

Stężenie przeciwciał antykardiolipinowych w płynie otrzewnowym i w płynie z hodowli limfocytów kobiet z endometriozą

Concentration of anticardiolipin antibodies in peritoneal fluid and in fluid from lymphocytes culture in women with endometriosis

Śikora Justyna, Mielczarek-Palacz Aleksandra, Kondera-Anasz Zdzisława, Świtała Jerzy, Jaśniok Ewa

Katedra i Zakład Immunologii i Serologii,
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Streszczenie

Cel pracy: Celem naszej pracy była ocena stężenia przeciwciał antykardiolipinowych (aCL) w płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą oraz zbadanie w warunkach hodowli komórkowej zdolności limfocytów izolowanych z płynu otrzewnowego kobiet z endometriozą do produkcji przeciwciał antykardiolipinowych.

Materiał i metody: Do grupy badanej zakwalifikowano 30 kobiet z endometriozą. Stopień klinicznego zaawansowania choroby oceniano wg klasyfikacji Amerykańskiego Towarzystwa Płodności.

Do grupy referencyjnej zakwalifikowano 15 kobiet, u których wykluczono endometriozę i inne patologiczne zmiany w obrębie miednicy mniejszej. Stężenie aCL w płynie otrzewnowym i w płynie z hodowli limfocytów oznaczano metodą immunoenzymatyczną ELISA.

Wyniki: Analiza statystyczna wyników wykazała bardzo istotny statystycznie wzrost średniego stężenia aCL w płynie otrzewnowym kobiet chorych w porównaniu do grupy kobiet z grupy referencyjnej ($p < 0,0001$). Również w płynie z hodowli limfocytów otrzewnowych stężenie aCL u kobiet z endometriozą było bardzo istotnie statystycznie podwyższone w porównaniu do stężenia przeciwciał w grupie referencyjnej ($p < 0,0001$).

Największe średnie stężenie aCL w płynie otrzewnowym i w płynie z hodowli zaobserwowano w I stopniu zaawansowania choroby.

Wnioski: Wzrost stężenia przeciwciał antykardiolipinowych w płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą oraz wzmożona produkcja przeciwciał przez limfocyty sugeruje zaburzenia odpowiedzi typu humoralnego oraz ich nasilenie we wczesnych etapach choroby.

Słowa kluczowe: przeciwciała antykardiolipinowe – aCL / endometrioza / limfocyty /
płyn otrzewnowy /

Adres do korespondencji:

Justyna Sikora
Katedra i Zakład Immunologii i Serologii, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
ul. Raciborska 15, 40-074 Katowice
tel.: 0 32 20 87 453
e-mail: jsikora@sum.edu.pl

Otrzymano: 05.11.2008
Zaakceptowano do druku: 10.05.2009

Summary

Aim: The aim of our work was to study both the concentration of anticardiolipin antibodies (aCL) in peritoneal fluid in women with endometriosis and to examine peritoneal lymphocyte ability to produce anticardiolipin antibodies.

Material and methods: Study group included 30 women with endometriosis. The clinical stages of the disease were assessed by the revised American Fertility Society (rAFS) classification. Reference group included fifteen healthy women, with excluded endometriosis and other pathological disorders within the pelvis. The concentration of aCL in the peritoneal fluid and in fluid from lymphocyte culture was measured by enzyme-linked immunosorbent ELISA assay.

Results: Statistical analysis showed significantly increased mean concentration of aCL in peritoneal fluid in women with endometriosis compared to women from the reference group ($p < 0.0001$).

The concentration of aCL in fluid from lymphocyte culture was also significantly higher in samples from women with endometriosis than from the reference group ($p < 0.0001$). The highest mean levels of aCL in peritoneal fluid and in fluid from lymphocyte culture were observed in samples from women with stage I of the disease.

Conclusions: An increased level of anticardiolipin antibodies in peritoneal fluid in women with endometriosis and increased antibodies production by lymphocytes may suggest an impairment of humoral immunity and its intensification in the early stages of the disease.

