

Praca naukowa finansowana ze
środków na naukę w roku 2007
jako projekt badawczy.

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Tomasz Banaś

Wartość kliniczna oceny ekspresji białka DFF45 w endometriozie
jajnika

Praca doktorska

Promotor: prof. dr hab. n. med. Marek Klimek

Pracę wykonano w Katedrze Ginekologii i Położnictwa UJ
Kierownik jednostki: prof. dr hab. n. med. Antoni Basta

Kraków, 2007

SPIS TREŚCI

1. Wstęp.....	3
1.1 Endometrioza – charakterystyka choroby.....	3
1.2 Mechanizmy regulujące apoptozę.....	12
1.3 Rola białka DFF45 w procesie apoptozy.....	20
2. Cele pracy.....	23
3. Materiał i metody badania.....	24
3.1 Dane kliniczne kobiet uczestniczących w badaniu.....	24
3.2 Materiał tkankowy.....	30
3.3 Metoda immunohistochemiczna.....	31
3.4 Metoda <i>Western-blot</i>	32
3.5 Analiza statystyczna.....	34
4. Wyniki.....	36
4.1 Porównanie danych klinicznych grupy kobiet z endometriozą i bez endometriozy	36
4.2 Wyniki analizy immunohistochemicznej.....	38
4.3 Wyniki analizy <i>Western-blot</i>	40
4.4 Podsumowanie wyników.....	55
5. Dyskusja.....	57
6. Wnioski.....	63
7. Streszczenie.....	64
8. Abstract.....	67
 Piśmiennictwo.....	69
Indeks skrótów.....	84
Spis rycin.....	86
Spis tabel.....	88
 Aneksy	
Aneks 1.....	89
Aneks 2.....	90
Aneks 3.....	93
Aneks 4.....	94

1. Wstęp

Endometrioza jest definiowana jako występowanie tkanki endometrialnej w miejscach ektopowych, to znaczy poza jamą macicy [1;2]. Mechanizm powstawania tego schorzenia pozostaje nadal niewyjaśniony, a sama endometrioza przez wielu badaczy nazywana jest „chorobą teorii”.

1.1 Endometrioza – charakterystyka choroby

Endometrioza została po raz pierwszy opisana w 1860 roku przez Rokitańskiego [3] i jest najczęstszym łagodnym schorzeniem ginekologicznym [4]. W Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej w latach 1990 – 1995 endometrioza stanowiła trzecie, najczęściej występujące rozpoznanie wśród pacjentek w wieku 15 – 44 lata wypisywanych ze szpitali [5]. Poprzez występowanie dolegliwości bólowych w okresie okołomiesiączkowym oraz w trakcie stosunków seksualnych endometrioza znacznie ogranicza jakość życia wielu kobiet [6], stanowi również główną przyczynę niepłodności żeńskiej [7]. Koszty związane z diagnostyką i leczeniem endometriozy są trudne do oszacowania [8], ocenia się jednak, że stanowią one ponad połowę wydatków w procesie diagnostyczno-terapeutycznym kobiet leczonych z powodu niepłodności [9;10]. Analiza przeprowadzona przez Narodowy Instytut Zdrowia w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej wykazała, że kobiety z rozpoznaną endometriozą z powodu tego schorzenia przebywały na zwolnieniu lekarskim średnio 17,8 dni w roku [11]. Biorąc pod uwagę powyższe dane można stwierdzić, że endometrioza stanowi nie tylko problem medyczny, lecz również społeczny i ekonomiczny przez co jest przedmiotem zainteresowania medycyny oraz zdrowia publicznego.

1.1.1 Epidemiologia i etiopatogeneza endometriozy

Dokładna częstość występowania endometriozy nie jest znana. Schorzenie to występuje w 10% ogólnej populacji kobiet i w większości przypadków nie daje jednak objawów klinicznych, w związku z czym dane te mogą być niedoszacowane [12]. Biorąc pod uwagę powyższy fakt niektórzy autorzy oceniają częstość występowania endometriozy w ogólnej populacji kobiet na 35%, a w populacji kobiet przed menopauzą nawet na 50% [12]. Ogniska endometrialne są rozpoznawane u 10% - 25% pacjentek poddawanych interwencji chirurgicznej ze wskazań

ginekologicznych i chirurgicznych, zarówno laparotomii jak i laparoskopii. W grupie kobiet diagnozowanych i leczonych z powodu niepłodności, zarówno pierwotnej jak i wtórnej, endometriozę rozpoznawano w 35% przypadków [13]. Najczęściej endometrioza jest diagnozowana w grupie kobiet leczonych z powodu zespołu bólowego miednicy mniejszej (PPS, Pelvic Pain Synrome), gdzie występuje aż w 80% przypadków [14].

Endometrioza może lokalizować się w jamie otrzewnowej oraz poza jamą brzuszną [15]. Najczęściej ogniska endometriozy lokalizują się w jajnikach (55%) następnie jajowodach (32%), otrzewnej pokrywającej macicę i aparacie więzadłowym macicy (20%) [15]. W 5,4% przypadków endometrioza obejmuje przewód pokarmowy (przede wszystkim wstępnicę, zstępnicę i odbytnicę), a 0,7% pacjentek wymaga resekcji jelit z powodu rozwoju niedrożności [16;17]. Ogniska endometriozy mogą być zlokalizowane również w otrzewnej ściennej, w zatoce Douglasa [18], oraz wyrostku robaczkowym [19], a także mogą obejmować układ moczowy [20;21]. Zidentyfikowano ogniska endometriozy w jamie nosowej [22], płucach [23], opłucnej [24], mózgu [25;26] oraz szyjce macicy [27], które ze względu na nietypową lokalizację oraz silne dolegliwości kliniczne stanowiły poważny problem diagnostyczno-terapeutyczny. Narastający problem kliniczny stanowi endometrioza zlokalizowana w bliźnie po cięciu cesarskim [28]. Wraz ze wzrostem liczby wykonywanych elektywnych cięć cesarskich obserwuje się wzrost tego powikłania [29].

Endometrioza nazywana jest „*chorobą teorii*”. Po raz pierwszy etiopatogenezę tego schorzenia próbował wytłumaczyć Meyer, który w roku 1909 stwierdził, że pierwotne komórki płciowe znajdujące się w jajniku mogą przekształcać się w komórki endometrialne [30;31]. Teoria Meyera tłumaczyła wprawdzie powstawanie ognisk endometriozy u kobiet niemiesiączkujących, nie wyjaśniała jednak mechanizmu powstawania endometriozy poza jamą brzuszną [32]. Rozwinięciem teorii metaplastji Meyera jest koncepcja indukcji endometriozy. Zakłada ona, że ogniska endometriozy powstają w skutek działania czynników endogennych lub egzogennych na komórki germinalne, stymulując je do różnicowania w kierunku komórek endometrialnych. Do czynników mogących inicjować powstanie ognisk endometrialnych zaliczono między innymi 17- β -estradiol [33;34].

W roku 1924 Helban wytłumaczył powstawanie odległych ognisk endometriozy poprzez rozsiew komórek endometrialnych drogą krwionośną lub limfatyczną

[35;36;37]. Najczęściej przedstawianą przyczyną powstawania endometriozy jest opublikowana w 1925 roku przez Sampsona teoria implantacji. W trakcie menstruacji, w skutek wstecznego przepływu jajowodami, złuszczone komórki endometrium dostają się do jamy otrzewnowej i ulegają implantacji [38]. Jednakże Godal i Blumenkrantz potwierdzili występowanie komórek endometrialnych w jamie otrzewnowej, w okresie menstruacji u 80% badanych kobiet, z czego tylko 10% - 25% kobiet w populacji ogólnej rozwija endometriozę [39;40].

W 1980 roku Simpson przedstawił genetyczne przyczyny endometriozy [41]. Wykazał, że w 6% przypadków endometrioza występuje równocześnie u sióstr i aż w 8% u matek i córek, podczas gdy rozpoznanie endometriozy u bliskich powyżej pierwszego stopnia pokrewieństwa wiązało się tylko z 1% ryzykiem rozwoju endometriozy. Powyższe obserwacje zostały potwierdzone w badaniach epidemiologicznych żeńskiej populacji Norwegii i Anglii [42;43]. Porównując endometrium zdrowych kobiet i kobiet z rozpoznaną endometriozą Taylor i współpracownicy przeanalizowali ekspresję 12000 genów i wykazali nadekspresję 91 genów i niższą ekspresję 115 genów w eutopowym endometrium kobiet z endometriozą [44;45].

W ogniskach endometriozy wykazano złożone immunoglobuliny klasy IgG i dopełniacza [46], co pozwoliło sformułować autoimmunologiczną teorię endometriozy. Badania aktywności układu immunologicznego wykazały, osłabioną cytotoksyczność monocytów krwi obwodowej i makrofagów płynu otrzewnowego pobranych od kobiet z endometriozą wobec ektopowych komórek endometrium w porównaniu do zdrowych kobiet [47]. Potwierdzono również mniejszą aktywność komórek NK (Natural Killers) oraz limfocytów cytotoksycznych T (CLT, Cytotoxic T Lymphocytes) w indukcji apoptozy ektopowych komórek endometrialnych [48;49]. Stwierdzono, że komórki endometrium ektopowego wykazują oporność na apoptozę, co prawdopodobnie ułatwia im ucieczkę spod regulacji układu immunologicznego [49].

Na podstawie obserwacji klinicznych stosowania gestagenów w terapii endometriozy stwierdzono satysfakcjonujący efekt terapeutyczny tylko w pierwszych miesiącach leczenia [50]. Celem wytłumaczenia tego zjawiska w 2005 roku sformułowano teorię oporności endometriozy na progesteron. Wzajemna równowaga pomiędzy estrogenami i gestagenami zapewnia prawidłowe, cykliczne funkcjonowanie endometrium eutopowego [51]. Progesteron określany jest jako

hormon „*różnicujący*” lub „*hamujący wzrost*” endometrium spowodowany działaniem estrogenów, przede wszystkim estriolu (E_2) [52]. Obecność receptorów progesteronowych (PR, Progesterone Receptors) typu A i B (PR-A i PR-B) stwierdzono zarówno w komórkach zrębu jak i gruczołów endometrium zdrowych kobiet [53]. Tkanka z ognisk endometriozy charakteryzuje się minimalną ekspresją PR-B aktywującego między innymi dehydrogenazę 17- β -hydroksysteroidów typ 2 (17 β -HSD-2). Zadaniem 17 β -HSD-2 jest przekształcanie E_2 do mniej aktywnego estrogenu – estronu (E_1). Teoria oporności na progesteron zakłada, że niska ekspresja PR-B [54] powoduje brak odpowiedzi na progesteron a tym samym brak aktywacji 17 β -HSD-2, co prowadzi do dużego miejscowego stężenia E_2 , który jest uznanym czynnikiem indukującym rozrost tkanki endometrialnej [55].

Przedstawione koncepcje rozwoju endometriozy prezentują różne możliwe mechanizmy powstawania ognisk endometriotycznych. W wielu przypadkach są one komplementarne, w niektórych wzajemnie się wykluczają. Zakładając, że proces powstawania ogniska endometriozy jest wieloetapowy [56], być może wyjaśniają jego kolejne etapy. Jednakże ciągle trudno jest ustalić, czy pierwotnie upośledzona funkcja układu immunologicznego pozwala na powstanie endometriozy, czy to endometrium eutopowe kobiet z rozpoznaną endometriozą posiada możliwości ucieczki przed odpowiedzią immunologiczną, co pozwala na implantację komórek endometrialnych, a nieefektywna reakcja układu immunologicznego jest wtórna do zaistniałych zmian. Być może komórki złuszczonego endometrium dopiero w miejscu ektopowym, nabierają cech, które pozwalają im przeżyć poza swoim naturalnym środowiskiem jakim jest jama macicy i na ucieczkę przed mechanizmami regulatorowymi w tym również odpowiedzią immunologiczną? Szukając odpowiedzi na powyższe pytania zaplanowano i przeprowadzono badania kliniczne opisane w niniejszej rozprawie.

1.1.2 Diagnostyka i leczenie endometriozy

Ze względu na mało specyficzne objawy kliniczne rozpoznanie endometriozy w niektórych przypadkach może być trudne [57]. Obciążający wywiad rodzinny, bolesne miesiączkowanie, dyspareunia, oraz kłopoty z koncepcją mogą sugerować obecność endometriozy [57]. W badaniu fizykalnym zwracać należy uwagę na bolesność w trakcie badania dwuręcznego, obecność zmian guzowatych w

przydatkach lub w zatoce Douglasa oraz nieruchomy, tyłozgięty, bolesny trzon macicy [57]. Badania dodatkowe obejmują wykonanie przezpochwowego badania ultrasonograficznego (USG-TV, Transvaginal Ultrasound) narządu rodnego, obrazowanie miednicy mniejszej za pomocą rezonansu magnetycznego (MRI, Magnetic Resonance Imaging) oraz ocena stężenia antygenów: CA-19-9 i CA-125 w surowicy krwi pacjentek z podejrzeniem endometriozy [58]. W odniesieniu do przydatków USG-TV charakteryzuje się czułością* rzędu 57%-92% oraz swoistością** w zakresie 91%-99% [18]. Czułość MRI w diagnostyce endometriozy jest znacznie niższa i wynosi 11%-91% w zależności od lokalizacji i wielkości zmian przy swoistości rzędu 60%-98% [18]. Stężenie antygenu CA-125 w surowicy krwi kobiet z endometriozą jest znacznie podwyższone, jednakże występuje dopiero w zaawansowanej chorobie i nie znalazło zastosowania do rozpoznawania jej wczesnych etapów [59;60]. Czułość tej metody waha się w granicach 24%-94% przy dużej swoistości wynoszącej 83%-93% [61]. Antygen CA-19-9 jest rzadko stosowany w diagnostyce endometriozy, charakteryzuje się mniejszą czułością w porównaniu do CA-125 [62].

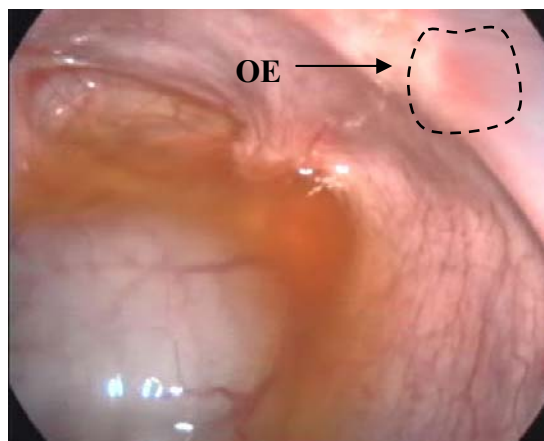
Złotym standardem rozpoznawania endometriozy jest laparoskopowa wizualizacja ektopowej tkanki endometrialnej z usunięciem zmiany w całości lub pobraniem wycinka, z następowym potwierdzeniem w badaniu histopatologicznym [63]. Jest to metoda inwazyjna, lecz jako jedyna pozwala na postawienie ostatecznego rozpoznania. Przyjmuje się również, że czułość i swoistość rozpoznań śródoperacyjnych stawianych przez wyszkolonych chirurgów-ginekologów z zastosowaniem metod dodatkowych jak barwienie metylenowe jest porównywalna z wynikami badań histopatologicznych [64]. Weryfikacja histologiczna w tych przypadkach nie jest wymagana do rozpoznania endometriozy, lecz pozostaje badaniem rekomendowanym [65].

