

Całkowity potencjał oksydacyjny płynu otrzewnowego kobiet z endometriozą

Total oxidative status of peritoneal fluid in women with endometriosis

Polak Grzegorz, Kotarski Jan

I Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Streszczenie

Zaburzenia równowagi pro- i antyoksydacyjnej w obrębie jamy otrzewnej mogą odgrywać rolę w rozwoju endometriozy.

Cel pracy: Celem pracy była ocena całkowitego potencjału oksydacyjnego płynu otrzewnowego (PO) kobiet z endometriozą.

Materiał i Metody: Badaniom poddano PO uzyskany podczas laparoskopii od 20 kobiet z I/II stopniem (rAFS) endometriozy oraz 20 pacjentek z III/IV stopniem zaawansowania schorzenia. Grupę referencyjną stanowiło 25 kobiet operowanych z powodu surowicznych torbieli jajników. Całkowity potencjał oksydacyjny oznaczono metodą kolorymetryczną przy użyciu zestawu PerOx (TOS) (Immundiagnostic AG).

Wyniki: Potencjał oksydacyjny PO kobiet z endometriozą był istotnie statystycznie wyższy od odnotowanego w grupie referencyjnej. Jakkolwiek nie wykazano znamienych statystycznie różnic potencjału oksydacyjnego PO pomiędzy pacjentkami z I/II stopniem endometriozy a kobietami z III/IV stopniem zaawansowania schorzenia.

Wnioski: Zwiększony potencjał oksydacyjny płynu otrzewnowego odnotowany u kobiet z endometriozą może brać udział w patogenezie schorzenia.

Słowa kluczowe: **endometrioza / potencjał oksydacyjny / płyn otrzewnowy /**

Abstract

Pathophysiology of endometriosis remains enigmatic despite extensive investigations. Accumulating data suggest that oxidative stress in the peritoneal cavity may be implicated in the pathogenesis of endometriosis.

Aim: The aim of our study was to evaluate the oxidative status of peritoneal fluid (PF) in women with and without endometriosis.

Material and methods: Sixty-five women participated in the study. 40 women with endometriosis constituted the study group and 25 patients with functional follicle ovarian cysts comprised the reference group. Total oxidative status of PF was determined using a commercially available colorimetric assay kit (Immundiagnostic AG, Cat. nr. KC5100).

Adres do korespondencji:

Grzegorz Polak
I Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii UM w Lublinie,
20-081 Lublin, ul. Staszica 16
tel. 81 5327847, email: polakg@yahoo.com

Otrzymano: 05.10.2010
Zaakceptowano do druku: 20.11.2010

Results: Women with endometriosis had significantly higher PF oxidative status compared to women with follicle ovarian cysts. No significant difference in the peritoneal oxidative status was found between patients with stage I/II endometriosis, and women with stage III/IV endometriotic disease.

Conclusions: Disrupted oxidative status in the peritoneal cavity of women with endometriosis plays a role in the pathogenesis of the disease.

Key words: **endometriosis / oxidative status / peritoneal fluid /**

W roku 2007 minęło osiemdziesiąt lat od kiedy Sampson opublikował pracę, w której za prawdopodobną przyczynę rozwoju endometriozy, badacz ten uznał zjawisko „wstecznego miesiączkowania” z następczą implantacją złuszczonej błony śluzowej macicy w obrębie jamy otrzewnej [1].

Pomimo wielu lat badań opartych na coraz doskonalszej metodologii oraz postępu jaki dokonał się w poznaniu mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój endometriozy, etiopatogeneza schorzenia wciąż pozostaje niewyjaśniona. Żadna pojedyncza teoria nie tłumaczy przyczyn rozwoju endometriozy a tym bardziej związanych z różnorodną lokalizacją postaci choroby. Środowisko płynu otrzewnego (PO) kobiet cierpiących na endometriozę stanowi, od czasu wprowadzenia laparoskopii jako rutynowego elementu diagnostyki schorzenia, przedmiot licznych badań. Ponieważ płyn otrzewny bezpośrednio kontaktuje się zarówno z narządami miednicy mniejszej jak również z implantami endometrialnymi, uważa się jego środowisko za niezmiernie ważny czynnik wpływający na rozwój choroby [2].