Key words: aCL / endometriosis / lymphocyte / peritoneal fluid /

Wstęp

Patogeneza endometriozy do tej pory pozostaje niewyjaśniona. Dużą rolę w przeżyciu i implantacji tkanki endometrialnej poza jamą macicy przypisuje się zaburzeniom w funkcjonowaniu układu odpornościowego. Zmiany te dotyczą przede wszystkim mikrośrodowiska jamy otrzewnowej, gdzie najczęściej dochodzi do rozwoju choroby [1].

W ostatnich latach liczne badania koncentrują się na poznaniu udziału odpowiedzi humoralnej w patogenezie endometriozy, co jest związane z obecnością w płynie otrzewnowym i w surowicy autoprzeciwciał skierowanych przeciwko fosfolipidom i histonom *endometrium* oraz jajnika [2, 3].

Najczęściej wykrywane są przeciwciała antyfosfolipidowe (APA). Jest to niejednorodna grupa przeciwciał skierowana przeciwko fosfolipidom błon komórkowych. Spośród nich, najlepiej poznane i najczęściej oznaczane są przeciwciała antykardiolipinowe (aCL), które wiążą się zarówno z obojętnymi, jak i ujemnie naładowanymi fosfolipidami oraz nie wymagają białkowego kofaktora. aCL nie posiadają właściwości antykoagulantu oraz nie wywołują powikłań zakrzepowo-zatorowych [4]. Natomiast poprzez wiązanie się do fosfolipidów błony komórkowej między innymi komórek *endometrium*, przeciwciała antykardiolipinowe mogą powodować zaburzenia transdukcji sygnału międzykomórkowego, zwiększać ekspresję cząsteczek adhezyjnych na powierzchni śródbłonna, a także wpływać na metabolizm kwasu arachidonowego pośrednio prowadząc do nasilenia stanu zapalnego towarzyszącego endometriozie [5].

Cel pracy

Celem naszej pracy była ocena stężenia przeciwciał antykardiolipinowych klasy IgG w płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą oraz zbadanie w warunkach hodowli komórkowej zdolności limfocytów izolowanych z płynu otrzewnowego kobiet z endometriozą do produkcji przeciwciał antykardiolipinowych.

Materiał i metody

Badaniami objęto 45 kobiet w wieku od 21 do 44 lat (średnia wieku: $31,5 \pm 4,9$ lat) poddanych laparoskopii w celu ustalenia przyczyn istniejącej niepłodności pierwotnej. Wszystkie badane kobiety miały regularne cykle menstruacyjne, trwające 28 ± 4 dni. Żadna z nich nie stosowała środków hormonalnych w ciągu 3 miesięcy przed zabiegiem oraz nie była leczona lekami immunosupresyjnymi.

Do grupy badanej zakwalifikowano 30 kobiet w wieku od 25 do 44 lat (średnia wieku $34,3 \pm 5,1$ lat), u których podczas laparoskopii stwierdzono endometriozę. Stopień klinicznego zaawansowania choroby oceniano wg klasyfikacji Amerykańskiego Towarzystwa Płodności [6]. Do grupy tej zakwalifikowano 10 kobiet z I stopniem endometriozy, 8 kobiet z II stopniem endometriozy oraz po 6 kobiet z III i IV stopniem zaawansowania choroby. Do grupy referencyjnej zakwalifikowano 15 kobiet w wieku od 20 do 33 lat (średnia wieku: $27,4 \pm 5,3$ lat), u których wykluczono endometriozę i inne patologiczne zmiany w obrębie miednicy mniejszej.

Materiałem wykorzystanym do badań był płyn otrzewnowy uzyskany podczas laparoskopii. Bezpośrednio po pobraniu płynu otrzewnowego wirowano przez 10 minut przy 2000 obr./minutę, a następnie płyn z osadu komórek dzielono na małe porcje i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania oznaczeń. Natomiast z osadu komórek izolowano limfocyty metodą wirowania na gradiencie gęstości (LinfoSep, Biomedics, Spain). Zdolność limfocytów płynu otrzewnowego do produkcji aCL oceniano w warunkach hodowli komórkowej. W tym celu wyizolowane komórki umieszczono w medium hodowlanym (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Bio Witteraker, Belgium), które zawierało mieszaninę penicyliny i streptomycyny (Sigma Chemical Corporation, USA) i 10% płodową surowicę cielęcą (Fetal Bovine Serum Premium-FBS, Bio Witteraker, Belgium). Następnie hodowano przez 72 godziny, w temperaturze 37°C i atmosferze z dodatkiem 5% CO_2 .