* **Czułość** – miara zdolności testu do wykrycia choroby - odsetek osób chorych, u których wynik testu jest dodatni.

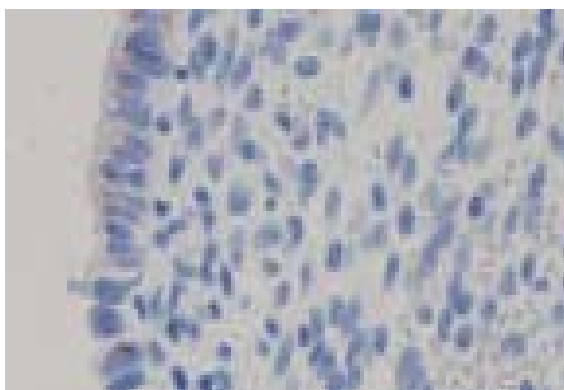
** **Swoistość** – miara zdolności testu do wykluczenia choroby – odsetek osób zdrowych, u których wynik testu jest ujemny.



Rycina 1. Torbiel endometrialna jajnika lewego (TEJL).



Rycina 2. Ognisko endometriozy (OE) otrzewnej ściennej.



Rycina 3. Endometrioza jajnikowa - preparat histopatologiczny (powiększenie x40).



Rycina 4. Endometrium sekrecyjne - preparat histopatologiczny (powiększenie x40).

Wybór metody leczenia pacjentek z endometriozą jest determinowany zgłaszanymi symptomami. Kobiety z rozpoznaną endometriozą szukają pomocy lekarskiej z powodu dolegliwości bólowych oraz w wyniku niepowodzeń w zajściu w ciążę. W pierwszym przypadku efektem terapeutycznym, jaki chcemy osiągnąć, jest ustąpienie dolegliwości bólowych i poprawa jakości życia. Druga grupa kobiet stanowi większe wyzwanie terapeutyczne, ponieważ efektem leczenia jest koncepcja, utrzymanie ciąży i urodzenie dziecka.

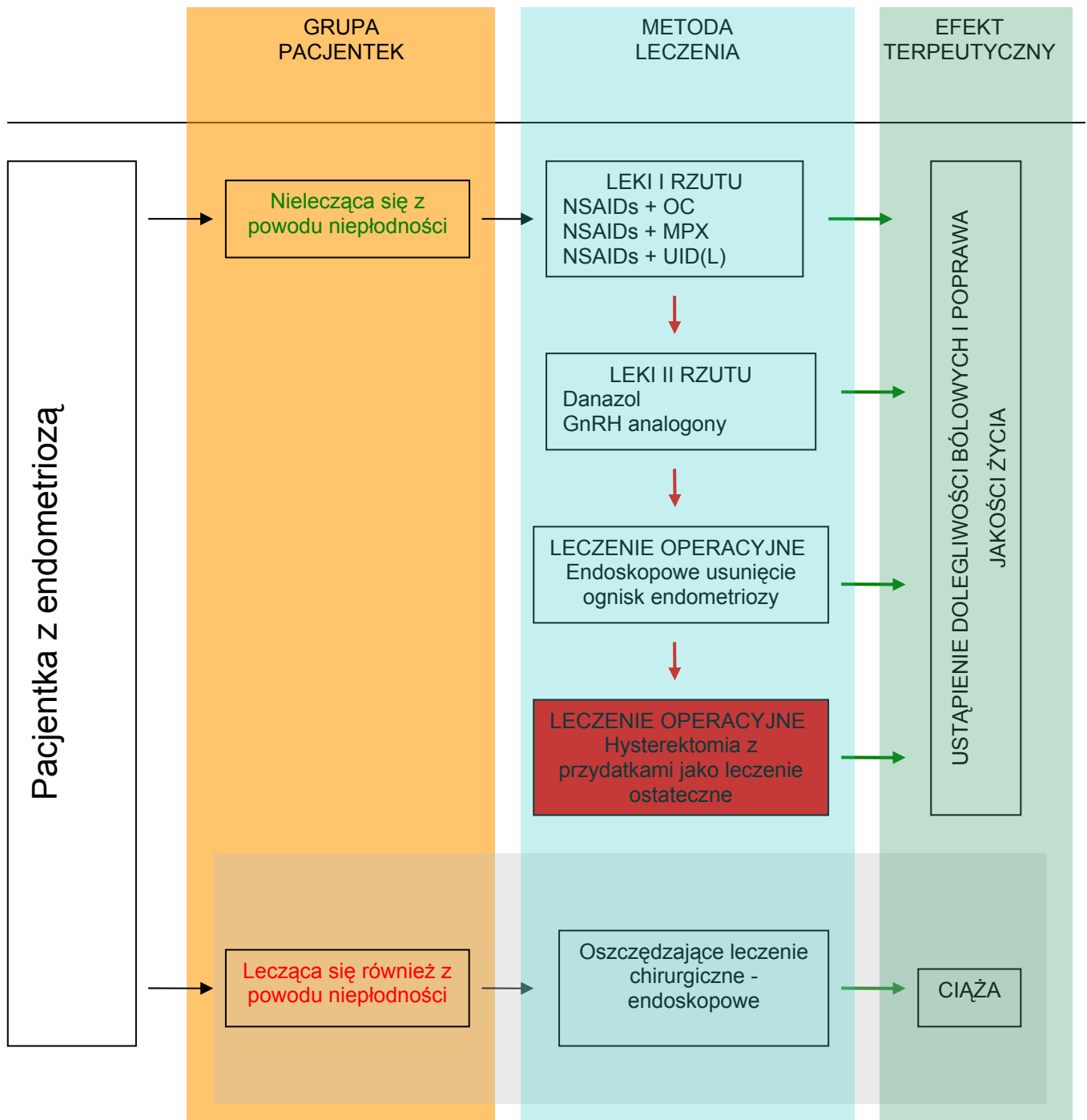
U pacjentek niezainteresowanych utrzymaniem płodności lekiem z wyboru są niesteroidowe leki przeciwzapalne (NSAIDs, NonSteroidal Antiinflammatory Drugs) oraz dwuskładnikowa doustna antykoncepcja (OC, Oral Contraception) [66]. Alternatywą do OC jest podanie medroxyprogsteronu (MPX) lub założenie wkładki domacicznej (IUD, Intrauterine Device) stopniowo uwalniającej levonogestrel [67].

Jako lek drugiego rzutu stosowany jest Danazol – (pochodna 17-a-etynylotestosteronu) analog steroidowy o silnych właściwościach przeciwigonadotropowych, który hamuje pulsacyjne wydzielanie gonadoliberyny (GnRH; Gonadotropin-Releasing Hormone) w podwzgórzu i wtórnie syntezę oraz wydzielanie luteotropiny (LH; Luteinizing Hormone) i folikulotropiny (FSH; Follicle-Stimulating Hormone) z przysadki oraz estradiolu przez jajniki. Niektóre badania jednakże nie wykazały większej skuteczności terapeutycznej Danazolu w porównaniu do OC czy MPX przy znacznie nasilonym jego działaniu niepożądanym [68].

Do grupy leków drugiego rzutu należą również analogi uwalniania GnRH jak na przykład goserelina [69]. Jest to syntetyczny deka-peptyd, którego podawanie po kilkudniowym wzroście wydzielania gonadotropin prowadzi do zahamowania ich syntezy i uwalniania, a w rezultacie do zahamowania czynności gonad oraz zmniejszenia stężenia hormonów płciowych.

W przypadku, gdy leczenie zachowawcze jest nieskuteczne, należy podjąć leczenie chirurgiczne, polegające najczęściej na laparoskopowym usunięciu ognisk endometriozy. W przypadku nawrotu choroby, co zdarza się sporadycznie, należy rozważyć całkowite usunięcie macicy wraz z przydatkami [70].

W przypadku rozpoznania endometriozy u kobiet leczonych z powodu niepłodności postępowaniem z wyboru jest laparoskopowe usunięcie ognisk endometriozy oraz uwolnienie zrostów w jamie otrzewnowej i miednicy mniejszej [63]. Zabieg powinien być oszczędzający, a jednocześnie usunąć najwięcej ognisk endometrialnych i przywrócić nie tylko prawidłowy stan anatomiczny, lecz przede wszystkim stan funkcjonalny żeńskiego narządu rodniczego [63]. Stwierdzono bowiem, że po leczeniu chirurgicznym znacznie wzrastają szanse na koncepcję zarówno w sposób naturalny jak i przy zastosowaniu technik rozrodu wspomaganego [71].



Rycina 5. Schemat postępowania terapeutycznego u kobiet z endometriozą. *NSAIDs*-niesteroidowe leki przeciwzapalne; *OC*-doustna antykoncepcja dwuskładnikowa; *MPX*-medroksyprogesteron w iniekcji; *IUD(L)*-wkładka domaciczna uwalniająca lewonogestrel; *GnRH*-gonadoliberyna.

1.1.3 Molekularne zmiany w endometrium i w ogniskach endometriozy

Endometrium zdrowych kobiet ulega cyklicznym zmianom funkcjonalnym [72]. Wbrew początkowym doniesieniom obecnie wiadomo, że menstruacja nie jest wyłącznie wynikiem skurczu tętnic spiralnych z następującą martwicą niedokrwienną [73;74], lecz śmierć komórek endometrium następuje poprzez apoptozę [75]. Apoptoza w endometrium ma charakter cykliczny i może zachodzić zarówno na drodze receptorowej jak i mitochondrialnej [76]. Za czynniki indukujące apoptozę uważa się komórki układu immunologicznego.

W podścielisku endometrium zidentyfikowano liczne komórki układu odpornościowego [77]. Najliczniejszą grupę stanowią komórki NK, których wyróżniono kilka subpopulacji w tym $CD56^{+};CD16^{-}$ [78;79]. Zaobserwowano również wzrost liczby komórek NK w endometrium, trwający od fazy sekrecyjnej do fazy proliferacyjnej, w której stanowią do 60% wszystkich leukocytów [79]. Komórki NK mają zdolność indukcji apoptozy poprzez wydzielanie granzymu B i perforyny [80;81;82]. Wykazano również wzrost aktywności granzymu B i perforyn w fazie sekrecyjnej cyklu miesięczkowego w porównaniu do fazy proliferacyjnej jak również silną korelację dodatnią pomiędzy liczbą komórek NK a aktywnością granzymu B i perforyn w endometrium zdrowych kobiet [83].

Porównanie endometrium kobiet zdrowych z eutopowym endometrium pacjentek z endometriozą nie wykazało statystycznie istotnych różnic w populacji leukocytów [84]. Stwierdzono natomiast znacznie niższą aktywność komórek NK w ogniskach endometriozy w porównaniu z endometrium zdrowych kobiet [84].

Zakłada się, że upośledzona funkcja komórek NK może predysponować do rozwoju endometriozy, jednakże ciągle nie przedstawiono jednoznacznej odpowiedzi czy pierwsze doszło do upośledzenia funkcji komórek NK, czy jest to zmiana wtórna, spowodowana obecnością ektopowej tkanki endometrialnej i nieefektywną aktywacją układu immunologicznego?

Analizując możliwy mechanizm oporności na apoptozę komórek endometrium oceniano ekspresję białek bcl-2 (antyapoptotyczne) i bax (proapoptotyczne) regulujących mitochondrialny szlak apoptozy oraz białka błonowego Fas – indukującego receptorowy szlak apoptozy.

Stwierdzono zależne od cyklu menstruacyjnego zmiany ekspresji białka bcl-2 w endometrium zdrowych kobiet [85;86]. Badając ekspresję bcl-2 w komórkach

gruczołowych endometrium, stwierdzono największą jego ekspresję w fazie proliferacyjnej i obniżenie ekspresji w fazie sekrecyjnej [85;86]. Komórki gruczołowe eutopowego endometrium kobiet z endometriozą również wykazują cykliczne zmiany w ekspresji bcl-2 ze szczytem w fazie proliferacyjnej [87]. Wyniki analizy ekspresji białka bax w endometrium nie były jednoznaczne. Według Tao i współpracowników ekspresja białka bax w endometrium zdrowych kobiet również podlega cyklicznym zmianom, osiągając maksimum w fazie sekrecyjnej, kiedy to obserwuje się nasilenie apoptozy komórek endometrium [88], natomiast McLaren ze współpracownikami postulują, że ekspresja bax w komórkach endometrium jest stała i niezależna od fazy cyklu menstruacyjnego [87]. W ogniskach endometriozy ekspresja białka bax nie wykazuje zmian cyklicznych [87]. Ekspresja białka bcl-2 w ogniskach endometriozy w porównaniu z endometrium zdrowych kobiet nie została jednoznacznie określona. Stwierdzono wyższą ekspresję białka bcl-2 w ogniskach endometriozy otrzewnowej [89], jak również wykazano wyższą ekspresję białka bax w porównaniu do endometriozy jajnikowej [90].

W endometrium zdrowych kobiet zidentyfikowano czynnik martwicy nowotworów α (TNF α , Tumor Necrosis Factor α), który osiąga najwyższy poziom w fazie sekrecyjnej cyklu menstruacyjnego [91]. W płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą wykazano znacznie wyższe stężenie TNF α wydzielanego przede wszystkim przez aktywowane makrofagi i monocyty [92]. Stężenie TNF α koreluje pozytywnie z zaawansowaniem choroby [93]. Równocześnie płyn otrzewnowy kobiet z endometriozą charakteryzuje się większym stężeniem formy rozpuszczalnej ligandu dla białka Fas (sFasL, soluble Fas Ligand) [94].

Potwierdzono podstawowe znaczenie apoptozy w cyklicznym wzroście i funkcjonowaniu endometrium zdrowych kobiet [76]. Również wykazano, że ogniska endometriozy nie charakteryzują się cyklicznymi zmianami w zakresie apoptozy. Oporność na apoptozę komórek endometrium ektopowego umożliwia powstanie i rozrost ogniska endometriozy [95].

1.2 Mechanizmy regulujące apoptozę

Po raz pierwszy termin *apoptoza* został użyty przez Kerr'a w 1972 roku i zdefiniowany jako: „*mało poznany mechanizm kontroli śmierci komórkowej, który wydaje się odgrywać uzupełniającą, lecz przeciwną rolę do mitozy w regulacji*

populacji komórek u zwierząt” [96]. Obecnie wiadomo, że jest to proces odgrywający kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy tkankowej [97]. W przeciwieństwie do nekrozy, gdzie śmierć komórki jest spowodowana deficytem energetycznym i pęknięciem błon mitochondrialnych, cytoplazmatycznych, komórkowych i jądrowych [98], apoptoza przebiega w sposób kaskadowy przy udziale proteaz serynowych - kaspaz biorących udział zarówno w przekazywaniu sygnału proapoptotycznego jak i uśmiercaniu komórki [99]. Komórkę ulegającą apoptozie charakteryzują zmiany morfologiczne, jak: obkurczenie jądra komórkowego i cytoplazmy, kondensacja chromatyny i tworzenie ciałek apoptotycznych [100]. Potwierdzono, iż dysfunkcje w indukcji jak również przekazywaniu sygnału proapoptotycznego prowadzą do powstania wielu chorób autoimmunologicznych, neurodegeneracyjnych, nowotworowych jak również endometriozy. W mechanizmie apoptozy dochodzi zarówno do odnowy i regeneracji tkanek poprzez eliminację uszkodzonych komórek jak i do inwolucji narządów [101].

