

U n i w e r s y t e t M e d y c z n y
i m . K a r o l a M a r c i n k o w s k i e g o
w P o z n a n i u

Wydział Nauk o Zdrowiu

Ocena wpływu immunomodulacji preparatem RESAN na zmianę potencjału proliferacyjnego eutopowego endometrium u szczura

lek med. Ksenia Stryjakowska

Praca na stopień
doktora nauk medycznych

Katedra i Klinika Zdrowia Matki i Dziecka
Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego
Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik Katedry
Prof. dr hab. n. med. Tomasz Opala

Promotor pracy:
Prof UM. dr hab. med. Krzysztof Szymanowski

Poznań 2011

Spis treści

Spis treści	2
1. WSTĘP	3
1.1. Endometrioza.....	3
1.2. Etiopatogeneza endometriozy.....	5
1.3. Rola odpowiedzi immunologicznej i komórkowej w etiopatogenezie endometriozy.....	7
1.4. Rozpoznawanie endometriozy	9
1.5. Leczenie endometriozy	11
1.1. Aktywność proliferacyjna komórek i apoptoza w aspekcie endometriozy	16
1.2. RESAN	20
2. CEL PRACY	22
3. MATERIAŁ.....	22
4. METODYKA	24
4.1. Pierwsza część eksperymentu.....	24
4.2. Ocena nasilenia ekspresji badanych genów <i>TERT</i> , <i>Ki-67</i> , <i>BAX</i> , <i>Bcl-2</i>	26
4.3. Metody statystyczne.....	34
5. WYNIKI	35
6. DYSKUSJA.....	51
7. WNIOSKI.....	61
8. BIBLIOGRAFIA	63
Spis tabel	78
Spis ilustracji.....	79

1. WSTĘP

1.1. Endometrioza

Endometrioza (gruczolistość zewnętrzna) to rozrost gruczołów i podścieliska błony śluzowej macicy poza jamą macicy, co w konsekwencji prowadzi do przewlekłej reakcji zapalnej, zrostów wewnątrz miednicy mniejszej, przewlekłego bólu i ograniczonej płodności. Endometrioza występuje w populacji kobiet w wieku rozrodczym w 7-10%, u 38% kobiet z niepłodnością, a w grupie skarżącej się na przewlekły ból w miednicy mniejszej endometriozę można stwierdzić aż u 71-87% pacjentek [29, 41, 116]. Głównymi objawami są chroniczny ból, dyspareunia i niepłodność.

Endometrioza jest uważana za chorobę dziedziczną wielogenowo, o złożonej, niewyjaśnionej do końca etiologii [18, 69, 117]. Wiadomo jednak, że jest to choroba estrogenozależna, ponieważ objawy znikają wraz z pojawieniem się menopauzy. Charakteryzuje się wzrostem wydzielania prozapalnych cytokin w płynie otrzewnowym oraz obniżeniem apoptozy w eutopowym endometrium [80, 84, 87, 97].

Ogniska endometriozy usytuowane są najczęściej wewnątrz jamy otrzewnej: na powierzchni jajników i więzadle szerokim, na więzadle krzyżowo-macicznym i w zatoce Douglasa. Endometrioza rzadziej obserwowana jest na powierzchni jelit i pęcherza moczowego, bardzo rzadko dotyczy moczowodu i nerki [79]. Endometriozę można też zaobserwować na szyjce macicy, w powłokach brzusznych u kobiet po cięciach cesarskich i w bliźnie po nacięciu krocza (po porodach fizjologicznych). Endometrioza zlokalizowana w pętku powstaje najczęściej w wyniku operacji laparoskopowych [41].

Ogniska endometriozy różnią się między sobą zabarwieniem wynikającym z obecności złogów hemosyderyny oraz strukturą [17, 21, 95]. Typowymi postaciami są żółtobrazowe ogniska lub wyraźnie widoczne pęcherzyki, wypełnione przezroczystą treścią płynną [17, 21]. Zmiany mogą także przyjmować postać białych nalotów lub czerwonych plam, ognisk rozszerzonych naczyń krwionośnych lub punktowych wybroczyn oraz kulistych i nieregularnych ubytków otrzewnej. Wygląd ognisk pozwala na określenie czy jest to postać aktywna endometriozy (endometrioza czerwona), czy też są to zmiany stare, nieaktywne lub o niskiej aktywności (endometrioza brunatna i czarna bądź biała, odpowiadająca złogom hemosyderyny bądź zrostom) [20, 21].

Możliwość zezłośliwienia ognisk endometriozy oceniana jest na poziomie od 0,7 do 1,0%, może dotyczyć ektopowych zmian otrzewnowych, jak i powierzchni jajnika albo torbieli endometrialnych przydatków [44, 48]. Wydaje się, że złośliwe zmiany rozwijają się częściej na podłożu torbieli endometrialnych niż ektopowych ognisk na powierzchni jajników (5,6% vs 1,6%) [44, 48]. Wśród nowotworów złośliwych, rozwijających się na podłożu endometriozy, najczęściej stwierdza się nowotwory jasnokomórkowe (41%) i endometrioidalne (38%) jajnika. Nowotwory te powstają w wyniku nieprawidłowego rozrostu tkanek endometriozy, głównie o cechach atypii [44, 90, 109]. W związku z powyższym taki atypowy rozrost wydaje się być stanem przednowotworowym, chociaż czynnik pobudzający transformację komórkową nie jest jednoznacznie określony [44, 90, 103]. Zdaniem części autorów, antygen zwiększonej proliferacji Ki-67 ma istotne znaczenie w nie zrównoważonym wzroście komórkowym [48, 90]. Wysoki indeks aktywności proliferacyjnej występuje w przypadkach atypowego rozrostu endometrium, jest on wyższy niż w przypadku typowego rozrostu, ale niższy niż w komórkach raka [48, 90]. Mutacja genu *PTEN* i *p53* jest najprawdopodobniej odpowiedzialna za nieprawidłowy szlak przemian komórkowych, ponieważ występuje jednakowo często w guzach endometrialnych, jak i w raku jasnokomórkowym i endometrioidalnym jajnika [21, 44]. Natomiast nie ma związku pomiędzy mutacją genu *BRCA1* a częstością występowania raka jajnika w przebiegu endometriozy [90].

Czynnikiem predysponującym do częstszego występowania endometriozy jest wywiad miesięczkowy. U kobiet, które podają w wywiadzie ginekologicznym wcześniej osiągniętą dojrzałość płciową (poniżej 11 roku życia), krótkie cykle (krótsze niż 28 dni) i obfite (powyżej 6 –7 dni) krwawienia miesięczne oraz używają tamponów dopochwowych podczas menstruacji, zaobserwowano wzrost ryzyka zachorowania na endometriozę [62, 57, 122]. Wydaje się również, że choroba rozwija się częściej wśród pierwiastek, natomiast obciążony wywiad położniczy nie wydaje się mieć w tym przypadku żadnego znaczenia [57, 122]. Ryzyko rozwoju choroby jest niższe wśród kobiet stosujących doustną antykoncepcję, niż w pozostałej populacji. W literaturze medycznej występują sprzeczne informacje (o większym lub mniejszym ryzyku zachorowania) dotyczące kobiet, które w przeszłości stosowały antykoncepcję doustną [57, 122].

1.2. Etiopatogeneza endometriozy

O endometriozie jako pierwszy pisał Daniel Shroen już w 1690r., w „Disputatio Inauguralis Medica de Ulceribus Ulceri” [108]. Pomimo wielu zmian jakie miały miejsce od XVII wieku oraz niewątpliwego postępu we wszelkich dziedzinach nauki, z medycyną na czele, badacze nadal nie potrafili jednoznacznie zdefiniować i podać przyczyn występowania tej choroby.

Począwszy od XIX wieku wysuwano hipotezy dotyczące patogenezy endometriozy. Friedrich Daniel von Recklinghausen proponował, że endometrium ektopowe pochodzi z przewodów Wolfa [108]. Thomas Stephen Cullen obstawał przy przewodach Müllera. Heinrich Wilhelm Waldeyer wysunął teorię metaplazji. Iwanhofen w roku 1898 wysunął przypuszczenie, że powstaje ona z metaplazji nabłonka otrzewnej. Meyer w 1903 roku podejrzewał, że metaplazji sprzyjało wpuklenie się nabłonka w podścielisko, pod wpływem czynników hormonalnych i zapalnych [22, 94]. Ta teoria mogłaby tłumaczyć występowanie endometriozy u niemiesiączkujących pacjentek z zespołem Rokitansky-Meyer-Küstner [49].

Kolejne hipotezy wysuwali Pick w 1905r., Halban w 1924r. oraz Navrital i Kramer w 1936r.

Najszerzej akceptowaną teorią jest teoria „miesiączkowania wstecznego”, którą opublikował w 1925r. John Sampson [101]. Opierała się ona na trzech zasadniczych założeniach: wstecznym wypływie krwi miesiączkowej do jamy brzusznej, aktywności tkanki endometrium przemieszczonej do jamy otrzewnowej oraz zdolności adhezyjnej, implantacji i proliferacji ektopowej tkanki do komórek otrzewnowych.

Refluks jajowodowy krwi miesiączkowej występuje u około 90% kobiet, a komórki endometrium można uzyskać z płynu otrzewnowego zarówno od zdrowych jak i chorych na endometriozę kobiet [22]. W prawidłowych warunkach, 90% ektopowego endometrium, które podczas menstruacji dostaje się do jamy otrzewnowej, ulega apoptozie i fagocytozie [84]. Wobec tego kluczową rolę w nieprawidłowym przebiegu tego procesu mogłoby odgrywać niesprawny system eliminacji ektopowych fragmentów błony śluzowej macicy [37]. Obecnie wszczepienie tkanki w otrzewną tłumaczy się miejscowym zaburzeniem mechanizmów, które w prawidłowych warunkach zapobiegają adhezji komórek [37, 60]. Teoria transplantacji mogłaby również wyjaśniać rozwój endometriozy w powłokach brzusznych i w okolicy krocza u kobiet po cięciu cesarskim i porodzie fizjologicznym oraz w pępku po zabiegach laparoskopowych. Ponadto tłumaczyłaby ona wzrost częstości zachorowania na endometriozę wśród pacjentek z zespołem Asherman’a [49].

Według hipotezy, którą w roku 1980 wysunęli Weed i Arquembourg, przyczyną choroby jest niewydolność układu immunologicznego [122]. Dwa lata później Malick uznał, że u podłoża endometriozy leży wrodzona lub nabyta osłabiona aktywność fibrynolityczna otrzewnej. Natomiast teoria indukcji, potwierdzona doświadczalnie przez Lavendera [17], zakładała istnienie nieodróżnicowanych komórek w jamie otrzewnej, które pod wpływem czynników biochemicznych lub immunologicznych (mających związek z błoną śluzową macicy) przekształcają się właśnie w komórki endometrium, dając tym samym początek endometriozie.

Patogeneza choroby wciąż budzi duże kontrowersje; powszechność występowania łagodnych postaci endometriozy Johannes Evers uznał za podstawę twierdzenia, że "endometrioza nie istnieje" [35].

Jednakże nie ulega wątpliwości, że aby powstała endometrioza, musi dojść najpierw do implantacji i rozwoju endometrium poza jamą macicy, co umożliwiając zmiany w układzie immunologicznym, jak i predyspozycja samej tkanki do proliferacji. Dmowski i wsp. [32, 33, 34], opracowali teorię obniżonej odporności komórkowej, jako etiopatologicznego czynnika w endometriozie. W ogniskach endometriozy obserwuje się obniżenie apoptozy komórek endometrium w stosunku do endometrium eutopowego oraz brak zmian związanych z cyklem płciowym [32, 82]. Dmowski i wsp. wykazali niższe nasilenie apoptozy w gruczołach endometrium eutopowego w koegzystencji ognisk endometriozy w miednicy mniejszej [32].

1.3. Rola odpowiedzi immunologicznej i komórkowej w etiopatogenezie endometriozy

Istnieją hipotezy że wpływ czynników immunologicznych może stanowić podstawę do powstawania endometriozy. Dmowski i wsp. [33, 34] uważają, że komórki endometrium migrujące, zgodnie z teorią Sampsona, w czasie miesiączki poza jamę macicy, przez jajowody i naczynia krwionośne, powinny być rozpoznawane i niszczone przez komórki układu immunologicznego. Zatem osłabienie mechanizmów odpowiedzi immunologicznej może prowadzić do większego przeżycia komórek ektopowego endometrium i w konsekwencji sprzyjać rozrostowi endometriozy [20, 21, 33, 34, 79].

Zwiększona proliferacja ektopowej tkanki doprowadza do powstania i rozwoju ognisk endometriozy. Ogniska te z kolei wywołują wtórną reakcję układu odpornościowego i stymulację limfocytów B [37, 84, 121]. Wytwarzane autoprzeciwciała mogą z jednej strony ograniczać rozrost endometriozy, jak również być przyczyną niepłodności i zwiększać ryzyko poronień [37]. Według Dmowskiego, w endometriozie swoiste są autoprzeciwciała przeciw antygenom o masie cząsteczkowej 26 i 34 kDa, które występują tylko u 60% chorych kobiet [37]. Inni badacze wykazują wyższą masę cząsteczkową, od 34 do 140 kDa [84, 121]. W przebiegu choroby występują także autoprzeciwciała skierowane przeciwko antygenom i komórkom endometrialnym, antygenom wewnątrzkomórkowym (autoprzeciwciała antyfosfolipidowe, przeciwhistonowe, przeciwjądrowe) oraz tkankom (antyendotelialne) i narządom wewnętrznym (przeciwjajnikowe, przeciwtarczycowe) głównie klasy IgG i IgA oraz IgM [37]. Obecność różnego rodzaju przeciwciał w przebiegu endometriozy sugeruje nieprawidłową aktywację limfocytów B [37].

Literatura bazująca na doświadczeniach ostatnich lat podaje, iż w przebiegu endometriozy dominuje odpowiedź immunologiczna indukowana przez limfocyty pomocnicze typu 2 [37, 41, 49]. Podgaec i wsp. [97] opublikowali w 2007r. badanie porównujące stężenie i wzajemny stosunek cytokin wydzielanych zarówno przez limfocyty Th1 i Th2 w płynach ustrojowych u zdrowych i chorych na endometriozę kobiet. Autorzy na podstawie swoich badań wykazali, że w przebiegu choroby dominuje odpowiedź immunologiczna Th2-zależna. [97]. W płynie otrzewnowym i we krwi obwodowej występują zasadnicze zmiany w stężeniu cytokin, czynników wzrostu czy też cząsteczek adhezyjnych jak również makrofagów i komórek NK [36, 37].

Defekt odporności komórkowej polega m.in. na obniżonej rozpoznawalności i upośledzeniu niszczenia ektopowych komórek endometrium przez limfocyty T cytotoksyczne (Tc). Obniżenie właściwości toksycznych limfocytów Tc wynika z obniżenia ich aktywności [36]. Świadczyć też o tym może odwrotnie proporcjonalny związek nieprawidłowej funkcji limfocytów Tc ze stopniem zaawansowania choroby [41]. Dysfunkcja komórek NK wynika z hamującego wpływu cytokin takich jak TGF- β i IL-10, a także przez czynniki wydzielane przez samą ektopową tkankę endometrium [91]. Defekt komórek NK prowadzi do przetrwania fragmentów endometrium poza jamą macicy i większej jego proliferacji co oczywiście koreluje z zaawansowaniem samej choroby [21, 91, 48,].

W płynie otrzewnowym u kobiet cierpiących na endometriozę stwierdza się podwyższoną ilość makrofagów, jednak ich właściwości fagocytarne i lityczne są znacznie obniżone [14, 19, 96]. Makrofagi wydzielają liczne białka, cytokiny, które u zdrowych kobiet odgrywają jedną z kluczowych ról w usuwaniu przetrwałych fragmentów ektopowych tkanek, a u kobiet z rozpoznaną endometriozą sprzyjają proliferacji ektopowego endometrium (IL-1, PDGF, EGF, TGF- α , TNF- α ,) inicjują angiogenezę (IL-8, VEGF, TGF- α , TNF- α ,), stymulują adhezję (IL-6, IL-8, fibronektyna.), pobudzają do tworzenia się zrostów (TGF- β), a także pobudzają limfocyty B do produkcji przeciwciał (IL-6, IL-10) [10, 23, 47, 91].

Nie wyjaśniono jeszcze mechanizmu powstawania autoprzeciwciał w endometriozie; nie można jednoznacznie stwierdzić czy są one odpowiedzialne za powstawanie choroby, a nie są jedynie jej skutkiem. U kobiet z endometriozą, makrofagi zostają aktywowane do niszczenia ektopowych ognisk endometrium [37, 47].

Zatem, podsumowując, defekt odpowiedzi immunologicznej w przebiegu endometriozy dotyczy zarówno odpowiedzi komórkowej jak i humoralnej oraz komórek zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną tj. makrofagów i monocytów oraz komórek NK [64, 75].

1.4. Rozpoznawanie endometriozy

Przewlekły ból w miednicy mniejszej, zgłaszany przez 30-50% pacjentek, ból przy współżyciu płciowym (25-50%), bolesne miesiączki (60-80%) i przede wszystkim niepłodność (30-50%), to objawy, na które skarżą się kobiety z rozpoznaną endometriozą [29, 41, 59]. Żaden z tych objawów nie jest patognomiczny. Obraz kliniczny połączony z wywiadem, badaniem ginekologicznym, badaniami laboratoryjnymi oraz badania obrazowe, szczególnie z wykorzystaniem ultrasonografii transwaginalnej, mogą sugerować endometriozę, jednak ostateczne rozpoznanie można postawić tylko na podstawie obrazu podczas operacji, szczególnie laparoskopii, rzadziej laparotomii. Rozpoznanie stawiane jest na podstawie oceny makroskopowej i potwierdzone wynikiem badania histopatologicznego [16, 41, 91, 127]. Trzeba jednakże nadmienić, że w rozpoznaniu endometriozy otrzewnowej potwierdzenie histopatologiczne nie jest warunkiem koniecznym.

W badaniach biochemicznych największe zastosowanie ma białko CA-125, z wysoką specyficznością rzędu do 93%, pomimo niskiej czułości [48, 91]. Najczęściej podwyższone wartości CA-125 towarzyszą torbielom endometrialnym i endometriozie III i IV stopnia. Podwyższone wartości CA-125 występują również w innych schorzeniach ginekologicznych: złośliwych guzach jajnika, raku szyjki macicy, raku trzonu macicy, mięśniakach macicy, polipach szyjkowych, stanach zapalnych miednicy mniejszej, guzach zapalnych, ciąży ektopowej, chorobach układu pokarmowego, oraz zmianach zapalnych otrzewnej, opłucnej i wątroby [20, 29, 43, 59, 71, 124].

Inne markery takie jak CA 19-9, CA 15-3 mogą służyć ocenie stopnia zaawansowania endometriozy jednak nie znajdują zastosowania we wstępnej diagnostyce [30, 33, 48].

Złożoność zjawiska endometriozy i jego enigmatyczność podkreśla duża różnorodność i mnogość klasyfikacji tej choroby.

Najczęściej wykorzystuje się łatwą i przejrzystą w zastosowaniu klasyfikację ASRM [6] (American Society for Reproductive Medicine). Rozróżnia się w niej cztery stopnie choroby:

I stopień (1-5 punktów), II - 6-15 pkt., III - 16-40 pkt. i IV – powyżej 40 pkt. Punkty przyznaje się odpowiednio biorąc pod uwagę: lokalizację, wielkość i głębokość naciekania ognisk endometriozy, obecność zrostów i torbieli endometrialnych. Klasyfikacja ASRM nie uwzględnia niestety aktywności ognisk endometrialnych, stopnia nasilenia dolegliwości klinicznych, ani niepłodności. W tym miejscu należy wspomnieć o klasyfikacjach Acosty i wsp., Kistnera, Sieglera i Behrmana, a także Butrama. Inne klasyfikacje opierają się na ocenie histologicznej aktywności ognisk, wyróżniając postacie aktywne i nieaktywne.

