

UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. K. MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Wydział Nauk o Zdrowiu

„Wpływ preparatu RESAN na odpowiedź immunologiczną typu Th 1 i Th2 w endometriozie- badanie doświadczalne na modelu zwierzęcym”

Praca na stopień doktora nauk medycznych

Lek. med. Joanna Niepsuj-Biniaś

Promotor pracy:

Dr hab. n. med., prof. UM Krzysztof Szymanowski

Katedra i Klinika Zdrowia Matki i Dziecka

Kierownik Kliniki:

Prof. dr hab. Tomasz Opala

Poznań 2011

*Panu prof. dr hab. Krzysztofowi Szymanowskiemu
składam serdeczne podziękowania
za wskazanie tematu,
wsparcie, cierpliwość i motywację oraz
wszechstronną pomoc w napisaniu pracy*

SPIS TREŚCI

1. Wykaz skrótów użytych w pracy.....	5
2. Wstęp.....	7
2.1. Definicja endometriozy.....	7
2.2. Objawy endometriozy.....	7
2.3. Występowanie endometriozy.....	7
2.4. Czynniki ryzyka i prewencja endometriozy.....	8
2.5. Etiopatogeneza endometriozy.....	10
2.6. Rola układu immunologicznego w endometriozie.....	11
2.6.1. Odpowiedź komórkowa w endometriozie.....	14
2.6.2. Odpowiedź humoralna w endometriozie.....	16
2.6.3. Rola angiogenezy w rozwoju endometriozy.....	16
2.6.4. Rola płynu otrzewnowego.....	17
2.6.5. Rola cytokin.....	18
2.6.5.1. Odczyn zapalny w endometriozie.....	19
2.7. Rozpoznawanie.....	19
2.8. Leczenie.....	21
2.8.1. Leczenie farmakologiczne.....	24
2.8.2. Leczenie chirurgiczne.....	29
3. Cel pracy.....	32
4. Materiał.....	32
5. Metodyka.....	33
5.1. Część doświadczalna.....	33

5.2.	Część laboratoryjna.....	35
5.2.1.	Pomiar cytokin z zastosowaniem cytometrii przepływowowej.....	36
5.2.2.	Ocena stężenia prokalcytoniny z zastosowaniem metody ELISA...36	
5.2.3.	Metody statystyczne.....	37
6.	Wyniki.....	37
6.1.	Grupy szczurów.....	37
6.2.	Etapy doświadczenia.....	38
6.3.	Interleukina-4.....	40
6.4.	Interleukina- 6.....	43
6.5.	Interleukina-10.....	45
6.6.	Interferon- γ	50
6.7.	TNF- α	52
6.8.	Prokalcytonina.....	53
7.	Dyskusja.....	54
8.	Wnioski.....	65
9.	Streszczenie.....	65
10.	Summary.....	67
11.	Piśmiennictwo.....	68
12.	Spis tabel.....	77
13.	Spis rycin.....	78

1. WYKAZ SKRÓTÓW UŻYTYCH W PRACY

AIH	(ang. artificial insemination by husband) - inseminacja nasieniem męża
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
BMI	(ang. body mass index) – indeks masy ciała
CEA	antygen karcinoembrionalny
CA- 15-3	antygen nowotworowy
CA- 19-9	antygen nowotworowy
CA-125	antygen nowotworowy
COX-2	cyklooksygenaza-2
DTA	doustna terapia antykoncepcyjna
EGF	(ang. epithelial growth factor) czynnik wzrostu naskórka
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embriology
FGF	(ang. fibroblast growth factor) czynnik wzrostu fibroblastów
FSH	hormon folikulotropowy
GnRH	hormon gonadotropowy
IA	inhibitor aromatazy
ICAM-1	(ang. soluble cellular adhesion molecule) rozpuszczalna cząsteczka adhezji międzykomórkowej
IFN- γ	interferon γ
IgG	immunoglobulina klasy G
IgM	immunoglobulina klasy M
IL	interleukina
LPSN	(ang. laparoscopic presacral neurectomy) - laparoskopowa neurektomia przedkrzyżowa

LUNA	(ang. laparoscopic uterosacral nerve ablation) – laparoskopowe przecięcie więzadeł krzyżowo-macicznych
MCP	(ang. monocyte chemotactic protein) białko chemotaktyczne dla monocytów
M-CSF	(ang. macrophage colony-stimulating factor) czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów
NK	(ang. natural killer) – naturalna komórka cytotoksyczna, komórka NK
NLPZ	niesterydowe leki przeciwzapalne
PD-ECGF	(ang. platelet-derived endothelial cell growth factor) płytkopochodny czynnik wzrostu śródbłonka
PGE 2	prostaglandyna E2
PCT	prokalcytonina
RANTES	(ang. regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted) chemokina β syntetyzowana przez limfocyty B
SERM	(ang. selective estrogen receptor modulator) selektywny modulator receptora estrogenowego
SPRM	(selective progesterone receptor modulator) selektywny modulator receptora progesteronowego
TGF- β	(ang. transforming growth factor β) – transformujący czynnik wzrostu β
Th	(ang. T helper) – pomocniczy limfocyt T
TNF- α	(ang. tumor necrosis factor) – czynnik martwicy nowotworu α
VEGF	(ang. vascular endothelial growth factor) – czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego

2. WSTĘP

2.1. DEFINICJA ENDOMETRIOZY

Endometrioza jest przewlekłą, zapalną i estrogenozależną chorobą. Jej definicja obejmuje występowanie czynnej błony śluzowej macicy (gruczołów i zrębu) lub tkanki endometroidalnej (endometrioides; gr. *eides*- podobny) poza jamą macicy, to jest w warstwie mięśniowej macicy, innych narządach płciowych i ich okolicy, a nawet w oddalonych od organów płciowych miejscach organizmu. Endometrioza, zwana też gruczolistością, jest chorobą niezłośliwą, jednak ze względu na towarzyszące dolegliwości i przewlekły charakter stanowi bardzo istotny problem medyczny, społeczny i ekonomiczny.

2.2. OBJAWY ENDOMETRIOZY

Typowe objawy endometriozy to niepłodność, bolesne miesiączki i bolesne współżycie [53]. Wśród innych symptomów wymienia się przewlekły zespół bólowy miednicy mniejszej (trwający minimum 6 miesięcy, niezależny od fazy cyklu miesiączkowego) [5]. Ból związany z chorobą najczęściej przyjmuje postać bolesnych miesiączek. Zazwyczaj poprzedza pojawienie się krwawienia i z czasem ulega nasileniu. Lokalizacja bólu dotyczy podbrzusza i głębszych okolic miednicy, jest symetryczna. Zdarza się, że ból promieniuje do ud i okolicy krzyżowej. Nierzadkie są przypadki przedłużania się bólu poza okres krwawienia, a bywa, że jest on obecny w trakcie całego cyklu miesiączkowego. Na podstawie licznych obserwacji wysnuto hipotezę, że nasilenie bolesności miesiączek wiąże się z zajęciem zatoki Douglasa i intensywnością tworzenia się zrostów we wspomnianej okolicy. Z kolei dyspareunia związana jest z ogniskami endometriozy głęboko naciekającej w więzadłach krzyżowo-macicznym, zaś bolesna defekacja- z zajęciem ścian pochwy. Zaobserwowano również korelację między bólami brzucha niezwiązanymi z miesiączką a zajęciem jelit przez ogniska gruczolistości [25]. Endometrioza może dotyczyć również jajników, gdzie przybiera najczęściej postać torbieli endometrialnych, z kolei w obrębie mięśnia macicy mogą pojawiać się ogniska endometriozy zwanej adenomiozą [41].

2.3. WYSTĘPOWANIE ENDOMETRIOZY

Gruczolistość dotyczy przede wszystkim kobiet w wieku rozrodczym. Według różnych statystyk dotyka około 10% żeńskiej populacji [50, 67, 108, 109]. Jak podaje Farquhar, występowanie bezobjawowej endometriozy notuje się u 2-22% kobiet, natomiast wśród kobiet z bolesnymi miesiączkami chorobę diagnozuje się w 40-60%. Gruczolistość uznaje się również za najczęstszą przyczynę bólu w miednicy mniejszej oraz stwierdza się ją wśród 13-33 % pacjentek ze zdiagnozowaną niepłodnością [18]. Według Child, problem stwierdza się także u 0,5 do 5% kobiet płodnych [14]. Jak podają Porpora i wsp., chorobę stwierdzano u 37-74 % pacjentek, u których wykonywano laparoskopię z powodu przewlekłego bólu w miednicy mniejszej [75]. Według Barton-Smith notuje się wzrost zachorowań na endometriozę w przeciągu minionych lat [5]. Tłumaczy się to faktem, że współczesne kobiety mają większą liczbę miesiączek ze względu na coraz dłuższy okres życia, a tym samym wydłużenie okresu rozrodczego oraz łączny krótszy czas bycia w ciąży związany ze spadkiem dzietności. Jednakże opinii tej nie podzielają wszyscy badacze. Według danych, jakie przedstawił Vercellini podczas Światowego Kongresu Endometriozy w Maastricht w 2005 roku, zachorowalność na endometriozę nie zwiększyła swojej częstotliwości w przeciągu minionych 30 lat i waha się w przedziale 2,37-2,49 na 1000 kobiet na rok [39, 56].

Choroba stanowi istotny problem ekonomiczny. Według danych z piśmiennictwa, roczny koszt leczenia pacjentek z endometriozą w Stanach Zjednoczonych wynosi około 22 miliardy dolarów (dane z 2007 roku) i stanowi 10% całej sumy wydawanej na terapię kobiet w wieku rozrodczym [97] .

2.4. CZYNNIKI RYZYKA I PREWENCJA ENDOMETRIOZY

W piśmiennictwie zgodnie dominuje opinia, że endometrioza promowana jest wszelkimi stanami związanymi z hyperestrogenizmem. Do tej pory nie opisano w literaturze przypadków endometriozy współistniejących z zespołem Kallmana czy zespołem kompletnej niewrażliwości na estrogeny. [90]

Za czynniki stymulujące rozwój choroby uważa się między innymi wczesną menarche, długie (powyżej 8 dni) krwawienia miesiączkowe, krótsze niż 27-dniowe cykle płciowe, wady narządów płciowych, w tym zarośnięcie błony dziewiczej czy zwężenie kanału szyjki macicy [90]. Wszystkie wymienione sytuacje wiążą się z jedną

z hipotez tłumaczących powstawanie endometriozy, a mianowicie z transportem wstecznym krwi miesiączkowej. Za pierwotną prewencję endometriozy można więc uznać regulację cykli miesiączkowych i korektę chirurgiczną wad narządów płciowych. Według Skrzypczak, również stosowanie tamponów dopochwowych w trakcie miesiączek przez dziewczęta i kobiety z upośledzoną funkcją układu immunologicznego sprzyja powstawaniu endometriozy. Tym samym unikanie takich środków higienicznych pomaga zapobiegać rozwojowi choroby [90].

Według Missmer do czynników ryzyka rozwoju endometriozy zalicza się także: rasę kaukaską, wiek 25-29 lat, codzienne spożywanie alkoholu w ilości co najmniej 10 g na dobę. Dodatkowo endometrioza częściej jest diagnozowana u kobiet niepełnych, które są aktywnymi palaczkami oraz których BMI (*body mass index*) jest prawidłowy lub niski [61]. Wielokrotnie w piśmiennictwie podkreśla się rolę diety w prewencji rozwoju endometriozy. Za najkorzystniejsze uważa się tu zielone warzywa oraz świeże owoce [72]. Dzieje się tak dzięki zawartości antyoksydantów, odgrywających istotną funkcję w prawidłowym funkcjonowaniu układu immunologicznego oraz usuwaniu wolnych rodników. Dodatkowo, zawarty w warzywach błonnik współdziała w kontroli jelitowej flory bakteryjnej i wpływa na równowagę hormonalną [90]. Według Parazziniego antagonistyczny do warzyw i owoców wpływ na rozwój endometriozy wywiera czerwone mięso. Tłumaczy się to wysoką zawartością dioksyn, hormonów oraz tłuszczu, podwyższającego stężenie estrogenów [72]. W prewencji pierwotnej endometriozy podkreśla się wreszcie modulację układu immunologicznego odpowiednim trybem życia, w którym znaczną część powinien zajmować wypoczynek, ruch i aktywność fizyczna.

Istnieje również wiele hipotez dotyczących prewencji trzeciorzędowej endometriozy, a więc po leczeniu operacyjnym. Według wytycznych ESHRE z 2005 roku zaleca się stosowanie danazolu lub analogów GnRH przez 6 miesięcy po operacji [9]. Ponadto w piśmiennictwie znaleźć można opinie, że stosowanie hormonalnych tabletek antykoncepcyjnych w sposób ciągły zapobiega nawrotom endometriozy. Takie leczenie jest jednak ograniczone u kobiet stosujących antykoncepcję hormonalną w przeszłości [92]. Ponadto znaczną rolę w prewencji trzeciorzędowej przypisuje się również diecie. Do produktów, których należy unikać, zalicza się czekoladę, słodczyce i lody, czerwone mięso, białe pieczywo, makarony i ciastka, produkty zawierające krowie białko oraz kawę, alkohol i gazowane napoje. Z kolei zaleca się spożywanie warzyw i świeżych owoców, białego mięsa, ryb morskich, produktów ziarnistych i ryżowych jak

również przetworów białkowych kóz i owiec [90]. Zaleca się również spożywanie produktów wielowitaminowych przez pierwsze 6 miesięcy po operacji, zwłaszcza tych z małą zawartością witaminy A, magnezem i pałeczkami kwasu mlekowego.

2.5. ETIOPATOGENEZA ENDOMETRIOZY

Po raz pierwszy endometriozę opisano w 1860 roku. Karl Rokitansky i Hans Chiarie zwrócili uwagę na jedną z postaci endometriozy zwaną adenomiozą. Mianem tym określono występowanie wysp endometrium (gruczołów i podścieliska) między warstwami tkanki mięśniowej ścian macicy. W 1908 roku Cullen napisał monografię na temat adenomyosis [45]. Endometriozę jajników opisał po raz pierwszy W. Russel w 1899 roku. U kobiety operowanej z powodu adenocarcinoma jednego z jajników, w drugim stwierdzono w badaniu histopatologicznym strukturę odpowiadającą gruczołom i podścielisku endometrium. W polskim piśmiennictwie jako pierwszy o schorzeniu pisze w 1937 roku Leonard Lorentowicz w Ginekologii Polskiej, w artykule p.t.: „W sprawie patogenezy gruczolistości śródmacicznej w jamie otrzewnej (endometriosis peritonealis). Przyczynek do etiologii ciąży brzusznej”[45].

Pierwszą teorię próbującą tłumaczyć przyczyny pojawienia się endometriozy podał w 1927 roku J.A. Sampson, który jako pierwszy wprowadził również do nazewnictwa medycznego pojęcie *endometriosis*. Według uczonego za chorobę miał odpowiadać transport wsteczny krwi miesięczkowej z następową implantacją złuszczonej błony śluzowej endometrium w obrębie jamy otrzewnej [82]. Mimo upływu ponad osiemdziesięciu lat od powstania opisanej teorii, jest ona dominującą wśród pozostałych hipotez dotyczących etiopatogenezy endometriozy. Niestety, mimo upływu tak długiego okresu czasu, wciąż nie udało się do końca wyjaśnić, dlaczego transport wsteczny krwi miesięczkowej, który pojawia się u blisko 90% kobiet w wieku rozrodczym, tylko w wąskiej grupie doprowadza do przetrwania tkanki endometrialnej poza jamą macicy [64]. Od pierwszej teorii Sampsona w miarę upływu lat i przeprowadzonych badań pojawił się cały szereg wielu teorii próbujących tłumaczyć zjawisko powstawania endometriozy. W 1984 roku Schweppe uporządkował znane teorie w trzy główne grupy. Pierwsza obejmuje teorie przeszczepiania endometrium przez wsteczną krew miesięczkową oraz mechaniczne przeszczepienie, na przykład podczas zabiegów operacyjnych, a także drogą naczyń chłonnych i krwionośnych czy przez ciągłość. Kolejna grupa to teorie rozwoju endometriozy *in situ*

-z pozostałości komórek lub tkanek zalążka płodowego czy układu moczowo-płciowego, a więc z miejscowej tkanki, zwłaszcza multipotencjalnego nabłonka otrzewnej. Do tych teorii przyczyniły się badania Waldeyera, Russela, Reclinghausena, Gebharda oraz Meyera i Novaka [45]. Obydwie grupy teorii scala trzecia- teoria indukcyjna Levandera z 1941 roku, według której złuszczone komórki endometrium, dostając się do jamy otrzewnej, stymulują jej nabłonek do przekształcenia się w tkankę endometrium [64, 76, 84].

2.6. ROLA UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO W ENDOMETRIOZIE

Pewnym przełomem w badaniach nad etiopatogenezą endometriozy było odkrycie związku choroby z zaburzeniami funkcjonowania układu immunologicznego chorych pacjentek. W 1981r. Paul Dmowski opublikował pierwsze wyniki swoich badań przeprowadzonych na małpach *Maccacus rhesus*. Wykazał, że autologiczne komórki endometrialne od zwierząt z endometriozą są niszczone *in vitro* przez limfocyty krwi obwodowej w znacznie niższym stopniu niż zwierząt zdrowych. Ponadto, po podskórnym wstrzyknięciu autologicznych antygenów endometrialnych, miejscowa infiltracja limfocytów była słabsza wśród małp z endometriozą. W ten sposób narodziła się kolejna teoria tłumacząca rozwój endometriozy- tzw. teoria obniżonej odporności, według której komórki endometrium podczas migracji przez jajowody i naczynia krwionośne poza jamę macicy w trakcie menstruacji są wychwytywane przez komórki układu immunologicznego. Zaburzenia odporności komórkowej bądź zwiększony rozsiew ektopowych komórek endometrium doprowadzają do przeżywania komórek endometrialnych poza jamą macicy i przekształcania się ich w ogniska endometriozy [22]. Na podstawie licznych badań dotyczących współzależności endometriozy i zaburzeń funkcjonowania układu immunologicznego wywnioskowano o całym szeregu nieprawidłowości w układzie odpornościowym u pacjentek z gruczolistością. Stwierdzono, że transport wsteczny krwi miesięczkowej występuje u blisko 76-90% kobiet w wieku rozrodczym [10], wobec czego rozwój endometriozy tylko u niewielkiego odsetka pacjentek z tej grupy musi wiązać się z nakładaniem dodatkowych czynników. Obecnie wiadomo już, że upośledzone rozpoznawanie i niszczenie komórek ektopowego endometrium nie wiąże się ze zmianami ilościowymi, a jakościowymi limfocytów krwi obwodowej [20]. W 1982 roku Mathur i wsp. rozpoznali w surowicy, płynie otrzewnowym, wydzielinie

szykowej i pochwowej pacjentek z endometriozą przeciwciała w klasie Ig G i Ig M skierowane przeciwko antygenom i komórkom endometrium [60]. W 1987 roku pojawiła się teoria deficytu immunologicznego w endometriozie, zgodnie z którą zaliczono to schorzenie do grupy chorób z autoagresji [31]. Tezę tę potwierdzać mogą doniesienia, zgodnie z którymi statystycznie częściej współwystępują z endometriozą niektóre choroby autoimmunologiczne, takie jak toczeń trzewny, reumatoidalne zapalenie stawów czy niedoczynność tarczycy [88]. Według Dmowskiego obecność autoprzeciwciał przeciwko komórkom i antygenom endometrialnym, antygenom wewnątrzkomórkowym (antyfosfolipidowym, przeciwhistonowym, przeciwjądrowym), tkankom i narządom (przeciwjajnikowe, przeciwtarczycowe) wskazuje na nieprawidłową aktywację poliklonalną limfocytów B [20].

W miarę upływu lat i postępu badań nad chorobą, wiedza związana z dysfunkcją układu immunologicznego znacznie się poszerzyła, choć wciąż nie wyjaśniono ostatecznie przyczyny endometriozy. W 1986 roku Barberi udowodnił podwyższony poziom antygeny karcinoembrionalnego (CA-125) we krwi pacjentek z endometriozą [45]. W 1991 roku Didier Oosterlynck ze współpracownikami wykazał, że funkcja limfocytów typu NK i cytotoksycznych skierowana przeciwko ektopowym komórkom endometrium jest upośledzona u kobiet z gruczolistością [68]. Dodatkowo stwierdzono zależność między zaburzeniem funkcji limfocytów i nasileniem choroby. W większości doniesień dotyczących choroby traktuje się ją jako miejscowy stan zapalny otrzewnej w obrębie miednicy mniejszej, o czym świadczy zwiększona ilość płynu otrzewnowego z podwyższonym poziomem leukocytów i cytokin. Lokalny stan zapalny z kolei indukuje napływ makrofagów. Wykazano ich podwyższone stężenie w płynie otrzewnowym u kobiet z endometriozą w porównaniu ze zdrowymi pacjentkami [51,69]. Stąd niekiedy endometriozę określa się mianem „choroby chorych makrofagów”[7]. Ich ilość w płynie otrzewnowym jest podwyższona, jednak produkowane przez nie cytokiny i czynniki wzrostu nie pomagają, a wręcz stymulują rozrost ektopowych komórek endometrium [93]. W 1992 Oosterlynck stwierdził również obniżoną aktywność komórek typu NK w płynie otrzewnowym chorych kobiet. W tym samym roku Tanaka potwierdził analogiczne zmiany we krwi pacjentek [45].

W zależności od mechanizmów działania układu immunologicznego odpowiedź immunologiczną dzieli się na nieswoistą- wrodzoną oraz swoistą, czyli nabytą. Odpowiedź wrodzona stanowi pierwszą linię obrony przy kontakcie z

zarazkiem, chociaż jest mniej precyzyjna. Odpowiedź nabyta uruchamiana jest, gdy mechanizmy odpowiedzi nieswoistej nie dadzą rady zapobiec wnikaniu lub usunięciu patogenu w krótkim czasie. Pełen rozwój odpowiedzi swoistej wymaga upływu określonego czasu, lecz jest znacznie precyzyjniejszy niż mechanizmy odpowiedzi wrodzonej. W odpowiedzi nabytej uczestniczą wytwarzane przez limfocyty B przeciwciała oraz limfocyty T ze swoistymi receptorami wiążącymi antygen. Wyróżnia się dwa rodzaje mechanizmów w funkcjonowaniu odpowiedzi nabytej- typ komórkowy i humoralny. Granica między nimi jest bardzo płynna i polega bardziej na przewadze niż wyłączności funkcjonowania któregoś z nich. Odpowiedź humoralna odpowiada za niszczenie cząstek występujących w organizmie w stanie pozakomórkowym, czyli wolnym. Główną rolę pełnią tu limfocyty B i różnicujące się z nich komórki plazmatyczne. Przeciwciała, wiążąc się z antygenami czynnika infekcyjnego, rozpoczynają kaskadę reakcji prowadzących do usunięcia tego czynnika z ustroju.

Z kolei odpowiedź komórkowa uruchamiana jest, gdy patogenne drobnoustroje pasożytują wewnątrz komórek [33].

Do zapoczątkowania odpowiedzi immunologicznej, zarówno komórkowej jak i humoralnej, niezbędna jest tzw. prezentacja antygeny przez odpowiednie komórki subpopulacji limfocytów T, czyli pomocnicze limfocyty T (Th-T helper). Rolę komórek prezentujących antygen mogą pełnić komórki dendrytyczne, limfocyty B i znaczna subpopulacja makrofagów [33].

W indukcji i ukierunkowaniu odpowiedzi immunologicznej dużą rolę odgrywają cytokiny. Jest to grupa rozpuszczalnych białek, uczestniczących w przekazywaniu informacji między komórkami w odpowiedzi na zakażenie wirusowe (interferony- IFN), w trakcie reakcji zapalnych i odpornościowych (interleukiny- IL) czy w procesach wzrostu i różnicowania komórek (czynniki wzrostu) [33].