Opisano szlak receptorowy (zewnątrzpochodny) i mitochondrialny (wewnątrzpochodny), jak również potwierdzono rolę retikulum endoplazmatycznego w przekazywaniu sygnału apoptotycznego.

1.2.1 Receptorowy szlak apoptozy

Indukcja apoptozy zależna od receptorów błonowych, jest jednym z najlepiej poznanych szlaków przekazywania sygnału śmierci komórki. W wyniku aktywacji przezbłonowych białek I typu [102] przez specyficzne ligandy lub obniżenie stężenia czynnika wzrostu (GF; Growth Factor) następuje aktywacja kaskady kaspaz, co w konsekwencji prowadzi do fragmentacji jądrowego DNA. Droga receptorowa indukcji apoptozy jest regulowana między innymi poprzez proapoptotyczne onkogeny: p53, p21, p38 [103;104].

1.2.1.1 Receptory błonowe szlaku apoptozy

Zidentyfikowano osiem rodzajów receptorów zawierających domeny śmierci (DD; death domain): TNF-R1; Fas; DR-3; DR-4; DR-5; DR-6; EDA-R i NGF-R mogących potencjalnie indukować przekazywanie sygnału śmierci komórki [105]. Występują one na błonie komórkowej niemal wszystkich komórek, a ich aktywacja poprzez odpowiednie ligandy śmierci prowadzi do indukcji apoptozy szlakiem

zewn tr pochodnym [106]. Zgodnie z klasyczną teori  szlaków apoptozy przy czenie trimeru liganda do receptora śmierci indukuje oligomeryzacj  receptora i przy czenie po jego stronie wewn tr cytoplazmatycznej jednego, lub więcej białek adaptorowych (FADD, TRADD, RIP, RIADD) [102]. Po czenie receptora i białka adaptorowego następuje za pomocą DD, które zbudowane są z 70 aminokwasów [107], co prowadzi do powstania kompleksu sygnałowego zapoc tkowywuj cego śmierć komórki (DISC, Death Initiated Signalling Complex) [106]. Receptory śmierci mogą również oligomeryzowa  spontanicznie bez udziału ligandu indukując powstanie DISC [108]. Powstaniu kompleksu DISC bez udziału specyficznego ligandu zapobiega obecność inhibitora białek z domen  śmierci (SODD, Silencer of Death Domains) [109].

Najlepiej poznanym białkiem błonowym receptorowego szlaku apoptozy jest proteina Fas (CD95/Apo-1), która należy do rodziny czynnika martwicy nowotworów (TNF-R cytokines; Tumor Necrosis Factor Related cytokines) [107]. Ligand proteiny Fas (FasL; CD95L; Apo-1L) występuje jako białko błonowe lub w formie rozpuszczalnej (sFasL; soluble Fas ligand), która powstaje w wyniku działania metaloproteinaz (MMP, Metaloproteinases) na formę błonową wyżej wymienionego białka [110;111]. Aktywacja białka Fas poprzez związanie ze swoim ligandem indukuje zmian  konformacji DD związanych z Fas - FADD/MORT-1 (Fas Associated Death Domain), co w konsekwencji prowadzi do aktywacji kaspazy-8 (zwanej również FLICE, FADD-like interleukine-1 -converting enzyme) i inicjacji komórkowej kaskady śmierci [112;113]. Kaspaza-8, oprócz rekrutacji kolejnych enzymów w kaskadzie kaspaz, posiada możliwość aktywacji białka bid, przez co może indukowa  uwolnienie cytochromu c i Endonukleazy G (EndoG), rozpoczynając tym samym mitochondrialny szlak apoptozy [114]. Zidentyfikowano białka hamujące kaspaz -8 do których należy między innymi czynnik FLIP (FLICE-inhibitory proteins) [105].

FLIP występuje w formie pełnowymiarowej – FLIP(L) (55kDa) i krótkiej – FLIP(S) (26kDa), które wraz z kaspaz -8 są rekrutowane, tworząc DISC [106]. FLIP(L) będący częściowym aktywatorem kaspazy-8, poprzez przekształcenie białka adaptorowego typu 2 związanego z receptorem TNF  (TRAF2, TNF  Receptor Associated Factor 2), decydując o aktywacji jądrowego czynnika kappa (NF-kB, Nuclear Factor kappa B) [115;116]. NF-kB jest silnym czynnikiem chroniącym kom rk  przed apoptoz  poprzez aktywacj  transkrypcji genów białek Bcl-2 oraz

komórkowych inhibitorów apoptozy 1 i 2 (c-IAP1; c-IAP2, cellular Inhibitors of Apoptosis 1 and 2) [117].

FADD reaguje również z zawierającym DD białkiem RIP (Receptor Interacting Protein), które poprzez RAIDD (death adapter protein capable of binding RIP), aktywuje kaspazę-2 [118;119]. Wykazano, że Fas aktywuje też białka nieposiadające DD jak DAXX (death domain associated protein), które indukuje apoptozę poprzez kinazę Jun [120;121].

Białko Fas reguluje funkcje komórek układu odpornościowego. Aktywacja receptorów antygenowych limfocytów T indukuje ekspresję FasL i prowadzi do Fas-zależnej apoptozy komórki docelowej [97]. Jednakże wykazano, że tylko związany z błoną komórkową FasL oraz agregaty sFasL w postaci trimerów mogą aktywować Fas. Monomery sFasL jak również przeciwciała anti-Fas nie indukują Fas-zależnej drogi apoptozy [122].

Czynnik martwicy nowotworów α jest prozapalną cytokiną, o działaniu proapoptotycznym, produkowaną przede wszystkim przez aktywowane makrofagi [123], a także w mniejszej ilości przez mastocyty, komórki endotelium, fibroblasty i neurony [124]. TNF α jest syntetyzowany jako przezbłonowe, tworzące trimery białko II typu (memTNF) [125;126]. W wyniku działania enzymu konwertującego TNF α (TACE; TNF Alfa Converin Enzyme) na błonową formę TNF α powstaje forma rozpuszczalna (sTNF; soluble TNF) [127]. Potwierdzono, że zarówno forma błonowa jak i rozpuszczalna TNF α indukują apoptozę poprzez receptory błonowe dla TNF (TNF-R; TNF-Receptor) [128]. TNF-R, które wiążą również limfotoksynę α (LT α), zawierają w domenie zewnątrzkomórkowej od jednego do sześciu powtórzeń cysteinowych tworzących mostki [129]. Zidentyfikowano dwa typy receptorów: TNF-R1 i TNF-R2, przy czym TNF-R1 po połączeniu z TNF indukuje przekazywanie sygnału śmierci komórki, natomiast TNF-R2 służy do amplifikacji sygnału proapoptotycznego [116], jak również może w sposób bezpośredni aktywować kinazę Jun (podobnie jak Fas przez DAXX) [130;131]. W przypadku braku ligandu homofilowe, dystalne, bogate w cysteinę domeny TNF-R1 i TNF-R2 oddziałują wzajemnie, tworząc PLAD (Preligand Binding Assembly Dmains), w ten sposób blokując przypadkową aktywację receptorów i indukcję szlaku apoptozy [108]. Podobnie jak TNF, TNF-R2 ulega działaniu TACE, a odcięte pozakomórkowe domeny wykazują działanie blokujące TNF-R1 [132].

Aktywacja TNF-R1 prowadzi do związania z cytoplazmatycznymi domenami DD tego receptora białka wzmacniającego z powinowactwem do domen śmierci receptora TNF α (TRADD, TNF α Receptor Associated Death Domain), co powoduje rekrutację białka FADD i indukcję apoptozy poprzez aktywację kaspazy-8 [133]. Połączenie z kompleksem TNF-R1/TRADD białka adaptorowego typu 2 związanego z TRAF2 powoduje fosforylację podjednostki hamującej NF-kB (Ik-B, inhibitory subunit of NF-kB) na drodze aktywacji kinazy IkB (IKK, IkB Kinase) i przez to aktywuje NF-kB, który ulega dimeryzacji i przemieszczeniu do jądra komórkowego [134].

W przypadku pobudzenia receptorów śmierci następuje indukcja sygnału proapoptotycznego za pomocą kaspazy-8 i kaspazy-2, które następnie aktywują pozostałe proteazy tworzące tak zwaną „kaskadę kaspaz”. W efekcie następuje fragmentacja DNA jądrowego. Należy zwrócić uwagę, że równolegle z aktywacją drogi apoptozy pobudzony zostaje szlak odpowiedzialny za przetrwanie komórki, którego głównym efektem jest NF-kB. Równowaga, w jakiej pozostają te dwie drogi aktywacji, zapewnia prawidłową homeostazę w tkankach organizmów wielokomórkowych.

1.2.1.2 Kaskada proteaz serynowych - kaspaz

Proteazy serynowe to enzymy odgrywające kluczową rolę w przekazywaniu, wzmacnianiu i wykonywaniu sygnału proapoptotycznego [135]. Nazwa kaspazy (*caspases*) powstała z kompilacji litery „c” (cysteine proteases) oraz zakończenia „aspse” określającego zdolność tych enzymów do rozcinania białek w miejscu kwasu asparaginianowego [135].

Zidentyfikowano 14 kaspaz, lecz nie wszystkie występują w tkankach ludzkich [136]. Kaspazy syntetyzowane są w formie nieaktywnych zymogenów [137], dopiero w wyniku rozcięcia łańcucha białkowego proenzymu w specyficznym miejscu powstaje ich aktywna forma [138]. Ze względu na długość i sekwencję N-końcowej domeny kaspazy podzielono na grupę z długą domeną N-końcową: prokaspaza-1; -2; -4; -5; -8; -9; -10. Natomiast do grupy z krótką domeną N-końcową należą: prokaspaza-3; -6; -7; -11; -13 [139]. Pierwsza grupa kaspaz charakteryzuje się obecnością wykonawczej domeny śmierci (DED, Death Executive Domain) oraz domeny rekrutacji kaspaz (CARD, CAspase Recruitment Domain) [140]. Kaspazy te

mogą ulegać aktywacji poprzez autoproteolizę indukowaną oligomeryzacją [141;142]. Natomiast aktywacja kaspaz o krótkich domenach N-końcowych wymaga etapu wstępnego - przecięcia przez aktywną kaspazę lub Granzym B, dopiero wtedy następuje etap autoproteolizy [143].

Aktywacja kaspaz odbywa się w sposób szeregowy, przy czym może dotyczyć nie tylko następnego w kolejności enzymu (*downstream activation*), lecz również poprzedniego (*upstream activation*) enzymu [135]. Ze względu na funkcję wyróżniono kaspazy indukujące (*inducers*), wzmacniające (*amplifiers*) i wykonawcze (*executives*). Do inicjujących należą: kaspaza-8 zwana także kaspazą początkową lub szczytową, oraz kaspaza-2 [107]. Największą grupę stanowią kaspazy wzmacniające sygnał: -9;-10; -11 [135]. Kaspazy wykonawcze to kaspaza-3 i -7 [135].

W kompartmentach komórkowych kaspazy występują w formie nieaktywnych proenzymów. Kaspaza-2 znajduje się przede wszystkim w cytozolu, choć mniejszą jej ilość zidentyfikowano również w mitochondriach i w jądrze komórkowym [139]. Kaspazę-3 zidentyfikowano zarówno w cytozolu jak również w mitochondriach [139]. Tylko w cytozolu komórkowym stwierdzono występowanie kaspazy-7 i -8 [139]. Natomiast kaspaza-9 występuje zarówno w cytozolu jak i mitochondriach [139].

1.2.2 Mitochondrialny szlak apoptozy

Mitochondria jako wyspecjalizowane organelle komórkowe poprzez syntezę związków wysokoenergetycznych pełnią podstawową rolę w utrzymywaniu komórki przy życiu [144]. Otoczone są błoną zewnętrzną oraz błoną wewnętrzną, która jest pofałdowana i tworzy grzebienie, tak zwane *cristy*, na których znajduje się cytochrom c – kluczowe białko łańcucha oddechowego [144]. Mitochondria regulują wewnątrzkomórkową homeostazę jonów wapnia, jak również są miejscem powstawania reaktywnych form tlenu (ROS, Reactive Oxygen Species). Uszkodzenie mitochondriów przez czynniki toksyczne powoduje dezintegrację błon mitochondrialnych oraz wzmożoną produkcję ROS. Jednym z pierwszych białek uwolnionych z mitochondrium jest cytochrom c [145]. Po przejściu do cytoplazmy komórkowej cytochrom c ulega związaniu z czynnikiem aktywacji proteaz 1 (Apaf-1; protease-activating factor-1), kwasem diadenozyno-trójfosforanowym (dATP) i prokaspazą-9, tworząc apoptosomy [146;147]. Związanie cytochromu c następuje

poprzez powtarzające się sekwencje aminokwasowe białka Apaf-1 określone jako WD-40 (12 powtórzeń), które zwiększają wzajemne powinowactwo białek oraz dATP [148], w rezultacie czego dochodzi do zmian przestrzennych domeny wiążącej kaspazy białka Apaf-1 [149] i zapoczątkowuje aktywację kaspazy-9 [150].

Mitochondrialny szlak apoptozy jest regulowany poprzez proteiny kodowane przez geny z rodziny bcl-2, [150], do której należą białka o działaniu proapoptotycznym jak bax, bak i bid oraz chroniące komórkę przed apoptozą: bcl-2 i bcl-x_L [151;152;153]. Stosunek proapoptotycznych i antyapoptotycznych białek z rodziny bcl-2 determinuje wrażliwość komórki na indukcję apoptozy [154]. Białko bak zidentyfikowano w mitochondriach natomiast białko bax w cytoplazmie komórek, obydwa znajdują się w formie nieaktywnych monomerów [155]. W odpowiedzi na sygnał proapoptotyczny następuje oligomeryzacja i przemieszczenie białka bax do błon mitochondrium [114]. Błonowe homooligomery tworzy również białko bak ulegając aktywacji [156]. W ten sposób w błonach mitochondrialnych powstają pory, jak również istnieją kanały anionowe zależne od potencjału (VDAC; voltage-dependent anion channel), przez które następuje uwolnienie cytochromu c [157]. Hepatocyty transgenicznym myszy charakteryzujące się brakiem ekspresji białek bax i bak [bax^{-/-}; bak^{-/-}] stają się odporne na apoptozę indukowaną etopozydem, starosporyną czy promieniowaniem ultrafioletowym [158].

Białka bcl-2 i bcl-x_L są odpowiedzialne za integralność błon mitochondrialnych i pełnią funkcję antyapoptotyczną [159]. Zamykając pory w błonach mitochondrialnych poprzez bezpośrednie związanie z VDAC białko bcl-x_L przeciwdziała uwolnieniu cytochromu c [160]. Mechanizm działania białka bcl-2 polega na wiązaniu się z proapoptotycznym białkiem bax i hamowaniu jego oligomeryzacji niezbędnej do powstania kanałów błonowych i uwolnienia cytochromu c z mitochondrium [161]. Sugerowany mechanizm antyapoptotyczny na poziomie apoptosomu, polegający na blokowaniu przez białka bcl-2 i bcl-x_L wiązania uwolnionego cytochromu c z białkiem Apaf-1 i aktywacji kaspazy-9, nie został potwierdzony [162].