W swojej klasyfikacji Koninckx i Martin [71] uznają aktywność zależną od głębokości naciekania: zmiany powierzchowne, o niskiej aktywności mitotycznej ektopowego endometrium, naciekające do 1mm; endometrioza umiarkowana penetrująca do grubości 2,5 mm; endometrioza aktywna głęboko naciekająca powyżej 5 mm pod powierzchnię otrzewnej. Natomiast Brosens i wsp. dzielą endometriozę nie tylko na postać aktywną (czerwoną) i nieaktywną (brązowe lub czarne ogniska), ale również rozróżniają postać otrzewnową, jajnikową i głęboką [21].

1.5. Leczenie endometriozy

Niepłodność i przewlekły ból przyczyniają się w znacznym stopniu do obniżenia jakości życia kobiet cierpiących na endometriozę i są główną przyczyną podejmowania leczenia.

W związku z niejasnością mechanizmu powstawania endometriozy, leczenie głównie opiera się na leczeniu objawowym, minimalizacji nawrotów choroby i leczeniu niepłodności.

Forma terapii może obejmować leczenie zachowawcze, operacyjne, jak również leczenie skojarzone oraz techniki wspomaganego rozrodu podparte farmakoterapią i/lub ewentualnym zabiegiem operacyjnym [4, 29, 61, 84, 99].

Leczenie ma za zadanie przede wszystkim zredukowanie dolegliwości bólowych przez jak najdłuższe okresy remisji, a także umożliwienie zajścia w ciążę [68, 99].

Laparoskopia nazywana jest złotym standardem leczenia zmian chorobowych w endometriozie. W zależności od stopnia zaawansowania choroby można usunąć powierzchowne ogniska, torbiele endometrialne, a nawet dokonać histerektomii z przydatkami [60, 127]. Należy wcześniej dokładnie ustalić postępowanie z pacjentką biorąc pod uwagę nie tylko zaawansowanie choroby, ale także jej wiek i plany rozrodcze. W około 2-12% zabieg laparoskopowy kończy się laparotomią, głównie ze względu na bezpieczeństwo pacjentki podczas trudnych technicznie endoskopii [60, 99]. Poważne powikłania okołoperacyjne takie jak: przetoki jelitowe i pęcherzowe oraz ropnie występują w około 3,5-15,5% zabiegów [36, 100]. Większość powikłań dotyczy leczenia głębokiej endometriozy w przegrodzie odbytniczo-pochwowej. Laparotomia wydaje się być skuteczną formą terapii głównie w leczeniu nawrotów choroby. Nawroty endometriozy po leczeniu chirurgicznym wynoszą około 5-20% na rok, osiągając 40% po 5 latach. Nawrót bólu po leczeniu zabiegowym szacuje się na 5-15% [100, 116]. Zasadnicze znaczenie przy wyborze sposobu leczenia ma doświadczenie zespołu operacyjnego.

Uznanymi i szeroko stosowanymi metodami leczenia farmakologicznego endometriozy są: analogi gonadoliberyn (GnRHa), Danazol oraz doustne środki antykoncepcyjne i progestageny [15, 16, 44, 46, 89].

Analogi gonadoliberyn znalazły zastosowanie w łagodzeniu dolegliwości bólowych w przebiegu endometriozy. Zastosowanie analogów GnRH po leczeniu operacyjnym zaawansowanej endometriozy zmniejsza ryzyko nawrotów choroby [15, 16].

Pomimo dobrych efektów terapeutycznych leki te wywołują szereg objawów niepożądanych [92]. Do najistotniejszych objawów związanych z hipoe estrogenizmem należy utrata masy kostnej i objawy wypadowe [46, 92]. Z tego powodu leki te nie powinny być stosowane przez okres dłuższy niż 6 miesięcy [15, 92, 99].

Brosens i Koninckx [21, 71, 72], zaproponowali leczenie skojarzone i trójstopniowy schemat terapii w III i IV stopniu zaawansowania endometriozy, który polegał na leczeniu laparoskopowym i pooperacyjnym stosowaniu analogu GnRH przez okres trzech miesięcy, po którym ponownie wykonuje się laparoskopię.

Danazol, syntetyczny steroid o działaniu przeciwigonadotropowym, zajmuje nadal istotne miejsce w leczeniu farmakologicznym endometriozy. Stosowany w dobowej, doustnej dawce 400-800 mg przez 4 do 6 miesięcy wywołuje zahamowanie owulacji i brak miesiączki oraz atrofię endometrium [24]. Objawy uboczne wynikają z androgennego działania leku. Najczęściej występują zaburzenia skórne związane z trądzikiem i tłustą cerą oraz hirsutyzm, jak również zatrzymanie wody i przyrost masy ciała. Niekorzystne zmiany w profilu lipidowym polegają na wzroście frakcji LDL cholesterolu i zmniejszeniu HDL cholesterolu [16, 80]. Opisywane objawy uboczne wpłynęły znacznie na ograniczenie stosowania Danazolu w ostatniej dekadzie.

Skuteczne w łagodzeniu dolegliwości bólowych są doustne tabletki antykoncepcyjne, które przyjmowane przez okres 6 - 9 miesięcy redukują ból u 75%-100% pacjentek z endometriozą [72]. Cykliczne przyjmowanie tabletek hormonalnych w takim samym stopniu redukuje niezwiązany z cyklem płciowym ból i bolesne stosunki płciowe co analogi GnRH [72,80]. Jeśli podczas 3 miesięcznej, ciągłej terapii niskodawkową antykoncepcją oraz niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi nie uzyskuje się poprawy, zalecane jest rozważenie innych metod terapeutycznych w leczeniu endometriozy [68,99]. Zastosowanie wkładki domacicznej z levonorgestrellem również (intrauterine device; LNG-IUD) skutecznie zwalcza ból związany z endometriozą [74].

Jednym z najczęściej stosowanych gestagenów w leczeniu endometriozy jest octan medroxyprogesteronu (MPA), stosowany pod postacią tabletek doustnych (w dawce 20-30 mg dziennie przez 6 miesięcy) jak również w formie podskórnych i domięśniowych iniekcji depot (w dawce 104 mg, co 3 miesiące) [25, 74, 103]. Skuteczność terapii 100 mg MPA/dobę jest porównywalna do efektywności leczenia danazolem w dawce 600 mg/dzień [74, 80, 103].

Przewlekłe stosowanie progestagenów prowadzi do zmian zanikowych w błonie śluzowej macicy poprzez przerwanie prawidłowego cyklu miesięcznego i zahamowanie krwawienia [15, 16]. Niekorzystnym objawem ubocznym podczas stosowania gestagenów są acykliczne krwawienia z macicy, co często zniechęca do kontynuowania terapii [12]. Dobrą i skuteczną alternatywą do długotrwałej terapii gestagenami, jest ostatnio zarejestrowany w Polsce preparat dienogestu (Visanne), jednak podobnie jak w sytuacji analogów GnRH, wysoka cena preparatu jest częstym powodem zaniechania terapii przez pacjentki [81].

W łagodzeniu bólu mogą być stosowane niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) [6], chociaż doniesienia literaturowe nie są jednoznaczne [4]. Jednak w rekomendacjach ESHRE dotyczących diagnozowania i terapii endometriozy zaleca się stosowanie NLPZ u pacjentek z dolegliwościami bólowymi w miednicy mniejszej [68].

W łagodzeniu przewlekłego bólu w miednicy mniejszej zaleca się także pooperacyjne leczenie sanatoryjne i okłady borowinowe oraz kąpiele m.in. solankowe, siarczkowo-siarkowodorowe i rodanowe [42].

Podsumowaniem różnych metod terapii endometriozy są rekomendacje ESHRE z 2005 roku [68]. U pacjentek z dolegliwościami bólowymi w miednicy mniejszej, z potwierdzonym laparoskopowo rozpoznaniem lub bez takiego ostatecznego rozpoznania, zalecane jest zahamowanie owulacji lekami hormonalnymi, na okres 6 miesięcy. Według najnowszych rekomendacji, nie jest konieczne ostateczne potwierdzenie histopatologiczne choroby u pacjentek z objawami bólowymi sugerującymi endometriozę.

W endometriozie o minimalnym stopniu zaawansowania klinicznego ablacja ektopowych ognisk błony śluzowej redukuje nieznacznie stopień odczuwania bólu. Natomiast nie ma jednoznacznych dowodów na to, że przecięcie nerwów krzyżowo-maciczych (laparoscopic uterosacral nerve ablation; LUNA) przynosi istotne korzyści terapeutyczne [61]. Trudnym technicznie, aczkolwiek skutecznym sposobem leczenia bólu w endometriozie jest neurektomia przedkrzyżowa [61]. Technika ta powinna być stosowana tylko przez bardzo sprawnych i doświadczonych laparoskopistów.

Całkowite wyłuszczenie torebki torbieli endometrialnej, w przeciwieństwie do koagulacji lub laserowej waporyzacji zmiany, istotnie zmniejsza szansę nawrotu choroby [41]. Pooperacyjne stosowanie Danazolu lub analogów GnRH redukuje dolegliwości bólowe i wydłuża czas wolny od choroby na okres od 12 do 24 miesięcy. Natomiast stosowanie doustnej antykoncepcji po leczeniu zabiegowym nie jest skuteczną i wskazaną formą terapii [29, 41]. Jednak z uwagi na dobrą tolerancję terapii oraz cenę i prostotę stosowania, postępowanie takie jest w pełni akceptowalne.

U pacjentek pragnących posiadać potomstwo w przebiegu minimalnej i łagodnej endometriozy (I i II stopień) powinno się wykonywać laparoskopową ablację ognisk z jednoczesnym usunięciem zrostów, chociaż pozytywne wyniki są porównywalne jak w przypadku laparoskopii diagnostycznej. Natomiast czasowe zahamowanie owulacji, przed planowanym rozrodem nie przyczynia się do wzrostu ilości ciąż. Inseminacja domaciczna (intrauterine insemination; IUI) zwiększa odsetek uzyskanych ciąż i powinna być przeprowadzana łącznie ze stymulacją jajczkowania [74].

Z kolei w endometriozie umiarkowanej i ciężkiej (III i IV stopień zaawansowania) usunięcie zmian chorobowych, tj. ektopowych ognisk i zrostów, nie przyczynia się do poprawy wyników IVF. Przed planowanym zapłodnieniem pozaustrojowym, powinna być zastosowana czasowa terapia GnRH [41, 72, 74].

W chwili obecnej nie ma niestety w pełni skutecznej metody leczenia, ponieważ etiopatogeneza endometriozy nie została jednoznacznie określona, a choroba ma charakter nawrotowy. Szacuje się, że pomimo leczenia (głównie operacyjnego) odsetek nawrotów objawów klinicznych jest bardzo wysoki i wynosi po roku około 10%, po dwóch latach 25%, a po pięciu latach od zakończenia terapii aż 45% [80, 100]. Prowadzone są liczne badania nad nowymi metodami terapii. Do szczególnie obiecujących należą m.in. inhibitory neoangiogenezy, na przykład Endostatyna, Rapamycyna, Aginex, TNP 470, przeciwciała przeciwko ludzkiemu VEGF.

Największa skuteczność obserwowana jest przy zastosowaniu kilku czynników jednocześnie. Endostatyna wydaje się być najskuteczniejszym lekiem spośród inhibitorów neoangiogenezy. Zastosowano ją skutecznie m.in. w profilaktyce wczesnych nawrotów po leczeniu operacyjnym na modelu mysim [13]. W badanej grupie zwierząt wykazano 59% ograniczenie rozwoju ognisk endometriozy przy zastosowaniu endostatyny zaraz po przeszczepie, obserwując jednocześnie brak wpływu działania leku na już powstałe ogniska endometriozy. Rapamycynę, kolejny inhibitor angiotensyny, wykorzystano w badaniach in vitro i in vivo, na modelu zwierzęcym (chomik syryjski). Rapamycyna powoduje regresję ognisk endometriozy poprzez zahamowanie neoangiogenezy i proliferacji komórek [77]. Jest to lek przeciwrzybiczy, immunosupresyjny - preparat stosowany skutecznie w transplantologii.

Innymi interesującymi preparatami są inhibitory aromatazy: Femara, Arimidex, Aromasin [1, 8, 27]. Aromataza przekształca androgeny C19 w estrogeny, w ogniskach endometriozy. Estrogeny pobudzają aktywność cyklooksygenazy-2 do produkcji prostaglandyny E2. Inhibitory aromatazy znoszą ból związany z endometriozą, mogą jednak stymulować folikulogenezę. Zaleca się łączenie ich z gestagenami, dwuskładnikowymi tabletkami antykoncepcyjnymi bądź GnRHa [7]. Niestety mimo połączenia stosowania Anastrozolu (Arimidex) z GnRHa (Goserelin) wykazano istotne obniżenie masy kostnej po 6 miesiącach stosowania, oraz objawy wypadowe – takie same jak przy stosowaniu wyłącznie Anastrozolu [106]. Natomiast w przeciwieństwie do Anastrozolu, terapia Letrozolem w połączeniu z octanem norethindronu, nie wpływa na masę kostną i prezentuje wysoką skuteczność w zwalczaniu bólu [1].

Dobre efekty wydaje się też mieć terapia łączona : Duphaston z reafironem (interferon $\alpha 2b$), która jest szczególnie skuteczna w leczeniu niepłodności u kobiet z endometriozą (52% vs 27%) [73].

Wiele nadziei badacze pokładają w lekach immunomodulujących [57, 114], takich jak Leflunomid, który jest selektywnym inhibitorem enzymu kontrolującego syntezę pirymidyny. Dotychczas stosowany skutecznie w RZS, jest to lek o działaniu przeciwzapalnym, przeciwgorączkowym i przeciwbólowym. Hamuje produkcję $IL-1\beta$ i $TNF\alpha$. Leflunomid powoduje regresję ognisk endometriozy w modelu doświadczalnym z użyciem szczurów [114].

Rekombinowany, ludzki interferon $\alpha 2b$ – jest to immunomodulator, który po zastosowaniu dootrzewnowo i podskórnym celem leczenia eksperymentalnej endometriozy u myszy, również spowodował regresję ognisk endometriozy [57].

1.1. Aktywność proliferacyjna komórek i apoptoza w aspekcie endometriozy

Koncepcja rozwoju endometriozy w wyniku obniżonej podatności eutopowego endometrium na apoptozę była rozważana już w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku [50]. Jednak w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat nie uzyskano przekonujących dowodów potwierdzających słuszność tych hipotez. Apoptoza, czyli „zaprogramowana śmierć komórki”, reguluje liczbę komórek oraz ich różnicowanie. Jest to proces aktywny, regulowany genowo, do którego niezbędna jest synteza białka. Polega on na kondensacji chromatyny, powstawaniu ciałek apoptotycznych (fragmenty zagęszczonej chromatyny jądrowej, cytoplazmy i organelli komórkowych), zniszczeniu cytoszkieletu, kondensacji cytoplazmy i zmianie powierzchni błony komórkowej, tak aby była ona rozpoznawalna dla makrofagów [70].

Tabela I Wybrane zmiany w komórce w przebiegu apoptozy

	Jądro	Cytoplazma	Błona komórkowa
Apoptoza	kondensacja chromatyny, fragmentacja DNA, rozpad jądra	depolimeryzacja cytoszkieletu, formowanie ciałek apoptotycznych	zaburzenie integralności, tworzenie pączków apoptotycznych

Apoptoza jest niezbędnym czynnikiem prawidłowej funkcji organizmu, dzięki czemu eliminowane są komórki stare, uszkodzone, zainfekowane przez wirusy oraz komórki nowotworowe. Nasilenie apoptozy obserwujemy w różnych schorzeniach takich jak: AIDS, schorzenia neurodegeneracyjne, zawał mięśnia sercowego. Natomiast zahamowanie procesu apoptozy może prowadzić do rozwoju schorzeń o podłożu autoimmunologicznym, alergicznym i nowotworowym.

Prawidłowa funkcja całego organizmu zależy więc od precyzyjnej równowagi czynników sterujących apoptozą. Sygnał do apoptozy może być wewnętrzny, pochodzący z samej komórki lub zewnętrzny.

Tabela II Wybrane inhibitory i aktywatory apoptozy

Aktywatory			
Fizjologiczne	Czynniki biologiczne i chemiczne	Toksyny	Leki
TNF	Wolne rodniki	Etanol	Metotreksat
Kalmodulina	HIV	Aflatoksyna	Cytozyna
Jony wapnia	Cytokiny		Winkrystyna
Transglutaminazy tkankowe	Cytotoksyczne komórki T		Digoksyna
			Prostaglandyna E2

Inhibitory		
Fizjologiczne	Biologiczne	leki
Czynniki wzrostu	HPV	Fenobarbital
Cytokiny	Wirus Epsteina-Barra	Inhibitory proteazy cysteinowej
Macierz pozakomórkowa	Ospa	
	HSV	

Lista czynników mogących wpływać na mechanizmy apoptozy jest niezwykle obszerna [118]. Jak już wcześniej wspomniano, apoptoza jest procesem aktywnym, sterowanym genowo. Do najliczniejszych genów regulujących homeostazę komórkową, należą geny *Bcl-2* i *BAX*, których produkty, białka Bcl-2 i BAX, działają przeciwstawnie do siebie. Bcl-2 hamuje, a BAX aktywuje apoptozę [63, 80]. Wzajemny stosunek białek Bcl-2 i BAX jest decydującym czynnikiem przeżycia komórki. Jeśli przeważa Bcl-2, to łączy się ono ze wszystkimi białkami BAX, a nadmiar tworzy dimery Bcl-2–Bcl-2. Jeśli natomiast w komórce będzie więcej białka BAX, to analogicznie powstaną dimery BAX–BAX i komórka obumrze. Hamowanie apoptozy przez białko Bcl-2 wyraża się m.in. przez jego właściwości antyoksydacyjne, regulację pompy wapniowej związanej z siateczką endoplazmatyczną, a także przez hamowanie aktywności kaspaz i proteaz serynowych [80, 116]. Natomiast aktywacja apoptozy przez białko BAX polega na hamowaniu działania Bcl-2 [63, 80, 116].

Istnieją doniesienia związane z nasileniem apoptozy w endometrium, zależnym od zmian hormonalnych w przebiegu cyklu miesięczkowego. Zmiany hormonalne wywołują zmiany ekspresji różnych białek, w tym szczególnie BAX, Bcl-2 [32, 63].

Nieliczne doniesienia wskazują, że w ogniskach endometriozy obserwuje się mniejszą aktywność apoptotyczną niż w endometrium eutopowym, oraz brak w nich cech charakterystycznych, związanych z cyklem płciowym [32, 112].

Białko Ki-67 jest doskonałym markerem do oznaczania aktywności proliferacyjnej komórek, i jego obecność stwierdzana jest w komórce podczas wszystkich czynnych faz cyklu komórkowego. Białko Ki-67 jest powszechnie uważane za bardzo dobry marker aktywności proliferacyjnej komórek nowotworowych i ma dużą wartość prognostyczną zwłaszcza w raku płuc, prostaty i raku sutka [39].

