

Tomasz Goździewicz

**Rola greliny i leptyny
w etiopatogenezie
endometriozy**

Rozprawa doktorska



Klinika Rozrodczości
Katedra Ginekologii, Położnictwa i Ginekologii Onkologicznej
Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Promotor
Prof. dr hab. Jana Skrzypczak

Poznań, 2013 r.

Składam serdeczne podziękowania

*Promotor – Prof. dr hab. Janie Skrzypczak
za kształtowanie mojej postawy naukowej
oraz za wsparcie i cenne rady podczas prowadzenia badań.*

*Pracownikom Kliniki Rozrodczości
za otwartość, serdeczność i pomoc w przeprowadzaniu badań.*

*Rozprawę doktorską dedykuję
mojej żonie Agacie
oraz moim rodzicom Janinie i Grzegorzowi*

Spis treści

Skróty	6
1. Wstęp	8
1.1 Endometrioza	8
1.1.1 Klasyczne teorie etiopatogenezy endometriozy.....	8
1.1.2 Współczesne teorie etiopatogenezy endometriozy	9
1.2 Grelina.....	11
1.2.1 Udział greliny w odpowiedzi immunologicznej.....	12
1.3 Leptyna	15
1.3.1 Udział leptyny w odpowiedzi immunologicznej.....	16
1.4 Transkrypcyjny czynnik jądrowy κB (NF-κB)	20
1.4.1 Związek NF- κ B z greliną i leptyną	21
2. Cel pracy	23
3. Materiał.....	24
3.1 Grupy badane	24
3.2 Omówienie grup badanych	25
3.2.1 Kobiety z endometriozą	25
3.2.2 Kobiety bez endometriozy	25
4. Metody.....	26
4.1 Badanie stężenia greliny i leptyny w osoczu	26
4.2 Badanie stężenia greliny i leptyny w płynie otrzewnowym	26
4.3 Oznaczenie ekspresji mRNA greliny, leptyny i ich receptorów	27
4.3.1 Odwrotna transkrypcja	27
4.3.2 Startery	28
4.3.3 Reakcja qPCR.....	28
4.4 Izolacja białka receptorów greliny i leptyny oraz analiza Western blot.....	30
4.5 Oznaczenie aktywności czynnika NF-κB	32
4.6 Analiza statystyczna	33
5. Wyniki	34
5.1 Stężenie greliny i leptyny w osoczu	34
5.2 Stężenie greliny i leptyny w płynie otrzewnowym	35
5.3 Ekspresja mRNA greliny, leptyny i ich receptorów	37
5.4 Ocena ilości białka receptora greliny i leptyny	42
5.5 Ocena aktywności czynnika NF-κB.....	44
5.6 Krzywe ROC ekspresji mRNA greliny i leptyny w eutopowym endometrium	45

6. Dyskusja	46
6.1 Stężenie greliny i leptyny w osoczu	46
6.2 Stężenie greliny i leptyny w płynie otrzewnowym	47
6.3 Ekspresja greliny, leptyny i ich receptorów w eutopowym i ektopowym endometrium.....	51
6.4 Aktywacja czynnika NF-κB.....	54
7. Wnioski	56
8. Streszczenie	57
9. Summary	61
PIŚMIENNICTWO	64

Skróty

ACTB – gen beta aktyny

ACTH – hormon adrenokortykotropowy

BMI – indeks masy ciała

cDNA – komplementarne DNA

COX – enzym cyklooksygenazy

CRP – białko ostrej fazy C

EAE – autoimmunologiczne zapalenie mózgu

EDTA – etylenodwuaminoczteroocjan

EIC – ostre zapalenie jelit

ELISA - test immunoenzymatyczny

FSH – hormon folikulotropowy

G-CSF – czynnik stymulujący tworzenie koloni granulocytów

GADPH – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowa

GH – hormon wzrostu

GHS-R – receptor dla greliny

GLUT – transporter glukozy

GM-CSF - czynnik stymulujący kolonizację granulocytów i makrofagów

GnRH – gonadoliberyna

GOAT – O-acetylotransferaza greliny

H₂O₂ – nadtlenek wodoru

HIF-1 α – czynnik indukujący hipoksję 1 alfa

ICAM – międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna

IFN – interferon

IGF – insulinowy czynnik wzrostu

IL – interleukina

JAK2 – kinaza Janusowa (rodzina niereceptorowych kinaz tyrozynowych)

LH – hormon luteinotropowy

MCP – białko chemotaktyczne monocytów

MHC- geny zgodności tkankowej

MMP – metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej

mRNA – informacyjny kwas rybonukleinowy

mTOR - kinaza mTOR, tzw. ssaczy cel rapamycyny

NF- κ B – Transkrypcyjny czynnik jądrowy κ B

NK – komórki NK „naturalni zabójcy”

PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy

PVDF - fluorek poliwinylidenu

STAT3 – przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji 3

Th1 – limfocyty pomocnicze typu 1

Th2 – limfocyty pomocnicze typu 2

TNF- α – czynnik martwicy guza alfa

VCAM-1 - naczyniowy czynnik adhezyjny

VEGF - czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego

1. Wstęp

1.1 Endometrioza

Endometrioza definiowana jest jako obecność błony śluzowej macicy poza jamą macicy z towarzyszącym przewlekłym stanem zapalnym. Rozpoznanie endometriozy opiera się na badaniu histopatologicznym materiału pobranego podczas laparoskopii lub laparotomii. Badanie histopatologiczne potwierdza endometriozę, ale przy ujemnym wyniku nie możemy jej wykluczyć (1).

Endometrioza dotyczy 6-10% kobiet w wieku rozrodczym. Objawy są mało swoiste, dlatego średni czas od ich wystąpienia do rozpoznania wynosi około 7 lat. Do objawów endometriozy należą: bolesne miesiączki, bolesne współżycie, nieprawidłowe krwawienia z macicy, przewlekły ból miednicy mniejszej oraz niemożność zajścia w ciążę (2). Wszystkie objawy w znacznym stopniu obniżają jakość życia kobiet. Szacuje się, że rocznie w Stanach Zjednoczonych straty ekonomiczne z powodu nieobecności w pracy lub zmniejszonej wydajności wynoszą 69,4 miliarda dolarów (3).

Endometrioza pozostaje chorobą enigmatyczną, mimo że w ostatnich dekadach przeprowadzono liczne badania mające na celu wyjaśnienie jej etiologii i patogenezy.

1.1.1 Klasyczne teorie etiopatogenezy endometriozy

Powstało wiele teorii próbujących wyjaśnić etiopatogenezę endometriozy. Do klasycznych należy teoria Sampsona z roku 1927, według której krew wraz z elementami endometrium przedostaje się z jamy macicy przez jajowody do jamy otrzewnowej.

W kolejnym etapie dochodzi do zagnieżdżenia się komórek błony śluzowej macicy i ich proliferacji, co prowadzi do powstania ektopowych ognisk. Wiadomo, że u 80% kobiet przy drożnych jajowodach dochodzi do wstecznego odpływu krwi miesięczkowej, a endometrioza występuje tylko u niektórych, co przemawia za istnieniem innych czynników, być może lokalnych, warunkujących przetrwanie komórek endometrium w jamie otrzewnowej i ich implantację (4,5).

Kolejną klasyczną teorią powstawania endometriozy jest teoria metaplazji. Jej autorami byli Iwanoff i Meyer. Głównym założeniem teorii jest istnienie komórek zdolnych do różnicowania się w endometrium, a będących prekursorami nabłonka

mezodermalnego jajnika i otrzewnej miednicy mniejszej. Teoria ta szczególnie jest przydatna w wyjaśnieniu istnienia endometriozy w różnych rejonach organizmu, tam gdzie występuje mezotelium np. jamie opłucnej. Tłumaczy również występowanie endometriozy u mężczyzn poddanych terapii estrogenami (4,6). Rozwinięciem teorii metaplastji jest teoria indukcji. Według niej złuszczone błona śluzowa macicy wydziela substancje powodujące przekształcanie komórek otrzewnej w implanty endometrialne (4).

Inna teoria zakłada, że elementy endometrium mogą przedostać się do jamy otrzewnowej drogą krwionośną lub limfatyczną. Pierwszym badaczem, który ją opisał był Halban, a w dalszych badaniach potwierdzał również Sampson. W dotychczasowych badaniach wykazano przepływ limfy z jamy macicy do jajnika oraz innych okolic miednicy mniejszej. Dodatkowo w modelu zwierzęcym, w którym indukowano endometriozę u pawianów, stwierdzono w węzłach chłonnych zwierząt komórki endometrialne. U kobiet, którym wykonywano wycięcie węzłów chłonnych miednicy mniejszej, w 6-7% przypadków również znajdowano komórki endometrium (4,7).

Złożona teoria Javerta z 1949 roku jest połączeniem teorii implantacji, transportu drogą krwionośną i limfatyczną, a także teorii bezpośredniego przenikania endometrium przez mięsień macicy. Badacz ten jako pierwszy zauważył, że w powstawaniu endometriozy może brać udział kilka mechanizmów (4).

1.1.2 Współczesne teorie etiopatogenezy endometriozy

Coraz więcej dowodów potwierdza założenie, że endometriozie towarzyszy przewlekły stan zapalny oraz zmieniona odpowiedź immunologiczna. Dmowski w 1981 roku po raz pierwszy zauważył, że zaburzenia układu immunologicznego towarzyszą praktycznie każdemu etapowi rozwoju endometriozy (8).

Kluczowym elementem układu immunologicznego są makrofagi. Biorą udział w rozpoznawaniu obcych komórek i prezentowaniu ich limfocytom T. W jamie otrzewnowej odpowiadają za usuwanie uszkodzonych i obcych komórek. U kobiet z endometriozą stwierdzono w jamie otrzewnowej zwiększoną liczbę aktywowanych makrofagów o obniżonej zdolności do fagocytycy. Makrofagi te wydzielają istotnie więcej cytokin prozapalnych takich jak IL-6. Innymi cytokinami, których udział rozważa się w etiopatogenezie endometriozy są: MIF, TNF- α , IL-1 β i IL-8. Makrofagi otrzewnowe

u kobiet z endometriozą wykazują zwiększoną ekspresję mRNA genu enzymu cyklooksygenazy-2 (COX-2), co tłumaczy zwiększone wydzielanie prostaglandyn (7).

W patogenezie endometriozy może odgrywać rolę także zaburzona równowaga pomiędzy limfocytami Th1 i Th2. Aktywowane limfocyty T różnicują się w limfocyty pomocnicze typu 1 (Th1), których głównym zadaniem jest produkcja cytokin i promowanie odpowiedzi typu komórkowego, oraz w limfocyty pomocnicze typu 2 (Th2), które wydzielają cytokiny biorące udział w różnicowaniu limfocytów B, supresji odpowiedzi typu komórkowego, a także nasilenia odpowiedzi typu humoralnego. Wiele badań wykazało, że u kobiet z endometriozą przewagę uzyskują limfocyty Th2 (4,5).

Kolejnymi komórkami układu immunologicznego, których aktywność jest obniżona u kobiet z endometriozą są komórki NK czyli „naturalni zabójcy”. Zaburzona funkcja tych komórek zmniejsza ich zdolność do oczyszczania jamy otrzewnowej z elementów endometrium po wstecznym odpływie krwi miesięczkowej (9). Innym czynnikiem ułatwiającym przeżycie ektopowych komórek endometrium jest zaburzony proces apoptozy. W dotychczasowych badaniach stwierdzono zwiększoną ekspresję antyapoptycznego genu BCL-2 zarówno w eutopowym jak i ektopowym endometrium kobiet z endometriozą (10).

Niezbędne do rozwoju ektopowego endometrium, w szczególności w mikrośrodowisku otrzewnej, jest powstawanie nowych naczyń. Neoangiogeneza jest połączona z powstawaniem nerwów, co może tłumaczyć dolegliwości bólowe u pacjentek. TNF- α , IL-8, MMP-3 oraz komórki progenitorowe śródbłonna wywodzące się z endometrium, szpiku kostnego lub krążenia promują proliferację i adhezję komórek endometrialnych oraz powstawanie nowych naczyń (11). Śródbłonkowy naczyniowy czynnik wzrostu (VEGF) odpowiada za powstawanie i rozrost nowych naczyń. U kobiet z endometriozą stwierdzono podwyższone stężenia tego czynnika w płynie otrzewnowym oraz jego korelację z ciężkością choroby (12). Aktywowane makrofagi otrzewnowe również wydzielają VEGF, co może nasilać proces angiogenezy w stanach zapalnych (13).

Zaburzona odpowiedź immunologiczna u kobiet z endometriozą może być związana z działaniem greliny i leptyny zarówno w płynie otrzewnowym jak i tkankach endometrialnych (14–16). Hormony te nie tylko modulują odpowiedź immunologiczną, ale także pobudzają powstawanie nowych naczyń i dzielenie się komórek (17–19).

1.2 Grelina

W 1999 roku grupa japońskich badaczy odkryła grelinę – ligand receptora dla hormonu uwalniającego hormon wzrostu. Grelina zbudowana jest z 28 aminokwasów, a powstaje z preprogreliny – 117 aminokwasowego prekursora. Prekursor ten jest kodowany przez gen składający się z 5 eksonów oraz 4 intronów i zlokalizowany u ludzi na chromosomie 3 (3p25-26). Preprogrelina ulega modyfikacji przez O-acetylotransferazę greliny (GOAT) przez przyłączenie grupy oktanylowej do seryny w pozycji 3 peptydu. Kolejnym etapem powstawania greliny jest cięcie zmodyfikowanego prekursora, co w efekcie daje aktywną biologicznie 28-aminokwasową grelinę (19).

Grelina występuje w organizmie w formie acylowanej lub desacylowanej. Stosunek stężenia pierwszej do drugiej formy ma się jak 2:1 w żołądku oraz jak 9:1 w surowicy. Forma desacylowana, w odróżnieniu od formy acylowanej zwykle nie jest aktywna biologicznie (20). Acylowana grelina uwalniana jest przede wszystkim z komórek enteroendokrynnych żołądka, a także w mniejszych ilościach z jelit, podwzgórza, przysadki mózgowej, nerek, łożyska, jąder, jajników, tarczycy i trzustki (19–21).

Receptor dla greliny (GHS-R) został odkryty w 1996 roku. Zbudowany jest z siedmiu domen przezbłonowych i należy do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G. Gen dla receptora również zlokalizowany jest na chromosomie 3 w pozycji 3q26.2. Wyróżnia się dwie postacie receptora: GHS-R1a oraz GHS-R1b. Pierwszy składa się z 366 aminokwasów i jest właściwym receptorem dla greliny, rola drugiego nie została określona (19). Ekspresję receptora GHS-R1a wykazano nie tylko w mózgu, ale także w komórkach trzustki, tarczycy, śledziony, mięśnia serca, nadnerczy, tkanki tłuszczowej oraz w komórkach układu immunologicznego (20).

Stężenia greliny w surowicy u ludzi z prawidłowym wskaźnikiem masy ciała ulegają pulsacyjnym zmianom – najwyższe występują w nocy. Związane jest to przede wszystkim z przyjmowaniem pokarmu. Podczas głodzenia stężenie greliny w surowicy zwiększa się, a 60 – 120 minut po spożyciu posiłku zaczyna się obniżać. Długotrwałe głodzenie hamuje acylację greliny, ale nie wpływa na ogólne jej wydzielanie (20).

Innymi czynnikami, które wpływają na zmiany stężenia greliny w surowicy są aktywność fizyczna oraz odpoczynek nocny. Krótkotrwałe intensywne ćwiczenia fizyczne obniżają stężenie hormonu – przede wszystkim formy acylowanej. Z drugiej

strony, systematyczny i długotrwały trening powoduje zwiększenie całkowitej i desacylowanej greliny, bez zmian w jej formie acylowanej. Podobnie brak snu podwyższa stężenie greliny (19).

Grelina odgrywa rolę nie tylko w bilansie energetycznym organizmu, ale także w procesach reprodukcyjnych. Zwiększa wydzielanie prolaktyny, hormonu adrenokortykotropowego i kortyzolu, a także obniża częstość pulsacyjnego wydzielania LH (21). Dodatkowo bierze udział w regulacji układu immunologicznego, osteoblastów, układu krążenia, proliferacji komórek nowotworowych np. w raku płuc, piersi, przysadki i tarczycy. Zaobserwowano także, że pod jej wpływem wzrasta stężenie insulinowego czynnika wzrostu IGF-I (22).

1.2.1 Udział greliny w odpowiedzi immunologicznej

W 2001 roku grupa badaczy pod kierownictwem Hattori odkryła obecność receptora dla greliny w obrębie komórek układu immunologicznego. Jego ekspresję wykazali w limfocytach typu B i T, a także w neutrofilach. Okazało się, że komórki te nie tylko mają receptor dla greliny, ale także uwalniają samą grelinę. W trakcie badań wykazano ekspresję greliny we wszystkich typach komórek B i T oraz neutrofilach i komórkach mieloidalnych (23). Dixit i wsp. przeprowadzili dokładniejsze badania i wykazali ekspresję genu preprogreliny w limfocytach T, a podczas ich aktywacji produkcję i wydzielanie greliny zarówno w formie acylowanej jak i desacylowanej (24).

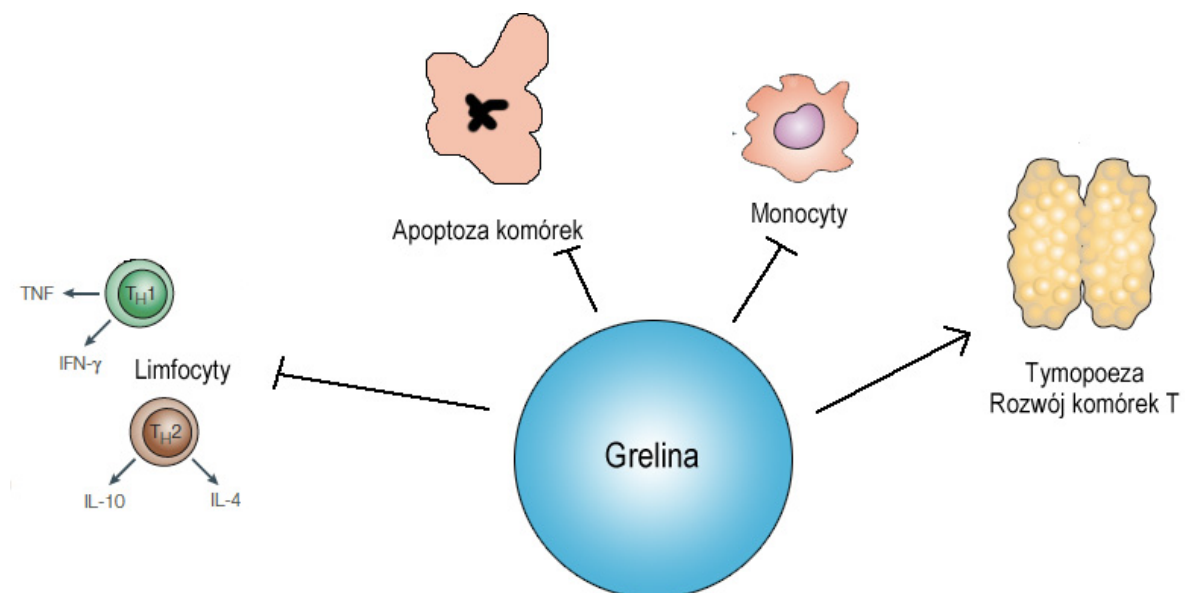
W chorobach immunologicznych jelit takich jak wrzodziejące zapalenie jelita grubego lub choroba Leśniowskiego – Crohna wykazano podwyższone stężenie greliny w surowicy; stopień zaawansowania choroby korelował ze stężeniem hormonu (25). Natomiast w surowicy pacjentów chorych na reumatoidalne zapalenie stawów, a także w doświadczalnie wywołanym zapaleniu stawów u szczurów, stwierdzono niższe stężenia greliny (26). Te odmienne wyniki sugerują pytanie, na ile stężenie greliny w surowicy zależy od samej choroby immunologicznej, a na ile od stanu odżywienia pacjentów. Wykazano, że odżywianie wpływa na stężenie greliny w stanie zapalnym. To czy podwyższone stężenie greliny w surowicy jest przyczyną czy konsekwencją stanu zapalnego było przedmiotem licznych badań, które przemawiają raczej za drugą możliwością (25,26).