W warunkach stresu oksydacyjnego spowodowanego nagromadzeniem ROS [163;164] z mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej uwolnione zostają pozostałe czynniki apoptotyczne, do których należy EndoG oraz czynnik indukcji apoptozy (AIF; Apoptosis Inducing Factor) [165;166]. EndoG jest syntetyzowana w jądrze komórkowym, a następnie transportowana do mitochondrium, gdzie poprzez syntezę primerów RNA bierze udział replikacji DNA mitochondrialnego [167]. W

wyniku aktywacji apoptotycznej następuje związanie EndoG z aktywną formą białka bid (tbid) [168] i uwolniona z mitochondriów EndoG przechodzi do jądra komórkowego, gdzie indukuje tworzenie nukleosomopodobnych fragmentów DNA [169]. Natomiast w wyniku aktywacji AIF, który jest flawoproteina, powstają duże fragmenty zdegradowanego DNA (>50kbp) [170]. Zwiększona ekspresja białka bax i hamowanie ekspresji białka bcl-x_L ułatwia uwolnienie EndoG. Tak więc szlak *bax/AIF/EndoG* stanowi główną i niezależną od kaspaz drogę apoptozy. EndoG fragmentuje jądrowe DNA niezależnie od aktywacji kompleksu DFF40/DFF45 [171]. Z mitochondriów komórek ulegających apoptozie uwalniane jest również białko Smac określane również jako DIABLO, które neutralizuje białka-inhibitory apoptozy (IAPs; Inhibitor of Apoptosis Proteins) [169].

1.2.3 Rola endoretikulum w przekazywaniu sygnału apoptozy

Retikulum endoplazmatyczne (ER, Endoplasmatic Reticulum) jest bardzo czułym organellem komórki, w którym syntetyzowane są peptydy i białka, ulegające procesowi obróbki potranslacyjnej (*splicing*) przybierając, w przypadku białek, strukturę III i IV-rzędową, co zapewnia ich prawidłowe funkcjonowanie [172]. Zewnętrzne czynniki uszkodzające, ekspresja nieprawidłowych genów i synteza niefunkcjonalnych białek (np. β -amyloid w chorobie Alzheimera) zaburza homeostazę ER [173]. Wywołuje to odpowiedź przystosowawczą (UPR, Unfolded Protein Response) poprzez aktywację białek czaperonowych powodujących hamowanie syntezy białek i ich degradację [174]. Jeżeli działanie czynników uszkodzających ER się przedłuża i mechanizm UPR staje się niewydolny, dochodzi do uwolnienia jonów wapnia (Ca^{2+}) z ER oraz aktywacji kaspazy-12, indukując apoptozę [175;176].

Wapń jest uniwersalnym przekaźnikiem sygnałowym biorącym udział w procesach zapłodnienia, rozwoju i różnicowania komórek, skurczu miocytów i neurotransmisji, jednakże przy dużym stężeniu w cytozolu staje się przekaźnikiem sygnału śmierci komórki [177]. Zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} powodują dezintegrację błon mitochondrialnych i zwiększając ich przepuszczalność stymulują uwolnienie cytochromu c, rozpoczynając mitochondrialny szlak apoptozy, aktywując kaspazę-9 [178;179;180]. Równocześnie translokacja białka bim,

należącego do rodziny protein bcl-2, aktywuje kaspazę-12 [181;182], która rekrutuje kaspazy-3; -6; -7 (downstream activation) oraz wstecznie kaspazę-8 (upstream activation) [183] aktywując kaskadę kaspaz.

1.2.4 Funkcjonowanie szlaków apoptozy

Receptorowy i mitochondrialny szlak apoptozy nie funkcjonują obok siebie jako alternatywne drogi przekazywania sygnału proapoptotycznego. Wręcz przeciwnie, aktywacja jednego ze szlaków prowadzi do aktywacji drugiego, a wzajemne przełączenia sygnału proapoptotycznego istnieją na różnych piętrach kaskady apoptozy [135]. Po aktywacji receptorowego szlaku apoptozy kaspaza-8 aktywuje kolejne kaspazy, równocześnie poprzez rekrutację białka bid „włącza” szlak mitochondrialny [107]. W przypadku aktywacji szlaku mitochondrialnego rekrutacja kaspazy-9 do apoptosomu aktywuje enzymy kaskady kaspaz [178]. Jeżeli indukcja apoptozy zachodzi w ER następuje przekazanie sygnału proapoptotycznego zarówno na szlak zewnątrzpochodny (poprzez kaspazę-12) jak również wewnątrzpochodny (poprzez jony wapnia) [179;181].

W efekcie współdziałania różnych szlaków apoptozy (cross-talk) następuje aktywacja kaspazy-3, dla której substratem jest kompleks czynnika fragmentacji DNA (DFF40/DFF45). Przyczyną zmniejszonej apoptozy w ogniskach endometriozy może być zaburzenie przekazywania sygnału apoptotycznego [184]. Transdukcja sygnału apoptotycznego jest procesem skomplikowanym, obejmuje wiele mechanizmów i wymaga obecności wielu białek.

1.3. Rola białka DFF-45 w procesie apoptozy

Kompleks DFF40/DFF45 (DFF, DNase Fragmentation Factor) jest utworzony z białka o masie cząsteczkowej 40kDa (DFF40) określanego również jako CAD (Caspase Activated DNase) oraz białka o masie cząsteczkowej 45kDa (DFF45) opisywanego również jako inhibitor CAD (ICAD; Inhibitor of Caspase Activated DNase). DFF40 składa się z 2 domen pełniących różne funkcje biologiczne [185]. Domena C-końcowa charakteryzuje się funkcją katalityczną i powoduje fragmentację DNA jako końcowy etap procesu apoptozy, N-końcowa domena pełni funkcję regulatorową i łączy się z DFF45 [186].

DFF45 pełni nie tylko rolę inhibitora, lecz również regulatora dla DFF40. N-końcowe domeny DFF40 i DFF45 są komplementarne, co gwarantuje prawidłowe powstanie kompleksu DFF40/DFF45 [187]. Nie jest możliwe uzyskanie aktywnej formy DFF40 przy braku białka DFF45, które zapewnia powstanie odpowiedniej struktury trzeciorzędowej DFF40 i w konsekwencji jego prawidłowe funkcjonowanie [188]. W wyniku działania kaspazy-3 następuje przecięcie w trzech miejscach łańcucha białka DFF45 i uwolnienie aktywnej formy DFF40 [189]. Aktywowane przez kaspazę-3 białko DFF40 występuje jako oligomer i łącząc się z histonem H1 indukuje rozpad chromatyny i fragmentację DNA na odcinki zawierające około 200 par nukleotydów (*laddering*) [190]. Wykazano również, że obecność białka DFF40 jest niezbędna do uzyskania przez DFF45 prawidłowej struktury przestrzennej, co z kolei gwarantuje utrzymanie trzeciorzędowej struktury DFF40 w kompleksie DFF40/DFF45 [187]. Tak więc DFF40 i DFF45 są dla siebie wzajemnymi chaperonami [187].

W prawidłowej komórce białka DFF40 i DFF45 są syntetyzowane w stechiometrycznym stosunku 1:1 [191]. W wyniku alternatywnej obróbki potranslacyjnej syntetyzowane jest również białko DFF o masie cząsteczkowej 35kDa (DFF35) (ICAD-S; Inhibitor of Caspase Activated DNase - Short) [192;193]. Pomimo że białko DFF35 ma zdolność wiązania DFF40 jednakże aktywna forma DFF40 może zostać zsyntetyzowana tylko w obecności komplementarnego DFF45. Funkcja białka DFF35 w komórce nie została jednoznacznie określona - hipotetycznie może ono służyć jako dodatkowy inhibitor dla DFF40, jednakże nie ma bezpośrednich badań potwierdzających tę teorię [194].

Zarówno w badaniach *in vitro* jak i w badaniach klinicznych potwierdzono udział białka DFF45 w procesie apoptozy [195]. Mysie tymocyty wyhodowane w warunkach laboratoryjnych i charakteryzujące się brakiem ekspresji DFF45 nie ulegały apoptozie. Również linie ludzkich fibroblastów DFF45^{-/-} były odporne na apoptozę indukowaną przez TNF α [196].

W badaniach klinicznych pacjentów z rakiem odbytnicy potwierdzono, że zmniejszona ekspresja białka DFF45 w guzie wiązała się z gorszym rokowaniem [197]. Również cięższy przebieg kliniczny charakteryzował pacjentów z rozpoznanym rakiem przełyku, którego komórki nowotworowe miały niską ekspresję białka DFF45 [198]. Mięśnie sercowe pobrane od dawców, które następnie z przyczyn niewydolności hemodynamicznej nie były kwalifikowane do wszczepienia

biorcom charakteryzowały się wyższą ekspresją białka DFF45 w kardiomiocytach w porównaniu z mięśniami sercowymi spełniającymi hemodynamiczne kryteria kwalifikacji do transplantacji [199].

Białko DFF45 zostało wybrane, ponieważ stanowi ostatni, wspólny element łączący szlaki apoptozy, jego funkcja i umiejscowienie w komórce zostało dokładnie zbadane, co pozwoli na wyciągnięcie wiarygodnych wniosków. Dodatkowo białko DFF45 nie było dotąd przedmiotem analizy w aspekcie patogenezy endometriozy.

Biorąc pod uwagę, że DFF40 tworzy dimery i oligomery, co utrudnia jego jednoznaczną analizę metodą *Western-blot* oraz stechiometryczny stosunek występowania DFF40:DFF45 wynoszący 1:1 jak również fakt, że bez obecności DFF45 nie może powstać aktywna forma białka DFF40, uznano oznaczenie białka DFF45 jako przydatne do analizy mechanizmów apoptozy w endometrium.

2. Cele pracy

Przedmiotem badania jest ocena ekspresji białka DFF45, jako ostatniego ogniwa kaskady przekazywania sygnału proapoptotycznego oraz próba przedstawienia jego funkcji i znaczenia w etiopatogenezie endometriozy jajnika.

Główne cele badawcze:

1. Lokalizacja białka DFF45 w próbkach tkankowych pochodzących z endometriozy jajnikowej, endometrium oraz z prawidłowego jajnika metodą immunohistochemiczną.
2. Ilościowa ocena białka DFF45 w próbkach tkankowych endometriozy jajnikowej, endometrium oraz prawidłowego jajnika metodą *Western-blot*.

Szczegółowe cele badawcze:

1. Porównanie ekspresji białka DFF45:
 - a) w próbkach tkankowych pochodzących z endometrium proliferacyjnego i z endometrium sekrecyjnego,
 - b) w próbkach pochodzących z prawidłowej tkanki jajnikowej pobranej w I fazie cyklu menstruacyjnego i prawidłowej tkanki jajnikowej pobranej w II fazie cyklu menstruacyjnego.
2. Określenie czy próbki tkankowe pochodzące z endometriozy jajnika różnią się względną ilością białka DFF45 w zależności od fazy funkcjonalnej cyklu menstruacyjnego.
3. Porównanie względnej ilości białka DFF45 w próbkach tkankowych endometriozy jajnikowej, endometrium w I fazie cyklu menstruacyjnego oraz endometrium w II fazie cyklu menstruacyjnego.
4. Ocena względnej ilości białka DFF45 w próbkach endometriozy jajnikowej, prawidłowej tkance jajnikowej w I fazie cyklu menstruacyjnego oraz w prawidłowej tkance jajnikowej w II fazie cyklu menstruacyjnego.
5. Ustalenie czy występuje związek między względną ilością białka DFF45 a stopniem endometriozy ocenianym śródoperacyjnie w punktowej zrewidowanej skali Amerykańskiego Towarzystwa Płodności (AFS) oraz ocena charakteru korelacji (liniowa/nieliniowa; dodatnia/ujemna).

3. Materiał i metody badania

3.1 Dane kliniczne kobiet uczestniczących w badaniu

Materiał tkankowy pobierano w Klinice Ginekologii i Niepłodności Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (protokół oznaczono symbolem K – „numer kolejny pacjentki”) (Aneks 4) oraz w Oddziale Ginekologiczno-Położniczym Szpitala Rejonowego w Suchoj Beskidzkiej (protokół oznaczono symbolem S – „numer kolejny pacjentki”) (Aneks 4) po uprzednim uzyskaniu odpowiednio zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie nr KBET/131/B2005 oraz zgody Komisji Bioetycznej przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Bielsku-Białej z dnia 04. 04. 2005 roku. Łącznie próbki tkankowe pobrano od 100 pacjentek, a wszystkie uczestniczki wyraziły pisemną, świadomą zgodę na udział w badaniu. Żadna z pacjentek, które poproszono o udział w badaniu, nie udzieliła odpowiedzi odmownej.

Zastosowano następujące kryteria włączenia do badania:

1. ukończone 18 lat życia,
2. brak stosowania terapii hormonalnej przez ostatnie sześć miesięcy.

Do badania nie włączano:

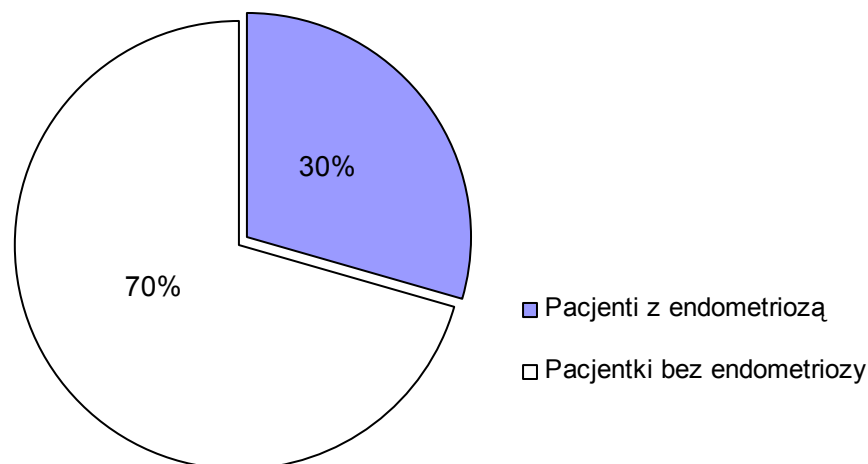
1. pacjentek ciężarnych,
2. pacjentek po menopauzie,
3. pacjentki z zespołem policystycznych jajników (PCOS, Polycystic Ovarian Syndrom)
4. pacjentek chorujących na choroby nowotworowe lub u których istniało podejrzenie procesu nowotworowego.

Uwzględniając kliniczne rozpoznanie śródoperacyjne oraz wynik badania histopatologicznego pobranego materiału tkankowego, jak również podane powyżej kryteria włączenia i wyłączenia, do ostatecznej analizy zakwalifikowano 88 pacjentek. Przyczyny wykluczenia przedstawia tabela 1.

Tabela 1. Przyczyny wyłączenia pacjentek z analizy.

