in peritoneal mesothelium layer is necessary for adhesion, invasion, and proliferation of endometrial fragments, which is required the activation of matrix metalloproteinase (MMPs), as a normal menstrual cycle. MMPs are a family of zinc dependent endopeptidase that play important roles in the degradation of the extracellular matrix (ECM). It has been suggested that overexpression of *MMP-2* and *MMP-9* in endometriotic tissues may result in degradation of peritoneal ECM and providing the adhesion and invasion to develop endometriosis disease.

**Materials & Methods:** For this purpose, we studied *MMP-2,-9* expressions in ectopic and eutopic tissue samples of women undergoing laparoscopy for endometriosis and eutopic tissues of fertile women at Royan Institute. Twenty samples were used in each group and cDNAs were prepared from RNA which had been isolated from each sample. Real-time PCR was performed to measure the mRNA expression levels of *MMP-2* and *MMP-9*.

**Results:** Our results showed the overexpression of *MMP-2* in ectopic and eutopic tissues of patients compared to the control group. However, statistical analysis showed no significant differences in the expression levels of *MMP-2* between groups ( $P>0.05$ ). The expression of *MMP-9* in ectopic endometrium was significantly higher than that in eutopic and control group ( $P=0.012$ ,  $P=0.014$ ). Also, *MMP-9* had high level of gene expression in eutopic samples compared with control group, but it did not reach the level ( $P>0.05$ ).

**Conclusion:** Overexpression of *MMP-2* and *MMP-9* in ectopic tissues of endometriosis may increase the strength of adhesion, invasion, and angiogenesis in the target tissue and improve endometriosis disease.

**Keywords:** Endometriosis, Matrix Metalloproteinase-2, 9, Gelatinases, Extra cellular matrix

**Address:** Department of Genetics, School of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

**Tel:** +98533261225-6

**E-mail:** smousazadeh77@gmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2018; 28(12): 804 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup> MSc in Molecular Genetics, Department of Genetics, School of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

<sup>2</sup> Department of Genetics, Caucasus Infertility Treatment Center, Ardabil Branch, Iranian Academic Center for Education, Ardabil, Iran (Corresponding Author)

<sup>3</sup> PhD Candidate, Department of Biology, School of Basic Sciences, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran