Oestrogen and progesterone receptors in endometrial surfaces during the proliferative phase of normal menstrual cycles

Thesis Submitted for partial fulfillment of *Master Degree* in Obstetric and Gynecology

By

Amany Yehia Mohammed M. Zahran
M.B.,B.Ch.
Faculty of Medicine, Minia University

Supervisors

Prof. Dr. Mohammed Ibrahem Mohammed Amer
Professor of Obstetric and Gynecology
Faculty of Medicine, Ain Shams University

Dr. Manal Mohammed Al-Mahdy
Assistant Professor of Pathology
Faculty of Medicine, Ain Shams University

Dr. Ahmed Adel Tharwat
Lecturer in Obstetric and Gynecology
Faculty of Medicine, Ain Shams University

Faculty of Medicine
Ain Shams University
2011

مستقبلات الإستروجين و البرجيستيرون فى جداربطانة الرحم أثناء الطور الخصوبى فى السيدات منتظمات الدورة الشهرية

رسالة مقدمة من

الطبيبة/أمانى يحيى محمد محمود زهران
بكالوريوس الطب و الجراحة
كلية الطب – جامعة المنيا

توطئة للحصول على درجة الماجستير فى طب النساء والتوليد

إشراف

الأ ستاذ الدكتور/محمد ابراهيم محمد عامر
أستاذ طب النساء والتوليد
كلية الطب – جامعة عين شمس

الدكتورة/منال محمد المهدى
أستاذ مساعد الباثولوجى
كلية الطب – جامعة عين شمس

الدكتور/أحمد عادل ثروت
مدرس طب النساء والتوليد
كلية الطب – جامعة عين شمس

كلية الطب
جامعة عين شمس
2011

مقدمة

تعتبر التغيرات الدورية التى تحدث فى بطانة الرحم فى السيدات البالغات واحدة من أكثر الأحداث ديناميكية فى الأنسجة البشرية فكلا من الخلايا الطلائية و الخلايا الضامة لبطانة الرحم تتكاثر بشكل نشط و سريع خلال الطور الخصوبى من الدورة الشهرية فى حين يكون هذا التكاثر أقل وضوحا خلال الطور الإفرازى من هذه الدورة

هذا النشاط التكاثرى لخلايا بطانة الرحم يوازى فى الوقت نفسه التغير الحادث فى تركيز مستقبلات الإستروجين و البروجيسترون فى خلايا بطانة الرحم ففى الدورة الشهرية المنتظمة يكون تركيز مستقبلات الإستروجين أكثر ما يمكن فى بداية الطور الخصوبى من الدورة فى جميع أنواع خلايا بطانة الرحم ومع بداية الطور الإفرازى من هذه الدورة تقل هذه المستقبلات فى الخلايا الضامة لبطانة الرحم ، وفى منتصف الطور الإفرازى تقل هذه المستقبلات فى الخلايا الطلائية لبطانة الرحم ، ويصل تركيز مستقبلات الإستروجين إلى أدنى مستوى له قرب نهاية الطور الإفرازى للدورة الشهرية ويتبع تركيز مستقبلات البروجيسترون فى خلايا بطانة الرحم نفس النهج الذى يتخذه تركيز مستقبلات الإستروجين

تقوم الهرمونات الأنثوية (الإستروجين و البروجيسترون) بعملها عن طريق تنشيط مستقبلات خاصة بهذه الهرمونات موجودة فى نواة الخلية المستقبلة • فهرمون الإستروجين يحفز الخلية لإنتاج المزيد من المستقبلات الخاصة به وكذلك الخاصة بهرمون البروجيسترون • و فى المقابل ينشط هرمون البروجيسترون المستقبلات الخاصة به حيث تقوم مستقبلات البروجيسترون النشطة بتقليل أعداد مستقبلات الإستروجين وما يتبع ذلك من