Grelina hamuje wydzielanie cytokin prozapalnych takich jak IL-1 β , IL-6 i TNF- α przez limfocyty T i monocyty (24). W modelach zwierzęcych grelina wykazuje efekt

przeciwwzapalny. Podanie greliny w indukowanym zapaleniu trzustki u szczurów powodowało zmniejszenie wydzielania prozapalnej IL-1 β (27). W innym badaniu wykazano, że grelina hamuje proliferację limfocytów T w śledzionie, a także zmniejsza ekspresję mRNA cytokin limfocytów Th1 - IL-2 i interferonu- γ oraz Th2 - IL-4 i IL-10 (28).

Wiele badań wskazuje na anty-apoptotyczny efekt greliny. Apoptoza indukowana przez TNF- α oraz aktywacją kaspazy-3 w komórkach osteoblastów, hamowana jest w obecności greliny (29). Podobny efekt hormon wykazuje w komórkach β trzustki, komórkach nabłonkowych jelit, adipocytach, kardiomiocytach i komórkach śródbłonna. Apoptoza może być hamowana na drodze aktywacji przez grelinę enzymu fosfatydyloinozytolowej kinazy-3 lub hamowaniu kinazy-3 β syntezy glikogenu. Na podstawie tych doświadczeń można przypuszczać, że grelina wywiera podobny anty-apoptotyczny efekt na komórki układu immunologicznego, ale do tej pory nie przeprowadzono takich badań (30).

Wpływ greliny na poszczególne elementy układu immunologicznego przedstawiono na rycinie 1.



Rycina 1. Wpływ greliny na poszczególne elementy układu immunologicznego.

Rola greliny w etiopatogenezie endometriozy może być związana z jej oddziaływaniem na komórki układu immunologicznego, a także hamowaniem apoptozy komórek endometrialnych poza jamą macicy. Grelina może mieć swój udział również w powstawaniu nowych naczyń niezbędnych do przeżycia ektopowych tkanek endometrium (15).

1.3 Leptyna

Leptyna została odkryta w 1994 roku przez Zhanga i wsp. jako produkt genu ludzkiej otyłości (OB) (31). Gen składający się z trzech egzonów i dwóch intronów zlokalizowany jest na chromosomie 7 w pozycji 7q31.3. Produktem tego genu jest białko składające się ze 166 aminokwasów. Leptyna produkowana jest przede wszystkim przez tkankę tłuszczową, ale wykryto ją także w tkankach żołądka, gruczołu piersiowego, łożyska i serca (17).

Leptyna działa poprzez receptor dla leptyny (LEPR lub OBR), który jest zlokalizowany na chromosomie 1 w pozycji 1p31. Produktem genu składającego się z 18 egzonów oraz 17 intronów jest 1162 aminokwasowe białko. Ekspresję receptora dla leptyny wykazano w podwzgórzu, mózdzku, naczyniach, żołądku, a także łożysku (17). Kitawaki i wsp. udowodnili występowanie tego receptora także w ludzkim endometrium z pikiem ekspresji we wczesnej fazie wydzielniczej (32). Z innych prac wynika, że pik ekspresji receptora dla leptyny przypada na późną fazę wydzielniczą (33,34). Dotychczas wykazano istnienie ponad 6 izoform tego receptora (ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe i ObRf). Izoformy ObRa i ObRb odgrywają rolę w transporcie leptyny przez barierę krew – mózg. Funkcjonalną izoformą jest postać ObRb (35).

Podstawową funkcją leptyny w organizmie jest wpływ na uczucie sytości i głodu, masę ciała a także metabolizm. Dodatkowo hormon ten reguluje wydzielanie GnRH, FSH, LH, ACTH, kortyzolu i GH. Już w 1996 roku Schartz i wsp. wykazali, że stężenie leptyny w surowicy jest wyższe u ludzi z podwyższonym wskaźnikiem BMI oraz wyższym wskaźnikiem tkanki tłuszczowej. Po uwolnieniu przez tkankę tłuszczową, leptyna przekazuje informację do mózgu o bilansie energetycznym organizmu. Stężenie leptyny w surowicy wzrasta wraz z wartościami BMI i przyjmowaniem pokarmu, a maleje wraz głodem i niską zawartością tkanki tłuszczowej (36).

Leptyna wpływa pośrednio na oś podwzgórze – przysadka – gonady, gdyż wiele neuronów związanych z bilansem energetycznym anatomicznie powiązanych jest z neuronami wydzielającymi GnRH, co stanowić może ogniwo łączące gospodarkę energetyczną organizmu z zaburzeniami funkcji rozrodczych człowieka (37). Ostatnie badania sugerują, że leptyna moduluje oś podwzgórze-przysadka-gonady działając przez „kisspeptyny” – produkty genu Kiss1 oraz neurokininy B. Mutacje w zakresie

genu GPR54 receptora dla kisspeptyny powodują wystąpienie hipogonadyzmu hipogonadotropowego zarówno u myszy jak i u ludzi (38).

1.3.1 Udział leptyny w odpowiedzi immunologicznej

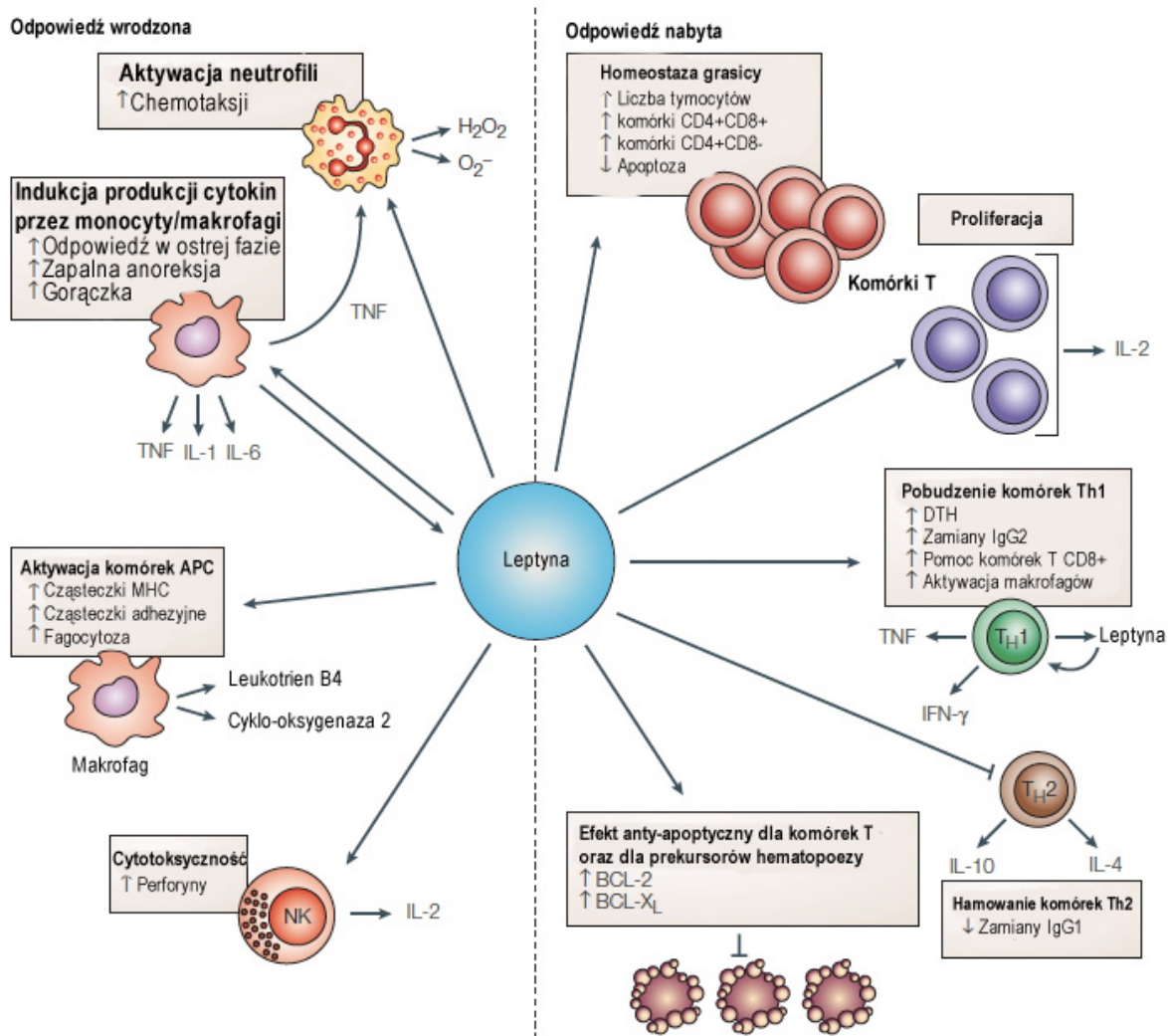
Badania nad leptyną wykazały jej rolę nie tylko w metabolizmie i odżywianiu, ale także w procesach immunologicznych. Razem z CRP, IL-1 i IL-6 bierze udział w ostrych fazach stanu zapalnego, sepsie i gorączce. Pomimo, że dobrze udowodniono właściwości prozapalne leptyny, w niektórych stanach zapalnych nie wykazano jej udziału (18).

Za wpływem leptyny na procesy immunologiczne przemawia występowanie tkanki tłuszczowej w elementach układu immunologicznego. Skupiska tkanki limfatycznej takie jak węzły chłonne, grasica i szpik kostny zawierają także tkankę tłuszczową, która poza funkcjami strukturalnymi, metabolicznymi i izolacyjnymi zapewnia specjalne mikrośrodowisko dla właściwej odpowiedzi immunologicznej.

Leptyna należy do rodziny długołańcuchowych heliktycznych cytokin. Charakteryzuje się strukturalnym podobieństwem do IL-6, IL-12, IL-15 oraz G-CSF (39). W stanach zapalnych związanych z uwolnieniem czynników ostrej fazy takich jak TNF, IL-1 i IL-6 dochodzi także do wydzielania leptyny (40). Jej działaniu podlega także rozwój i aktywacja komórek NK. Na powierzchni komórek NK wykazano ekspresję receptora dla leptyny ObRb. Na modelu mysim udowodniono, że w przypadku jego braku dochodziło do nieprawidłowego rozwoju komórek NK oraz zmniejszenia ich puli na obwodzie. Pobudzenie receptora ObRb leptyny aktywowało bezpośrednio drogę sygnału STAT3, co wpływało na działanie cytotoksyczne limfocytów NK (41,42).

Od leptyny zależy również metabolizm i przeżycie limfocytów; może ona zwiększać ekspresję transporterów glukozy GLUT1 i GLUT2 na powierzchni limfocytów. Dodatkowo leptyna ma zdolność zwiększania ekspresji białek antyapoptotycznych BCL-2 oraz BCL-X_L co chroni limfocyty T oraz komórki grasicy przed zaprogramowaną śmiercią (43).

Wpływ leptyny na poszczególne elementy układu immunologicznego przedstawiono na rycinie 2.



Rycina 2. Wpływ leptyny na poszczególne elementy układu immunologicznego według La Cava A, Matarese G (18).

Leptyna bierze udział w procesach autoimmunologicznych, szczególnie związanych z odpowiedzią zapalną. Zwiększone obwodowe stężenie leptyny u ludzi związane jest z przewlekłym stanem zapalnym oraz chorobami z autoagresji, podczas gdy obniżone stężenia leptyny hamuje powstawanie chorób autoimmunologicznych. Lord i wsp wykazali, że leptyna zaburza równowagę pomiędzy limfocytami Th1 i Th2. U myszy pozbawionych genu leptyny obserwowano zmniejszone wydzielanie cytokin Th1: IL-2, IFN- γ , TNF- α oraz IL-18 i zwiększone cytokin Th2: IL-4 i IL-10 (44). Zwierzęta te były odporne na próby indukcji chorób autoimmunologicznych.

Fraser i wsp. wykazali, że u ludzi chorych na reumatoidalne zapalenie stawów, którzy nie przyjmowali żadnych posiłków rano, co korelowało z niższym stężeniem leptyny i przewagą cytokin typu Th2, przebieg choroby był łagodniejszy (45).

Właściwości immunomodulacyjne leptyny zostały udowodnione także w innej chorobie autoimmunologicznej: eksperymentalnym autoimmunologicznym zapaleniu mózgu (EAE) – modelu stwardnienia rozsianego. Ostatnie badania przeprowadzone przez Matarese i wsp. wykazały, że leptyna jest odpowiedzialna za indukcję i rozwój EAE. Myszy pozbawione genu dla leptyny były odporne na indukcję EAE, czemu towarzyszyło zwiększone stężenie IL-4 oraz brak uwalniania IFN- γ przez limfocyty T. Substytucja leptyny generowała u tych myszy zdolność do wystąpienia EAE wtórnie do przesunięcia równowagi w kierunku komórek Th1 (46).

Badania przeprowadzone przez Galgani i wsp. wykazały, że leptyna reguluje przeżywanie komórek T CD4⁺ specyficznych dla autoantygenów: działa bezpośrednio poprzez aktywację mTOR i przeżycie genu Bcl-2 oraz pośrednio poprzez hamowanie wydzielania cytokin ważnych dla odpowiedzi autologicznej komórek T CD4⁺ takich jak IL-6, IL-15 i GM-CSF (47).

Siegmund i wsp. udowodnili, że myszy pozbawione genu dla leptyny nie rozwijają ostrego zapalenia jelit (EIC) indukowanego siarczanem sodowym dekstranu, a komórki układu odpornościowego wydzielają mniej cytokin prozapalnych oraz chemokin. Podanie leptyny tym myszom skutkowało wystąpieniem stanu zapalnego oraz produkcją cytokin na poziomie myszy z prawidłowym genem leptyny (48).

Rozważając udział leptyny w procesach autoimmunologicznych należy zwrócić uwagę, że u kobiet stężenie tego hormonu w surowicy jest 2-3 krotnie wyższe niż u mężczyzn po korekcji względem BMI oraz wieku. Predysponuje to do częstszego występowania chorób autoimmunologicznych tj. stwardnienia rozsianego, reumatoidalnego zapalenia stawów lub toczenia układowego. Hormony płciowe mają duży wpływ na stężenie leptyny u mężczyzn i kobiet. Przed okresem dojrzewania stężenie leptyny w surowicy jest na podobnym poziomie u obu płci. W trakcie okresu dojrzewania dziewczynki dochodzi do wzrostu stężenia leptyny, co idzie w parze ze wzrostem stężenia estrogenów. Kobiety w odróżnieniu od mężczyzn wykazują silniejszą odpowiedź komórek T, większą produkcję przeciwciał oraz wyższe stężenie cytokin Th1 – zwłaszcza IFN- γ oraz IL-1 (co bezpośrednio jest związane z estrogenami). Odwrotnie działają androgeny i testosteron – promują produkcję IL-4 oraz IL-5, a także zmianę odpowiedzi immunologicznej w kierunku komórek Th2 (49).

Udział leptyny w etiopatogenezie endometriozy związany może być z wymienionym wpływem na inne cytokiny prozapalne, a także na cząsteczki adhezyjne.

Lord i wsp. wykazali, że leptyna zwiększa ekspresję cząsteczek adhezyjnych – przede wszystkim międzykomórkowej cząsteczki adhezyjnej 1 (ICAM1, CD54), integryny VLA2 oraz CD49B - podjednostki integryny alfa. Leptyna działa w tym przypadku pośrednio poprzez indukcję prozapalnych cytokin jak np. interferonu gamma (44). Zwiększona ekspresja cząsteczek adhezyjnych z jednej strony może inicjować grupowanie, aktywację i migrację komórek odpornościowych do rejonu stanu zapalnego, a z drugiej strony ułatwiać przyleganie komórek endometrialnych implantów.

1.4 Transkrypcyjny czynnik jądrowy κ B (NF- κ B)

W 1986 roku Sen i Baltimore opisali transkrypcyjny czynnik jądrowy κ B (NF- κ B), który wiąże się z promotorem genu łańcucha lekkiego kappa immunoglobulin w limfocytach B i odgrywa istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej oraz procesach zapalnych (50).

Do rodziny białek NF- κ B należy 5 czynników transkrypcyjnych: NF- κ B1 (podjednostka p50 i jego prekursor p105), NF- κ B2 (podjednostka p52 i jego prekursor p100), RelA (podjednostka p65), RelB oraz c-Rel. Wszystkie białka posiadają wspólną homologiczną domenę Rel w N-końcowym odcinku łańcucha peptydowego. Podrodzina RelA, RelB i c-Rel może aktywować transkrypcję cząsteczki DNA, ponieważ posiada na C-końcowym odcinku peptydu sekwencję TAD (transcription activation domain). Drugą podrodzinę stanowią kompleksy białkowe NF- κ B1 (p105/p50) i NF- κ B2 (p100/p52) syntetyzowane jako duże białka prekursorowe p105 i p100 zawierające w odcinku C-końcowym domenę ARD (ankirin repeat domain). W wyniku proteolizy powstają postaci ostateczne podjednostek NF- κ B: p50 i p52, które posiadają domenę dzięki której mogą łączyć się z cząsteczką DNA (51).

Wszystkie białka z rodziny NF- κ B mogą występować jako homo- i heterodimery. Tylko w takiej postaci są aktywne i pełnią funkcję regulatorowych białek transkrypcyjnych. Najczęściej występującym dimerem jest p50/RelA (p50/p65) określany mianem NF- κ B. Ze wszystkich dimerów najszybciej przenika on do jądra komórkowego. Homodimery p50/p50 i p52/p52 funkcjonują jako inhibitory transkrypcji. Dopiero w połączeniu z białkiem Bcl-3 mogą ją aktywować. Z kolei RelA, RelB i c-Rel funkcjonują jako aktywatory transkrypcji (52).

NF- κ B kontroluje ekspresję około 200 genów związanych z procesami komórkowymi takimi jak proliferacja, różnicowanie i apoptoza. Jest głównym czynnikiem transkrypcyjnym regulującym geny odpowiedzialne za natychmiastową odpowiedź immunologiczną. Poprzez kaskadę fosforylacji NF- κ B przechodzi do jądra komórkowego promując ekspresję genów związanych z rozwojem komórek T, ich dojrzewaniem i proliferacją (53). Ponadto NF- κ B kontroluje geny mające udział w stanie zapalnym. W stanach zapalnych, takich jak choroby zapalne jelit, zapalenia stawów, sepsa, astma i miażdżyca stwierdzono przewlekłą aktywność tego czynnika (52).