Lp.	Kod pacjentki	Przyczyna wykluczenia
1	K-3	Zespół policystycznych jajników (rozpoznanie histopatologiczne)
2	K-7	Atroficzne zmiany jajników i endometrium (rozpoznanie histopatologiczne).
3	K-19	Guz zapalny okolicy jelita czczego (rozpoznanie śródoperacyjne, potwierdzone w badaniu histopatologicznym).
4	K-21	Zespół policystycznych jajników (rozpoznanie histopatologiczne).
5	K-24	Zespół policystycznych jajników (rozpoznanie histopatologiczne).
6	K-27	Gruczolakotorbielak śluzowaty jajnika prawego (rozpoznanie histopatologiczne).
7	K-28	Przerost endometrium bez cech atypii (rozpoznanie histopatologiczne).
8	S-23	Gruczolakotorbielak śluzowaty jajnika lewego (rozpoznanie histopatologiczne).
9	S-40	Guz jajnika prawego o granicznej złośliwości (rozpoznanie histopatologiczne).
10	S-42	Gruczolakotorbielak śluzowaty jajnika prawego (rozpoznanie histopatologiczne).
11	S-45	Metaplasja śródnabłonkowa szyjki macicy 3. stopnia (rozpoznanie histopatologiczne).
12	S-47	Gruczolakotorbielak śluzowaty jajnika prawego (rozpoznanie histopatologiczne).

Badaną populację kobiet na podstawie rozpoznania klinicznego, potwierdzonego oceną histopatologiczną, podzielono na grupę kobiet leczonych operacyjnie z powodu endometriozy – PACJENTKI Z ENDOMETRIOZĄ (n=26) oraz leczonych operacyjnie z innej przyczyny – PACJENTKI BEZ ENDOMETRIOZY (n=62).



Rycina 6. Charakterystyka badanej grupy kobiet pod względem rozpoznania endometriozy.

3.1.1 Charakterystyka pacjentek z endometriozą

Grupę stanowi 26 kobiet, u których śródoperacyjnie rozpoznano endometriozę jajnikową, co następnie zostało potwierdzone wynikiem badania histopatologicznego. Charakterystykę kliniczną pacjentek przedstawia Aneks 1.

Średnia* wieku pacjentek z endometriozą wynosiła 42,1 lat, odchylenie standardowe* (SD) $\pm 6,7$ a rozkład wieku był zbliżony do rozkładu normalnego (S-W=0,966; $p=0,517$). Mediana** wieku wystąpienia pierwszej miesiączki wynosiła 13 lat, rozstęp kwartyłowy** (Q_3-Q_1) 2, a rozkład był różny od normalnego (S-W=0,883; $p=0,007$). W grupie kobiet z endometriozą cykl miesięczkowy trwał średnio 28,9 dni (SD $\pm 2,0$), z rozkładem zbliżonym do normalnego (S-W=0,928; $p=0,068$) i u 21 pacjentek (80,8%) był regularny. Mediana czasu trwania krwawienia miesięczkowego u kobiet z rozpoznaną endometriozą wynosiła 5 dni ($Q_3-Q_1=1$) i

* **Średnia arytmetyczna i Odchylenie Standardowe (SD)** zostały użyte do charakterystyki zmiennych o rozkładzie zbliżonym do normalnego. Średnia arytmetyczna została wyliczona jako iloraz sumy wartości wszystkich zmiennych i liczebności grupy. Odchylenie Standardowe zgodnie z regułą trzech sigm zawiera 31,73% wszystkich przypadków, tak więc $\pm SD$ zawiera w przybliżeniu 68,27% wszystkich przypadków.

** **Mediana i Rozstęp Kwartyłowy (Q_3-Q_1)** zostały użyte do charakterystyki zmiennych o rozkładzie różnym od normalnego. Mediana to wartość dzieląca zbiorowość na dwie równe części. Rozstęp kwartyłowy stanowi różnicę między kwartylem trzecim pierwszym (Q_3-Q_1) i określa przedział, w którym znajduje się 50% wszystkich obserwacji.

rozkład różnił się od normalnego ($S-W=0,906$; $p=0,021$). Większość kobiet miała obfite miesiączki - 16 (61,5%), krwawienie miernego stopnia zgłosiło 7 (26,9%) pacjentek, a jedynie 3 (11,6%) podały skąpe miesiączki. Dolegliwości bólowe w trakcie miesiączki występowały u 18 (69,2%) kobiet.

Mediana liczby ciąż u pacjentek z rozpoznaną endometriozą wynosiła 1 ($Q_3-Q_1=1$), mediana liczby porodów 1 ($Q_3-Q_1=2$), a rozkłady były różne od normalnego (odpowiednio $S-W=0,839$ $p=<0,001$ oraz $S-W=0,835$ $p<0,001$). U trzech pacjentek jednokrotnie wystąpiło poronienie samoistne, co stanowi 11,5% grupy badanej.

Analiza procedur chirurgicznych wykazała, że u 14 (53,8%) kobiet wykonano laparotomie a u pozostałych 12 (46,2%) laparoskopie, którym w 6 (23,1%) przypadkach towarzyszyła hysteroskopia diagnostyczna z pobraniem materiału tkankowego.

U 14 (53,8%) pacjentek z endometriozą współistniał rozrost mięśniakowaty macicy. Schorzenia przewlekłe rozpoznano u 3 (11,5%) pacjentek z endometriozą. Również 3 (11,5%) kobiety z analizowanej grupy w przeszłości poddane zostały interwencji chirurgicznej, co przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Charakterystyka grupy kobiet z endometriozą pod względem schorzeń przewlekłych i przeszłości operacyjnej.

Lp.	Kod pacjentki	Choroba przewlekła / Zabieg operacyjny
1	K-14	Nadczynność tarczycy.
2	K-16	Choroba zwyrodnieniowa kręgosłupa.
3	S-14	Choroba niedokrwienność mięśnia sercowego.
4	S-35	Wycięcie wyrostka robaczkowego.
5	S-36	Wycięcie wyrostka robaczkowego.
6	S-43	Wycięcie wyrostka robaczkowego.

W trakcie każdego zabiegu operacyjnego oceniano śródoperacyjnie nasilenie zmian endometriotycznych według punktowej skali klasyfikacji endometriozy (RCE; Revised Classification of Endometriosis) rekomendowanej przez Amerykańskie Towarzystwo Płodności (AFS; American Fertility Society) (Aneks 3). Na tej podstawie wyróżniono cztery stopnie endometriozy przedstawione w tabeli 3.

Tabela 3. Skala oceny endometriozy według Amerykańskiego Towarzystwa Płodności (AFS).

Lp.	Stopnie endometriozy	Punktacja wg AFS
1	I	1 - 5
2	II	6 - 15
3	III	16 - 40
4	IV	> 40

Pierwszy stopień endometriozy rozpoznano u 3 (11,6) pacjentek, co stanowi 15% badanej grupy. Kolejne 6 (23,1%) pacjentek miało drugi stopień zaawansowania endometriozy, a trzeci stopień choroby rozpoznano również u 6 (23,1%) kobiet. Grupę z czwartym stopniem endometriozy stanowiło 11 (42,2%) pacjentek.

3.1.2 Charakterystyka kliniczna pacjentek bez endometriozy

W grupie 62 kobiet interwencje chirurgiczne wykonano z powodu łagodnych schorzeń układu rodneg (Aneks 2). Średni wiek pacjentek wynosił 43,2 lata (SD $\pm 4,8$) i charakteryzował się rozkładem zbliżonym do normalnego (S-W=0,959; p=0,125), a mediana wieku menarche wyniosła 14 lat ($Q_3-Q_1=2$) z rozkładem różnym od normalnego (S-W=0,904; p<0,001). Średnia długość cyklu miesięczkowego u kobiet bez endometriozy wynosiła 28,9 dni (SD $\pm 2,3$), a rozkład był zgodny z rozkładem normalnym (S-W=0,970; p=0,138) i 41 (66,1%) pacjentek miało cykle regularne. Mediana czasu trwania miesiączek u kobiet bez endometriozy wynosiła 5 dni ($Q_3-Q_1=3$) i czas trwania krwawienia miesięczkowego charakteryzował się również rozkładem różnym od normalnego (S-W=0,906; p=0,021). Obfite miesiączki miało 34 (54,8%), a średnio nasilone krwawienie miesięczne występowało u 23 (37,1%) pacjentek. U 5 (8%) pacjentek miesiączki były skąpe. Dolegliwości bólowe w trakcie miesiączki miało 22 (35,5%) kobiet bez endometriozy, u pozostałych 40 (64,5%) miesiączki były niebolesne. Mediana liczby ciąż w grupie kobiet bez endometriozy wynosiła 2 ($Q_3-Q_1=1$) z rozkładem różnym od normalnego (S-W=0,839; p<0,001), a mediana liczby porodów również wynosiła 2 ($Q_3-Q_1=1$) i charakteryzowała się rozkładem różnym od normalnego (S-W=0,835; p<0,001), U 10 (16,1%) kobiet wystąpiło jednokrotnie poronienie samoistne.

Tabela 4. Charakterystyka grupy kobiet bez endometriozy pod względem schorzeń przewlekłych i przeszłości operacyjnej.

Lp.	Kod pacjentki	Choroba przewlekła / Zabieg operacyjny
1	K-1	Nadciśnienie tętnicze krwi.
2	K-4	Polipy jamy nosowej.
3	K-5	Wole gruczołu tarczowego.
4	K-6	Uchyłkowatość jelita grubego. Operacja przepukliny pachwinowej lewej. Usunięcie przydatków lewych z powodu torbieli jajnika lewego.
5	K-8	Nadciśnienie tętnicze krwi.
6	K-22	Cięcie cesarskie. Wycięcie wyrostka robaczkowego.
7	S-18	Choroba zwyrodnieniowa lewego stawu biodrowego.
8	S-19	Reumatoidalne zapalenie stawów.
9	S-20	Wycięcie wyrostka robaczkowego.
10	S-25	Częściowa resekcja gruczołu tarczowego z powodu zmian guzowatych.
11	S-26	Choroba niedokrwienna mięśnia sercowego.
12	S-28	Wycięcie łagodnego guzka lewego gruczołu piersiowego.
13	S-29	Zespół depresyjny
14	S-32	Reumatoidalne zapalenie stawów.
15	S-33	Choroba niedokrwienna mięśnia sercowego. Cukrzyca. Wycięcie jajnika prawego z powodu ciąży pozamacicznej.
16	S-41	Częściowa resekcja gruczołu tarczowego z powodu zmian guzowatych.
17	S-44	Reumatoidalne zapalenie stawów. Cukrzyca. Wycięcie wyrostka robaczkowego.

W badanej grupie 12 (19,4%) kobiet cierpiało na choroby przewlekłe, a 8 (12,9%) pacjentek miało w przeszłości wykonywany zabieg chirurgiczny, co przedstawiono w tabeli 4.

U 57 (91,9%) pacjentek bez endometriozy wykonano laparotomie, w 3 (4,8%) przypadkach laparoskopie oraz w 2 (3,3%) przypadku laparoskopie i hysteroskopie diagnostyczne z pobraniem materiału tkankowego.

Najczęstszym wskazaniem do interwencji chirurgicznej był rozrost mięśniakowaty macicy, który stwierdzono u 54 (87,1%) kobiet. W 7 przypadkach rozrostowi mięśniakowatemu macicy towarzyszyły łagodne zmiany w przydatkach (3 torbiele proste jajnika prawego, 2 torbiele proste jajnika lewego, torbiel dermoidalna jajnika lewego oraz torbiel okołojajnikowa po stronie prawej), a w jednym przypadku wysiłkowe nietrzymanie moczu z powodu obniżenia narządu rodowego. W 2 (3,3%) przypadkach wskazaniem do interwencji chirurgicznej była rozpoznana torbiel jajnika lewego w skręcie, w 1 (1,6%) przypadku torbiel dermoidalna jajnika lewego oraz w 1 (1,6%) przypadku torbiel dermoidalna jajnika prawego. U 4 (6,4%) pacjentek wykonano zabieg operacyjny z powodu zespołu bólowego miednicy mniejszej.

3.2 Materiał tkankowy

Próbki tkankowe zostały pobrane w trakcie rutynowych zabiegów operacyjnych:

1. **całkowite wycięcie macicy z przydatkami obustronnie / amputacja trzonu macicy z przydatkami obustronnie** – pobierano wycinek jajnika prawego oraz jajnika lewego i wycinek endometrium,
2. **całkowite wycięcie macicy z przydatkami jednostronnie / amputacja trzonu macicy z przydatkami jednostronnie** – pobierano wycinek zresekowanego jajnika i wycinek endometrium,
3. **całkowite wycięcie macicy bez przydatków / amputacja trzonu macicy bez przydatków** – pobierano wycinek endometrium,
4. **hysteroskopia diagnostyczna z pobraniem wycinków endometrium do badania histopatologicznego** - z fragmentów tkankowych pobranych rutynowo do badania histopatologicznego część tkanki endometrium została przekazana do analiz laboratoryjnych.

Wycinek próbki tkankowej pobieranej do badań w przypadku jajnika wynosił **3-4mm³** i w przypadku endometrium również **3-4mm³**, co stanowiło ułamek całości materiału wysyłanego do pracowni patomorfologicznej i nie miało wpływu na wynik badania histopatologicznego.

. Następnie próbki tkankowe na podstawie rozpoznania histopatologicznego podzielono na 5 grup funkcjonalnych:

1. endometrioza jajnika,
2. endometrium w I fazie cyklu menstruacyjnego,
3. endometrium w II fazie cyklu menstruacyjnego,
4. jajnik prawidłowy w I fazie cyklu menstruacyjnego,
5. jajnik prawidłowy w II fazie cyklu menstruacyjnego.

3.3 Metoda immunohistochemiczna

Immunolokalizacja białka DFF45 została przeprowadzona w 50 losowo wybranych próbkach tkankowych (endometrioza n=10; endometrium proliferacyjne n=10; endometrium sekrecyjne n=10; jajnik w I fazie cyklu menstruacyjnego n=10 oraz jajnik w II fazie cyklu menstruacyjnego n=10). Skrawki parafinowe pobrano z archiwum Zakładu Patomorfologii „INTRA” w Cieszynie.

Skrawki tkankowe grubości 5µm zostały odparafinowane, ponownie uwodnione i zanurzone w wodzie destylowanej. Następnie próbki przez 8 minut (± 1) były inkubowane w 3% roztworze H_2O_2 w temperaturze pokojowej.

W celu immunolokalizacji białka DFF45 użyto 100µg pierwszorzędowych, poliklonalnych przeciwciał króliczych anti-DFF45 klasy IgG, które rozcieńczano w stosunku 1:75 w buforze Tris-HCl zawierającym białko stabilizujące oraz 0,015mol/L azydku sodu (DakoCytomation). Próbki tkankowe następnie inkubowano w temperaturze pokojowej z rozcieńczonym roztworem przeciwciał anti-DFF45 przez 30 minut (± 1). Szkiełka następnie przemywano wodą destylowaną. Do wybarwienia preparatów zastosowano zestaw EnVision+System-HRP (DakoCytomation), będący dwustopniową techniką barwienia immunohistochemicznego, opartym na polimerze znakowanym peroksydazą i przeznaczonym do użycia z pierwszorzędowymi przeciwciałami króliczymi. Po pokryciu próbki tkankowej znakowanym polimerem (Labelled Polimer) była ona inkubowana przez 30 minut (± 1) w temperaturze pokojowej. Po przepłukaniu próbki tkankowej w buforze celem wywołania reakcji barwnej zastosowano chromogen (DakoCytomation) zawierający 0,75mg/ml 3-amino-9-etylokarbazolu w 2,5% N,N-imetyloformamidzie i 0,05mol/L buforu octanowego o pH 5,0. Czas inkubacji przeprowadzonej w temperaturze pokojowej wynosił 8minut (± 1). Skrawki tkankowe zostały następnie umocowane i przykryte

szkiełkiem nakrywkowym przy użyciu wodnego środka mocującego Glycergel (DakoCytomation)

Immunoreaktywność białka DFF45 w badanych tkankach została przedstawiona w sposób opisowy.