تقليل قدرة المورثات أو الجينات الحساسة لهرمون الإستروجين مثل الجين الخاص بإنتاج مستقبلات البروجيسترون • بناء على ذلك يمكن القول أن هرمون البروجيسترون يؤدى إلى تقليل أعداد وتركيز كلا من مستقبلات الإستروجين و البروجيسترون فى خلايا الغدد الطلائية فى جدار الرحم □

فى محاولة لتوحيد قياس تركيز مستقبلات الإستروجين والبروجيسترون بين المرضى أكد Pilka , *et al.* (2006) على أن تؤخذ العينات بنفس الباحث من أماكن محددة من بطانة الرحم أثناء الأطوار المختلفة للدورة الشهرية □ فى حين استخدم باحثون آخرون مثل Hayama , *et al.*, (2002) كل بطانة الرحم للدراسة من أرحام استئصلت لوجود أورام ليفية بها ، وذلك لتجنب أى انحراف للنتائج التى قد تحدث نتيجة التوزيع المكانى التفاضلى لمستقبلات الإستروجين و البروجيسترون فى بطانة الرحم□

هدف الرسالة

هدف هذه الرسالة هو البحث عن وجود فرق أو اختلاف كمى فى تركيز مستقبلات الإستروجين و البروجيسترون فى خلايا البطانة الرحمية بين كلا من الجدار الأمامى و الخلفى للرحم أثناء الطور الخصوبى فى السيدات منتظمات الدورة الشهرية و تحليل ما إذا كان هناك دلالة إحصائية لهذا الفرق أو الإختلاف 0 وذلك عن طريق قياس التفاعل المناعى لمستقبلات الإستروجين و البروجيسترون فى بطانة الرحم بحثا عن وجود فروق مكانية فى توزيع هذه المستقبلات فى بطانة الرحم□

المرضى و طرق البحث

فى هذه الدراسة المستقبلية يتم اختيار المريضات من السيدات المترددات على وحدة التشخيص المبكر للأورام و مناظير الرحم بمستشفى عين شمس الجامعى ، حيث تشمل الدراسة ثلاثين سيدة على التوالى ممن ينطبق عليهن شروط و مواصفات الدراسة □

مواصفات اختيار المرضى للبحث :

1. أن يتراوح أعمارهن ما بين 20 – 35 عاما
2. أن تكون السيدات منتظمات الدورة الشهرية
3. ألا يكن يعانين من أى أمراض ظاهرية فى الجهاز التناسلى
4. ألا يكن يعانين من أعراض الإصابة نالكلاميديا أو تعالج قبل أخذ العينة
5. تؤخذ جميع العينات أثناء الطور الخصوبى فى الأسبوع الأول بعد الدورة الشهرية بعد أخذ موافقة مكتوبة لأخذ العينات من بطانة الرحم بالمنظار الرحمى من جميع السيدات المندرجات فى الدراسة □

طرق البحث :

يتم أخذ العينات لدراسة مستقبلات الإستروجين و البروجيسترون فى بطانة الرحم باستخدام المنظار الرحمى بواسطة الباحث نفسه الذى يأخذ العينات من أماكن ثابتة متقابلة من الجدار الأمامى و الخلفى لبطانة الرحم مستخدما جفت عينة يولج فى القناة الجانبية لمنظار الرحم □ تؤخذ جميع العينات أثناء الطور الخصوبى فى الأسبوع الأول بعد الدورة الشهرية □ وتحفظ العينات بالفورمالين و ترسل لصبغها باستخدام الصبغ المناعي لمستقبلات الإستروجين و البروجيسترون □

الصبغ المناعى لمستقبلات الإستروجين و البروجيسترون :

يتم قياس تركيز مستقبلات الإستروجين و البروجيسترون كميا فى الجدار الأمامى و الخلفى لبطانة الرحم فى كل مريضة بواسطة نفس الباحث باستخدام أسلوب الصبغ المناعى للأنسجة وذلك عن طريق قياس التفاعل المناعى لمستقبلات الإستروجين و البروجيسترون فى بطانة الرحم □