NF- κ B jest jednym z inhibitorów apoptozy. Hamuje zaprogramowaną śmierć komórki indukowaną TNF- α lub innymi czynnikami. Myszy pozbawione podjednostki RelA umierały w 15 dniu życia płodowego na skutek masywnej apoptozy komórek wątroby. W innym badaniu, fibroblasty z niedoborem tej samej podjednostki, również wykazywały wzmożoną apoptozę (54). Komórki śródbłonka ulegają zaprogramowanej śmierci na skutek braku właściwych czynników wzrostu. Komórki, które przeżywają wykazują się zwiększoną aktywnością NF- κ B, a te które uległy apoptozie mają zdegradowaną podjednostkę RelA (53).

Wykazano również proapoptotyczną aktywność czynnika NF- κ B. W komórkach czerniaka zmniejszoną apoptozę indukowaną promieniowaniem UV tłumaczono zmniejszoną aktywnością czynnika NF- κ B (55). Natomiast zwiększona aktywacja NF- κ B kontroluje apoptozę wywołaną stresem oksydacyjnym w komórkach śródbłonka aorty. Odbywa się to przez obniżenie aktywacji białka Bcl-2, translokację białka Bax i zwiększone działanie białka p53 (56).

NF- κ B jest jednym z głównych czynników transkrypcyjnych związanych z ekspresją genów odpowiedzialnych za stan zapalny. Aktywuje on między innymi: IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, MCP-1, TNF- α , TGF- β , IFN- β , IFN- γ , naczyniowy czynnik adhezyjny 1 (VCAM-1), międzykomórkowy czynnik adhezyjny 1 (ICAM-1), czynniki pobudzające kolonizację granulocytów-makrofagów (GM-CSF), granulocytów (G-CSF) oraz geny układu zgodności tkankowej MHC (57).

Wiele badań wykazało wpływ NF- κ B na procesy związane z patogenezą endometriozy: stanem zapalnym, proliferacją komórek, apoptozą i powstawaniem nowych naczyń. Jednak dokładne mechanizmy regulujące te procesy i aktywację NF- κ B są nieznane (58).

1.4.1 Związek NF- κ B z greliną i leptyną

Wei Gen Li i wsp. badali wpływ greliny na stan zapalny w komórkach śródbłonka żyły pępowinowej. Wykazali, że grelina działa przeciwzapalnie poprzez hamowanie wytwarzania cytokiny TNF- α oraz przylegania komórek jednojądrzastych w komórkach śródbłonka. Dodatkowo stwierdzili obniżoną aktywację czynnika NF- κ B, co wiązało z działaniem greliny. W ten sposób udowodniono po raz pierwszy mechanizm działania przeciwzapalnego greliny w odpowiedzi na TNF- α i H₂O₂. Jednak molekularne podstawy odpowiedzi greliny na hamowanie aktywacji czynnika NF- κ B pozostają nieznane (59).

Zhang i wsp. oceniali ochronne działanie greliny na apoptozę komórek linii H9c2. Wykazali, że wraz ze wzrastającymi stężeniami greliny stopień apoptozy komórek zależnej od H₂O₂ był mniejszy. Aktywacja czynnika NF-κB obniżała się również wraz ze wzrostem stężeń greliny. Z tego względu autorzy postrzegają hamowanie aktywacji czynnika NF-κB przez grelinę jako jej potencjalny mechanizm modulowania apoptozy komórek (60).

Odmienne wyniki uzyskali Sung i wsp. W swoim badaniu oceniali wpływ greliny na czynnik NF-κB w komórkach B układu immunologicznego. Udowodnili, że grelina zwiększa aktywację czynnika NF-κB nawet o 50% w komórkach B, co może nasilać procesy zapalne. Taki efekt uzyskali tylko w komórkach w stanie spoczynku. Według ich obserwacji aktywowane limfocyty wykazują już maksymalną aktywację czynnika NF-κB, a dalsze stymulowanie przez receptor greliny nie przynosi istotnego efektu. Badacze potwierdzili także brak wpływu greliny na produkcję cytokin przez komórki B. Stężenia cytokin nie zmieniały się istotnie mimo zmian w aktywności NF-κB (61).

Jia – Hong Chen i wsp. w swoim badaniu wykazali zwiększenie migracji komórek gleju pod wpływem greliny, co wiązało się z jednoczesną aktywacją czynnika NF-κB. Potwierdzeniem kontroli migracji komórek przez grelinę za pomocą czynnika NF-κB było obniżenie migracji komórek po zahamowaniu aktywności NF-κB (62).

Leptyna podobnie jak grelina również wpływa na aktywację czynnika NF-κB. Proliferacja komórek mięśni gładkich naczyń zwiększa się pod wpływem leptyny. Fen Huang i wsp. wykazali, że leptyna zwiększa częstość przechodzenia komórek z fazy S do G2/M. Jednocześnie zaobserwowali zwiększoną aktywność czynnika NF-κB wraz ze zwiększającym się stężeniem leptyny. Potwierdzono tę zależność dodając do hodowli komórek inhibitor leptyny, co powodowało istotne obniżenie się aktywności NF-κB (63).

Leptyna zwiększa stężenie śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w komórkach raka piersi. Badacze pod kierownictwem Rubena Gonzalez-Perez'a wykazali, że odbywa się to między innymi poprzez aktywację czynnika NF-κB. Odpowiadają za to przede wszystkim niekanoniczne szlaki aktywacji leptyny (64).

Czynnik NF-κB może stanowić ogniwo łączące hormony leptynę i grelinę z układem immunologicznym, którego zaburzone funkcjonowanie odgrywa istotną rolę w etiopatogenezie endometriozy. W dotychczasowych badaniach wykazano udział zarówno czynnika NF-κB jak i greliny z leptyną w patogenezie endometriozy, ale żadne nie wykazały ich wzajemnych zależności.

2. Cel pracy

Nadrzędnym celem pracy było uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy grelina i leptyna jako hormony wpływające na układ immunologiczny biorą udział w etiopatogenezie endometriozy.

Cel pracy był realizowany przez:

1. Ocenę stężenia greliny i leptyny w płynie otrzewnowym oraz osoczu kobiet z i bez endometriozy.
2. Ocenę ekspresji mRNA greliny i leptyny oraz ich receptorów w eutopowym endometrium kobiet z i bez endometriozy.
3. Ocenę ekspresji mRNA greliny i leptyny oraz ich receptorów w eutopowym i ektopowym endometrium w różnych stadiach endometriozy.
4. Ocenę białek receptorów greliny i leptyny w eutopowym i ektopowym endometrium.
5. Ocenę aktywacji czynnika NF- κ B w eutopowym i ektopowym endometrium kobiet z i bez endometriozy.

3. Materiał

Badaniami objęto 88 kobiet hospitalizowanych i diagnozowanych w Klinice Rozrodczości Katedry Ginekologii, Położnictwa i Ginekologii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego imienia Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, pomiędzy listopadem 2008 a sierpniem 2012 roku. U wszystkich 88 kobiet wykonano laparoskopię i histeroskopię ze wskazań:

1. niemożność zajścia w ciążę
2. objawy kliniczne sugerujące endometriozę
3. mięśniaki macicy
4. podejrzenie wady wrodzonej macicy

Materiał do badań stanowiło eutopowe i ektopowe endometrium oraz krew i płyn otrzewnowy.

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu wyraziła zgodę na przeprowadzenie badań (zgoda nr 299/10). Wszystkie pacjentki otrzymały informację na temat badania i podpisały zgodę na ich przeprowadzenie.

Badania zostały przeprowadzone ze środków statutowych Kliniki Rozrodczości Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

3.1 Grupy badane

W zależności od wyniku laparoskopii pacjentki podzielono na 2 grupy. W przypadku stwierdzenia ognisk endometriozy na otrzewnej lub torbieli endometrialnych pacjentki kwalifikowano do grupy badanej (n=54). W przypadku nie uwidocznienia zmian charakterystycznych dla endometriozy w jamie brzusznej, pacjentki włączano do grupy kontrolnej (n=34). Kobiety z grupy kontrolnej nie miały stwierdzonej żadnej patologii w obrębie jamy otrzewnowej poza kilkoma pacjentkami z rozpoznaną wadą macicy lub niedrożnością jajowodu.

Charakterystykę obu analizowanych grup przedstawiono w tabeli I. Nie stwierdzono istotnych różnic pod względem wieku, dnia cyklu miesięczkowego, w którym uzyskano materiał i BMI.

Tabela I. Charakterystyka kobiet z i bez endometriozy

	Kobiety z endometriozą n=54	Kobiety bez endometriozy n=34	p
Wiek <i>średnia ±SD</i>	31,3 ±6,0	31,3 ±3,8	NS
Dzień cyklu <i>średnia ±SD</i>	18,1 ±7,3	17,7 ±5,1	NS
BMI (kg/m ²) <i>średnia ±SD</i>	22,0 ±2,5	22,6 ±2,7	NS

3.2 Omówienie grup badanych

3.2.1 Kobiety z endometriozą

Do tej grupy włączono 54 kobiety z endometriozą potwierdzoną badaniem histopatologicznym. U 25 kobiet stwierdzono torbiel endometrialną, a u 29 ogniska endometriozy na powierzchni otrzewnej zatoki Douglasa, więzadeł krzyżowo-maciczych, powierzchni jajnika i/lub otrzewnej ściennej jamy brzusznej. Średnia wieku pacjentek wynosiła 31,3 ±6,0 lat. Pacjentki były średnio w 18,1 ±7,3 dniu cyklu podczas pozyskiwania materiału (mediana 19; min-max: 4 – 44). W zdecydowanej większości (88,9%) pacjentki miały prawidłową masę ciała - indeks masy ciała średnio wynosił 22,0 ±2,5 (min-max: 16 – 28). Dwie pacjentki (3,7%) miały niedowagę (BMI 16,2 i 17 kg/m²) a cztery (7,4%) nadwagę (BMI 27,3 – 28,7 kg/m²).

3.2.2 Kobiety bez endometriozy

Do tej grupy włączono 34 kobiety bez wykładników endometriozy w badaniu laparoskopowym. U 5 kobiet usunięto przegrodę macicy podczas równoczesnej histeroskopii, u 1 rozpoznano hipoplazję macicy, u 1 usunięto mięśniaka macicy, a u pozostałych 27 nie stwierdzono patologii w obrębie jamy brzusznej. Średnia wieku pacjentek wynosiła 31,3 ±3,8 lat. Pacjentki były średnio w 17,7 ±5,1 dniu cyklu podczas pozyskiwania materiału (mediana 18; min-max: 7 – 26). Większość pacjentek (88,3%) miała prawidłową masę ciała – indeks masy ciała średnio wynosił 22,6 ±2,7 (min-max: 18,4 – 33,7 kg/m²). Trzy (8,8%) pacjentki miały nadwagę (BMI 25,1 – 27,3 kg/m²), a jedna (2,9%) otyłość (BMI 33,8 kg/m²).

4. Metody

Krew pobierano na czczo w dniu operacji pacjentek w ilości 5 ml do próbówki zawierającej etylenodwuaminoczeroctan (EDTA). Następnie krew odwirowywano w ciągu 10 minut od pobrania z przyspieszeniem 3000 g przez 10 minut, a osocze przenoszono do próbek typu Eppendorfa 1,5 ml i zamrażano w temperaturze -20°C do czasu wykonania oznaczeń.

Bezpośrednio po założeniu laparoskopu pobierano płyn otrzewnowy w ilości 5 ml do próbówki zawierającej EDTA. Płyn odwirowywano w ciągu 10 minut od pobrania z przyspieszeniem 3000 g przez 10 minut, a następnie przenoszono do próbek typu Eppendorfa 1,5 ml i zamrażano w temperaturze -20°C do czasu wykonania oznaczeń.

Eutopowe endometrium (błona śluzowa jamy macicy) było pobierane drogą biopsji endometrium podczas histeroskopii lub Pipellą. Ektopowe endometrium pozyskiwano z torbieli endometrialnych po ich laparoskopowym usunięciu.

4.1 Badanie stężenia greliny i leptyny w osoczu

U 50 kobiet z endometriozą oraz u 30 kobiet bez endometriozy oznaczono stężenie greliny w osoczu przy pomocy komercyjnego zestawu ELISA Human Ghrelin (#EZGRT-89K; Millipore, USA). Procedura oznaczania została wykonana zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta w Pracowni Hodowli Tkanek Kliniki Rozrodczości Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Stężenie leptyny w osoczu zostało oznaczone przy pomocy komercyjnego zestawu ELISA Human Leptin "Dual Range" (#EZHL-80SK; Millipore, USA). Procedura oznaczania została wykonana zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta w Pracowni Hodowli Tkanek Kliniki Rozrodczości.

4.2 Badanie stężenia greliny i leptyny w płynie otrzewnowym

U 50 kobiet z endometriozą oraz u 30 kobiet z grupy kontrolnej oznaczono stężenie greliny w płynie otrzewnowym przy pomocy komercyjnego zestawu ELISA Human Ghrelin (#EZGRT-89K; Millipore, USA). Procedura oznaczania została wykonana zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta w Pracowni Hodowli Tkanek Kliniki Rozrodczości.

Stężenie leptyny w płynie otrzewnowym zostało oznaczone przy pomocy komercyjnego zestawu ELISA Human Leptin "Dual Range" (#EZHL-80SK; Millipore, USA). Procedura oznaczania została wykonana zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta w Pracowni Hodowli Tkanek Kliniki Rozrodczości.

4.3 Oznaczenie ekspresji mRNA greliny, leptyny i ich receptorów

Ekspresja greliny, leptyny i ich receptorów została oznaczona w eutopowym endometrium u 32 kobiet z endometriozą i 20 kobiet z grupy kontrolnej oraz w ektopowym endometrium u 25 kobiet. Oceniono zarówno poziom względnej transkrypcji mRNA jak i poziom białka badanych czynników. Tkanki eutopowego endometrium zostały umieszczone w buforze Allprotect Tissue Reagent (Qiagen; Hilden, Niemcy), a następnie zamrożone w temperaturze -20°C do czasu wykonania oznaczeń.

Ektopowe endometrium zostało pobrane z torbieli endometrialnych. Wycinki z torbieli zawierały wszystkie warstwy ściany i zostały umieszczone w buforze Allprotect Tissue Reagent (Qiagen; Hilden, Niemcy), a następnie zamrożone w temperaturze -20°C do czasu wykonania oznaczeń.

Oznaczenia względnego poziomu transkryptów leptyny, greliny i ich receptorów w eutopowym i ektopowym endometrium wykonano w Pracowni Hodowli Tkanek Kliniki Rozrodczości. Procedura oznaczenia w eutopowym i ektopowym endometrium była taka sama.

4.3.1 Odwrotna transkrypcja

Ilościowa analiza transkryptów greliny, leptyny i ich receptorów polegała na ocenie reprezentatywnych komplementarnych cząsteczek DNA (cDNA), uzyskanych w reakcji odwrotnej transkrypcji. W celu uzyskania cDNA, 1 mg RNA poddano odwrotnej transkrypcji za pomocą zestawu odczynników QuantiTect (Qiagen; Hilden, Niemcy). Kontrolę ilości (OD; $\lambda=260$ nm) i czystości (OD; $\lambda=260/280$ nm) próbek przeprowadzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop ND1000 (ThermoScientific, USA). Jako matrycy w reakcji qPCR użyto 30 ng otrzymanego cDNA.

4.3.2 Startery

Tabela II. Sekwencja starterów użyta do reakcji RT-PCR.

Starter do RT-PCR	Sekwencja
Grelina FF	5'-GGGCAGAGGATGAACTGGAA-3'
Grelina REV	5'-CCTGGCTGTGCTGCTGGTA-3'
Receptor greliny 1a FF	5'-TCGTGGGTGCCTCGCT-3'
Receptor greliny 1a REV	5'-CACCCTACAGCCAGCATTTC-3'
Leptyna FF	5'-AAGGTTTGGTGTGTGGAGATG-3'
Leptyna REV	5'-CTCCTGTCTCTTCTTCTCTGC-3'
Receptor leptyny FF	5'-ATGTTCCGAACCCCAAGAAT-3'
Receptor leptyny REV	5'-GGACCACATGTCACTGATGC-3'
GADPH FF	5'- GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
GADPH REV	5'- GAAGATGGTGATGGGATTC-3'

Specyficzne sekwencje starterów dla ilościowej oceny względnego poziomu transkryptów badanych białek zaczerpnięto z literatury (15,65). Specyficzność starterów potwierdzono w bazie BLAST. Syntezę oligonukleotydów zamówiono w TIB-MOLBIOL Syntheselabor GmbH (Berlin, Niemcy). Swoistość i długość produktów otrzymanych w reakcji PCR z zastosowaniem wyprodukowanych starterów potwierdzono na żelu agarozowym. Sekwencje starterów przedstawiono w tabeli II.

4.3.3 Reakcja qPCR

Wszystkie reakcje prowadzono przy użyciu zestawu polimerazy Dynamo HS SYBR Green qPCR Kit (Finnzymes, Finlandia) i termocyklerze Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Australia). Specyficzność uzyskanych produktów reakcji oceniano na 2% żelu agarozowym i na podstawie drugiej pochodnej wykresu charakterystyki topnienia produktu do reakcji PCR. Profil termiczny opracowano na podstawie instrukcji w/w producentów. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil termiczny reakcji do ilościowej oceny transkryptów przedstawiono odpowiednio w tabeli III i IV.

Tabela III. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR

Składniki w kolejności dodawania	20 µl reakcji	Ostateczne stężenie	Komentarz
2x główne mieszanie	10 µl	1x	Mieszanie
Mieszanie starterów (w H₂O)	0,5 µM fwd/0,5 µM rev	2x 1 µl	W razie potrzeby miareczkowane od 0,3 do 1 µM
Wzorcowe DNA	10 ng	1 µl	Nie przekraczało 10 ng/ µl w ostatecznej reakcji
H₂O	Uzupełnienie do 20 µl		

W celu ustalenia poziomu transkryptów podanych w badanych próbkach, zostały wyznaczone krzywe standardowe, oparte na wartościach CT (cykl w którym krzywa amplifikacji odzwierciedla przyrost produktu reakcji według zasady $y_n=2^n$; gdzie y_n jest ilością produktu wygenerowaną w n cyklu reakcji) z sześciu kolejnych dziesięciokrotnych rozcieńczeń liniowego DNA, który jest produktem specyficznej pary starterów. Dla każdej próbki kopiowanie zostało przetworzone w obecności kontroli dodatniej i kontroli negatywnej, bez matrycy cDNA. Poziomy CT dla każdej próby badanej odnoszono do krzywej kalibracyjnej. Względny poziom transkrypcji greliny, leptyny i ich receptorów ustalono w relacji do transkryptu genu o konstytutywnej ekspresji (house keeping gene) dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH).