Ki-67 pierwotnie wykryto przy pomocy przeciwciał monoklonalnych Ki-67, uzyskanych po immunizacji myszy jądrami komórkowymi linii komórkowej chłoniaka Hodgkina L428 [39]

Telomeraza występuje w intensywnie dzielących się komórkach, a jej aktywność zmniejsza się z wiekiem. To zmniejszenie aktywności łączy się ze starzeniem się komórek. W komórkach nowotworowych aktywność telomerazy zwykle jest podwyższona. Można więc przypuszczać, że jej aktywność w komórkach eutopowego endometrium u chorych na endometriozę może być również zwiększona.

U zdrowych kobiet, komórki endometrium rozsiane ektopowo nie powodują endometriozy. Prawdopodobnie dzieje się tak w wyniku prawidłowej eliminacji, przez układ immunologiczny zdrowej kobiety; przykładem takiego działania jest aktywacja procesów apoptozy. Taki stan rzeczy wskazuje, że muszą istnieć mechanizmy powodujące zarówno nieadekwatną odpowiedź systemu immunologicznego, jak i obniżenie nasilenia apoptozy u kobiet z endometriozą. Badania wykazują, że w przypadku endometriozy, ektopowe komórki endometrium różnią się od eutopowych oraz od komórek endometrium zdrowych kobiet, tak że w endometriozie jest tendencja do proliferacji w odpowiedzi na te same bodźce powodujące apoptozę w endometrium zdrowych kobiet. Ponadto ektopowe endometrium ma wyższą zdolność przeżycia ze względu na zdolność do miejscowej syntezy estrogenów i innych czynników wzrostu [24, 25, 26].

Różnice w funkcjonowaniu komórek na poziomie molekularnym, mogą być spowodowane zmianami na poziomie genów [11, 18].

1.2. RESAN

Wstępne badania kliniczne nad szczepionką RESAN w leczeniu endometriozy, przeprowadził zespół dr Ovsienko w Witebsku, na Białorusi. RESAN jest mieszaniną więcej niż 40 różnych substancji - antygenów uzyskanych z endometrium i z ognisk endometriozy oraz mięśniaków macicy i białek osoczowych(między innymi: CA-125, CA 15-3). W swoim składzie zawiera kompleksy molekuł uzyskane z ksenogenicznych białek zwierzęcych (*Gallus Gallus Domesticus*). Są to między innymi glikoproteiny (frakcje $\alpha 2\beta$), peptydy i fragmenty węglowodanowe. Glikoproteiny imitują 6-50 fragmentów każdego antygeny. Dokładny skład szczepionki jest chroniony patentem RB numer 542883. Preparat zarejestrowany jest na Białorusi oraz w Meksyku jako szczepionka, która występuje pod postacią krystalicznego proszku (200 mg), który należy uzupełnić 0,9% solą fizjologiczną do objętości 1 ml [88].

W analizowanych badaniach, spośród 24 chorych na endometriozę kobiet zdiagnozowano dodatkowo: u 10 mięśniaki macicy, a u 2 torbiele endometrialne. Po zakończeniu doświadczenia zaobserwowano zmniejszenie się wymiarów torbieli endometrialnych oraz całkowitą regresję mięśniaków macicy (u 7 z 10 kobiet). Ponadto, w surowicy krwi badanych pacjentek poziomy markerów nowotworowych: CA-125, CA-19-9, CA-15-3 i CEA uległy istotnemu statystycznie obniżeniu ($p < 0,05$). Z otrzymanych wstępnych wyników można przypuszczać, że oceniany preparat wywiera korzystny wpływ na zmniejszanie się zmian chorobowych [40].

Niestety badania te nie zostały szczegółowo udokumentowane. Ponadto grupa badana jest bardzo nieliczna. Nie jest zatem możliwe wyciąganie poważniejszych wniosków z cytowanych badań.

Zastosowanie preparatu RESAN na modelu zwierzęcym może okazać się istotnym dla poznania działania preparatu. Dlatego niezwykle interesująca wydaje się być zarówno ewentualna ocena skuteczności preparatu w leczeniu endometriozy, jak również w profilaktyce choroby. Zasadniczym jednak powodem przeprowadzenia eksperymentu pozostaje brak skutecznych form terapii i profilaktyki endometriozy, a zastosowanie preparatu pozwoli ponadto przybliżyć się do wyjaśnienia etiopatogenezy endometriozy.

2. CEL PRACY

Celem pracy jest ocena potencjału proliferacyjnego eutopowego endometrium, jako czynnika mogącego odpowiadać za rozwój endometriozy oraz określenie wpływu immunomodulacji preparatem RESAN na ten potencjał w aspekcie leczenia endometriozy, w oparciu o eksperymentalne badanie na modelu zwierzęcym.

3. MATERIAŁ

Materiał do badań doświadczalnych stanowiło 58 dojrzałych szczurów płci żeńskiej, szczepu Wistar. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu, z dnia 24 kwietnia 2006r., uchwała nr 20/2006. Zezwolenie indywidualne nr 80/2006, na przeprowadzanie doświadczeń na zwierzętach, z dnia 31.03.2006, zostało wydane przez Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu.

Eksperyment przeprowadzono zgodnie z zaleceniami Ministerstwa Edukacji i Szkolnictwa Wyższego z 1959 roku i Światowej Deklaracji UNESCO odnośnie Praw Zwierząt z Paryża, z roku 1978.

Zwierzęta przebywały w plastikowych klatkach, w warunkach stałej temperatury (21⁰ C) i wilgotności, z ciągłym dostępem do pokarmu i wody pitnej, w pomieszczeniach Katedry i Zakładu Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, przy ul. Dojazd 30. Znormalizowana dieta szczurów zawierała 24% białka i była taka sama dla wszystkich zwierząt.

Po zakończeniu doświadczeń materiał biologiczny został przekazany firmie PHUT „ULTEX” w Luboniu.

Zwierzęta w wieku 4 miesięcy i o wadze od 200 do 300 g zostały podzielone na trzy grupy.

Opis grup:

Grupa I obejmowała 24 szczury (nr: 1-24), którym na 3 miesiące przed przystąpieniem do wszczepienia ektopowo eutopowego endometrium, podano profilaktycznie preparat RESAN.

Grupa II obejmowała 24 szczury (nr: 25-48), gdzie zwierzętom po usunięciu ognisk endometriozy z otrzewnej ściennej jamy brzusznej podano RESAN w celach leczniczych.

Grupę III stanowiła grupa kontrolna 10 szczurów (nr: 49-58).

Z powodu powikłań okołoperacyjnych zwierzęta nr 12 i 30 zostały zutylizowane. Dlatego w wynikach liczebność podawana jest jako $n=23$ dla grupy I i $n=23$ dla grupy II.

Badania sfinansowano ze środków KBN nr NN 404154134.

4. METODYKA

4.1. Pierwsza część eksperymentu – część doświadczalna

Całość części doświadczalnej podzielono na 4 etapy. W pierwszym etapie eksperymentu, na 3 miesiące przed przystąpieniem do wszczepienia endometrium, podano 24 (1-24) szczurom, preparat RESAN (200 mg preparatu uzupełnione solą fizjologiczną do objętości 1 ml). Połowę „szczepionki” podano podskórnie, a pozostałą część domięśniowo, w okolicę lewego pośladka zgodnie ze sposobem dawkowania zalecanym przez producenta preparatu.

W kolejnym, II etapie badań, po trzech miesiącach od podania immunoprofilaktycznej dawki preparatu, przeprowadzono wszczepienie fragmentów endometrium do otrzewnej 48 szczurów (gr. I i gr. II). Zabiegi przeprowadzano w warunkach czystych, ale nie ściśle sterylnych. Podczas operacji zwierzęta znieczulano dootrzewnowo pentobarbitalem. Sierść na brzuchu szczurzyca ogolono. Po przemyciu pola operacyjnego roztworem hibitanu, otwierano jamę brzuszną w linii pośrodkowej przedniej na długości około 4 cm. W czasie pierwszego otwarcia jamy brzusznej, po uwidocznieniu prawego rogu macicy i podwiązaniu naczyń macicznych, wycięto segment prawego rogu macicy o długości 4 cm. Uzyskany fragment macicy dzielono na 4 części. Pierwszy z nich umieszczano w roztworze soli fizjologicznej, następnie oddzielono endometrium od błony mięśniowej. Tak uzyskany fragment błony śluzowej o wielkości 4x4 mm naszywano na otrzewną powłoki brzusznej szczura po stronie prawej w linii przyśrodkowej bocznej, przy użyciu szwu nylonowego 6-0. Drugi fragment zamrażano w ciekłym azocie, celem późniejszego wykonania oznaczeń ekspresji genów. Trzeci fragment zamrażano i skrajano przy użyciu mikrotomu zamrożeniowego, aby umieścić tkankę na szkiełku, celem przygotowania do badań immunohistochemicznych. Czwarty fragment zatapiano w 4% zbuforowanej formalinie, a po utrwaleniu skrajano na mikrotomie i barwiono w sposób typowy hematoksyliną i eozyną, celem późniejszej oceny histologicznej. Wszczepienia dokonano u szczurów z grupy I i II. U pozostałych 10 szczurów

(gr. III), po podwiązaniu naczyń, prawy róg macicy został przecięty, a wolne końce pozostawiono po zaopatrzeniu hemostatycznymi szwami. Na otrzewną założono szew nylonowy, tak jak w przypadku wszczepienia endometrium. Jama brzuszna została zamknięta szwem ciągłym 1-0 (Dexon). Do oddzielania błony śluzowej od błony mięśniowej macicy i do wszczepiania eutopowego endometrium użyto techniki mikrochirurgicznej.

W III etapie części doświadczalnej, po kolejnych trzech miesiącach od zakończenia II etapu eksperymentu, dokonano relaparotomii. W pierwszej kolejności, podczas drugiej laparotomii oceniano, czy doszło do rozwoju endometriozy. Za kryterium rozpoznania endometriozy w ocenie makroskopowej przyjęto występowanie jednej lub więcej z wymienionych poniżej cech: obecność pęcherzyków (torbielek) wypełnionych przeźroczystą treścią płynną i/lub obecność cienkich zrostów wokół wszczepu i/lub wyraźnie wzmożony rysunek naczyniowy pod postacią ogniska przekrwienia na otrzewnej ściennej jamy brzusznej.

Po wykonaniu dokumentacji fotograficznej i uwolnieniu ewentualnych zrostów, pobrano materiał do badania histologicznego z okolicy otrzewnej ściennej prawej strony powłoki brzusznej, z miejsca gdzie uprzednio wszczepiono ektopowo endometrium. Następnie uwidoczniono i wycięto lewy róg macicy, po wcześniejszym podwiązaniu naczyń macicznych. Jama brzuszna została zamknięta szwem ciągłym 1-0 (Dexon). Do wykonania wszystkich etapów usunięcia ognisk endometriozy została użyta technika mikrochirurgiczna. Równocześnie w grupie II, po usunięciu z otrzewnej ściennej jamy brzusznej ognisk podejrzanych o istnienie endometriozy, podano preparat RESAN w celach leczniczych.

Ostatni - IV etap badań przeprowadzono po kolejnych trzech miesiącach. Po otwarciu jamy brzusznej oceniano obecność ognisk przetrwałej endometriozy i po wykonaniu dokumentacji fotograficznej pobrano materiał do badania histologicznego, celem weryfikacji. Następnie, ocenę histologiczną fragmentów tkanek pobranych z otrzewnej szczurów, wykonał patolog nie znający wyniku oceny makroskopowej jak również grupy, z której dany szczur pochodził. W badaniu poszukiwano obecności gruczołów endometrialnych oraz elementów podścieliska endometrium z makrofagami obładowanymi hemosyderyną.

W końcowej ocenie histopatologicznej, endometriozę rozpoznawano w przypadku występowania gruczołów endometrialnych, elementów nabłonka endometrialnego bądź charakterystycznego podścieliska z makrofagami obładowanymi hemosyderyną.

4.2. Ocena nasilenia ekspresji badanych genów *TERT*, *Ki-67*, *BAX*, *Bcl-2*

Kolejny etap eksperymentu polegał na ocenie ekspresji genów biorących udział w kontroli proliferacji i apoptozy komórek. Badania przeprowadzono na eutopowym endometrium z zamrożonych preparatów pobranych od wszystkich szczurów w poszczególnych fazach eksperymentu.

Reakcje PCR

Reakcję przeprowadzono za pomocą zestawu odczynników QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Niemcy). Z każdej próbki, roztwór zawierający 1 µg wyizolowanego RNA został poddany procesowi odwrotnej transkrypcji według wskazówek producenta zestawu odczynników w dwóch etapach: usuwanie DNA, synteza cDNA przy pomocy starterów oligoT.

Real Time PCR

Projektowanie starterów

Startery do reakcji qPCR zostały zaprojektowane z wykorzystaniem programu Primer3, na podstawie sekwencji w formacie FASTA, uzyskanych z bazy NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) dla *Ki-67* i *TERT*. Dla pozostałych genów źródłem sekwencji była baza RTPrimerDB. Następnie, przy użyciu programu OligoAnalyzer1.2. przeanalizowane zostały właściwości termodynamiczne sekwencji wyznaczonych jako potencjalne startery. Specyficzność oligonukleotydów wyznaczonych w tej procedurze została potwierdzona w bazie BLAST [51]. Temperatura topnienia starterów została obliczona za pomocą kalkulatora dostępnego na stronie Finnzymes.

Reakcja real time – PCR

Jednorodność produktu została zweryfikowana na żelu agarozowym oraz przy zastosowaniu analizy krzywej topnienia uzyskanego produktu reakcji. W obu przypadkach analiza potwierdziła specyficzność produktu reakcji, dodatkowo, obraz żelu agarozowego wskazał, że produkty reakcji mają zakładaną wielkość.

1 μ l matrycy, zawierającej 200 ng cDNA uzyskanego w pierwszym etapie zostało wykorzystane do przeprowadzenia ilościowej analizy ekspresji badanych genów zestawem odczynników DyNAmo HS SYBR Green qPCR Kit Finnzymes (Finlandia). Profil reakcji i skład mieszaniny reakcyjnej zostały opracowane według instrukcji producenta odczynników*. Reakcje prowadzono przy użyciu termocyklera Rotor-Gene3000, CorbettResearch (Australia). W trakcie reakcji, po każdym cyklu wyznaczany był przyrost produktu, a po zakończeniu reakcji program sterujący termocyklerem wyznaczył poziom fluorescencji (Ct), przy którym tempo przyrostu produktu reakcji weszło w fazę wykładniczą.

Do wyznaczenia krzywej standardowej i wydajności reakcji real - time PCR wykorzystano szereg 7 kolejnych 10-cio krotnych rozcieńczeń (standardów) liniowej cząsteczki DNA, będącej specyficznym produktem reakcji PCR dla każdego z badanych transkryptów. Reakcja dla każdego z 7 standardów przeprowadzona została w 4 powtórzeniach. Wydajność reakcji, oceniana na podstawie wartości współczynnika korelacji R² wynosiła 0,996 - 0,999.

Dla każdej z badanych prób przeprowadzono podwójną reakcję real time PCR, w obecności ślepej próby NTC (no template control) i standardu będącego jednocześnie kontrolą pozytywną PC (positive control). Wartości ekspresji dla poszczególnych prób wyznaczono nanosząc wartości Ct na wygenerowaną krzywą standardową, stosując dodatkowo korekcję dla standardu.

Obliczenie względnej ekspresji mRNA dla genów badanych polegało na odniesieniu ich do ekspresji genów referencyjnych – *GAPDH* i *ACTB*.

W tym celu, w pierwszej kolejności porównano ekspresję genów referencyjnych pomiędzy analizowanymi grupami. Zmierzone wartości ich ekspresji były porównywalne i nie wykazywały istotnych statystycznie różnic. Współczynnik korelacji (Spearman Rank Correlation) pomiędzy ekspresją *GAPDH* i *ACTB* wynosił 0,967, przy poziomie istotności $P < 0,0001$. Wykazana w ten sposób korelacja poziomu ekspresji dwóch niezależnych genów świadczy że mogą być one adekwatnym wskaźnikiem poziomu RNA w uzyskanym materiale. Dodatkowo, zastosowano nieparametryczną metodę obliczeniową, polegającą na randomizacji i bootstrappingu, wyznaczonych w trakcie reakcji wartości Ct dla genów referencyjnych i badanych. Do przeprowadzenia tych obliczeń użyto programu REST2005 [54].

***Profil reakcji PCR:**

Profil ACTB, GAPDH. wydajność = 0,99

Cycle	Cycle Point
Aktywacja polimerazy w 95°C, 15 min 0 secs	
Cykle (40 powtórzeń)	Denaturacja matrycy w 94°C, 10 secs
	Hybrydyzacja starterów z matrycą w 59°C, 20 secs
	Reakcja polimerazy w 72°C, 30 secs, pomiar fluorescencji (kanał FAM/Sybr)
Inkubacja w 72°C, 10 min 0 secs	
Profil topnienia w przedziale 72-95°C, w krokach co 1°C, interwały: 45 secs po pierwszym kroku i 10 secs po następnych. Pomiar zmiany fluorescencji w kanale FAM/Sybr	
Inkubacja w 72°C, 10 min 0 secs	

Profil BAX. wydajność = 1,00

Cycle	Cycle Point
Aktywacja polimerazy w 95°C, 15 min 0 secs	
Cykle (40 powtórzeń)	Denaturacja matrycy w 94°C, 10 secs
	Hybrydyzacja starterów z matrycą w 59°C, 20 secs
	Reakcja polimerazy w 72°C, 30 secs
	Reakcja polimerazy w 81°C, 1 secs, pomiar fluorescencji (kanał FAM/Sybr)
Inkubacja w 72°C, 10 min 0 secs	
Profil topnienia w przedziale 72-95°C, w krokach co 1°C, interwały: 45 secs po pierwszym kroku i 10 secs po następnych. Pomiar zmiany fluorescencji w kanale FAM/Sybr	
Inkubacja w 72°C, 10 min 0 secs	

Profil TERT. wydajność = 0,98

Cycle	Cycle Point
Aktywacja polimerazy w 95°C, 15 min 0 secs	
Cykle (40 powtórzeń)	Denaturacja matrycy w 94°C, 10 secs
	Hybrydyzacja starterów z matrycą w 59°C, 20 secs
	Reakcja polimerazy w 72°C, 30 secs
	Reakcja polimerazy w 81°C, 1 secs, pomiar fluorescencji (kanał FAM/Sybr)
Inkubacja w 72°C, 10 min 0 secs	
Profil topnienia w przedziale 72-95°C, w krokach co 1°C, interwały: 45 secs po pierwszym kroku i 10 secs po następnych. Pomiar zmiany fluorescencji w kanale FAM/Sybr	
Inkubacja w 72°C, 10 min 0 secs	

Profile: BCL, wydajność = 0,99.**Ki-67 wydajność = 1,00**

Cycle	Cycle Point
Aktywacja polimerazy w 95°C, 15 min 0 secs	
Cykle (40 powtórzeń)	Denaturacja matrycy w 94°C, 10 secs
	Hybrydyzacja starterów z matrycą w 60°C, 20 secs
	Reakcja polimerazy w 72°C, 30 secs, pomiar fluorescencji (kanał FAM/Sybr)
Inkubacja w 72°C, 10 min 0 secs	
Profil topnienia w przedziale 72-95°C, w krokach co 1°C, interwały: 45 secs po pierwszym kroku i 10 secs po następnych. Pomiar zmiany fluorescencji w kanale FAM/Sybr	
Inkubacja w 72°C, 10 min 0 secs	

Oznaczenia aktywności białek Ki-67, BAX, Bcl-2, w błonie śluzowej macicy badanych szczurów

Fragmenty endometrium uzyskane podczas operacji w II i III etapie eksperymentu, przekazywano natychmiast do dalszej obróbki. Tkanki po zamrożeniu w ciekłym azocie skrajano kriostatem na skrawki grubości 4-5µm. Preparaty zamontowane na szkiełkach utrwalano przez 10 minut w temperaturze 21°C i pozostawiano do wyschnięcia. Następnie szkiełka zanurzano w 1% roztworze H₂O₂ w metanolu na 30 minut, aby zablokować aktywność endogennej peroksydazy. W kolejnym stadium preparaty płukano przez 10 minut w wodzie destylowanej i buforze TBS. Po odsączeniu, preparaty inkubowano przez 12h w temperaturze 5°C z odpowiednio rozcieńczonymi monoklonalnymi mysimi przeciwciałami przeciwko szczurzym białkom Ki-67, BAX i Bcl-2. Po inkubacji szkiełka płukano dwukrotnie buforem TBS po 5 minut. Następnie ponownie inkubowano preparaty, z przeciwciałem drugorzędowym, przez 30 minut stosując system En Vision + TM firmy DAKO. Po drugiej inkubacji skrawki płukano dwukrotnie buforem TBS po 5 minut. Po płukaniu TBS i wodą destylowaną, preparaty dobarwiano przy użyciu hematoksyliny Mayera (SIGMA). Następnie wykonano odwodnienie skrawków w roztworach alkoholu etylowego, stosując kolejno wzrastające stężenia aż do alkoholu absolutnego. Po odwodnieniu umieszczano skrawki w ksylenie 3 razy po 5 minut i zamykano w balsamie kanadyjskim gotowe preparaty. Jako kontrolę pozytywną stosowano znane, dodatnie fragmenty szczurzego endometrium. Kontrolę negatywną stanowiły preparaty przygotowane z pominięciem pierwotnego przeciwciała, używając w zamian PBS (SIGMA).