3.4 Metoda *Western blot*

Natychmiast po pobraniu fragmenty tkanek homogenizowano w homogenizatorze obrotowym szkło – szkło w obecności mieszaniny inhibitorów proteaz Complete (Roche, Niemcy) i uzyskany homogenat przechowywano w temperaturze –20 stopni Celsjusza (°C) do czasu analizy badanych białek.

Po rozmrożeniu homogenaty mieszano z buforem (125 mM Tris-HCl pH=6,8, 4% SDS, 1% Triton X-100) w stosunku objętościowym 1:1 i inkubowano we wrzącej łaźni wodnej przez czas 15 (±1) minut, następnie zamrażano w ciekłym azocie. Po rozmrożeniu próbki wirowano w temperaturze pokojowej przy 16000g przez 10 (±1) minut uzyskując supernatant zawierający mieszaninę białek. Przy użyciu zestawu kwasu bitynchoninowego (BCA) na 96-studzienkowej płytce oznaczano stężenie białka całkowitego, następnie dodawany był ditiotritol (DTT) jako czynnik redukujący. W łaźni wodnej w temperaturze 90°C przez 10 (±1) minut przeprowadzano reakcję redukcji (i denaturacji białek).

W układzie buforowym Tris–trycyna z zastosowaniem żelu poliakrylamidowego SDS–PAGE wykonano rozdział elektroforetyczny 40µg białka całkowitego w obecności próbki wzorcowej P14, która służyła jako wzorzec pomiaru intensywności uzyskanych prążków. Następnie przez 90 (±1) minut wykonywano elektrotransfer rozdzielonych białek na membranę z polifluorku winylidenu (PVDF) o porach 0,45 µm (Immobilion–P, Milipore, USA) w buforze (2,5 mM Tris-HCl, 19,2 mM glicyna pH=8,5, 10% obj. metanol) przy natężeniu prądu 0,2 A.

Umieszczając membrane po elektrotrasferze na dobę w (3%) roztworze odtłuszczonego mleka o temperaturze 4°C blokowano niespecyficzne miejsca wiązania przeciwciał na membranach. Przez 90 (±1) minut inkubowano membrany z przeciwciałami pierwszorzędowymi stosowanymi w rozcieńczeniu 1:5000. Następnie czterokrotnie (przez 10 minut każde) płukano membrany w buforze TST (0,01M Tris-HCl pH=7,4; 0,9 % w/w NaCl, 0,05% w/obj., Tween 20) i inkubowano z przeciwciałami drugiego rzędu, które były zawieszone w buforze TST w

rozcieńczeniu 1:20000. Sześciokrotnie płukano membrany, każdorazowo przez 5 (± 1) minut. Po wypłukaniu membrany umieszczane były w wodnym roztworze gotowego substratu dla alkalicznej fosfatazy przygotowanego z tabletki – BCIP/NBT (*ang.* 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium). Na tym etapie celem zahamowania aktywności fosfataz endogennych dodawano lewamizol w końcowym stężeniu 0,15mg/mL.

β -Aktynę oznaczano na membranach służących uprzednio do detekcji DFF45. Były one krótko solubilizowane w metanolu a następnie płukane w buforze TST. Detekcji β -Aktyny dokonywano za pomocą odpowiednich pierwszo- i drugorzędowych przeciwciał według identycznego protokołu jak w przypadku DFF45. W ten sposób na jednej membranie można było oznaczyć zarówno DFF45 jak i β -Aktynę.

W celu lepszej orientacji budowę kompleksów detekcyjnych dla każdego antygenu podsumowano w tabeli 6.

Tabela. 5. Składniki kompleksów immunodetekcyjnych użytych w przeprowadzonych doświadczeniach.

Antygen	Przeciwciało pierwszorzędowe	Przeciwciało drugorzędowe
DFF45	anty-DFF45 (królicze)	anty-królicze IgG – AP
β -Aktyna	anty β -Aktyna (mysie)	anty-mysie IgG – AP

Przy użyciu aparatu FluorS Multimager (BioRad, USA) z oprogramowaniem Quantity One (BioRad, USA) wyznaczono intensywności zarówno prążków antygenów, jak i poziom tła. Różnicę powstałą po odjęciu wartości intensywności tła od wartości intensywności prążka dzielono przez wartość intensywności prążka próbki wzorcowej P14, która została wybrana ze względu na największą ilość białka DFF45 ustaloną w badaniach pilotażowych. Uzyskano w ten sposób względną intensywność oznaczanych białek w poszczególnych próbkach, którą wyrażono w bezwymiarowych jednostkach ciągłych.

Przeprowadzenie dwóch reakcji immunodetekcyjnych (dla DFF45 i β -Aktyny) na jednej membranie pozwala obiektywnie analizować i porównać statystyczny rozkład ilości obydwu białek.

3.5 Analiza statystyczna

Minimalna liczba oznaczeń, jaka jest wymagana, aby analiza statystyczna była wiarygodna wynosiła 79 przypadków ogółem. Zastosowano założenia wstępne, iż moc testu wynosi 80% a poziom istotności statystycznej 0,05.

Do określenia rozkładu danych klinicznych i analizowanych zmiennych (DFF45 i β -Aktyna) użyto testu Shapiro-Wilka. Do porównania danych klinicznych zdefiniowanych przez zmienne jakościowe i porządkowe, użyto testu U - Manna-Whitneya, a w przypadku zmiennych ilościowych ciągłych w zależności od rozkładu zbliżonego do rozkładu normalnego lub różnego od rozkładu normalnego zostały użyte odpowiednio: test parametryczny oraz nieparametryczny.

Porównanie ekspresji badanych białek w przypadku rozkładu zbliżonego do normalnego zostało wykonane przy użyciu testu parametrycznego t-Studenta i przedstawione jako wartość średnia i odchylenie standardowe (SD, Standard Deviation). W przypadku rozkładu różnego od normalnego ekspresja analizowanych białek została porównana testem nieparametrycznym U – Manna-Whitneya i przedstawiona jako mediana oraz rozstęp kwartylowy (Q_3-Q_1).

Do porównania zmiennych w próbach powiązanych o rozkładzie różnym od normalnego został użyty nieparametryczny test kolejności par Wilcoxona dla prób zależnych.

Celem testowania hipotezy badawczej w co najmniej 3 grupach użyto jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). W przypadku, gdy badane zmienne nie spełniły założenia rozkładu normalnego, co oceniono testem Lavrenc'a, do testowania hipotez użyta została ANOVA rang Kruskala-Wallisa. Do analizy związku między ekspresją białka DFF45 w endometriozie jajnika a oceną kliniczną endometriozy w skali AFS została użyta korelacja Spearmana.

Poziom istotności statystycznej przy porównywaniu wartości zmiennych został wyznaczony na poziomie $p < 0,05$. Obliczeń dokonano przy pomocy pakietu

statystycznego STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. firmy StatSoft, Inc. (2005).

4. Wyniki

4.1 Porównanie grupy kobiet z endometriozą i bez endometriozy w aspekcie danych klinicznych

Używając odpowiednich testów parametrycznych oraz nieparametrycznych w zależności od charakteru i rozkładu badanych zmiennych porównano grupę pacjentek z endometriozą i grupę kobiet bez endometriozy pod względem cech klinicznych.

Średnia wieku pacjentek z endometriozą wyrażona w latach nie różniła się istotnie od średniego wieku pacjentek bez endometriozy, u których głównym wskazaniem do interwencji chirurgicznej był rozrost mięśniakowaty macicy. Analizowane grupy kobiet nie różniły się w sposób statystycznie istotny pod względem wieku wystąpienia pierwszej miesiączki, długości i regularności cyklu miesięczkowego, także długości i nasilenia krwawienia miesięczkowego. Natomiast kobiety z rozpoznaną endometriozą znamienne częściej zgłaszały dolegliwości bólowe w trakcie menstruacji (69,2% vs. 31,8%; $p=0,009$).

W analizowanym materiale klinicznym nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między badanymi grupami w zakresie liczby ciąż, porodów i poronień oraz w liczbie rozpoznanych schorzeń przewlekłych i liczbie przebytych interwencji chirurgicznych.

Pacjentki z podejrzeniem endometriozy, która następnie została potwierdzona śródoperacyjnie i histopatologicznie, były znamienne częściej kwalifikowane do interwencji endoskopowej w porównaniu z grupą kobiet bez endometriozy (53,8% vs. 9,1%; $p<0,001$).

Rodzaj interwencji chirurgicznej, w trakcie której pobierano materiał tkankowy, jak również obecność lub brak dolegliwości bólowych w trakcie menstruacji nie są czynnikami determinującym ocenę ekspresji badanego białka, tak więc nie mają wpływu na wyniki prowadzonych badań. Brak różnic w czynnikach klinicznych, mogących potencjalnie wpływać na wynik oceny ekspresji badanego białka w endometrium, takich jak długość i regularność cykli miesięczkowych, czas trwania i nasilenie krwawienia miesięczkowego, liczba ciąż, liczba porodów, liczba poronień pozwalają na analizę porównawczą ekspresji białka DFF45.

Tabela 6. Porównanie kliniczne pacjentek z endometriozą i kobiet bez endometriozy.

	Kobiety z endometriozą (n=26)	Kobiety bez endometriozy (n=62)	Wartość p
Średnia wieku w chwili badania (lata)* (odchylenie standardowe)	42,1 (±6,7)	43,2 (±4,8)	0,348
Mediana wieku menarche (lata)** (rozstęp kwartylowy)	13 (2)	14 (2)	0,133
Średnia długości cyklu (dni)* (błąd standardowy)	28,9 (±2,0)	28,9 (±2,3)	0,971
Liczba cykli regularnych** (udział procentowy)	21 (80,8%)	41 (66,1%)	0,281
Mediana długości miesiączki (dni)** (rozstęp kwartylowy)	5 (1)	5 (3)	0,568
Nasilenie krwawienia miesięczkowego obfite/średnie/skape**	16 / 7 / 3	34 / 23 / 5	0,395
Liczba pacjentek z bolesnymi miesiączkami** (udział procentowy)	18 (69,2%)	22 (35,5%)	0,012 [#]
Mediana liczby ciąż** (błąd standardowy)	1 (1)	2 (1)	0,082
Mediana liczby porodów** (błąd standardowy)	1 (2)	2 (1)	0,137
Liczba jednokrotnych poronień samoistnych** (udział procentowy)	3 (11,5%)	0 (±0,059)	0,735
Liczba pacjentek ze schorzeniami przewlekłymi**	3 (11,5%)	12 (19,4%)	0,769
Liczba pacjentek poddanych wcześniejszym interwencjom chirurgicznym**	3 (11,5%)	8 (12,9%)	0,891
Rodzaj interwencji chirurgicznej w trakcie której pobrano materiał tkankowy** Endoskopia / Laparotomia	12 / 14	5 / 57	<0,001 [#]

[#] różnica statystycznie istotna

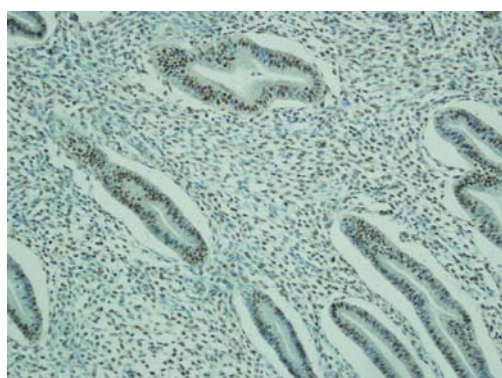
* Wartości charakteryzują się rozkładem normalnym - do obliczeń zastosowano test t - Studenta

** Wartości cechuje brak rozkładu normalnego lub są to zmienne jakościowe - do obliczeń zastosowano test U - Manna-Whitneya.

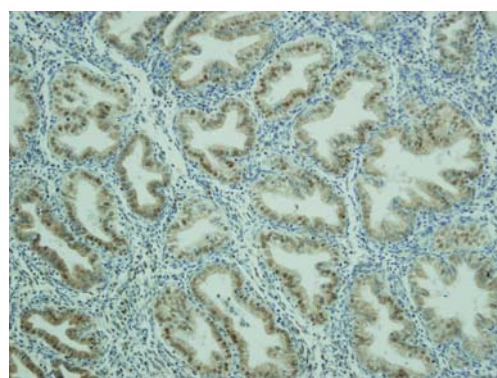
4.2 Wyniki analizy immunohistochemicznej

Do oceny immunoreaktywności białka DFF45 w badanych tkankach wykorzystano metodę immunohistochemiczną, która z powodzeniem była już stosowana do oceny rozkładu białek w endometrium i endometriozie przez innych badaczy [200;201]. Do analizy immunohistochemicznej białka DFF45 wybrano losowo po dziesięć próbek tkankowych w każdej z pięciu analizowanych grup – łącznie immunoreaktywność białka DFF45 oznaczono w 50 przypadkach.

Immunohistochemicznie potwierdzono ekspresję białka DFF45 zarówno w podścielisku endometrium zdrowych kobiet jak również w komórkach gruczołowych zarówno w fazie proliferacyjnej (n=10) jak i sekrecyjnej (n=10) cyklu menstruacyjnego (Rycina 7 i 8).



Rycina 7. Immunolokalizacja białka DFF45 w fazie proliferacyjnej w endometrium zdrowych kobiet (powiększenie x20).

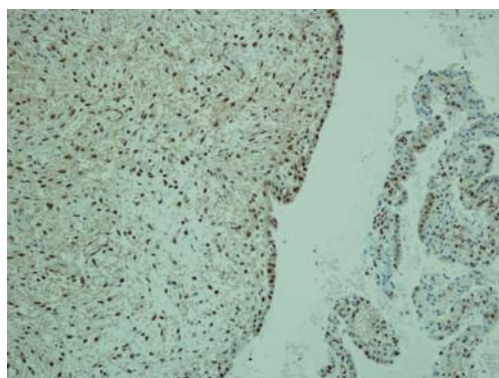


Rycina 8. Immunolokalizacja białka DFF45 w fazie sekrecyjnej w endometrium zdrowych kobiet (powiększenie x20).

Zaobserwowano silniejszą immunoreaktywność białka DFF45 w komórkach gruczołowych endometrium w porównaniu do komórek zrębu endometrium zarówno w fazie proliferacyjnej jak i sekrecyjnej cyklu menstruacyjnego, która miała charakter odczynu jądrowego. Immunoreaktywność białka DFF45 oceniana w komórkach zrębu w endometrium sekcyjnym i endometrium proliferacyjnym kobiet bez endometriozy była porównywalna.