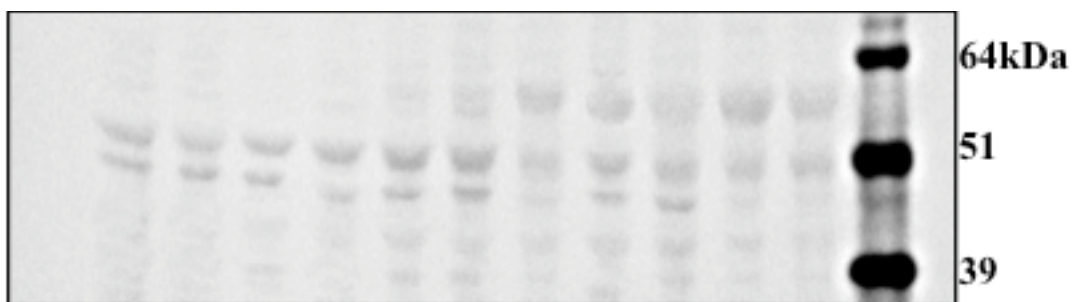
Tabela IV. Profil termiczny reakcji PCR

Cykl	Punkt cyklu
Aktywacja polimerazy: 95°C, 15 min	
Cykl reakcji (45 powtórzeń)	Denaturacja matrycy: 94°C, 10 sek
	Przyłączanie starterów: 62°C, 20 sek
	Tworzenie komplementarnej nici: 72°C, 30 sek, odczyt przyrostu produktu na podstawie wzrostu fluorescencji pochodzącej od fluoroforu SYBRGreen.
Dokończenie reakcji: 72°C, 10 min	
Topienie dwuniciowego produktu w przedziale 72-95°C,	Wyznaczenie drugiej pochodnej krzywej topnienia, w celu oznaczenia swoistości produktu

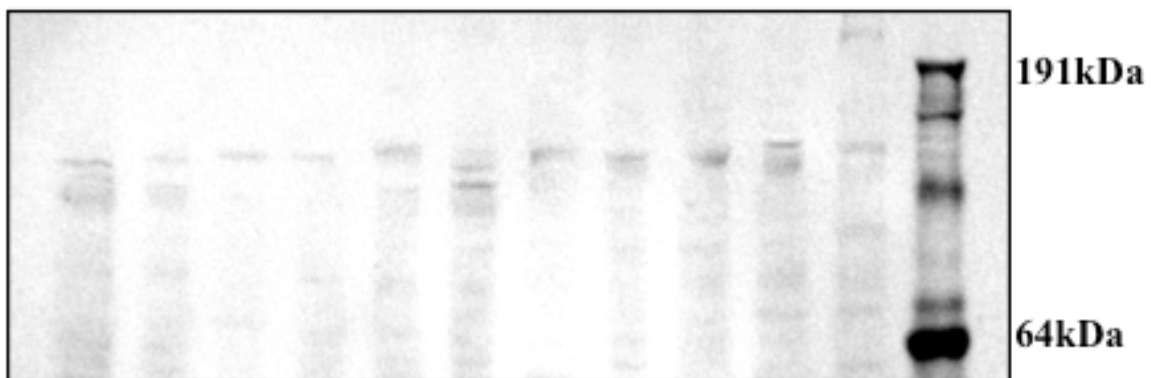
4.4 Izolacja białka receptorów greliny i leptyny oraz analiza Western blot

Dwadzieścia losowo wybranych fragmentów tkanek pochodzących z eutopowego endometrium i 20 z torbieli endometrialnych od kobiet z rozpoznaną endometriozą oraz 20 z eutopowego endometrium od kobiet bez endometriozy poddano badaniu na obecność białka receptorów dla greliny i leptyny przy użyciu metody Western blot. Analizę wykonano w Zakładzie Biochemii Produktów Naturalnych Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Izolację białka przeprowadzono przy pomocy odczynników AllPrep DNA / RNA / Protein Mini Kit (Qiagen, Niemcy). Trzydzieści mg białka z uzyskanych ekstraktów białkowych, rozdzielano elektroforetycznie w 4-12% żelu SDS-poliakrylamidowym (NuPAGE Bis-Tris, Invitrogen). Rozdzielone białka przeniesiono na błonę PVDF i zablokowano TBST (TBS plus 0,1% Tween-20), zawierającym 4% BSA. Immunodetekcję wykonano przy użyciu króliczego przeciwciała poliklonalnego Grelin Receptor (LSBio, LifeSpan) i króliczego przeciwciała poliklonalnego anty-ObR (H-300, 200 mg / ml; SantaCruz, USA) w

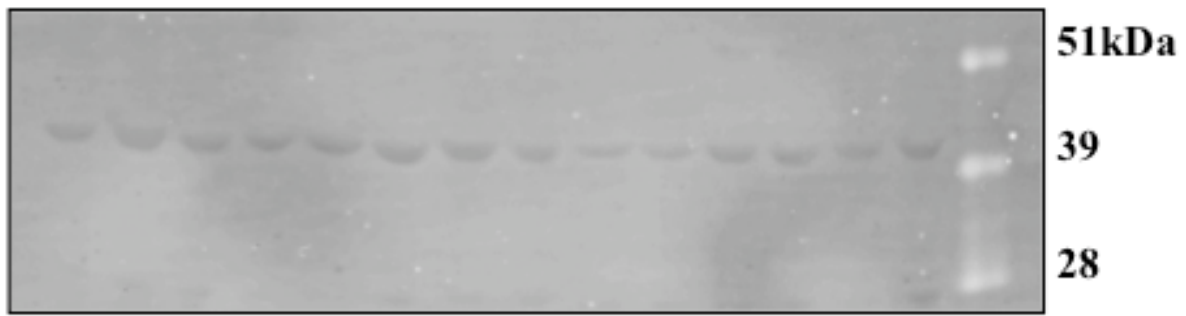
rozcieńczeniach 1:200. Do wykrywania ACTB, królicze poliklonalne przeciwciała anti-ACTB zastosowano w stężeniu 1:400 (N-21, 100 ng / ml), (SantaCruz, USA). Kozie antykrólicze przeciwciała sprzężone z fluoroforem Alexa Fluor 663 (Invitrogen, USA), zostało użyte jako przeciwciała wtórne. Kompleksy antygen-przeciwciała zostały ujawnione za pomocą skanera Fuji FLA5100 (FujiFilm, Japonia). Ilość białka wykryta przy pomocy Western-blot została wyrażona na podstawie gęstości optycznej sygnału. Odczyty densytometryczne zostały znormalizowane w oparciu o kontrolny odczyt białka β -aktyny. Przykładowe wyniki Western-blot analizy białka receptora greliny, receptora leptyny i białka β -aktyny przedstawiono odpowiednio na rycinach 3, 4 i 5.



Rycina 3. Przykładowe wyniki Western-blot białka receptora greliny.



Rycina 4. Przykładowe wyniki Western-blot białka receptora leptyny.



Rycina 5. Przykładowe wyniki Western-blot białka β -aktyny.

4.5 Oznaczenie aktywności czynnika NF-kB

Aktywność czynnika NF-kB została oznaczona w próbkach eutopowego endometrium od losowo wybranych 12 kobiet bez endometriozy i 16 kobiet z endometriozą. Spośród tych 16 kobiet od 12 uzyskano ektopowe endometrium. Oznaczenie wykonano przy użyciu zestawu TransAM NFkB p65 (Active Motif, USA) w Pracowni Hodowli Tkanek Kiniki Rozrodczości. Izolację białka przeprowadzono przy pomocy odczynników AllPrep DNA / RNA / Protein Mini Kit (Qiagen, Niemcy). Czterdzieści μ g białka przeniesiono do nowej probówki i dodano 6 objętości zimnego (-20°C) acetonu w celu wytrącenia białka. Po 24 godzinnej inkubacji w temperaturze -20°C wykonano wirowanie przez 10 minut z przyspieszeniem 12100 g, w 4°C . Materiał pozostawiono w RT do całkowitego odparowania acetonu. Następnie dodano 45 μ l buforu AM2 z zestawu TransAM NFkB p65. Po wymieszaniu i inkubowaniu w 4°C przez 1 godzinę materiał ponownie wirowano przez 10 minut z przyspieszeniem 12100 g, a otrzymany supernatant użyto do reakcji oznaczenia aktywności NF-kB p65. Oznaczenia wykonano według instrukcji dostarczonej przez producenta. Zestaw TransAM NFkB zawiera płytki opłaszczane oligonukleotydem zawierającym zgodny region NFkB podjednostki p65 (5'-GGGACTTCC-3'). Aktywna forma czynnika NF-kB wiąże się specyficznie z oligonukleotydem. Pierwszorzędowe przeciwciała użyte do detekcji NF-kB rozpoznają epitop specyficzny dla podjednostki p65 tylko gdy jest ona aktywowana i wiąże się z docelowym regionem DNA. Drugorzędowe przeciwciała, skoniugowane z HRP zapewniają czuły odczyt kolorometryczny barwnego produktu reakcji enzymatycznej przy $\lambda=450\text{nm}$. Oznaczenia każdej próbki wykonano w duplikacji. Ilość aktywnego białka NFkB p65 przedstawiono w relacji do wzorca – 2,5ng/ml frakcji jądrowej z ekstraktu białkowego komórek linii Jurkat (TPA+Cl).

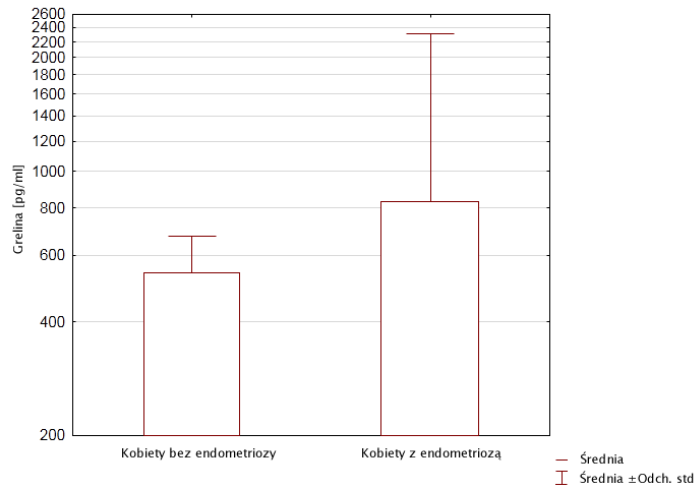
4.6 Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej użyto programu firmy StatSoft Statistica w wersji 10. Do oceny normalności rozkładu badanych zmiennych w skali interwałowej użyto testu Shapiro-Wilka. W przypadku normalności rozkładu badanej zmiennej w obu grupach do oceny istotności różnic użyto testu t-Studenta. Do oceny istotności różnic w przypadku braku normalności rozkładu zmiennej w skali interwałowej oraz zmiennych mierzonych w skali porządkowej użyto testu Manna – Whitneya. Do oceny korelacji zmiennych wykorzystano test korelacji rangowej Spearmana. Krzywa ROC została określona przy pomocy zestawu medycznego będącego dodatkiem do programu Statistica 10. Za granicę istotności statystycznej przyjęto $p < 0,05$.

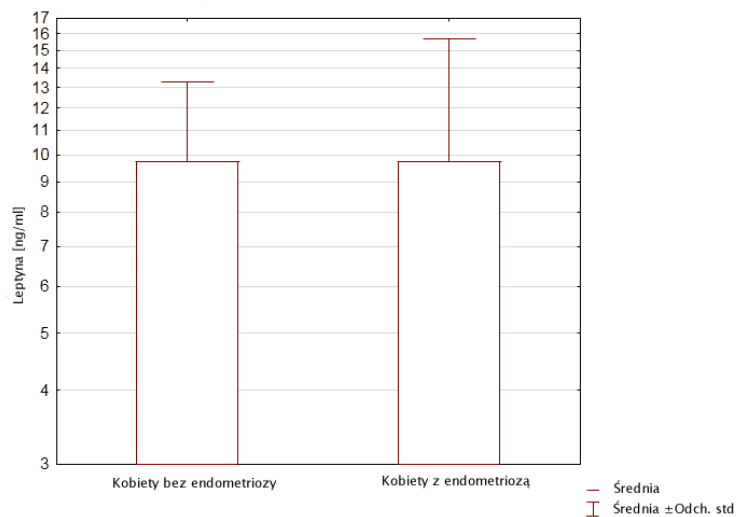
5. Wyniki

5.1 Stężenie greliny i leptyny w osoczu

U kobiet z endometriozą średnie stężenie greliny w osoczu wynosiło 829 pg/ml \pm 1475 i było wyższe niż u kobiet bez endometriozy (537 pg/ml \pm 138), ale różnica nie była istotna statystycznie ($p=0,09$, ryc. 6). Natomiast stężenie leptyny w osoczu było jednakowe w obu grupach 9,7 ng/ml \pm 5,9 vs 9,7 ng/ml \pm 3,5 (ryc. 7).



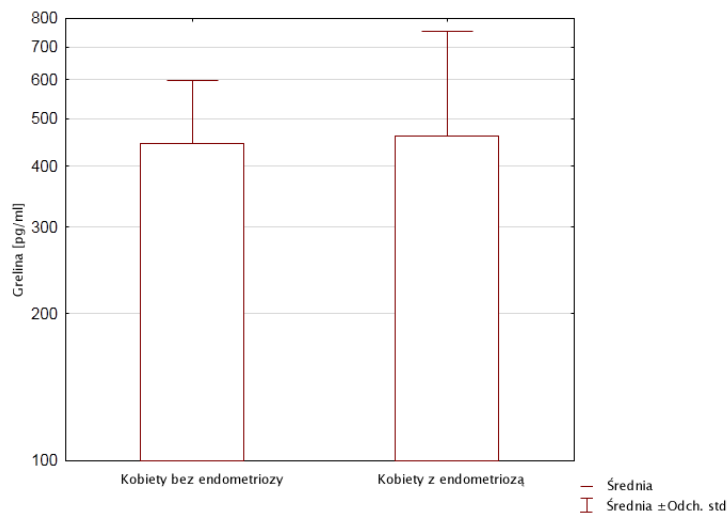
Rycina 6. Stężenie greliny w osoczu kobiet z i bez endometriozy.



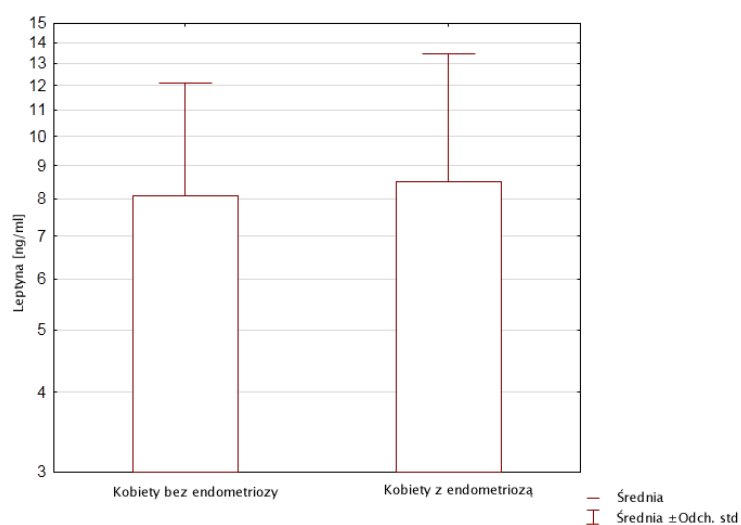
Rycina 7. Stężenie leptyny w osoczu kobiet z i bez endometriozy.

5.2 Stężenie greliny i leptyny w płynie otrzewnowym

Średnie stężenie greliny w płynie otrzewnowym było porównywalne u kobiet z endometriozą i u kobiet bez endometriozy. Wynosiło odpowiednio 458 pg/ml \pm 292 i 442 pg/ml \pm 155 (ryc. 8). Podobnie średnie stężenie leptyny w płynie otrzewnowym nie różniło się między badanymi grupami; u kobiet z endometriozą wynosiło 8,4 ng/ml \pm 4,9 a u kobiet bez endometriozy 8,0 ng/ml \pm 4,0 (ryc. 9).



Rycina 8. Stężenie greliny w płynie otrzewnowym kobiet z i bez endometriozy.



Rycina 9. Stężenie leptyny w płynie otrzewnowym kobiet z i bez endometriozy.

U kobiet z endometriozą stwierdzono istotną statystycznie dodatnią korelację między stężeniem greliny w osoczu a stężeniem greliny w płynie otrzewnowym (współczynnik korelacji rangowej Spearmana $R=0,56$, $p<0,001$). Stężenie leptyny w osoczu również istotnie korelowało dodatnio ze stężeniem leptyny w płynie otrzewnowym ($R=0,56$, $p<0,001$). Podobnie u kobiet bez endometriozy stwierdzono istotną statystycznie dodatnią korelację między stężeniem greliny i leptyny w osoczu i płynie otrzewnowym (współczynnik korelacji rangowej Spearmana wynosił odpowiednio $R=0,44$, $p=0,008$ i $R=0,70$, $p<0,001$).

Nie uzyskano istotnej korelacji pomiędzy stopniem endometriozy a stężeniem greliny i leptyny ani w osoczu, ani w płynie otrzewnowym.

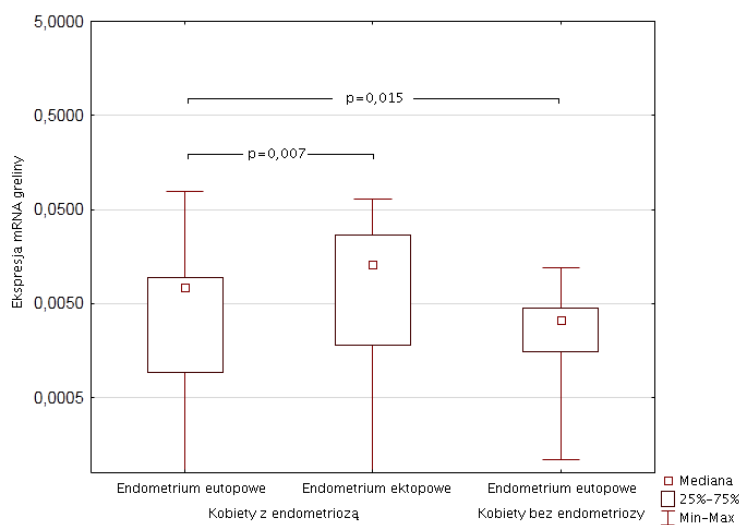
Wszystkie przedstawione powyżej wyniki w osoczu i płynie otrzewnowym były tak samo istotne po uwzględnieniu BMI pacjentek.

5.3 Ekspresja mRNA greliny, leptyny i ich receptorów

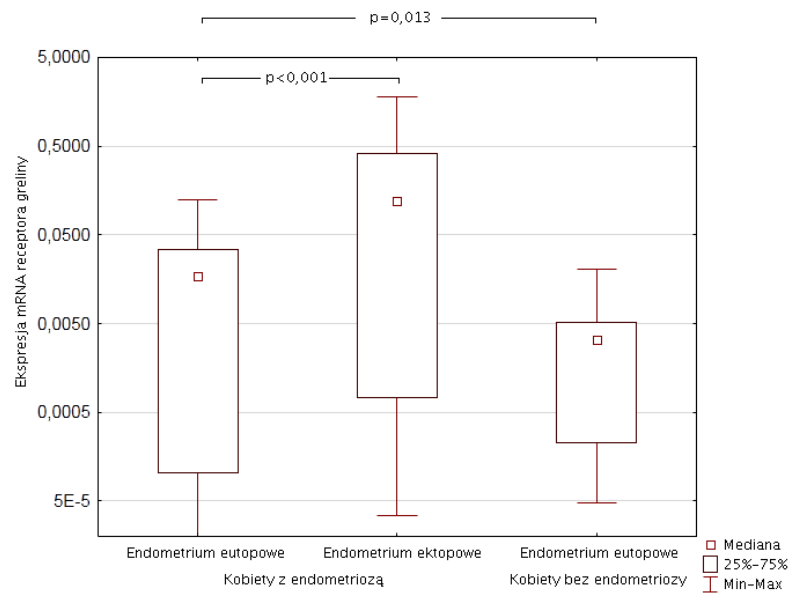
Mediana stosunku transkryptu genu greliny do genu referencyjnego w eutopowym endometrium u kobiet z endometriozą wynosiła 0,007 (min.-max. 0 – 0,08) i była istotnie wyższa niż u kobiet bez endometriozy 0,0034 (min.-max. 0,0001 – 0,012), $p=0,015$. Najwyższą ekspresję mRNA greliny stwierdzono w ektopowym endometrium pozyskanym z torbieli endometrialnych (mediana 0,013; min.-max. 0 – 0,064; $p=0,007$), (ryc. 10).