Ocenę preparatów przeprowadzono w mikroskopie świetlnym (JENAMED), stosując powiększenia 400 i 1000 razy. Ekspresję BAX, Bcl-2 i Ki-67 oceniano osobno w gruczołach endometrialnych i podścielisku. Jako subiektywną skalę oceny przyjęto: 0 – brak wybarwienia, 1 – słabe wybarwienie, 2 – umiarkowane wybarwienie, 3 – silne wybarwienie. Oceniano 10 kolejnych pól przy powiększeniu 400 razy. Dokumentację fotograficzną wykonywano przy użyciu klisz fotograficznych 64T t.II firmy Fuji. Celem określenia ekspresji badanego genu zastosowano skalę H-score. Jest to metoda oceniająca zarówno rozkład jak i intensywność wybarwienia. Wynik uzyskuje się według wzoru: $\sum(P_i)/100$, gdzie P= procent, i=wybarwienie. W ten sposób uzyskiwano 0 przy braku barwnego produktu reakcji i maksymalnie 3,0 przy maksymalnym obserwowanym zabarwieniu.

Oznaczania aktywności telomerazy

Przygotowanie ekstraktu:

- Zamrożony w -80°C fragment endometrium, nie większy niż 100 mg umieszczono w 200 μl CHAPS lysis buffer z 200U/ml inhibitora RNAz i natychmiast zhomogenizowano w próbówce umieszczonej w lodzie.
- Homogenat trawiono 30 min w próbówce umieszczonej w lodzie, a następnie wirowano 20 min na kolumnach QiaShrader w 4°C przy 13000 rpm.
- Do dalszej analizy zabezpieczono supernatant, a osad odrzucono.

1) Reakcja:

Do przeprowadzenia analizy użyto zestawu odczynników:

Skład mieszaniny reakcyjnej:

5X Trapeze®RT Reaction Mix	5µL
Taq Polymerase (5units/µL)	0,4µL
Nuclease Free Water	17,6µL
Samples: TSR8 dilutions, Positive extract control, Telomerase Negative, NTC, experimental samples+/- heat treatment	2µL
Całkowita objętość	25,0µL

Profil reakcji real time PCR:

30 °C	30minut	1 cykl
95°C	2 minuty	1 cykl
45 cykli:		
94°C	15 sekund	
59°C	60 sekund	
45°C	10 sekund	

Reakcję prowadzono w termocyklerze Rotor Gene 3000.

Przedstawione wartości podane są jako wykładniki potęgi log10 i określają logarytm liczby kopii produktu uzyskanego w reakcji telomerazy (Log copy number). Czyli wartość wyniku „y” należy podstawić do wzoru 10^y aby otrzymać ilość kopii na 1µg białka w danej próbce. Aktywność telomerazy mierzona jest na podstawie ilości wytworzonych kopii GGTTAG w ciągu 30 min. Ilość ta zależy od ilości aktywnego enzymu i ewentualnych czynników hamujących reakcję.

Każdorazowo, do reakcji wykonywana była krzywa standardowa(TSR8 Dilutions) na którą nanoszone były wyniki reakcji poszczególnych próbek.

Reakcję prowadzono dwukrotnie dla każdej z badanych prób. Jako kontroli negatywnej użyto mieszaniny reakcyjnej z H₂O zamiast ekstraktu. Jako kontroli pozytywnej użyto kontroli dostarczonej przez producenta, w zestawie. Do sporządzenia krzywej standardowej każdy standard (rozcieńczenie) wprowadzono potrójnie. Otrzymane wyniki przeliczono na ilość kopii produktu, na 1 µg białka i przedstawiono jako log₁₀ liczby kopii.

Zawartość białka w ekstrakcie ustalono spektrofotometrycznie A=595nm, w reakcji barwnej z Bradford Reagent.

Wszystkie badania poziomu względnej ekspresji genów *BAX*, *Bcl-2*, *Ki-67*, *TERT* względem genów referencyjnych *GAPDH* i *ACTB* oraz analizę obecności produktów badanych genów, wykonano w Pracowni Patomorfologicznej Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego w Poznaniu oraz Pracowni Hodowli Tkanek Kliniki Rozrodczości.

4.3. Metody statystyczne

Analiza statystyczna badanych parametrów została przeprowadzona przy zastosowaniu podziału badanych zwierząt na 3 grupy – grupę I, II i III, oraz biorąc pod uwagę obecność lub brak stwierdzonej histopatologicznie endometriozy podczas III etapu eksperymentu. Oznaczenia opisano średnią arytmetyczną i odchyleniem standardowym, medianą. Sprawdzono zgodność ww. parametrów z rozkładem normalnym testem Shapiro-Wilka.

Ponieważ nie potwierdzono zgodności z rozkładem normalnym zarówno w badanych grupach jak i w kolejnych etapach, porównań dokonano wykorzystując testy nieparametryczne. Do porównania dwu niezależnych grup zastosowano test nieparametryczny Manna-Whitneya, do porównania trzech niezależnych grup test Kruskala-Wallisa z testami wielokrotnych porównań Dunna. Do porównania w czasie, gdy porównywano dwa etapy zastosowano test Wilcoxon.

W analizie statystycznej dotyczącej oceny immunohistochemicznej użyto klasycznego testu t-Studenta dotyczącego hipotez o istotności wartości średniej oraz testu t-Studenta w jego zmodyfikowanej przez Welcha wersji dotyczącego porównań dwóch wartości średnich.

Potraktowanie badanych cech jako ciągłych uzasadnione było sposobem ich pomiaru oraz ich matematycznym przekształceniem. Użycie testów poprzedzone było sprawdzeniem założeń o normalności rozkładów (test Shapiro-Wilka) oraz założenia o równości wariancji w sytuacjach porównań dwóch średnich (przy pomocy testu F.Snedecora) w przypadku nierównych wariancji stosowano zmodyfikowaną przez Welcha wersję t-Studenta.

Współczynnik istotności statystyczne ustalono na poziomie $p < 0,05$. Do obliczeń statystycznych używano programów Statistica 8.0, MS Excel 2007.

5. WYNIKI

Poniżej przedstawiono wyniki zebrane podczas II, III i IV etapu eksperymentu. W II etapie naszego eksperymentu wykonano laparotomie z wszczepieniem ektopowo eutopowego endometrium w grupach I i II, natomiast u zwierząt z grupy III wykonano operacje pozorowane. W III etapie wykonano relaparotomie we wszystkich grupach z identyfikacją i wycięciem ognisk endometriozy, pobraniem materiału do badania histopatologicznego oraz szczurom z grupy II podano RESAN w celach leczniczych. IV etap polegał na powtórnych laparotomiach we wszystkich grupach i pobraniem materiału do weryfikacji histologicznej celem oceny skuteczności leczenia.

Dane znajdujące się w tabeli nr III dotyczą podsumowania eksperymentu w aspekcie rozpoznania endometriozy w poszczególnych grupach. Endometriozę rozpoznano histologicznie u 4,3 % zwierząt w grupie I i u 69,6% z grupy II. Z kolei na podstawie oceny makroskopowej endometriozę stwierdzono u 21,7% zwierząt z grupy I i 91,3% z grupy II. Podczas IV etapu badań, nie stwierdzono obecności endometriozy w badanych grupach, zarówno makroskopowo jak i w badaniu histologicznym.

Tabela III Porównanie obecności endometriozy w badanych grupach

Metoda badawcza	GRUPA I (n=23)		GRUPA II (n=23)		GRUPA III (n=10)	
	<i>n</i>	%	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%
Ocena makroskopowa	5	21,7	21	91,3	0	0
Ocena histologiczna	1	4,3	16	69,6	0	0

Dane znajdujące się w tabelach IV-XIII dotyczą porównania względnej ekspresji genów *BAX*, *Bcl-2*, *Ki-67*, *TERT*, na materiale zebranym podczas II i III etapu eksperymentu. Poziom ekspresji badanych genów był mierzony względem poziomu ekspresji genów referencyjnych. Analizowano nasilenie ekspresji badanych genów w błonie śluzowej macicy, biorąc pod uwagę obecność endometriozy, a także różnice w ekspresji badanych genów, zachodzące w endometrium podczas II i III etapu doświadczenia.

W tabeli nr IV porównywano poziom ekspresji genów *BAX*, *Bcl-2*, *Ki-67*, *TERT* w II i III etapie eksperymentu, w eutopowym endometrium u szczurów z grup I i II, u których nie rozwinęła się endometrioza.

Tabela IV Poziom ekspresji badanych genów w II i III etapie doświadczenia u zwierząt, u których nie doszło do rozwoju endometriozy

n=29			
	II ETAP	III ETAP	Istotność statystyczna
<i>BAX</i>	0,0365	0,0222	p=NS
<i>TERT</i>	0,00328	0,00221	p=NS
<i>Ki-67</i>	0,000202	0,000062	p<0,001
<i>Bcl-2</i>	0,000165	0,000306	p=NS

NS- nie istotne statystycznie

Zaobserwowano istotną statystycznie różnicę w ekspresji genu *Ki-67*, na poziomie $p < 0,001$. Nasilenie ekspresji genu *Ki-67* obniżyło się w III etapie eksperymentu.

Dla porównania, w tabeli nr V przedstawiono wyniki ekspresji badanych genów u zwierząt, u których doszło do rozwoju endometriozy.

Tabela V Poziom ekspresji badanych genów w II i III etapie doświadczenia u zwierząt, u których doszło do rozwoju endometriozy

	N=17	N=17	Istotność statystyczna
	II ETAP	III ETAP	p
<i>BAX</i>	0,0428	0,0362	p=NS
<i>TERT</i>	0,00797	0,00439	p=NS
<i>Ki-67</i>	0,000315	0,000122	p=NS
<i>Bcl-2</i>	0,000286	0,000121	p=NS

We wszystkich grupach ekspresja badanych genów nie zmieniła się pomiędzy etapami. Zaobserwowano jedynie tendencję do obniżenia aktywności w III etapie eksperymentu.

W tabeli nr VI, przedstawiono porównanie ekspresji genów *BAX*, *Bcl-2*, *Ki-67*, *TERT* między etapami II i III, w eutopowym endometrium u szczurów z grupy II.

Tabela VI Poziom ekspresji badanych genów w II i III etapie doświadczenia u zwierząt z grupy II

n=23			
	II ETAP	III ETAP	Istotność statystyczna
<i>BAX</i>	0,0348	0,362	p=Ns
<i>TERT</i>	0,00665	0,00439	p=NS
<i>Ki-67</i>	0,0000299	0,000120	p<0,001
<i>Bcl-2</i>	0,000286	0,000121	p=NS

W grupie szczurów leczonych preparatem RESAN zaobserwowano zmianę ekspresji *Ki-67*, która jest wyższa po III etapie eksperymentu i istotna statystycznie na poziomie $p<0,001$

W tabeli nr VII porównano ekspresję genów *BAX*, *Bcl-2*, *Ki-67*, *TERT* w eutopowym endometrium u szczurów bez endometriozy oraz u tych zwierząt, u których rozwinęła się endometrioza, podczas II etapu eksperymentu.

Tabela VII Porównanie poziomu ekspresji badanych genów pod względem wystąpienia endometriozy w II etapie doświadczenia u zwierząt z grupy I i II

	N=29	N=17	Istotność statystyczna
	ENDOMETRIOZA (-)	ENDOMETRIOZA (+)	P
<i>BAX</i>	0,0365	0,0428	NS
<i>TERT</i>	0,00328	0,00797	p=0,036
<i>Ki-67</i>	0,000202	0,000315	NS
<i>Bcl-2</i>	0,000165	0,000286	NS

Zaobserwowano większe nasilenie ekspresji genu *TERT* u szczurów, u których doszło do rozwoju endometriozy, z różnicą statystyczną na poziomie p=0,036.

W tabeli nr VIII przedstawiono wyniki porównania ekspresji genów *BAX*, *Bcl-2*, *Ki-67*, *TERT* w eutopowym endometrium u szczurów z grupy I i II bez endometriozy, ze szczurami z grupy I i II, u których stwierdzono endometriozę oraz ze szczurami z grupy kontrolnej (gr. III)

Tabela VIII Porównanie poziomu ekspresji badanych genów pod względem wystąpienia endometriozy u zwierząt z grupy I, II i III

	N=29	N=17	N=10	Istotność statystyczna
	ENDOMETRIOZA (-)	ENDOMETRIOZA (+)	SHAM	p
<i>BAX</i>	0,0222	0,0362	0,0235	P<0,001
<i>TERT</i>	0,00221	0,00439	0,00147	P<0,001
<i>Ki-67</i>	0,000062	0,000122	0,0000694	P<0,001
<i>Bcl-2</i>	0,000306	0,000121	0,000214	P=0,001

Zaobserwowano wyższą ekspresję 3 z 4 badanych genów u zwierząt, u których doszło do rozwoju endometriozy. W przypadku genu *Ki-67* zaobserwowano istotną statystycznie różnicę na poziomie $p<0,001$.

Tabela nr IX przedstawia porównanie ekspresji genów *BAX*, *Bcl-2*, *Ki-67*, *TERT* między II a III etapem eksperymentu w eutopowym endometrium u szczurów z grupy II, u których rozwinęła się endometrioza.

Tabela IX Porównanie poziomu ekspresji badanych genów w II i III etapie doświadczenia u zwierząt z grupy II, u których rozwinęła się endometrioza

n=16			
	II ETAP	III ETAP	Istotność statystyczna
<i>BAX</i>	0,0422	0,0381	p=NS
<i>TERT</i>	0,00711	0,00468	p=NS
<i>Ki-67</i>	0,000283	0,000130	P<0,001
<i>Bcl-2</i>	0,000241	0,000113	p=NS

W III etapie doświadczenia, doszło do obniżenia ekspresji *Ki-67* w eutopowym endometrium szczurów, z różnicą statystyczną na poziomie $p<0,001$

W tabeli nr X porównano ekspresję genów *BAX*, *Bcl-2*, *Ki-67*, *TERT* podczas II i III etapu, w eutopowym endometrium szczurów z grupy II, u których nie doszło do rozwoju endometriozy.

Tabela X Porównanie poziomu ekspresji badanych genów w II i III etapie doświadczenia u zwierząt z grupy II, u których nie rozwinęła się endometrioza

n=7			
	II ETAP	III ETAP	Istotność statystyczna
<i>BAX</i>	0,0277	0,0196	NS
<i>TERT</i>	0,00243	0,00230	NS
<i>Ki-67</i>	0,000341	0,0000594	P<0,023
<i>Bcl-2</i>	0,000111	0,000310	NS

U szczurów, u których nie doszło do rozwoju endometriozy, obserwuje się w tym przypadku obniżenie ekspresji genu *Ki-67*, z istotną statystycznie różnicą na poziomie $p<0,023$.

Tabela nr XI przedstawia porównanie ekspresji genów *BAX*, *Bcl-2*, *Ki-67*, *TERT* w II etapie eksperymentu, w eutopowym endometrium u szczurów z grupy II bez endometriozy oraz szczurów z tej samej grupy, u których rozwinęła się endometrioza.

Tabela XI Porównanie poziomu ekspresji badanych genów pod względem wystąpienia endometriozy w II etapie doświadczenia

N=16		N=7	
	ENDOMETRIOZA(+)	ENDOMETRIOZA (-)	Istotność statystyczna
<i>BAX</i>	0,0422	0,0277	p=NS
<i>TERT</i>	0,00711	0,00243	p=NS
<i>Ki-67</i>	0,000283	0,000341	p=NS
<i>Bcl-2</i>	0,000241	0,000111	p=NS

Nie stwierdzono w tym przypadku istotnej statystycznie różnicy między badanymi grupami.

W kolejnym zestawieniu w tabeli nr XII, porównywaliśmy ekspresję genów *BAX*, *Bcl-2*, *Ki-67*, *TERT*, w III etapie eksperymentu, w eutopowym endometrium u szczurów z grupy II bez endometriozy, ze szczurami u których rozwinęła się endometrioza.

Tabela XII Porównanie poziomu ekspresji badanych genów pod względem wystąpienia endometriozy w III etapie doświadczenia

N=16		N=7	
	ENDOMETRIOZA(+)	ENDOMETRIOZA (-)	Istotność statystyczna
<i>BAX</i>	0,0381	0,0196	p=NS
<i>TERT</i>	0,00468	0,00230	p=NS
<i>Ki-67</i>	0,000130	0,0000594	P<0,005
<i>Bcl-2</i>	0,000113	0,000310	p=NS

W analizowanych grupach zaobserwowano istotną statystycznie różnicę na poziomie $p<0,005$ w ekspresji genu *Ki-67*

W tabeli nr XIII przedstawiono wyniki ekspresji genów *BAX*, *Bcl-2*, *Ki-67*, *TERT* w eutopowym endometrium u szczurów z grupy I, u których nie rozwinęła się endometrioza, badając różnicę między II a III etapem eksperymentu.

Tabela XIII Porównanie poziomu ekspresji badanych genów w II i III etapie doświadczenia u zwierząt z grupy I, u których nie rozwinęła się endometrioza

N=22			
	II ETAP	III ETAP	Istotność statystyczna
<i>BAX</i>	0,0386	0,222	NS
<i>TERT</i>	0,00421	0,00210	NS
<i>Ki-67</i>	0,000201	0,0000658	P<0,002
<i>Bcl-2</i>	0,000219	0,000301	NS

W III etapie doświadczeń, ekspresja genu *Ki-67* była niższa i zaobserwowano istotną statystycznie różnicę na poziomie $p<0,002$.

Dokonano również porównania ekspresji badanych genów w błonie śluzowej macicy, tkanek pobranych podczas II i III etapu doświadczeń, od jedyne go szczura z gr. I, u którego rozwinęła się endometrioza. Poziom ekspresji genów *BAX*, *Bcl-2* i *TERT* był niższy w III etapie eksperymentu. Również poziom ekspresji genu *Ki-67* był niższy w III etapie badań, ale różnica między ekspresją badanych genów między II a III etapem była o wiele większa niż w przypadku pozostałych genów (ekspresja *Ki-67* w II etapie wynosiła 0,000390 a w III 0,0000877).