Wiadomo, że w zależności od profilu produkcji cytokin (Th1 i Th2), dochodzi do uruchomienia dwóch podstawowych typów odpowiedzi zależnych od pomocniczych komórek T CD4+. Typowe ludzkie cytokiny Th1 to IFN γ , TNF α , IL-1 i IL-2. Komórki Th1 biorą udział w reakcjach zapalnych typu komórkowego. Funkcją cytokin Th1 jest aktywacja reakcji cytotoksycznych, zapalnych i nadwrażliwości opóźnionej. Tymczasem dla komórek typu Th2 typowa jest produkcja IL-4, IL-5 oraz IL-6, IL-9, IL-10 i IL-13. Za pośrednictwem komórek typu Th2 wzmagana jest produkcja przeciwciał, zwłaszcza IgE, a same cytokiny Th2 wpływają na regulację silnych odpowiedzi humoralnych i alergicznych [79]. Profil cytokin produkowanych

przez limfocyty pamięci T CD4+ nie jest stały, wpływ mają na niego hormony (progesteron) czy cytokiny. Interleukina 12 stymuluje produkcję IFN- γ przez subpopulację limfocytów Th2. Zarówno subpopulacje Th1 jak i Th2 wywodzą się z limfocytów TCD4+ typu Th0 (naive T CD4+). Wpływ na różnicowanie limfocytów T CD4+ w kierunku subpopulacji Th1 mają IL-12, IFN- γ oraz TGF- β . Z kolei IL-4 z IL-1 są najistotniejszymi czynnikami wpływającymi na różnicowanie limfocytów T CD4+ w kierunku komórek typu Th2. Dodatkowo IL-10 ma właściwości immunosupresyjne, hamując aktywację limfocytów T CD4+ typu Th1 [63, 80]. Odpowiedzi typu Th1 hamują odpowiedzi Th2 i *vice versa* [79].

Istnieją dowody na to, że odpowiedzi Th1 i Th2 mają inne role ochronne i mogą przyczyniać się do powstawania immunopatologii narządowej. Idąc tym tropem, można znaleźć doniesienia o chorobach, u podstawy których dochodzi do zmian w czynności Th. Odpowiedź Th1 wiąże się z narządowo swoistymi zaburzeniami immunologicznymi, ostrym odrzucaniem alloprzeszczepów, niewytłumaczalnymi nawracającymi poronieniami czy stwardnieniem rozsianym. U chorych z opisanymi schorzeniami można z łatwością wyizolować klony komórek Th1. Z kolei u chorych z toczeniem rumieniowatym układowym czy z astmą atopową spowodowaną pyłkami traw wyizolować można komórki o profilu Th2 [79].

W miarę rozwoju badań nad immunologicznym podłożem endometriozy pojawiły się hipotezy dotyczące udziału poszczególnych typów cytokin, a co za tym idzie również typów odpowiedzi immunologicznej, które mogłyby wpływać na rozwój choroby.

2.6.1. ODPOWIEDŹ KOMÓRKOWA W ENDOMETRIOZIE

Istnieje wiele sprzecznych doniesień na temat upośledzonej odpowiedzi komórkowej u pacjentek z endometriozą. Liczne dane wskazują na zmiany czynnościowe limfocytów we krwi obwodowej pacjentek z endometriozą w odpowiedzi na autologiczne antygeny endometrialne. Liczne prace potwierdziły, że nie chodzi tu o zmiany ilościowe limfocytów [20]. Istotne badania dotyczące zmian jakościowych odpowiedzi komórkowej opisał również w 1991 r. Oosterlynck, według którego w endometriozie dochodzi do obniżenia upośledzonej funkcji limfocytów typu NK. Wykazał on, że dochodziło do zmniejszenia cytotoksyczności komórek NK w warunkach *in vitro* po dodaniu osocza krwi obwodowej lub odseparowanego płynu

otrzewnowego od kobiet z endometriozą [68]. Dane co do zmian liczebności NK wskutek endometriozy pozostają sprzeczne- Oosterlynck opisywał ich niezmienny poziom, ale Hill ze współpracownikami wskazywał na wzrost poziomu NK, mimo ich obniżonej cytotoksyczności [38].

W prawidłowych warunkach ektopowe komórki endometrialne stanowią naturalny cel dla komórek NK. To właśnie ta grupa leukocytów odpowiada za eliminację ognisk endometriozy z jamy otrzewnej. Skutkiem upośledzonej czynności komórek NK jest niepełna ich zdolność do rozpoznawania i niszczenia komórek ektopowego endometrium. Kolejne badania wskazują, że monocyty krwi obwodowej oraz makrofagi płynu otrzewnowego u kobiet z endometriozą cechują się zwiększoną aktywnością i wytwarzają dużo więcej cytokin prozapalnych.

W 1992 roku Taketani opisał podwyższone poziomy IL 1 i TNF- α w płynie otrzewnowym pacjentek z endometriozą [87], a więc cytokin typowych dla odpowiedzi Th1. Obie cytokiny zmniejszają ekspresję inhibitorów metaloproteinaz, ułatwiając inwazję komórek endometrium. Ponadto w endometriozie zaobserwowano zwiększone wytwarzanie IL-6, IL-8 czy prostaglandyn kurczących mięśnie gładkie (PGF 2 α , PGE2) [12, 47, 78, 112]. Tym zjawiskiem próbuje się wytłumaczyć towarzyszący endometriozie ból, powiększanie się jej ognisk, powstawanie odczynów zapalnych, zrostów i autoprzeciwciał. Jak podaje D'Hooghe, TNF- α nasila przyleganie komórek endometrialnych do mesothelium, a także stymuluje ich proliferację. Tym sposobem może ułatwiać implantację i przeżycie złuszczonych komórek endometrium w jamie otrzewnej [18].

Oprócz zwiększonej koncentracji makrofagów, typowej dla stanu zapalnego, podczas choroby zaobserwowano również ich zmiany czynnościowe. W piśmiennictwie opisuje się ich obniżoną zdolność do cytolizy, fagocytozy oraz obniżoną adhezję do otrzewnej [12, 21, 83]. Wykazano, że podanie autologicznych makrofagów i monocytów od kobiet z endometriozą do hodowli *in vitro* eutopowych i ektopowych komórek endometrium nasila proliferację i zmniejsza apoptozę w komórkach endometrium. Zjawiskiem tym tłumaczy się przeżywalność, inwazję i rozrost tych komórek z następowym rozrostem ognisk endometriozy w obecności makrofagów i monocytów płynu otrzewnowego chorych kobiet [20].

2.6.2. ODPOWIEDŹ HUMORALNA W ENDOMETRIOZIE

Liczne badania udowodniły zwiększoną aktywność limfocytów B oraz obecność autoprzeciwciał w przebiegu endometriozy. Wśród autoprzeciwciał stwierdzono izotypy IgG, IgM, IgA skierowane przeciwko antygenom i komórkom endometrialnym, antygenom wewnątrzkomórkowym (antyfosfolipidowe, przeciwhistonowe, przeciwjądrowe), tkankom (antyendotelialne) i narządom (przeciwjajnikowe, przeciwtrądzycowe). Obecność wspomnianych przeciwciał jest typowa dla nieprawidłowej poliklonalnej aktywacji limfocytów B. Ta z kolei jest charakterystyczna dla chorób z autoagresji [20]. Co ciekawe, autoprzeciwciała występują tylko u części pacjentek z endometriozą- w około 60%. Częściej są spotykane wśród pacjentek z mniej zaawansowaną endometriozą [29, 30]. Na podstawie badań przeprowadzonych przez Gleichera oraz Dmowskiego stwierdzono, że reakcja immunologiczna między antygenami eutopowego endometrium a autoprzeciwciałami przyczynia się do niepłodności lub nawracających poronień u kobiet z endometriozą [20, 32, 87].

Zmiany w obrębie funkcjonowania odpowiedzi humoralnej tłumaczą prawdopodobnie statystycznie częstsze występowanie wraz z endometriozą niektórych schorzeń immunologicznych. Wymienić tu można toczeń trzewny, reumatoidalne zapalenie stawów czy niedoczynność tarczycy [88].

2.6.3. ROLA ANGIOGENEZY W ROZWOJU ENDOMETRIOZY

Wiadomo już, że aby tkanka endometrialna mogła ulec adhezji i wszczępieniu poza jamą macicy, musi dojść do zaburzeń w obrębie lokalnej odpowiedzi immunologicznej. Aby jednak ekotopowa tkanka mogła przetrwać w środowisku jamy otrzewnej, musi być również zaopatrywana w substancje odżywcze i czynniki wzrostu. Taką funkcję pełnią powstające w procesie neowaskularyzacji naczynia krwionośne [23]. Na podstawie opracowań Seli i współpracowników wyodrębniono 5 etapów rozwoju ognisk endometrialnych. I tak: najpierw dochodzi do przylegania komórek zarzuconych do mesothelium jamy otrzewnej. Następnie ma miejsce inwazja komórek do przestrzeni pozakomórkowej, aby później indukować rekrutację komórek układu immunologicznego z aktywacją angiogenezy wokół nowego implantu i ostateczną proliferacją [86]. Angiogeneza jest więc bardzo istotnym czynnikiem rozwoju tkanki

endometrioidalnej. Reguluje ją grupa białek sygnalizacyjnych określanych mianem czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego- VEGF. Jest on wydzielany do płynu otrzewnowego przez aktywowane makrofagi. Udowodniono podwyższony poziom VEGF u pacjentek z czynną postacią endometriozy [23]. Wśród innych czynników angiogennych w endometriozie wymienia się również czynnik wzrostu fibroblastów α i β (FGF- α , FGF- β), płytkopochodny czynnik wzrostu śródbłonna (PD-ECGF), czynnik martwicy nowotworu α (TNF- α) oraz transformujące czynniki wzrostu α i β (TGF- α i TGF- β).

2.6.4. ROLA PŁYNU OTRZEWNOWEGO W ENDOMETRIOZIE

Źródłem płynu otrzewnowego u kobiet jest przesączanie osocza, czynność wydzielnicza jajników oraz wydzielina jajowodowa, debris miesięczkowe, wydzielanie makrofagów [69]. Poprzez bezpośrednie sąsiedztwo z narządami miednicy mniejszej środowisko płynu otrzewnowego wpływa na przebieg procesów rozrodczych oraz proces wszczepiania i przeżywania ognisk endometriozy. Pomimo sprzecznych doniesień większość badań wskazuje na wzrost objętości płynu otrzewnowego w grupie kobiet z endometriozą, jak również niewyjaśnioną przyczyną niepłodności [51]. Liczne badania potwierdziły, że płyn otrzewnowy kobiet z endometriozą ma niekorzystny wpływ na czynność układu rozrodczego poprzez oddziaływanie na procesy związane z owulacją, wychwytywaniem komórek jajowych przez strzępki jajowodu, transportem przez jajowód jak i przeżywalność plemników, zapłodnienie, implantację oraz rozwój embrionów [20]. Obecność implantów endometrialnych oraz wsteczny napływ treści miesięczkowej stymulują, poprzez rozwój miejscowego stanu zapalnego, napływ makrofagów [90]. Wykazano, że aktywność makrofagów jest bardziej nasiloną wśród pacjentek z endometriozą [51].

Zarówno makrofagi jak i limfocyty czy ogniska ektopowego endometrium oraz komórki mesothelium otrzewnej mają zdolność produkcji cytokin [102, 110]. Wśród wytwarzanych w płynie otrzewnowym cytokin stwierdzono IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL 13, IFN- γ , TNF- α , EGF- czynnik wzrostu naskórka, MCP- białko chemotaktyczne dla monocytów, M-CSF- czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów, TGF- β – transformujący czynnik wzrostu, VEGF- czynnik wzrostu śródbłonna, RANTES. Komórki mezotelialne płynu otrzewnowego wytwarzają również białko CA-125 [4, 110, 111].

2.6.5. ROLA CYTOKIN W ENDOMETRIOZIE

Liczne badania wskazują, że cytokiny mają istotny wpływ na rozwój, przebieg i skutki endometriozy. Działanie cytokin zaznacza się już na etapie implantacji ektopowych ognisk endometrialnych. Według doniesień Garcia-Velasco i Arici podwyższony poziom IL-8 stymuluje zdolność ektopowych komórek endometrium do adhezji do fibronektyny [28]. Cytokina ta jest również silnym czynnikiem proangiogennym. Innymi czynnikami angiogenezy wytwarzanymi przez komórki ektopowego endometrium są IL-6, IL-1, angiogenina i angiopoetyna [20].

Jedną z molekuł biorących udział w adhezji i implantacji ognisk endometrialnych jest ICAM-1, a więc rozpuszczalna cząsteczka adhezji międzykomórkowej. Stwierdzono jej nasiloną ekspresję u kobiet z endometriozą, zwłaszcza w zaawansowanych stadiach choroby, przebiegających z dużymi naciekami ognisk endometrialnych. Wiele cytokin prozapalnych, w tym IL-1, TNF- α czy IFN- γ ma zdolność do zmniejszania ekspresji ICAM-1 na powierzchni komórek [110]. Ponadto produkcja ICAM-1 przez makrofagi jest osłabiana pod wpływem IFN- γ i IL-6 [26]. Według doniesień Oosterlynck'a TGF- β prawdopodobnie zmniejsza aktywność limfocytów NK w płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą [68]. Antagonistyczne działanie ma IL-12, która poprzez stymulację produkcji przede wszystkim IFN- γ zwiększa cytotoksyczność NK, nasilając odpowiedź typu Th1. Wiadomo jednak również, że komórki endometrialne nie posiadają receptorów dla IL-12 [35].

Wiele danych potwierdza, że cytokiny zawarte w płynie otrzewnowym u kobiet z endometriozą stymulują proliferację ektopowych i ektopowych ognisk endometriozy. Takie właściwości przypisuje się przede wszystkim TNF- α i IL-8. Istotną rolę przypisuje się także IL-6, której stężenie również jest podwyższone w krążeniu obwodowym i płynie otrzewnowym pacjentek z endometriozą. Według piśmiennictwa wspomniana cytokina może być związana z powstawaniem autoprzeciwciał w endometriozie. Ponadto IL-6 hamuje proliferację prawidłowych komórek endometrium, nie wywierając takiego działania na komórki ektopowe [35, 69].

Szczególną rolę w proliferacji ektopowego endometrium przypisuje się TNF- α . Wiadomo, że w prawidłowych warunkach, to jest u zdrowych pacjentek, molekula ta sprzyja apoptozie ektopowych komórek endometrium. Zupełnie inaczej wygląda ta funkcja wśród chorych pacjentek. Jak wynika z doniesień Ding'a i wsp.,

rekombinowany TNF- α dodany do hodowli komórek endometrialnych pacjentek z endometriozą zmniejszał apoptozę wspomnianych komórek [19].

2.6.5.1. ODCZYN ZAPALNY W ENDOMETRIOZIE

Ból związany z endometriozą może mieć różnorakie pochodzenie. Na pewno wśród przyczyn wymienia się pośrednie i bezpośrednie podrażnienie przez krwawienie z ektopowego endometrium oraz podrażnienie i bezpośrednie naciekanie zakończeń nerwowych dna miednicy. Kluczową rolę w patogenezie bólu przypisuje się jednak wytwarzaniu czynników wzrostowych i cytokin przez aktywowane makrofagi i inne komórki związane z odczynem zapalnym w przebiegu endometriozy [43].

Prokalcytonina (PCT) jest prohormonem kalcytoniny, produkowanym w stanach fizjologii przez komórki okołopęcherzykowe tarczycy. Za jej powstawanie odpowiada gen CALC-I. Pod wpływem infekcji bakteryjnej, grzybiczej, pasożytniczej lub uogólnionej odpowiedzi zapalnej dochodzi do indukcji ekspresji genu CALC-I w komórkach neuroendokrynych jelit, płuc, wątroby, nerek, mięśni, adipocytach, które stają się głównym źródłem prokalcytoniny. Pobudzenie syntezy PCT zachodzi na drodze bezpośredniej pod wpływem toksyn mikroorganizmów (np. lipo polisacharydów bakteryjnych) lub pośrednio- pod wpływem cytokin prozapalnych, jak TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-2 [58]. Takie wnioski na podstawie przeprowadzonych badań wysnuł Dandona i wsp., którzy obserwowali wzrost stężenia cytokin z następowym szczytem poziomu prokalcytoniny po uprzednim podaniu endotoksyny bakteryjnej [15]. Odmienne wnioski opublikowali Assicot i wsp., według których w analogicznym eksperymencie wzrost stężenia PCT poprzedzał podwyższone poziomy cytokin [2].

2.7. ROZPOZNAWANIE ENDOMETRIOZY

Wszystkie objawy endometriozy są mało specyficzne, w związku z czym diagnostyka choroby jest często procesem długotrwałym, według danych z piśmiennictwa opóźniającym ostateczne rozpoznanie średnio o około pięć lat [104]. Objawy podawane przez pacjentki w badaniu podmiotowym są mało specyficzne. Opisywane dolegliwości bólowe w miednicy mniejszej mogą mieć różnorodne nasilenie i lokalizację, niekoniecznie korelujące z nasileniem choroby. W typowym badaniu ginekologicznym zdiagnozować można jedynie endometriozę pod postacią zmian w bliźnie po cięciu cesarskim czy zmian w bliźnie po nacięciu i szytym kroczu. Przy

pomocy wzornika zdiagnozować można również ogniska endometriozy na szyjce macicy czy ścianach pochwy [42]. Niestety również diagnostyka obrazowa nie jest wystarczająco czuła. Ultrasonografia jest przydatna przede wszystkim w rozpoznawaniu torbieli endometrialnych jajników o średnicy przekraczającej 10mm. Wspomnianej metodzie przypisuje się aż 82-86% czułości i 98-100% swoistości [42]. Uważa się również, że ultrasonografia przezodbytnicza połączona z rezonansem magnetycznym jest pomocna w diagnostyce głębokich ognisk gruczolistości, zwłaszcza w okolicy przegrody odbytniczo-pochwowej [95]. Niestety, powierzchowne zmiany otrzewnej i jajników czy też zrosty są niedostępne ultrasonografii i rezonansowi magnetycznemu.

Jak przyznaje zdecydowana większość badaczy, złotym standardem w diagnostyce gruczolistości jest uwidocznienie ognisk endometriozy podczas laparoskopii [49]. Potwierdzenie histopatologiczne nie jest koniecznym warunkiem do ustalenia rozpoznania w sytuacji endometriozy otrzewnowej. Według opracowania Buchweitz i wsp. laparoskopowa diagnostyka endometriozy okazała się w 97% czuła i w 77% specyficzna. Warto jednak podkreślić, że korelacja między laparoskopowym rozpoznaniem endometriozy a jej histologicznym potwierdzeniem jest stosunkowo niska [95]. Stosowanie klasyfikacji endometriozy pozwala na łatwiejsze porównanie uzyskiwanych wyników leczenia endometriozy. Najczęściej klasyfikacja endometriozy odbywa się według rASRM, to jest The Revised American Society for Reproductive Medicine Classification of endometriosis z 1996 r.

Niestety, wciąż brak typowych markerów endometriozy, które pozwoliłyby na czułe i swoiste rozpoznanie choroby z uniknięciem inwazyjnych technik, do jakich należy laparoscopia. Tym sposobem tak naprawdę nieznana jest całkowita liczba kobiet cierpiących z powodu endometriozy. Niemożliwe jest też wczesne jej wykrywanie bowiem u wielu kobiet przez długi czas może przebiegać asymptotycznie. Wśród badań dodatkowych często stosowanych pomocniczo w rozpoznawaniu choroby wymienia się ocenę stężenia białka CA-125 we krwi [53]. Jest to jednak substancja mało specyficzna, występująca również w wielu innych schorzeniach ginekologicznych, wśród których najczęściej wymienia się raka jajnika oraz stany zapalne miednicy mniejszej, mięśniaki macicy, ciążę ektopową czy polipy szyjki macicy. Wiadomo, że podwyższony poziom CA-125 koreluje z występowaniem endometriozy o średnim i ciężkim przebiegu i proponuje się rutynowe oznaczanie tej substancji wśród pacjentek diagnozowanych ze względu na niepłodność [62]. Najlepiej przeprowadzać oznaczenia tego markera w pierwszych dniach miesiączki, kiedy stężenia antygenu są najwyższe.

Podkreśla się także wartość oznaczania CA-125 jako markera prognostycznego nawrotu endometriozy, wskaźnika oceny skuteczności działań chirurgicznych oraz czynnika prognostycznego możliwości zajścia w ciążę wśród pacjentek cierpiących na niepłodność w przebiegu endometriozy [73].

Postępy w badaniach nad etiopatogenezą gruczolistości wyłaniają kolejne propozycje biochemicznych markerów choroby, jednak ze względu na niską czułość nie mają one zastosowania klinicznego. Wymienia się tutaj między innymi aromatazę P 450. Jest to enzym konwertujący androstendion i testosteron do estronu, występujący w eutopowym endometrium, lecz tylko wśród kobiet z endometriozą. Jego zaletą jest brak zależności między ekspresją w endometrium a fazą cyklu miesięczkowego. Wykazano jednak podwyższone poziomy tego enzymu również w innych estrogenozależnych chorobach miednicy mniejszej, co znacznie obniża jego wartość diagnostyczną [42].

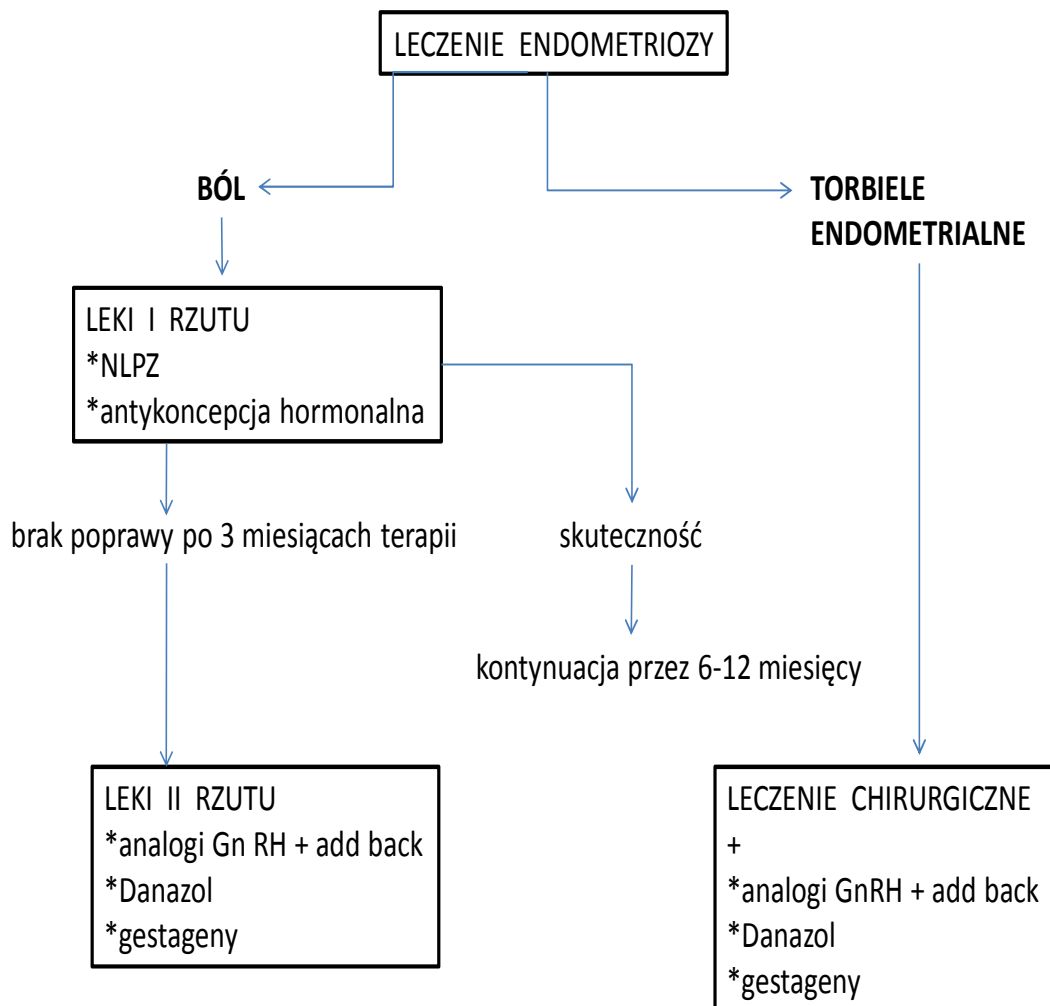
Do surowicznych markerów endometriozy zaliczyć można interleukinę 6, lecz po wykluczeniu objawów zakażenia. Również poziom leptyny ulega podwyższeniu w przypadku gruczolistości. Jest to interleukina produkowana w adipocytach, ma właściwości prozapalne i neoangiogenne [42]. Coraz więcej doniesień wskazuje na podwyższone poziomy witaminy E oraz afaminy, glikoproteiny wiążącej wit. E, jako markerów stresu oksydacyjnego w przebiegu endometriozy [85]. Wymienione substancje pozostają jednak w sferze badań doświadczalnych i nie znajdują jeszcze zastosowania w klinicznej diagnostyce endometriozy.

