

Stężenie żelaza w płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą

Peritoneal fluid iron levels in women with endometriosis

Polak Grzegorz, Wertel Iwona, Tarkowski Rafał, Kotarski Jan

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

Streszczenie

Endometriozę charakteryzuje cykliczny krwotok w obrębie jamy otrzewnowej. Jego konsekwencją jest zaburzenie metabolizmu żelaza w płynie otrzewnowym.

Cel pracy: Celem pracy była ocena stężenia żelaza w płynie otrzewnowym (PO) kobiet z endometriozą.

Materiał i metody: Badaniom poddano PO uzyskany podczas laparoskopii od 25 pacjentek z I/II stopniem (rAFS) endometriozy oraz 25 kobiet z III/IV stopniem zaawansowania schorzenia. Grupę referencyjną stanowiło 25 pacjentek operowanych z powodu surowiczych torbieli jajników. Stężenie żelaza oznaczono metodą kolorymetryczną przy użyciu zestawu Stanbio Iron and Total Binding Capacity.

Wyniki: Stężenie żelaza w PO kobiet cierpiących na endometriozę było istotnie statystycznie wyższe od odnotowanego w grupie referencyjnej. Stężenie żelaza w PO pacjentek z III/IV° endometriozy było znamienne statystycznie wyższe w porównaniu do pacjentek z I/II° zaawansowania schorzenia.

Wnioski: Zaburzony metabolizm żelaza w płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą sugeruje udział tego pierwiastka w patogenezie endometriozy.

Słowa kluczowe: **endometrioza / żelazo / płyn otrzewnowy /**

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: 01.07.2009
Zaakceptowano do druku: 10.12.2009

Summary

Aim: Endometriosis is characterized by a cyclic hemorrhage within the peritoneal cavity. Accumulating data suggests that iron homeostasis in the peritoneal cavity may be disrupted by endometriosis. The aim of our study was to evaluate iron levels in peritoneal fluid (PF) of women with and without endometriosis.

Material and Methods: Seventy-five women were studied: 50 women with endometriosis and, as a reference group, 25 patients with functional follicle ovarian cysts. Iron concentrations in the PF were measured using a commercially available colorimetric assay kit.

Results: Iron concentrations were significantly higher in PF from women with endometriosis as compared to the reference group. Patients with stages III/IV endometriosis had significantly higher PF iron concentrations than women with stages I/II of the disease.

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

Key words: **endometriosis / iron / peritoneal fluid /**

Wstęp

Żelazo jest pierwiastkiem niezbędnym dla funkcjonowania większości organizmów. Jego obecność konieczna jest dla syntezy DNA, hemoglobiny, mioglobiny, cytochromów, wielu enzymów oraz innych białek. Zawartość żelaza w organizmie ludzkim, bez dodatkowej suplementacji żelazem, wynosi 3 do 4 gramów (35 do 45mg/kg masy ciała). Największa jego ilość (około 1,6g) obecna jest w krążących erytrocytach, mniejsze ilości zawierają proporcjonalnie hepatocyty, makrofagi układu siateczkowo-śródbłonkowego, szpik kostny i mięśnie [1, 2, 3].

Jednakże nadmiar żelaza związany jest z licznymi uszkodzeniami tkankowymi. Szczególnie dotyczą one wątroby, która może w takim stanie ulegać włóknieniu i marskości. Prawdopodobnie patologia ta spowodowana jest indukowanym przez jony żelaza oksydacyjnym uszkodzeniem fosfolipidów błon komórkowych [4]. W obecności tlenu bowiem wolne, tzn. niezwiązane z enzymami lub białkami transportowymi, żelazo katalizuje podczas reakcji Fentona nieenzymatyczną produkcję rodnika wodorotlenowego, jednej z najbardziej reaktywnych form tlenu [5].

