

P R A C E O R Y G I N A L N E
*ginekologia*Zwiększone stężenie utlenionego cholesterolu
LDL w płynie otrzewnowym kobiet
z zaawansowaną endometrioząIncreased oxidized LDL cholesterol levels in peritoneal fluid of women
with advanced-stage endometriosisPolak Grzegorz¹, Mazurek Diana¹, Rogala Ewelina¹, Nowicka Aldona¹,
Derebianka-Polak Magdalena², Kotarski Jan¹¹ I Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Polska² Katedra i Klinika Psychiatrii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Polska**Streszczenie**

W wielu pracach wykazano prozapalne i prooksydacyjne właściwości płynu otrzewnowego (PO) kobiet z endometriozą. Zwiększona aktywność procesów wolnorodnikowych prowadzi do powstania utlenionego cholesterolu LDL (ox-LDL).

Cel pracy: Celem obecnej pracy była ocena stężenia ox-LDL w płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą.

Materiał i Metody: Badaniom poddano PO uzyskany podczas laparoskopii od 20 pacjentek z I/II stopniem (rAFS) endometriozy oraz 20 kobiet z III/IV stopniem zaawansowania schorzenia. Grupę referencyjną stanowiło 20 pacjentek operowanych z powodu surowicznych torbieli jajników. Stężenie ox-LDL oznaczono metodą immunoenzymatyczną (ELISA).

Wyniki: Utleniony LDL był obecny we wszystkich badanych próbkach. Stężenie ox-LDL w PO kobiet z III/IV stopniem endometriozy było istotnie statystycznie większe od obserwowanego w grupie referencyjnej ($p=0,03$), jakkolwiek nie różniło się od odnotowanego u pacjentek z I/II stopniem zaawansowania choroby ($p=0,2$). Nie wykazano znamienych statystycznie różnic w koncentracji ox-LDL w PO pomiędzy kobietami z minimalną/łagodną postacią endometriozy a grupą referencyjną ($p=0,3$).

Wnioski: Zwiększone stężenie utlenionego LDL w PO kobiet z zaawansowanymi stadiami endometriozy świadczy o udziale stresu oksydacyjnego w patogenezie schorzenia.

Słowa kluczowe: **endometrioza / utleniony LDL / płyn otrzewnowy /****Adres do korespondencji:**Grzegorz Polak
I Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii UM w Lublinie
20-081 Lublin, ul. Staszica 16, Polska
tel./fax: 81 5327847
email: polakg@yahoo.comOtrzymano: 20.11.2010
Zaakceptowano do druku: 15.01.2011

Summary

Introduction: Proinflammatory and prooxidative environment in the peritoneal cavity may be involved in the pathogenesis of endometriosis. Imbalance between reactive oxygen species levels and the antioxidant capacity leads to oxidation of low-density lipoproteins (LDL). The importance of oxidized LDL (Ox-LDL) in the development of atherosclerosis is well recognized.

Aim: The aim of our study was to evaluate for the presence of ox-LDL in the peritoneal fluid (PF) of women with and without endometriosis.

Material and Methods: A total of 60 women who underwent laparoscopy were divided into groups: endometriosis sufferers with minimal to mild (n 20) and moderate to severe (n 20) stages, and the reference group (n 20) with functional follicle ovarian cysts. Oxidized LDL levels were determined in the PF using enzyme immunoassay.

Results: Oxidized LDL levels were detectable in all peritoneal fluid samples. Significantly increased levels of ox-LDL were observed in PF of women with stage III/IV endometriosis compared to the reference group ($p=0.03$). However, peritoneal fluid ox-LDL concentrations did not differ significantly between patients with minimal/mild and women with moderate/severe stage of the disease ($p=0.2$). No significant difference in the PF ox-LDL concentrations was also found between women with stage I/II endometriosis and patients with follicle cysts ($p=0.3$).

Conclusions: Increased peritoneal fluid ox-LDL levels observed in women with advanced-stage endometriosis suggest the important role of oxidative stress in the pathogenesis of the disease.