طرق الدراسة الإحصائية :

- يؤخذ المتوسط الحسابى و النسب المئوية للنتائج
- يستخدم اختبارا Paired *t* test و Wilcoxon's signed Rank test للنتائج المزدوجة لقياس وجود دلائل احصائية للنتائج حيث يعتبر $P < 0.05$ مقياسا لوجود فروق ذات دلائل احصائية هامة أو ذات مغزى □

نتائج البحث :

أكدت الطرق الإحصائية فى هذا البحث عدم وجود فرق أو اختلاف كمى فى تركيز مستقبلات الإستروجين و البروجيسترون فى خلايا البطانة الرحمية بين كلا من الجدار الأمامى و الخلفى للرحم أثناء الطور الخصوبى فى السيدات منتظمات الدورة الشهرية وذلك عن طريق قياس التفاعل المناعى لمستقبلات الإستروجين و البروجيسترون فى بطانة الرحم □ و مع كون هذه دراسة غير مسبوقة تبحث فى وجود فروق مكانية فى توزيع هذه المستقبلات فى بطانة الرحم بين كلا من الجدار الأمامى و الخلفى للرحم فإن نتائج هذه الدراسة تتفق مع أبحاث آخرون أكدوا عدم وجود فروق مكانية فى توزيع هذه المستقبلات فى بطانة الرحم على طول المحور الرأسى للرحم أو فى عنق الرحم □

Contents

ACKNOWLEDGMENT - - - - - - - - - - - - - - - - - - - I

ABBREVIATIONS - II

PROTOCOL - III

INTRODUCTION - 1

REVIEW OF LITERATURES - - - - - - - - - - - - - - - - 3

SUBJECTS, MATERIALS AND METHODS - - - - - 90

RESULTS - 97

DISCUSSION - 100

SUMMERY AND CONCLUSIONS - - - - - - - - - - - - 114

REFERENCES - 117

ARABIC ABSTRACT

Table (1): Gene Ontology (GO) classifications of clusters (Gene Clusters) (for details, see the supplemental data published on The Endocrine Society's Journals Online web site at http://endo.endojournals.org). **(Talbi S., *et al.*, 2006)**

***Cluster A.* high expression of genes in proliferative phase that are involved in**	
Biological processes	Molecular functions
cell adhesion, cell-cell signaling, cell cycle regulation, and cell division: • DNA replication, • strand elongation, • DNA metabolism, • chromatin cycle • segregation • mitosis • G1/S and G2/M transitions • DNA repair collagen metabolism ECM regulation signal transduction development regulation of enzyme ion channels	cell cycle regulation DNA synthesis steroid binding, receptor-mediated events ECM constituents

***Cluster B.* has high gene expression in ES phase and include genes that govern**	
Biological processes	Molecular functions
Metabolism and/or biosynthesis of : • cholesterol • amino acids • organic acids • acetyl coenzyme A • lipids • fatty acids • steroids • prostaglandins Transport of: • ions • peptides • carboxylic acids	variety of coenzymes, Enzymes : • hydrolases • isomerases • oxidoreductases • prostaglandin D synthase • coenzyme A carboxylase transporters

***Cluster C.*: Genes of high expression in MS phase, include genes for**	
Biological processes	Molecular functions
Cell communication Intracellular signaling cascades Negative regulation of cell proliferation Cell ion homeostasis Metabolism and synthesis of: • amino acids • organic acids • polysaccharides first appearance of genes involved in • immune response • response to chemicals, ions, wounding, and stress.	Glutathione activity Metallothionein activity variety of protein and enzyme binding Glycoprotein biosynthesis (acetyl-glucosaminyl transferase activity) Inhibition of protease activities A variety of transporters.