Stężenie przeciwciał antykardiolipinowych w płynie otrzewnowym...

Po zakończonej inkubacji płyn z nad hodowanych komórek zebrano i przechowywano w temperaturze -80°C . Stężenie przeciwciał antykardiolipinowych w płynie otrzewnowym i w płynie z hodowli limfocytów oznaczano metodą immunoenzymatyczną ELISA wykorzystując test Bindazyme Anticardiolipin IgG Enzyme Immunoassay Kits (The Binding Site, Birmingham, England).

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. Wszystkie kobiety zostały poinformowane o celu prowadzonych badań i wyraziły zgodę na pobranie i wykorzystanie ich płynu otrzewnowego.

Wyniki opracowano statystycznie przy pomocy programu Statistica v 8. W celu weryfikacji normalności otrzymanych wyników wykorzystano test Shapiro-Wilka, natomiast do oceny istotności różnic test t-Studenta. Za istotny statystycznie przyjmowano poziom $p \leq 0,05$.

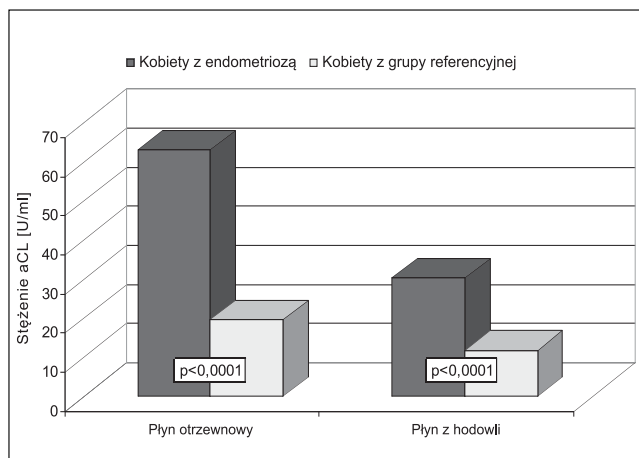
Wyniki

Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinie 1 i 2. W płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą jak i kobiet z grupy referencyjnej stwierdzono obecność przeciwciał antykardiolipinowych. Analiza statystyczna wyników wykazała bardzo istotny statystycznie wzrost średniego stężenia aCL u kobiet chorych ($63,29 \pm 26,80 \text{ U/mL}$) w porównaniu do grupy kobiet z grupy referencyjnej ($19,66 \pm 3,66 \text{ U/mL}$) ($p < 0,0001$). Natomiast w płynie z hodowli limfocytów otrzewnowych stężenie aCL u kobiet z endometriozą wynosiło średnio $30,48 \pm 6,14 \text{ U/mL}$ i było również bardzo istotnie statystycznie podwyższone w porównaniu do stężenia przeciwciał w grupie referencyjnej ($11,86 \pm 2,87 \text{ U/mL}$) ($p < 0,0001$).

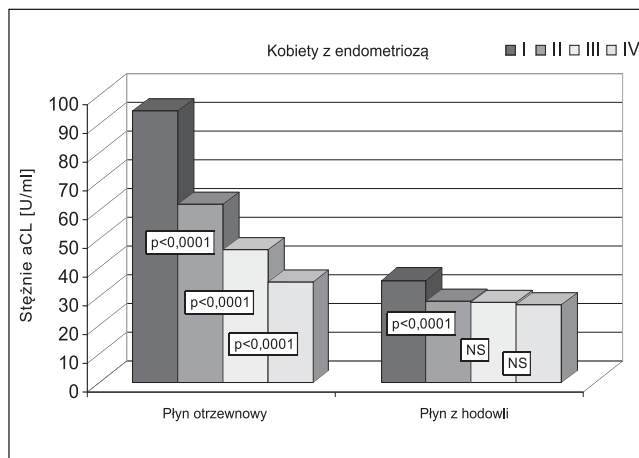
Ponadto, stężenie aCL w płynie otrzewnowym było zróżnicowane w zależności od stopnia endometriozy. Największe średnie stężenie zaobserwowano w I stopniu zaawansowania choroby ($94,78 \pm 23,06 \text{ U/mL}$), natomiast w kolejnych stopniach malało i odpowiednio wynosiło: w II stopniu $61,96 \pm 5,45 \text{ U/mL}$; w III stopniu $46,19 \pm 3,68 \text{ U/mL}$ oraz w IV stopniu $34,95 \pm 3,85 \text{ U/mL}$. Różnice pomiędzy stopniami zaawansowania choroby były bardzo istotne statystycznie ($p < 0,0001$). Z kolei w płynie z hodowli limfocytów największy wzrost stężenia aCL zaobserwowano w przypadku limfocytów izolowanych z płynu otrzewnowego kobiet z I stopniem zaawansowania choroby ($35,61 \pm 8,40 \text{ U/mL}$), w II stopniu stężenie było niższe, a w kolejnych utrzymywało się na podobnym poziomie (II stopień – $28,44 \pm 1,82 \text{ U/mL}$; III stopień – $28,08 \pm 1,63 \text{ U/mL}$, IV stopień – $23,84$ do $28,81 \text{ U/mL}$). Różnice istotne statystycznie obserwowano tylko pomiędzy I i II stopniem zaawansowania choroby ($p < 0,0001$).