W roku 1987 Zeller i wsp. [3] wykazali za pomocą chemiluminescencji zwiększone wydzielanie reaktywnych form tlenu, takich jak anionorodnik nadtlenkowy, nadtlenek wodoru oraz tlen singletowy, przez mononuklearne komórki PO kobiet z endometriozą. Jednakże, w późniejszych badaniach nie potwierdzono różnic w stężeniu reaktywnych form tlenu zarówno w nie podanym odwirowaniu jak i w supernatancie płynu otrzewnego pomiędzy pacjentkami z endometriozą a kobietami zdrowymi [4, 5]. Van Langendonck i współpracownicy [6] sugerowali, że podwyższony poziom wolnych rodników może być zjawiskiem lokalnym i występującym jedynie w pobliżu implantów a nie w całym płynie otrzewnym. Teorie tę potwierdza wykazanie nadekspresji oksydazy ksantynowej, enzymu biorącego udział w produkcji reaktywnych form tlenu, zarówno w eutopowym jak i ektopowym *endometrium* u kobiet chorujących na endometriozę [7].

Peroksydacja lipidów, czyli proces utlenienia wielonienasyconych kwasów tłuszczowych prowadzący do powstania nadtlenu tych związków, jest najbardziej znanym zjawiskiem oksydacji inicjowanej przez wolne rodniki. Stężenie produktów lipoperoksydacji, określane mianem potencjału oksydacyjnego, jest wykładnikiem aktywności reaktywnych form tlenu w badanych tkankach. W PO nieplodnych pacjentek cierpiących na endometriozę odnotowano zwiększoną koncentrację produktów peroksydacji lipidów [8, 9].

Jednak w innych pracach, oceniających stężenie produktu lipoperoksydacji, dialdehydu malonowego (MDA) oraz kompleksów MDA-Cu w PO, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w koncentracji tych substancji pomiędzy pacjentkami

z endometriozą a kobietami bez schorzenia, nie wykazując również związku ze stopniem zaawansowania schorzenia. Podobnych różnic nie odnotowano również w koncentracji cholest-3,5-dien-7 w płynie otrzewnym [10, 11, 12].

Jakkolwiek stwierdzono zwiększoną koncentrację w PO kobiet z endometriozą lisofosfatydylocholino, innego produktu peroksydacji lipidów, o właściwościach chemotaktycznych w stosunku do monocytów [13]. Obecność dialdehydu malonowego i 7-hydroksynonenalu wykazano w zrębie ektopowej tkanki endometrium, jednak substancje te występują także w eutopowej błonie śluzowej macicy [14].

Cel pracy

Celem pracy była ocena całkowitego potencjału oksydacyjnego płynu otrzewnego kobiet z endometriozą.

Materiał i metody

Badaniem objęto grupę 65 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* [15].

Grupę referencyjną stanowiło 25 pacjentek operowanych endoskopowo z powodu torbieli surowiczych jajników. Wiek pacjentek wynosił od 19 do 40 lat. Śródoperacyjne rozpoznanie endometriozy oraz torbieli surowiczych potwierdzone zostało poprzez pooperacyjne badanie histopatologiczne. Zaaspirowany z jamy Douglasa oraz zachyłka pęcherzowo-macicznego płynu otrzewny wirowano z przyspieszeniem 500xg przez 10 minut. Uzyskany supernatant przechowywano w temperaturze -75°C do czasu analizy.

Całkowity potencjał oksydacyjny próbek płynu otrzewnego oceniano kolorymetrycznie przy użyciu zestawu PerOx (TOS) (Immundiagnostic AG, Nr kat. KC5100). Użycie powyższego zestawu pozwala na ocenę całkowitej zawartości produktów peroksydacji lipidów w badanej tkance. Metoda ta oparta jest na reakcji zawartych w próbkach produktach lipoperoksydacji z peroksydazą. Po dodaniu tetrametylobenzydyny (TMB) rozwija się, proporcjonalna do koncentracji badanych produktów w próbce, reakcja barwna. Jej nasilenie oceniano odczytując absorbancję przy długości fali 450nm.

Wyniki wyrażono w mikromolach na litr płynu i opracowano statystycznie przy pomocy programu Statistica 5 (Stat Soft Inc.) wykorzystując test Shapiro-Wilka do oceny rozkładu, a następnie test Manna-Whitneya. Za graniczny poziom istotności statystycznej przyjęto $p=0,05$.

Całkowity potencjał oksydacyjny płynu otrzewnowego kobiet z endometriozą.