Key words: **endometriosis / oxidized LDL / peritoneal fluid /**

Lipoproteiny o małej gęstości (LDL) obejmują heterogenną grupę cząstek białkowo-lipidowych, produkowanych w wątrobie, o gęstości od 1.019 do 1.063 g/ml. Krążąc w krwioobiegach wiążą się z receptorami obecnymi na większości komórek aby w procesie endocytozy dostarczyć im tłuszczów. Cząsteczki LDL zawierają dużą ilość fosfolipidów, które w przypadku niedoboru antyoksydantów ulegać mogą peroksydacji czyli utlenieniu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych prowadzącym do syntezy nadtlenków tych związków. W ten sposób powstaje utleniony LDL (ox-LDL). Fagocytowany przez makrofagi, powoduje transformację tych komórek w bogatotłuszczowe komórki piankowe, stanowiący główny składnik blaszek miażdżycowych [1].

Badania prowadzone na płynie otrzewnowym (PO) sugerują zwiększoną aktywność procesów wolnorodnikowych w tym środowisku u kobiet z endometriozą. Jednakże wyniki dotychczasowych prac, w których badano procesy peroksydacji lipidów PO, nie są jednoznaczne. W części prac zaobserwowano zwiększone stężenie produktów lipoperoksydacji w PO kobiet z endometriozą [2, 3]. Murphy i wsp. wykazali zwiększoną oksydację lipoprotein o małej gęstości oraz większe stężenie tych cząstek w płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą [4]. Autorzy ci stwierdzili także, że PO uzyskany od pacjentek z endometriozą zawiera utlenione kompleksy lipidowo-białkowe, wykazujące właściwości chemotaktyczne, jak również stymulujące syntezę licznych cytokin. Poziom autoprzeciwciał skierowanych przeciw produktom peroksydacji lipidów jest większy w surowicy krwi kobiet z endometriozą lecz immunoglobuliny te są nieobecne w płynie otrzewnowym [5]. Obecność produktów peroksydacji lipidów, takich jak dialdehyd malonowy (MDA) oraz 7-hydroksynonenal, stwierdzono w ektopowej tkance *endometrium*, jakkolwiek występują one także w eutopowej błonie śluzowej macicy [6]. Nie wszystkie badania potwierdzają hipotezę o występowaniu zwiększonej lipoperoksydacji w jamie otrzewnowej kobiet z endometriozą.

W części prac koncentracja MDA oraz kompleksów MDA-Cu w PO nie różniła się statystycznie pomiędzy pacjentkami z endometriozą a kobietami zdrowymi, nie wykazując również zależności ze stopniem zaawansowania endometriozy.

Istotnych statystycznie różnic pomiędzy kobietami z endometriozą a tymi bez schorzenia nie odnotowano również w stężeniu w PO innego produktu peroksydacji tłuszczów, cholest-3,-5-dien-7 [7, 8, 9].

Cel pracy

Celem pracy była ocena stężenia utlenionego cholesterolu LDL w płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą.

Materiał i Metody

Badaniami objęto grupę 60 pacjentek operowanych laparoskopowo w I Katedrze i Klinice Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii UM w Lublinie, włączając 20 pacjentek z I/II oraz 20 kobiet z III/IV stopniem endometriozy. Zaawansowanie schorzenia określano przyjmując zrewidowane kryteria American Fertility Society [10].

Grupę referencyjną stanowiło 20 pacjentek operowanych endoskopowo z powodu surowicznych, funkcjonalnych torbieli jajników. Wiek pacjentek wynosił od 19 do 38 lat. Śródoperacyjne rozpoznanie endometriozy oraz torbieli surowicznych potwierdzone zostało poprzez pooperacyjne badanie histopatologiczne.

Zaaspirowany z jamy Douglasa oraz zachyłka pęcherzowo-macicznego płyn otrzewnowy wirowano z przyspieszeniem 500xg przez 10 minut. Uzyskany supernatant przechowywano w temperaturze -75°C do czasu analizy. Stężenia ox-LDL w PO oznaczono metodą immunoenzymatyczną (ELISA), zgodnie z procedurą podaną przez producenta, przy użyciu zestawu ox-LDL (Immundiagnostic AG). Odczytu absorbancji dokonywano przy długości fali 450nm stosując ośmiokanałowy czytnik Multiskan RC (Labsystems).