Dyskusja

Endometrioza jest jednym z trudniejszych do zdiagnozowania i wyleczenia schorzeń ginekologicznych. Przypuszcza się, że ważną rolę w powstawaniu tego schorzenia odgrywają zaburzenia układu odpornościowego, dotyczące zarówno odpowiedzi komórkowej, jak i humoralnej. Odpowiedź komórkowa u kobiet z endometriozą cechuje się występowaniem zwiększonej liczby zmienionych funkcjonalnie makrofagów, komórek NK (*Natural Killer*) oraz limfocytów T cytotoksycznych (Tc).



Rycina 1. Średnie stężenie aCL w płynie otrzewnowym i supernatancie z hodowli limfocytów otrzewnowych kobiet z endometriozą i kobiet z grupy referencyjnej.



Rycina 2. Średnie stężenie aCL w płynie otrzewnowym i supernatancie z hodowli limfocytów otrzewnowych kobiet z I, II, III i IV stopniem endometriozy.

Ponadto, wzmożona aktywność limfocytów T pomocniczych typu 2 (Th2) jest związana z poliklonalną aktywacją limfocytów B, co prowadzi do zaburzeń odpowiedzi typu humoralnego [7]. Zaburzenia te są głównie związane z obecnością autoprzeciwciał skierowanych przeciwko różnym strukturalom endometrium i jajnika [8]. Ich obecność, według wielu autorów, pozwala na zakwalifikowanie endometriozy do chorób autoimmunologicznych. Dodatkowo sugeruje się, że zmiany w układzie odpornościowym u chorych poprzedzają wystąpienie endometriozy, a nie są tylko zjawiskiem wtórnym, spowodowanym obecnością ekotopowego *endometrium* w jamie otrzewnowej [9].

W naszych badaniach oznaczano stężenie przeciwciał antykardiolipinowych w płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą oraz oceniano zdolność limfocytów izolowanych z płynu otrzewnowego do produkcji tych przeciwciał.

Analiza wyników wykazała znaczący wzrost stężenia aCL w płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą w porównaniu do kobiet z grupy referencyjnej. W płynie z hodowli limfocytów otrzewnowych stężenie przeciwciał również było wyższe w grupie kobiet chorych.

Podobne wyniki uzyskali Ulcova-Gallova i wsp. [10], którzy oceniali stężenie aż siedmiu różnych typów przeciwciał antyfosfolipidowych, w tym aCL, w płynie otrzewnowym oraz surowicy krwi kobiet z endometriozą. Wyniki ich badań wykazały wyższe stężenie przeciwciał aCL zarówno w płynie otrzewnowym, jak i w surowicy kobiet z endometriozą, przez co wskazują na nasiloną odpowiedź typu humoralnego w jamie otrzewnej w odpowiedzi na ekotopowe ogniska *endometrium*. Autorzy tej pracy podkreślają również związek obecnych w płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą przeciwciał antyfosfolipidowych i przeciwciał skierowanych przeciwko glikoproteinie I z występowaniem nawracających poronień oraz niepłodnością. Duże znaczenie ma fakt, że również w surowicy krwi kobiet z endometriozą stwierdza się wyższe stężenie aCL [11], co może wskazywać na ogólnoustrojową reakcję ze strony układu odpornościowego.