Na rycinie 11 przedstawiono ekspresję mRNA genu receptora greliny w eutopowym i ektopowym endometrium. Najwyższą ekspresję (mediana 0,119; min.-max. 0,00003 – 1,82) zanotowano w ektopowym endometrium. Była ona istotnie wyższa ($p<0,001$) w stosunku to ekspresji w endometrium eutopowym kobiet z endometriozą. Ekspresja mRNA genu receptora greliny różniła się również w eutopowym endometrium obu grup kobiet i była istotnie wyższa ($p=0,013$) u kobiet z endometriozą - 0,0170 (min.-max. 0 – 0,12) vs 0,0033 (min.-max. 0 – 0,021).

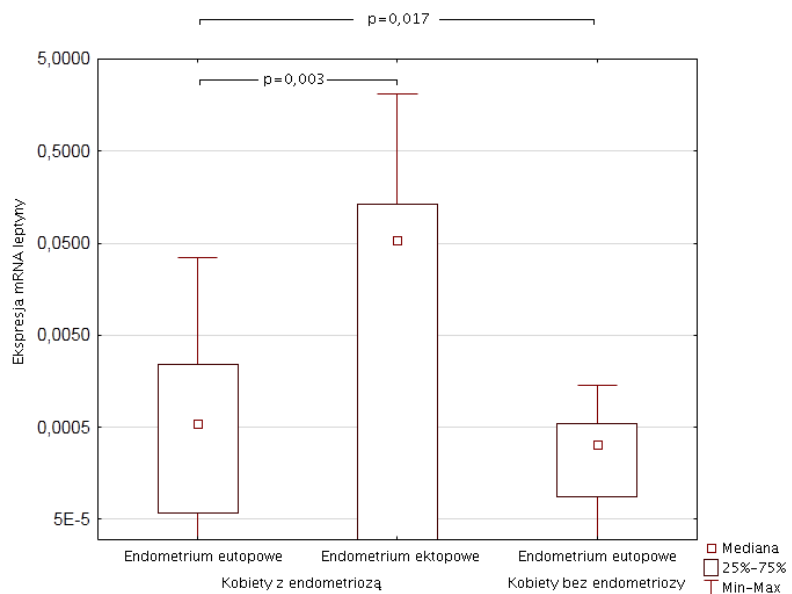
Ekspresja zarówno mRNA genu leptyny jak i mRNA genu receptora leptyny były najwyższe w wycinkach z torbieli endometrialnych. Jak zobrazowano na rycinach 12 i 13 wartości te różniły się istotnie od uzyskanych w endometrium eutopowym zarówno kobiet z, jak i bez endometriozy. Podczas gdy uzyskano istotne różnice między grupami w ekspresji mRNA genu leptyny w eutopowym endometrium (0,0005 [min.-max. 0 – 0,034] vs 0,0003 [min.-max. 0 – 0,001], $p=0,017$), to ekspresja mRNA genu receptora leptyny była w obu grupach podobna.



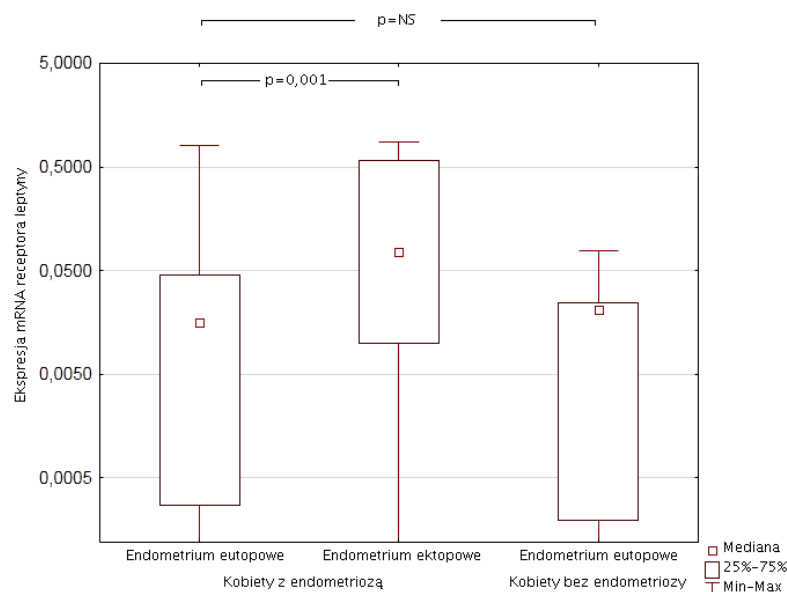
Rycina 10. Ekspresja mRNA genu greliny w endometrium eutopowym i ektopowym wyrażona jako stosunek transkryptu genu greliny do genu referencyjnego.



Rycina 11. Ekspresja mRNA genu receptora greliny wyrażona jako stosunek transkryptu genu receptora greliny do genu referencyjnego.



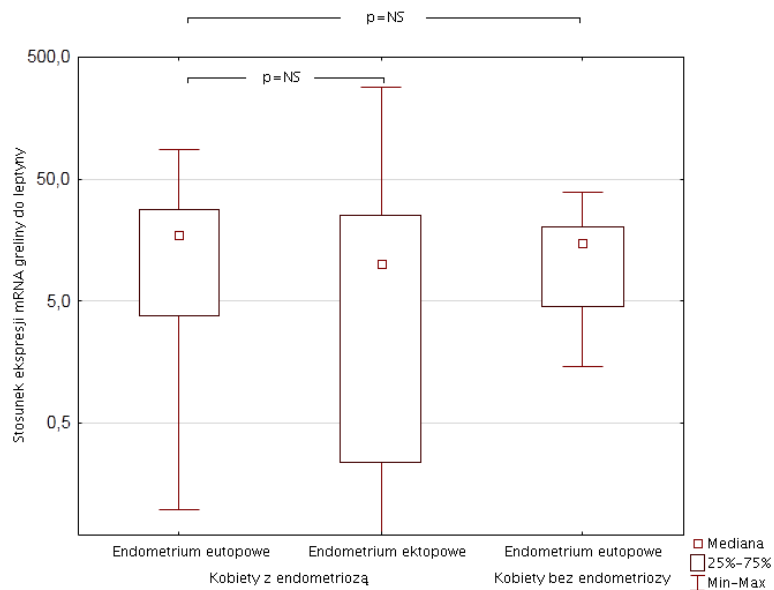
Rycina 12. Ekspresja mRNA genu leptyny wyrażona jako stosunek transkryptu genu leptyny do genu referencyjnego.



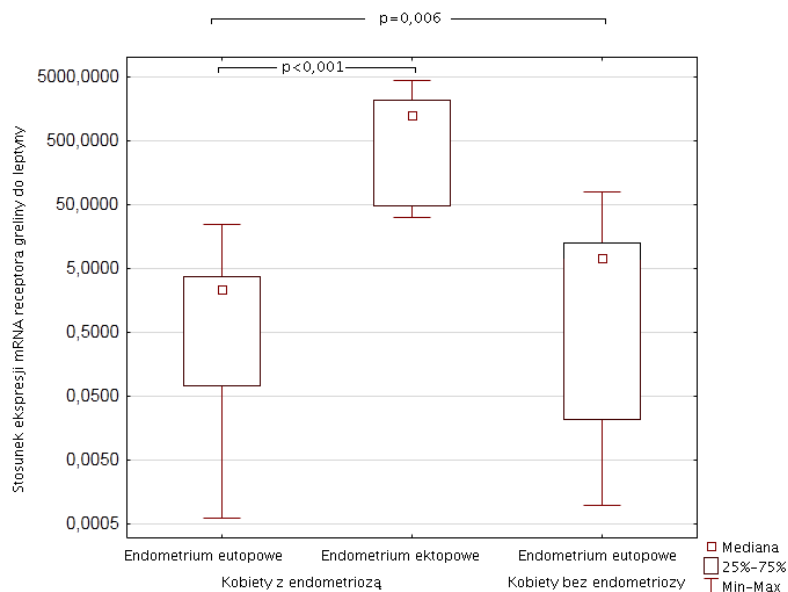
Rycina 13. Ekspresja mRNA genu receptora leptyny wyrażona jako stosunek transkryptu genu receptora leptyny do genu referencyjnego.

Stosunek ekspresji mRNA genu greliny do leptyny był najwyższy w eutopowym endometrium kobiet z endometriozą (mediana 17,24; min. – max. 0,09 – 87,4), a najniższy w ectopowym endometrium (mediana 10,46; min. – max. 0 – 285). Nie uzyskano istotnych różnic w stosunku ekspresji mRNA genu greliny do leptyny ani między ectopowym i eutopowym endometrium kobiet z endometriozą, ani między eutopowym endometrium od obu grup kobiet (ryc. 14).

Natomiast mediana stosunku ekspresji mRNA genu receptora greliny do receptora leptyny była najwyższa w wycinkach z torbieli (mediana 1226,24; min.-max. 31,17 – 4399) i różniła się statystycznie od wartości uzyskanych w eutopowym endometrium kobiet z endometriozą ($p < 0,001$). Na uwagę zasługuje wyższy istotnie ($p = 0,006$) stosunek ekspresji mRNA genu receptora greliny do leptyny w endometrium kobiet bez endometriozy w porównaniu do grupy badanej – odpowiednio 7,21 (min. -max. 0,0009 – 77,5) i 2,35 (min.-max. 0,0006 – 24,4) - co przedstawiono na rycinie 15.



Rycina 14. Stosunek ekspresji mRNA genu greliny do leptyny w eutopowym i ektopowym endometrium.



Rycina 15. Stosunek ekspresji mRNA genu receptora greliny do receptora leptyny w eutopowym i ektopowym endometrium.

W eutopowym endometrium kobiet z endometriozą ekspresja mRNA greliny korelowała dodatnio z ekspresją receptora greliny ($R=0,67$, $p<0,001$), podobnie ekspresja mRNA leptyny korelowała dodatnio z ekspresją receptora leptyny ($R=0,34$, $p=0,011$).

Takich korelacji nie zaobserwowano ani w ektopowym endometrium kobiet z endometriozą, ani w eutopowym endometrium kobiet bez endometriozy.

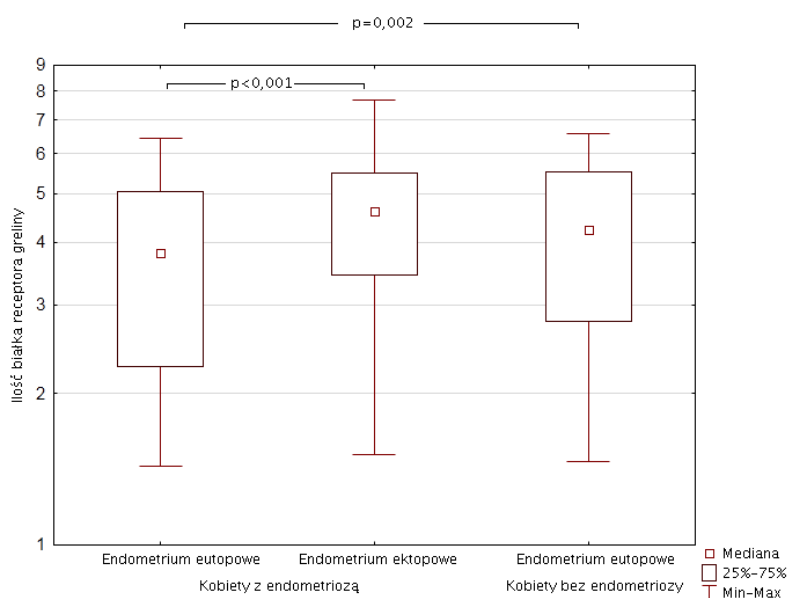
Nie uzyskano istotnej korelacji pomiędzy stopniem endometriozy, a ekspresją greliny, leptyny i ich receptorów u kobiet z endometriozą.

Wszystkie przedstawione powyżej wyniki ekspresji mRNA były tak samo istotne po uwzględnieniu BMI pacjentek.

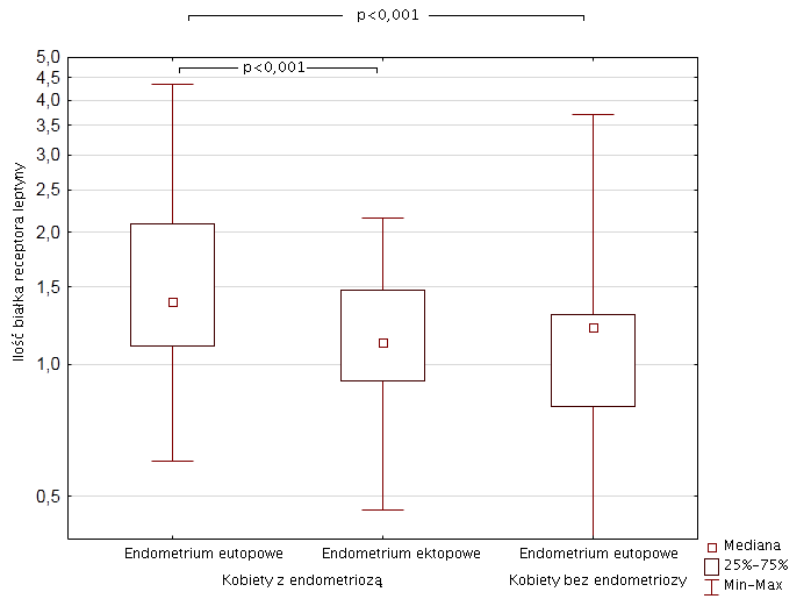
5.4 Ocena ilości białka receptora greliny i leptyny

Najwyższą medianę ilości białka receptora greliny ocenioną przy pomocy Western-blot uzyskano w wycinkach z torbieli endometrialnych - 4,6 (min.-max. 1,5 – 7,6). Wartości te były istotnie wyższe ($p < 0,001$) niż w endometrium kobiet z endometriozą - 3,8 (min.-max. 1,43 – 6,44), ale nie różniły się statystycznie od wartości uzyskanych w endometrium kobiet bez endometriozy. Istotną różnicę uzyskano natomiast między grupami w eutopowym endometrium, gdzie wyższe wartości ilości białka receptora greliny wykazano u kobiet bez endometriozy - 4,24 (min.-max. 1,46 – 6,59), $p = 0,002$ (ryc. 16).

Zupełnie inne wyniki uzyskano w odniesieniu do mediany ilości białka receptora leptyny. W wycinkach z torbieli endometrialnych wykazano najniższą ilość białka receptora leptyny - 1,12 (min.-max. 0,46 – 2,14). Wartości te były istotnie niższe tylko w odniesieniu do eutopowego endometrium kobiet z endometriozą - 1,38 (min.-max. 0,60 – 4,34), $p < 0,001$. Uzyskano natomiast istotne różnice w ilości białka receptora leptyny w eutopowym endometrium między grupami. U kobiet bez endometriozy wartości były istotnie niższe - 1,21 (min.-max. 0 – 3,7), $p < 0,001$ (ryc. 17).

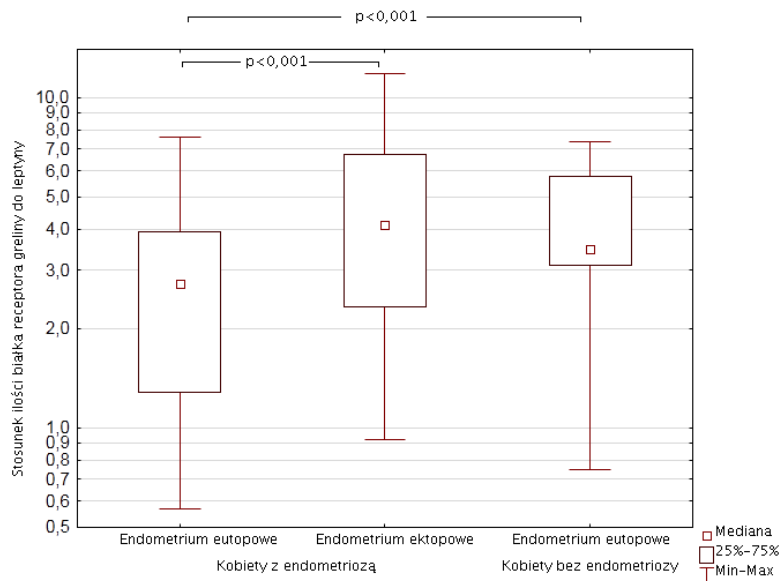


Rycina 16. Ilość białka receptora greliny w endometrium eutopowym i ektopowym.



Rycina 17. Ilość białka receptora leptyny w endometrium eutopowym i ektopowym.

Mediana stosunku ilości białka receptora greliny do receptora leptyny była najwyższa w wycinkach z torbieli endometrialnych - 4,10 (min.-max. 0,92 - 11,7) i różniła się statystycznie ($p < 0,001$) od wartości uzyskanych w endometrium eutopowym kobiet z endometriozą - 2,74 (min.-max. 0,57 - 7,62). W odniesieniu do eutopowego endometrium obu grup kobiet stosunek ten był istotnie wyższy u pacjentek bez endometriozy - 3,49 (min.-max. 0,74 - 7,37), $p < 0,001$ (ryc. 18).



Rycina 18. Stosunek ilości białka receptora greliny do receptora leptyny w endometrium eutopowym oraz ektopowym.

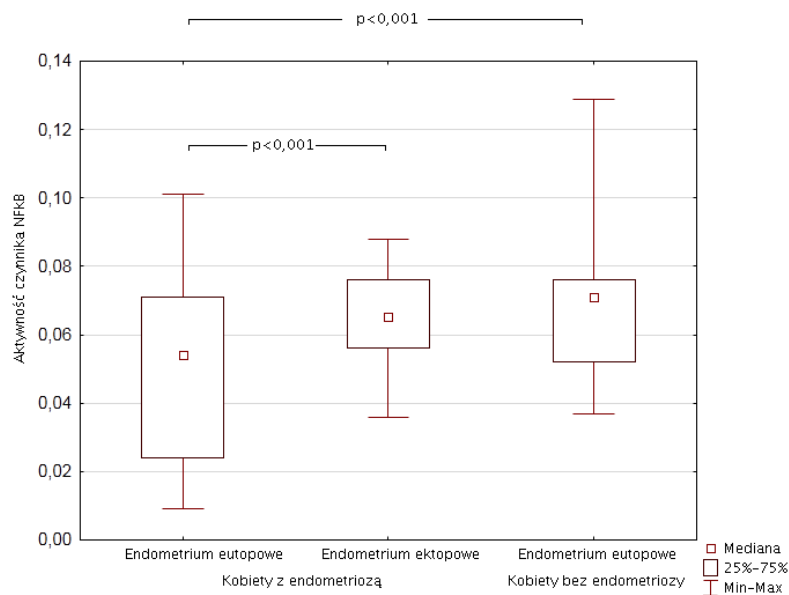
Zarówno w eutopowym jak i ektopowym endometrium nie zaobserwowano istotnych statystycznie korelacji pomiędzy ilością białka receptorów greliny i leptyny a pozostałymi badanymi parametrami.