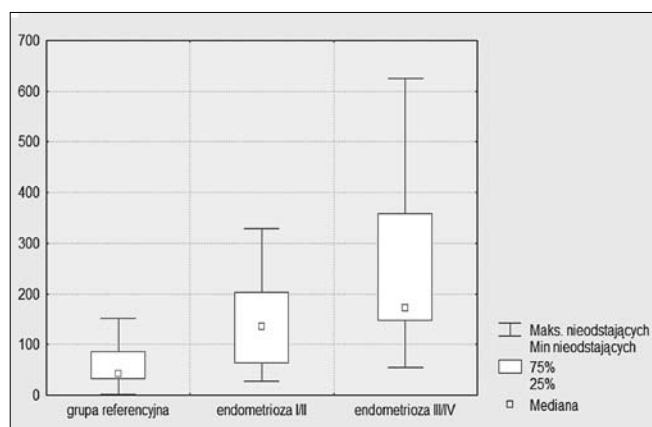
Wyniki

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

Całkowity potencjał oksydacyjny w płynie otrzewnowym kobiet zarówno z I/II jak i III/IV stopniem zaawansowania endometriozy był istotnie statystycznie wyższy od odnotowanego w grupie referencyjnej ($p < 0,001$; $p < 0,001$). Nie stwierdzono natomiast istotnych statystycznie różnic potencjału oksydacyjnego płynu otrzewnowego pomiędzy pacjentkami z I/II oraz III/IV stopniem schorzenia, jakkolwiek poziom istotności statystycznej zbliżony był do znamiennej ($p = 0,06$).

Tabela I. Całkowity potencjał oksydacyjny ($\mu\text{mol/l}$) płynu otrzewnowego kobiet z endometriozą oraz grupy referencyjnej).

	N	Mediana	Minimum	Maximum
Grupa referencyjna	25	41,5	1,48	151,11
Endometrioza I/II rAFS	20	135,29	27,59	329,63
Endometrioza III/IV rAFS	20	242,72	54,74	625,26
Endometrioza łącznie	40	167,92	27,59	615,26



Rycina 1. Potencjał oksydacyjny płynu otrzewnowego badanych kobiet.

Dyskusja

Wolne rodniki biorą udział w patogenezie wielu chorób. Na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat podjęto wiele prób sprecyzowania roli jaką mogą odgrywać one w rozwoju endometriozy. Wyniki dotychczasowych badań dotyczących udziału zaburzeń układu prooksydacyjno-antyoksydacyjnego w patogenezie schorzenia różnią się od siebie, jednakże rezultaty prac większości badaczy zdają się potwierdzać tą hipotezę [6,9,16]. Rozbieżność uzyskanych wyników może być związana z faktem, że jedynie stałe markery stresu oksydacyjnego, takie jak enzymy oraz stabilne produkty utleniania są wiarygodnym źródłem informacji o procesach wolnorodnikowych w środowisku PO.

Uzyskane przez nas wyniki wykazały zwiększony potencjał oksydacyjny płynu otrzewnowego kobiet z endometriozą a przez to potwierdzają wyższą aktywność procesów wolnorodnikowych w tym środowisku. Zwiększenie liczby badanych próbek pozwoli w przyszłości na odpowiedź na pytanie czy potencjał oksydacyjny PO uzyskanego od pacjentek z bardziej zaawansowanymi stadiami schorzenia różni się od tych z minimalną i łagodną endometriozą. W obecnej pracy wartości te były na granicy istotności statystycznej.

Wśród związków, które mogą być odpowiedzialne za wzrost aktywności procesów wolnorodnikowych w PO pacjentek z endometriozą wymienia się przede wszystkim jony żelaza. Ich źródłem w jamie otrzewnowej są niewątpliwie ulegające lizie erythrocyty, pochodzące z wydzieliny, która dostała się do jamy otrzewnej podczas wstecznego miesiączkowania, jak również krwinki czerwone uwalniane podczas cyklicznych krwawień z implantów endometrialnych. Jony żelaza katalizują w trakcie reakcji Fentona syntezę jednego z najbardziej reaktywnych form tlenu – rodnika wodorotlenowego [17]. Źródłem zaburzenia równowagi pro- i antyoksydacyjnej w płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą mogą być także poddane apoptozie komórki *endometrium* dostające się do jamy otrzewnowej oraz makrofagi PO. Także czynniki środowiskowe, w tym dioksyny oraz metale ciężkie, stanowiąc mogą potencjalne źródło stresu oksydacyjnego [18].