Osobnej ocenie poddano wyniki analizy immunohistochemicznej badanych preparatów. Ocenę nasilenia ekspresji *BAX*, *Bcl-2*, *Ki-67* porównywano pod kątem występowania endometriozy, a także w aspekcie różnic ekspresji w błonie śluzowej macicy podczas II i III etapu eksperymentu.

W tabeli nr XIV przedstawiono różnicę w nasileniu ekspresji *BAX* w błonie śluzowej macicy, podczas II i III etapu doświadczenia, mierzone u wszystkich szczurów, bez względu na grupę.

Tabela XIV Porównanie poziomu ekspresji BAX podczas II i III etapu eksperymentu u wszystkich badanych zwierząt

N	56	56	
Etap eksperymentu	II etap	III etap	Różnica
Średnia	1,15	1,77	-0,62
Odchylenie standardowe	0,92	1,41	1,88
P			<0,014

Zaobserwowano istotną statystycznie różnicę na poziomie $p < 0,014$

W tabeli nr XV przedstawiono różnicę w ekspresji BAX w błonie śluzowej macicy pobranej w II i III etapie eksperymentu, biorąc pod uwagę tylko te zwierzęta, u których doszło do rozwoju endometriozy.

Tabela XV Porównanie poziomu ekspresji BAX podczas II i III etapu eksperymentu u zwierząt, u których doszło do rozwoju endometriozy

n	17	17	
Etap eksperymentu	II etap	III etap	Różnica
Średnia	0,98	1,83	-0,85
Odchylenie standardowe	0,90	1,47	2,25
p			<0,022

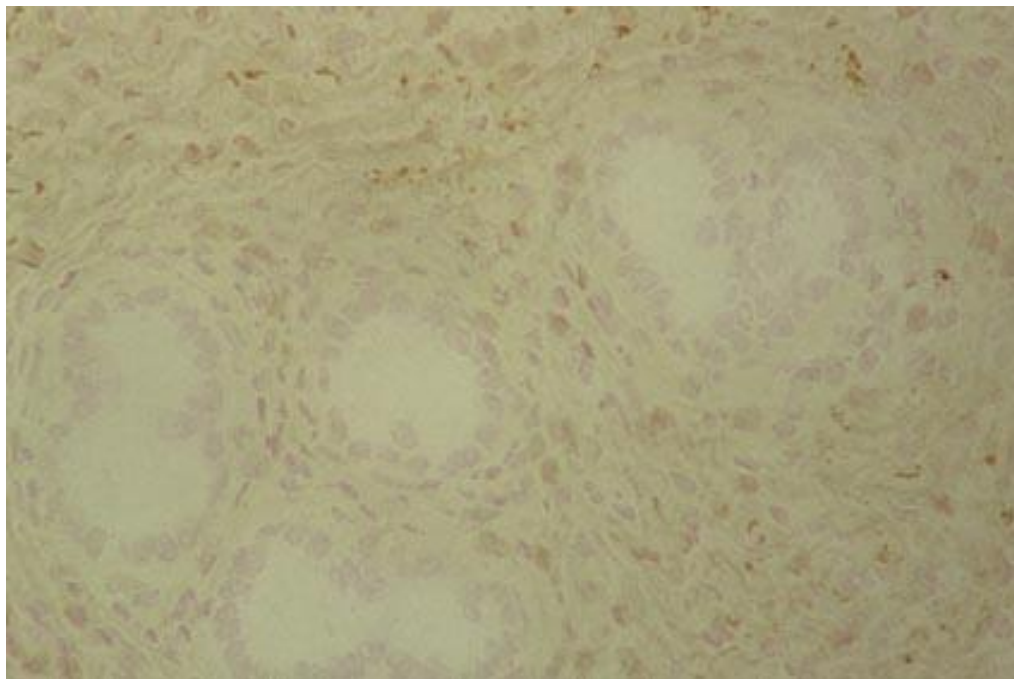
Zaobserwowano istotną statystycznie różnicę na poziomie $p < 0,022$

Tabela nr XVI przedstawia porównanie nasilenie ekspresji ekspresji Bcl-2 w błonie śluzowej macicy w II i III etapie eksperymentu, u wszystkich szczurów, bez względu na grupę

Tabela XVI Porównanie poziomu ekspresji Bcl-2 podczas II i III etapu eksperymentu u wszystkich badanych zwierząt

N	56	56	
Etap eksperymentu	II etap	III etap	Różnica
Średnia	1,74	1,55	0,19
Odchylenie standardowe	0,83	0,87	1,19
P			>0,13

Nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy między badanymi grupami.



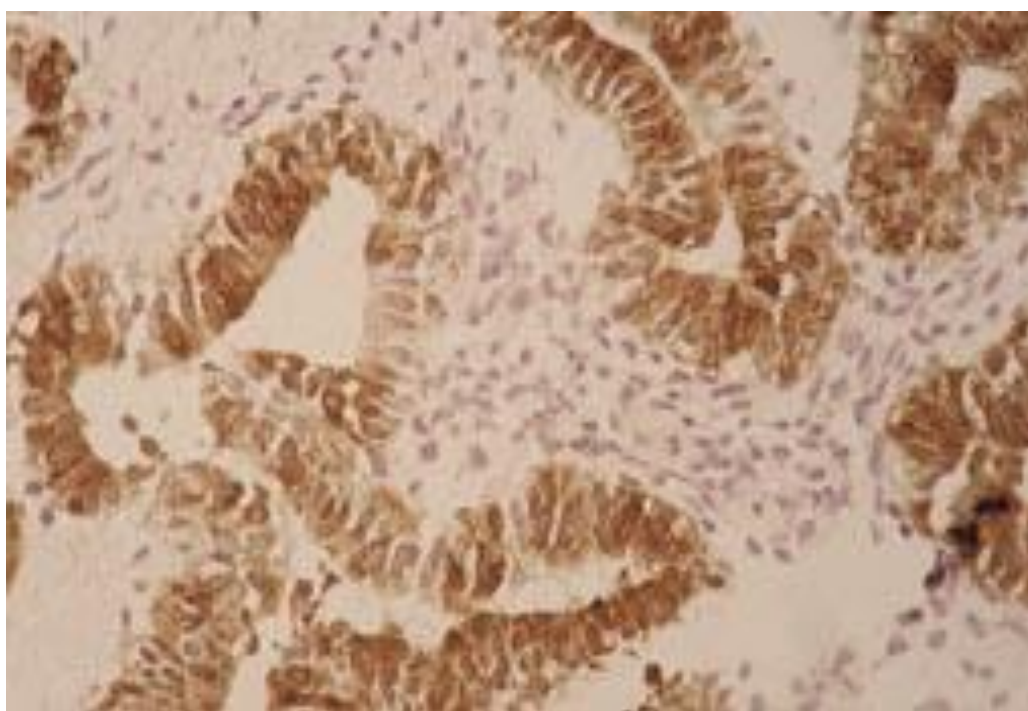
Rysunek 1 Słaba reakcja ekspresji Bcl-2 w nabłonku endometrium w grupie I

W tabeli nr XVII przedstawiono nasilenie ekspresji Bcl-2 w błonie śluzowej macicy pobranej w II i III etapie eksperymentu, biorąc pod uwagę tylko te zwierzęta, u których doszło do rozwoju endometriozy

Tabela XVII Porównanie poziomu ekspresji Bcl-2 podczas II i III etapu eksperymentu u zwierząt, u których doszło do rozwoju endometriozy

N	17	17	
Etap eksperymentu	II etap	III etap	Różnica
Średnia	1,95	1,46	0,50
Odchylenie standardowe	0,66	0,90	1,04
P			<0,0012

Zaobserwowano istotną statystycznie różnicę na poziomie $p < 0,0012$



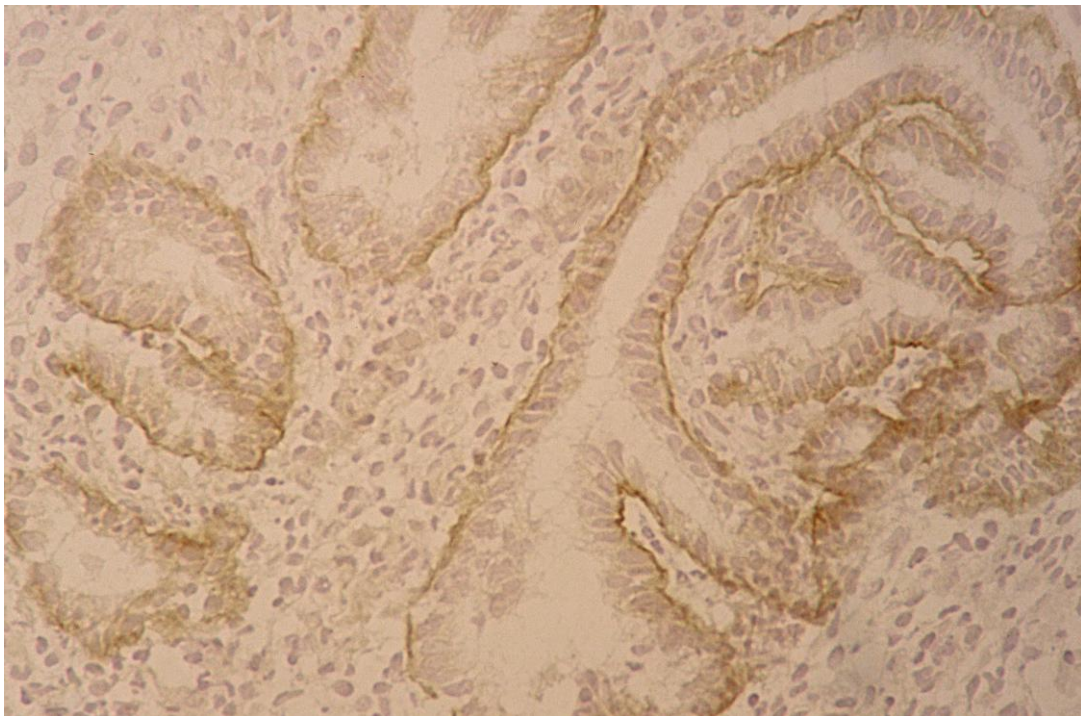
Rysunek 2 Silna reakcja ekspresji Bcl-2 w nabłonku endometrium w grupie I

Tabela nr XVIII przedstawia nasilenie ekspresji Ki-67 w błonie śluzowej macicy, podczas II i III etapu eksperymentu, u wszystkich szczurów, bez względu na grupę

Tabela XVIII Porównanie poziomu ekspresji Ki-67 podczas II i III etapu eksperymentu u wszystkich badanych zwierząt

N	56	56	
Etap eksperymentu	II etap	III etap	Różnica
Średnia	1,23	0,80	0,46
Odchylenie standardowe	1,10	0,77	1,40
P			<0,013

Zaobserwowano istotną statystycznie różnicę na poziomie $p < 0,013$



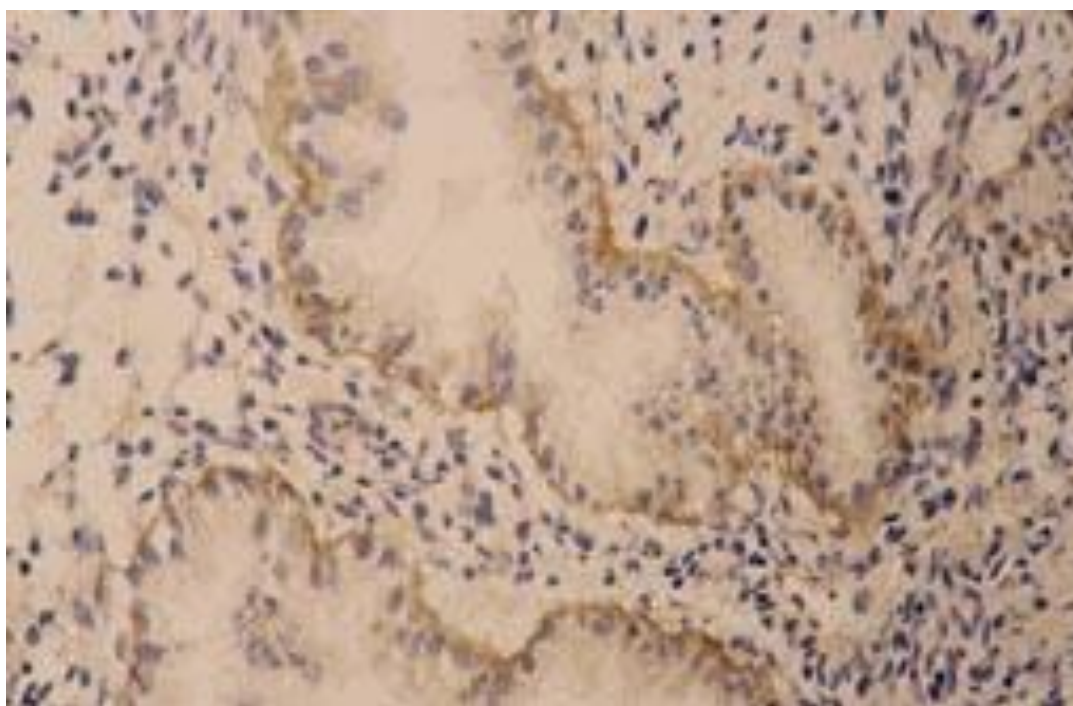
Rysunek 3 Umiarkowana reakcja ekspresji Ki-67 w nabłonku endometrium w grupie

Wyniki porównania różnic między II i III etapem badań w ekspresji Ki-67 przedstawiono w tabeli nr XIX. Nasilenie ekspresji Ki-67 w błonie śluzowej macicy badano w tym przypadku tylko w grupie szczurów, u których doszło do rozwoju endometriozy

Tabela XIX Porównanie poziomu ekspresji Ki-67 podczas II i III etapu eksperymentu u zwierząt, u których doszło do rozwoju endometriozy

N	17	17	
Wszczepienie implantu	II etap	III etap	Różnica
Średnia	1,36	0,56	0,81
Odchylenie standardowe	1,109	0,626	1,171
P			<0,000001

Stwierdzono istotną statystycznie różnicę na poziomie $p < 0,000001$.



Rysunek 4 Silna reakcja ekspresji Ki-67 w nabłonku endometrium w grupie I

Osobno oceniano aktywność telomerazy w eutopowym endometrium badanych genów podczas II i III etapu eksperymentu. Dane przedstawiono w tabelach nr XX-XXV.

Tabela XX Porównanie aktywności telomerazy u zwierząt w II etapie eksperymentu

Grupa	N	Średnia [Log /μg]	SD	P
Szczury, u których nie stwierdzono później endometriozy	29	4,10	2,37	0,939
Szczury, u których stwierdzono później endometriozę	17	4,05	2,01	

Tabela XXI Porównanie aktywności telomerazy u zwierząt w III etapie eksperymentu

Grupa	N	Średnia [Log /μg]	SD	P
Szczury, u których nie stwierdzono później endometriozy	29	3,22	1,84	0,01
Szczury, u których stwierdzono później endometriozę	17	4,6	1,49	

Dodatkowo, porównano poziom aktywności telomerazy u wybranych szczurów w II i III etapie eksperymentu:

Tabela XXII Porównanie poziom aktywności telomerazy u wybranych zwierząt w II i III etapie eksperymentu

Grupa	N	Średnia [Log /μg]	SD	P
Szczury z II etapu, u których stwierdzono później endometriozę	17	3,70	1,90	0,113
Szczury z III etapu, u których stwierdzono później endometriozę	17	4,66	1,43	

Różnica poziomów aktywności telomerazy u tych samych szczurów przed i po zabiegu nie była istotna statystycznie. Wzrost aktywności telomerazy nastąpił u 10 z 15 badanych szczurów.

Następnie porównano aktywność telomerazy w 2 grupach zwierząt podczas III etapu eksperymentu. Nie brano pod uwagę w tym zestawieniu szczurów z grup I i II, u których nie stwierdzono endometriozy.

Ponieważ w grupie I tylko u jednego osobnika stwierdzono endometriozę, aby wyniki były wiarygodne porównano szczury z grupy I i II razem w odniesieniu do grupy kontrolnej III. Wyniki przedstawiono w tabeli nr .

Tabela XXIII Porównanie poziom aktywności telomerazy u wybranych zwierząt w II i III etapie eksperymentu

Grupa	n	Średnia [Log /μg]	SD	P
Szczury u których wywiązała się endometrioza	17	4,60	1,49	0,012
Szczury z grupy kontrolnej	10	2,90	1,74	

Na koniec porównano szczury z gr I i II ze zwierzętami z grupy II, u których nie obserwowano endometriozy podczas III etapu eksperymentu.

Tabela XXIV Porównanie poziom aktywności telomerazy u zwierząt, u których doszło do rozwoju endometriozy ze zwierzętami z grupy II, u których nie doszło do rozwoju endometriozy w III etapie eksperymentu

Grupa	n	Średnia [Log /μg]	SD	P
Szczury u których rozwinęła się endometrioza	17	4,60	1,49	0,028
Szczury z grupy kontrolnej	7	3,34	1,87	

Eutopowe endometrium szczurów, u których doszło do rozwoju endometriozy, wykazywało wyższy stopień aktywności telomerazy w stosunku do endometrium zwierząt, które poddano operacjom pozorowanym.

6. DYSKUSJA

Endometrioza jest estrogenozależną chorobą zapalną, której cechą charakterystyczną jest obecność tkanek endometrium poza jamą macicy, głównie na otrzewnej i w obrębie jajników [29, 41]. Do głównych cech klinicznych należy przewlekły ból w miednicy mniejszej, ból podczas stosunku oraz niepłodność. Przebieg endometriozy może silnie negatywnie wpływać na jakość życia pacjentek, a diagnozowanie i leczenie tego schorzenia jest niestety bardzo rozciągnięte w czasie. Biorąc pod uwagę fakt, że endometrioza dotyczy kobiet w wieku rozrodczym, borykających się często nie tylko z bólem ale i z niepłodnością, wydłużający się czas diagnostyki i leczenia jest wysoce niepożądany [74, 123]. Według Dmowskiego i wsp. diagnostykę w kierunku endometriozy przeprowadza się z dużym opóźnieniem, gdzie od momentu wystąpienia pierwszych objawów do wykonania laparoskopii mija średnio 8 lat [33, 34]. Makroskopowy obraz dostępny w laparoskopii bądź laparotomii, pozwala na ocenę ognisk chorobowych, które w przypadku endometriozy są bardzo charakterystyczne [127]. Można na tej podstawie postawić wstępne rozpoznanie, powinno się jednak zawsze dążyć do histopatologicznego potwierdzenia endometriozy [123]. Opóźnienie w stwierdzeniu endometriozy wynika głównie z braku skutecznych, nieinwazyjnych metod diagnostycznych, które pozwoliłyby na rozpoznanie nawet wczesnych postaci choroby. Zadania nie ułatwia także niespecyficzny obraz kliniczny, bez jakichkolwiek objawów, które można nazwać patognomicznymi dla endometriozy [29, 34].

Innym aspektem utrudniającym walkę z chorobą jest brak specyficznego leczenia przyczynowego wynikający z faktu nieznanej w pełni etiologii schorzenia.