Metabolizm żelaza wydaje się być nasilony w płynie otrzewnowym (PO) kobiet z endometriozą. Schorzenie charakteryzuje bowiem cykliczny krwotok w obrębie jamy otrzewnowej. Jego źródłem jest nie tylko zjawisko wstecznego miesiączkowania, występujące przecież u większości kobiet, ale także krwawienia z podlegających jak prawidłowa błona śluzowa wpływowi hormonów płciowych, implantów endometrialnych [6, 7]. Stężenie żelaza w płynie otrzewnowym pacjentek z endometriozą jest wyższe od stwierdzanego u kobiet bez tego schorzenia. Nie różni się jednocześnie w sposób istotny statystycznie pomiędzy kobietami ze zmianami czarnymi, białymi oraz czerwonymi jak również nie jest zależne od fazy cyklu płciowego. Wykazano także, że stężenie tego pierwiastka jest niższe od odnotowywanego w surowicy krwi [6, 8, 9]. W ogniskach ektopowego *endometrium* wykazano zwiększoną zawartość złogów żelaza [10]. Zasygnowano nawet, aby oznaczenie zawartości żelaza w podejrzanych zmianach otrzewnowych oraz określenie stężenia syderofagów, czyli makrofagów magazynujących jony żelaza, jako typowych dla endometriozы komórek, w płynie otrzewnowym stanowiło jedno z kryteriów ułatwiających w wątpliwych przypadkach rozpoznanie tego schorzenia [10].

Stężenie jonów żelaza jest wyższe także w zawartości torbieli endometrialnych w porównaniu zarówno do płynu uzyskanego z torbieli surowiczych, śluzowych oraz dermoidalnych jajników, jak i zmian o charakterze *adenocarcinoma* [10].

Cel pracy

Celem pracy była ocena stężenia jonów żelaza w płynie otrzewnowym pacjentek operowanych z powodu endometriozы oraz oszacowanie relacji pomiędzy poziomem żelaza a stopniem zaawansowania endometriozы.

Materiał i metody

Badaniami objęto grupę 75 pacjentek operowanych laparoskopowo w I Katedrze i Klinice Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii UM w Lublinie, włączając 25 pacjentek z I/II oraz 25 kobiet z III/IV stopniem endometriozы. Zaawansowanie schorzenia określano przyjmując zrewidowane kryteria *American Fertility Society* [12]. Grupę referencyjną stanowiło 25 pacjentek operowanych endoskopowo z powodu torbieli surowiczych jajników. Operacje przeprowadzone zostały w folikularnej fazie cyklu płciowego. Wiek pacjentek wynosił od 18 do 37 lat. Śródoperacyjne rozpoznanie endometriozы oraz torbieli surowiczych potwierdzone zostało poprzez pooperacyjne badanie histopatologiczne.

Zaaspirowany pod kontrolą wzroku, z jamy Douglasa oraz zachyłka pęcherzowo-macicznego PO wirowano z przyspieszeniem 500xg przez 10 min. Stężenie żelaza oznaczono metodą kolorymetryczną przy użyciu zestawu Stanbio Iron and Total Binding Capacity (TIBC) (Stanbio Laboratory, Nr kat 370).

Po przygotowaniu próbek: ślepej, badanej i wzorcowej i dodaniu do 100 mikrolitrów każdej z nich 1 mililitra roztworu chłorowodoru hydroksyloaminy w buforze octanowym, poddano je inkubacji w temperaturze pokojowej przez 1 minutę i odczytano absorbancję próby badanej oraz wzorca wobec próby ślepej przy długości fali 560nm (A1).

Następnie dodano do wszystkich próbek po 20 mikrolitrów roztworu ferrozyny, blokera jonów miedziowych oraz chłorowodoru hydroksyloaminy. Probki wymieszano i inkubowano 5 minut w temperaturze 37°C, po czym ponownie zmierzono wartość absorbancji badanej oraz wzorca wobec próby ślepej przy długości fali 560nm (A2).

Stężenie żelaza (w mikrogramach/decylitr) w badanej próbce obliczono według wzoru:

Żelazo w surowicy krwi = $A2-A1$ dla próbki badanej / $A2-A1$ dla wzorca $\times 500$.

Wyniki 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 $p=0,05$. Wyniki zostały przedstawione jako Mediana; Minimum- Maksimum.