Zwiększone stężenie utlenionego cholesterolu LDL w płynie otrzewnowym kobiet z zaawansowaną endometrią.

Wyniki

Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci tabeli, oraz w formie ryciny. (Tabela I, rycina 1).

Utloniony LDL obecny był we wszystkich badanych próbkach płynu otrzewnowego. Stężenie ox-LDL w PO kobiet z zaawansowanymi postaciami endometriozы (III/IVrAFS) było istotnie statystycznie większe od stwierdzonego w grupie referencyjnej ($p=0,03$), jakkolwiek nie różniło się znamienne od pacjentek z minimalną i łagodną postacią choroby ($p=0,2$). Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w koncentracji ox-LDL w płynie otrzewnowym pacjentek z I/II stopniem endometriozы a kobietami bez schorzenia ($p=0,3$).

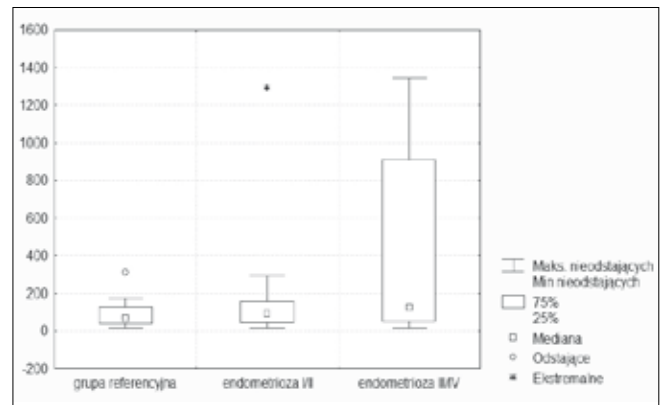
Dyskusja

W naszej pracy stwierdziliśmy zwiększone stężenie utlenionego LDL w płynie otrzewnowym kobiet z zaawansowanymi postaciami endometriozы. Wyniki te są zgodne z uzyskanymi przez Murphy i wsp. i pośrednio potwierdzają hipotezę o udziale stresu oksydacyjnego w obrębie jamy otrzewnowej w patogenezie choroby [4]. Płyn otrzewnowy bogaty jest w cholesterol LDL, którego stężenie dochodzić tu może nawet do 40% koncentracji obserwowanej w surowicy krwi [11].

Do utlenienia cząstek LDL dochodzi w środowisku prooksydacyjnym. Endometrioza wydaje się sprzyjać zwiększonej aktywności procesów wolnorodnikowych w środowisku płynu otrzewnowego. Chorobę tą charakteryzuje, bowiem cykliczne krwawienie w obrębie jamy otrzewnowej, którego źródłem są zarówno implanty ektopowego *endometrium* jak i wydzielina miesięczkowa dostająca się wstecznie przez jajowody. Rozpadłe erythrocyty uwalniają hemoglobinę, której dalsza degradacja prowadzi do powstania licznych aktywnych biologicznie substancji takich jak hem, jony żelaza, tlenek węgla oraz biliwerdyna [12].

Uwolniony hem uczestniczy w inicjacji procesu peroksydacji lipidów a jony żelaza katalizują w trakcie reakcji Fentona syntezę jednego z najbardziej z reaktywnych form tlenu – rodnika wodorotlenowego [1]. Do utlenienia LDL mogą przyczyniać się także monocyty i makrofagi PO. Proces ten jest bowiem katalizowany przez mieloperoksydazę oraz 15-lipoperoksydazę obecną w makrofagach [11]. Dlatego też uzyskane przez nas wyniki można powiązać ze zwiększoną koncentracją tych komórek w jamie otrzewnowej u kobiet cierpiących na endometriozę, którą wykazało szereg prac [13].

Obecność zwiększonej koncentracji utlenionego LDL w PO może mieć szereg następstw. Wykazano bowiem, że jego składniki mają szereg niekorzystnych działań, odpowiedzialnych za procesy zapalne i miażdżycotwórcze.



Rycina 1. Stężenie ox-LDL w PO badanych kobiet.