2.8. LECZENIE ENDOMETRIOZY

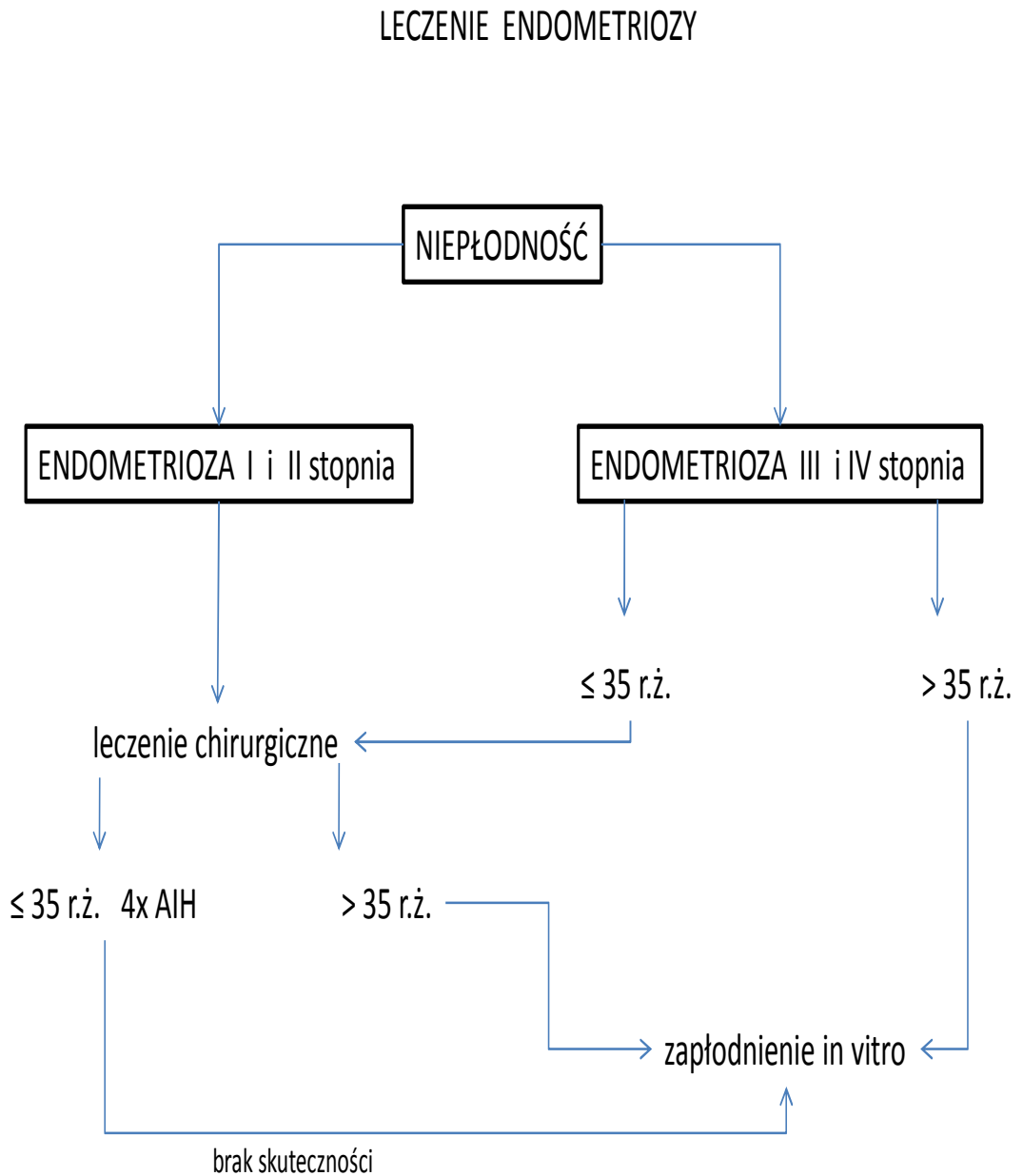
Tak jak wciąż trwają poszukiwania jednoznacznych przyczyn powstawania endometriozy, tak nie udało się znaleźć w pełni skutecznego leczenia choroby, umożliwiającego eliminację wszystkich związanych z nią objawów. Terapia choroby ma bowiem na celu redukcję bólu, zwiększenie szansy na zajście w ciążę oraz w miarę możliwości maksymalne opóźnienie wystąpienia wznowy choroby [81]. W miarę postępów w pracach badawczych pojawiają się nowe hipotezy dotyczące możliwości terapii gruczolistości, jednak nie poznano dotąd preparatu, którego mechanizm umożliwiłby eliminację bólu, niepłodności, a tym bardziej terapię torbieli endometrialnych. Schemat leczenia choroby musi być oparty na szczegółowym

wywiadzie z pacjentką, uwzględniając jej potrzeby, dominujące objawy, choroby towarzyszące, a przede wszystkim- plany prokreacyjne.

Ryc. I Schemat leczenia torbieli endometrialnych i bólu w przebiegu endometriozy na podstawie Sobstyl M. et al. Farmakologiczne leczenie endometriozy; Gambone. Consensus statement for the management of chronic pelvic pain and endometriosis: proceedings of an expert-panel consensus process.



Ryc. II Schemat leczenia niepłodności w przebiegu endometriozy wg Radwan P., Radwan J. Postępowanie w endometriozie współistniejącej z niepłodnością.



2.8.1. LECZENIE FARMAKOLOGICZNE

W przypadku endometriozy, której dominującym objawem są różne postaci bólu, coraz częściej zaleca się jako pierwsze leczenie farmakologiczne. Wiadomo, że gruczolistość należy do chorób estrogenozależnych. Już dawno dokonano spostrzeżeń, że dwa fizjologiczne stany organizmu łagodzą objawy endometriozy, a mianowicie ciąża i menopauza. Farmakoterapia ma więc na celu stworzenie środowiska hypoestrogennego w organizmie, aby zahamować wzrost właściwej jak i ektopowej tkanki endometrialnej.

Wśród dostępnych i znanych preparatów wymienia się hormonalną terapię antykoncepcyjną, niesterydowe leki przeciwzapalne, Danazol -lek o działaniu antygonadotropowym i androgennym, analogi gonadoliberyny oraz leki gestagenne. Jak wskazują dane systemu Cochrane, schemat leczenia wywołujący pseudociażę nie przynosi znaczniejszych korzyści niż leczenie doprowadzające do pseudomenopauzy w przypadku bólu w endometriozie. Postępowanie farmakologiczne powinno więc uwzględniać indywidualną sytuację pacjentki i być podyktowane możliwymi skutkami ubocznymi [5]. Uproszczony schemat postępowania w przypadku bólu związanego z endometriozą oraz torbieli endometrialnych przedstawia rycina 2.

Powszechnie przyjęto, że lekami pierwszego rzutu w przypadku endometriozy manifestującej się różnymi postaciami bólu są hormonalne leki antykoncepcyjne oraz niesterydowe leki przeciwzapalne (NLPZ) [81,96]. Działanie NLPZ wiąże się z wysokim poziomem ekspresji cyklooksygenazy 2 (COX-2) w zmianach endometrialnych. Wspomniane leki mają zdolność blokowania tej ekspresji. Niestety, wywołują dość uciążliwe skutki uboczne, takie jak owrzodzenie żołądka, hamowanie owulacji, a poza tym działają wyłącznie objawowo, bez jakiegokolwiek hamującego wpływu na ogniska endometriozy [89].

Celem stosowania dwuskładnikowych tabletek antykoncepcyjnych jest uzyskanie stanu „pseudociaży”, ponieważ brak miesiączek oraz przemiana doczesnowa endometrium hamują postęp choroby i zmniejszają dolegliwości bólowe [96]. Ponadto doustna terapia antykoncepcyjna (DTA) wpływa na indukcję apoptozy w endometrium pacjentek z gruczolistością [59, 69]. Antykoncepcja hormonalna powinna być stosowana w sposób ciągły, aby jak najskuteczniej wywołać supresję endometrium [6,

89, 96]. Wadą metody są nieregularne krwawienia z dróg rodnych, mogące występować u około 10% kobiet [6].

Jeżeli leki antykoncepcyjne i NLPZ nie przynoszą ulgi w leczeniu bólu po około 3 miesiącach stosowania, rozważyć należy leczenie chirurgiczne lub włączenie leków drugiego rzutu, o silniejszym działaniu. Zalicza się tutaj analogi hormonu uwalniającego gonadotropiny (GnRh), Danazol i progestageny.

Danazol jest lekiem sprawdzonym, stosowanym od lat 70-tych. Jest to syntetyczny androgen, którego działanie polega na hamowaniu owulacji, obniżaniu stężenia estrogenów i wpływaniu na atrofię endometrium. Stosowany w dawce 200-600 mg na dobę skutecznie hamuje oś podwzgórze-przysadka-jajnik [81, 89]. Związane z lekiem działania uboczne ograniczają jego stosowanie. Są to: wzrost masy ciała, zmęczenie, trądzik, tłusta cera, zatrzymywanie wody w organizmie, hirsutyzm, uderzenia gorąca, obniżenie tembru głosu (czasem nawet nieodwracalne), nerwowość, kurcze mięśni szkieletowych, nieregularne krwawienia [8, 89]. Terapia Danazolem wymaga również stosowania pewnej antykoncepcji barierowej, ponieważ lek ma działanie teratogenne [8]. Należy jednak zaznaczyć, że zajście w ciążę podczas stosowania Danazolu jest bardzo mało prawdopodobne. Wykazano również niekorzystny wpływ Danazolu na gospodarkę lipidową i funkcję wątroby. Z tego powodu nie zaleca się stosowania leku dłużej niż przez 6 miesięcy [89]. Dzięki działaniu androgennemu lek może się jednak okazać korzystną alternatywą dla pacjentek skarżących się na obniżone libido w trakcie stosowania innych leków, z których wszystkie zmniejszają stężenie androgenów [54].

Znacznie krótszą listę skutków ubocznych prezentują analogi GnRH. Działają poprzez wywołanie hipogonadyzmu hipogonadotropowego i objawów pseudomenopauzy. W ten sposób leki eliminują proliferacyjny wpływ estrogenów na komórki endometrium. Podobnie jak Danazol i progestageny, analogi GnRH wywołują zmniejszenie bądź zanik miesiączek. Znanych jest kilka preparatów, różniących się drogą podawania: leuprolid- w formie domięśniowej, donosowa nafarelina i podawana podskórnie goserelina [8].

Leki mają jednak pewne wady -są drogie oraz mają szereg działań ubocznych, wynikających z działania hipoestrogennego, do których zaliczyć należy uderzenia gorąca, bezsenność, suchość w pochwie, spadek libido, zaburzenia depresyjne, bóle kostno-stawowe, drażliwość, zaburzenia lipidowe, znaczny spadek masy kostnej. Należy bardzo ostrożnie włączać terapię analogami wśród pacjentek, które jeszcze nie

osiągnęły szczytowej gęstości kości [89]. Jednak w odróżnieniu od terapii Danazolem, działania niepożądane analogów poddają się leczeniu substytucyjnemu [8, 41, 96]. Dodanie małych dawek estrogenów zapobiega działaniom niepożądanych analogów GnRH, nie niwelując ich leczniczych skutków. Określa się to jako tzw. terapię *add back*. Chroni ona pacjentkę przed utratą masy kostnej, zmianami naczynioruchowymi czy atrofią układu moczowo-płciowego [54, 96]. Najczęściej zaleca się tutaj połączenie niskodawkowych skoniugowanych estrogenów z gestagenem.

Inną alternatywą jest stosowanie z analogami GnRH noretisteronu w dawce 2,5-5 mg/dobę -sam gestagen zapobiega wtedy utracie masy kostnej [54, 96]. Istotna jest jednak kontrola gospodarki lipidowej, ponieważ zbyt wysoka dawka gestagenów w terapii *add back* może potęgować niekorzystny wpływ analogów [8]. Taką złożoną terapię można kontynuować przez okres 12 miesięcy, podczas gdy podaż samego analogu nie powinna być dłuższa niż 6 miesięcy. Niestety, dolegliwości bólowe mają tendencję do nawrotu już w ciągu 60-90 dni po odstawieniu leczenia [54].

Alternatywą dla drogich analogów GnRH są preparaty progestagenowe. Ich działanie polega na wywoływaniu przemiany doczesnowej i atrofii komórek endometrium przy równoczesnym hamowaniu jajnikowego wytwarzania estrogenów [54, 96]. Dodatkowo progestageny hamują proces angiogenezy we wszczepach endometrialnych, jak również podkreśla się ich działanie przeciwzapalne [89]. Uważa się, że jest to bardzo korzystna forma leczenia endometriozy po wcześniejszym leczeniu operacyjnym. Progestageny zmniejszają prawdopodobieństwo nawrotu dolegliwości bólowych i wydłużają okres remisji [107]. Najczęściej stosowanym lekiem z tej grupy jest octan medroksyprogesteronu [41, 96]. Podaż leku można rozpocząć od 10 mg/dobę w dwóch lub trzech dawkach [54]. Inną formą leku jest postać depot –150 mg co 3 miesiące domięśniowo [89]. Z innych preparatów wymienić można linestrenol (Oragmetril) w dawce 5-15 mg/dobę, noretysteron (Primolut-N) 5-10 mg/dobę, dydrogesteron (Duphaston) 10-20 mg/dobę czy chlormadynon 2-6 mg/dobę [81]. Stosuje się także lewonorgestrel w formie wkładki wewnątrzmacicznej. Ta forma terapii w znakomity sposób zwalcza ból związany z endometriozą. Główne powikłania leczenia gestagenami to nieregularne krwawienia i plamienia, trądzik, wzrost masy ciała czy skłonność do nastrojów depresyjnych [8].

Jak wynika z powyższych informacji, znane i sprawdzone leki stosowane w leczeniu endometriozy nie przynoszą pełnych i trwałych efektów, a związane z ich stosowaniem skutki uboczne mają istotny wpływ obniżający komfort życia leczonych

pacjentek. Z tego względu wciąż poszukuje się nowych form leczenia gruczolistości. W miarę poznawania kolejnych aspektów związanych z etiopatogenezą choroby, pojawiają się nowe kierunki leczenia. Obecnie najwięcej uwagi wśród badanych form terapii przypisuje się inhibitorom aromatazy, inhibitorom TNF- α oraz selektywnym modulatorom receptora progesteronowego [6].

Inhibitory aromatazy (IA) mogą okazać się szansą leczenia ektopowych ognisk endometriozy odpornej na leczenie analogami GnRH. Wykazano, że ektopowe endometrium wykazuje pewien rodzaj autonomii -niezależnej od osi podwzgórze-przysadka-jajnik produkcji estrogenów. Powstają one za pośrednictwem aromatazy, poprzez konwersję produkowanego w nadnerczach androstendionu do estronu, z którego następnie przy udziale dehydrogenazy typu I produkowany jest estradiol. Wykazano, że zwiększona aktywność aromatazy wpływa znacząco na patogenezę wielu chorób estrogenozależnych, takich jak rak piersi, endometrioza, rak endometrium i mięśniaki macicy [3]. Zaobserwowano bardzo dużą aktywność aromatazy w torbielach endometrialnych i wszczepach endometrialnych na otrzewnej. Co więcej, najsilniejszym induktorem aktywności aromatazy jest prostaglandyna PGE2, której synteza jest silnie stymulowana przez estradiol. W ten sposób ektopowa tkanka endometrialna posiada pewną autonomię, którą tłumaczy się oporność niektórych pacjentek na leczenie analogami GnRH, antykoncepcją hormonalną czy Danazolem. Inhibitory aromatazy działają więc poprzez hamowanie wytwarzania estrogenów w ogniskach endometriozy, ale również w jajniku i na obwodzie, w tkance tłuszczowej [54]. Pierwsze pojedyncze doniesienia o stosowaniu inhibitorów aromatazy pojawiły się w 1998 roku, jednak randomizowane badanie opublikowano w 2004 roku. Dotyczyło ono stosowania anastrozolu wraz z analogami GnRH w grupie pacjentek po laparoskopii z powodu endometriozy. W drugiej grupie stosowano same analogi. Wśród kobiet leczonych dodatkowo inhibitorami aromatazy wykazano znacznie efektywniejszą i dłuższą remisję choroby po operacji [94].

Wiadomo, że inhibitory aromatazy podwyższają stężenie FSH z następującą stymulacją jajników. Dlatego właśnie Attar i Bulun w swoich wnioskach dotyczących oceny badań związanych z zastosowaniem IA w endometriozie zalecili łączenie tych leków u kobiet przed menopauzą z analogami GnRH, progestagenami lub antykoncepcją doustną celem supresji czynności jajników. Według badaczy obserwacje kliniczne pozwalają wysnuć również inne wnioski. Zgodnie z nimi można zalecić IA w terapii bólu opornego na inne leczenie, są to leki z wyboru w przewlekłej endometriozie

u kobiet po menopauzie. Zaletą tej grupy leków jest również fakt, że terapii towarzyszą stosunkowo nieliczne skutki uboczne, a przede wszystkim brak znacząco niekorzystnego wpływu na gęstość mineralną kości [3]. Znane są dwa typy inhibitorów: kompetencyjne, anastrozol i letrozol oraz inaktywator -eksemestan. Należy jednak pamiętać, że łączne stosowanie analogów GnRH i inhibitorów aromatazy jest terapią bardzo kosztowną.

Kolejną grupą leków, z którą wiąże się duże nadzieje w związku z leczeniem endometriozy, są inhibitory TNF- α . Jak opisano wcześniej, jest to cytokina nadmiernie produkowana u kobiet z gruczolistością, stymulująca adhezję komórek endometrialnych do mesotelium i pobudzającą ich proliferację. Inne działania TNF- α opisano powyżej. W badaniach na pawianach wykryto, że dodanie białka wiążącego TNF do złuszczonego się endometrium przed wprowadzeniem go do jamy otrzewnowej zmniejszało szansę powstawania ognisk endometriozy [17]. Próbowano podjęcia leczenia pentoksyfiliną. W badaniach Balascha jej zastosowanie u chorych po laparoskopii z I i II stopniem zaawansowania choroby wydawało się obiecujące, skutkując większym odsetkiem ciąż wśród pacjentek. Jednak późniejsze badania u kobiet z gruczolistością III i IV stopnia nie wykazały już tak korzystnych efektów. Pewne nadzieje wiąże się z innymi lekami tej grupy, jak etanercept stosowany w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów oraz onercept i infliksymab [96].

W sferze badań doświadczalnych pozostają również antyprogestageny, np. mifepriston (RU 486), onapriston czy ZK 136799. Mifepriston podawany w dawce 50-100 mg/d skutecznie redukuje ból związany z endometriozą [81]. Terapia lekiem nie jest jednak powszechna, ograniczenie spowodowane jest między innymi faktem stosowania go w terminacji ciąży. Alternatywą mogą okazać się selektywne modulatory receptora progesteronowego (SPRM), związki o zmiennym działaniu na receptor w zależności od lokalizacji tkanki docelowej. Wywołują one supresję wzrostu tkanki endometrium i kontrolują miejscową produkcję prostaglandyn [6]. Znany lekiem opisanej grupy jest asoprisnil. Uważa się, że dzięki tym lekom można ominąć ogólnoustrojowe działanie progestagenów, jak zatrzymywanie wody w organizmie, depresja czy tkliwość piersi [81]. Wydaje się, że wysoką efektywność w leczeniu endometriozy reprezentują również antagoniści GnRH. Leki te nie powodują pierwotnej stymulacji czynności jajników jak analogi GnRH, są lepiej tolerowane przez pacjentki [81].

Wciąż badane są również inne grupy leków, jak inhibitory angiogenezy (endostatyna, inhibitory VEGF), inhibitory metaloproteinaz tkankowych (marimastat, prinomastat, tanomastat, ONO-4817), agoniści receptora estrogenowego β , selektywne modulatory receptora estrogenowego (SERM) oraz statyny i inne.

2.8.2. LECZENIE CHIRURGICZNE

Leczenie operacyjne wskazane jest w przypadku wszystkich pacjentek starających się o ciążę, pacjentek z torbielami endometrialnymi oraz u tych, u których leczenie farmakologiczne nie przyniosło efektu. Preferowaną formą leczniczą jest laparoscopia. Zaleca się, aby wdrożono ją po minimum 3 miesiącach po odstawieniu leczenia hormonalnego, aby uniknąć „maskowania” objawów [49]. W przypadku endometriozy otrzewnowej zniszczenie ognisk można osiągnąć w wyniku ablacji laserowej, koagulacji diatermią chirurgiczną oraz resekcji na ostro [44]. Trwają dyskusje na temat porównania skuteczności resekcji i ablacji ognisk. Wielu operatorów uznaje za skuteczniejszą resekcję z następową koagulacją krwawiących miejsc. Jednak tego roku opublikowano obszernie, randomizowane badanie przeprowadzone w grupie 335 pacjentek. Część z nich leczono z powodu endometriozy poprzez resekcję ognisk, a część –za pomocą ablacji. Następnie przy użyciu specjalnej skali bólu oceniano stopień nawrotu objawów choroby w czasie do 12 miesięcy od leczenia operacyjnego. Okazało się, że w obydwu grupach stopień nasilenia dolegliwości i odsetek ich pojawiania się po leczeniu operacyjnym były porównywalne [37]. Można wysnuć zatem wniosek, że rodzaj zastosowanej techniki zależy tak naprawdę od preferencji i doświadczenia oraz dostępności różnego sprzętu.

W razie nawrotu dolegliwości po leczeniu laparoskopowym zaleca się rozważenie leczenia hormonalnego. Ponowny zabieg powinno się wykonać jedynie u pacjentek opornych na postępowanie farmakologiczne [44].

W przypadku torbieli endometrialnych z reguły postępowanie chirurgiczne jest metodą z wyboru. W obszernych badaniach potwierdzono wyższą efektywność wyluszczenia torbieli wraz z torebką w porównaniu z drenażem i następową ablacją torbieli [36, 91].

Koagulacja lub laserowa waporyzacja torbieli wiąże się z wyższym ryzykiem nawrotów zmian w porównaniu z ich wyluszczeniem. Ponadto wyluszczenie zmian o średnicy powyżej 4 cm wiąże się z uzyskaniem lepszych wyników płodności w

porównaniu z drenażem i ablacją [49]. Właśnie w grupie pacjentek z torbielami, leczonych z powodu niepłodności, postępowanie musi być bardzo ostrożnie wyważone. Coraz częściej wskazuje się na leczenie operacyjne jako czynnik mogący obniżyć rezerwę jajnikową. Dlatego należy dokładnie rozważyć sens operacyjnego leczenia małych zmian, których wyłuszczenie prawdopodobnie nie wpłynęłoby w znaczącym stopniu na poprawę płodności, a z drugiej strony -zmniejszyłoby objętość tkanki jajnikowej. Niektóre dane z piśmiennictwa potwierdzają, że po obustronnym wyłuszczeniu torbieli odpowiedź jajników na stymulację gonadotropinami w trakcie stosowania technik wspomaganego rozrodu jest słabsza [57].