***Cluster D*. are genes highly expressed in LS phase and regulate:**	
Biological processes	Molecular functions
Cell motility and communication Cell adhesion/ interactions with ECM Signal transduction/ intracellular signaling cascades: • MAPK cascade Regulation of the cell cycle • cell cycle arrest • negative regulation of cell proliferation Apoptosis Cellular physiological processes, and cell activation Cleavage of cytoskeletal and ECM proteins Icosanoid biosynthesis. Endocytosis, phagocytosis Blood coagulation/ hemostasis Immune response: • regulation of lymphocyte and T-cell differentiation and activation, • cellular and humoral immune responses • antimicrobial humoral response • NK cell activity Responses to inflammation, pathogens, chemicals and xenobiotics, and wounding Chemotaxis	Binding: • Carbohydrate • Protein • Cytokine • Ig Receptor binding: • IL-1 receptor • TGFβ receptor Protease and protease inhibitor activity regulation Cyclin-dependent protein kinase inhibitory activity Signal transduction activity Icosanoid and prostanoid receptor activity Thromboxane receptor activity, Hematopoietic/interferon-class cytokine receptor activity

Wound healing	

Table (2): Relative gene expression across the cycle

Pairwise comparisons of genes expressed in distinct phase transitions of the menstrual cycle

Cycle Phase Transition	pairwise comparisons	significantly up-regulated genes and ESTs	significantly down-regulated genes and ESTs
PE → ESE	ESE *vs.* PE	1589	1470
ESE →MSE	MSE *vs.* ESE	1415	1463
MSE →LSE	LSE *vs.* MSE	1190	1027

(Talbi S., *et al.*, 2006)

Cycle Phase Transition	pairwise comparisons	significantly up-regulated genes	significantly down-regulated genes
ME→PE	LPE *vs.* ME	282	512

(Punyadeera C, *et al.*, 2005)

Abbreviations:

ESE	Early-secretory endometrium
ESTs	expressed sequence tags
LPE	Late proliferative endometrium
LSE	Late-secretory endometrium
ME	menstrual endometrium
MSE	Mid-secretory endometrium
PE	proliferative endometrium

Table (3): Rapid effects of progesterone in target tissues

Physiological action	Cell / tissue / organism	Signalling pathway	Reference
Acrosome reaction /capacitation	Human spermatozoa	Ca^{2+} influx, Cl^- efflux, cAMP increase	Luconi M, *et al.* (2004), Kirkman-Brown JC, *et al.* (2000)
Oocyte maturation	Amphibian and fish oocytes	G-protein activation and cAMP decrease, ERK1/2 activation, PI3 kinase activation	Zhu Y, *et al.* (2003), Thomas P, *et al.* (2002), Maller JL (2001) Bagowski CP, *et al.* (2001)
Immunoregulatory function	Human T-lymphocytes	G-protein activation, K^+ channel inhibition	Dosiou C, *et al.* (2008)
Platelet aggregation	Human platelets	Ca^{2+} influx	Blackmore PF (2008) Bar J, *et al.* (2000)
Anti-apoptotic effects	Rat granulosa cells	MAPK kinase (MEK) inhibition, Ca^{2+} homeostasis, Protein kinase G activation	Peluso JJ and Pappalardo A (2004) Peluso JJ, *et al.* (2001)
Muscle contraction	Human intestinal smooth muscle cells	Ca^{2+} currents reduction	Bielefeldt K, *et al.* (1996)
Vasoreactivity	Rat vascular smooth muscle cells	Ca^{2+} influx regulation	Barbagallo M, *et al.* (2001)
Steroidogenesis and LH action	Rodent Leydig cells	Na^+ influx	El-Hefnawy T and Huhtaniemi I (1998) Rossato M, *et al.* (1999)
Lordosis	Female mice		Frye CA, *et al.* (2006)
Transepithelial resistance	Human fetal membranes	Not assessed	Verikouki CH, *et al.* (2008)
Actin cytoskeleton remodelling / cell movement	Human umbilical vein endothelial cells, human breast cancer cells	G-protein activation, PI3 kinase and RhoA/ROCK-2 cascade activation	Fu XD, *et al.* (2008a, b)
Neuroprotection	Mouse cerebral cortex, rat hippocampal neurons	PI3 kinase activation, ERK1/2 activation, Ca^{2+} influx inhibition	Cai W, *et al.* (2008) Kaur P, *et al.* (2007) Nilsen J and Brinton RD (2003)
Retinal neuronal activity	Mouse rod bipolar cells	PI3 kinase activation	Koulen P, *et al.* (2008)

