



UNIwersytet Medyczny
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wydział Farmaceutyczny
Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej,
Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej

Izabela Monika Kokot

**Analiza wybranych parametrów stanu zapalnego
i równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej
u kobiet z endometriozą**

rozprawa doktorska

Promotor:

dr hab. n. med. Ewa Maria Kratz, prof. UMW
Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej UMW

Drugi promotor:

prof. dr hab. n. farm. Agnieszka Piwowar
Katedra i Zakład Toksykologii UM

Streszczenie

Wprowadzenie: Diagnostyka endometriozy w dalszym ciągu pozostaje sporym wyzwaniem, gdyż nawet obecnie zalecane metody obrazowe (USG, MRI), posiadają znaczne ograniczenia jeśli chodzi o diagnostykę zmian zaotrzewnowych i głęboko naciekających. Skłania to wielu badaczy do poszukiwania niedrogich, a przede wszystkim nieinwazyjnych, biomarkerów umożliwiających skuteczne diagnozowanie kobiet z podejrzeniem endometriozy, lub przynajmniej do wytypowania panelu markerów przydatnych w badaniach przesiewowych i pozwalających na wyselekcjonowanie kobiet o wysokim prawdopodobieństwie rozwoju zaawansowanej endometriozy.

Cel badań: Jednym z głównych celów przeprowadzonych badań była ocena przydatności diagnostycznej oznaczeń stężeń wybranych parametrów stanu zapalnego, tj. IL-1 β , IL-6, hs-CRP, IgG, YKL-40, PRL i CA 125, oraz parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej, tj.: TAS, FRAP, albuminy, bilirubiny całkowitej, kwasu moczowego, żelaza całkowitego, SIRT3, SIRT5, SIRT6, telomerazy i AOPP, w diagnozowaniu zaawansowanej endometriozy. Badania miały również na celu sprawdzenie, czy oznaczenia stężeń w/w zestawu markerów mogą być przydatne do różnicowania pacjentek z zaawansowaną endometriozą od kobiet bez endometriozy, ale chorujących na łagodne zaburzenia ginekologiczne. Istotnym aspektem moich badań była również ocena możliwości zastosowania spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni, jako metody pomocnej w nieinwazyjnym diagnozowaniu pacjentek z zaawansowaną endometriozą i/lub jako metody różnicującej endometriozę z innymi zaburzeniami ginekologicznymi.

Materiał i metody: Materiałem badanym były 43 surowice krwi pochodzące od pacjentek z endometriozą (E). Zebrano również 35 surowic krwi pochodzących od kobiet bez endometriozy lecz z łagodnymi zaburzeniami ginekologicznymi (NE), stanowiących grupę odniesienia. Materiał kontrolny stanowiło 18 surowic krwi pochodzących od zdrowych ochotniczek (C). Metodą ELISA oznaczono stężenia: IL-1 β , IL-6, YKL-40, SIRT3, SIRT5, SIRT6 i telomerazy. Immunoturbidymetrycznie oznaczono stężenia hs-CRP i IgG, za pomocą elektrochemiluminescencji oznaczono stężenia PRL, CA 125 i estradiolu. Metoda kolorymetryczna posłużyła do oznaczenia

stężeń: TAS, ALB, T-BIL, UA, Fe całkowite, AOPP oraz FRAP. Do analizy statystycznej uzyskanych wyników zastosowano program Statistica 13.3 PL, a za istotne uznano wyniki, dla których współczynnik istotności $p < 0,05$, natomiast dla danych spektralnych – Matlab. Projekt badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej został pozytywnie zaopiniowany przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (nr 231/2019, nr 634/2019, nr 685/2019).

Wyniki: Wykazano, że wartości stężeń parametrów stanu zapalnego, tj.: IL-1 β , IL-6, hs-CRP, YKL-40, PRL i CA 125 są istotnie wyższe w surowicach krwi pacjentek z zaawansowaną endometriozą niż w grupie kontrolnej kobiet zdrowych. Natomiast stężenia FRAP i AOPP były istotnie wyższe zarówno w grupie E, jak i NE, niż w grupie kontrolnej. Stężenia surowiczej telomerazy były istotnie wyższe w grupie pacjentek z endometriozą niż u kobiet zdrowych. Jedynym parametrem różnicującym pacjentki z zaawansowaną endometriozą od pacjentek bez endometriozy, ale z łagodnymi schorzeniami ginekologicznymi, był marker CA 125. Parametr ten był również jedynym, którego wartość stężenia była istotna w oszacowaniu ryzyka rozwoju zaawansowanej endometriozy, niezależnie od grupy odniesienia zastosowanej w modelu, a więc również grupy NE. Uzyskane modele w analizie PLS-DA, skonstruowane w oparciu wartości oznaczonych stężeń wybranych parametrów biochemicznych i regiony widm FTIR ATR surowic krwi, charakteryzowały się czułością, swoistością i dokładnością na poziomie odpowiednio: 81-100%, 89-100% oraz 91-100% i pozwoliły na różnicowanie wszystkich trzech grup badanych między sobą, odpowiednio: E, NE i grupy kontrolnej kobiet zdrowych.

