

Maciej Pliszkiwicz

Ocena przydatności oznaczania osoczowych stężeń izoenzymów arginazy w diagnostyce endometriozy

Wstęp

Endometrioza jest przewlekłą, estrogenozależną chorobą o nieznannej etiologii, dotykającą od 6% do 15% kobiet w wieku rozrodczym, choć najnowsze dane wskazują, że może być to nawet 20%. Choroba stanowi ogromne obciążenie zdrowotne i psychospołeczne dla cierpiących na nią kobiet, a dla systemów ochrony zdrowia – znaczące obciążenie finansowe. Dotychczas nie ustalono jednoznacznie etiologii choroby, powszechnie uznawanych jest kilka teorii jej powstawania, choć żadna z nich nie zyskała miana uniwersalnej. Od lat trwają badania, mające na celu określenie przyczyn powstawania choroby, jak również sposobów jej rozpoznawania i leczenia. Jakkolwiek zbadano setki substancji, nie dysponujemy obecnie żadnym laboratoryjnym oznaczeniem, które mogłoby posłużyć jako wiarygodny marker choroby w zakresie potwierdzenia rozpoznania, ustalenia stopnia zaawansowania, czy późniejszej oceny skuteczności wdrożonego leczenia i monitorowania jej przebiegu.

Cele

W niniejszej pracy podjęto próbę zbadania, czy oznaczenia osoczowych stężeń oraz aktywności izoenzymów arginazy (Arg-1 oraz Arg-2, Mn^{2+} -zależnych metaloenzymów z grupy hydrolaz) mogłyby znaleźć zastosowanie w diagnostyce endometriozy, oraz czy istnieją przesłanki mogące wskazywać na istnienie w patomechanizmie endometriozy podobnego do opisywanego w przypadku raka jajnika mechanizmu ucieczki spod nadzoru immunologicznego, obejmującego wzrost aktywności arginazy oraz spadek stężeń argininy w środowisku guza.

Material i metody

Oznaczenia stężeń i aktywności arginazy wykonano w trzech grupach kobiet – u pacjentek z potwierdzoną endometriozą przed i po radykalnym zachowawczym leczeniu operacyjnym (grupa badana – B), u pacjentek z inną łagodną patologią miednicy (również przed i po operacji; grupa kontrolna 1 – K1), oraz u kobiet zdrowych (bez wywiadu ani cech klinicznych endometriozy, nie prezentujących innej patologii ginekologicznej, metabolicznej, oraz autoimmunologicznej; grupa kontrolna 2 – K2). Krew do oznaczenia wyżej wymienionych parametrów pobierano przed wykonaniem zabiegu oraz w 48 godzin po jego zakończeniu. Po wstępnej obróbce (wirowanie), surowice przechowywano w temperaturze ok. $-80^{\circ}C$ do dalszych analiz.

Stężenia Arg-1 i Arg-2 w surowicy oznaczano za pomocą dedykowanych zestawów opartych na metodologii ELISA. Oznaczenia aktywności arginazy przeprowadzono z użyciem dedykowanych zestawów do laboratoryjnego oznaczania aktywności arginazy w oparciu o metodę konwersji argininy do mocznika i ornityny. Ze względu na brak powtarzalności wyników oznaczeń stężenia arginazy-2, wyniki te zostały wykluczone z dalszej analizy.

Wyniki i ich omówienie

W oznaczeniach przedoperacyjnych, wartości stężeń Arg-1 były wysoce istotnie statystycznie wyższe w grupie B w porównaniu do grupy K1 (średnia \pm SD: $94,1 \pm 44,4$ vs. $44,4 \pm 23,9$ ng/mL; $p < 0,0001$) oraz K2 ($32,6 \pm 26,5$ ng/mL; $p < 0,0001$). Stężenie Arg-1 w grupie K2 było statystycznie istotnie niższe aniżeli w grupie K1 ($p = 0,015$). Wartości przedoperacyjne aktywności arginazy były wysoce istotnie statystycznie wyższe w grupie B w stosunku do grupy K2 ($1,07 \pm 0,67$ vs. $0,73 \pm 0,50$ U/L; $p = 0,0028$), natomiast nie wykazano istotności w zakresie różnicy pomiędzy grupą B a grupą K1 ($0,76 \pm 0,31$ U/L; $p = 0,12$). Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy aktywności arginazy pomiędzy grupami K1 a K2 ($p = 0,26$).