Jednak choroba dotyczy 5-10% kobiet w wieku rozrodczym i nie można udawać, że nie istnieje, jak proponuje Evers [29, 35, 37]. Terapia endometriozy zależy głównie od wieku pacjentki, jej planów rozrodczych, dolegliwości bólowych i zaawansowania choroby. Niestety żadna z form terapii nie jest w pełni skuteczna [68, 123]. Endometrioza ma charakter nawrotowy i jest to druga po mięśniakach macicy przyczyna operacji wykonywanych w ginekologii [100]. Laparoscopia jest złotym standardem jeśli chodzi zarówno o rozpoznanie jak i leczenie endometriozy [99, 125, 127, 129]. W przypadku kobiet z niepłodnością, powinno się dążyć do usunięcia wszystkich widocznych ognisk endometriozy na czele z torbielami jajników, zachowując przy tym jak najwięcej tkanki gonady [12,29,74].

Dolegliwości bólowe można wyeliminować chirurgicznie stosując między innymi przecięcie więzadeł krzyżowo-maciczych oraz neurektomię przedkrzyżową, aczkolwiek skuteczność tych procedur jest ograniczona [61].

Farmakoterapia endometriozy polega na stosowaniu leczenia hormonalnego w połączeniu z leczeniem przeciwzapalnym i przeciwbólowym [4, 16, 73, 74, 123]. Niestety, mimo dużego postępu wiedzy i wprowadzania coraz nowszych form leczenia, skuteczność farmakoterapii jest nadal niezadowalająca [1, 4, 27, 68, 73, 77, 123].

Dlatego dążenia do znalezienia jeszcze skuteczniejszych form terapii nadal zajmują wysoką pozycję w problemie walki z endometriozą [2, 7, 9, 11, 13, 116].

Wszystkie powyższe aspekty skłoniły nasz zespół do rozpoczęcia badań, na modelu zwierzęcym, mających na celu próbę znalezienia skutecznej formy terapii i próby określenia ewentualnych różnic w ekspresji genów odpowiedzialnych za proliferację i apoptozę komórek błony śluzowej macicy, a pośrednio uzyskać nowe informacje w poszukiwaniu markerów obecności endometriozy otrzewnowej na podstawie oceny endometrium.

W ostatnich latach często zastanawiano się nad tym, czy istnieje różnica w endometrium kobiet z endometriozą w porównaniu do endometrium kobiet zdrowych [11, 32, 56, 82]. Wyniki tych badań przyniosły bardzo ciekawe efekty, jednak bez rozróżnienia czynnika swoistego dla endometriozy [38, 39, 56, 58, 62].

Mając na uwadze dotychczasowe wyniki badań w tym kierunku, postanowiono poddać analizie ekspresję 4 wybranych genów (*Ki-67*, *BAX*, *Bcl-2* i *TERT*) w eutopowym endometrium szczurzyce szczepu Wistar. Porównywano ekspresję badanych genów w błonie śluzowej macicy, na tkankach pobranych w trakcie II i III etapu eksperymentu, czyli w momencie wszczepiania implantu eutopowego endometrium, oraz po 3 miesiącach w trakcie relaparotomii, kiedy oceniano czy doszło do rozwoju endometriozy, uwolniono ewentualne zrosty, uwidoczniono i wycięto lewy róg macicy oraz pobrano materiał do badania histologicznego z okolicy otrzewnej ściennej prawej strony powłoki brzusznej, z miejsca gdzie uprzednio, w II etapie eksperymentu, wszczepiono ektopowo eutopowe endometrium.

W przeprowadzanym eksperymencie zastosowano jednocześnie immunomodulujący preparat RESAN - u części zwierząt (gr. I) jako profilaktykę - na 3 miesiące przed pierwszą laparotomią, a u kolejnych 24 szczurów (gr. II) w celach leczniczych, podczas III etapu

eksperymentu. W ten sposób ocenialiśmy wpływ zastosowanej immunoprofilaktyki i leczenia preparatem RESAN na rozwój endometriozy. W naszym modelu zwierzęcym, preparat RESAN okazał się być nad wyraz skuteczny zarówno jako immunoprofilaktyka, jak i leczenie powstałych ognisk endometriozy. Jest to obiecujący początek, który zachęca do dalszych badań nad zastosowaniem tego immunomodulatora [111].

Analizując dostępne w wynikach dane, należy pamiętać, że sam skład tkanki może być w każdym preparacie różny, ponieważ endometrium nie jest substancją homogeną. Ponadto, ekspresja genów ulega cały czas zmianom, ze względu na specyficzny charakter samej tkanki błony śluzowej macicy. Dlatego może się zdarzyć, że w danym preparacie jest wysoka ekspresja badanego genu a produkt tej ekspresji jeszcze się nie pojawił. Dlatego sam fakt wyizolowania mRNA nie znaczy, że w danym preparacie zaobserwuje się poszukiwaną ekspresję badanych genów, czy konkretne białka, szczególnie w ekspresji genów związanych z apoptozą.

Przed porównaniem ekspresji badanych genów trzeba zaznaczyć, że dane zawarte w tabeli nr III, w sposób bardzo klarowny przedstawiają efekty działania preparatu RESAN. W naszym doświadczeniu doszło do całkowitej regresji ognisk endometriozy, powstałej w wyniku przeszczepienia ektopowo eutopowego endometrium. Ponadto zastosowana profilaktyka również przyniosła bardzo dobre rezultaty. Tylko u jednego szczura z grupy profilaktycznej doszło do rozwoju endometriozy. Znamienny jest fakt, iż ten konkretny osobnik nie otrzymał leczniczo preparatu RESAN w III etapie eksperymentu. Natomiast podczas kolejnej relaparotomii, w IV etapie doświadczenia, nie stwierdzono u niego endometriozy zarówno makroskopowo jak i histologicznie. Można więc przypuszczać, że zastosowanie profilaktyki pozwala na skuteczniejsze leczenie operacyjne, wzmagając jego efekt poprzez wzmocnienie właściwej odpowiedzi immunologicznej.

U szczurów ze wszystkich trzech grup, u których nie doszło do rozwoju endometriozy, obserwuje się obniżenie ekspresji genu *Ki-67*. Można więc przypuszczać, że to sama operacja, a nie rozwój choroby, wpływa na zmianę ekspresji genu *Ki-67*. Jednak patrząc na wyniki nie można nie zauważyć tendencji do niższych wartości genu *Bcl-2* i wyższych wartości genu *BAX* w III etapie doświadczenia. Ponadto brak istotnych statystycznie różnic może wynikać z małej grupy zwierząt, u których nie potwierdzono histopatologicznie endometriozy.

Porównując względną ekspresję badanych genów w II etapie eksperymentu, czyli podczas wszczepiania implantu eutopowego endometrium, w grupie II (a więc u zwierząt, które otrzymały preparat RESAN leczniczo), u szczurów z endometriozą względem szczurów bez endometriozy, mała liczebność porównywanych grup nie pozwoliła na wykazanie istotnych statystycznie różnic. Jednak wartości median ocenianej względnej ekspresji badanych genów (0,00711 vs. 0,00243), jak również średnich (0,0145 vs. 0,00293) dla odwrotnej transkryptazy telomerazy (*TERT*), są kilkakrotnie wyższe u szczurów, które rozwinęły endometriozę

Może to świadczyć o zdecydowanie wyższym potencjale eutopowego endometrium do przeżycia w tej grupie, a zatem w konsekwencji do rozwoju endometriozy.

Wyniki ekspresji genów *BAX* i *Bcl-2* również wskazują na tendencję do wyższej ekspresji w eutopowym endometrium u szczurów, u których rozwinęła się endometrioza, jednak powszechnie znany jest fakt, iż oba czynniki występują w komórce w ścisłej równowadze, a dopiero nadmiar jednego z nich prowadzi do zaburzenia tej równowagi i zmian w homeostazie komórki [82].

Na podkreślenie zasługuje fakt, iż w grupie I, gdzie zastosowano preparat RESAN profilaktycznie, tylko u jednego ze zwierząt doszło do rozwoju endometriozy. Zatem można założyć, że profilaktyka preparatem RESAN jest niezwykle skuteczna, zwłaszcza gdy porównamy odsetek szczurów z endometriozą z grupy terapeutycznej (gr. II). Nie można w tym przypadku dokonać analizy statystycznej, natomiast uzyskane wyniki ekspresji badanych genów u powyższego szczura z grupy I, wykazują różnicę w ekspresji genów *Ki-67*, *TERT* oraz *BAX*, między II a III etapem eksperymentu. W badanym endometrium obserwujemy znaczne obniżenie ekspresji genu *TERT*, co może być mechanizmem ułatwiającym późniejsze skuteczne leczenie chirurgiczne. Można bowiem spodziewać się podobnych zmian jak w eutopowym endometrium w nabłonkach torbieli endometrialnych [90, 112, 118]. Również ekspresja genu *Ki-67* była zdecydowanie niższa w tkankach pobranych podczas relaparotomii w III etapie eksperymentu, co może świadczyć o zahamowaniu nadmiernej proliferacji komórek endometrium prawdopodobnie pod wpływem preparatu RESAN. Wydaje się to być tym bardziej słuszne, że podczas IV etapu eksperymentu nie stwierdzono u tego szczura żadnych ognisk endometriozy.

Pomimo małej liczebności grup, można uznać, że na początku eksperymentu, w grupie poddanej uprzednio immunoterapii preparatem RESAN (gr. I), endometrium eutopowe nie różniło się pod względem potencjału proliferacyjnego. Zatem możliwość zagnieżdżenia się implantów i rozwoju endometriozy należy rozpatrywać w aspekcie nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej u szczurów, u których doszło do rozwoju endometriozy [87, 91, 94, 97, 98, 104]. Zastosowana immunoprofilaktyka, poprzez aktywację odpowiedzi komórkowej powinna uniemożliwić rozwój endometriozy, co udało się zaobserwować u zdecydowanej większości przypadków. W naszym materiale leczenie to było skuteczne w 100% [111].

Analizując nasilenie ekspresji badanych genów u szczurów, u których nie doszło do rozwoju endometriozy, z tkanek pobranych podczas III etapu eksperymentu wynika, że w eutopowym endometrium tych zwierząt doszło do wzrostu ekspresji genu *BAX*. Pomimo, iż grupy są małe, można przypuszczać, że pod wpływem preparatu RESAN, doszło do odrzucenia implantów na drodze uruchomienia mechanizmów apoptozy.

Z danych zawartych w tabeli nr IX, w której przedstawiono zmiany, między II a III etapem badań, zachodzące w eutopowym endometrium osobników z gr. II (a zatem w grupie zwierząt, u których w zdecydowanej większości doszło do przyjęcia implantów i rozwoju endometriozy po operacjach wszczepienia), u których nie rozwinęła się endometrioza jasno wynika, że podczas III etapu eksperymentu doszło do obniżenia ekspresji genu *Ki-67* i jest to różnica istotna statystycznie. Można zatem przypuszczać, że to rozwój endometriozy wtórnie spowodował wzrost ekspresji genu *Ki-67*.

Dane z tabeli nr VII, przedstawiają porównanie poziomu względnej ekspresji badanych genów w eutopowym endometrium pobranym podczas II etapu eksperymentu, kiedy wszczepiano ektopowo implanty eutopowego endometrium. Porównanie dotyczy ewentualnych zmian w poziomie ekspresji badanych genów, u zwierząt, u których stwierdzono histopatologicznie endometriozę, ze zwierzętami bez endometriozy i dane te wskazują na odmienne właściwości eutopowego endometrium, przy istotnej statystycznie różnicy na poziomie $p=0,036$ ekspresji genu *TERT*. Odmienne właściwości eutopowego endometrium mogą prawdopodobnie wynikać z rozwoju endometriozy. Poza tym, wyłoniły się nowe elementy wskazujące na coraz większą ekspansywność rozwijającego się implantu. Można tak przypuszczać, ponieważ eutopowe endometrium, mogące pośrednio

odzwierciedlać zmiany w implancie, uzyskało niższą ekspresję genów promujących apoptozę i wyższą aktywność proliferacyjną, czego wyrazem może być wyższa ekspresja genu *Ki-67*.

Na podkreślenie zasługuje w tym miejscu brak wyraźnych różnic w ekspresji badanych genów pomiędzy grupą zwierząt, u których nie doszło do rozwoju endometriozy i zwierząt z grupy kontrolnej. Zatem to rozwój implantu, możliwy początkowo dzięki wyższej aktywności telomerazy, w konsekwencji jeszcze bardziej pobudza swój rozwój, poprzez tworzenie nieznanych mechanizmów pozwalających na dalsze zwiększanie żywotności rozwijających się implantów. Możliwe jest, że mechanizmy te polegają na promowaniu własnej produkcji estrogenów w implantach poprzez aktywność cyklooksygenazy 2 [25, 26, 28, 111].

Pomimo, iż nie udało się ocenić poziomu ekspresji analizowanych genów w ogniskach rozwijającej się endometriozy, to ocena tych zjawisk w eutopowym endometrium wiele wyjaśnia. Powszechnie wiadomo, że zmiany hormonalne, które przebiegają w trakcie cyklu płciowego, mają swoje odbicie również w ogniskach endometriozy [4, 24, 28, 29]. Stąd dolegliwości bólowe, jakże charakterystyczne dla przebiegu endometriozy, są ściśle związane z cyklem i mają największe nasilenie tuż przed oraz w pierwszych dniach trwania miesiączki. Od lat za powód bólu okołomiesiączkowego u kobiet z endometriozą uznaje się właśnie nadmierną produkcję i wydzielanie prostaglandyn [26, 29, 30]. Związek między cyklooksygenazą 2, prostaglandynami i miejscową produkcją estrogenów w ogniskach endometriozy został już wielokrotnie wykazany [24, 29, 46]. W naszym badaniu, ocena ekspresji badanych genów, czy też ich aktywności, w pobranych ogniskach endometriozy nie była możliwa ze względów technicznych.

Z uwagi na bardzo małą ilość materiału, który uzyskano z usuwanych ognisk endometriozy, w części sytuacji, należało podczas projektowania eksperymentu podjąć decyzję, co jest najważniejsze. Zatem usunięty fragment tkanek z miejsca, w które było wszczepione eutopowe endometrium, a zmiany morfologiczne, pozwalające na identyfikację makroskopową endometriozy nie były widoczne, utrwalano w formalinie i zabezpieczano do badania histologicznego. Uznano bowiem, że ostateczne, histopatologiczne rozpoznanie endometriozy jest warunkiem nadrzędnym dla prawidłowego przeprowadzenia eksperymentu.

Niezwykle istotnym wydaje się być zestawienie uzyskanych wyników ekspresji genów z immunohistochemiczną oceną białek.

Immunohistochemiczne porównanie nasilenia ekspresji białek BAX, Bcl-2 i Ki-67 w eutopowym endometrium w I i II etapie eksperymentu, wykazało istotną statystycznie różnicę dla gruczołów endometrialnych. Nie zaobserwowano takich różnic ani dla podścieliska, ani w obrębie naczyń.

Analizując uzyskane dane dla nasilenia ekspresji białka BAX, można wnioskować, że indywidualnie zarówno w II jak i III etapie doświadczenia, poziom ekspresji jest większy od zera; natomiast porównując różnice między etapami – są one statystycznie istotne na poziomie $p < 0,014$ czyli nasilenie ekspresji wzrosło w III etapie badań. Można więc wnioskować że mechanizmy odpowiedzialne za uruchomienie apoptozy zostały, prawdopodobnie przez zastosowanie preparatu RESAN zaktywowane w III etapie eksperymentu. W ścisłej korelacji są wyniki, dotyczące szczurów, u których doszło do rozwoju endometriozy. Tutaj tendencje są podobne i białko BAX jest zdecydowanie wyższy w III etapie badań. Obserwuje się istotną statystycznie różnicę w grupie szczurów z endometriozą w ekspresji BAX, między II a III etapem eksperymentu na poziomie $p < 0,022$. Wynika z tego, że podczas III etapu badań tendencje do aktywowania apoptozy w eutopowym endometrium są wyższe aniżeli w II etapie. Należy pamiętać, że podczas II etapu wszczepione zostały ektopowo implanty eutopowego endometrium w otrzewną szczurów, natomiast podczas III etapu rozpoznawano makroskopowo powstałe ogniska endometriozy oraz podano leczniczo preparat RESAN zwierzętom z grupy II w celach leczniczych. Dane dotyczące ekspresji BAX sugerują aktywację procesów apoptozy w III etapie eksperymentu. Jest to niejako sprzeczne z wynikami poziomu względnej ekspresji badanych genów z tabeli nr V, gdzie ekspresja genu *BAX* jest niższa w III etapie badań. Taką rozbieżność w wynikach można tłumaczyć specyficznością tkanki jaką jest błona śluzowa macicy. Jest to, jak już wcześniej wspomniano, tkanka podlegająca aktywnym zmianom, zatem zakładamy, że w danym preparacie będzie można stwierdzić aktywność badanego genu, ale nie będzie jeszcze można wykazać obecności produktu tego genu. Natomiast w kolejnym preparacie sytuacja może być odwrotna. Dlatego nasze doświadczenie z całą stanowczością wskazuje na potrzebę prowadzenia kompleksowych eksperymentów, gdzie badać się powinno ekspresję genów i aktywność ich produktów, aby móc dojść do rozwiązania problemu etiologii endometriozy,

co przybliży nas do znalezienia skutecznych metod zarówno diagnostyki jak i terapii omawianej choroby.

Analizując dalej wyniki badań immunohistochemicznych dla białka *Bcl-2*, analizując indywidualnie, można wnioskować, że zarówno w II jak i w III etapie eksperymentu, poziom ekspresji *Bcl-2* jest większy od zera; natomiast porównując różnice między etapem II a III – są one statystycznie nieistotne na poziomie $p > 0,13$ czyli nie zanotowano zmiany ekspresji *Bcl-2*. Z kolei w grupie szczurów, u których doszło do rozwoju endometriozy, tendencje dla poziomu nasilenia ekspresji indywidualnie w II i III etapie doświadczenia są takie same. Natomiast w tym przypadku nastąpił statystycznie istotny spadek w grupie szczurów z endometriozą w nasileniu ekspresji podczas III etapu (na poziomie $p < 0,022$) porównaniu z II etapem eksperymentu. Aktywacja i hamowanie apoptozy regulowane przez geny *BAX* i *Bcl-2* charakteryzują się istnieniem równowagi między aktywnością tych genów. Biorąc pod uwagę powyższe wyniki można przypuszczać, że działania dokonane podczas II i III etapu eksperymentu nie miały znaczącego wpływu na aktywność genu *Bcl-2*, a równoczesny nadmiar białka *BAX* spowodował aktywację apoptozy i w konsekwencji mógł prowadzić do eradykacji ognisk endometriozy. Należy pamiętać, że część szczurów była poddana profilaktyce preparatem RESAN jeszcze przed II etapem eksperymentu, dlatego nie można jednoznacznie stwierdzić, że istnieje powiązanie między rozwojem endometriozy a nasileniem ekspresji *BAX* i jednoczesnym obniżeniem ekspresji *Bcl-2* w III etapie eksperymentu, natomiast można przypuszczać, że właśnie RESAN doprowadził do wzmożonej aktywacji procesów apoptozy.

Porównując nasilenie ekspresji we wszystkich preparatach dla indeksu Ki-67 można wnioskować, że indywidualnie zarówno w II jak i w III etapie eksperymentu, poziom ekspresji Ki-67 jest większy od zera, a różnica między obydwoma etapami jest istotna statystycznie na poziomie $p < 0,013$. Zatem w III etapie doświadczenia doszło do obniżenia ekspresji Ki-67. Dla szczurów z endometriozą można zaobserwować, że różnica między operacjami jest większa, na poziomie $p < 0,000001$, a więc również doszło do bardziej znaczącego obniżenia ekspresji Ki-67. Jest to zgodne z wynikami mierzonymi dla ekspresji genu *Ki-67*. Fakt, że dane te są kompatybilne, jest optymistycznym czynnikiem zachęcającym do dalszych badań indeksu Ki-67.