Wnioski: Wyniki badań przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej w istotny sposób przyczyniły się do poszerzenia wiedzy z zakresu dodatkowych aspektów związanych z nieinwazyjną diagnostyką zaawansowanej endometriozy. Zastosowanie do oznaczeń diagnostycznych panelu wybranych surowicznych parametrów pozwalających na ocenę stopnia zaawansowania stanu zapalnego oraz utrzymania równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej, w połączeniu z widmem uzyskanym za pomocą spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR-IR), może stanowić bardzo użyteczne narzędzie kliniczne pozwalające na wyselekcjonowanie kobiet, u których występuje duże ryzyko rozwoju zaawansowanej endometriozy. Przełomowym osiągnięciem wydaje się być uzyskany w analizie ATR-IR model diagnostyczny, o potencjalnym zastosowaniu również do monitorowania nawrotu

choroby, gdyż uzyskano całkowity rozdział między grupą pacjentek z endometriozą a grupą NE, co oznacza, że uzyskany model jest charakterystyczny tylko dla endometriozy. Zgodnie z moją najlepszą wiedzą, są to pierwsze badania, w których zastosowano dane łączone - widma ATR i dane biochemiczne w diagnostyce różnicowej zaawansowanej endometriozy.

Summary

Introduction: The diagnosis of endometriosis remains a challenge, as even the currently recommended imaging methods (USG, MRI) have significant limitations when it comes to the diagnosis of retroperitoneal and deep infiltrating lesions. This prompts many researchers to look for inexpensive and non-invasive biomarkers to diagnose women with suspected endometriosis, or at least select a panel of markers useful in screening tests and allowing the selection of women with a high probability of advanced endometriosis.

The aim of the study: The main aim of the study was to assess the diagnostic possibilities of the analyzed parameters of inflammation, i.e. IL-1 β , IL-6, hs-CRP, IgG, YKL 40, PRL and CA 125, and the parameters of the oxidative-antioxidant balance, i.e. TAS, FRAP, albumin, total bilirubin, uric acid, total iron, SIRT3, SIRT5, SIRT6, telomerase and AOPP as an auxiliary tool in the diagnostics of advanced endometriosis. The study was also aimed at checking whether the determination of the above-mentioned set of markers may be useful in distinguishing patients with advanced endometriosis from women suffering from other benign gynecological disorders but without endometriosis. It was also crucial to assess the possibility of using attenuated total infrared spectroscopy as a method helpful in the non-invasive diagnosis of patients with advanced endometriosis and/or a method for differentiation with other gynecological disorders.

Materials and methods: The study material consisted of 43 blood serum samples from patients with endometriosis (E). As comparative group, 35 serum samples of women with other mild gynecological disorders, but without endometriosis (NE), were also selected. The control group was composed of 18 serum samples derived from healthy female volunteers (C). The ELISA method was used to determine the concentrations of: IL-1 β , IL-6, YKL-40, SIRT3, SIRT5, SIRT6 and telomerase. Immunoturbidimetry was used to determine the concentrations of hs-CRP and IgG, and electrochemiluminescence to determine the concentrations of PRL, CA 125 and estradiol. Colorimetric method was used to determine the concentrations of: TAS, ALB, T-BIL, UA, total Fe, AOPP and FRAP. Statistical analysis of the obtained results was performed using the Statistica 13.3 PL, where the results were significant for p values lower than 0.05, and for spectral data - Matlab. The research project presented in this doctoral thesis received a positive opinion of the Bioethics Committee at the Wroclaw Medical University (No. 231/2019, No. 634/2019, No. 685/2019).

Results: The most important results include a significantly higher concentration of inflammatory parameters, i.e. IL-1 β , IL-6, hs CRP, YKL-40, PRL and CA 125 in the blood serum in the group of patients with endometriosis compared to the control group of healthy women. In turn, the concentrations of FRAP and AOPP were significantly higher in the E and NE groups than in the control group. Telomerase levels were significantly higher in the endometriosis group than in the control group. The only parameter differentiating patients with advanced endometriosis from patients with other benign gynecological diseases but without endometriosis was the marker CA 125. This parameter was also the only one whose concentration was significant in estimating the risk of advanced endometriosis, regardless of the reference group used in the model including NE groups. The models obtained in the PLS-DA analysis, constructed on the basis of selected biochemical parameters and regions of the FTIR ATR spectra of blood serum, obtained sensitivity, specificity and accuracy at the level of 81-100%, 89-100% and 91-100%, respectively.

Conclusions: The results obtained in my doctoral thesis significantly contributed to extending the knowledge in the field of non-invasive diagnostics of advanced endometriosis. The use of a selected panel of parameters assessing inflammation and oxidative-antioxidant balance, in combination with the spectrum obtained by attenuated total infrared spectroscopy, is a very useful clinical tool, if not for diagnosis, then certainly for selecting women at high risk of advanced endometriosis. The model obtained in the analysis seems to be a breakthrough achievement, also (potential) in the field of disease relapse monitoring, as a complete separation with the group of NE patients has been achieved, i.e. the model is characteristic only for endometriosis. To the best of my knowledge, this is the first study to use fused data - ATR spectra and biochemical data for the differential diagnosis of advanced endometriosis.