Pooperacyjne wartości stężeń Arg-1 w grupie B były istotnie statystycznie wyższe w porównaniu do grupy K1 ($75,0 \pm 46,3$ vs. $28,8 \pm 20,5$ ng/mL; $p = 0,0005$) oraz nieoperowanej grupy K2 ($32,6 \pm 26,5$ ng/mL; $p < 0,0001$). Pooperacyjna aktywność arginazy była istotnie statystycznie wyższa w grupie B w stosunku do grupy K1 ($1,04 \pm 0,77$ vs. $0,60 \pm 0,58$ U/L; $p = 0,041$) i nieoperowanej grupy K2 ($0,73 \pm 0,50$ U/L; $p = 0,041$). Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy stężeń Arg-1 ($p = 0,60$) ani aktywności arginazy ($p = 0,19$) pomiędzy operowaną grupą K1 a nieoperowaną grupą K2. Zaobserwowano statystycznie istotny spadek stężenia Arg-1 w obrębie zarówno grupy B ($-19,1 \pm 63,5$ ng/mL; $p < 0,0001$) jak i K1 ($-13,7 \pm 11,3$ ng/mL; $p = 0,0043$). Nie zaobserwowano istotnej pooperacyjnej zmiany aktywności arginazy w grupie B ani K1 (odpowiednio $-0,05 \pm 0,67$ U/L; $p = 0,346$ oraz $-0,11 \pm 0,55$ U/L; $p = 0,13$).

Analiza czułości i swoistości stężenia Arg-1 oraz aktywności arginazy w surowicy jako potencjalnych wskaźników diagnostycznych endometriozy (czyli ocena sprawności diagnostycznej testu metodą *Receiver Operating Characteristic* (ROC)), dla rozróżnienia pomiędzy grupą badaną (z endometriozą) a grupami K1 i K2 (bez endometriozy) wykazała, iż wysokie stężenie Arg-1 bardzo dobrze różnicowało grupę B od grupy K2 i nieco słabiej grupę B od grupy K1. Punkt odcięcia proponowany na podstawie indeksu Youdena dla różnicowania grup B i K2 miał wartość $42,3$ ng/mL, zapewniając czułość = 90% i swoistość = 81%. Analogiczny punkt odcięcia dla różnicowania grup B i K1 miał wartość $78,4$ ng/mL, zapewniając czułość = 61% i swoistość = 95%.

Analiza korelacji parametrów przed- i pooperacyjnych w grupie badanej ujawniła statystycznie istotną korelację pozytywną pomiędzy przedoperacyjną aktywnością arginazy a stopniem zaawansowania klinicznego endometriozy wg skali ASRM (Grading; współczynnik korelacji rang Spearmana $R = 0,22$; $p = 0,029$), natomiast nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności pomiędzy stopniem zaawansowania klinicznego a przedoperacyjnym stężeniem Arg-1 w surowicy ($R = -0,02$; $p = 0,83$). Zaobserwowano również statystycznie istotną pozytywną korelację pomiędzy przedoperacyjną aktywnością arginazy a glikemią na czczo ($R = 0,27$; $p = 0,006$) oraz stężeniem Arg-1 w surowicy ($R = 0,29$; $p = 0,003$). Nie wykazano zależności pomiędzy liczbą lokalizacji zmian endometrialnych a stężeniem Arg-1 (odpowiednio przed operacją $R = -0,01$; $p = 0,88$; i po operacji $R = -0,100$; $p = 0,34$) ani aktywnością arginazy (odpowiednio przed operacją $R = 0,06$; $p = 0,53$; i po operacji $R = 0,00$;

p=0,99). Nie wykazano również istotnej statystycznie korelacji między pooperacyjnym stężeniem Arg-1 a pooperacyjną aktywnością arginazy (R=0,19; p=0,078).