Analizując dalej uzyskane dane, nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w ekspresji badanych genów *BAX*, *Bcl-2* i *TERT*, co może wynikać z małej liczebności grup.

Istotną statystycznie różnicę zaobserwowano natomiast w ekspresji genu *Ki-67*, wykazując obniżenie podczas III etapu eksperymentu. Porównując te wyniki z danymi z II etapu eksperymentu, można przypuszczać, że do obserwowanych zmian doszło w wyniku rozwoju endometriozy. Zatem można wysunąć wniosek, że pierwotnie eutopowe endometrium jest zbliżone zarówno u szczurów, u których rozwinęła się endometrioza jak i u tych bez stwierdzonej endometriozy, z tendencją do wyższej aktywności telomerazy i *Ki-67*, a zmiany (takie jak np. wyraźne promowanie apoptozy) następują dopiero w trakcie rozwoju endometriozy.

Nie jest to zgodne z obserwacjami zespołu Dmowskiego, który postuluje za tym, iż istniejące nieznane nam mechanizmy powodują zmiany prowadzące do obniżenia apoptozy w eutopowym endometrium u kobiet z endometriozą [32].

Analizując dalej grupę II, stwierdza się, że w obu grupach (u szczurów z endometriozą i u szczurów bez endometriozy), doszło do obniżenia ekspresji *Ki-67* podczas III etapu doświadczenia, czyli po wszczepieniu implantów eutopowego endometrium. Może to świadczyć o uruchomieniu nieznanego mechanizmu, który w swoisty sposób ma doprowadzić do odrzucenia przeszczepionych implantów, a jednocześnie powoduje zmiany w eutopowym endometrium, które w końcowym efekcie zmniejszają jego możliwości proliferacyjne. Niestety na podstawie naszego eksperymentu nie ma możliwości wykazania jakie to mechanizmy, jednak sama obserwacja wydaje się być bardzo interesująca i może wyznaczać nowe pomysły i ścieżki w poszukiwaniu odpowiedzi [111].

Wspólna analiza wyników zamieszczonych w tabeli nr XIII, a zatem grupy zwierząt, u których zastosowano immunoprofilaktykę preparatem RESAN, a wyznacznikiem był rozwój endometriozy, pokazuje, iż w III etapie badań, po wszczepieniu implantów doszło do obniżenia ekspresji *TERT* i *Ki-67*, a podwyższenia ekspresji *BAX* w eutopowym endometrium. Wynika z tego, że doszło do obniżenia ekspresji genów, mogących ułatwić implantację, przeżycie i rozwój endometriozy w otrzewnej. Można więc przypuszczać, że równocześnie aktywowane zostały nieokreślone mechanizmy odpowiedzi immunologicznej (np. przez immunoprofilaktykę preparatem RESAN), które nie pozwoliły na przyjęcie się implantów. Prawdopodobnie te mechanizmy okazały się być bardzo istotne w etiopatogenezie endometriozy [32, 111].

Możliwe jest również, że zmiany obserwowane w eutopowym endometrium, wynikają z samego wpływu wykonania laparotomii i przecięcia macicy, co łączy się z uruchomieniem mechanizmów regeneracyjnych.

Wyjaśnieniem tych wątpliwości może być porównanie ekspresji badanych genów w grupie zwierząt z grup I i II z grupą kontrolną, u której wykonano "sham operation".

Niezwykłe interesujące są wyniki dotyczące samej aktywności telomerazy. Ponieważ w II i III etapie eksperymentu poziom aktywności telomerazy w endometrium był niemal identyczny, z powyższego mogłoby wynikać, że zaistnienie endometriozy u szczura w jakiś sposób indukuje aktywność telomerazy z endometrium eutopowym. Porównano także poziom aktywności telomerazy u konkretnych, losowo wybranych szczurów w II i III etapie doświadczeń i różnica poziomów aktywności telomerazy u tych samych szczurów nie była istotna statystycznie. Można więc przypuszczać, że rozwój endometriozy nie ma wpływu na aktywność telomerazy. Jednak dane zawarte w tabeli nr XXVI w sposób przekonywujący przemawiają za odmiennym wnioskiem. Porównywano tutaj aktywność telomerazy u szczurów, u których rozwinęła się endometrioza (suma zwierząt z gr. I i gr. II) ze szczurami z grupy kontrolnej (gr. III). Zaobserwowano istotną statystycznie różnicę na poziomie $p = 0,028$. Z powyższego wynika iż istnieje tendencja do większej aktywności telomerazy u szczurów u których doszło do rozwoju endometriozy. Dane te są o tyle cenniejsze, że porównania dokonano z grupą prawdziwie kontrolną, której zwierzęta były poddane tylko operacjom pozorowanym i nie podano im także preparatu RESAN. Ponadto może to stanowić dowód na to, że sama operacja nie ma jednak wpływu na zmianę aktywności proliferacyjnej eutopowego endometrium.

Jak wynika z poprzednich porównań, zasadniczym czynnikiem prowadzącym do powstania stwierdzanych różnic w ekspresji badanych genów, wydaje się być obecność ektopowo umieszczanych fragmentów endometrium. Dalszy rozwój tak małej liczby implantów i ich przekształcenie w ogniska endometriozy wskazuje na prawdopodobieństwo vzniesienia właściwej odpowiedzi komórkowej poprzez zastosowaną immunomodulację preparatem RESAN zarówno jako profilaktyki jak i leczenia. Tego mechanizmu brakuje prawdopodobnie u kobiet cierpiących z powodu endometriozy. Jednakże taka analiza nie jest tematem niniejszej pracy.

W opisywanym eksperymencie, czas pomiędzy poszczególnymi etapami został zwiększony do 3 miesięcy [111]. Takie wydłużenie miało na celu uzyskanie odpowiedzi jaki jest rzeczywisty skutek rozwoju ektopowo umieszczonych implantów eutopowego endometrium. Zbyt krótki czas mógłby zakłócać obserwowane zmiany, poprzez wpływ samej operacji, a zatem znacznego urazu, który się z tym łączy.

Oczywiście nie jest możliwe precyzyjne ustalenie jaki czas jest wystarczający do skutecznej oceny rozwoju wszczepionych implantów, poza wpływem procesów regeneracyjnych i związanych z samą operacją, jednak przyjęte w założeniu 3 miesiące, przy bardzo krótkim cyklu płciowym szczura i szybko przebiegających procesach regeneracyjnych, powinno być w pełni wystarczające.

Podsumowując, z jednej strony warunkiem istotnym dla rozwoju endometriozy są odmienne właściwości eutopowego endometrium, które po dostaniu się do jamy otrzewnej ma większy potencjał do adhezji, a następnie do miejscowego wzrostu. Co więcej te ektopowo umieszczone fragmenty podczas swojego rozwoju uzyskują nowe właściwości, ułatwiające dalszy rozwój. Które z czynników są najistotniejsze, zapewne długo jeszcze nie będzie wiadomo, jednak z pewnością niniejsze badanie stanowi znaczący krok w kierunku wyjaśnienia tego problemu.

7. WNIOSKI

1. Pierwotna przyczyna rozwoju endometriozy leży prawdopodobnie w zmienionych właściwościach eutopowego endometrium
2. Ektopowe przeszczepienie eutopowego endometrium promuje mechanizmy ułatwiające dalszy miejscowy rozwój endometriozy.
3. Preparat RESAN, powoduje obniżenie częstości powstawania endometriozy, jak również pozwala na uzyskanie skutecznej terapii powstałych ognisk endometriozy, prawdopodobnie poprzez działanie immunomodulujące.

4. Rozwój implantów wyzwała zmiany w eutopowym endometrium, które mogą wskazywać na dezaktywację mechanizmów mających spowodować ograniczenie rozwoju choroby.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Ailawadi R, Jobanputra S, Kataria M, et Al. Treatment of endometriosis and chronic pelvic pain with letrozole and norethindrone acetate: a pilot study. *Fertil Steril* 2004;81:290-296
2. Alborzi S, Ghotbi S, Parsanezhad ME et Al. Pentoxifylline therapy after laparoscopic surgery for different stages of endometriosis: a prospective, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *J Minimal Invasive Gynecol* 2007;14:54-58
3. Alborzi S, Momtahan M, Parsanezhad ME et Al. A prospective, randomized study comparing laparoscopic ovarian cystectomy versus fenestration and coagulation in patients with endometriomas. *Fertil Steril* 2004;82:1633-1637
4. Allen C, Hopewell S, Prentice A et Al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for pain in women with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;19:CD004753
5. Alnemri A, Fernandes T, Haldar S et Al. Involvement of Bcl-2 in glucocorticoid – induced apoptosis of human pre-B-leukemias. *Cancer Res.*1992;52:491-495
6. American Society for Reproductive Medicine (ASRAM). Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis. *Fertil Steril* 1997;67:817-821
7. Amsterdam LL, Gentry W, Jobanputra S et Al. Anastrozole and oral contraceptives: a novel treatment for endometriosis. *Fertil Steril* 2005;84:300-4
8. Attar E, Bulun S: Aromatase inhibitors: the next generation of therapeutics for endometriosis? *Fertil Steril* 2006;85:1307-18
9. Balasch J, Creus M, Fabregues F et Al. Pentoxifylline versus placebo in the treatment of infertility associated with minimal or mild endometriosis: a pilot randomized clinical trial. *Hum Reprod* 1997;12:2046-2050

10. Barcz E, Skopinska-Rózewska E, Kamiński P et Al. Angiogenic activity and IL-8 concentrations in peritoneal fluid and sera in endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet* 2002;79:229-235
11. Barlow DH, Kennedy S Endometriosis: new genetic approaches and therapy. *Annu Rev Med.* 2005;56:345-56.
12. Barton-Smith P, Ballard K, Kent ASH Endometriosis: a general review and rationale for surgical therapy. *Rev Gynaecol Perinat Pract* 2006;6:168-176
13. Becker CM, et Al. Short synthetic endostatin peptides inhibit endothelial migration in vitro and endometriosis in a mouse model. *Fertil Steril* 2006;168:71-77
14. Bedaiwy MA, Falcone T Laboratory testing for endometriosis. *Clin Chim Acta* 2004;340:41-56
15. Bednarowska A, Bińkowska M, Dębski R. Leczenie endometriozy – stan obecny i nowe trendy w terapii. *Ginekologia Po Dyplomie* 2006;8:36-45
16. Bednarowska-Flisiak A, Bińkowska M, Dębski R. Endometrioza – leczenie. *Prz Menopauz* 2004;3:11-15
17. Bińkowska M, Dębski R. Endometrioza – co nowego? *Prz Menopauz* 2004;2:22-29
18. Bischoff F, Simpson JL. Genetics of endometriosis: heritability and candidate genes. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18:219-232
19. Braun DP, Dmowski WP Endometriosis: abnormal endometrium and dysfunctional immune response. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1998 Oct;10(5):365-9
20. Brosens IA, Brosens JJ. Review. Endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;90:159-164
21. Brosens IA. Classification of endometriosis revisited. *Lancet* 1993;341:630
22. Brosens JJ, Timmerman D, Starzinski-Powitz A. Noninvasive diagnosis of endometriosis: the role of imaging and markers. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2003;30:95-114

23. Bullimore DW. Endometriosis is sustained by tumor necrosis factor- alpha. Med Hypotheses 2003;60:84-8
24. Bulun SE, Cheng YH, Pavone ME et Al. Estrogen receptor-beta, estrogen receptor-alpha, and progesterone resistance in endometriosis. Semin Reprod Med. 2010; 28(1):36-43
25. Bulun SE, Cheng YH, Pavone ME et Al. 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase-2 deficiency and progesterone resistance in endometriosis. Semin Reprod Med. 2010 ;28(1):44-50
26. Bulun SE, Cheng YH, Yin P et Al. Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. Mol Cell Endocrinol. 2006 27;248(1-2):94-103
27. Bulun SE, Fang Z, Imir G et Al.: Aromatase and endometriosis. Semin Reprod Med. 2004; 22(1):45-50
28. Bulun SE, Utsunomiya H, Lin Z et Al. Steroidogenic factor-1 and endometriosis. Mol Cell Endocrinol. 2009 5;300(1-2):104-8
29. Bulun SE. Endometriosis. N Engl J Med. 2009 Jan 15;360(3):268-79.
30. Chwalisz K, Garg R, Brenner RM et Al. Selective progesterone receptor modulators (SPRMs): a novel therapeutic concept in endometriosis. Ann N Y Acad Sci. 2002; 955:373-88
31. Clayton RD, Duffy SR, Wilkinson N et Al. Increase in peripheral blood mononuclear cell (PBMC)- and CD56+ cell-mediated killing of endometrial stromal cells by mycobacteria; a possible role in endometriosis immunotherapy? Hum Reprod 2004;19:1886-1893
32. Dmowski W, Ding J, Braun DP et Al. Apoptosis In endometrial glandular and stromal cells In women with endometriosis.Hum.Reprod.2001; 16:1802-1808
33. Dmowski WP, Braun DP Immunology of endometriosis. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2004;18:245-263

34. Dmowski WP. Teoria deficytu immunologicznego w etiopatogenezie endometriozy z perspektywy 25 lat. *Ginekologia po Dyplomie* 2006;3:28-36.
35. Evers JL. Endometriosis does not exist; all women have endometriosis. *Hum. Reprod.* 1994;9(12), 2206-9
36. Frishman GN, Salak JR. Conservative surgical management of endometriosis in women with pelvic pain. *J Minimal Invasive Gynecol* 2006;13:546-558
37. Gazvani R, Templeton A. Review article. New considerations for the pathogenesis of endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet.* 2002;76:117-126
38. Gebel H, Braun DP, Tambur A et Al. Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. *Fertil.Steril.* 1998; 69:1042-1047
39. Gerdes J, Schwab U, Lemke H et Al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. „*Int J Cancer*”. 1983;1:13–20.
40. guidelines: www.anticancer.net/resan
41. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004;364:1789-99
42. Głyda E, Opala T, Olejniczak T et Al. Leczenie uzdrowiskowe chorób kobiecych – wskazania i przeciwwskazania. *Med Rodz* 2004;7:131-134
43. Gocmen A, Inaloz HS, Sari I et Al. Endometriosis in the Bartholin gland. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;114:110-111
44. Gorp TV, Amant F, Neven P, Vergote I. Endometriosis and development of malignant tumours of the pelvis. A review of literature. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18:349-371
45. Gul A, Yasar T, Ugras S. BCG vaccination to prevent implantation of endometriosis: an experimental study in rats. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;98:209-212
46. Gurates B, Bulun SE. Endometriosis: the ultimate hormonal disease. *Semin Reprod Med.* 2003;21(2):125-34.

47. Harada T, Iwabe T, Terakawa N. Role of cytokines in endometriosis. *Fertil Steril* 2001;76:1-10
48. Harada T, Kubota T, Aso T. Usefulness of CA 19-9 versus CA –125 for the diagnosis of endometriosis. *Fertil Steril* 2002;78:733-9
49. Hemmings R, Rivard M, Olive DL et al. Evaluation of risk factors associated with endometriosis. *Fertil Steril* 2004;81:1513-1521
50. Harada M, Suganuma N, Furui K et Al. Detection of apoptosis in human endometriotic tissues. *Mol Hum Reprod* 1996;2:307-315
51. http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
52. <http://medgen.ugent.be>
53. http://molbiol-tools.ca/molecular_biology_freeware.htm
54. http://www.gene-quantification.de/REST-2005_manual_1.9.12.pdf
55. https://www.finnzymes.fi/tm_determination.html.
56. Hornung D et al: Inhibition of cell proliferation, adhesion, and invasion with an anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibody in an in vitro endometriosis model. *Fertil Steril*. 2010 ;94(3):1102-4
57. Ingelmo Jm, Quereda F, Acien P. Intraperitoneal and subcutaneous treatment of experimental endometriosis with recombinant human interferon-alpha-2b in murine model. *Fertil Steril* 1999;71:907-911
58. Itil IM, Cirpan T, Akercan F et Al. Effect of BCG vaccine on peritoneal endometriotic implants in a rat model of endometriosis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006;46:38-41
59. Jakiel G, Robak-Chołubek D, Tkaczuk-Włach J. Endometrioza. *Prz Menopauz* 2006;2:126-129
60. Jędrzejczak P, Pawelczyk L, Skrzypczak J et Al. Analiza ilości operacji laparoskopowych oraz liczby powikłań u kobiet operowanych w Klinice Rozrodczości AM w latach 1992-1997. *Gin Pol* 1998;69:230-236

61. Jędrzejczak P, Sokalska A, Spaczyński RZ et Al. Effects of presacral neurectomy on pelvic pain in women with and without endometriosis.
62. Jędrzejczak P, Szymanowski K, Skrzypczak J et Al. Eksperymentalny model endometriozy u szczurów. *Gin Pol* 1990;61:387-391
63. Jones R, Bulmer J, Searle R, Apoptosis and Bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Hum.Reprod.* 1998;13:3496-3502
64. Kanter M, Gul A, Meral I et Al. Morphological quantitative changes in the number of lymphocytes, macrophages and plasma cells in the uterus and lymph nodes of rats exposed to the systemic administration of BCG. *Tohoku J Exp Med* 2003;199:219-228
65. Karczewski J, Kaszkowiak M, Nycz P et Al. Interakcja płód-matka z punktu widzenia immunologa. III. Regulacja produkcji cytokin w ciąży. Łożysko jako „bariera immunologiczna”. *Prz Ginek Położ* 2006;6:71-79
66. Kauppila A, Ronnberg L. Naproxen sodium in dysmenorrhea secondary to endometriosis. *Obstet Gynecol* 1985;65:379-83
67. Kennan JA, et Al. Regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis treated with the immune modulators loxoribine and levamisole *Fertil Steril* 1999;72:135-41
68. Kennedy S, Bergqvist A, Charon C et Al. E. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod* 2005;20:2698-2704
69. Kennedy S Genetics of endometriosis: a review of the positional cloning approaches. *Semin Reprod Med.* 2003;21(2):111-8.
70. Kerr J, Wyllie A, Currie A Apoptosis a basic biological phenomenon with wide – ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* 1972;26:239-257
71. Koninckx P, Martin D. Deep endometriosis; a consequence of infiltration or retraction or possibly adenomyosis externa? *Fertil Steril* 1992;58:924-928
72. Koninckx PR; Renaer M; Brosens IA: Origin of peritoneal fluid in women: an ovarian exudation product. *Br J Obstet Gynaecol* 1980 Mar;87(3):177-83

73. Koridze, Dzhangidze: Combined usage of duphaston and reaferon for infertility treatment in patients with endometriosis. Georgian Med News 2005;128:21-24
74. Kumar J, Ng SC. Treatment of infertility associated with endometriosis. Current Obstetrics and Gynaecology 1998;8:197-203
75. Kyama CM, Debrock S, Mwenda JM, D'Hooghe TM. Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. Reprod Biol Endocrinol 2003;1:123-132
76. Lam M, Dubyak G, Chen L, Nunez G, Misfeld R, Distelhorst C: evidence that Bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmatic reticulum-associated Ca²⁺ fluxes. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1994;91:6569-6573
77. Laschke MW et Al. Rapamycin induces regression of endometriotic lesions by inhibiting neovascularization and cell proliferation. Br J Pharmacol 2006;149(2):137-44
78. Lasek W, Gołab J Immunomodulacja. Wydawnictwo Naukowe PWN - Immunologia. Warszawa 2006:483
79. Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. Fertil Steril 2001;75: 1-10
80. Matarese G, De Placido G, Nikas Y, Alviggi C. Pathogenesis of endometriosis: natural immunity dysfunction or autoimmune disease? Trends Mol Med 2003;9:223-228
81. McCormack PL Dienogest: a review of its use in the treatment of endometriosis. Drugs. 2010 Nov 12;70(16):2073-88.
82. Meresman G, Vighi S, Buquet R et Al. Apoptosis and expression of Bcl-2 and BAX in eutopic endometrium from women with endometriosis. Fertil Steril 2000; 74:760-766.
83. Meyer R. Über den stau der frage der adenomyosites adenomyoma in allgemeinen und adenomyonetitis sarcomastosa. Zentral. Gyn. 1919;36:74.
84. Mounsey A, Wilgus A, Slawson D. Diagnosis and Management of endometriosis. Am Fam Physician 2006;74:594-600