Wyniki

Jony żelaza były obecne we wszystkich badanych próbkach płynu otrzewnowego. Stężenie pierwiastka było istotnie statystycznie ($p<0,01$) wyższe w płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą (289; 123-504 $\mu\text{g/dl}$) w odniesieniu do grupy referencyjnej (100; 63-196 $\mu\text{g/dl}$). Odnotowano, że poziom żelaza w płynie otrzewnowym kobiet z III i IV stopniem endometriozy (386; 211-504 $\mu\text{g/dl}$) był znamienne statystycznie wyższy ($p<0,01$) w porównaniu do pacjentek z I i II stopniem zaawansowania schorzenia (204; 213-311 $\mu\text{g/dl}$).

Dyskusja

Nadmiar żelaza w organizmie prowadzi do licznych, niekorzystnych patologii. W naszych badaniach stwierdziliśmy, że kobiety cierpiące na endometriozę narażone są na zwiększone stężenia tego pierwiastka w obrębie jamy otrzewnowej. Wyniki te są zgodne z uzyskanymi przez większość autorów [8, 9]. Jednocześnie odnotowaliśmy zwiększone stężenia żelaza w płynie otrzewnowym pacjentek z endometriozą umiarkowaną oraz ciężką w porównaniu do tych z minimalnym i łagodnym stopniem zaawansowania schorzenia. Rezultaty te wydają się być naturalną konsekwencją mechanizmów związanych z rozwojem choroby. Ektopowe ogniska błony śluzowej macicy, podlegają podobnie jak eutopowe *endometrium* krwawieniu miesięczkowemu. Logicznym więc wydaje się wykazanie zwiększonego stężenia krwinek czerwonych w płynie otrzewnowym pacjentek z endometriozą w porównaniu do kobiet bez schorzenia [13]. Van Langendonck i wsp. [14] odnotowali większe w odniesieniu do grupy kobiet zdrowych stężenie wolnej hemoglobiny w płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą, nieświadczając jednocześnie różnic w stężeniu bilirubiny w tym środowisku pomiędzy badanymi grupami. Ulegające lizie krwinki czerwone uwalniają hemoglobinę, która następnie degradowana jest do jej białkowej części oraz do hemu. Większość komórek broni się przed toksycznym działaniem hemu poprzez ekspresję białek unieczyniających ten związek, jak hemopeksyna, oraz poprzez indukowaną hemem oksygenazę I, powodującą jego dalszą degradację. Dalsze przemiany hemu prowadzą do powstania licznych aktywnych biologicznie substancji, takich jak: jony żelaza, tlenek węgla oraz biliwerdyna, która następnie ulega przemianie do bilirubiny [15].

Zaburzenie metabolizmu żelaza w środowisku jamy otrzewnowej może mieć liczne implikacje kliniczne. Pochodne hemoglobiny, w postaci jonów żelaza oraz hemu, razem z poddanymi apoptozie fragmentami *endometrium* jak również aktywowanymi makrofagami mogą stać się źródłem stresu oksydacyjnego w obrębie jamy otrzewnowej kobiet z endometriozą. Zarówno wolny hem, jak i jony żelaza gromadząc się w otrzewnej mogą powodować jej uszkodzenie zwiększając

adhezję komórek *endometrium* [14]. Zwiększona aktywność oksydacyjna prowadzić może do zaburzeń ekspresji genów kodujących cytokiny, cząsteczki adhezyjne oraz immunoregulatory [9].

Hem poprzez stymulację ekspresji ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) oraz E-selektyny zarówno w komórkach otrzewnej jak i *endometrium* ułatwia implantację komórek błony śluzowej macicy [16]. Ponadto wykazano, że hem może stymulować produkcję przez aktywowane makrofagi, szeregu cytokin biorących udział w patogenezie endometriozy, takich jak $\text{TNF}\alpha$, IL-1 oraz IL-6 [17]. Zwiększona ekspresja oksygenazy hemu prowadzi do nasilonej produkcji biliwerdyny, jonów żelaza oraz tlenku węgla. Ostatni z tych związków rozszerza naczynia krwionośne, a przez to razem z haptoglobina, również wykazującą właściwości angiogenne, może stymulować waskularyzację, niezbędną do rozwoju implantów [14,18].

Dlatego też upośledzona homeostaza żelaza w płynie otrzewnowym poprzez wytworzenie prozapalnego oraz prooksydacyjnego środowiska w jamie otrzewnowej bierze udział w etiopatogenezie endometriozy.