INTRODUCTION

The periodic morphological changes that occur in the endometrium in adult women with regular ovulatory cycles represent one of the most dynamic series of events seen in human tissues (Hayama M, *et al.,* 2002). It is the sex steroid hormones, 17β-estradiol (E2) and progesterone (P), that drive the endometrium through the different phases of the cycle (Talbi S, *et al.*, 2006).

These hormones mediate their biological effects on target tissues through gene regulation by nuclear steroid receptors, estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR), respectively. Also 17β-E2 and P have rapid effects via a variety of signal transduction molecules and pathways that appear to be initiated from the plasma cell membrane (Edwards DP, 2005).

Acting sequentially via their cognate receptors, it is known that E2 induces and P down-regulates both ERα and PR in human functionalis endometrium (Pilka R, *et al.*, 2006; Kurita T, *et al.,* 2005). Thus the expression of endometrial ERα and PR varies temporally across the menstrual cycle (Hayama M, *et al.*, 2002; Critchley HO, *et al.,* 2001; Fukunaka K, *et al.,* 2001). Spatially, the

topographical distribution and dynamics of ER and PR are studied in radial direction in basalis layer and myometrium (Hayama M, *et al.*, 2002; Critchley HO, *et al.*, 2001; Fukunaka K, *et al.*, 2001; Noe M, *et al.*, 1999) as well as along the longitudinal axis of uterus (Noe M, *et al.*, 1999), in the endocervix (Al-Hendy A, *et al.*, 2006), and in fallopian tubes (Horne AW, *et al.*, 2009).

Two clinical observations evoked our interest to study if there is a statistically significant quantitative difference in the topographical distribution of ER and PR between anterior and posterior endometrial walls in normal cycling women. First, the commonest site of implantation and placentation, in normal setting, is the upper posterior endometrial wall, and this accounts for the occipitoanterior being the most common presentation by a fetus who faces the placenta. Second, the secretory changes observed by experienced hysteroscopist during the secretory phase are more obvious at the upper posterior wall of the endometrium. We, therefore, conducted this prospective analytic pilot study to examine if such differences between anterior and posterior wall of the normal human endometrium already exist at molecular levels of ER and PR. To our knowledge no previous studies explored this issue.

Endometrial cycle changes [Figure (1)]

The human endometrium is the anatomic prerequisite for establishing and sustaining pregnancy. It is an amazingly plastic tissue that undergoes dynamic cycles of proliferation, differentiation, breakdown and repair on monthly bases throughout the adult reproductive life. These dynamic changes occur in response to fluctuations in sex steroid hormone levels (E2 and P), and form continuum of structural and functional hormone-dependent endometrial remodelling that make up the menstrual cycle. The endometrium is composed of two layers, the functionalis and basalis. If no embryo implantation occurs, the abrupt fall in the levels of circulating E2 and P leads to the functional layer (upper two thirds of endometrium) being shed during menstruation and repaired from the basal layer that remains intact. The endometrium is consequently a site of recurrent physiological injury and repair, and within 2 weeks, the functionalis layer is completely restored by regeneration and growth under the influence of E2 during the proliferative phase of the cycle. Once the functional layer has successfully been rebuilt, the actions of P transform the estrogen primed endometrium into a receptive state that render the tissue capable of receiving an