Wszystkie przedstawione powyżej wyniki ilości białek receptorów greliny i leptyny były tak samo istotne po uwzględnieniu BMI pacjentek.

5.5 Ocena aktywności czynnika NF- κ B

Aktywność czynnika NF- κ B wyrażona jako wartość absorbancji $\lambda=450\text{nm}$ była najwyższa w endometrium kobiet bez endometriozy - 0,071 (min.-max. 0,037 – 0,129). Natomiast wartości uzyskane w endometrium eutopowym kobiet z endometriozą i wycinkach z torbieli endometrialnych były istotnie niższe, odpowiednio 0,054 (min.-max. 0,009 – 0,101) i 0,065 (min.-max. 0,36 – 0,088) (ryc. 19).

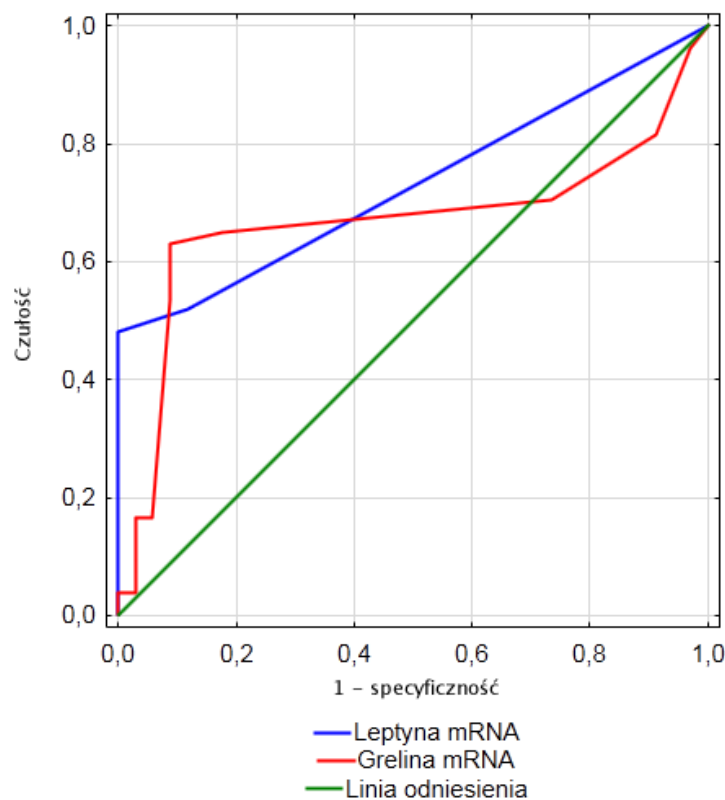
W endometrium eutopowym jak i ektopowym nie uzyskano korelacji pomiędzy aktywnością czynnika NF- κ B, a ekspresją greliny i leptyny. Nie odnotowano również istotnej korelacji pomiędzy stopniem endometriozy a aktywnością czynnika NF- κ B.



Rycina 19. Aktywność czynnika NF- κ B w eutopowym i ektopowym endometrium.

5.6 Krzywe ROC ekspresji mRNA greliny i leptyny w eutopowym endometrium

Po zastosowaniu krzywych ROC (Receiver Operating Characteristic) stwierdzono, że wartości ekspresji greliny w eutopowym endometrium różnicowały z 63% czułością i 91,2% swoistością przy punkcie odcięcia $\geq 0,005$ kobiety z endometriozą (pole pod krzywą AUC – 0,66), a wartości ekspresji leptyny w eutopowym endometrium różnicowały z 48% czułością i 100% swoistością przy punkcie odcięcia $\geq 0,002$ kobiety z endometriozą (pole pod krzywą AUC – 0,72), co przedstawiono graficznie na rycinie 20.



Rycina 20. Krzywe ROC dla ekspresji mRNA genu greliny i leptyny w eutopowym endometrium kobiet z endometriozą w stosunku do kobiet bez endometriozy.

6. Dyskusja

Grelina i leptyna są hormonami, które poza regulacją odżywiania, modulują działanie układu immunologicznego. Wśród współczesnych teorii powstawania endometriozy dominuje teoria zmienionej odpowiedzi immunologicznej organizmu z towarzyszącym przewlekłym stanem zapalnym (1). Jednak nadal nie poznano wszystkich mechanizmów zmieniających działanie układu odpornościowego u kobiet z endometriozą. Biorąc pod uwagę uzyskane przeze mnie wyniki można przypuszczać, że grelina i leptyna mają swój udział w nieprawidłowym działaniu układu immunologicznego u kobiet z endometriozą, a tym samym w etiopatogenezie endometriozy.

6.1 Stężenie greliny i leptyny w osoczu

Stężenie greliny w osoczu w przeprowadzonych przeze mnie badaniach było wyższe u kobiet z endometriozą, ale bez statystycznej istotności. Natomiast stężenie leptyny w osoczu kobiet z endometriozą nie różniło się istotnie od stężenia u kobiet bez endometriozy.

W bazie PubMed brak jest prac analizujących stężenie greliny w osoczu kobiet z endometriozą. Stężenie greliny w osoczu regulowane jest przez uczucie głodu i sytości, dlatego niektóre pokarmy czy sposób odżywiania się może odgrywać rolę w patogenezie endometriozy. Wiele uwagi zwraca się na odpowiedni dobór diety u kobiet z endometriozą jako formy zapobiegania rozwojowi choroby. Przyjmowanie odpowiednich produktów może również zmniejszać dolegliwości bólowe związane z endometriozą (5). Być może nie tylko sama dieta ma znaczenie, ale także jej wpływ na stężenie greliny. Kobiety chore na endometriozę są zwykle szczupłe, co może być związane z mniejszym spożywaniem pokarmów. U takich osób należy się spodziewać wyższych stężeń greliny. W materiale własnym stężenie greliny w osoczu kobiet z endometriozą było wyższe niż w osoczu kobiet bez endometriozy, ale bez istotności statystycznej. Indeks masy ciała kobiet z grupy badanej jak i z kontrolnej był porównywalny, a różnice w stężeniu greliny w osoczu po uwzględnieniu BMI również nie uzyskały istotności statystycznej.

Pandey i wsp. oceniali stężenie leptyny i adiponektyny w osoczu i płynie otrzewnowym u kobiet z i bez endometriozy. Zarówno stężenie leptyny, jak i adiponektyny było porównywalne u kobiet z grupy badanej i kontrolnej, także po korekcji ich stężeń względem indeksu masy ciała (66). Podobnie Gungor i wsp. ocenili stężenie leptyny w osoczu i płynie otrzewnowym u kobiet z niewyjaśnioną niepłodnością, z zespołem policystycznych jajników, z obustronną niedrożnością jajowodów oraz z endometriozą. Autorzy ci nie uzyskali istotnej różnicy w stężeniu leptyny w osoczu kobiet z i bez endometriozy (67). Także w badaniach Wertel i wsp. u kobiet z i bez endometriozy stężenia leptyny w osoczu były podobne (68). Ciekawe wyniki uzyskali Matalliotakis i wsp. w pracy oceniającej wpływ terapii danazolem i leuproreliną u kobiet z endometriozą na stężenia leptyny w osoczu. U kobiet z rozpoznaną endometriozą oznaczano stężenie leptyny przed, podczas i po 6 miesięcznej terapii danazolem lub analogiem gonadoliberyny. Grupę kontrolną stanowiły kobiety bez endometriozy. Stężenia leptyny w osoczu kobiet z endometriozą nie różniły się istotnie od kobiet bez endometriozy, ale były wyższe w trakcie i po terapii niż przed wdrożeniem leczenia farmakologicznego, co autorzy tłumaczą działaniem osi podwzgórzowo-przysadkowej pod wpływem zastosowanych leków (69). Odmienne wyniki uzyskali Matarese i wsp. W ich badaniach stężenie leptyny w osoczu było istotnie wyższe u kobiet z endometriozą. Ponadto stężenia leptyny były istotnie wyższe w niskich stopniach endometriozy w porównaniu do bardziej zaawansowanych stadiów choroby. Należy jednak zaznaczyć, że grupa badana i kontrolna były dość małe, odpowiednio 13 i 15 kobiet (14). W materiale własnym nie stwierdzono korelacji pomiędzy stopniem endometriozy, a stężeniem leptyny w osoczu.

6.2 Stężenie greliny i leptyny w płynie otrzewnowym

Płyn otrzewnowy kobiet chorych na endometriozę był przedmiotem licznych badań. Powstaje on głównie na skutek przesączania osocza, jednak za jego produkcję odpowiedzialne są też makrofagi. Ze względu na bezpośredni kontakt płynu otrzewnowego z implantami endometrialnymi jest on postrzegany jako ważny czynnik wpływający na rozwój endometriozy (5). W dotychczasowym piśmiennictwie widnieje tylko jedna praca analizująca stężenie greliny w płynie otrzewnowym kobiet z

endometriozą. Dziunycz i wsp. analizowali stężenie greliny w płynie otrzewnowym i jej związek ze stężeniem VEGF. Stwierdzili istotnie statystycznie wyższe stężenia greliny w płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą oraz dodatnią korelację jej stężenia ze stężeniem VEGF. Autorzy przypuszczają, że grelina zawarta w płynie otrzewnowym może być produkowana przez ogniska endometriozy na otrzewnej. Związek greliny z VEGF może sugerować jej udział w etiopatogenezie endometriozy, a dokładnie w procesie angiogenezy. Natomiast badacze nie wykazali zależności między stężeniem greliny a stężeniami cytokin IL-1 β , TNF i IL-6 w płynie otrzewnowym. Wiadomo, że wymienione cytokiny odgrywają rolę w patogenezie endometriozy. Jednak brak zależności między badanymi czynnikami autorzy tłumaczą innym ich pochodzeniem: grelina może być wydzielana przede wszystkim przez ogniska endometrialne, a cytokiny produkowane są głównie przez makrofagi. Zwracają oni uwagę, że brak zależności między greliną a wymienionymi cytokinami nie wyklucza modulującego wpływu hormonu na komórki układu immunologicznego (15).

W materiale własnym stężenie greliny w płynie otrzewnowym było wyższe w grupie kobiet z endometriozą, jednak bez istotności statystycznej. Przyczyną takich wyników może być 46% odsetek torbieli endometrialnych bez towarzyszących ognisk na otrzewnej. Należy brać również pod uwagę różne etapy choroby u pacjentek oraz nieodkryte dotąd czynniki wpływające na stężenie greliny w płynie otrzewnowym. Warto zaznaczyć, że w otrzymanych wynikach uzyskano dodatnią korelację między stężeniem greliny w osoczu a płynem otrzewnowym. Może to być związane z mechanizmami powstawania płynu otrzewnowego, którego głównym źródłem jest przesącz osocza. Nie wyklucza to wydzielania greliny przez ektopowe tkanki endometrium jako auto- i parakrynnego mediatora.

W dotychczasowych badaniach wykazano zwiększoną ilość makrofagów w płynie otrzewnowym oraz ich nieprawidłowe funkcjonowanie u kobiet z endometriozą (5). Leptyna jest ważnym czynnikiem modulującym działanie makrofagów, dlatego tak wielu badaczy analizowało jej stężenie w płynie otrzewnowym u kobiet z endometriozą. Alviggi i wsp. stwierdzili wyższe stężenie leptyny w płynie otrzewnowym u pacjentek z endometriozą jajnika w porównaniu do kobiet bez endometriozy, przy czym w endometriozie głębokiej jajnika stężenie leptyny było niższe w porównaniu do endometriozy powierzchownej (70). Autorzy sugerują, że lokalizacja ognisk endometriozy wpływa na stężenie leptyny w płynie otrzewnowym. Podobnego zdania

byli Malhotra i wsp. oraz De Placido i wsp., którzy znaleźli różne stężenia leptyny w płynie otrzewnowym w zależności od lokalizacji implantów endometrialnych. W endometriozie otrzewnowej stężenie leptyny w płynie otrzewnowym było wyższe niż u kobiet z torbielami endometrialnymi. Warto zaznaczyć, że drudzy z wymienionych badaczy nie uzyskali istotnych różnic w stężeniu leptyny w płynie otrzewnowym pomiędzy kobietami z torbielami endometrialnymi, a grupą kontrolną. Obserwacje te dowodzą, że płyn otrzewnowy zmienia swój skład tylko w przypadku kontaktu z otwartymi implantami endometrialnymi (71,72).

W przypadku zaawansowanego stopnia endometriozy, gdy torbielom endometrialnym towarzyszą zrosty i implanty endometrialne w miednicy mniejszej, można się również spodziewać zmian w stężeniu leptyny w płynie otrzewnowym. Potwierdzają to wyniki dwóch kolejnych zespołów badawczych pod kierownictwem Gungora i Bedaiwy. Wykazali oni dodatnią korelację stężenia leptyny w płynie otrzewnowym ze stopniem endometriozy, a drugi z zespołów stwierdził również dodatnią korelację z dolegliwościami bólowymi miednicy mniejszej (67,73). Uzyskane przez wymienionych autorów wyniki sugerują, iż leptyna zawarta w płynie otrzewnowym odgrywa rolę w patogenezie endometriozy. Hormon ten może nie tylko zmieniać odpowiedź komórek układu immunologicznego, ale także wpływać na powstawanie nowych naczyń w obrębie implantów otrzewnowych (74).

Ujemną korelację między stężeniem leptyny w płynie otrzewnowym a stopniem endometriozy uzyskali Mahutte i wsp. Można przypuszczać, że kobiety z wyższymi stopniami endometriozy miały torbiele endometrialne bez towarzyszących ognisk endometrialnych i zrostów w obrębie otrzewnej lub ilość implantów otrzewnowych była bardzo mała (75).

W materiale własnym stężenie leptyny w płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą nie różniło się istotnie od kobiet bez endometriozy. Może to wynikać z faktu, że 46% kobiet z grupy badanej miało torbiele endometrialne bez towarzyszących implantów endometrialnych i zrostów w obrębie otrzewnej, zatem płyn otrzewnowy nie miał bezpośredniej styczności z tkanką endometrialną. Ponadto stężenie leptyny w płynie otrzewnowym nie korelowało ze stopniem endometriozy. Podobne wyniki uzyskali Tao i wsp. którzy analizowali grupy kobiet z rozpoznaną endometriozą, z niedrożnymi jajowodami oraz z mięśniakami macicy. Stężenie leptyny oraz TNF- α w płynie otrzewnowym nie różniło się istotnie pomiędzy wszystkimi badanymi grupami.

Autorzy ci wykazali natomiast dodatnią korelację stężenia leptyny w płynie otrzewnowym z białkiem chemotaktycznym monocytów MCP-1 w grupie kobiet z endometriozą, co może być potwierdzeniem roli leptyny w immunomodulacji (76).

Wertel i wsp. również nie stwierdzili różnicy w stężeniu leptyny w płynie otrzewnowym u kobiet z i bez endometriozy. Mimo braku różnic między badanymi grupami w stężeniu leptyny w płynie otrzewnowym, autorzy zaobserwowali istotnie wyższe stężenia leptyny w płynie otrzewnowym w III i IV stopniu endometriozy w porównaniu do kobiet z I stopniem choroby. Autorzy przypuszczają, że uzyskane przez nich wyższe stężenie leptyny w zaawansowanych stadiach choroby może być związane z lokalnym metabolizmem leptyny w obrębie jajników (68).

Barcz i wsp. również nie stwierdzili różnicy w stężeniu leptyny w płynie otrzewnowym pomiędzy kobietami z i bez endometriozy, ale wykazali wyższe stężenie leptyny w przypadku kobiet niemogących zajść w ciążę. Autorzy sugerują, że leptyna może odgrywać rolę w niepłodności (77).

Analizując wpływ leptyny w płynie otrzewnowym na patogenezę endometriozy warto zaznaczyć, że Milewski i wsp. wykazali ujemną korelację pomiędzy stężeniem leptyny w płynie otrzewnowym, a stężeniem IL-1 β oraz IFN- γ oraz dodatnią korelację z subpopulacją CD3⁺ limfocytów T i CD4⁺ limfocytów Th, co potwierdza immunomodulujący wpływ leptyny na elementy układu odpornościowego w obrębie jamy otrzewnowej (78).

Inną pracą badającą wpływ leptyny na układ immunologiczny w endometriozie jest praca Wu i wsp. w której oceniali ekspresję enzymów COX-1 i COX-2 w makrofagach otrzewnowych w zależności od ich stymulacji wzrastającymi stężeniami leptyny. Wykazali, że leptyna istotnie zwiększa ekspresję tych enzymów na makrofagach otrzewnowych zarówno u kobiet z endometriozą jak i bez. Konsekwencją tej stymulacji było również wyższe stężenie cytokiny PGF_{2 α} , zwłaszcza w grupie kobiet z endometriozą (79).

Na podstawie wyników przytoczonych autorów oraz własnych obserwacji można wnioskować, że leptyna w płynie otrzewnowym odgrywa rolę w etiopatogenezie endometriozy, ale tylko w postaci otrzewnowej choroby. Jednak jej udział w modulacji układu immunologicznego i stymulacji stanu zapalnego czy powstawaniu nowych naczyń wymaga dalszych badań.

6.3 Ekspresja greliny, leptyny i ich receptorów w eutopowym i ektopowym endometrium

Zespół Lima-Couy badał ekspresję leptyny i jej receptora u kobiet z i bez endometriozy. Autorzy porównywali ekspresję hormonu w eutopowym endometrium w dwóch dniach cyklu: w drugim oraz w dziewiątym dniu po pikie LH. Stwierdzili, że ekspresja leptyny była wyższa w dziewiątym niż w drugim dniu zarówno u kobiet z jak i bez endometriozy. Natomiast autorzy nie wykazali istotnych różnic w ekspresji mRNA leptyny pomiędzy badanymi grupami. Nie stwierdzili również różnic w ekspresji mRNA receptora leptyny w dziewiątym dniu po pikie LH pomiędzy badanymi grupami, a jedynie w drugim dniu, gdzie u kobiet z endometriozą ekspresja receptora była niższa niż u kobiet bez endometriozy (80). W badaniach własnych materiał uzyskano średnio w $18,1 \pm 7,3$ i $17,7 \pm 5,1$ dniu cyklu odpowiednio u kobiet z i bez endometriozy. Ekspresja mRNA genu leptyny w eutopowym endometrium była istotnie wyższa u kobiet z endometriozą. Natomiast ekspresja mRNA genu receptora leptyny była niższa w porównaniu do pacjentek bez endometriozy, ale bez istotności statystycznej. Warto zaznaczyć, że ilość białka receptora leptyny w eutopowym endometrium była istotnie wyższa u kobiet z endometriozą. Prawdopodobnie istnieją dodatkowe czynniki, które wpływają na procesy potranslacyjne mRNA receptora leptyny. Zarówno u kobiet z endometriozą jak i bez endometriozy nie stwierdzono korelacji pomiędzy ekspresją receptora leptyny, a ilością jego białka, co dodatkowo może potwierdzić istnienie dodatkowych modyfikacji potranslacyjnych.