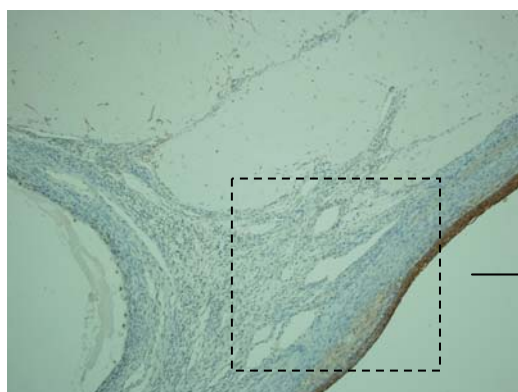
W próbkach endometriozy jajnikowej stwierdzono, podobnie jak w przypadku endometrium, większą białka DFF45 w komórkach gruczołowych w porównaniu do komórek zrębu. Jednakże w porównaniu do endometrium proliferacyjnego i sekrecyjnego zdrowych kobiet w ogniskach endometriozy zaobserwowano niższą

immunoreaktywność ocenianego białka zarówno w komórkach gruczołowych jak i w komórkach zrębu. Należy jednak zaznaczyć, że z uwagi na obecność komórek układu immunologicznego jak również wybroczyn krwawych analiza tej tkanki była technicznie trudna (Rycina 9).

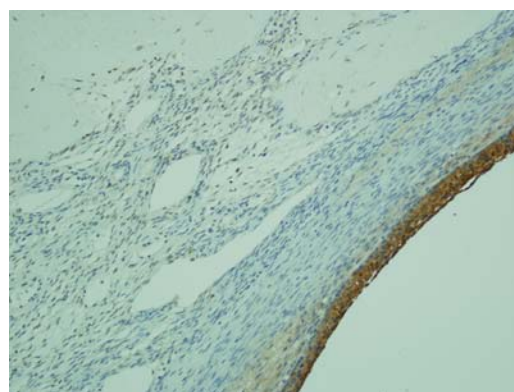


Rycina 9. Immunolokalizacja białka DFF45 w tkance endometriozy jajnikowej (powiększenie x20).

W wycinkach jajników pobranych od zdrowych kobiet immunohistochemiczne wybarwienie przeciwciałami anti-DFF45 lokalizowało się przede wszystkim w pęcherzykach pierwotnych i wzrastających, natomiast komórki zrębu jajnika i ciałek białawych charakteryzowały się mniejszą immunoreaktywnością badanego białka (Rycina 10 i 11).



Rycina 10. Immunolokalizacja białka DFF45 w prawidłowym jajniku zdrowej kobiety (powiększenie x10).

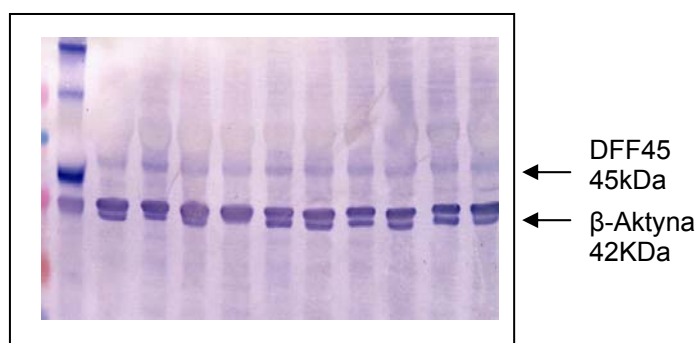


Rycina 11. Immunolokalizacja białka DFF45 w prawidłowy jajniku zdrowej cyklu (fragment Ryciny 10 w powiększeniu x20).

Zastosowana metoda immunohistochemiczna pozwoliła na zbadanie immunoreaktywności białka DFF45 w kontekście jego lokalizacji, jednakże nie jest to uznana metoda do oceny ilościowej analizowanego białka, dlatego analizę pogłębiono techniką *Western-blot*.

4.3 Wyniki analizy *Wester-blot*

Znając rozkład immunoreaktywności białka DFF45 do określenia ilości badanego białka zastosowano pół-ilościową metodę *Wester-blot* używaną w podobnym celu przez innych badaczy [202] (Rycina 12).



Rycina 12. Blot będący wynikiem dwurzędowej reakcji immunodetekcyjnej. Prążek o masie 45kD odpowiada badanemu białku DFF45, natomiast prążek o masie 42kD odpowiada białku kontrolnemu β -Aktynie.

Tabela 7. Liczebność badanych próbek tkankowych.

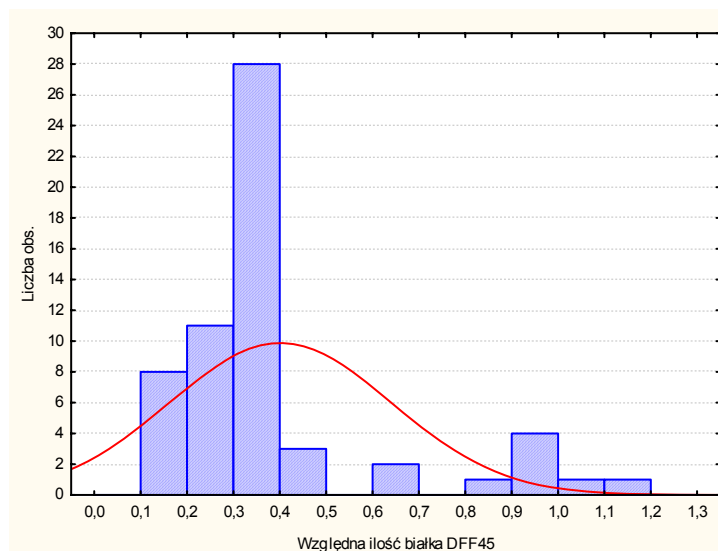
Lp.	Próbka tkankowa	n
1	Endometrioza jajnikowa	26
2	Endometrium proliferacyjne	31
3	Endometrium sekrecyjne	28
5	Tkanka jajnika pobrana od zdrowych kobiet w I fazie cyklu menstruacyjnego	19
5	Tkanka jajnika pobrana od zdrowych kobiet w II fazie cyklu menstruacyjnego	23
SUMA		127

Względna ilość białka DFF45 i β -Aktyny oznaczono w sumie w 127 próbkach tkankowych, w tym w 26 próbkach endometriozy jajnikowej jak również w 31 próbkach endometrium proliferacyjnego i w 28 próbkach endometrium sekrecyjnego kobiet bez endometriozy. Dodatkowo oznaczono względną ilość DFF45 i β -Aktyny w 19 próbkach jajnika w I fazie folikularnej, w 23 próbkach jajnika w II fazie cyklu menstruacyjnego.

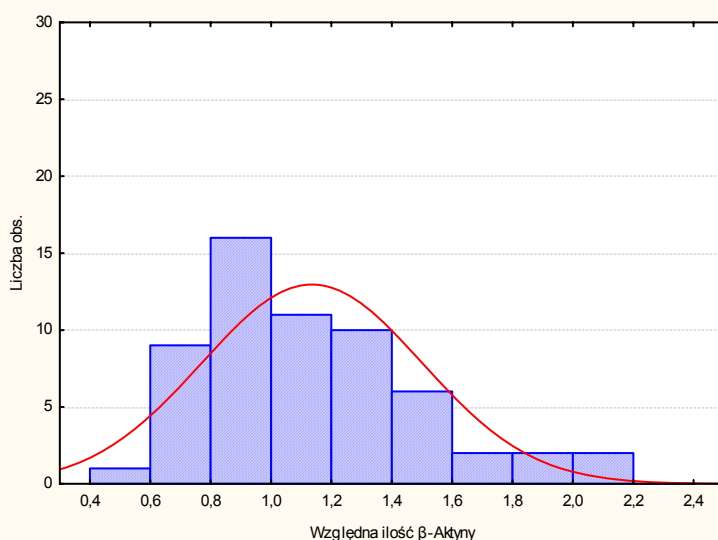
4.3.1 Ocena ekspresji białka DFF45 i β -Aktyny w endometrium

Wartości względnej ekspresji białka DFF45 oraz β -Aktyny w endometrium proliferacyjnym i endometrium sekrecyjnym zostały przedstawione odpowiednio w tabeli 8 i w tabeli 9.

Względna ilość białka DFF45 w endometrium kobiet bez endometriozy charakteryzowała się rozkładem różnym od normalnego ($S-W=0,765$; $p<0,001$). Rozkład względnej ilości białka kontrolnego β -Aktyny w endometrium pobranym od kobiet bez rozpoznanej endometriozy był również różny od normalnego ($S-W=0,934$; $p=0,003$).



Rycina 13. Histogram wartości względnej ilości białka DFF w endometrium w grupie kobiet bez endometriozy.



Rycina 14. Histogram wartości względnej ilości β -Aktyny w endometrium w grupie kobiet bez endometriozy.

Analizując ekspresję DFF45 i β -Aktyny w endometrium kobiet bez endometriozy zaobserwowano znacząco niższe wartości ekspresji białka DFF45 w próbkach tkankowych endometrium proliferacyjnego w porównaniu z endometrium sekrecyjnym. Nie wykazano różnic w ekspresji białka kontrolnego β -Aktyny w porównywanych tkankach (Tabela 10; Rycina 15).

Tabela 8. Względna ilość białka DFF45 oraz β -Aktyny w endometrium proliferacyjnym zdrowych kobiet (dane przedstawione są kolejno w porządku rosnącym według oznaczenia protokołu).

Lp.	Nr proto- kołu	Symbol próbki	Względna ilość białka DFF45	Względna ilość β -Aktyny
1	K-6	X20	0,252751	1,444099
2	K-22	X6	0,266298	1,068464
3	K-25	Z15	0,199249	0,689714
4	K-29	Z19	0,112373	0,689801
5	K-30	Z22	0,136947	0,665986
6	S-2	E7	0,387201	0,869183
7	S-4	X26	0,395613	2,127624
8	S-5	E4	0,374183	1,0135217
9	S-8	B43	0,207328	1,874497
10	S-11	Z6	0,365322	0,823658
11	S-13	Z10	0,197779	0,656658
12	S-17	B5	0,341488	1,258505
13	S-18	B41	0,356359	1,168364
14	S-20	B10	0,323448	1,001977
15	S-25	E23	0,330752	1,197531
16	S-26	B44	0,230096	1,054885
19	S-27	M39	0,286261	1,091092
8	S-29	M10	0,387184	1,444739
19	S-39	M7	0,112319	1,917212
20	S-41	M55	0,385758	1,435155
21	S-44	M42	0,367548	0,945224
22	S-49	E11	0,214779	2,044681
23	S-50	X1	0,263274	0,816996
24	S-51	E1	0,339259	1,387478
25	S-52	Z12	0,201667	0,815369
26	S-53	X17	0,194308	1,030377
27	S-54	B19	0,381274	1,282426
28	S-58	G2	0,374906	0,857228
29	S-59	G3	0,317328	0,766345
30	S-61	G5	0,286228	1,060233
31	S-62	G6	0,330096	0,870509

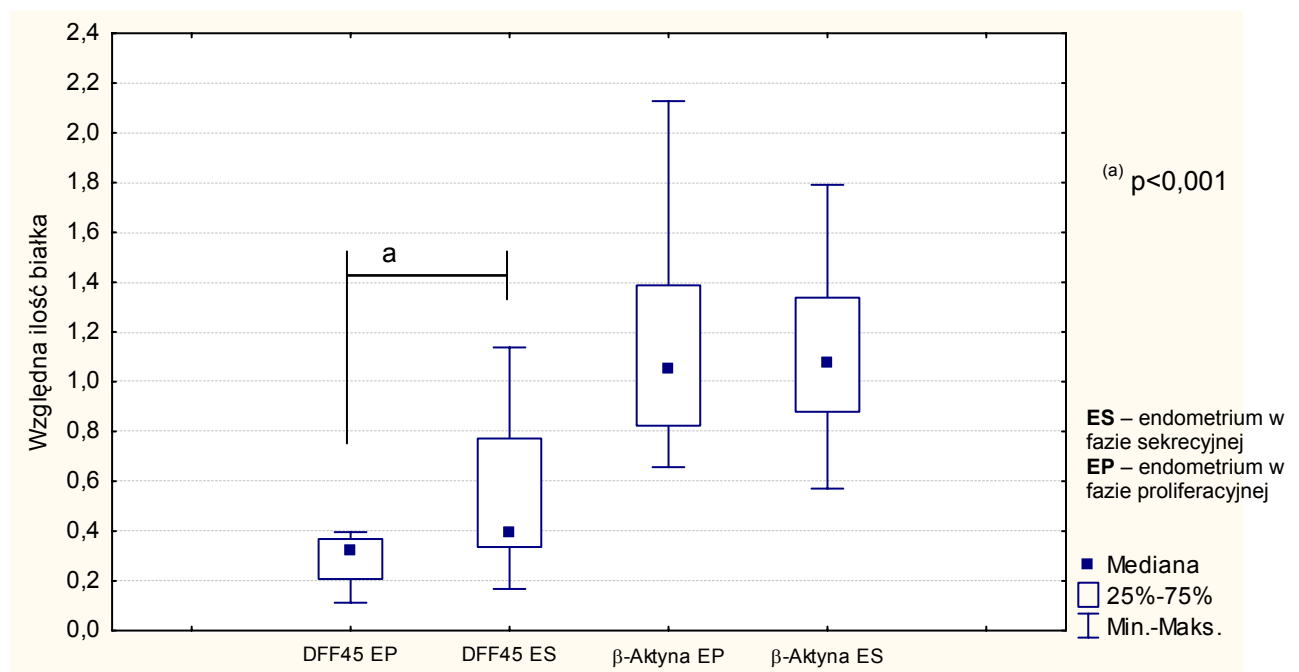
Tabela 9. Względna ilość białka DFF45 oraz β -Aktyny w endometrium sekrecyjnym zdrowych kobiet (dane przedstawione są kolejno w porządku rosnącym według oznaczenia protokołu).

Lp.	Nr proto- kołu	Symbol próbki	Względna ilość białka DFF45	Względna ilość β -Aktyny
1	K-1	X14	0,482131	0,797946
2	K-2	X8	0,259085	1,397189
3	K-4	X10	0,666345	1,790828
4	K-18	Z14	0,939373	1,272446
5	S-3	E6	1,137436	0,975729
6	S-6	X25	0,948865	0,815339
7	S-7	X22	0,961348	0,950948
8	S-9	X28	0,877076	0,795344
9	S-10	Z3	0,167499	1,177789
10	S-12	Z8	0,199372	0,979526
11	S-15	B1	0,343386	1,480451
12	S-16	B7	0,396015	1,289601
13	S-19	B8	0,396356	1,525996
14	S-21	B12	0,394742	1,386325
15	S-22	B15	0,347286	1,226149
16	S-28	M21	1,0249336	1,201778
17	S-32	M14	0,604708	1,242751
18	S-33	M63	0,403978	1,189461
19	S-34	M57	0,966217	1,679218
20	S-46	M45	0,450591	1,588997
21	S-55	M36	0,326511	0,881761
22	S-56	M33	0,247524	0,737997
23	S-57	G1	0,329448	0,761489
24	S-60	G4	0,352542	0,570683
25	S-63	G7	0,319468	0,932413
26	S-64	G8	0,360268	0,877031
27	S-65	G9	0,367536	0,919081
28	S-66	G10	0,367536	0,932413

Tabela 10. Porównanie względnej ilości białka DFF45 i β -Aktyny w endometrium proliferacyjnym i endometrium sekrecyjnym zdrowych kobiet.