Zawarta w ox-LDL lizofosfatydylocholina posiada właściwości chemotaktyczne w stosunku do monocytów i limfocytów T, wykazuje działanie cytotoksyczne, jak również stymuluje syntezę czynnika wzrostu fibroblastów, płytkowego czynnika wzrostu i cząstek adhezyjnych. Pozostałe składniki utlenionego LDL indukują produkcję białek szoku termicznego, interleukiny-1 oraz innych cytokin a także inaktywują enzymy [14].

Rong i wsp. [15] wykazali, że utleniony LDL stymuluje produkcję białka chemotaktycznego monocytów (MCP-1) przez komórki mezotelialne oraz endometrialne. Badacze ci stwierdzili również, że komórki endometrium hodowane w środowisku PO uzyskanego od pacjentek z endometrią produkują większe ilości tej cytokiny niż te z hodowli płynu kobiet bez schorzenia.

Dlatego też wykazane w naszej pracy zwiększone stężenie ox-LDL może być odpowiedzialne za stwierdzone w innych badaniach podwyższone stężenie tej cytokiny w PO kobiet z endometrią [16]. MCP-1 ma silne działanie chemotaktyczne w stosunku do monocytów. Stymulacja produkcji MCP-1 przez utleniony LDL, jak również sama obecność ox-LDL w płynie otrzewnowym może być częściowo odpowiedzialna za wytworzenie prozapalnego środowiska w obrębie jamy otrzewnowej kobiet z endometrią.

Niekorzystne zmiany profilu lipidowego mogą dotyczyć nie tylko płynu otrzewnowego kobiet z endometrią. Wykazano niedawno, że osocze kobiet z tym schorzeniem zawiera większe stężenia całkowitego cholesterolu, frakcji LDL, HDL oraz trójglicerydów w porównaniu do kobiet zdrowych. Największą różnicę odnotowano jednak w koncentracji LDL, która była większa o 38% u pacjentek z endometrią [17].

Tabela I. Stężenie Ox-LDL (ng/ml) w płynie otrzewnowym kobiet z endometrią oraz z grupy referencyjnej.

	N	Mediana	Minimum	Maximum
Grupa referencyjna	20	68,8	17,4	313
Endometrioza I/II rAFS	20	92,7	14,1	1290
Endometrioza III/IV rAFS	20	126	16,7	1347

Stwierdzono również, że surowica kobiet z endometriozą charakteryzuje się niższą aktywnością paraoksonazy-1 (PON-1), która koreluje negatywnie ze stopniem zaawansowania schorzenia [18]. Enzym ten hamuje peroksydację lipidów LDL i HDL, chroniąc te frakcje przed utlenieniem. Wydaje się więc, że zaburzenia profilu lipidowego mogą u kobiet z endometriozą mieć charakter ogólnoustrojowy i w połączeniu z niską aktywnością PON-1 predysponować je do rozwoju zmian miażdżycowych.

Wnioski

Zwiększone stężenie utlenionego LDL odnotowane w PO kobiet z zaawansowanymi stadiami endometriozy świadczy o udziale stresu oksydacyjnego w patogenezie schorzenia.

Praca finansowana ze środków na naukę w latach 2008-2011 jako projekt badawczy N N407 180834