W tej pracy wykazano także, że zarówno w płynie otrzewnowym, jak i w płynie z hodowli limfocytów największe stężenie aCL obserwowano we wczesnych stadiach choroby, a w kolejnych stopniach znacząco malało. Przeciwciała antyfosfolipidowe, a w szczególności antykardiolipinowe do niedawna kojarzone były przede wszystkim z nawracającymi poronieniami oraz problemami z zajściem w ciążę [12, 13, 14]. Zwraca się jednak uwagę, że ponad 50% kobiet z rozpoznaną endometriozą, ma również problemy z zajściem w ciążę [15].

Obecność przeciwciał aCL w płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą oraz wzmożona ich produkcja przez limfocyty sugeruje, że mogą być one jednym z czynników odpowiedzialnych za zaburzenia płodności u tych kobiet. Natomiast większe stężenie tych przeciwciał we wczesnych etapach endometriozy może tłumaczyć występującą w I i II stopniu endometriozy niepłodność, zanim dojdzie do zmian anatomicznych w obrębie układu rodowego spowodowanych zrostami i bliznowaceniem. Stan taki prawdopodobnie jest główną przyczyną problemów z zajściem w ciążę w III i IV stopniu zaawansowania endometriozy [15, 16]. Ponadto, podwyższone stężenie aCL zarówno w płynie otrzewnowym, jak i w surowicy kobiet z endometriozą również ujemnie koreluje z powodzeniem zapłodnienia *in vitro* (IVF) [17, 18].

Podwyższone stężenie APA w surowicy krwi kobiet, u których wykonywano zakończone niepowodzeniem zabiegi IVF może sugerować, że przeciwciała te są ważnym czynnikiem odpowiedzialnym za utratę ciąży i niepowodzeniem przy zapłodnieniu *in vitro* [13, 19]. Malinowski i wsp. [20] badali obecność APA u kobiet cierpiących na bezpłodność. Przeciwciała antyfosfolipidowe występowały częściej u pacjentek niepłodnych (17,9%) w porównaniu do kobiet zdrowych (4,5%) oraz znacznie częściej u pacjentek z endometriozą (47,7%).

U kobiet z endometriozą badano także występowanie innych autoprzeciwciał. Ulcova-Gallova i wsp. [21] wykazali, że obecność przeciwciał przeciw aneksynie-V oraz innym fosfolipidom może być czynnikiem ryzyka utraty ciąży.

Z kolei Iborra i wsp. [22] stwierdzili, że występujące u ponad połowy kobiet z endometriozą przeciwciała przeciwko *endometrium* mogą mieć związek ze stopniem zaawansowania choroby. Ponadto, u 63% przypadków kobiet z endometriozą wykryto obecność przeciwciał przeciwdądrowych [23].

W ostatnich latach można zaobserwować zwiększone zainteresowanie rolą przeciwciał antykardiolipinowych w patogenezie endometriozy. Mechanizm, w wyniku którego aCL mogą wpływać na rozwój choroby oraz płodność kobiet nie jest dokładnie poznany, ale podwyższone stężenie tych przeciwciał i wzmożona produkcja przez limfocyty wskazuje, że ich obecność może przyczynić się do rozwoju endometriozy i towarzyszącej jej niepłodności.

Wnioski

1. Wzrost stężenia przeciwciał antykardiolipinowych w płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą oraz wzmożona produkcja przeciwciał przez limfocyty sugeruje zaburzenia odpowiedzi typu humoralnego u tych chorych.
2. Największy wzrost stężenia przeciwciał antykardiolipinowych zaobserwowany u kobiet z I stopniem endometriozy, potwierdza nasilenie zmian odpowiedzi typu humoralnego we wczesnych etapach schorzenia.

Praca została zgłoszona na III Sympozjum nt.