Nawroty torbieli endometrialnych, w zależności od zastosowanej techniki, pojawiają się u 6,4-18,4 % pacjentek [44]. Dlatego zaleca się pooperacyjną terapię farmakologiczną, aby zmniejszyć nasilenie i opóźnić nawrót dolegliwości bólowych w obrębie miednicy mniejszej. Według wytycznych ESHRE proponuje się leczenie Danazolem lub agonistami GnRH przez okres 6 miesięcy po operacji endometriozy. Wykazano, że terapia antykoncepcją doustną nie przynosi opisanych powyżej efektów [49].

Uważa się, że pozytywny wynik histopatologii potwierdza endometriozę, ale wynik negatywny – wcale jej nie wyklucza. Badanie histopatologiczne powinno być wdrożone zawsze w przypadku torbieli endometrialnych o średnicy powyżej 3 cm oraz w przypadku głębokiej, naciekającej endometriozy, aby wykluczyć zmiany o charakterze rozrostu złośliwego [49].

Głęboka endometrioza może być zlokalizowana w okolicy więzadeł krzyżowo-maciczkowych, zagłębienia odbytniczo-macicznego, pochwy, odbytnicy i pęcherza moczowego. W przypadku lokalizacji pęcherzowej i więzadłowej laparoscopia okazała się być skuteczną metodą. W przypadku endometriozy jelitowej leczenie laparoskopowe jest skuteczne przy naciekaniu błony surowiczej, bez zajęcia błony mięśniowej. Aby doprowadzić do zmniejszenia ognisk endometriozy i ich unaczynienia, warto zastosować przed leczeniem operacyjnym głębokiej endometriozy leczenie farmakologiczne [44]. Jednak wieloletnie doświadczenia z naszego szpitala wskazują brak efektu farmakoterapii w leczeniu głębokiej, naciekającej endometriozy. Jedynym, w pełni skutecznym, sposobem leczenia tej formy endometriozy jest częściowa lub odcinkowa resekcja odbytnicy. Jednak terapia ta łączy się ze znacznym ryzykiem powikłań zarówno śród- jak i pooperacyjnych.

W przypadku operacyjnego leczenia endometriozy związanej z bólem istnieje wiele kontrowersji. Znane dwie metody denerwacji macicy nie przyniosły oczekiwanych efektów. W ostatnim randomizowanym badaniu przeprowadzonym w Wielkiej Brytanii oceniono skuteczność LUNA – laparoscopic uterosacral nerve ablation. Oceniano dolegliwości bólowe po przeprowadzonych operacjach w grupie 487 kobiet leczonych z powodu dolegliwości bólowych miednicy mniejszej w latach 1998-2005. Nie zaobserwowano istotnych różnic w zwalczeniu dolegliwości związanych z bolesnymi miesiączkami, dyspareunią oraz poprawy jakości życia pomiędzy pacjentkami leczonymi techniką LUNA oraz klasyczną laparoskopią [16].

Nieco większe korzyści powinna przynieść laparoskopowa neurektomia przedkrzyżowa (LPSN- laparoscopic presacral neurectomy). Wiele doniesień wskazuje na znaczną skuteczność w zniesieniu dolegliwości bólowych leczonych techniką neurektomii. Jest to jednak zabieg trudny technicznie do wykonania, wymagający znacznej wprawy operatora. Zabieg niesie ze sobą niestety również poważne powikłania związane z odnerwieniem odbytnicy i pęcherza moczowego. Sposobem na przedłużenie okresu remisji dolegliwości bólowych jest pooperacyjne włączenie leczenia farmakologicznego, np. analogów GnRH lub progestagenów, również wewnątrzmacicznej wkładki uwalniającej lewonorgestrel (Mirena) [114].

Dopóki nie zostanie ostatecznie wyjaśniona etiopatogeneza endometriozy, trwać będą poszukiwania nowych, skuteczniejszych leków. Na razie wiadomo, że choroba ma podłoże wieloczynnikowe - stąd różnorakie kierunki poszukiwań dotyczących możliwości jej zapobiegania i leczenia. Wiele z nich ma wciąż charakter eksperymentalny, wymagający poszerzenia badań dotyczących mechanizmów i zakresu działania. Od kilku lat trwają badania nad preparatem złożonym z kilkudziesięciu składników imitujących antygeny tkankowe, uzyskanych między innymi z endometrium, z ognisk endometriozy, z mięśniaków oraz z białek CA-125, CA 15-3. Został on przebadany przez dr Ovsienko w ośrodku w Witebsku (Białoruś). W projekcie badawczym wzięły udział 22 pacjentki, z których 12 chorowało na endometriozę, 10 na endometriozę i mięśniaki macicy, a u dwóch stwierdzono torbiele jajników. Pacjentki poddano szczepieniu preparatem RESAN. Po upływie miesiąca zaobserwowano istotny spadek nasilenia dolegliwości bólowych związanych z miesiączkami, współżyciem płciowym, dolegliwościami międzymiesiączkowymi. Ponadto stwierdzono istotne statystycznie zmniejszenie objętości torbieli oraz całkowitą regresję zmian o

charakterze mięśniaków wśród 7 z 10 chorych kobiet. Udokumentowano również istotne obniżenie poziomu markerów nowotworowych w surowicy badanych pacjentek: CA-125, CA-19-9, CA-15-3 i CEA ($p < 0,05$).

Zespół badawczy prof. Ovsienko podkreśla również, że preparat RESAN wpływa na aktywację odpowiedzi komórkowej poprzez podwyższanie poziomu TNF- α i IFN- γ oraz doprowadza do stałego i długotrwałego podwyższania aktywności cytotoksycznej CD-56 pozytywnych limfocytów. W przypadkach osiągnięcia całkowitego zniszczenia zmian nie dochodzi do nawrotów choroby, ponieważ w systemie immunologicznym kształtuje się prawdopodobnie pamięć immunologiczna [113].

Powyższe doniesienia mogą świadczyć o skuteczności preparatu RESAN. Badana grupa pacjentek jest jednak zbyt mała i niejednorodna, aby dostarczyć szerszych i wyczerpujących informacji na temat mechanizmu i zakresu działania substancji. Kolejną próbę opisanie skuteczności RESAN w leczeniu i zapobieganiu endometriozy na modelu zwierzęcym podjęto w ostatnich latach w naszym ośrodku, potwierdzając, że preparat RESAN korzystnie wpływa na profilaktykę endometriozy u szczurów oraz wraz z postępowaniem chirurgicznym skutecznie redukuje objętość i liczbę ognisk endometriozy otrzewnowej [98].

Wobec przedstawionych publikacji interesująca wydała się kwestia wyjaśnienia mechanizmu działania preparatu RESAN, zwłaszcza w kontekście jego wpływu na odpowiedź komórkową w przebiegu endometriozy. Z tego powodu uzasadnione wydało mi się podjęcie tego tematu w mojej pracy doktorskiej.

3. CEL PRACY

Celem pracy jest ocena wpływu preparatu RESAN na odpowiedź immunologiczną typu Th 1 i Th 2 w badaniu eksperymentalnym na modelu zwierzęcym.

4. MATERIAŁ

Materiał do badań stanowiła surowica otrzymana z krwi pobranej podczas kolejnych czterech etapów doświadczenia od 58 dojrzałych szczurzyk szczepu Wistar.

Na przeprowadzenie doświadczenia uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu w dniu 24 kwietnia 2006, uchwałą nr 20/2006. Doświadczenie było przeprowadzane zgodnie z zaleceniami Ministerstwa Edukacji i Szkolnictwa Wyższego z 1959 r. oraz Światowej Deklaracji UNESCO odnośnie praw zwierząt z 1978 roku.

Zwierzęta przechowywano w plastikowych klatkach w pomieszczeniach Katedry i Zakładu Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu przy ul. Dojazd 33. Wszystkie szczurzyce karmiono paszą o stałym składzie – zawierającą 24% białka. W pomieszczeniach panowała stała temperatura i wilgotność, zwierzęta miały stały dostęp do paszy i wody pitnej. Po zakończeniu doświadczenia materiał biologiczny przekazano firmie PHUT „Ultex” w Luboniu

Podczas kolejnych etapów eksperymentu (przeszczepienie ektopowe eutopowego endometrium, leczenie endometriozy i kontrolna laparotomia) pobierano krew z ogona zwierząt w ilości 2 ml do próbek ze środkiem przeciwkrzepliwym (wersenian sodu), którą następnie odwirowano, a uzyskaną surowicę przechowywano w temp. ok. -70° C w chłodni w pomieszczeniach Pracowni Biochemii Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego w Poznaniu.

Badania sfinansowano ze środków KBN nr NN 404154134.

5. METODYKA

5.1. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Dojrzałe płciowo szczurzyce w wieku 4 miesięcy podzielono na trzy grupy - dwie po 24 szczurzyce i jedną w składzie 10 zwierząt. Grupę pierwszą (I) poddano profilaktycznemu działaniu preparatu RESAN, grupę drugą (II)- działaniu leczniczemu, a ostatnie 10 szczurów stanowiło grupę kontrolną (III).

Preparat RESAN jest substancją zawierającą w swoim składzie kompleksy molekuł pozyskanych z ksenogenicznych białek zwierzęcych (*Gallus domesticus*). Są to między innymi glikoproteiny (frakcja $\alpha 2\beta$), peptydy i węglowodanowe fragmenty ponad 40 różnych antygenów nowotworowych. Glikoproteiny imitują 6-50 fragmentów (długości 7-30 aminokwasów) każdego antygeny. Preparat występuje w formie proszku krystalicznego w ilości 200mg. W celu podania proszek uzupełnia się 0,9% solą fizjologiczną do objętości 1 ml. Szczegółowy skład preparatu chroniony jest patentem RB nr 542883 [103].

Całość części doświadczalnej badania rozłożono na cztery etapy. W pierwszym z nich grupę 24 szczurzyce poddano szczepieniu preparatem RESAN celem uzyskania działania profilaktycznego. Preparat w zalecanej objętości i po przygotowaniu według zaleceń producenta, podano w połowie podskórnie w okolicę brzucha, a połowę w okolicę mięśnia pośladkowego. Od każdej ze szczurzyce pobrano próbkę 2 ml krwi, którą po odwirowaniu zamrożono w temperaturze -70°C . Krew pobierano z ogona.

Kolejny- II etap doświadczenia miał miejsce po trzech miesiącach- przeprowadzono operacyjne wszczepienie fragmentu błony śluzowej macicy (autologicznego) do jamy otrzewnej. Operacje wykonano u 24 szczurzyce, którym 3 miesiące wcześniej podano profilaktycznie RESAN oraz u 24 zwierząt wcześniej nie szczepionych preparatem. Proces miał miejsce w warunkach czystych, lecz niezupełnie sterylnych, przy użyciu metod mikrochirurgicznych. Po ogoleniu skóry brzucha i przemyciu go roztworem hibitanu, nacinano jamę brzuszną w linii pośrodkowej, na odcinku około 4cm. Następnie uwidaczniano prawy róg macicy i po podwiązaniu naczyń macicznych resekowano 3cm fragment rogu macicy. Macicę zaopatrywano szwami hemostatycznymi. Z części wyciętego fragmentu macicy, po umieszczeniu go w roztworze soli fizjologicznej, oddzielano część mięśniową od błony śluzowej. Uzyskany fragment endometrium o wymiarach 4 na 4 mm naszywano na otrzewną ścienną po prawej stronie jamy brzusznej za pomocą szwów nylonowych 6-0.

Do znieczulenia używano pentobarbitalu podawanego dootrzewnowo. Jamy brzuszne szczurzyce zamknięto szwem ciągłym z użyciem nici Dexon 1-0. Przed operacją we wszystkich grupach szczurzyce pobrano krew w objętości 2 ml, którą podobnie jak w poprzednim etapie, odwirowano i zamrożono.

W pozostałej grupie 10 szczurów (grupa III, kontrolna), w analogicznych warunkach dokonano jedynie uwidocznienia i nacięcia prawego rogu macicy, który następnie zaopatrywano szwem hemostatycznym. Na otrzewną ścienną po prawej stronie zakładano szew nylonowy 6-0, analogicznie do szczurzyce z wszczepionym endometrium. Krew pobierano analogicznie z ogona, bezpośrednio po wykonaniu znieczulenia, przed operacją.

Po upływie kolejnych 12 tygodni przeprowadzono III etap doświadczenia. We wszystkich grupach zwierząt wykonano laparotomie zwiadowcze, podczas których identyfikowano ogniska endometriozy, szczegółowo je opisując, z uwzględnieniem dokumentacji fotograficznej. W grupach I i II, po uwolnieniu ewentualnych zrostów, wykonano wycięcie wszystkich zmian podejrzanych o endometriozę. Następnie

uwidoczniono i wycięto fragment lewego rogu macicy, po wcześniejszym podwiązaniu naczyń macicznych. Jamę brzuszną zamknięto szwem ciągłym 1-0 (Dexon). Podczas wszystkich etapów zastosowano techniki mikrochirurgiczne. Następnie 24 szczurzycom z II podgrupy podano RESAN w sposób opisany przy I etapie. Wszystkim zwierzętom pobrano krew jak w poprzednich etapach doświadczenia.

Po kolejnych trzech miesiącach, podczas IV - ostatniego etapu doświadczenia, przeprowadzono trzecią laparotomię u wszystkich zwierząt, podczas której ponownie identyfikowano możliwe ogniska endometriozy i zrosty, pobierając je do badania histologicznego. Analogicznie do poprzednich etapów, zwierzętom pobrano krew. Podczas opisanego etapu w grupie I oceniano tylko te zwierzęta, u których wcześniej rozpoznano makroskopowo cechy endometriozy (n=5).

W części doświadczalnej doszło do straty dwóch zwierząt - jednego z powodu krwawienia pooperacyjnego w dwa dni po drugiej operacji (I grupa), drugiego wskutek rozejścia i zakażenia rany pooperacyjnej w dzień po pierwszej operacji (II grupa).

Wszystkie pobrane fragmenty ognisk endometriozy utrwalono w 4% zbuforowanej formalinie, skrojono na mikrotomie, następnie typowo wykonano barwienie hematoksyliną i eozyną. Ocenę histologiczną w mikroskopie świetlnym wykonano w "sposób ślepy", tzn. osoba oceniająca nie знаła wyniku oceny makroskopowej oraz nie wiedziała, z której grupy pochodzi szczur. W badaniu poszukiwano obecności gruczołów endometrialnych oraz elementów podścieliska endometrium z makrofagami obładowanymi hemosyderyną. Wszystkie preparaty skonsultowano z drugim histopatologiem.

Za kryterium rozpoznania endometriozy w ocenie makroskopowej przyjęto występowanie jednej i więcej z wymienionych poniżej cech: obecność pęcherzyków (torbielek) wypełnionych przezroczystą treścią płynną i/lub obecność cienkich zrostów wokół wszczepu i/lub wyraźnie wzmożony rysunek naczyniowy pod postacią ogniska przekrwienia na otrzewnej ściennej jamy brzusznej.

Uzyskane podczas poszczególnych etapów doświadczenia fragmenty macicy zabezpieczano do innych, równoległych gałęzi eksperymentu.

5.2. CZĘŚĆ LABORATORYJNA

Pobraną surowicę poddano badaniu cytometrii przepływowej celem oceny

ilościowej wybranych cytokin: IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α i INF- γ oraz badaniu immunoenzymatycznemu ELISA celem oceny stężenia poziomu prokalcytoniny szczurzej. Na podstawie oceny stężeń cytokin analizowano ewentualną przewagę odpowiedzi komórkowej typu Th1 lub Th 2 w poszczególnych grupach szczurów podczas różnych etapów doświadczenia. Z kolei prokalcytonina szczurza, jako marker odpowiedzi zapalnej, analizowana była pod kątem stanu zapalnego wywołanego przeprowadzonymi operacjami. Wszystkie oznaczenia wykonano w Katedrze Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

5.2.1. Pomiar cytokin z zastosowaniem cytometrii przepływowej

W badaniach nad oceną stężenia cytokin szczurzych wykorzystano odczynniki firmy Becton Dickinson (USA). Wszystkie próbki surowicy szczurzej przechowywano w tych samych warunkach w temperaturze -70 °C. Mieszaninę *capture beads* oraz standardy do pomiaru cytometrycznego przygotowano ściśle według zaleceń producenta. Do dziesięciu probówek kontrolnych dodano po 50 μ l przygotowanych wcześniej standardów w stężeniach rosnących 0 pg/mL, 10 pg/ml, 20 pg/ml, 40 pg/ml, 80 pg/ml, 156 pg/ml, 312 pg/ml, 625 pg/ml, 1250 pg/ml, 2500 pg/ml i 500 pg/ml. W pozostałych probówkach umieszczono po 50 μ L surowicy szczurzej. Następnie do wszystkich probówek dodano po 50 μ L mieszaniny *capture beads* oraz 50 μ L zawiesiny przeciwciała detekcyjnego sprzężonego z fikoerytryną. Tak przygotowane próbki inkubowano w temperaturze pokojowej, w ciemności przez okres 3 godzin. Następnie dodano do wszystkich próbek po 100 μ l buforu (*Wash Buffer*) i odwirowano przy prędkości 200g. Po odwirowaniu próbek oddzielono supernatant, a pelet zawieszono w 300 μ L buforu (*Wash Buffer*). Przygotowane w ten sposób próbki poddano analizie cytometrycznej z wykorzystaniem cytometru FACScan (*BD Biosciences, USA*) oraz specjalistycznego oprogramowania FCAP Array Software (*Soft Flow Hungary Ltd. dla BD Biosciences*). Stężenia poszczególnych cytokin były automatycznie przeliczane względem odpowiednich krzywych standardowych.

5.2.2. Ocena stężenia prokalcytoniny z zastosowaniem metody ELISA

W oznaczeniu prokalcytoniny szczurzej zastosowano odczynniki firmy USCNLIFE (Chiny). Wszystkie procedury wykonano zgodnie z zaleceniami producenta. Próbki badawcze i kontrolne oznaczono podwójnie. Substancję standardową uszeregowano w rozcieńczeniach od 15,6 do 1000 pg/ml. Do każdego dołka dodano 100 μ l substancji standardowej i badanej, inkubując 2 godziny w

temperaturze pokojowej. Po usunięciu płynu z każdej studzienki, dodano 100 µl znacznika A. Ponownie inkubowano próbki w temperaturze pokojowej przez godzinę. Następnie próbki przepłukano 400 µl substancji buforującej. Dodano znacznik B i po godzinnej inkubacji oraz pięciokrotnym przepłukaniu próbek dodano 90 µg substratu, a następnie 50 µl czynnika blokującego. Po 10 minutach wykonano odczyt spektrofotometryczny (aparatury Hyperion Micro Reader III) z zastosowaniem fali długości 450 nm.

5.2.3. Metody statystyczne

Oznaczenia stężenia wybranych cytokin i prokalcytoniny opisano średnią arytmetyczną i odchyleniem standardowym, medianą, pomiarem maksymalnym i minimalnym oraz dolnym i górnym kwartylem. 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 doświadczenia, 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 eksperymentu, zastosowano test Wilcoxon. Gdy porównywano trzy lub cztery etapy- zastosowano test Friedmana z testami wielokrotnych porównań Dunna.

W stosowanych testach przyjęto poziom istotności $p=0,05$.

Do obliczeń wykorzystano pakiet statystyczny StatSoft, Inc. (2009). STATISTICA (data analysis software system), v9.0.

6. WYNIKI

1. Charakterystyka grup

I grupa – 24 szczurzyce, u których zastosowano RESAN w formie profilaktycznej, po 3 miesiącach wszczepiono ektopowe endometrium; po upływie kolejnych 3 i 6 miesięcy wykonano relaparotomię z identyfikacją i wycięciem ognisk endometriozy.

II grupa – 24 szczurzyce, którym wszczepiono ektopowe endometrium, po kolejnych 3 miesiącach wykonano operacje identyfikacji i wycięcia

endometriozy z jednoczesnym podaniem preparatu RESAN w formie leczniczej; po upływie następnym 3 miesięcy wykonano kolejne relaparotomie z oceną ognisk endometriozy.

III grupa – 10 szczurzy, u których nie zastosowano preparatu RESAN. Wykonano tzw. sham operations, a po upływie 3 miesięcy wykonano relaparotomie z identyfikacją ognisk endometriozy.

2. Charakterystyka etapów części doświadczalnej

I etap : profilaktyczne podanie preparatu RESAN grupie I

II etap : po 3 miesiącach laparotomie z wszczepieniem ektopowego endometrium w grupach I i II; operacje pozorowane w grupie III.

III etap: relaparotomie we wszystkich grupach z identyfikacją i wycięciem ognisk endometriozy. Podanie preparatu RESAN grupie II.

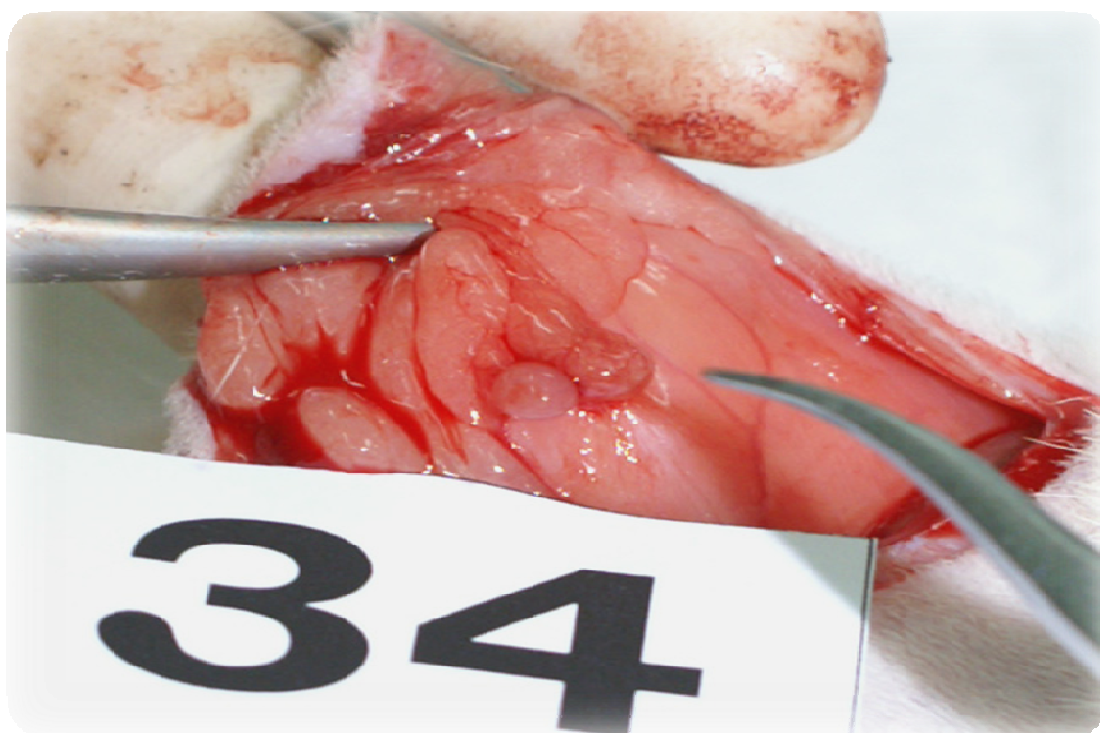
IV etap: relaparotomie we wszystkich grupach z identyfikacją i wycięciem ognisk endometriozy - ocena skuteczności leczenia.

Podczas III etapu endometriozę oceniono histologicznie pozytywnie odpowiednio u 4,3 % zwierząt w grupie I i u 69,6% z grupy II ($p < 0,0001$). W ocenie makroskopowej odsetki stwierdzanej endometriozy określono odpowiednio na 21,7% i 91,3% ($p < 0,0001$). Powyższe dane przedstawiono na ryc. 3. W trakcie IV etapu doświadczenia nie stwierdzono obecności endometriozy w badanych grupach, zarówno makroskopowo jak i w badaniu histologicznym.