Wnioski

Zaburzony metabolizm żelaza w płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą sugeruje udział tego pierwiastka w patogenezie endometriozy.

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

**Praca zgłoszona na XXX Jubileuszowy Kongres Polskiego
Towarzystwa Ginekologicznego „Jakość życia kobiety – Salus
feminae suprema lex esto” w dniach 16-19 września 2009 roku
w Lublinie**

Piśmiennictwo

1. Mladenka P, Simunek T, Hubl M, [et al.]. The role of reactive oxygen and nitrogen species in cellular iron metabolism. *Free Radic Res.* 2006, 40, 263-272.
2. Reddy M, Clark L. Iron, oxidative stress, and disease risk. *Nutr Rev.* 2004, 62, 120-124.
3. Weinberg E. Cellular iron metabolism in health and disease. *Drug Metab Rev.* 1990, 22, 531-579.
4. Puntarulo S. Iron, oxidative stress and human health. *Mol Aspects Med.* 2005, 26, 299-312.
5. Imlay J. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol.* 2003, 57, 395-418.
6. Van Langendonck A, Casanas-Roux F, Donnez J. Iron overload in the peritoneal cavity of women with pelvic endometriosis. *Fertil Steril.* 2002, 78, 712-718.
7. Polak G, Wertel I, Tarkowski R, [i wsp.]. Poziom ferrytyny w płynie otrzewnowym- nowy marker endometriozy? *Ginekol Pol.* 2006, 77, 389-393.
8. Arumugam K. Endometriosis and infertility: raised iron concentration in the peritoneal fluid and its effect on acrosome reaction. *Hum Reprod.* 1994, 9, 1153-1157.
9. Van Langendonck A, Casanas-Roux F, Eggemont J, [et al.]. Characterization of iron deposition in endometriotic lesions induced in the nude mouse model. *Hum Reprod.* 2004, 19, 1265-1271.

10. Moen M, Halvorsen T. Histologic confirmation of endometriosis in different peritoneal lesions. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1992, 71, 337-342.
11. Iizuka M, Igarashi M, Abe Y, [et al.]. Chemical assay of iron in ovarian cysts: a new diagnostic method to evaluate endometriotic cysts. *Gynecol Obstet Invest.* 1998, 46, 58-60.
12. The American Fertility Society. Revised American Fertility Society classification of endometriosis: 1985. *Fertil Steril.* 1985, 43, 351-352.
13. D'Hooghe T, Debrock S. Endometriosis, retrograde menstruation and peritoneal inflammation in women and in baboons. *Hum Reprod Update.* 2002, 8, 84-88.
14. Van Langendonck A, Casanas-Roux F, Dolmans M, [et al.]. Potential involvement of hemoglobin and heme in the pathogenesis of peritoneal endometriosis. *Fertil Steril.* 2002, 77, 561-570.
15. Maines M. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997, 37, 517-554.
16. Wagener F, Feldman E, De Witte T, [et al.]. Heme induces the expression of adhesion molecule ICAM-1, VCAM-1 and E selectin in vascular endothelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1997, 216, 456-463.
17. Simoni J, Simoni G, Lox C, [et al.]. Cytokines and PAF release from human monocytes and macrophages: effect of haemoglobin and contaminants. *Artif Cells Blood Subst Immobil Biotechnol.* 1994, 22, 525-534.
18. Piva M, Sharpe-Timms K. Peritoneal endometriotic lesions differentially express a haptoglobin-like gene. *Mol Hum Reprod.* 1999, 5, 71-78.



**Sekcja Psychosomatyczna
Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego**

**Katedra i Oddział Kliniczny Ginekologii
i Położnictwa w Tychach,
Wydział Opieki Zdrowotnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach**

z a p r a s z a j ą n a :

**XIII SYMPOZJUM
NAUKOWO-SZKOLENIOWE**

***Stany naglące
w położnictwie i ginekologii***

Tychy

17 - 18 września 2010 roku

**Termin zgłoszenia uczestnictwa
oraz składania prac do 30 kwietnia 2010**

Tychy, ul. Edukacji 102
e-mail: 13sympozjum@gmail.com