Analizując ekspresję mRNA genu leptyny i jej receptora w eutopowym endometrium u zdrowych kobiet oraz w ektopowym endometrium u kobiet z endometriozą Wu i wsp. stwierdzili istotnie wyższą ekspresję leptyny w endometrium ektopowym. Ekspresja mRNA genu receptora leptyny była niższa w ektopowym endometrium i korelowała ujemnie z zaawansowaniem choroby. Autorzy zwrócili w ten sposób uwagę, że leptyna może bezpośrednio wpływać na zmniejszenie ekspresji własnego receptora (81). W materiale własnym ekspresja mRNA genu leptyny w endometrium kobiet bez endometriozy była również istotnie niższa w porównaniu do eutopowego endometrium kobiet z endometriozą. Natomiast ekspresja mRNA genu receptora leptyny była podobna w eutopowym endometrium kobiet z i bez

endometriozy. Warto zaznaczyć, że u kobiet z endometriozą ekspresja mRNA genu leptyny w endometrium eutopowym korelowała dodatnio z ekspresją jej receptora, czego nie stwierdzono u kobiet bez endometriozy. Może to sugerować zaburzony mechanizm sprzężenia zwrotnego leptyny w obrębie endometrium kobiet z endometriozą.

Z badań Wu i wsp. wynika, że potencjalnym czynnikiem, który może zwiększać ekspresję leptyny w ektopowym endometrium jest czynnik indukujący hipoksję 1 alfa (HIF-1 α). W dotychczasowych badaniach stwierdzono większą ekspresję HIF-1 α w ektopowym endometrium kobiet z endometriozą w porównaniu do eutopowego endometrium zdrowych kobiet. Autorzy wykazali także, że w warunkach hipoksji HIF-1 α zwiększał ekspresję mRNA leptyny w ektopowym endometrium kobiet z endometriozą (82).

Oh i wsp. oceniali ekspresję receptora leptyny w ektopowym endometrium kobiet z endometriozą oraz u pacjentek bez endometriozy. Wykazali istotnie wyższą ekspresję receptora leptyny w ektopowym endometrium kobiet z endometriozą w porównaniu do eutopowego kobiet bez endometriozy. Dodatkowo stwierdzili, że leptyna pobudza wzrost komórek nabłonkowych ektopowego endometrium poprzez szlak sygnałowy JAK2/STAT3 (83).

Badania przeprowadzone przez powyższe dwa zespoły badaczy niestety nie dotyczyły endometrium eutopowego kobiet z endometriozą, a jedynie endometrium zdrowych kobiet. Można przypuszczać, że zaobserwowane przez autorów zmiany w endometrium ektopowym również mogą dotyczyć endometrium eutopowego kobiet z endometriozą.

W badaniach własnych najwyższą ekspresję mRNA genu leptyny oraz jej receptora stwierdzono w torbielach endometrialnych kobiet z endometriozą. Może to świadczyć o dużej aktywności hormonu w nieprawidłowych tkankach endometrium. Wiadomo, że leptyna reguluje ekspresję cząsteczek adhezyjnych ICAM-1 (44), a także ma zdolność zwiększania ekspresji białek antyapoptotycznych BCL-2 oraz BCL-X_L w komórkach grasicy (43). Udział leptyny w patogenezie endometriozy może być związany z ułatwieniem inwazji ektopowego endometrium oraz z hamowaniem jego apoptozy.

W dotychczasowym piśmiennictwie widnieje tylko jedna publikacja analizująca ekspresję greliny w endometrium kobiet z endometriozą. Milewski i wsp. wykazali po raz pierwszy ekspresję greliny i jej receptorów w ektopowym endometrium. Autorzy

skupili się na ocenie lokalizacji ekspresji greliny i jej receptorów w wycinkach z torbieli endometrialnych, stwierdzając ją w komórkach nabłonka, fibroblastach zrębu i komórkach śródbłonka naczyń zrębu. Ekspresja mRNA genu greliny w śródbłonku naczyń zrębu oraz korelacja jej stężenia w płynie otrzewnowym ze stężeniem VEGF może potwierdzać jej udział w etiopatogenezie endometriozy.

Wymieniony powyżej zespół badaczy wykazał również ekspresję greliny i jej receptora w leukocytach wyizolowanych z płynu otrzewnowego oraz infiltrujących tkankę torbieli endometrialnej. Może to sugerować rolę greliny w modulacji odpowiedzi immunologicznej kobiet z endometriozą (16).

W materiale własnym wykazano różnicę w ekspresji mRNA genu greliny i jej receptora między endometrium kobiet bez endometriozy, a eutopowym i ektopowym endometrium kobiet z endometriozą. Ekspresja mRNA greliny i jej receptora była najwyższa w torbielach endometrialnych, a najniższa w eutopowym endometrium kobiet bez endometriozy. Otrzymane wyniki przemawiają za dużą aktywnością greliny w ektopowym endometrium i jej rolą w patogenezie endometriozy. Hormon ten może hamować apoptozę komórek ektopowego endometrium lub wpływać na zmienioną odpowiedź układu immunologicznego w jego obrębie. Dokładne poznanie mechanizmów działania greliny w obrębie torbieli endometrialnych wymaga dalszych badań.

Stosunek ekspresji mRNA genu greliny do leptyny w materiale własnym był podobny zarówno w endometrium kobiet bez endometriozy jak i endometrium eutopowym i ektopowym kobiet z endometriozą. Sugeruje to, że zarówno grelina jak i leptyna są produkowane w proporcjonalnych ilościach w wymienionych tkankach. Warto zwrócić uwagę, że stosunek greliny do leptyny jest dodatni, co przemawia za przewagą pierwszego hormonu nad drugim. Rozpatrując zmienioną odpowiedź immunologiczną u kobiet z endometriozą, można przypuszczać, że komórki układu odpornościowego mogą podlegać regulacji właśnie za pośrednictwem greliny, a nie leptyny. Jednak powstaje pytanie czy przewaga ekspresji greliny jest przyczyną czy konsekwencją zmienionej aktywności komórek immunologicznych? Stosunek ekspresji mRNA genu receptora greliny do leptyny, a także stosunek ilości białka tych receptorów był najwyższy w torbielach endometrialnych.

Własne wyniki pozwalają wnioskować, że oznaczenie ekspresji mRNA greliny w eutopowym endometrium może z 63% czułością i 91,2% swoistością wskazać na

istnienie endometriozy. Podobnie oznaczenie ekspresji mRNA leptyny w eutopowym endometrium może z 48% czułością i 100% swoistością dać odpowiedź na pytanie, czy pacjentka choruje na endometriozę. Jednak oznaczenie ekspresji tych hormonów jako jedynych czynników predykcyjnych może być mało przydatne głównie ze względu na dość niską czułość. May i wsp. podsumowali ponad 100 dotychczas analizowanych czynników predykcyjnych endometriozy i żaden z nich nie był klinicznie istotny (84).

6.4 Aktywacja czynnika NF-κB

Według publikacji Gonzalez-Ramos i wsp. aktywacja czynnika jądrowego NF-κB w endometrium jest wyższa w fazie proliferacyjnej niż wydzielniczej cyklu miesięczkowego u zdrowych kobiet. W przypadku kobiet z endometriozą aktywacja NF-κB jest podobna w obu fazach cyklu, a więc zaburzona. Autorzy nie stwierdzili istotnych różnic w aktywacji NF-κB pomiędzy kobietami z i bez endometriozy (85).

W materiale własnym stwierdzono niższą aktywację NF-κB w endometrium eutopowym kobiet z endometriozą w porównaniu do endometrium eutopowego kobiet bez endometriozy. Podobne wyniki uzyskali Ponce i wsp. analizując aktywację czynnika NF-κB w eutopowym endometrium kobiet z i bez endometriozy. Autorzy zaobserwowali również obniżoną aktywację czynnika NF-κB w eutopowym endometrium kobiet z endometriozą (86). Dokładna rola wymienionego czynnika jądrowego w procesach zachodzących w błonie śluzowej macicy kobiet chorujących na endometriozę wymaga dalszego wyjaśnienia. Należy pamiętać, że czynnik ten działa poprzez różne drogi aktywacji na odpowiedź immunologiczną, przeżycie komórek, adhezję, inwazję i powstawanie nowych naczyń. Może to również tłumaczyć wyniki badań własnych, w których wykazano wyższą aktywność czynnika NF-κB w torbielach endometrialnych w porównaniu do eutopowego endometrium.

Bianco i wsp. wykazali, że dla aktywacji czynnika NF-κB u kobiet z endometriozą może mieć znaczenie jego polimorfizm. W badanym materiale polimorfizm czynnika NF-κB w rejonie -94 insercji/delecji ATTG istotnie wiązał się z niepłodnością (OR 1,47, 95% CI=1,09 – 1,97) oraz zaawansowanymi stopniami endometriozy (OR 1,89, 95% CI=1,32 – 2,70) (87). Otrzymane przez autorów wyniki pokazują, że zmieniona aktywacja czynnika NF-κB może również zależeć od czynników genetycznych.

W materiale własnym nie stwierdzono istotnej korelacji pomiędzy ekspresją leptyny i greliny a aktywacją czynnika NF-κB zarówno w eutopowym jak i ektopowym

endometrium grupy kobiet z i bez endometriozą. Na tej podstawie można przypuszczać, że produkcja greliny jak i leptyny nie zależy od czynnika NF- κ B.

Grelina, leptyna jak i czynnik NF- κ B regulują procesy, które od dawna rozpatruje się w etiopatogenezie endometriozą. Przeżywanie komórek eutopowego endometrium może zależeć od hamowania ich apoptozy lub zmienionej odpowiedzi komórek układu immunologicznego. Nie bez znaczenia może też być udział greliny w powstawaniu nowych naczyń w obrębie torbieli endometrialnych. Dokładne poznanie mechanizmów działania leptyny, greliny i czynnika NF- κ B w endometriozie wymaga dalszych badań.

Badania dotyczące endometriozą skupiają się obecnie nie tylko na próbie wyjaśnienia jej etiopatogenezy, ale także na znalezieniu markera, który nie wymagałby działania operacyjnego. Dotychczas przeanalizowano ponad 100 różnych czynników, ale żaden nie znalazł zastosowania klinicznego. W badaniach własnych zarówno ekspresja mRNA greliny, jak i leptyny w eutopowym endometrium nie odznacza się satysfakcjonującą czułością, aby móc je zastosować klinicznie.

7. Wnioski

1. Na podstawie uzyskanych wyników odnośnie stężenia greliny i leptyny w osoczu i płynie otrzewnowym wydaje się, że grelina jest bardziej związana z endometriozą niż leptyna.
2. Wyższa ekspresja mRNA greliny i mRNA leptyny w eutopowym endometrium kobiet z endometriozą w stosunku do kobiet bez endometriozy sugeruje udział tych hormonów w zwiększeniu przeżywalności i zdolności do implantacji fragmentów endometrium.
3. Wysoka ekspresja mRNA greliny i leptyny oraz ich receptorów w ektopowym endometrium potwierdza dużą aktywność hormonów w formowaniu ognisk endometrialnych.
4. Brak korelacji między ekspresją mRNA greliny i mRNA leptyny a aktywacją NF- κ B pozwala wnioskować, że czynniki te działają przez niezależne od siebie mechanizmy.
5. Wartości ekspresji mRNA greliny w eutopowym endometrium różnicowały endometriozę z większą czułością niż wartości ekspresji mRNA leptyny, jednakże za niską, aby przybliżyć się do roli markera.

8. Streszczenie

Endometrioza jest chorobą, która dotyczy 6- 10% kobiet w wieku rozrodczym. Objawy są mało swoiste, dlatego średni czas od ich wystąpienia do rozpoznania wynosi około 7 lat. Endometrioza obniża jakość życia chorych kobiet oraz wpływa na straty ekonomiczne z powodu ich nieobecności w pracy. Przy nawracającym charakterze choroby leczenie często jest, niestety, mało efektywne. Dotychczas nie znaleziono jednoznacznej odpowiedzi na pytanie dotyczące mechanizmu powstawania endometriozy.

Istnieje wiele teorii próbujących wyjaśnić etiopatogenezę endometriozy. Do klasycznych należy teoria wstecznego odpływu krwi miesięczkowej Sampsona, teoria metaplastji Iwanoffa i Meyera oraz teoria transportu drogą krwionośną i limfatyczną Halbana. Wśród współczesnych teorii powstawania endometriozy przeważa teoria zmienionej odpowiedzi immunologicznej Dmowskiego oraz związanego z nią przewlekłego stanu zapalnego.

Grelina i leptyna są hormonami odkrytymi w latach dziewięćdziesiątych XX wieku. Wpływają głównie na gospodarkę energetyczną organizmu, metabolizm i uczucie głodu i sytości. Odkryto również ich rolę auto- i parakrynną oraz modulującą układ immunologiczny. Grelina i leptyna wpływają na elementy układu immunologicznego takie jak limfocyty B, T i NK oraz zmieniają wydzielanie cytokin prozapalnych. Promowanie powstawania nowych naczyń krwionośnych lub działanie mitogenne to inne cechy greliny i leptyny, które mogą mieć wpływ na rozwój endometriozy.

Transkrypcyjny czynnik jądrowy NF- κ B jest kompleksem białkowym, przy pomocy którego kontrolowana jest ekspresja wielu genów odpowiedzialnych za procesy komórkowe takie jak proliferacja, różnicowanie i apoptoza. Jest także głównym czynnikiem transkrypcyjnym regulującym geny odpowiedzialne za natychmiastową odpowiedź immunologiczną. Transkrypcyjny czynnik jądrowy może być ogniwem łączącym grelinę i leptynę z układem immunologicznym.

Nadrzędnym celem pracy było uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy grelina i leptyna, jako hormony wpływające na układ immunologiczny biorą udział w etiopatogenezie endometriozy. Cel pracy był realizowany przez:

1. Ocenę stężenia greliny i leptyny w płynie otrzewnowym oraz osoczu kobiet z i bez endometriozy.

2. Ocenę ekspresji mRNA greliny i leptyny oraz ich receptorów w eutopowym endometrium kobiet z i bez endometriozą.
3. Ocenę ekspresji mRNA greliny i leptyny oraz ich receptorów w eutopowym i ektopowym endometrium w różnych stadiach endometriozą.
4. Ocenę białek receptorów greliny i leptyny w eutopowym i ektopowym endometrium.
5. Ocenę aktywacji czynnika NF- κ B w eutopowym i ektopowym endometrium kobiet z i bez endometriozą.

Badaniami objęto 88 kobiet hospitalizowanych i diagnozowanych w Klinice Rozrodczości Katedry Ginekologii, Położnictwa i Ginekologii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego imienia Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, pomiędzy listopadem 2008 a sierpniem 2012 roku. U wszystkich 88 kobiet wykonano laparoskopię i histeroskopię ze wskazań:

1. Niemożność zajścia w ciążę.
2. Objawy kliniczne sugerujące endometriozę.
3. Mięśniaki macicy.
4. Podejrzenie wady wrodzonej macicy.

Materiał do badań stanowiło eutopowe i ektopowe endometrium oraz krew i płyn otrzewnowy. Krew obwodową pobierano na czczo w dniu operacji. Bezpośrednio po założeniu laparoskopu pobierano płyn otrzewnowy. Błonę śluzową jamy macicy (endometrium eutopowe) pobierano drogą biopsji podczas histeroskopii lub pipellą. Ektopowe endometrium pozyskiwano z torbieli endometrialnych po ich laparoskopowym wycięciu.

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu wyraziła zgodę na przeprowadzenie badań, które zostały sfinansowane ze środków statutowych Kliniki Rozrodczości Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Grupę badaną stanowiły 54 pacjentki z potwierdzoną histopatologicznie endometriozą, a kontrolną 34 bez endometriozą. Grupy te nie różniły się istotnie pomiędzy sobą w zakresie wieku kobiet, dnia cyklu pozyskania materiału i BMI.

Ocenę stężenia greliny i leptyny w osoczu oraz płynie otrzewnowym wykonano przy pomocy komercyjnych zestawów ELISA. Ekspresję mRNA greliny, leptyny i ich receptorów w eutopowym i ektopowym endometrium oceniono na podstawie reakcji real-time PCR. Do oznaczenia ilości białka receptorów greliny i leptyny w eutopowym i

ektopowym endometrium wykorzystano metodę Western-blot. Aktywność czynnika NF- κ B została oznaczona przy pomocy komercyjnego zestawu TransAM NF- κ B p65.

Do analizy statystycznej wykorzystano program Statistica v.10 firmy StatSoft.

W badanym materiale stwierdzono wyższe stężenie greliny w osoczu i płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą, ale statystycznie nieistotne. Stężenie leptyny w osoczu i płynie otrzewnowym, nie różniło się pomiędzy kobietami z i bez endometriozy. Zarówno u kobiet z jak i bez endometriozy stwierdzono istotną dodatnią korelację pomiędzy stężeniem greliny i leptyny w osoczu oraz ich stężeniem w płynie otrzewnowym.

Najwyższą ekspresję mRNA greliny, leptyny i ich receptorów stwierdzono w ektopowym endometrium. Ekspresja mRNA greliny i leptyny była wyższa w eutopowym endometrium kobiet z endometriozą, w porównaniu do endometrium kobiet bez endometriozy. W wycinkach z torbieli endometrialnych ilość białka receptora greliny oceniona przy pomocy Western-blot była najwyższa w stosunku do pozostałego badanego materiału, a ilość białka receptora leptyny była najniższa. W endometrium eutopowym kobiet z endometriozą stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy ekspresją mRNA greliny i jej receptorem oraz ekspresją mRNA leptyny i jej receptorem.

Aktywność czynnika NF- κ B była istotnie niższa w badanych kompartmentach u kobiet z endometriozą w porównaniu do endometrium kobiet bez endometriozy. Nie uzyskano istotnych korelacji pomiędzy aktywnością czynnika NF- κ B, a ekspresją mRNA genu greliny i leptyny oraz ich receptorów.

Wnioski:

1. Na podstawie uzyskanych wyników odnośnie stężenia greliny i leptyny w osoczu i płynie otrzewnowym wydaje się, że grelina jest bardziej związana z endometriozą niż leptyna.
2. Wyższa ekspresja mRNA greliny i mRNA leptyny w eutopowym endometrium kobiet z endometriozą w stosunku do kobiet bez endometriozy sugeruje udział tych hormonów w zwiększeniu przeżywalności i zdolności do implantacji fragmentów endometrium.
3. Wysoka ekspresja mRNA greliny i leptyny oraz ich receptorów w ektopowym endometrium potwierdza dużą aktywność hormonów w formowaniu ognisk endometrialnych.

4. Brak korelacji między ekspresją mRNA greliny i mRNA leptyny a aktywacją NF-kB pozwala wnioskować, że czynniki te działają przez niezależne od siebie mechanizmy.
5. Wartości ekspresji mRNA greliny w eutopowym endometrium różnicowały endometriozę z większą czułością niż wartości ekspresji mRNA leptyny, jednakże za niską, aby przybliżyć się do roli markera

9. Summary

Endometriosis affects 6 - 10% of women in reproductive age. The symptoms are not specific, so the average time between their occurrence and diagnosis is approximately 7 years. Endometriosis reduces women's quality of life and affects the economic losses due to women absence at work. Treatment often is not very effective and the disease recurs. There is no clear explanation of endometriosis pathogenesis yet.