Tab.1. Porównanie obecności endometriozy w badanych grupach

Metoda badawcza	GRUPA I (n=23)		GRUPA II (n=23)		GRUPA III (n=10)		p
	n	%	n	%	N	%	
Ocena makroskopowa	5	21,7	21	91,3	0	0	<0,0001
Ocena histologiczna	1	4,3	16	69,6	0	0	<0,0001

Ryc. III Obraz zmian o charakterze pęcherzyków w miejscu wszczepienia ektopowego endometrium.



Podczas drugiej laparotomii (III etap) obecność zrostów wewnątrztrzewnowych stwierdzono wśród 13% zwierząt w I grupie i 61% w II grupie. W grupie III nie stwierdzono obecności zrostów (ryc. 4). Podczas IV etapu doświadczenia zrosty zaobserwowano jedynie wśród trzech zwierząt z II grupy.

Tab.2. Makroskopowa ocena zrostów w poszczególnych grupach szczurów podczas III etapu doświadczenia

Metoda badawcza	GRUPA I (n=23)		GRUPA II (n=23)		GRUPA III (n=10)		<i>p</i>
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Ocena makroskopowa	3	13,0	14	61,0	0	0	<0,0009

Następnie poddano analizie laboratoryjnej pobraną od zwierząt krew celem oceny stężeń wykładników odpowiedzi komórkowej oraz wykładników stanu

zapalnego. Spośród cytokin prezentujących odpowiedź komórkową typu Th1 oceniano INF- γ i TNF- α . Natomiast z markerów odpowiedzi typu Th2 oceniono IL-4, IL-6 i IL-10. Jako marker stanu zapalnego we wszystkich grupach oznaczano prokalcytoninę.

Stężenia poszczególnych cytokin poddano analizie porównawczej pomiędzy poszczególnymi grupami oraz poszczególnymi etapami doświadczenia. Poniżej przedstawiono szczegółową statystykę, przy czym załączono tylko wybrane ryciny, przedstawiające otrzymane zależności statystyczne w obrębie grup.

6.1. INTERLEUKINA-4 (IL-4)

Poniżej przedstawiono statystyki opisowe stężenia IL-4 we wszystkich badanych grupach podczas kolejnych etapów doświadczenia.

Tab.3. Wartości średnie, mediana, wartości minimalne i maksymalne, kwartyle górne i dolne oraz odchylenie standardowe stężenia IL-4 w trzech grupach szczurów podczas poszczególnych etapów doświadczenia.

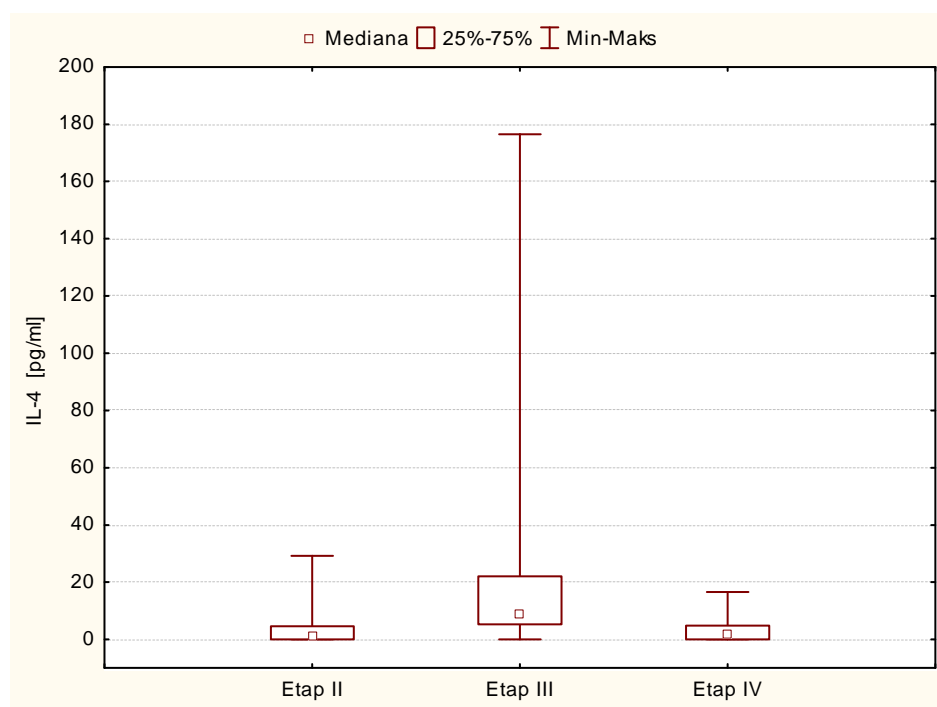
Zmienna	Grupa I Statystyki opisowe							
	N	Średnia	Mediana	Min.	Maks.	Kw.dolny	Kw.górny	Odch.std
IL-4 [pg/ml] I etap	24	0,530833	0,000000	0,00	4,63000	0,000000	0,000000	1,201596
IL-4 [pg/ml] II etap	23	0,715652	0,000000	0,00	5,17000	0,000000	0,000000	1,535678
IL-4 [pg/ml] III etap	23	2,224348	0,000000	0,00	12,88000	0,000000	4,130000	3,596193
IL-4 [pg/ml] IV etap	5	6,144000	5,420000	1,830000	10,18000	4,410000	8,880000	3,388086
	Grupa II Statystyki opisowe							
IL-4 [pg/ml] II etap	23	3,38652	1,150000	0,00	29,2300	0,000000	4,59000	6,38132
IL-4 [pg/ml] III etap	23	20,81391	8,590000	0,00	176,5100	5,250000	22,07000	36,50587
IL-4 [pg/ml] IV etap	23	3,27217	2,140000	0,00	16,6100	0,000000	4,80000	4,37242
	Grupa III Statystyki opisowe							
IL-4 [pg/ml] II etap	10	1,776000	0,000000	0,00	9,51000	0,00	2,82000	3,058134
IL-4 [pg/ml] III etap	10	7,037000	6,525000	0,00	22,07000	0,00	12,34000	7,576990

Porównując poziom IL-4 w I grupie szczurów podczas poszczególnych etapów doświadczenia, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). Z kolei

porównując poziom cytokiny w grupie II szczurów, stwierdzono istotny wzrost poziomu cytokiny podczas III etapu w porównaniu z II etapem, a więc po wszczepieniu ektopowego endometrium ($p < 0,01$). Zanotowano również istotny statystycznie spadek poziomu IL-4 porównując III i IV etap w II grupie, a więc po leczniczym zastosowaniu preparatu RESAN ($p < 0,01$).

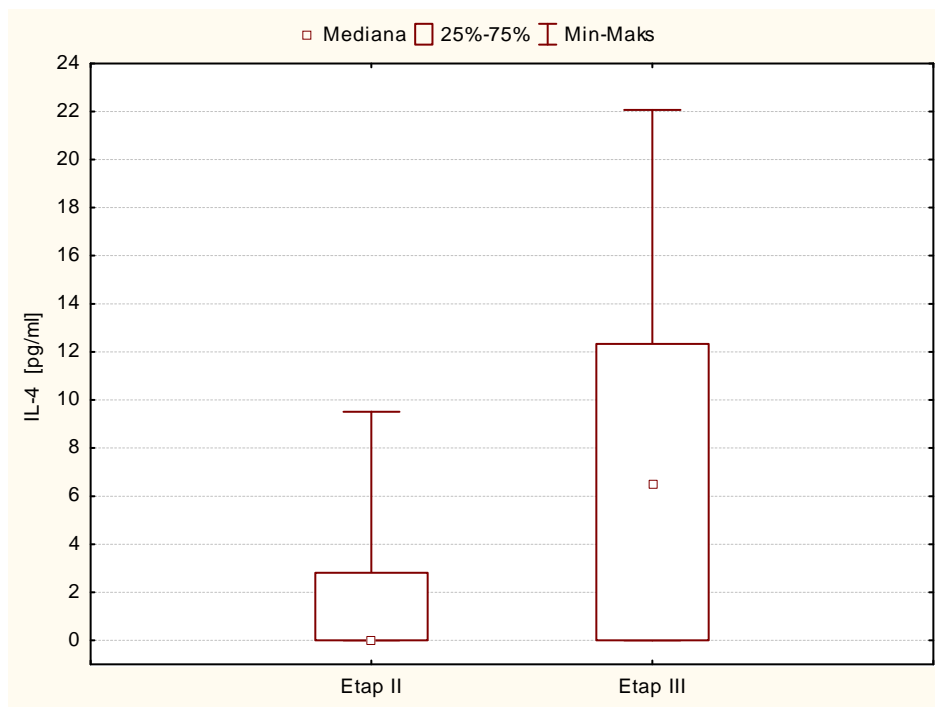
Poniżej przedstawiono wykres dla mediany IL-4 podczas trzech etapów doświadczenia w II grupie szczurów.

Ryc. IV Wartości mediany IL-4 w II grupie szczurów podczas poszczególnych etapów doświadczenia.



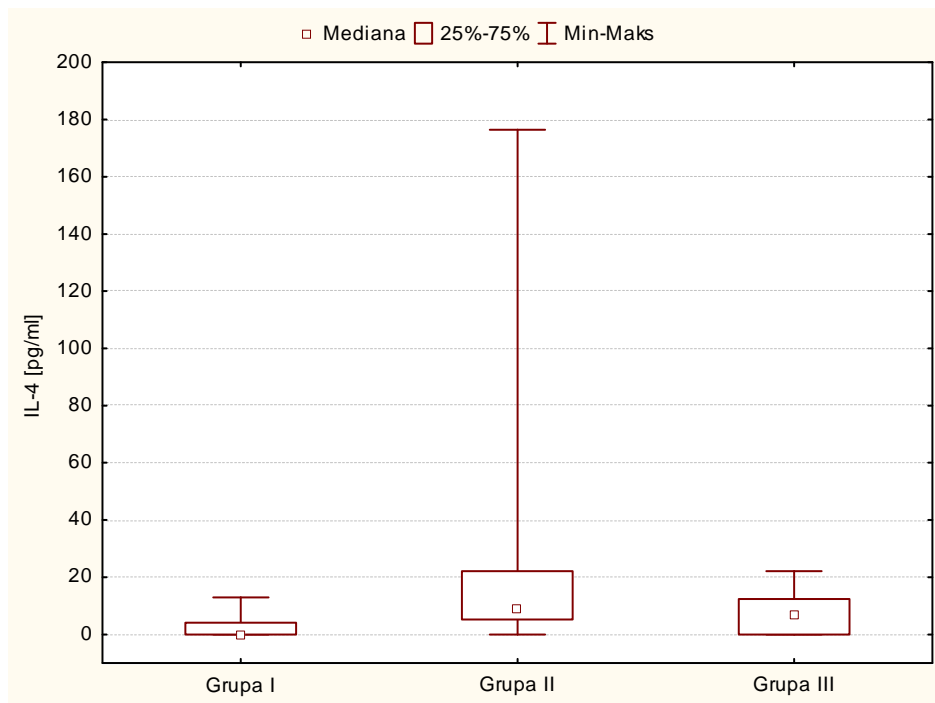
Analizując poziom cytokiny w III grupie szczurów podczas II i III etapu stwierdzono również istotny wzrost poziomu IL-4 w III etapie eksperymentu ($p = 0,049$). Poniżej przedstawiono wykres wartości mediany dla IL-4 w III grupie szczurów podczas opisywanych części badania.

Ryc. V Wartości mediany IL-4 w III grupie szczurów podczas poszczególnych etapów doświadczenia.



Porównując poziom IL-4 między grupami szczurów podczas kolejnych etapów eksperymentu nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy podczas etapu wszczepiania ektopowych fragmentów endometrium i Sham operations. Jednak już podczas III części eksperymentu, a więc podczas kontrolnych laparotomii po wszczepieniu ektopowego endometrium, zanotowano istotną różnicę między stężeniem IL-4 w surowicy szczurów z grupy I i II ($p=0,000424$). Poniżej przedstawiono wykres dla mediany IL-4 w trzech grupach szczurów podczas III etapu eksperymentu.

Ryc. VI Wartości mediany IL-4 w trzech grupach szczurów podczas III etapu doświadczenia.



Podczas ostatniej- IV części eksperymentu nie stwierdzono istotnych różnic w poziomie cytokiny między poszczególnymi grupami szczurów ($p > 0,05$).

6.2. INTERLEUKINA -6 (IL-6)

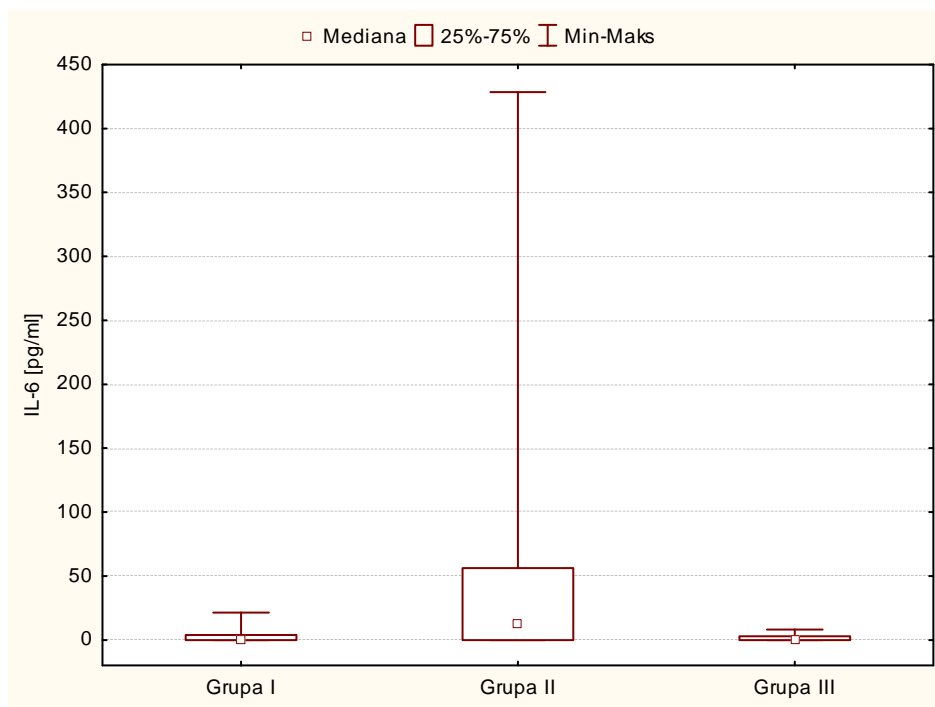
Poniżej przedstawiono statystyki opisowe wartości stężenia IL-6 we wszystkich grupach szczurów podczas kolejnych etapów doświadczenia.

Tab.4. Wartości średnie, mediana, wartości minimalne i maksymalne, kwartyle górne i dolne oraz odchylenie standardowe stężenia IL-6 w trzech grupach szczurów podczas poszczególnych etapów doświadczenia.

Zmienna	Grupa I Statystyki opisowe							
	N	Średnia	Mediana	Min.	Maks.	Kw.dolny	Kw.górny	Odch.std
IL-6 [pg/ml] I etap	24	1,61458	0,00000	0,00	12,71000	0,00000	0,00000	3,77678
IL-6 [pg/ml] II etap	23	4,76565	0,00000	0,00	26,65000	0,00000	10,10000	8,41209
IL-6 [pg/ml] III etap	23	2,56826	0,00000	0,00	21,55000	0,00000	3,94000	5,27459
IL-6 [pg/ml] IV etap	5	39,74600	46,73000	0,00	77,99000	17,70000	56,31000	31,03029
	Grupa II Statystyki opisowe							
IL-6 [pg/ml] II etap	23	16,48696	5,33000	0,00	66,7200	0,00	32,11000	19,9523
IL-6 [pg/ml] III etap	23	66,49217	12,76000	0,00	428,5300	0,00	56,31000	117,3207
IL-6 [pg/ml] IV etap	23	19,81174	15,85000	0,00	83,1000	0,00	27,72000	23,9710
	Grupa III Statystyki opisowe							
IL-6 [pg/ml] II etap	10	5,765000	2,465000	0,00	15,28000	0,00	12,23000	6,665687
IL-6 [pg/ml] III etap	10	1,667000	0,000000	0,00	8,25000	0,00	2,95000	2,960800

Porównując poziom IL-6 w I, II i III grupie szczurów podczas kolejnych etapów badań nie stwierdzono istotnych różnic statystycznych ($p > 0,05$). Widoczna jest jednak tendencja wzrostowa cytokiny w II grupie szczurów porównując II i III etap eksperymentu. Wykazano również różnicę w poziomie IL-6 pomiędzy I i II grupą podczas III etapu doświadczenia, a więc podczas relaparotomii zwiadowczej po wszczepieniu ektopowego endometrium ($p = 0,0102$). Poniżej przedstawiono wartości mediany w trzech grupach szczurów podczas III etapu doświadczenia.

Ryc. VII Wartości mediany IL-6 we wszystkich grupach szczurów podczas III fazy doświadczenia.



6.3. INTERLEUKINA- 10 (IL-10)

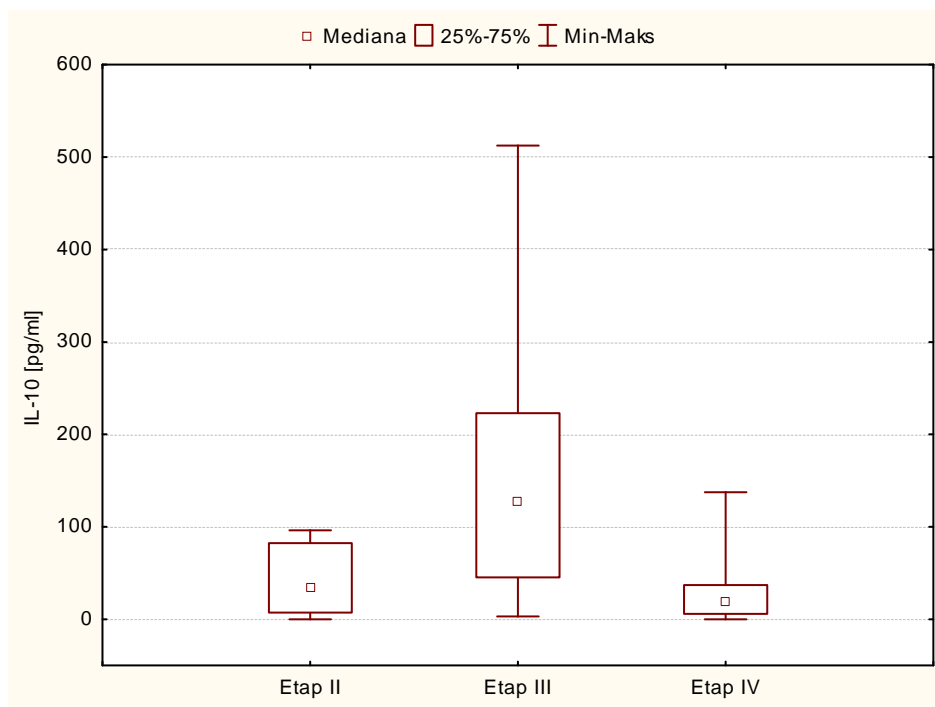
Poniżej przedstawiono wartości sty styki opisowe stężenia IL-10 we wszystkich grupach szczurów podczas kolejnych etapów doświadczenia.

Tab.5. Wartości średnie, mediana, wartości minimalne i maksymalne, kwartyle górne i dolne oraz odchylenie standardowe stężenia IL-10 w trzech grupach szczurów podczas poszczególnych etapów doświadczenia.

Zmienna	Grupa I Statystyki opisowe							
	N	Średnia	Mediana	Min.	Maks.	Kw.dolny	Kw.górny	Odch.std
IL-10 [pg/ml] I etap	24	10,91083	5,09500	0,00000	54,20000	0,00000	16,75000	15,57390
IL-10[pg/ml] II etap	23	11,26739	8,91000	0,00000	48,76000	3,83000	15,38000	11,84089
IL-10[pg/ml] III etap	23	25,37000	22,24000	0,00000	78,17000	0,00000	41,58000	25,89420
IL-10[pg/ml] IV etap	5	51,63400	42,26000	17,17000	86,03000	38,95000	73,76000	27,87996
	Grupa II Statystyki opisowe							
IL-10[pg/ml] II etap	23	40,5765	34,3300	0,000000	96,1500	7,28000	82,3000	35,3810
IL-10[pg/ml] III etap	23	163,5517	128,0000	3,140000	512,2300	45,40000	222,7900	139,0573
IL-10[pg/ml] IV etap	23	29,0939	18,9500	0,000000	137,4400	6,03000	36,9400	33,0626
	Grupa III Statystyki opisowe							
IL-10[pg/ml] II etap	10	11,11700	5,28500	0,00000	61,2800	0,00000	9,4300	18,92989
IL-10[pg/ml] III etap	10	62,99400	44,60000	15,00000	128,0000	25,00000	116,7400	46,53461

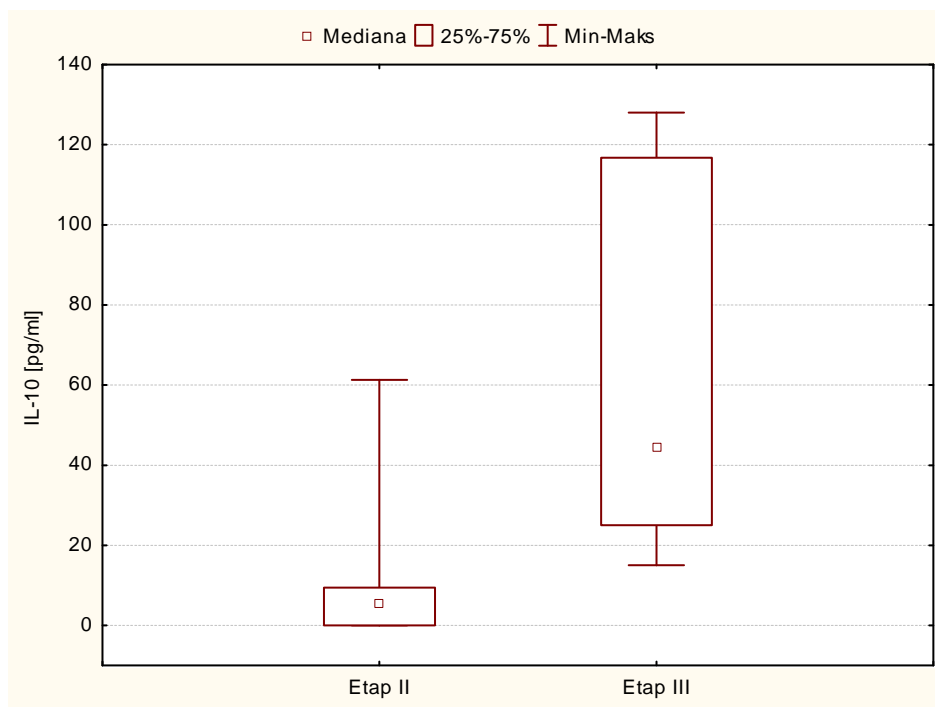
Analizując poziom stężenia IL-10 w I grupie szczurów nie zanotowano istotnych różnic podczas czterech etapów doświadczenia. W grupie II ustalono istotną statystycznie różnicę między II a III ($p < 0,01$) oraz III i IV etapem ($p < 0,01$). Poniżej przedstawiono wykres z wartościami mediany stężenia IL-10 w grupie II szczurów podczas poszczególnych etapów doświadczenia.

Ryc. VIII Wartości mediany stężenia IL-10 w II grupie szczurów podczas wszystkich etapów doświadczenia.