85. Murphy AA, Green WR, Bobbi D. Unsuspected endometriosis documented by scanning electron microscopy in visually normal peritoneum. *Fertil Steril* 1986;46:522-8
86. Nawaz N. C-b2-01: a panel of markers with potential clinical diagnostic application. *Clin Med Res.* 2010 Dec;8(3-4):192-3.
87. Nothnick WB. Treating endometriosis as an autoimmune disease. *Fertil Steril* 2001;76:223-31
88. Ogawa S, Kaku T, Amada S et al.: Ovarian endometriosis associated with ovarian carcinoma: a clinicopathological and immunohistochemical study. *Gynecol. Oncol.* 2000;77:298-304
89. Olejniczak T, Wilczak M, Opala T et Al. Porównanie gęstości mineralnej tkanki kostnej u kobiet leczonych analogami GnRH z powodu mięśniaków lub endometriozy miednicy mniejszej. *Gin Prakt* 2001;7:11-15
90. Olive DL, Lindheim SR, Pritts EA. New medical treatments for endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18:319-328
91. Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Koninckx PR Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril.* 1991 Jul;56:45-51.
92. Opala T, Skrzypczak J, Kolasa-Guglas E et Al. Gęstość kości u kobiet w przebiegu leczenia endometriozy analogami GnRH (Dekapaptyl). *Gin Pol* 1997;1:62-66
93. Oral E, Iivan S, Tustas E et al.: Prevalence of endometriosis in malignant epithelial ovary tumors. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;109:97-101
94. Ota H, Rong H, Igarashi S, Tanaka T. Suppression of natural killer cell activity by splenocyte transplantation in a rat model of endometriosis. *Hum Reprod* 2002;17:1453-1458
95. Parazzini F. Adhesions and pain in women with first diagnosis of endometriosis: results from a cross-sectional study. *J Minimal Invasive Gynecol* 2006;13:49-54

96. Pittaway DE, Rondinone D, Miller KA, Barnes K. Clinical evaluation of CA-125 concentrations as a prognostic factor for pregnancy in infertile women with surgically treated endometriosis. *Fertil Steril* 1995;64:321-4
97. Podgaec S, Abrao MS, Dias JA et Al. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Hum Reprod* 2007;22(5):1373-9
98. Quaranta MG, Porpa MG, Mattioli B et Al. Impaired NK-cell-mediated cytotoxic activity and cytokine production in patients with endometriosis: a possible role for PCBs and DDE. *Life Sciences* 2006;79:491-498
99. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. The investigation and management of endometriosis. Green-top Guideline No.24. 2006 p. 1-14
100. Sajdak S, Moszyński R. Współczesne metody leczenia endometriozy. *Prz Ginek Położ* 2006; 6:3-9
101. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927;14:422-69.
102. Sanfilippo JS, Hur H. Oral contraceptives for endometriosis- associated pain. *J Minimal Invasive Gynecol* 2006;13:525-527
103. Schlaff W, Carson S, Luciano A, Ross D, Bergqvist A. Subcutaneous injection of depot medroxyprogesterone acetate compared with leuprolide acetate in the treatment of endometriosis – associated pain. *Fertil Steril* 2006;85:314-325
104. Senturk LM, Arici A. Review immunology of endometriosis. *J Reprod Immunol* 1999;43:67-83
105. Skrzypczak J, Szymanowski K, Pisarski T et Al. Ocena wyników leczenia analogami GnRH kobiet z endometriozą jajnikową i niepłodnością. *Gin Pol* 1997;supl 1:54-61
106. Soysal S, et al. The effects of post-surgical administration of goserelin plus anastrozole compared to goserelin alone in patients with severe endometriosis: a prospective randomized trial. *Hum Reprod* 2004;19:160-167

107. Stratton P, Winkel CA, Sinaii N et Al. Location, color, size, depth and volume may predict endometriosis in lesions resected at surgery. *Fertil Steril* 2002;78:743-8
108. Sutton C. The history of endometriosis. *Modern Management of Endometriosis*. CRC Press, 2005 s. 1-17
109. Szymanowski K, Florek E, Mikołajczyk M, Skrzypczak J. Integrin pattern in rats endometrium after endometriosis induction. *Pol J Gynaecol Invest* 2002;5:293-298
110. Szymanowski K, Mikołajczyk M, Skrzypczak J et Al. Integrin pattern in rats endometrium after endometriosis excision. *Pol J Gynaecol Invest* 2002;5:299-302
111. Szymanowski K, Chmaj-Wierzchowska K, Yantchenko A et Al. Endometriosis prophylaxis and treatment with the newly developed xenogenic immunomodulator RESAN in an animal model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009 Feb;142(2):145-8
112. Szymanowski K. Ocena ekspresji wybranych integryn, metaloproteinaz, cytokin oraz nasilenia apoptozy w błonie śluzowej jamy macicy u kobiet z endometriozą małego stopnia. *Seminaria z Medycyny Perinatalnej*. Tom XI. Ośrodek Wydawnictw Naukowych. Poznań 2004;7-80
113. Teirney R, Prentice A. Review. The medical management of endometriosis. *Reviews in Gynaecological Practice* 2002;2:91-98
114. Uygur D, Aytan H, Zergeroglu S, Batioglu S. Leflunomide – an immunomodulator – induces regression of endometrial explants in rat model of endometriosis. *J Soc Gynecol Investig* 2006 ;13(5):378-83
115. Uygur D, et Al. Effect of the immunomodulator leflunomide on the induction of endometriosis in an experimental rat model. *Fertil Steril* 2007 ;87(3):698-701.
116. Vercelini P., Kennedy S. 9th World Congress on Endometriosis. 14-17.09.2005 Maastricht, Holandia
117. Vigano P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18:177-200

118. Vinatier D, Dufour P, Subtil D: Apoptosis: a programmed cell death involved in ovarian and uterine physiology. *Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol.*1996;67:85-102
119. Vinatier D, Orazi G, Cosson M, Dufour P. Review. Theories of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;96:21-34
120. Walter AJ, Hentz JG, Magrina JF et Al. Endometriosis: correlation between histologic and visual findings at laparoscopy. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:1407-13
121. Wan-Tinn T, Vollenhoven B, Harris P. Umbilical endometriosis a pathology that a gynecologist may encounter when inserting the Veres needle. *Fertil Steril* 2006;86:1764
122. Weed JC, PC Arquembourg. Endometriosis: can it produce an autoimmune response resulting in infertility? *Clin Obst Gynecol* 1980;23 (3): 885-93
123. Wellbery C. Diagnosis and treatment of endometriosis. *Am Fam Physician* 1999;60:1753-68
124. Wilczak M, Rzymiski P, Strykowska K Highly elevated levels of the antigen Ca-125 associated with inflammatory abdominal masses. *Arch of Med Sc.* 2007;3 (3):278 – 280
125. Winkel CA. Evaluation and management of women with endometriosis. *Obstet Gynecol* 2003;102:397-408
126. www.anticancer.net/resan
127. Wykes CB, Clark TJ, Khan KS. Accuracy of laparoscopy in the diagnosis of endometriosis: a systematic quantitative review. *BJOG* 2004;111:1204-12
128. Yang W, Chen H, Au H et al.: Serum and endometrial markers. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18:305-318
129. Zupi E, Marconi D, Sbracia M et al.: Add-back therapy in the treatment of endometriosis associated pain. *Fertil Steril* 2004;82:1303-8

STRESZCZENIE

Wstęp: Endometrioza jest przewlekłą, estrogenozależną chorobą polegającą na występowaniu błony śluzowej endometrium poza jamą macicy. Do głównych cech klinicznych należy przewlekły ból w miednicy mniejszej, dyspareunia oraz niepłodność. Przebieg endometriozy może silnie negatywnie wpływać, na jakość życia pacjentek. Etiologia endometriozy nadal pozostaje niewyjaśniona, a co za tym idzie brak jest metod i standardów skutecznego jej leczenia.

Cel pracy: Celem powyższej pracy była ocena potencjału proliferacyjnego eutopowego endometrium, jako czynnika mogącego odpowiadać za rozwój endometriozy oraz określenie wpływu immunomodulacji preparatem RESAN na ten potencjał w aspekcie leczenia endometriozy, w oparciu o eksperymentalne badanie na modelu zwierzęcym.

Preparat RESAN to substancja zawierająca w swoim składzie kompleksy molekuł pozyskanych z ksenogenicznych białek zwierzęcych (*Gallus domesticus*). Są to między innymi glikoproteiny, peptydy i węglowodanowe fragmenty ponad 40 różnych antygenów nowotworowych.

Material i metody: Eksperyment przeprowadzono w grupie 58 dojrzałych płciowo szczurzy szczepu Wistar, którą podzielono na trzy mniejsze grupy. W pierwszym etapie pierwszą grupę (n=24) poddano profilaktycznemu szczepieniu preparatem RESAN (I etap). Następnie po trzech miesiącach 48 szczurów poddano operacji wszczepienia ektopowego endometrium do otrzewnej (II etap). W kontrolnej grupie 10 szczurów (gr. III) wykonano jedynie przecięcie rogu macicy i założono szew na otrzewną. Po kolejnych trzech miesiącach wszystkim szczurom przeprowadzono relaparotomię z wycięciem i oceną ewentualnych ognisk endometriozy (III etap). Grupie kolejnych szczurów nie poddanych wcześniejszemu profilaktycznemu szczepieniu podano preparat RESAN (gr. II, n=24). Po upływie następnych trzech miesięcy ponownie wykonano relaparotomię w I i II grupie szczurów (IV etap). Podczas II i III etapu doświadczenia pobierano fragment macicy, z którego wyizolowano endometrium, celem dokonania oznaczeń ekspresji genów *Bax*, *Bcl-2*, *Ki-67* i *TERT*.

Ekspresję oznaczano metodą Real time PCR. Immunohistochemicznie oceniano aktywność białek BAX, Bcl-2 i Ki-67 osobno w gruczołach endometrialnych i podścielisku za pomocą skali H-score. Dodatkowo obecność endometriozy potwierdzano w badaniu histopatologicznym.

Analiza statystyczna badanych parametrów została przeprowadzona przy zastosowaniu podziału badanych zwierząt na 3 grupy – grupę I, II i III, oraz biorąc pod uwagę obecność lub brak stwierdzonej histopatologicznie endometriozy podczas III etapu eksperymentu. Do zbadania istotnych statystycznie różnic dla immunohistochemicznej oceny ekspresji genów *BAX*, *Bcl-2* i *Ki-67* *TERT* zastosowano średnią i odchylenie standardowe, test t-studenta, a dla wyników reakcji PCR test Wilcoxon'a, test Mann'a-Whitney'a, test wielokrotnych porównań i Rank Sum Test na oprogramowaniu Sigmastat 8.0

Wyniki: Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono statystycznie istotny niższy odsetek wszczepienia ognisk endometriozy po przeprowadzonych operacjach w grupie I (profilaktyczne zastosowanie RESAN) w porównaniu z grupą II. Zanotowano również istotny statystycznie niższy odsetek szczurów z wszczepioną endometriozą w II grupie podczas IV etapu doświadczenia w porównaniu z etapem III (po leczeniu chirurgicznym i leczniczym zastosowaniu preparatu RESAN). Zaobserwowano istotną statystycznie różnicę w ekspresji genu *Ki-67* i *TERT* u zwierząt, u których doszło do rozwoju endometriozy. Zastosowana immunoprofilaktyka, poprzez aktywację odpowiedzi komórkowej uniemożliwia rozwój endometriozy, co zaobserwowano w zdecydowanej większości przypadków.

Wnioski: Pierwotna przyczyna rozwoju endometriozy leży prawdopodobnie w zmienionych właściwościach eutopowego endometrium. Ektopowe przeszczepienie eutopowego endometrium promuje mechanizmy ułatwiające dalszy miejscowy rozwój endometriozy. Rozwój implantów wyzwała zmiany w eutopowym endometrium, które mogą wskazywać na dezaktywację mechanizmów mających spowodować ograniczenie rozwoju choroby. Preparat RESAN, powoduje obniżenie częstości powstawania endometriozy, jak również pozwala na uzyskanie skutecznej terapii powstałych ognisk endometriozy, prawdopodobnie poprzez działanie immunomodulujące.

The impact of RESAN compound immunomodulation on proliferative potential of eutopic rat endometrium - an animal study

SUMMARY

Introduction: Endometriosis is a chronic, estrogen-dependent disease. The main clinical features are chronic pelvic pain, severe dysmenorrhoea, deep dyspareunia and infertility.

The etiology of endometriosis is still not clarified, and hence there is a lack of effective methods and standards for its treatment. The aim of this study was to evaluate the proliferative potential of eutopic endometrium as a factor that may be responsible for the development of endometriosis, and to assess the effect of immunomodulation in terms of treatment of endometriosis, based on the experimental study on animal model.

The RESAN compound is a complex of molecules extracted from xenogenic tissues (*Gallus Domesticus*). It contains glycoproteins, peptides and carbohydrate fragments of more than 40 different common tumor antigens.

Material and methods: The experiment was performed on 58 sexually mature female Wistar white rats which were divided into three groups. In the first stage (stage I) the RESAN compound was given to 24 rats (group I, prophylaxis). Three months later endometriosis induction was performed in 48 rats (group I and group II). In ten animals (group III, controls), a sham operation was performed (stage II). Three months later, the second laparotomy aiming to search for endometriotic foci and adhesions was performed in all animals (stage III). Excision of endometriotic foci was performed in groups: I and II. During the second laparotomy, RESAN was given to the animals in group II. After 3 months, the third laparotomy was performed in all animals (stage IV). During the second and third stages of the experiment, 4 fragments of uterus were sampled in order to determine the histological presence of endometriosis and to detect gene expression of Bax, Bcl-2, Ki-67 and TERT. Expression was determined by real-time-PCR. The activity of genes (Bax, Bcl-2, Ki-67 and TERT) was immunohistochemically evaluated separately in the endometrial glands and stroma, using H-score scale.

Statistical analysis of the parameters was carried out using Student t-test, Wilcoxon test, Mann-Whitney test and Rank Sum Test with the Sigmastat 3.0 software.

P value of <0,05 was considered statistically significant.

Results: Positive, histologically confirmed endometriosis was found in 4,3% of the animals in group I and in 69,9% of group II ($p < 0,0001$). There was also statistically less endometriotic foci in animals in group II during the fourth stage of experiment in comparison to the third stage. In animals with endometriosis, a statistically significant difference in gene expression of Ki-67 and TERT was observed. A significant tendency in

Conclusions: Applied immunoprophylaxis, by the stimulation of cellular response, should prevent the development of endometriosis, which was observed in most cases in our experiment. The primary reason for the development of endometriosis is probably the altered properties of the eutopic endometrium. Ectopic transplantation of eutopic endometrium promotes certain mechanisms, that enable further local development of endometriosis. The growth of transplanted implants, triggers changes in the eutopic endometrium, which may indicate the deactivation of the mechanisms which decrease the development of the disease.

According to our results RESAN acts as an immune modulator and appears to be effective in both the prophylaxis and treatment of endometriosis. A rat model of endometriosis seems to be very useful in research on the etiology and treatment of endometriosis.

Spis tabel

Tabela I Wybrane zmiany w komórce w przebiegu apoptozy	17
Tabela II Wybrane inhibitory i aktywatory apoptozy	18
Tabela III Porównanie obecności endometriozy w badanych grupach	35
Tabela IV Poziom ekspresji badanych genów w II i III etapie doświadczenia u zwierząt, u których nie doszło do rozwoju endometriozy	36
Tabela V Poziom ekspresji badanych genów w II i III etapie doświadczenia u zwierząt, u których doszło do rozwoju endometriozy	37
Tabela VI Poziom ekspresji badanych genów w II i III etapie doświadczenia u zwierząt z grupy II	37
Tabela VII Porównanie poziomu ekspresji badanych genów pod względem wystąpienia endometriozy w II etapie doświadczenia u zwierząt z grupy I i II	38
Tabela VIII Porównanie poziomu ekspresji badanych genów pod względem wystąpienia endometriozy u zwierząt z grupy I, II i III	39
Tabela IX Porównanie poziomu ekspresji badanych genów w II i III etapie doświadczenia u zwierząt z grupy II, u których rozwinęła się endometrioza	40
Tabela X Porównanie poziomu ekspresji badanych genów w II i III etapie doświadczenia u zwierząt z grupy II, u których nie rozwinęła się endometrioza	40
Tabela XI Porównanie poziomu ekspresji badanych genów pod względem wystąpienia endometriozy w II etapie doświadczenia u zwierząt z grupy II	41
Tabela XII Porównanie poziomu ekspresji badanych genów pod względem wystąpienia endometriozy w III etapie doświadczenia u zwierząt z grupy II	41
Tabela XIII Porównanie poziomu ekspresji badanych genów w II i III etapie doświadczenia u zwierząt z grupy I, u których nie rozwinęła się endometrioza	42
Tabela XVI Porównanie poziomu ekspresji BAX podczas II i III etapu eksperymentu u wszystkich badanych zwierząt	43
Tabela XVII Porównanie poziomu ekspresji BAX podczas II i III etapu eksperymentu u zwierząt, u których doszło do rozwoju endometriozy	43
Tabela XVIII Porównanie poziomu ekspresji Bcl-2 podczas II i III etapu eksperymentu u wszystkich badanych zwierząt	44
Tabela XIX Porównanie poziomu ekspresji Bcl-2 podczas II i III etapu eksperymentu u zwierząt, u których doszło do rozwoju endometriozy	45
Tabela XX Porównanie poziomu ekspresji Ki-67 podczas II i III etapu eksperymentu u wszystkich badanych zwierząt	46
Tabela XXI Porównanie poziomu ekspresji Ki-67 podczas II i III etapu eksperymentu u zwierząt, u których doszło do rozwoju endometriozy	47
Tabela XXII Porównanie aktywności telomerazy u zwierząt w II etapie eksperymentu	48
Tabela XXIII Porównanie aktywności telomerazy u zwierząt w III etapie eksperymentu	49
Tabela XXIV Porównanie poziom aktywności telomerazy u wybranych zwierząt w II i III etapie eksperymentu	49
Tabela XXVI Porównanie poziom aktywności telomerazy u wybranych zwierząt w II i III etapie eksperymentu	50
Tabela XXVII Porównanie poziom aktywności telomerazy u zwierząt, u których doszło do rozwoju endometriozy ze zwierzętami z grupy II, u których nie doszło do rozwoju endometriozy w III etapie eksperymentu	50

Spis ilustracji

Rysunek 1 Słaba reakcja ekspresji Bcl-2 w nabłonku endometrium w grupie I	44
Rysunek 2 Silna reakcja ekspresji Bcl-2 w nabłonku endometrium w grupie I	45
Rysunek 3 Umiarkowana reakcja ekspresji Ki-67 w nabłonku endometrium w grupie.....	46
Rysunek 4 Silna reakcja ekspresji Ki-67 w nabłonku endometrium w grupie I.....	48