Nie wykazano zależności pomiędzy przed- i pooperacyjnymi stężeniami Arg-1 oraz aktywnością arginazy a ryzykiem nawrotu choroby czy szansą na uzyskanie ciąży po przeprowadzonym leczeniu operacyjnym u chorych z endometriozą i niepłodnością.

Wnioski

1. Wyższe przed- i pooperacyjne stężenia arginazy-1 w surowicy pacjentek z endometriozą w porównaniu z kobietami zdrowymi i pacjentkami z inną łagodną patologią miednicy wskazują na potencjalną użyteczność pomiarów stężeń izoenzymów arginazy w surowicy jako markerów diagnostycznych obecności endometriozy.
2. Analogiczny jak dla stężenia arginazy-1, lecz słabszy pozytywny związek przed- i pooperacyjnej całkowitej aktywności arginazy w surowicy z obecnością endometriozy, bez istotnej różnicy wartości przedoperacyjnych w porównaniu z pacjentkami z inną łagodną patologią miednicy, przemawia przeciwko udziałowi surowiczej aktywności enzymatycznej arginazy w patogenezie endometriozy. Dalszych badań wymagają stężenie i aktywność izoenzymów arginazy w tkance endometrioidalnej i jej otoczeniu.
3. Sprawność diagnostyczna przedoperacyjnego rozpoznania endometriozy jest znacznie wyższa dla stężenia arginazy-1 w porównaniu z całkowitą aktywnością arginazy w surowicy, osiągając czułość 61% i swoistość 95% dla różnicowania z inną łagodną patologią miednicy, oraz czułość 90% i swoistość 81% dla różnicowania z kobietami zdrowymi, nie spełniając jednak kryteriów testu zastępującego laparoskopię diagnostyczną.
4. Brak silnych korelacji stężenia arginazy-1 i całkowitej aktywności arginazy w surowicy z liczbą lokalizacji zmian i stopniem zaawansowania klinicznego endometriozy wg skali ASRM przemawia przeciwko możliwości wykorzystania tych markerów do oceny zaawansowania klinicznego endometriozy. Słaba pozytywna korelacja przedoperacyjnej aktywności arginazy z wartością skali ASRM wymaga potwierdzenia w dalszych badaniach.
5. Podobny pooperacyjny spadek stężenia arginazy-1 w surowicy obserwowany do 48h po zabiegu u pacjentek z endometriozą i inną patologią miednicy sugeruje, że za zwiększone stężenie arginazy-1 nie jest bezpośrednio odpowiedzialna usuwana w trakcie zabiegu tkanka endometrioidalna, lecz inne mechanizmy. Weryfikacja hipotezy udziału arginazy w mechanizmie ucieczki endometriozy spod nadzoru immunologicznego wymaga przeprowadzenia oznaczeń jej ekspresji w tkance endometrioidalnej.
6. Brak związku przed- i pooperacyjnych stężeń arginazy-1 i całkowitej aktywności arginazy w surowicy z ryzykiem nawrotu i szansą uzyskania ciąży po operacji endometriozy przemawia przeciwko użyteczności oznaczeń arginazy w ocenie rokowania pooperacyjnego u pacjentek z endometriozą.
7. Dla oceny możliwości praktycznego wykorzystania surowiczego stężenia arginazy-1 w diagnostyce endometriozy konieczna jest standaryzacja metody jego oznaczania oraz określenie zakresów referencyjnych i parametrów sprawności diagnostycznej w badaniu obejmującym dużą grupę kobiet z objawami mogącymi sugerować obecność endometriozy, która zostanie potwierdzona lub wykluczona w oparciu o wyniki badań klinicznych, obrazowych i histopatologicznych.