Stres oksydacyjny w obrębie jamy otrzewnej prowadzi do lokalnej destrukcji nabłonka otrzewnej. Uszkodzone mesotelium staje się w ten sposób miejscem implantacji wszczepów endometrialnych, jak również tworzenia się zrostów [19]. Procesy te niewątpliwie biorą udział w progresji choroby.

Nadmierna aktywność procesów wolnorodnikowych prowadzi do uszkodzenia struktury błon komórkowych plemników z następczą utratą aktywności fruktolitycznej i oddechowej tych komórek. Ponadto stres oksydacyjny może być odpowiedzialny za część przedimplantacyjnych uszkodzeń zarodków [20, 21]. Dlatego też zaburzenie równowagi pro- i antyoksydacyjnej środowiska PO może mieć udział w patogenezie zaburzeń płodności towarzyszących endometriozie. Z uwagi na fakt oddziaływania stresu oksydacyjnego na owulację oraz syntezę progesteronu przez ciało żółte [22], nie można również wykluczyć, że zwiększone nasilenie procesów wolnorodnikowych w PO może być odpowiedzialne za część przypadków niepłodności odnotowywanej w minimalnych stadiach endometriozy.

Wnioski

Zwiększony potencjał oksydacyjny płynu otrzewnowego odnotowany u kobiet z endometriozą może brać udział w patogenezie schorzenia.

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

Piśmiennictwo

1. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol.* 1927, 14, 422-469.
2. Bedaiwy MA, Falcone T. Peritoneal fluid environment in endometriosis. *Minerva Ginecol.* 2003, 55, 333-345.
3. Zeller JM, Henig I, Radwanska E, [et al]. Enhancement of human monocytes and peritoneal macrophage chemiluminescence activities in women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol Microbiol.* 1987, 13, 78-82.
4. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.* 2003, 79, 829-843.
5. Wang Y, Sharma RK, Falcone T, [et al]. Importance of reactive oxygen species in the peritoneal fluid of women with endometriosis or idiopathic infertility. *Fertil Steril.* 1997, 68, 826-830.
6. Van Langendonck A, Casanas-Roux F, Donnez J. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertil Steril.* 2002, 77, 861-870.
7. Ota H, Igarashi S, Tanaka T. Xanthine oxidase in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Fertil Steril.* 2001, 75, 785-790.
8. Liu Y, Luo L, Zhao H. Levels of lipid peroxides and superoxide dismutase in peritoneal fluid of patients with endometriosis. *J Tongji Med Univ.* 2001, 21, 166-167.
9. Szczepańska M, Koźlik J, Skrzypczak J, [et al]. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertil Steril.* 2003, 79, 1288-1293.
10. Arumugam K, Yip CY. Endometriosis and infertility: the role of exogenous lipid peroxides in the peritoneal fluid. *Fertil Steril.* 1985, 63, 198-199.
11. Polak G, Kozioł-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.
12. Do Amaral VF, Bydłowski SP, Peranovich TC, [et al]. Lipid peroxidation in the peritoneal fluid of infertile women with peritoneal endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005, 119, 72-75.
13. Murphy AA, Santanam N, Morales AJ, [et al]. Lysophosphatidyl-choline. A chemotactic factor for monocytes/T-lymphocytes is elevated in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998, 83, 2110-2113.
14. Murphy AA, Palinski W, Rankin S, [et al]. Evidence for oxidatively modified lipid-protein complexes in endometrium and endometriosis. *Fertil Steril.* 1998, 89, 1092-1094.
15. The American Fertility Society. Revised American Fertility Society classification of endometriosis: 1985. *Fertil Steril.* 1985, 43, 351-352.
16. Murphy AA, Santanam N, Parthasarathy S. Endometriosis: a disease of oxidative stress? *Semin Reprod Endocrinol.* 1998, 16, 263-273.
17. Imlay JA. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol.* 2003, 57, 395-418.
18. Gupta S, Agarwal A, Krajcir N, [et al]. Role of oxidative stress in endometriosis. *Reprod Biomed Online.* 2006, 13, 126-134.
19. Arumugam K, Yip CY. De novo formation of adhesions in endometriosis: the role of iron and free radical reactions. *Fertil Steril.* 1995, 64, 62-64.
20. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.* 2003, 79, 829-843.
21. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, [et al]. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 59, 1037-1046.
22. Miyazaki T, Sueoka K, Dharmarajan AM, [et al]. Effect of inhibition of oxygen free radical on ovulation and progesterone production by the in-vitro perfused rabbit ovary. *J Reprod Fertil.* 1991, 91, 207-212.