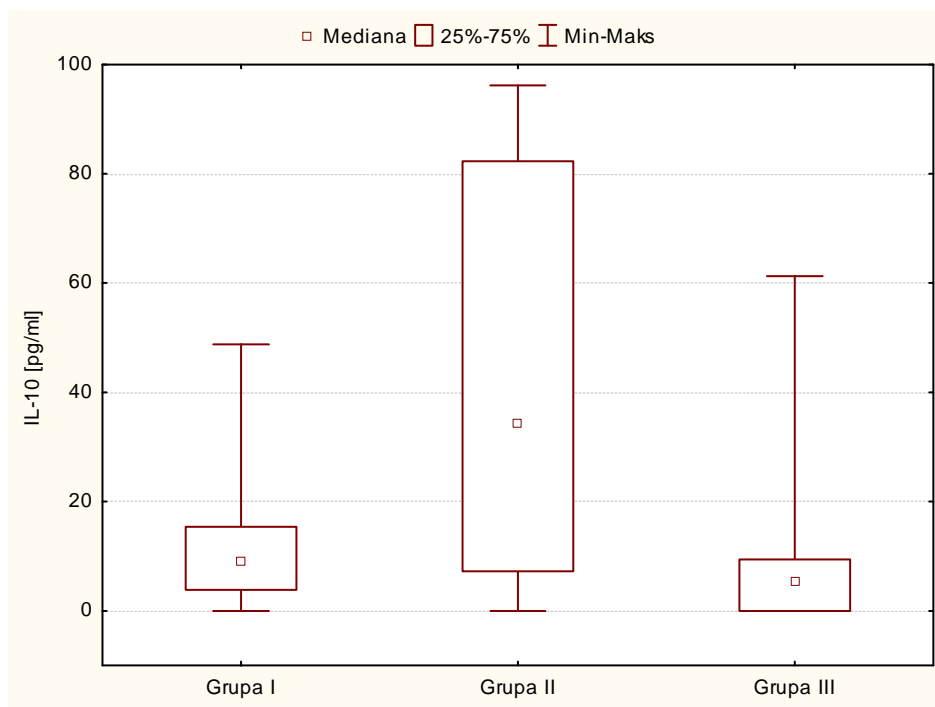
Porównując II i III etap badań w III grupie szczurów również zanotowano istotny statystycznie wzrost stężenia IL-10 ($p=0,012516$). Poniżej przedstawiono wartości mediany IL-10 w kontrolnej grupie.

Ryc. IX Wartości mediany stężenia IL-10 w III grupie szczurów podczas II i III etapu eksperymentu.



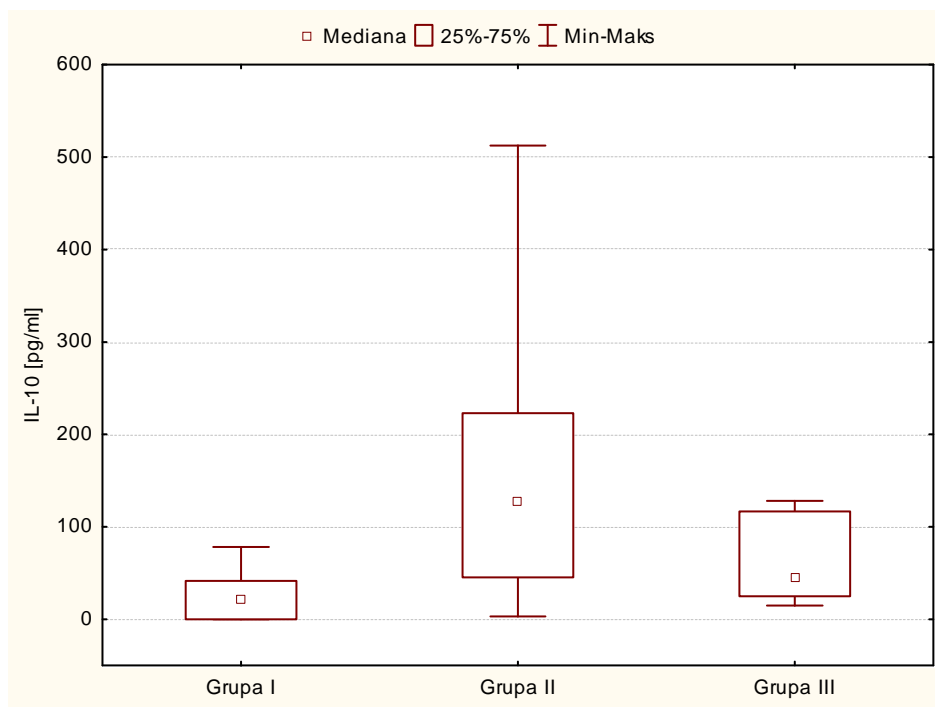
Porównując poziom cytokiny między poszczególnymi grupami podczas drugiego etapu doświadczenia zanotowano istotną różnicę między I a II grupą oraz między II a III (odpowiednio $p=0,021762$ oraz $p=0,014468$). Poniżej przedstawiono wartości mediany IL-10 w poszczególnych grupach podczas wspomnianego etapu doświadczenia.

Ryc. X Wartości mediany stężenia IL-10 we wszystkich grupach szczurów podczas II etapu doświadczenia.



Z kolei podczas analizy poziomu stężenia IL-10 w III etapie eksperymentu zanotowano różnicę między I i II grupą szczurów ($p=0,000018$). Poniżej przedstawiono wykres z wartościami mediany IL-10 w grupach szczurów w trakcie wspomnianego etapu badań.

Ryc. XI Wartości mediany stężenia IL-10 we wszystkich grupach szczurów podczas III etapu doświadczenia.



6.4. INTERFERON- γ (IFN- γ)

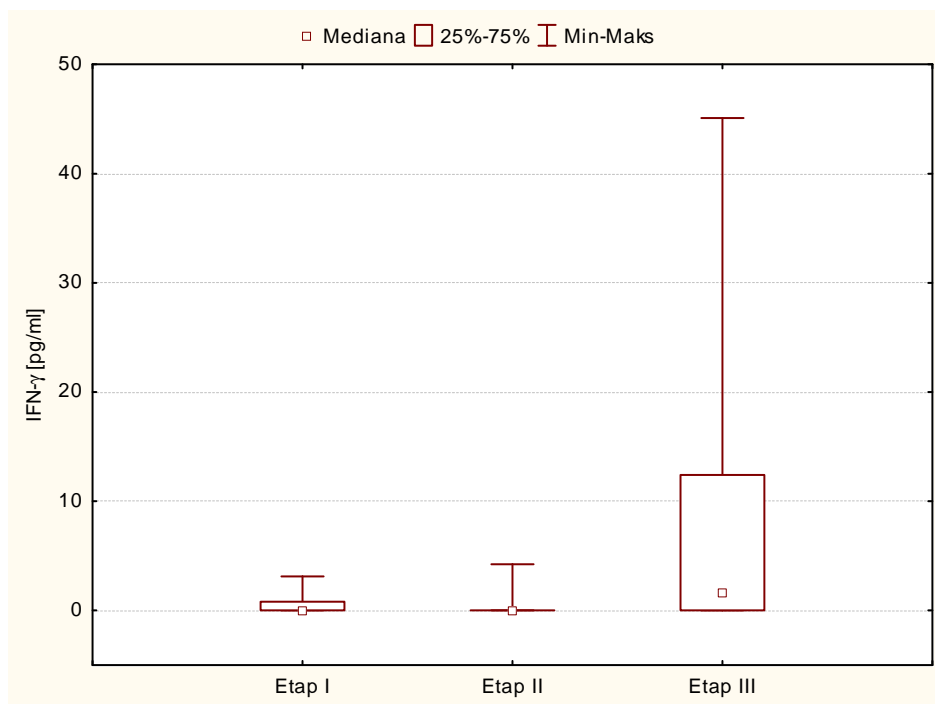
W przedstawionej poniżej tabeli umieszczono statystyki opisowe stężenia interferonu- γ w badanych grupach szczurów podczas kolejnych etapów badania.

Tab.6. Wartości średnie, mediana, wartości minimalne i maksymalne, kwartyle górne i dolne oraz odchylenie standardowe stężenia IFN- γ w trzech grupach szczurów podczas poszczególnych etapów doświadczenia.

Zmienna	Grupa I Statystyki opisowe							
	N	Średnia	Mediana	Min.	Maks.	Kw.dolny	Kw.górny	Odch.std
IFN- γ [pg/ml] I etap	24	0,517500	0,000000	0,00	3,12000	0,000000	0,79500	0,88657
IFN- γ [pg/ml] II etap	23	0,657391	0,000000	0,00	4,22000	0,000000	0,00000	1,36314
IFN- γ [pg/ml] III etap	23	8,290870	1,610000	0,00	45,10000	0,000000	12,40000	13,04906
IFN- γ [pg/ml] IV etap	5	9,644000	9,010000	0,00	24,04000	3,140000	12,03000	9,33607
	Grupa II Statystyki opisowe							
IFN- γ [pg/ml] II etap	23	0,438696	0,000000	0,00	3,34000	0,00	0,28000	0,89716
IFN- γ [pg/ml] III etap	23	6,874348	3,340000	0,00	29,27000	0,00	12,85000	8,54913
IFN- γ [pg/ml] IV etap	23	6,159565	1,540000	0,00	43,76000	0,00	11,24000	10,38487
	Grupa III Statystyki opisowe							
IFN- γ [pg/ml] II etap	10	0,673000	0,285000	0,00	2,37000	0,00	1,00000	0,871130
IFN- γ [pg/ml] III etap	10	5,093000	0,000000	0,00	15,13000	0,00	12,40000	6,836180

Analizując poziom IFN- γ zarówno w I jak i III grupie szczurów, nie wykazano istotnych różnic statystycznych. Zanotowano jednak wzrost poziomu stężenia cytokiny w II grupie szczurów między II a III ($p < 0,01$) oraz II a IV ($p < 0,01$) etapem doświadczenia. Poniżej umieszczono wykres z wartościami mediany TNF- γ w II grupie szczurów podczas kolejnych faz doświadczenia.

Ryc. XII Wartości mediany poziomu stężenia IFN- γ w II grupie szczurów podczas kolejnych etapów doświadczenia.



Podczas porównywania poziomu IFN- γ między grupami w trakcie poszczególnych etapów badań nie wykazano istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$).

6.5. CZYNNIK MARTWICY NOWOTWORÓW (TNF- α)

Poniżej przedstawiono średnie wartości TNF- α we wszystkich grupach podczas poszczególnych etapów doświadczenia. Podczas pierwszego i ostatniego etapu w grupie I oraz podczas II etapu w grupie III stężenie cytokiny znalazło się poniżej poziomu detekcji metodą cytometryczną.

Tab.7. Wartości średnie, mediana, wartości minimalne i maksymalne, kwartyle górne i dolne oraz odchylenie standardowe stężenia TNF- α w trzech grupach szczurów podczas poszczególnych etapów doświadczenia.

Zmienna	Grupa I Statystyki opisowe							
	N	Średnia	Mediana	Min.	Maks.	Kw.dolny	Kw.górny	Odch.std
TNF- α [pg/ml] I etap	24	0,000000	0,00	0,00	0,000000	0,00	0,00	0,000000
TNF- α [pg/ml] II etap	23	3,472609	0,00	0,00	32,030000	0,00	0,00	8,468603
TNF- α [pg/ml] III etap	23	2,177826	0,00	0,00	37,490000	0,00	0,00	7,935242
TNF- α [pg/ml] IV etap	5	0,000000	0,00	0,00	0,000000	0,00	0,00	0,000000
	Grupa II Statystyki opisowe							
TNF- α [pg/ml] II etap	23	3,042174	0,00	0,00	33,960000	0,00	0,00	8,281754
TNF- α [pg/ml] III etap	23	2,834348	0,00	0,00	40,320000	0,00	0,00	9,675292
TNF- α [pg/ml] IV etap	23	0,524783	0,00	0,00	12,070000	0,00	0,00	2,516769
	Grupa III Statystyki opisowe							
TNF- α [pg/ml] II etap	10	0,000000	0,00	0,00	0,000000	0,00	0,00	0,000000
TNF- α [pg/ml] III etap	10	0,852000	0,00	0,00	8,520000	0,00	0,00	2,694261

Analizując poziom stężenia cytokiny w poszczególnych grupach oraz na różnych etapach eksperymentu nie wykazano różnic statystycznych. Poziom cytokiny znajdował się poniżej poziomu detekcji lub osiągał bardzo niskie wartości.

6.6. PROKALCYTONINA (PCT)

Poniżej przedstawiono średnie wartości prokalcytoniny szczurzej. Poziom enzymu nie zmieniał się istotnie ani w obrębie grup szczurów, ani w zależności od fazy doświadczenia w obrębie jednej grupy.

Tab. 8. Wartości średnie, mediana, wartości minimalne i maksymalne, kwartyle górne i dolne oraz odchylenie standardowe stężenia PCT w trzech grupach szczurów podczas poszczególnych etapów doświadczenia.

Zmienna	Grupa I Statystyki opisowe							
	N	Średnia	Mediana	Min.	Maks.	Kw.dolny	Kw.górny	Odch.std
PCT [pg/ml] I etap	24	6,50833	7,10000	0,200000	19,80000	2,10000	9,15000	4,639145
PCT [pg/ml] II etap	23	11,49565	10,20000	3,000000	28,80000	7,60000	14,70000	5,932076
PCT [pg/ml] III etap	23	14,23043	15,00000	5,300000	20,00000	10,80000	17,60000	4,138339
PCT [pg/ml] IV etap	5	10,36000	7,20000	4,700000	21,00000	6,70000	12,20000	6,557667
	Grupa II Statystyki opisowe							
PCT [pg/ml] II etap	23	10,81739	10,70000	1,000000	20,50000	6,500000	14,90000	5,42190
PCT [pg/ml] III etap	23	15,81739	13,20000	4,700000	43,40000	7,300000	18,90000	10,62829
PCT [pg/ml] IV etap	23	13,55652	11,70000	4,400000	41,30000	7,900000	18,40000	8,25518
	Grupa III Statystyki opisowe							
PCT [pg/ml] II etap	10	0,000000	0,00	0,00	0,000000	0,00	0,00	0,000000
PCT [pg/ml] III etap	10	0,852000	0,00	0,00	8,520000	0,00	0,00	2,694261

7. DYSKUSJA

W niniejszej pracy podjęto próbę wykrycia jednego z możliwych mechanizmów działania preparatu RESAN w przypadku endometriozy szczurzej na podstawie oceny stężeń i wzajemnych zależności między wybranymi parametrami charakterystycznymi dla różnych typów immunologicznej odpowiedzi komórkowej.

Badania nad opracowaniem skutecznego leczenia endometriozy, zwłaszcza w aspekcie immunologicznym, trwają od lat – wciąż z niezadowalającym skutkiem. Pociąga to za sobą podejmowanie kolejnych prób opracowania skutecznego leczenia choroby. Takie działanie wymaga odpowiedniego modelu doświadczalnego, dzięki któremu można oceniać wpływ i ewentualne mechanizmy oddziaływania badanych preparatów i substancji.

Doświadczalny model endometriozy u szczurów znany jest już od wielu lat, w

ośrodka poznańskim od ponad dwudziestu. Szczur laboratoryjny szczepu *Wistar* okazał się być dogodnym zwierzęciem ze względu na krótkie (4-5-dniowe) i regularne cykle płciowe, dużą dostępność oraz stosunkowo niski koszt hodowli [43]. Na podstawie przeprowadzonego eksperymentu w 1990 r. Jędrzejczak i wsp. zaobserwowali skuteczne wszczepienie implantów endometriozy po przeprowadzonych operacjach mikrochirurgicznych w grupie 36 szczurzy. Powstałe ogniska endometriozy miały postać brunatnych torbielek wypełnionych płynem, różnej wielkości w zależności od tygodnia po operacji. Po trzech tygodniach torbielki miały średnicę 2-3mm, a po sześciu tygodniach 5-6mm [43]. W ciągu minionych kilkadziesiąt lat pojawiło się wiele doniesień, w których opisano eksperymentalne działania dotyczące opracowania metod leczniczych w endometriozie z użyciem modelu szczurzego.

Samica szczura szczepu *Wistar* posiada macicę dwurożną. Dojrzałość płciową osiąga między 80 a 100 (± 7) dniem życia osobniczego [71]. Stwierdzono podobieństwo anatomiczne ludzkiego i szczurzego endometrium, co prawdopodobnie jest jednym z czynników, które istotnie przyczyniają się do skutecznej indukcji endometriozy po przeszczepieniu tkanki ektopowej u szczurów [98, 99, 100, 101]. Co prawda przebieg cyklu płciowego u szczura odbiega od cyklu ludzkiego. W cyklu rujowym samicy szczura wyróżnia się cztery fazy: diestrus, proestrus, estrus i metestrus. Ostatnia z wymienionych jest fazą lutealną i trwa bardzo krótko- średnio 6 godzin (3-27), wpływając na gwałtowną dynamikę cyklu u szczurów. Mechanizmy regulujące cykl płciowy u szczura są odmienne niż u człowieka. Samice szczura mają tzw. cykl rujowy typu II, co oznacza, że przy nieobecności samca, skracana lub nawet eliminowana jest faza lutealna [71]. Fazę cyklu szczura ustala się głównie na podstawie mikroskopowej analizy popłuczyn rozmazów pochwowych. W opisywanym w tej pracy eksperymencie odstąpiono od tego badania, uznając je za zbędne. Uzasadnić to można obserwacjami, na podstawie których nie stwierdzono różnicy w częstości występowania endometriozy w zależności od fazy cyklu szczura, podczas której przeprowadzono operację wszczepiania ektopowego endometrium do otrzewnej [98, 99, 100, 101]. Wydaje się więc, że mimo pewnych odrębności, model endometriozy u szczura jest odpowiedni do badań doświadczalnych nad chorobą, głównie dzięki jednorodności badanej populacji, możliwości wykonania ewentualnych relaparotomii, dobrej znajomości zachowań i faz cyklu zwierząt oraz, jak wspomniano wcześniej, dość niskim nakładom finansowym koniecznym do prowadzenia hodowli.

Eksperymentalnym modelem endometriozy u szczura posłużyli się również w

swoich badaniach Gul oraz Itil, którzy podjęli próbę opracowania profilaktycznego wpływu szczepionki BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) [34, 40]. W 2001 r. Gul i wsp. opublikowali wyniki eksperymentu przeprowadzonego w grupie 40 szczurzy. Połowę zwierząt poddano szczepieniu 0,1 ml BCG podskórnemu. Po trzech tygodniach wszystkie zwierzęta poddano operacji przeszczepienia endometrium otrzymanego metodą mikrochirurgiczną z prawego rogu macicy do tęczówki jednego oka. Następnie co tydzień w przeciągu sześciu tygodni obserwowano zmiany morfologiczne w operowanym oku. W ostatecznych wynikach uzyskano istotną statystycznie przewagę wszczepienia ognisk endometriozy w grupie szczurów nie poddanych szczepieniu BCG (85% vs 25%, $p < 0,001$) [34].

Pięć lat później zespół badawczy z tego samego ośrodka (Turcja) opublikował wyniki analogicznego badania z wykorzystaniem szczepionki BCG, jednak fragmenty endometrium pobrane po wycięciu rogu macicy wszczepiano po dwóch stronach otrzewnej ściennej jamy brzusznej szczurów. W grupie 20 zaszczepionych szczurzy, którym po 4 tygodniach od podania szczepionki wszczepiono dootrzewnowo fragmenty endometrium, po kolejnych 8 tygodniach stwierdzono statystycznie mniej ognisk endometriozy potwierdzonej histologicznie niż w grupie kontrolnej (20 szczurzy), nie poddanej szczepieniu (27,8% vs 67,6%, $p = 0,01$) [40]. Obydwa eksperymenty wykazały, że szczepienie BCG, prawdopodobnie poprzez wpływ na odpowiedź komórkową, może hamować implantację przeszczepionego endometrium. Taki wniosek oparto również o badania Kantera i wsp., którzy badali wpływ szczepienia BCG na zmiany ilościowe limfocytów, makrofagów i komórek plazmatycznych w macicy oraz węzłach chłonnych szczurów. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono wzrost ilości makrofagów w grupie zaszczepionej w porównaniu z grupą bez podania BCG ($35,18 \pm 2,01$ vs $86,43 \pm 4,25$ komórek w mm^2), wzrost ilości limfocytów T w endometrium ($17,32 \pm 1,27$ vs $64,11 \pm 2,42$ komórek w mm^2) oraz w błonie mięśniowej macicy ($10,47 \pm 0,13$ vs $28,12 \pm 1,56$ komórek w mm^2), a także wzrost ilości monocytów w błonie śluzowej macicy (odpowiednio w grupach: $10,38 \pm 1,37$ vs $45,60 \pm 2,57$ komórek w mm^2). Wobec powyższych wysnuto wniosek, że preparat poprawia funkcje humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej w obrębie błony śluzowej i tkanki mięśniowej macicy oraz w węzłach chłonnych miednicy mniejszej [46]. Brak jest doniesień podejmujących temat wpływu szczepienia BCG na cytokiny i proporcje odpowiedzi komórkowej typu Th1 i Th2.

Na podstawie przeprowadzonych analiz opisanych w niniejszej pracy

stwierdzono, że w badanej grupie szczurów, w której zastosowano RESAN jako profilaktykę, istotnie statystycznie rzadziej dochodziło do implantacji ektopowego endometrium i rozwoju endometriozy, a więc wyniki są porównywalne do tych po zastosowaniu szczepionki BCG. Co prawda istnieją pewne rozbieżności między oceną makroskopową a oceną histologiczną, jednak takie sytuacje nie są rzadkością również w codziennej praktyce klinicznej. Istotnym przełomem w diagnostyce endometriozy było wprowadzenie powszechnego stosowania laparoskopii w diagnostyce i leczeniu choroby. Od tamtej pory pojawiły się trendy w postępowaniu diagnostycznym, według których rozpoznanie endometriozy może być oparte jedynie na wizualizacji ognisk choroby podczas laparoskopii z ewentualnym histologicznym potwierdzeniem [49].

Wobec wyników świadczących o skuteczności preparatu RESAN w zapobieganiu oraz prawdopodobnie leczeniu endometriozy, kolejnym pytaniem jest : jakie mechanizmy towarzyszą wspomnianemu działaniu preparatu? W związku z licznymi doniesieniami potwierdzającymi wpływ zaburzeń układu immunologicznego na etiopatogenezę choroby, dość oczywista wydała się potrzeba oceny możliwego działania RESAN właśnie na układ immunologiczny, również w kontekście wniosków Kantera po ocenie wpływu BCG na wspomniany układ.

Wśród znanych i zbadanych dysfunkcji układu immunologicznego w przebiegu endometriozy znajduje się obniżona aktywność komórek NK w surowicy i płynie otrzewnowym [20, 67] oraz zwiększona aktywność monocytów krwi obwodowej i makrofagów płynu otrzewnowego [20]. Skutkuje to wzrostem wytwarzania cytokin prozapalnych zarówno w stanie spoczynku jak i po stymulacji, wśród których wymienić można TNF- α , IL-6, IL-8 czy prostaglandyny kurczące mięśnie gładkie PGF, PGE [20]. Na podstawie obserwacji rodzaju uwalnianych cytokin w przebiegu endometriozy stwierdzono przewagę cytokin charakterystycznych dla odpowiedzi komórkowej typu Th2 i upośledzoną funkcję odpowiedzi komórkowej typu Th1 [69, 74]. Zakładając immunomodulacyjny wpływ preparatu RESAN, interesująca okazała się ocena wybranych cytokin typowych dla danej odpowiedzi immunologicznej przed podaniem preparatu oraz po uzyskaniu jego leczniczego działania. Czy udowodniony wpływ preparatu na rozwój endometriozy wiąże się ze zmianami w obrębie poszczególnych typów odpowiedzi komórkowej? Czy istnieje wyraźna przewaga wybranej odpowiedzi u szczurów zdrowych i chorych, czy też zmiany dotyczą poszczególnych cytokin typowych dla różnych typów odpowiedzi?

W opublikowanych trzy lata temu badaniach Podgaec i wsp. dokonali analizy

porównawczej stężenia wybranych cytokin u pacjentek z endometriozą i zdrowych. W pierwszej grupie znalazło się 65 pacjentek, w grupie kontrolnej 33. Oceniano stężenia cytokin zarówno w surowicy, jak i w płynie otrzewnowym. Jako metodę zastosowano cytometrię przepływową. Wśród glikoprotein typowych dla odpowiedzi typu Th1 oceniono stężenie TNF- α , INF- γ oraz IL-2, z kolei wśród cytokin charakterystycznych dla odpowiedzi typu Th2 oznaczono poziom IL-4 i IL-10. Okazało się, że poziomy IL-10 oraz TNF- α były istotnie podwyższone w płynie otrzewnowym pacjentek z endometriozą (nie zaobserwowano jednak takiej zależności w surowicy krwi badanych kobiet). Zagadnienie dotyczące przewagi którejkolwiek odpowiedzi immunologicznej (Th1 vs Th2) pozostało więc otwarte, bez jednoznacznej odpowiedzi [74].