There are many theories trying to explain the etiology of endometriosis. The classic are: Sampson's retrograde menstruation, Iwanoff and Meyer metaplasia theory and the Halban one - the blood and lymphatic metastases theory. Among contemporary theories of the pathogenesis of endometriosis prevailing one is Dmowski modified immune response theory and the associated chronic inflammation.

Ghrelin and leptin are hormones discovered in the nineties of the twentieth century. They mainly affect the energy balance, metabolism and food intake behavior. They also have the auto- and paracrine functions and modulate the immune system. Ghrelin and leptin can control the components of the immune system such as B, T and NK lymphocytes, as well as inflammatory cytokines secretion. Ghrelin and leptin may promote neoangiogenesis or have mitogenic effect. In this way they can have an impact on the development of endometriosis.

Nuclear transcription factor NF-KB is a protein complex which control expression of many genes involved in cellular processes such as cell proliferation, differentiation and apoptosis. It is also a key transcription factor regulating genes involved in the immediate immune response. Nuclear transcription factor may be a link between ghrelin, leptin and the immune system.

The primary aim of this study was to answer the question whether ghrelin and leptin as hormones affecting the immune system are involved in the pathogenesis of endometriosis. Aim of the study was carried out by:

1. The assessment of ghrelin and leptin in the peritoneal fluid and plasma of women with and without of endometriosis.
2. Evaluation of mRNA expression of ghrelin, leptin and their receptors in eutopic endometrium of women with and without of endometriosis.
3. Evaluation of mRNA expression of ghrelin, leptin and their receptors in eutopic as well as in ectopic endometrium in various stages of endometriosis.

4. Evaluation of protein expression of ghrelin and leptin receptors in eutopic and ectopic endometrium.
5. Evaluation of the NF-kB activation in eutopic and ectopic endometrium women with and without of endometriosis.

The study group consisted of 88 women hospitalized and diagnosed in the Division of Reproduction Department of Gynecology, Obstetrics and Gynaecologic Oncology, Poznan University of Medical Sciences between November 2008 and August 2012. All 88 women had laparoscopy and hysteroscopy because of:

1. Inability to get pregnant.
2. Clinical symptoms suggesting endometriosis.
3. Fibroids.
4. Suspicion of uterus congenital defects.

Material included eutopic and ectopic endometrium as well as blood and peritoneal fluid. Fasting peripheral blood was collected on the day of operation. Peritoneal fluid was obtained immediately after laparoscope insertion. Endometrium was obtained by endometrial biopsy taken during hysteroscopy or by Pipella. Ectopic endometrium was extracted from endometrial cysts after laparoscopic removal. Bioethics Committee at the Poznan University of Medical Sciences has agreed to carry out the study, which was financed by the Division of Reproduction statutory reserves.

Study group consisted of 54 women diagnosed with endometriosis and 34 controls without endometriosis. Both groups of patients were not significantly different between them in age, day of the cycle when material was obtained and BMI.

The assessment of ghrelin and leptin concentrations in plasma and peritoneal fluid were performed by commercial ELISA kits. Ghrelin, leptin and their receptors mRNA expression in eutopic and ectopic endometrium was assessed by real-time PCR. The amount of ghrelin and leptin receptor proteins in eutopic as well ectopic endometrium was assessed by Western-blot. Activity of NF-kB was measured by commercial TransAM NF-kappaB p65 kit. StatSoft Statistica v.10 software was used for statistical analysis.

Ghrelin concentration in serum and in peritoneal fluid was higher in endometriosis patients, however did not reach statistical significance. There were no significant differences in leptin concentration in both plasma and peritoneal fluid between women with and without endometriosis. There was a significant positive correlation between

ghrelin and leptin plasma and peritoneal fluid concentrations in all of women. The highest ghrelin, leptin and their receptors mRNA expression was found in the ectopic endometrium. Ghrelin and leptin mRNA expression in eutopic endometrium was higher in endometriosis patients. Moreover there was a positive correlation between the ghrelin and its receptor mRNA expression as well as leptin and its receptor in eutopic endometrium of endometriosis patients. We found the highest ghrelin receptor protein level and on the other hand the lowest leptin receptor protein level in the endometrial cysts. Activity of NF- κ B was significantly lower in women with endometriosis. We did not find any significant correlations between the activity of NF- κ B and ghrelin, leptin and their receptors mRNA expression.

Conclusions:

1. Based on the results obtained for ghrelin and leptin concentration in the plasma and peritoneal fluid, it may be supposed that ghrelin is more associated with endometriosis than leptin.
2. Higher ghrelin and leptin mRNA expression in eutopic endometrium of women with endometriosis compared to women without endometriosis suggests participation of these hormones in increasing survival and ability to implantation of endometrial fragments.
3. High ghrelin, leptin and their receptors mRNA expression in ectopic endometrium confirm high activity of these hormones in the development of endometriosis.
4. Lack of correlation between the ghrelin and leptin mRNA expression and activation of NF- κ B leads to the conclusion that these factors act through independent mechanisms.
5. The values of ghrelin mRNA expression in eutopic endometrium reach higher sensitivity than leptin mRNA expression in endometriosis differentiation, however it is too small to be a clinical marker.

PIŚMIENNICTWO

1. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod.* 2005;20(10):2698 – 704.
2. Eskenazi B, Warner M. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1997;24:235 – 58.
3. Simoens S, Dunselman G, Dirksen C i wsp. The burden of endometriosis: costs and quality of life of woman with endometriosis and treated in referral centres. *Hum Reprod.* 2012;27:1292 – 1299.
4. Witz C. Pathogenesis of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest.* 2002;53(suppl 1):52 – 62.
5. Skrzypczak J. Endometrioza. Zeszyt Edukacyjny. *Ginekologia po Dyplomie;* 2007.
6. Nap A, Groothuis P, Demir A i wsp. Pathogenesis of endometriosis. *Clin Obstet and Gynaecol.* 2004;18(2):233 – 244.
7. Burney R, Giudice L. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril.* 2012;98(3):511 – 519.
8. Dmowski W, Steele R, Baker G. Deficient cellular immunity in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1981;14:377 – 388.
9. Hill J. Immunology and endometriosis. *Fertil Steril.* 1992;58:262 – 264.
10. Jones R, Searle R, Bulmer J. Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod.* 1998;13:3496 – 3502.
11. Laschke M, Giebels C, Menger M i wsp. Vasculogenesis: a new piece of the endometriosis puzzle. *Hum Reprod Update.* 2011;17:628 – 36.
12. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones D, i wsp. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod.* 1996;11:220 – 223.
13. Shifren J, Tseng J, Zaloudek C i wsp. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:3112 – 8.
14. Matarese G, Alviggi C, Sanna V i wsp. Increased leptin levels in serum and peritoneal fluid of patients with pelvic endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(7):2483 – 2487.

15. Dziunycz P, Milewski Ł, Radomski D i wsp. Elevated ghrelin levels in the peritoneal fluid of patients with endometriosis: associations with vascular endothelial growth factor (VEGF) and inflammatory cytokines. *Fertil Steril*. 2009;92(6):1844 – 1849.
16. Milewski L, Wójtowicz K, Roszkowski P i wsp. Expression of ghrelin and its receptors in ovarian endometrioma. *Gynecol Endocrinol*. 2012;28(4):310 – 313.
17. Klok M, Jakobsdottir S, Drent M. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obesity Reviews*. 2006;9:21 – 34.
18. La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nature Rev*. 2004;4:371 – 379.
19. Polińska B, Matowicka-Karna J, Kemonia H. Rola greliny w organizmie. *Postepy Hig Med Dosw*. 2011;65:1–7.
20. Muccioli G, Lorenzi T, Lorenzi M, i wsp. Beyond the metabolic role of ghrelin: A new player in the regulation of reproductive function. *Peptides*. 2011;32:2514 – 2521.
21. Katulski K, Męczekalski B. Ghrelin influence on metabolism and fertility. *Arch of Perinat Med*. 2011;17(3):134 – 139.
22. Camilleri M, Papathanasopoulos A, Odunsi S. Actions and therapeutic pathways of ghrelin for gastrointestinal disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009;6:343 – 352.
23. Hattori N, Saito T, Yagyu T i wsp. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor and ghrelin expression in human T cells, B cells and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:4284 – 4291.
24. Dixit V, Schaffer E, Pyle R i wsp. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest*. 2004;114:57 – 66.
25. Karmiris K, Koutroubakis I, Xidakis C, i wsp. Circulating levels of leptin, adipokines, resistin and ghrelin in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12:100 – 105.
26. Otero M, Nogueiras R, Lago F, i wsp. Chronic inflammation modulates ghrelin levels in humans and rats. *Rheumatology (Oxford)*. 2004;43:306 – 310.
27. Dembinski A, Warzecha Z, Ceranowicz R i wsp. Ghrelin attenuates the development of acute pancreatitis in rat. *J Physiol Pharmacol*. 2003;54:561 – 573.
28. Xia Q, Pang Q, Pan H i wsp. Effects of ghrelin on the proliferation and secretion of splenic T lymphocytes in mice. *Regulat Pept*. 2004;122:173 – 178.

29. Kim S, Her S, Park S i wsp. Ghrelin stimulates proliferation and differentiation and inhibits apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone*. 2005;37:359 – 369.
30. Hattori N. Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system. *Growth Hormone & IGF Research*. 2009;19:187 – 197.
31. Zhang Y, Proenca R, Maffei M i wsp. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425 – 432.
32. Kitawaki J. Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:1946 – 50.
33. González R, Caballero-Campo P, Jasper M i wsp. Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:4883 – 8.
34. Alfer J, Müller-Schöttle F, Classen-Linke I, i wsp. The endometrium as a novel target for leptin: differences in fertility and subfertility. *Mol Hum Reprod*. 2000;6:595 – 601.
35. Lee G, Proenca R, Montez J, i wsp. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 1996;379:632 – 635.
36. Schwartz M, Peskind E, Raskind M, i wsp. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med*. 1996;2:589 – 593.
37. Hill J, Elmquist J, Elias C. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;294(5):E827–32.
38. De Roux N, Genin E, Carel J. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(19):10972 – 10976.
39. Zhang F, Basinski M, JM B, i wsp. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature*. 1997;387:206 – 208.
40. Sarraf P, Frederich R, Turner E, i wsp. Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *J Exp Med*. 1997;185:171 – 180.
41. Zhao Y, Sun R, You L, i wsp. Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;300:247 – 252.
42. Tian Z, Sun R, Wei H, i wsp. Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;298:297 – 302.

43. Najib S, Sanchez-Margalet W. Human leptin promotes survival of human circulating blood monocytes prone to apoptosis by activation of p42/44 MAPK pathway. *Cell Immunol.* 2002;220:143 – 149.
44. Lord G, Matarese G, Howard J, i wsp. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature.* 1998;394:897 – 901.
45. Fraser D, Thoen J, Reseland J i wsp. Decreased CD4+ lymphocyte activation and increased interleukin-4 production in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients after acute starvation. *Clin Rheumatol.* 1999;18:394 – 401.
46. Matarese G, Di Giacomo A, Sanna V i wsp. Requirement for leptin in the induction and progression of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2001;166:5909 – 5916.
47. Galgani M, Procaccini C, De Rosa V, i wsp. Leptin modulates the survival of autoreactive CD4+ T cells through the nutrient/energy-sensing mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Immunol.* 2010;185:7474 – 7479.
48. Siegmund B, Lehr H, Fantuzzi G, i wsp. Leptin: a pivotal mediator of intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology.* 2002;122:2011 – 2025.
49. Whitacre C. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol.* 2001;2:777 – 780.
50. Sen R, Baltimore D. Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell.* 1986;47:921 – 928.
51. Nabel G, Verma I. Proposed NF- κ B/I κ B family nomenclature. *Genes Dev.* 1993;7(11):2063.
52. Monaco C, Andreakos E, Kiriakidis S i wsp. Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(15):5634 – 5639.
53. Shishodia S, Aggarwal B. Nuclear factor- κ B activation: a question of life and death. *J Biochem Mol Biol.* 2002;35:28 – 40.
54. Piotrowska A, Iżykowska I, Podhorska – Okołów M i wsp. Budowa białek z rodziny NF- κ B i ich rola w procesie apoptozy. *Postepy Hig Med Dosw.* 2008;62:64 – 74.
55. Ivanow V, Roani Z. p38 protects human melanoma cells from UV-induced apoptosis through down-regulation of NF- κ B activity and Fas expression. *Oncogene.* 2000;19:3003 – 3012.

56. Aoki M, Nata T, Morishita R i wsp. Endothelial apoptosis induced by oxidative stress through activation of NF- κ B. Antiapoptotic affect of antioxidant agents on endothelial cells. *Hypertension*. 2001;38:48 – 55.
57. Dąbek J, Świdorski R, Głogowska – Ligus J. Ekspresja genów związanych z czynnikiem jądrowym kappa B (NF- κ B) oceniana techniką mikromacierzy oligonukleotydowych HG-U133A u chorych z ostrym zawałem serca. *Pol Merk Lek*. 2009;XXVII(160):265 – 272.
58. González-Ramos R, Van Langendonck A, Defrère S i wsp. Involvement of the nuclear factor- κ B pathway in the pathogenesis of endometriosis. *Fertil Steril*. 2010;94(6):1985 – 94.
59. Gen Li W, Gavrilu D, Liu X i wsp. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear Factor- κ B activation in human endothelial cells. *Circulation*. 2004;109:2221 – 2226.
60. Zhang Q, Huang W, Lv X. Ghrelin protects H9c2 cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis through NF- κ B and mitochondria-mediated signaling. *Eur J of Pharmacology*. 2011;654:142 – 149.
61. Sung E, Da Silva N, Goodyear S i wsp. Ghrelin promotes nuclear factor kappa-B activation in a human B-lymphocyte cell line. *Mol Biol Rep*. 2011;38:4833 – 4838.
62. Jia-Hong C, Ssu-Ming H, Chun-Chung C i wsp. Ghrelin induces cell migration through GHS-R, CaMKII, AMPK, and NF- κ B signaling pathway in glioma cells. *J Cell Biochem*. 2011;112:2931 – 2941.
63. Fen H, Xiaofang X, Huabin W i wsp. Leptin-induced vascular smooth muscle cell proliferation via regulating cell cycle, activating ERK1/2 and NF- κ B. *Acta Biochem Biophys Sin*. 2010;42:325 – 331.
64. Gonzalez-Perez R, Guo S, Watters A i wsp. Leptin upregulates VEGF in breast cancer via canonic and non-canonical signaling pathways and NF- κ B/HIF-1 α activation. *Cell Signal*. 2010;22(9):1350 – 1362.
65. Abir R, Ao A, Jin S i wsp. Leptin and its receptors in human fetal and adult ovaries. *Fertil Steril*. 2005;84(6):1779 – 82.
66. Pandey N, Kriplani A, Yadav R i wsp. Peritoneal fluid leptin levels are increased but adiponectin levels are not changed in infertile patients with pelvic endometriosis. *Gynecol Endocrinol*. 2010;26(11):854 – 859.
67. Gungor T, Kanat-Pektas M, Karayalcin R i wsp. Peritoneal fluid and serum leptin concentrations in women with primary infertility. *Arch Gynecol Obstet*. 2009;279(3):361 – 364.
68. Wertel I, Gogacz M, Polak G i wsp. Leptin is not involved in the pathophysiology of endometriosis-related infertility. *Eur J Obstet Gynecol*. 2005;119(2):206 – 209.

69. Matalliotakis I, Koumantaki Y, Neonaki M i wsp. Increase in serum leptin concentrations among women with endometriosis during danazol and leuprolide depot treatments. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183(1):58 – 62.
70. Alviggi C, Clarizia R, Castaldo G i wsp. Leptin concentrations in the peritoneal fluid of women with ovarian endometriosis are different according to the presence of a “deep” or “superficial” ovarian disease. *Gynecol Endocrinol*. 2009;25(9):610 – 615.
71. Malhotra N, Karmakar D, Tripathi V i wsp. Correlation of angiogenic cytokines – leptin and IL-8 in stage, type and presentation of endometriosis. *Gynecol Endocrinol*. 2012;28(3):224 – 227.
72. De Placido G, Alviggi C, Carravetta C i wsp. The peritoneal fluid concentration of leptin is increased in women with peritoneal but not ovarian endometriosis. *Hum Reprod*. 2001;16(6):1251 – 1254.
73. Bedaiwy M, Falcone T, Goldberg J i wsp. Peritoneal fluid leptin is associated with chronic pelvic pain but not infertility in endometriosis patients. *Hum Reprod*. 2006;21(3):788 – 791.
74. Cao R, Brakenhielm E, Wahlestedt C i wsp. Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FHF-2 and VEGF. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:6390 – 6395.
75. Mahutte N, Matalliotakis I, Goumenou A i wsp. Inverse correlation between peritoneal fluid leptin concentrations and the extent of endometriosis. *Hum Reprod*. 2003;18(6):1205 – 1209.
76. Tao Y, Zhang Q, Huang W, i wsp. The peritoneal leptin, MCP-1 and TNF-alfa in the pathogenesis of endometriosis-associated inferrility. *Am J Reprod Immunol*. 2011;65(4):403 – 406.
77. Barcz E, Milewski L, Radomski D i wsp. A relationship between increased peritoneal leptin levels and infertility in endometriosis. *Gynecol Endocrinol*. 2008;24(9):526 – 30.
78. Milewski Ł, Barcz E, Dziunycz P i wsp. Association of leptin with inflammatory cytokines and lymphocyte subpopulations in peritoneal fluid of patients with endometriosis. *J Reprod Immunol*. 2008;79:111 – 117.
79. Wu M, Huang M, Chang F i wsp. Leptin on peritoneal macrophages of patients with endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63:214 – 221.
80. Lima-Couy I, Cervero A, Bonilla-Musoles F i wsp. Endometrial leptin and leptin receptor expression in women with severe/moderate endometriosis. *Mol Hum Reprod*. 2004;10(11):777 – 782.

81. Wu M, Chuang P, Chen H i wsp. Increased leptin expression in endometriosis cells is associated with endometrial stromal cell proliferation and leptin gene up-regulation. *Mol Hum Reprod.* 2002;8(5):456 – 464.
82. Wu M, Chen K, Lin S i wsp. Aberrant expression of leptin in human endometriotic stromal cells is induced by elevated levels of hypoxia inducible factor-1alpha. *Am J Pathol.* 2007;170(2):590 – 598.
83. Oh H, Choi Y, Yang Y i wsp. Leptin receptor is induced in endometriosis and leptin stimulates the growth of endometriotic epithelial cells through the JAK2/STAT3 and ERK pathways. *Mol Hum Reprod.* 2013;19(3):160 – 168.
84. May K, Conduit-Hulbert S, Villar J i wsp. Peripheral biomarkers of endometriosis: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2010;16(6):651 – 674.
85. González-Ramos R, Rocco J, Rojas C i wsp. Physiologic activation of nuclear factor kappa-B in the endometrium during the menstrual cycle is altered in endometriosis patients. *Fertil Steril.* 2012;97(3):645 – 651.
86. Ponce C, Torres M, Galleguillos C i wsp. Nuclear factor kappaB pathway and interleukin-6 are affected in eutopic endometrium of women with endometriosis. *Reproduction.* 2009;137(4):727 – 737.
87. Bianco B, Lerner T, Trevisan C i wsp. The nuclear factor-kB functional promoter polymorphism is associated with endometriosis and infertility. *Hum Immunol.* 2012;73(11):1190 – 1193.