

Streszczenie rozprawy doktorskiej lek. Joanny Figuły pt.: „Stężenie osteopontyny w surowicy krwi pacjentek z klinicznie i histologicznie potwierdzoną endometriozą”

Endometrioza to choroba, która dotyka ok. 2-10 % kobiet w wieku przedmenopauzalnym. Jej głównymi objawami są niepłodność oraz przewlekłe dolegliwości bólowe związane nie tylko z cyklem miesięcznym, ale również występujące bez związku z krwawieniem miesiączkowym. Endometrioza to schorzenie przewlekłe, które znacząco wpływa na zdrowie prokreacyjne kobiet jak również znacząco obniża jakość ich życia.

Mimo licznych badań nad tą chorobą do dnia dzisiejszego dokładna patogenezą pozostaje nieznana. Nie istnieje również żaden test przesiewowy, ani marker, które ułatwiłyby wczesne wykrycie choroby. Osteopontyna to glikoproteina, która odgrywa rolę w procesach takich jak angiogeneza, adhezja komórkowa, apoptoza czy też rozwój zapalenia. Odgrywa rolę w patogenezie wielu chorób m.in miażdżycy, chorobach autoimmunologicznych czy wielu nowotworów.

W badaniu tym chcieliśmy zbadać korelację między stężeniem osteopontyny w surowicy krwi pacjentek z endometriozą a ekspresją genu osteopontyny w implantach endometriotycznych pobranych w trakcie laparoskopii. Założyliśmy również, iż endometrioza może być markerem endometriozy, którego stężenie możemy zbadać w krwi.

Badaniem została objęta grupa 20 kobiet w wieku rozrodczym przyjętych do Kliniki Endokrynologii Ginekologicznej UJCM w celu laparoskopowego leczenia endometriozy. U kobiet przed zabiegiem endoskopowym pobierano krew w celu oznaczenia stężenia osteopontyny. Pacjentki zakwalifikowane do badań zostały poinformowane o prowadzonym programie badawczym i wyraziły na to pisemną zgodę.

Obecność implantów endometriozy potwierdzono jest zarówno technikami obrazowania w trakcie laparoskopii jak również badaniem histopatologicznym pobranych fragmentów tkanek. Klasyfikacje zaawansowania endometriozy prowadzono jest na podstawie międzynarodowej klasyfikacji r-AFS.

Pobrane implanty endometrialne poddano analizie techniką mikromacierzy u 4 pacjentek. Kontrolę do nich stanowiła zdrowa tkanka otrzewnej pobrana w trakcie tego samego zabiegu. Analiza mikromacierzowa wykazała zwiększoną ekspresję genu osteopontyny w tkance chorej, w związku z czym gen ten został wybrany do dalszej analizy. Poziom ekspresji mRNA osteopontyny został oszacowany metodą PCR w czasie rzeczywistym. Stężenie osteopontyny w krwi pacjentek zostało zmierzone metodą immunoenzymatyczną ELISA.

Różnice między badanymi grupami określono przy pomocy testów statystycznych. Dokonane została sprawdzona normalność rozkładu, w przypadku normalności test T-Studenta, w przypadku

braku normalności test U-Manna-Whitney'a. Wyniki zostały opracowane z użyciem programu Statistica 8.

Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego.

W wynikach badań wykazaliśmy zwiększoną ekspresję genu osteopontyny w przypadku obecności endometriozy, potwierdzoną w tkance ekspresją RT-PCR. Stężenie osteopontyny w surowicy krwi pacjentek zdrowych oraz chorych również wykazywało różnice, było znamienne wyższe w przypadku obecności choroby, co może postulować jej rolę jako biomarkera endometriozy. W badaniu nie wykazano różnic w stężeniu osteopontyny w zależności od stopnia choroby lub obecności torbieli endometrialnych.

Dalszych badań wymaga określenie roli witaminy D w rozwoju choroby. Osteopontyna, która stanowi ligand receptora dla witaminy D, może zmieniać aktywność genów w szlaku zależnym od witaminy D, uczestnicząc tym samym w patogenezie choroby.

Summary

Endometriosis is a disease that affects about 2-10% of women in the pre-menopausal age. Its main symptoms are infertility and chronic pain associated not only with the menstrual cycle, but also occurring without connection with menorrhagia. Endometriosis is a chronic condition that significantly affects the reproductive health of women and significantly reduces their quality of life.

Despite numerous studies on this disease to date, the exact pathogenesis remains unknown. There is also no screening test or marker that would facilitate the early detection of the disease.

Osteopontin is a glycoprotein that plays a role in processes such as angiogenesis, cell adhesion, apoptosis or the development of inflammation. It plays roles in the pathogenesis of many diseases, including atherosclerosis, autoimmune diseases and many cancers.

In this study, we wanted to study the correlation between osteopontin serum concentration in patients with endometriosis and osteopontin gene expression in endometriotic implants taken during laparoscopy. We also assumed that endometriosis may be a marker of endometriosis, the concentration of which can be examined in the blood.

The study involved a group of 20 women of childbearing age admitted to the Department of Gynecological Endocrinology UJCM for laparoscopic treatment of endometriosis. In women, before the endoscopic procedure, blood was collected to determine the concentration of osteopontin. The patients were qualified for the study and were informed about the conducted research program and expressed their written consent.

The presence of endometriosis implants is confirmed by both imaging techniques during laparoscopy as well as by histopathological examination of collected fragments of tissues. Endometriosis advancement classifications are based on the international r-AFS classification.

The collected endometrial implants were analyzed by microarray technique in 4 patients. Control was carried out on healthy peritoneal tissue collected during this procedure. Aralia microarray showed increased expression of the osteopontin gene in the diseased tissue, therefore this gene was selected for further analysis. The level of osteopontin mRNA expression was estimated by real-time PCR. The concentration of osteopontin in the blood of the patients was measured by the enzyme immunoassay ELISA.

Differences between the groups were determined using statistical tests. The normality of the distribution was made, in the case of normality, the Student's T test was used, in the case of the normality of the U-Mann-Whitney test was used. The results were developed using the Statistica 8 program.

The study was approved by the Bioethical Commission of the Collegium Medicum of the Jagiellonian University.

The results of the study showed an increased expression of the osteopontin gene in the presence of endometriosis, confirmed in the tissue by RT-PCR expression. Serum concentration of osteopontin in healthy patients and patients also showed differences, was significantly higher in the presence of disease, which may postulate its role as biomarker of endometriosis. The study did not show differences in osteopontin concentration depending on the degree of the disease or the presence of endometrioma cysts.

Further research requires determining the role of vitamin D in the development of the disease. Osteopontin, which is a ligand for the receptor for vitamin D, can change the activity of genes in the pathway dependent on vitamin D, thus contributing to the pathogenesis of the disease.