Wśród ocenianych w naszym eksperymencie parametrów znalazły się cytokiny typowe dla odpowiedzi komórkowej typu Th1, a więc IFN- γ i TNF- α oraz cytokiny charakterystyczne dla odpowiedzi typu Th2, takie jak IL-4, IL-6, IL-10. Okazało się, że w grupie szczurów nie poddanych immunoporfilaktycznemu działaniu RESAN, wyraźnie silniej zarysowała się tendencja do podwyższonego poziomu cytokin typowych dla odpowiedzi komórkowej typu Th2. Ponadto ich poziom obniżył się po leczeniu operacyjnym połączonym z leczniczym zastosowaniem RESAN. Sugerowałoby to wpływ preparatu na mechanizmy immunomodulacyjne istotne w zwalczaniu endometriozy. Co zaskakujące, nie stwierdziliśmy takiej zależności w aspekcie wpływu preparatu na cytokiny typowe dla odpowiedzi typu Th1, a więc TNF- α i IFN- γ .

TNF- α produkowany jest przez neutrofile, aktywowane limfocyty, komórki NK i wiele innych komórek. Jego podstawową funkcją jest zdolność do inicjacji produkcji innych cytokin i czynników związanych z odpowiedzią immunologiczną. W ludzkim endometrium TNF- α bierze udział w fizjologicznych procesach tkankowych. Jednak w przypadku kobiet z endometriozą jego funkcja staje się bardziej złożona. Według niektórych doniesień stężenie TNF- α w płynie otrzewnowym chorych kobiet jest podwyższone i koreluje z zaawansowaniem choroby [55].

W otrzymanych przez nas wynikach nie otrzymaliśmy różnic w poziomie cytokiny w obrębie poszczególnych grup oraz na poszczególnych etapach doświadczenia. Niestety, w zdecydowanej większości oznaczeń poziom cytokiny był poniżej poziomu detekcji. Analogiczne wyniki w swoich badaniach opisał Podgaec, również nie znajdując różnicy statystycznej między poziomem tej cytokiny w płynie otrzewnowym i surowicy wśród kobiet chorujących na endometriozę oraz zdrowych

[74].

Według piśmiennictwa podwyższone stężenia TNF- α w płynie otrzewnowym pacjentek z endometriozą stymulują adhezję i implantację ectopowych komórek endometrium do ścian otrzewnej [35, 55]. Wnioskować z tego można istotną rolę opisaną cytokiny w etiopatogenezie i rozwoju choroby.

Interferon γ (IFN- γ) również należy do cytokin uwalnianych w przypadku aktywacji limfocytów typu Th1. W otrzymanych przez nas wynikach nie zaobserwowaliśmy istotnych statystycznie różnic pomiędzy stężeniami tej cytokiny w obrębie badanych grup. Są to dość zaskakujące rezultaty, ponieważ w piśmiennictwie opisuje się podwyższone poziomy tej cytokiny wśród pacjentek z endometriozą. Według literatury IFN- γ jest istotnym czynnikiem stymulującym adhezję ectopowych komórek endometrialnych do otrzewnej poprzez stymulację molekuly adhezyjnej ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) [110]. Nishida opisał IFN- γ jako czynnik obniżający tendencję komórek ectopowego endometrium do apoptozy, zwiększający tym samym zdolność do przeżywania patologicznych komórek poza jamą macicy [65]. W badaniach Podgaec'a poziom IFN- γ w płynie otrzewnowym był istotnie statystycznie wyższy wśród pacjentek z endometriozą w porównaniu z grupą kontrolną- zdrowych kobiet (mediana 0,5 vs 0, p=0,039). Warto jednak zwrócić uwagę, że nie uzyskano takiej zależności na podstawie oceny stężenia cytokiny w surowicy badanych pacjentek [74].

Badania nad oceną stężeń wybranych cytokin i chemokin przeprowadzili również Umezawa i wsp. Grupę badaną stanowiło 17 szczurów, u których przeprowadzono autologiczne wszczepienie ectopowego endometrium w dwóch miejscach na otrzewnej, zaś grupę kontrolną stanowiło 11 szczurów, wśród których przeprowadzono jedynie operacje pozorowane (sham operations). Ocenę stężeń cytokin przeprowadzono z użyciem metody PCR. Nie stwierdzono istotnych różnic w poziomie IFN- γ w obydwu grupach w czwartej i siódmej dobie po operacyjnym wszczepieniu endometrium. W czwartej dobie poziom IFN- γ był nieoznaczalny. W siódmej dobie odsetek oznaczalnego stężenia cytokiny wynosił odpowiednio w grupie badanej i kontrolnej 63% i 14%, ale były to bardzo niskie stężenia [105]. Zwraca jednak uwagę mała liczebność grup oraz krótki okres czasu między przeprowadzonymi operacjami i oznaczeniami. Przytoczone badania wskazują na trudności metodyczne, których inni również doświadczają, pomimo bardzo szczegółowego zaplanowania eksperymentu. Przygotowanie naszego eksperymentu wraz z jego przeprowadzeniem zajęło ponad 2

lata.

W uzyskanych wynikach wykazano podwyższony poziom IL-6 w II grupie szczurów w porównaniu z grupą I podczas III etapu doświadczenia, a więc po immunoprofilaktycznym podaniu RESAN w I grupie i wszczepieniu ektopowego endometrium w dwóch wymienionych grupach.

Interleukina- 6 (IL-6) jest istotnym regulatorem stanu zapalnego oraz odpowiedzi immunologicznej. Wpływa na produkcję i uwalnianie innych cytokin, stymuluje aktywację limfocytów T, różnicowanie limfocytów B, a także jest inhibitorem wzrostu różnych linii komórkowych w ludzkim organizmie. Wskutek aktywacji hormonalnej i immunologicznej IL-6 może być produkowana przez komórki eutopowego i ektopowego endometrium. Uwalniana miejscowo przez ogniska ektopowo przemieszczonego endometrium i rozwijające się wszczepy, przyczynia się wraz z IL-8, VEGF i PGE2 do neowaskularyzacji implantów endometriozy, a tym samym do ich przeżywania i rozwoju. Z kolei w płynie otrzewnowym uwalniana przez aktywowane makrofagi, stymuluje limfocyty T i B do produkcji autoprzeciwciał w endometriozie, pogłębiając patologiczne skutki choroby, takie jak niepłodność [54].

Istotnie niższe stężenie IL-6 w I grupie szczurów po wszczepieniu ektopowego endometrium można wytłumaczyć dwojako. We wspomnianej grupie w niewielu przypadkach potwierdzono endometriozę, a IL-6 może być wytwarzana miejscowo w obrębie ognisk endometriozy. Z drugiej strony, najprawdopodobniej pod wpływem immunomodulującego działania RESAN, nie wystąpiła patologiczna, nadmierna aktywacja makrofagów, która mogłaby skutkować zwiększoną produkcją IL-6 przez te komórki.

Istotny wzrost stężenia IL-6 w przypadku szczurzego modelu endometriozy zaobserwowali również Umezawa i wsp. w przytoczonym wcześniej badaniu. W grupie szczurów z wszczepionym ektopowym endometrium w porównaniu z grupą kontrolną po operacjach pozorowanych (sham operations) istotność statystyczna w poziomie IL-6 w czwartej dobie po operacji wynosiła $p < 0,01$, a w siódmej dobie $p < 0,001$ [104]. Nie wydaje się możliwe wytłumaczenie tych różnic rozwojem ognisk endometriozy już w kilka dni po wykonaniu operacji przeszczepienia eutopowego endometrium. Może to wskazywać raczej na pojawienie się odczynu zapalnego bądź wczesnej reakcji na przeszczep. Podobnie podwyższenie poziomu IL-6 ma miejsce w związku z samym urazem, jakim niewątpliwie jest operacja.

W naszym badaniu, chcąc uniknąć podobnych, w moim odczuciu błędnych

wniosków, kolejne etapy eksperymentu odbywały się co trzy miesiące. W poprzednich badaniach na modelu szczurzym w poznańskim ośrodku odstępy pomiędzy etapami (wszczepienie, laparotomia diagnostyczno-lecznicza) trwały dwa miesiące [99, 100, 101]. W przygotowaniu obecnego eksperymentu uznaliśmy, że wydłużenie czasu pomiędzy etapami pozwoli na wykluczenie błędów we wnioskowaniu, bowiem obserwowane zmiany będą dotyczyć wyłącznie utrwalonej endometriozy. Ponadto, po tak długim okresie od operacji, sam uraz z nią związany jest już nieistotny.

Kolejną ocenianą w opisywanym badaniu cytokiną związaną z odpowiedzią typu Th2 była interleukina-4 (IL-4). Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić istotny statystycznie wzrost stężenia IL-4 w grupie II podczas III etapu doświadczenia oraz spadek podczas IV etapu. Stwierdzono również istotnie wyższy poziom wspomnianej cytokiny w II grupie szczurów w porównaniu z I grupą podczas III fazy eksperymentu.

Interleukina-4 jest cytokiną typową dla chorób związanych z reakcjami autoimmunologicznymi i alergicznymi. W zależności od miejsca oddziaływania może wpływać stymulująco lub hamująco na proliferację różnych linii komórkowych [69]. W dwóch badaniach porównujących stężenia IL-4, w przypadku ludzkiej i szczurzej endometriozy, nie zaobserwowano istotnie wyższych stężeń cytokiny u chorych osobników. W badaniach Podgaec'a i wsp. poziom IL-4 był porównywalny zarówno w surowicy jak i w płynie otrzewnowym chorych i zdrowych kobiet [74]. Z kolei w oznaczeniach mRNA cytokiny wśród szczurów z wszczepionym ektopowym endometrium oraz po operacjach pozorowanych, zarówno odsetek oznaczalnego parametru, jak i jego oznaczalne wartości były bardzo niskie [104]. Jednak OuYang i wsp. postanowili ocenić wpływ IL-4 na komórki implantów endometriozy. Zgodnie z ich analizą, cytokina jest uwalniana miejscowo i stymuluje proliferację tkanki endometrioidalnej, przyczyniając się do powstawania zrostów w przebiegu endometriozy. Ponadto ma synergistyczne działanie z TNF- α w indukcji wspomnianej proliferacji [70]. Obserwacje te świadczą o istotnej roli IL-4 w rozwoju endometriozy. Wyniki naszego eksperymentu mogą potwierdzić tę obserwację.

W przypadku interleukiny-10 otrzymaliśmy istotny wzrost jej stężenia w grupie II po wszczepieniu ektopowego endometrium, a przed podaniem preparatu RESAN. Poziom ten był też istotnie wyższy w porównaniu ze szczurami z grupy I na tym samym etapie doświadczenia, ale po profilaktycznym zastosowaniu RESAN. Świadczy to więc o immunomodulacyjnym wpływie preparatu w zakresie oddziaływania na osłabienie

funkcji IL-10, a tym samym odpowiedzi komórkowej typu 2. Według Wu i wsp. IL-10 jest wytwarzana w podwyższonej ilości przez aktywowane makrofagi płynu otrzewnowego pacjentek z endometriozą [110]. Pełni ważną funkcję regulatorową, ponieważ działa hamująco na uwalnianie cytokin typowych dla limfocytów Th 1.

Wyniki opisanych badań nie dały jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czy w przebiegu endometriozy na modelu zwierzęcym dochodzi do istotnej przewagi odpowiedzi komórkowej typu Th2 nad odpowiedzią typu Th1. Stwierdzono wzrost stężenia cytokin typowych dla Th2, jednak bez wyraźnego upośledzenia funkcji Th1. Nie wykazano również jednoznacznego oddziaływania preparatu RESAN na wszystkie oceniane cytokiny. Potwierdza to liczne wątpliwości związane z jednoznacznym określeniem etiopatogenezy endometriozy. Podgaec i wsp. również nie osiągnęli jednoznacznych wyników na podstawie oceny wybranych interleukin w surowicy i płynie otrzewnowym pacjentek z endometriozą w porównaniu ze zdrowymi kobietami. Stwierdzili istotną statystycznie przewagę w stężeniu IL-10 oraz IFN- γ jedynie w płynie otrzewnowym chorych kobiet. Stężenia TNF- α , IL-2, IL-4 oraz IL-10 i IFN- γ w surowicy krwi nie różniły się w badanych grupach, bądź były nieoznaczalne. Nie uzyskano więc jednoznacznej odpowiedzi na pytanie o przewagę konkretnej odpowiedzi (Th1 lub Th2) w przebiegu endometriozy. Ponadto zmiany dotyczące różnic stężeń wybranych cytokin były zaznaczone wyraźniej w płynie otrzewnowym w porównaniu z surowicą [74]. Powstaje więc pytanie, czy taka sama zależność- z wyraźniej zarysowaną różnicą w stężeniach badanych cytokin w płynie otrzewnowym- byłaby widoczna również w przypadku badanych przez nas grup szczurów?

Nieco odmienne wyniki opublikowali Umezawa i wsp., którzy oceniali różnice w ekspresji mRNA między innymi IL-6, IL-10, IL-4 i IFN- γ wśród szczurów poddanych operacji wszczepienia do otrzewnej ektopowego endometrium i szczurów poddanych operacjom pozorowanym (sham operations). Uzyskano istotnie wyższy odsetek ekspresji IL-6 i IL-10 w obrębie implantów endometriozy, jednak pozostałe cytokiny były nieoznaczalne bądź w bardzo niskich stężeniach w obydwu badanych grupach. Również stężenia wspomnianych molekuł (łącznie z IL-6 i IL-10) nie wykazały różnic w porównywanych grupach bądź były poniżej poziomu oznaczalności [104]. Można więc wywnioskować, że wykazano przewagę odpowiedzi typu Th2.

W przypadku oceny poziomu prokalcytoniny nie uzyskaliśmy istotnych różnic w grupach szczurów i na poszczególnych etapach, co świadczy o braku korelacji między przeprowadzonymi operacjami i wszczepionym ektopowym endometrium a

ewentualnym stanem zapalnym. Jak wspomniano wcześniej, wielkość wzrostu PCT w surowicy, nawet do poziomu 1000-krotnie przekraczającego zakres normy, jest uzależniona od stopnia uogólnienia procesu zapalnego. Najwyższe stężenia PCT obserwuje się we wstrząsie septycznym, a nieznaczne tylko przekroczenie normy w miejscowych stanach zapalnych, jak ropnie, zapalenie oskrzeli, płuc, infekcje dróg moczowych bez urosepsy [52]. Ze względu na dobre parametry kinetyczne PCT jest uważana za lepszy marker ostrej fazy niż CRP [58]. Wnioskować więc można, że na wyniki naszych badań miały wpływ szczepienia RESAN bądź rozwój endometriozy, nie zaś odczyn zapalny wywołany samymi operacjami, co podnosi wartość zastosowanego modelu eksperymentalnego.

Jak widać, nie udało się otrzymać jednoznacznej odpowiedzi na pytanie o mechanizm działania preparatu RESAN, choć na pewno przedstawione dane sugerują, że może być on kolejnym lekiem zaliczanym do grupy immunomodulatorów. Jak wynika z piśmiennictwa, jest to główny trend w poszukiwaniu nowych leków zwalczających objawy endometriozy. Wśród badanych leków wyliczyć można pentoxyfilinę, interferon, leflunomid czy infliximab. Dane dotyczące zakresu ich działania są bardzo zachęcające, choć większość ocenianych leków znajduje się wciąż w fazie badań doświadczalnych.

Pentoxifylina jest lekiem immunosupresyjnym, który według niektórych autorów może ograniczać zapalną aktywację komórek układu immunologicznego w płynie otrzewnowym kobiet chorych na endometriozę. Badania Nothnick'a i wsp. potwierdziły, że w przypadku endometriozy indukowanej chirurgicznie na modelu szczurzym, pentoxyfilina istotnie hamowała rozwój implantów oraz ograniczała ilość produkowanych w nich protein typowych dla stanu zapalnego w endometriozie [66]. Późniejsze badania na ludziach nie przyniosły jednak już tak jednoznacznie korzystnych wyników, o czym wspomniano we wstępie niniejszej pracy.

Kolejnym lekiem z grupy immunomodulatorów jest leflunomid - selektywny inhibitor enzymu kontrolującego syntezę pirymidyny. Jego zalecana dawka to 100 mg przez 3 dni, następnie 20 mg dziennie. Jest lekiem przeciwzapalnym, przeciwgorączkowym i przeciwbólowym, stosowanym w leczeniu m.in. reumatoidalnego zapalenia stawów. Jego aktywny metabolit A771726 hamuje produkcję IL-1 β i TNF- α , co skutkowało regresją ognisk endometriozy na modelu doświadczalnym u szczurów[106].

Innym lekiem, z którym wiąże się duże nadzieje, jest ludzki interferon α -2b.

Według Ali i wsp. lek podany w formie iniekcji kobietom leczonym laparoskopią z powodu niepłodności skutkowało zmniejszeniem bólu podczas miesiączek, współżycia i defekacji przez okres 3 miesięcy. Z kolei po tym okresie, podczas laparoskopii second look, stwierdzano zmniejszenie stopnia zaawansowania endometriozy [1].

Również infliximab zaliczany jest do grona immunomodulatorów. Jako chimeryczne, monoklonalne przeciwciało, lek wiąże błonową i rozpuszczalną formę TNF, neutralizując jego biologiczny efekt, a tym samym redukując w surowicy stężenie prozapalnych mediatorów [6].

Trwają prace badawcze nad loxoribiną i levamisolem, które w badaniach Kennana także spowodowały regresję ognisk endometriozy na modelu szczurzym [48].

Wstępne wyniki dotyczące oddziaływania RESAN na ogniska endometriozy podczas badań na modelu szczurzym wydają się zachęcające i na pewno mobilizują do podjęcia dalszych obserwacji. Wyniki dotyczące oceny stężeń wybranych cytokin wskazują na immunomodulujący wpływ preparatu, choć wobec braku dowodów świadczących o wpływie preparatu RESAN na poziom TNF- α , a więc jednego z głównych czynników odpowiedzialnych za implantację ognisk endometriozy, prawdopodobne wydają się również inne mechanizmy wpływu preparatu na etiopatogenezę choroby. Interesująca okazać się może ocena oddziaływania RESAN na zaburzony w przypadku endometriozy mechanizm apoptozy ektopowych komórek endometrium.

Choć zaobserwowane działanie RESAN na ogniska szczurzej endometriozy jest bardzo obiecujące, sam preparat pozostawia wiele pytań. Jakie mogą być skutki uboczne leku, zwłaszcza w okresie długoterminowym? Czy ma on wpływ na cykl rozrodczy i może być pomocny w leczeniu niepłodności? W którym momencie wreszcie i u których pacjentek warto włączyć lek?

Na pewno niektóre z tych wątpliwości mogłyby być znacznie zawężone, gdyby znany był pełny skład leku, który nadal chroniony jest patentem. Wciąż otwarte pozostaje również pytanie, czy możemy w przypadku RESAN zastosować pojęcie szczepionki? Badania przeprowadzone na szerszą skalę i przez dłuższy okres czasu mogłyby być również pomocne w otwartej kwestii wytwarzania przez preparat pamięci immunologicznej. Nie wiemy bowiem, czy zmiany w obrębie układu immunologicznego są trwałe, czy też stosowanie preparatu wymaga dawek przypominających.

Endometrioza od lat pozostaje chorobą bardzo enigmatyczną, stawiającą zarówno klinicyście jak i badaczom wiele pytań. W związku z faktem, że zachorowalność wydaje się wciąż wzrastać, a w kwestii leczenia nie ma w pełni skutecznych środków, każde badania mające na celu poszukiwanie nowych metod i preparatów leczniczych mają na pewno ogromną wartość zarówno dla świata medycznego, jak i samych pacjentek.

8. WNIOSKI

1. Preparat RESAN można zaliczyć do grupy leków immunomodulujących.
2. Preparat RESAN wpływa na osłabienie odpowiedzi komórkowej typu Th2 , hamując rozwój endometriozy na modelu szczurzym.
3. Nie zaobserwowano istotnego wpływu RESAN na odpowiedź immunologiczną typu Th1.

9. STRESZCZENIE

Endometrioza jest przewlekłą, estrogenozależną chorobą polegającą na występowaniu błony śluzowej endometrium poza jamą macicy. Prowadzi do bólu w obrębie miednicy mniejszej, bolesnych miesiączek, dyspareunii i niepłodności. Choć choroba znana jest od ponad stu lat, do tej pory nie określono jednoznacznie jej przyczyny ani nie opracowano w pełni skutecznego schematu leczenia. Wiadomo, że istotny wpływ na etiopatogenezę choroby mają zaburzenia immunologiczne w organizmie chorych kobiet. Na podstawie licznych badań stwierdzono zaburzoną odpowiedź immunologiczną typu Th1 i Th2 w przebiegu endometriozy.

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.

Celem powyższej pracy była ocena wpływu preparatu RESAN na odpowiedź immunologiczną typu Th1 i Th2 w przebiegu endometriozy szczurzej.

Część badawczą przeprowadzono w grupie 58 dojrzałych płciowo szczurzym 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 wszystkich etapów doświadczenia pobierano szczurom 2 ml krwi z ogona, którą po odwirowaniu mrozono. Celem oceny wpływu RESAN na odpowiedź immunologiczną oceniono w surowicy stężenie IL-4, IL-6 i IL-10 jako markerów odpowiedzi typu Th2 oraz TNF- α i IFN- γ jako markerów odpowiedzi typu Th1. Dodatkowo badano stężenie prokalcytoniny, aby ocenić wpływ operacji na stan zapalny w organizmie zwierząt.

Cytokiny oznaczano metodą cytometrii przepływową, a prokalcytoninę metodą ELISA. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem testu nieparametrycznego Manna-Whitneya, testu Kruskala-Wallisa z testami wielokrotnych porównań Dunna, testu Wilcoxon'a i testu Friedmana z testami wielokrotnych porównań Dunna. W stosowanych testach przyjęto poziom istotności $p=0,05$.

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 (4,3% vs 69,6%, $p<0,0001$). 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).

W części laboratoryjnej zanotowano istotny statystycznie wzrost IL-4, IL-6 i IL-10 w II grupie szczurów podczas III etapu doświadczenia w porównaniu z grupą I. Stwierdzono również istotny statystycznie wzrost stężenia IL-4, IL-10 i IFN- γ w drugiej grupie szczurów podczas III etapu eksperymentu w porównaniu z etapem II. W przypadku TNF- α nie zanotowano istotnych różnic. Również poziom prokalcytoniny był porównywalny we wszystkich badanych grupach podczas poszczególnych części doświadczenia.

Na podstawie przeprowadzonych można stwierdzić, że preparat RESAN działa jak lek immunomodulujący poprzez osłabienie odpowiedzi komórkowej typu Th2, hamując tym samym rozwój endometriozy na modelu szczurzym. Nie zanotowano jednak wpływu RESAN na odpowiedź typu Th1. Szczurzy model okazał się być bardzo przydatny w badaniach nad etiopatogenezą endometriozy.

10. SUMMARY

Endometriosis is a chronic, estrogen-dependent disease. It is defined as the presence of functioning endometrial glands and stroma outside the uterus, predominantly within peritoneal cavity. The following symptoms can be caused by endometriosis: severe dysmenorrhoea, deep dyspareunia, chronic pelvic pain, infertility. Although the disease has been known for more than a hundred years, there is currently no cure for endometriosis and reported recurrence rates after surgical therapy are high. There is substantial evidence that immunologic factors play a role in the pathogenesis of endometriosis. According to many theories there is a disorder of the interaction between Th1 and Th2 immune response patterns in the course of the disease, with predominance of Th2 cells.

The RESAN vaccine is a complex of molecules extracted from xenogenic tissues, i.e., *G. domesticus*. It contains glycoproteins, peptides and carbohydrate fragments of more than 40 different common tumor antigens.