Piśmiennictwo

- Bartos G. Druga twarz tlenu. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 1995.
- Szczepańska M, Koźlik J, Skrzypczak J, Mikołajczyk M. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertil Steril.* 2003, 79, 1288-1293.
- Murphy A, Santanam N, Morales A, Parthasarathy S. Lysophosphatidyl-choline. A chemotactic factor for monocytes/T-lymphocytes is elevated in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998, 83, 2110-2113.
- Murphy A, Palinski W, Rankin S, [et al.]. Macrophage scavenger receptor(s) and oxidatively modified proteins in endometriosis. *Fertil Steril.* 1998, 69, 1085-1091.
- Shanti A, Santanam N, Morales A, [et al.]. Autoantibodies to markers of oxidative stress are elevated in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 1999, 71, 1115-1118.
- Murphy A, Palinski W, Rankin S, [et al.]. Evidence for oxidatively modified lipid-protein complexes in endometrium and endometriosis. *Fertil Steril.* 1998, 89, 1092-1094.
- Anumugam K, Dip C. Endometriosis and infertility: the role of exogenous lipid peroxides in the peritoneal fluid. *Fertil Steril.* 1985, 63, 198-199.
- Polak G, Koziol-Montewka M, Niedźwiadek J, [et al.]. Produkty peroksydacji lipidów, czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α) oraz interferon γ (IFN- γ) w płynie otrzewnowym niepłodnych kobiet z łagodną postacią endometriozy. *Ginekol Pol.* 2001, 72, 422-426.
- do Amaral V, Bydlowski S, Peranovich T, [et al.]. Lipid peroxidation in the peritoneal fluid of infertile women with peritoneal endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005, 119, 72-75.
- The American Fertility Society. Revised American Fertility Society classification of endometriosis: 1985. *Fertil Steril.* 1985, 43, 351-352.
- Santanam N, Murphy A, Parthasarathy S. Macrophages, Oxidation, and Endometriosis. *Ann NY Acad Sci.* 2002, 955, 183-198.
- Maines M. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997, 37, 517-554.
- Hill J, Faris H, Schiff I, Anderson D. Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril.* 1988, 50, 216-222.
- Parthasarathy S, Santanam N, Augé N. Oxidized low-density lipoprotein, a two-faced Janus in coronary artery disease? *Biochem Pharmacol.* 1998, 56, 279-284.
- Rong R, Ramachandran S, Santanam N, [et al.]. Induction of monocyte chemotactic protein-1 in peritoneal mesothelial and endometrial cells by oxidized low-density lipoprotein and peritoneal fluid from women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2002, 78, 843-848.
- Arici A, Oral E, Attar E, [et al.]. Monocyte chemotactic protein-1 concentration in peritoneal fluid of women with endometriosis and its modulation of expression in mesothelial cells. *Fertil Steril.* 1997, 67, 1065-1072.
- Melo A, Rosa-e-Silva J, Rosa-e-Silva A, [et al.]. Unfavorable lipid profile in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2010, 93, 2433-2436.
- Verit F, Erel O, Celik N. Serum paraoxonase-1 activity in women with endometriosis and its relationship with the stage of the disease. *Hum Reprod.* 2008, 23, 100-104.

KOMUNIKAT

UROGINEKOLOGIA OPERACYJNA WARSZTATY PRAKTYCZNE

(I półrocze 2011 r.)

kierownik kursu
prof. zw. dr hab. n. med. Tomasz Rechberger

II Katedra i Klinika Ginekologii UM w Lublinie

oraz

Stowarzyszenie na Rzecz Promocji
i Rozwoju Nauk Podstawowych oraz Klinicznych
w Ginekologii Pro Femina

organizuje warsztaty praktyczne
w zakresie operacji uroginekologicznych.

W programie warsztatów:

- zabiegi rekonstrukcyjne dna miednicy z wykorzystaniem nowoczesnych systemów protezujących – (Prosima),
- leczenie operacyjne wysiłkowego nietrzymania moczu – nowe zestawy operacyjne – TVT Abbrevio, TVT Exact;
- Botox w leczeniu OAB.

Zapewniamy czynny udział w przeprowadzanych w czasie kursu zabiegach operacyjnych – planowana liczba zabiegów podczas warsztatów 8-10.

Czas trwania warsztatów 9.00-18.00. Ilość uczestników ograniczona.

Terminy warsztatów:

25. 02. 2011 r.,

18. 03. 2011 r.,

15. 04. 2011 r.,

13. 05. 2011 r.,

10. 06. 2011 r.

Koszt uczestnictwa 800 PLN (zapewniamy lunch podczas trwania kursu).
Uczestnicy otrzymują certyfikat oraz 8 punktów edukacyjnych.

Zgłoszenia z przedpłatą w wysokości 300 PLN przyjmuje sekretariat
Stowarzyszenia Pro Femina

tel. **81-7244688** fax. **81-7244849**

Dokładne dane do faktury proszę przesyłać na
e-mail: **tikuchta@gazeta.pl** lub na nr faxu **81-7244849**

Stowarzyszenie na Rzecz Promocji i Rozwoju Nauk Podstawowych
oraz Klinicznych w Ginekologii Pro Femina,

nr konta bankowego: **13 1930 1709 2001 0021 2894 0001**

Szczegółowych informacji udziela dr n. med. Paweł Miotła
604 79 39 02