„Postępy w diagnostyce i terapii w położnictwie i ginekologii”,
9-11. 10. 2008 w Łodzi

Piśmiennictwo

1. Giudice L, Kao L. Endometriosis. *Lancet*. 2004, 364, 1789-1799.
2. Matarese G, De Placido G, Nikas Y, [et al.]. Pathogenesis of endometriosis: natural immunity dysfunction or autoimmune disease? *Trends Mol Med*. 2003, 9, 223-228.
3. Seery J. Endometriosis associated with defective handling of apoptotic cells in the female genital tract is a major cause of autoimmune disease in women. *Med Hypotheses*. 2006, 66, 945-949.
4. McIntyre J, Wagenknecht D, Faulk W. Antiphospholipid antibodies: discovery, definitions, detection and disease. *Prog Lipid Res*. 2003, 42, 176-237.
5. Koike T, Bohgaki M, Amengual O, [et al.]. Antiphospholipid antibodies: lessons from the bench. *J Autoimmun*. 2007, 28, 129-133.
6. American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*. 1997, 67, 817-821.
7. Antsiferova Y, Sotnikova N, Posiseeva L, [et al.]. Changes in the T-helper cytokine profile and in lymphocyte activation at the systemic and local levels in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2005, 84, 1705-1711.
8. Dias J Jr, de Oliveira R, Abrao M. Antinuclear antibodies and endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet*. 2006, 93, 262-263.
9. Pasoto S, Abrao M, Viana V, [et al.]. Endometriosis and systemic lupus erythematosus: a comparative evaluation of clinical manifestations and serological autoimmune phenomena. *Am J Reprod Immunol*. 2005, 53, 85-93.
10. Ulcova-Gallova Z, Bousù V, Bek L, [et al.]. Endometriosis in reproductive immunology. *Am J Reprod Immunol*. 2002, 47, 269-274.
11. Abrao M, Podgaec S, Filho B, [et al.]. The use of biochemical markers in the diagnosis of pelvic endometriosis. *Hum Reprod*. 1997, 12, 2523-2527.
12. Carp HJ, Shoenfeld Y. Anti-phospholipid antibodies and infertility. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2007, 32, 159-161.

Stężenie przeciwciał antykardioliplinowych w płynie otrzewnowym...

13. Chilcott I, Margara R, Cohen H, [et al.]. Pregnancy outcome is not affected by antiphospholipid antibody status in women referred for in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2000, 73, 526-530.
14. Uncu G, Ozan H, Kucukerdogan I, [et al.]. Anticardiolipin antibodies in pregnancy induced hypertension. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1996, 70, 97-100.
15. Halis G, Arici A. Endometriosis and inflammation in infertility. *Ann N Y Acad Sci.* 2004, 1034, 300-315.
16. Kuivasaari P, Hippeläinen M, Anttila M, [et al.]. Effect of endometriosis on IVF/ICSI outcome: stage III/IV endometriosis worsens cumulative pregnancy and live-born rates. *Hum Reprod.* 2005, 20, 3130-3135.
17. Putowski L, Darmochwał-Kolarz D, Rolinski J, [et al.]. The immunological profile of infertile women after repeated IVF failure (preliminary study). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004, 112, 192-196.
18. Caccavo D, Pellegrino N, Lorusso F, [et al.]. Anticardiolipin antibody levels in women undergoing first in vitro fertilization/embryo transfer. *Hum Reprod.* 2007, 22, 2494-2500.
19. Vaquero E, Lazzarin N, Caserta D, [et al.]. Diagnostic evaluation of women experiencing repeated in vitro fertilization failure. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006, 125, 79-84.
20. Malinowski A, Dyński M, Głowacka E, [i wsp.]. Występowanie przeciwciał antyfosfolipidowych u kobiet leczonych z powodu niepłodności. *Ginekol Pol.* 2000, 71, 1011-1016.
21. Ulcova-Gallova Z, Turek J, Bibkova K, [et al.]. Serum antibodies against annexin V and other phospholipids in women with fertility failure. *Ceska Gynecol.* 2006, 71, 2000-2003.
22. Iborra A, Palacio J, Ulcova-Gallova Z, [et al.]. Autoimmune response in women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 2000, 44, 236-241.
23. Malinowski A, Szpakowski M, Wilczyński J, [i wsp.]. Occurrence of antinuclear antibodies in women with endometriosis and unexplained infertility. *Ginekol Pol.* 1995, 66, 420-424.