The aim of our study was to evaluate the RESAN influence on Th1 and Th2 immune response in the course of endometriosis in an animal model.

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 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 all stages of experiment, rats' blood (2 ml from tails) was taken, centrifuged and frozen. To check the influence of RESAN on immune response some interleukins were evaluated. Th1 cells are

secretors of interferon-gamma (IFN- γ) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), whereas Th2 cells produce principally interleukin-4 (IL-4), IL-6 and IL-10. All interleukins were measured by flow cytometry. In addition, procalcitonin (PCT) was detected by ELISA as a marker of inflammatory process.

The Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis test, Wilcoxon test and, finally, Friedman test were used in the statistical analysis to compare cytokines and procalcitonin concentrations. P value of $<0,05$ was considered statistically significant.

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. IL-4, IL-6 and IL-10 levels were significantly higher in rats from group II during the third stage of experiment compared to animals from group I at the same stage ($p<0,05$). IL-4, IL-10 and IFN- γ levels were also significantly higher in group II at the third stage than in the same group during the second stage of the experiment ($p<0,05$). No statistically significant changes in TNF- α and PCT levels were found.

According to our results RESAN seems to be effective in both the prophylaxis and treatment of endometriosis by inhibiting Th2 immune response. Probably RESAN acts as an immune modulator with small influence on Th1 response. A rat model of endometriosis seems to be very useful in research on the etiology and treatment of endometriosis.

11. PIŚMIENNICTWO

1. Ali AF, Fateen B, Ezzet A. et al. Laparoscopic intraperitoneal injection of human interferon-alpha2b in the treatment of pelvic endometriosis: a new modality. *Obstet Gynecol* 2000; 1(4): 47-48.
2. Assicot M, Gendrel D, Carsin H, et al. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet* 1993; 341: 515-8.
3. Attar E, Bulun S.E. Inhibitory aromatazy: nowy trend w leczeniu endometriozy? *W:Ginekologia po Dyplomie* 2007; 4: 87-91.
4. Barcz E, Kamiński P, Marianowski L. Role of cytokines in pathogenesis of endometriosis. *Med Sci Monit* 2000; 6: 1042-1046.

5. Barton-Smith P., Ballard K., Kent A.S.H. Endometriosis: A general review and rationale for surgical therapy. *Reviews in Gyneacological and Perinatal Practice* 2006; 6: 168-176.
6. Bednarowska A, Bińkowska M, Dębski R. Leczenie endometriozy- stan obecny i nowe trendy w terapii. *Ginekologia po Dyplomie* 2006; 9: 22-26.
7. Bednarowska-Flisiak A, Bińkowska M, Dębski R. Endometrioza- co nowego? *Prz Menopauz* 2004; 2: 22-29.
8. Bednarowska-Flisiak A, Bińkowska M, Dębski R. Endometrioza- leczenie. *Prz Menopauz* 2004; 3: 11-15.
9. Bergqvist A, Kennedy ST, Chapron Ch, et al. ESHRE Guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod.* 2005; 20: 2698-2704.
10. Blumenkrantz MJ, Galgher N, Bashore RA, Tenckhoff H. Retrograde menstruation in women undergoing chronic peritoneal dialysis. *Obstet Gynecol* 1981; 57(5): 667-670.
11. Braun D, Gebel H, House R, Rana N. et al. Spontaneous and induced synthesis of cytokines by peripheral blood monocytes in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1996; 65(6): 1125-1129.
12. Braun D, Gebel H, Rotman C, Rana N. et al. W. The development of cytotoxicity in peritoneal macrophages from women with endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 57(6):1203-1210.
13. Buchweitz O, Poel T, Diedrich K, Malik E. The diagnosis dilemma of minimal and mild endometriosis under routine conditions. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 2003; 10(1): 85-9.
14. Child TJ, Tan SL. Endometriosis: aetiology, pathogenesis and treatment. *Drugs* 2001; 61: 1735-50.
15. Dandona P, Nix D, Wilson MF, et al. Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 1605-8.
16. Daniels J, Gray R, Hills RK, Latthe P. et al. LUNA Trial Collaboration. Laparoscopic uterosacral nerve ablation for alleviating chronic pelvic pain: a randomized controlled trial. *JAMA* 2009; 2;302(9): 955-61.
17. D'Hooghe TM, Cuneo S, Nugent N, Chai D. et al. Recombinant human TNF binding protein-1 (r-hTBP-1) inhibits the development of endometriosis in baboons: a prospective, randomized, placebo- and drug-controlled study. *Fertil Steril* 2001; 76(suppl.): S3.

18. D'Hooghe TM, Debrock S, Hill JA, Meuleman C. Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved? *Semin Reprod Med.*2003; 21: 243-254.
19. Ding J, Braun DP, Gogacz M, Rana N et al. Endometrial apoptosis is inhibited in vitro by TNF- α and is stimulated by TNF- α in healthy women. *J Society Gynecol Invest(suppl)* 2000; 7(1): abstract # 625.
20. Dmowski W.P. Teoria deficytu immunologicznego w etiopatogenezie endometriozy z perspektywy 25 lat. *Ginekologia po Dyplomie* 2006; 5: 28-36.
21. Dmowski W, Gebel H, Braun D. Decreased apoptosis and sensitivity to macrophage mediated cytotoxicity of endometrial cells in endometriosis. *Hum Reproduct Update* 1998; 4(5): 696-701.
22. Dmowski WP, Steel RW, Baker GF. Deficient cellular immunity in endometriosis. *Am J Obst Gynecol.* 1981; 141(4): 377-383.
23. Donnez J, Smoes P, Gillerot S. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod* 1998; 13: 1686-90.
24. Farquhar CM. Extracts from the "clinical evidence". *Endometriosis. BMJ.* 2000; 320: 1449-1452. Doi:10.1136/bmj.320.7247.1449.
25. Fauconnier A. Relation between pain symptoms and the anatomic location of deep infiltrating endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 78: 719-726.
26. Fukaya T, Sugawara J, Yoshida H, Murakami T. et al. Intercellular adhesion molecule-1 and hepatocyte growth factor in human endometriosis: original investigation and review of literature. *Gynecol Obstet Invest* 1999; 47(1): 11-17.
27. Gambone JC, Mittman BS, Munro MG et al. Consensus statement for the management of chronic pelvic pain and endometriosis: proceedings of an expert-panel consensus process. *Fertil Steril* 2002; 78: 961-970.
28. Garcia-Velasco JA, Arici A. Interleukin-8 expression in endometria stroma cells is regulated by integrin-dependent cell adhesion. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 1135-1140.
29. Gebel H, Braun D, Rana N, Rotman C, Semino A., Dmowski W. Reduced production of immunoglobulin subclasses in patients with endometriosis. *Am J Reproduct Immunol* 1991; 25: 59.

30. Gebel H, Braun D, Rotman C, Rana N et al. Mitogen induced production of polyclonal IgG is decreased in women with severe endometriosis. *Am J Reproduct Immunol* 1993; 29: 124-130.
31. Gleicher N, El-Rocity A, Confino E, Friberg J. Abnormal autoantibodies in endometriosis: Is endometriosis an autoimmune disease? *Obstet Gynecol* 1987; 70: 115.
32. Gleicher N, El-Rocity A, Confino E, Friberg J. Reproductive failure because of autoantibodies: unexplained infertility and pregnancy wastage. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 160: 1376-1385.
33. Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W. *Immunologia*. PWN, Warszawa 2004.
34. 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.
35. Harada T, Iwabe T, Terakawa N. Role of cytokines in endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 76: 1-10.
36. Hart RJ, Hickey M, Maouris P, Buckett W. Excisional surgery versus ablative surgery for ovarian endometriomata. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008; 16(2): CD004992. Review
37. Healey M, Ang WC, Cheng C. Surgical treatment of endometriosis- a prospective randomized double-blinded trial comparing excision and ablation. *Fertil Steril* 2010; Mar 30.
38. Hill J, Faris H, Schiff I, Anderson D. Characterisation of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 1988; 50:216-222.
39. Hummelshoj L, Prentice A, Groothuis P. Update on endometriosis. *Women's Health* 2006;2(1):53-6.
40. Itil I, Cirpan T, Akercan F, Gamaa A. et al. Effect of BCG vaccine on peritoneal endometriotic implants in a rat model of endometriosis. *Aust N Z J Obstet Gyneacol* 2006; 46: 38-41.
41. Jakiel G, Robak-Chołubek D, Tkaczuk-Włach J. Endometrioza. *Przeg Menop* 2006; 2: 126-129.
42. Jakowicki JA. Rozpoznawanie endometriozy w : Endometrioza. Red. Skrzypczak J. *Ginekologia po Dyplomie* 2007; 18-21.

43. Jędrzejczak P, Szymanowski K, Skrzypczak J, Pisarski T. Eksperymentalny model endometriozy u szczurów. *Gin Pol* 1990; 61(8): 387-391.
44. Kamiński P. Chirurgiczne leczenie endometriozy związanej z bólem. W: *Endometrioza*. Red. Skrzypczak J. *Ginekologia po Dyplomie* 2007; 36-45.
45. Kanikowska D., Markowska J., Wiktorowicz K., Historia badań nad endometriozą. *Polski Przegląd Nauk o Zdrowiu*. 2010; 1: 42-45.
46. Kanter M, Gul A, Meral I, Koc A 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. *Tohok J Exp Med* 2003; 199: 219-228.
47. Karck U, Reister F, Schafer W, Zahradnik H. et al. PGE2 and PGF-2- α release by human peritoneal macrophages in endometriosis. *Prostaglandins* 1996; 51(1): 49-60.
48. Keenan JA, Williams-Boyce PK, Massey PJ. Et al. Regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis treated with the immune modulators loxoribine and levamisole. *Fertil Steril* 1999; 72(1): 135-41.
49. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron Ch, D'Hooghe T. et al. on behalf of the ESHRE Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium Guideline Development Group. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod* 2005; 10: 2698-2704.
50. Kjerulff KH, Langenberg PW. Chronic gynaecological conditions reported by US women: findings from the National Health Interview Survey. 1984 to 1992. *Am J Public Health* 1996; 86(2): 195-9.
51. Koninx PR, Kennedy SH, Barlow DH. Pathogenesis of endometriosis: the role of peritoneal fluid. *Gynecol Obstet Invest* 1999; 47: 23-33.
52. Korczowska E. Rola prokalcytoniny w diagnostyce chorób wewnętrznych. *Pol Merk Lekarski* 1999; 7: 251-2.
53. Kowalczyk-Amico K., Szubert M, Suzin J. Angiogeneza i odpowiedź zapalna w endometriozie. *Przegl Menop* 2009; 5: 261-264.
54. Kulp J.L. Taylor H.S. Nowe teorie dotyczące przyczyn powstawania i leczenia endometriozy. W: *Ginekologia po Dyplomie* 2009; 62(4):12-18.
55. Lebovic D, Mueller M, Taylor R. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 75(1): 1-10.

56. Leibson CL, Good AE, Hass SL, Ransom J. et al. Incidence and characterization of diagnosed endometriosis in a geographically defined population. *Fertil Steril* 2004; 82(2):314-21.
57. Loh FH, Tan AT, Kumar J. et al. Ovarian response after laparoscopic ovarian cystectomy for endometriotic cysts in 132 monitored cycles. *Fertil Steril* 1999; 72(2): 316-21.
58. Maciejewska-Stelmach J., Śliwińska-Stańczyk P, Łącki JK. Znaczenie prokalcytoniny w zapalnych chorobach tkanki łącznej. *Reumatologia* 2007; 45(1): 40-45.
59. Maresman GF, Auge L, Baranao RI, Lombardi E. et al. Oral contraceptives suppress cell proliferation and enhance apoptosis of eutopic endometrial tissue from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 77(6): 1141-1147.
60. Mathur S, Peress MR, Williamson HO. et al. Autoimmunity to endometrium and ovary in endometriosis. *Clin Exp Immunol* 1982; 50: 259.
61. Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D. et al. Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric and lifestyle factors. *Am J Epidemiol* 2004; 160: 784-96.
62. Mol BW, Bayram N, Lijmer JG, Wiegerinck MA. et al. The performance of CA-125 measurement in the detection of endometriosis: a metaanalysis. *Fertil Steril* 1998; 70 (6): 1101-1108.
63. Mosmann T, Coffman R. Th1 and Th2 cells: different pattern of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:145-188.
64. Nap AW, Groothuis PG, Demir AY, Evers JL. et al. Pathogenesis of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004; 18: 233-244.
65. Nishida M, Nasu K, Ueda T, Fukuda J. et al. Endometriotic cells are resistant to interferon-gamma-induced cell growth inhibition and apoptosis: a possible mechanism involved in the pathogenesis of endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2005; 11(1): 29-34.
66. Nothnick WB, Curry TE, Vernon MW. Immunomodulation of rat endometriotic implant growth and protein production. *Am J Reprod Immunol.* 1994; 31: 151-162.
67. Olive DL, Schwartz LB,. Endometriosis. *N Engl J Med* 1993; 328(24): 1759-69.

68. Oosterlynck D, Cornillie F, Waer M, Vandeputte M. et al. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 1991; 56(1): 45-51.
69. Oral E, Olive DL, Arici A. The peritoneal environment in endometriosis. *Hum Reprod Update* 1996; 2: 385-398.
70. OuYang Z, Hirota Y, Osuga Y, Hamasaki K. et al. Interleukin-4 stimulates proliferation of endometriotic stromal cells. *Am J Pathol* 2008; 2(173): 463-469.
71. Paczkowska A, Brelińska R, Malińska A. Szczur laboratoryjny jako model doświadczalny- fizjologia cyklu płciowego (rujowego) i rozrodu. *Pol Prz Nauk Zdr* 2006; 2(7): 128-133.
72. Parazzini F, Chiaffarino F, Urace M, et al. Selected food intake and risk of endometriosis. *Hum Reprod.* 2004; 19: 1755-759.
73. Pattaway 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. *Ferti Steril* 1995; 64: 321-324.
74. Podgaec S, Abrao M, Dias Jr J, Rizzo et al. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Hum Reprod* 2007; 5(22): 1373-1379.
75. Porpora MG, Koninckx PR, Piazzè J et al. Correlation Between Endometriosis and Pelvic Pain. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 1999; 6 (4): 429-434.
76. Quinn M. Endometriosis: the consequence of neurological dysfunction? *Med Hypoth* 2004; 63: 602-608.
77. Radwan J. Postępowanie w endometriozie współistniejącej z niepłodnością. W: *Endometrioza. Ginekologia po Dyplomie 2007*; red.: Skrzypczak J.
78. Rana N, Braun D, House R, Gebel H. et al. Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1996; 65(5): 925-930.
79. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunologia*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL , Warszawa 2000.
80. Romagnani S. Induction of Th1 and Th2 response: A key role for the natural immune response? *Immunol Today* 1992; 13: 379-380.
81. Sajdak S, Moszyński R. Współczesne metody leczenia endometriozy. *Przegląd Ginekologiczno-Położniczy*. 2006; 6(1): 3-9.

82. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol.* 1927; 14: 422-469.
83. Santanam N, Song M, Rong R, Murphy A, Parthasarathy S. Athelosclerosis , oxidation and endometriosis. *Free Radical Research* 2002; 36(12): 1315-1321.
84. Schindler AE. Pathophysiology, diagnosis and treatment of endometriosis. *Miverva Ginecol.* 2004; 56: 419-435.
85. Seeber BE, Czech T, Buchner H, Barnhart KT. et al. The vitamin E-binding protein afamin is altered significantly in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 2010 Jun 16 [Epub ahead of print].
86. Seli E, Berkkanoglu M, Arici A. Pathogenesis of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Amer* 2003; 30: 41-61.
87. Senturk L, Arici A. Immunology of endometriosis. *J Reprod Immun* 1999; 43: 67-83.
88. Sinai N, Cleary SD, Ballweg ML, et al. High rates of autoimmune and endocrine disorders, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and atopic diseases among women with endometriosis: a survey analysis. *Hum Reprod* 2002; 17(10): 2715-24.
89. Skalba P. Farmakologiczne leczenie endometriozy związanej z bólem. W: *Endometrioza. Ginekologia po Dyplomie 2007*; red. Skrzypczak J.
90. Skrzypczak J. Jak zapobiegać endometriozie. W: *Endometrioza. Ginekologia po Dyplomie 2007*; red. Skrzypczak J.
91. Skrzypczak J, Szymanowski K. Laparoscopia w rozpoznawaniu i leczeniu endometriozy. *Gin Pol* 1992; 63(11): 583-88.
92. Somigliana E, Vercellini P, Daguati R, Giambattista E. et al. Effect of delaying post-operative conception after conservative surgery for endometriosis. *Reprod Biomed Online.* 2010 Mar; 20(3): 410-415. Epub 2009 Dec 16.
93. Song M, Karabina SA, Kartaradze N, Murphy AA. et al. Presence of endometrial epithelial cells In the peritoneal cavity and the mesothelial inflammatory response. *Fertil Steril* 2003; 79: 789-794.
94. Soysal S, Soysal M, Ozer S, 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.

95. Spaczynski RZ, Duleba AJ. Diagnosis of endometriosis. *Semin Reprod Med.* 2003; 21(2): 193-208.
96. Substyl M, Tkaczuk-Włach J, Jakiel G. Farmakologiczne leczenie endometriozy. *Przegląd Menopauzalny* 2010; 3: 194-197.
97. Szamatowicz J. Nowe kierunki w badaniu nad endometriozą. W: *Endometrioza. Ginekologia po Dyplomie 2007*; red. Skrzypczak J.
98. Szymanowski K, Chmaj-Wierzchowska K, Yantczenko A, Niepsuj-Biniaś J. et al. Endometriosis prophylaxis and treatment with the newly developed xenogenic immunomodulator RESAN in an animal model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 142: 145-148.
99. Szymanowski K, Florek E, Mikołajczyk M, Skrzypczak J. Integrin pattern in rats endometrium after endometriosis induction. *Pol J Gynaecol Invest* 2002;5: 293-298.
100. Szymanowski K, Mikołajczyk M, Rączyńska R, Florek E. et al. Integrin pattern in rats endometrium after endometriosis excision. *Pol J Gyneacol Invest* 2002; 5: 299-302.
101. 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.
102. Tabibzadeh S, Santhanam V, Sehgel PB, May LT. Cytokine- induced production of IFN- β 2 by freshly explanted human endometrial stromal cells. Modulation by estradiol-17 β . *J Immunol* 1989; 142: 3134-3139.
103. The patent committee of Republic of Belarus, No. 5942; 1997.
104. Treloar SA, Martin NG, Kennedy SH, Montgomery GW. Characteristics and symptoms in 3985 women diagnosed with endometriosis in an Australian genetic epidemiological study. In: *Ninth world congress on endometriosis*; 2005.p.S5.
105. Umezawa M, Sakata C, Tanaka N, Kudo S. et al. Cytokine and chemokine expression in a rat endometriosis is similar to that in human endometriosis. *Cytokine* 2008; 43: 105-109.
106. Uygur D, Aytan H, Zergeroglu S, Batioglu S. Leflunomide – an immunomodulator – induces regression of endometrial explants in rat model of endometriosis. *J Soc Gynecol Invest* 2006 Jul;13(5):378-83.

- 107.Vercellini P, Fedele L, Pietropaolo G, Frontino G. et al. Progestagens for endometriosis: forward to the past. Hum Reprod Update. 2003; 9(4): 387-396.
- 108.Vessey MP, Villerd-Mackintosh L, Painter R. Epidemiology of endometriosis in women attending family planning clinics. BMJ 1993; 306(6871): 182-4.
- 109.Vigano P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P. Endometriosis: epidemiology and eathiological factors. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2004; 18(2): 177-200.
- 110.Wu MY, Ho HN. The role of cytokines in endometriosis. Am J of Reprod Immunol 2003; 49(5): 285-296.
- 111.Zeillemaker AM, Verbrough HA, Hoynck van Papendrecht AAGM, Leguit P. CA125 secretion by peritoneal mesothelial cells. J Clin Pathol 1994; 47: 263-265.
- 112.Zeller J, Henig I, Radwanska E, Dmowski W. Enhancement of human monocyte and peritoneal macrophage chemiluminescencje activities in women with endometriosis. Am j Reproduct Immunol Microbiol 1987; 13: 78.
- 113.Yantchenko VV, Yantchenko AV, Yantchenko LK. Imitators of the tumor antigens. The patent committee RB, appl. N970547; 1997.
- 114.Yeung PP Jr, Shwayder J, Pasic RP. Laparoscopic management of endometriosis: comprehensive review of best evidence. J Minim Invasive Gynecol 2009; 16(3): 269-281.

SPIS TABEL

Tab.1. Porównanie obecności endometriozy w badanych grupach.

Tab.2. Makroskopowa ocena zrostów w poszczególnych grupach szczurów podczas III etapu doświadczenia

Tab. 3. Wartości średnie, mediana, wartości minimalne i maksymalne, kwartyłe górne i dolne oraz odchylenie standardowe stężenia IL-4 w trzech grupach szczurów podczas poszczególnych etapów doświadczenia.

Tab. 4. Wartości średnie, mediana, wartości minimalne i maksymalne, kwartyłe górne i dolne oraz odchylenie standardowe stężenia IL-6 w trzech grupach szczurów podczas poszczególnych etapów doświadczenia.

Tab. 5. Wartości średnie, mediana, wartości minimalne i maksymalne, kwartyle górne i dolne oraz odchylenie standardowe stężenia IL-10 w trzech grupach szczurów podczas poszczególnych etapów doświadczenia.

Tab. 6. Wartości średnie, mediana, wartości minimalne i maksymalne, kwartyle górne i dolne oraz odchylenie standardowe stężenia IFN- γ w trzech grupach szczurów podczas poszczególnych etapów doświadczenia.

Tab. 7. Wartości średnie, mediana, wartości minimalne i maksymalne, kwartyle górne i dolne oraz odchylenie standardowe stężenia TNF- α w trzech grupach szczurów podczas poszczególnych etapów doświadczenia.

Tab. 8. Wartości średnie, mediana, wartości minimalne i maksymalne, kwartyle górne i dolne oraz odchylenie standardowe stężenia PCT w trzech grupach szczurów podczas poszczególnych etapów doświadczenia.

SPIS RYCIN

Ryc. I Schemat leczenia torbieli endometrialnych i bólu w przebiegu endometriozy na podstawie Sobstyl M. et al. „Farmakologiczne leczenie endometriozy”, Gambone. Consensus statement for the management of chronic pelvic pain and endometriosis: proceedings of an expert-panel consensus process. Fertil Steril 2002; 78: 961-970.

Ryc. II Schemat leczenia niepłodności w przebiegu endometriozy wg Radwan P., Radwan J. Postępowanie w endometriozie współistniejącej z niepłodnością w „Endometrioza” pod red. J. Skrzypczak. Ginekologia po dyplomie 2007.

Ryc. III Obraz zmian o charakterze pęcherzyków w miejscu wszczepienia ektopowego endometrium.

Ryc. IV Wartości mediany stężenia IL-4 w II grupie szczurów podczas poszczególnych etapów doświadczenia.

Ryc. V Wartości mediany stężenia IL-4 w III grupie szczurów podczas poszczególnych etapów doświadczenia.

Ryc. VI Wartości mediany stężenia IL-4 w trzech grupach szczurów podczas III etapu doświadczenia.

Ryc. VII Wartości mediany stężenia IL-6 we wszystkich grupach szczurów podczas III fazy doświadczenia.

Ryc. VIII Wartości mediany stężenia IL-10 w II grupie szczurów podczas wszystkich etapów doświadczenia.

Ryc. IX Wartości mediany stężenia IL-10 w III grupie szczurów podczas II i III etapu eksperymentu.

Ryc. X Wartości mediany stężenia IL-10 we wszystkich grupach szczurów podczas II etapu doświadczenia.

Ryc. XI Wartości mediany stężenia IL-10 we wszystkich grupach szczurów podczas III etapu doświadczenia.

Ryc. XII Wartości mediany poziomu stężenia IFN- γ w II grupie szczurów podczas kolejnych etapów doświadczenia.