	Endometrium		Wartość p
	proliferacyjne (n=31)	sekrecyjne (n=28)	
Mediana względnej ilości białka DFF45 (rozstęp kwartyłowy)	0,317 (0,160)	0,395 (0,435)	<0,001 [#]
Mediana względna ilość β -Aktyny (rozstęp kwartyłowy)	1,055 (0,564)	1,078 (0,459)	0,867

[#]wartość statystycznie istotna



Rycina 15. Porównanie mediany wartości względnej ekspresji białka DFF45 i mediany wartości względnej ekspresji β -Aktyny w endometrium proliferacyjnym i endometrium sekrecyjnym kobiet bez endometriozy.

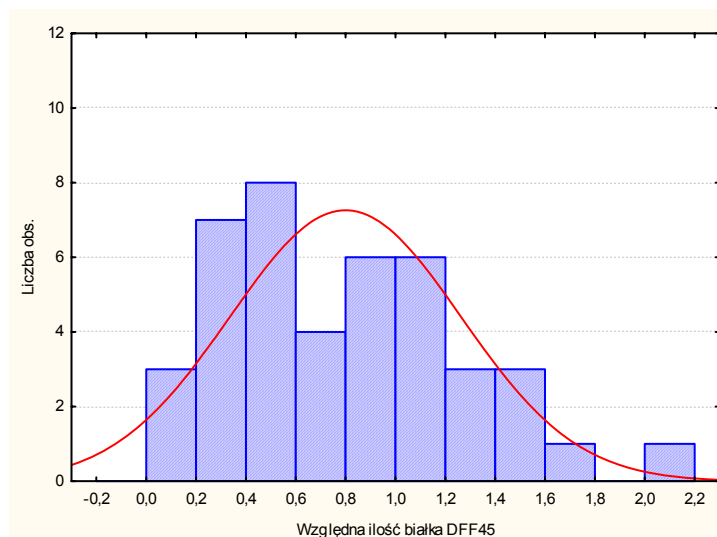
4.3.2 Ocena ekspresji DFF45 i β -Aktyny w prawidłowej tkance jajnika

Względną ekspresję białka DFF45 oraz β -Aktyny oznaczono w 19 próbkach prawidłowej tkanki jajnikowej pobranej w I fazie cyklu menstruacyjnego oraz w 23 próbkach prawidłowej tkanki jajnikowej pobranych w II fazie cyklu menstruacyjnego. U 13 pacjentek bez endometriozy względną ilość białka DFF45 oraz β -Aktyny oceniono zarówno w jajniku lewym jak i w jajniku prawym. Testem

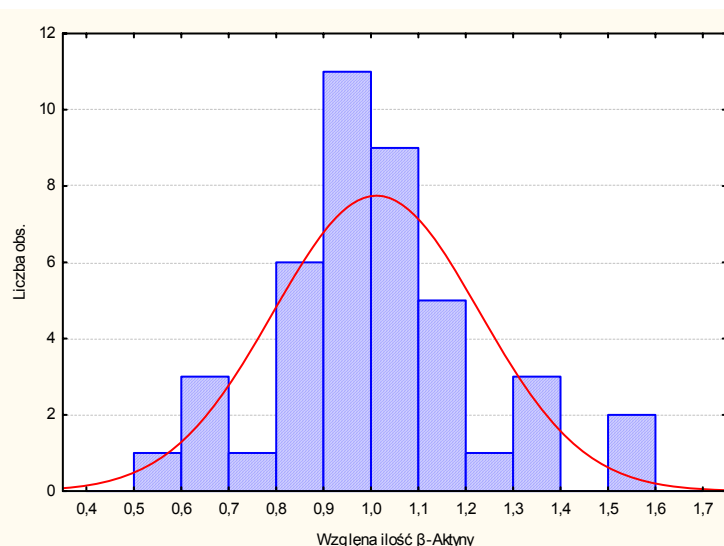
nieparametrycznym dla prób powiązanych Wilcozona porównano ekspresję białka DFF45 oraz β -Aktyny w próbkach tkankowych pobranych od tej samej pacjentki z jajnika lewego i prawego. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy jajnikiem prawym i lewym w średniej względnej ilości białka DFF45 oraz β -Aktyny (odpowiednio $p=0,463$ oraz $p=0,552$). Na tej podstawie dalszą analizę ekspresji białka DFF45 oraz β -Aktyny prowadzono, nie różnicując czy materiał tkankowy pochodzi z lewego jajnika lub prawego jajnika, biorąc pod uwagę jedynie funkcjonalną fazę cyklu jajnikowego, w której próbka tkankowa została pobrana.

Wartości względnej ekspresji białka DFF45 oraz β -Aktyny w prawidłowej tkance jajnikowej pobranej w I fazie cyklu menstruacyjnego oraz pobranej w II fazie cyklu menstruacyjnego zostały przedstawiono odpowiednio w tabeli 11 i w tabeli 12.

Oceniając rozkład badanych zmiennych w prawidłowej tkance jajnikowej pobranej w grupie kobiet bez endometriozy stwierdzono, że względna ilość białka DFF45 ma rozkład normalny ($S-W=0,952$; $p=0,077$), również wartości ekspresji białka kontrolnego β -Aktyny charakteryzują się rozkładem normalnym ($S-W=0,966$; $p=0,248$).



Rycina 16. Histogram wartości względnej ilości białka DFF w tkance jajnikowej w grupie kobiet bez endometriozy.



Rycina 17. Histogram wartości względnej ilości białka β -Aktyny w tkance jajnikowej w grupie kobiet bez endometriozy.

Tabela 11. Względna ilość białka DFF45 oraz β -Aktyny w prawidłowej tkance jajnika w I fazie cyklu jajnikowego (dane przedstawione są kolejno w porządku rosnącym według oznaczenia protokołu).

Lp.	Nr proto-kołu	Symbol próbki	Względna ilość białka DFF45	Względna ilość β -Aktyny
1	K-5	X11	0,484304	1,150807
2		X4	0,445943	0,943581
3	K-6	X19	0,296499	1,544407
4	K-8	X13	0,526022	1,040636
5	K-17	Z18	0,714958	1,173181
6	K-30	Z21	0,185735	0,656756
7	S-2	X-29	0,305149	1,026145
8	S-5	X35	0,202969	0,935915
9	S-13	Z9	0,187573	0,567399
10	S-18	B42	0,555461	1,023487
11	S-20	B11	1,449889	0,871826
12	S-25	B24	0,288126	1,079659
13		B25	0,373387	1,092628
14	S-27	M40	1,002819	1,105234
15		M41	0,564994	1,032253
16	S-29	M11	0,595238	1,358886
19		M12	0,587489	1,121557
8	S-41	M17	0,966216	0,967921
19		M56	0,657449	1,370731

Tabela 12. Względna ilość białka DFF45 oraz β -Aktyny w prawidłowej tkance jajnika w II fazie cyklu jajnikowego (dane przedstawione są kolejno w porządku rosnącym według oznaczenia protokołu).

Lp.	Nr proto-kołu	Symbol próbki	Względna ilość białka DFF45	Względna ilość β -Aktyny
1	K-18	Z13	0,963513	1,030577
2	S-3	X31	0,408835	1,332657
3	S-6	X24	0,922467	0,815369
4		X23	0,896807	0,815338
5	S-7	X21	0,988972	0,979526
6	S-9	X27	0,860089	0,815763
7	S-10	Z1	0,228973	0,896407
8		Z2	0,211216	0,999526
9	S-12	Z7	0,162123	0,656658
10	S-15	B3	1,163812	1,052212
11		B2	1,494744	0,656658
12	S-16	B6	1,316967	1,166789
13	S-21	B13	1,674876	0,901448
14		B14	2,000343	1,059111
15	S-22	B16	1,039812	0,959691
16		B17	0,682982	0,999673
17	S-28	M23	1,204841	1,221713
18		M24	1,019589	0,946624
19	S-32	M15	1,470953	0,900739
20		M16	1,183345	0,959411
21	S-34	M59	0,685366	1,527301
22	S-46	M46	1,021923	0,841267
23		M47	1,353396	0,757788

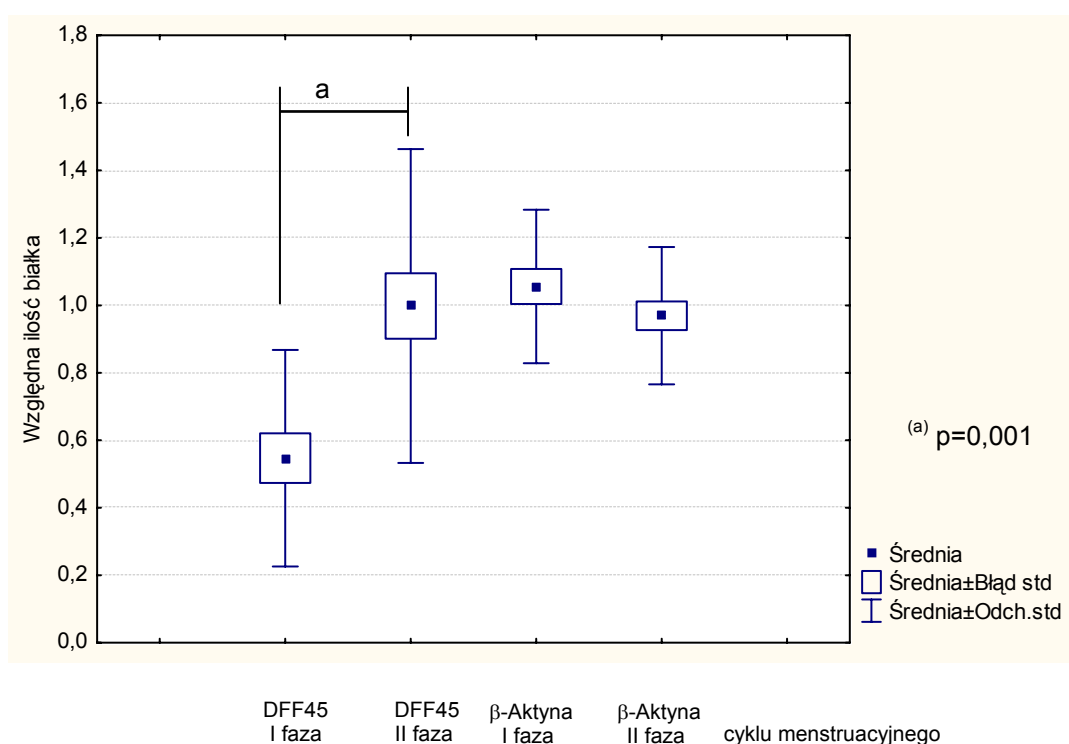
Analizując prawidłową tkankę jajnika zaobserwowano zmiany ekspresji DFF45 w zależności od funkcjonalnej fazy jajnika. Znamienne niższą ekspresję DFF45 wykazano w I fazie cyklu miesięczkowego w porównaniu do fazy II cyklu

miesięczkowego. Nie wykazano różnic w ekspresji białka kontrolnego β -Aktyny w porównanych tkankach (Tabela 13; Rycina 18).

Tabela 13. Porównanie względnej ilości białka DFF45 i β -Aktyny w prawidłowej tkance jajnikowej pobranej w I i II fazie cyklu menstruacyjnego.

	Prawidłowa tkanka jajnika		Wartość p
	I faza cyklu (n=19)	II faza cyklu (n=23)	
Średnia względna ilość białka DFF45 (odchylenie standardowe)	0,546 (0,321)	0,998 (0,465)	0,001 [#]
Średnia względna ilość β -Aktyny (odchylenie standardowe)	1,056 (0,227)	0,969 (0,203)	0,199

[#]wartość statystycznie istotna

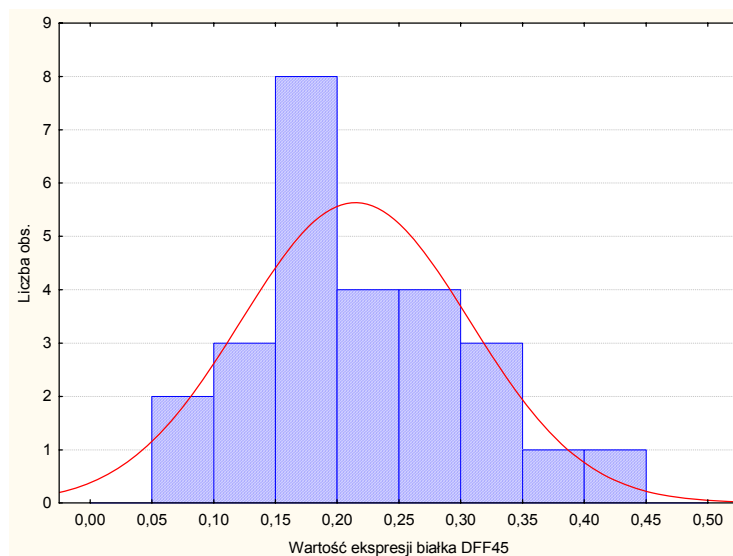


Rycina 18. Porównanie ekspresji białka DFF45 i β -Aktyny w zdrowej tkance jajnika w I i w II fazie cyklu menstruacyjnego.

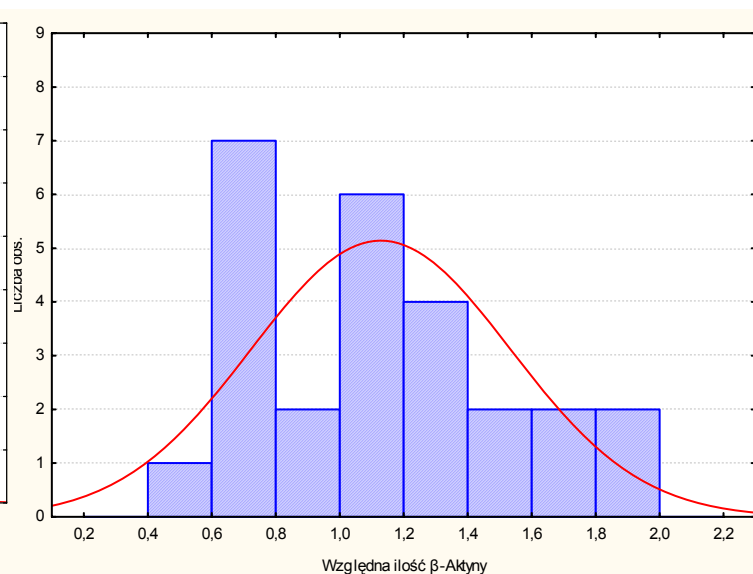
4.3.3 Ocena ekspresji DFF45 i β -Aktyny w endometriozie jajnikowej

Ekspresję białka DFF45 oraz białka kontrolnego β -Aktyny oceniono w 26 próbach tkankowych endometriozy jajnikowej.

Oceniając rozkład badanych zmiennych w endometriozie jajnikowej stwierdzono, że względna ilość białka DFF45 ma rozkład normalny ($S-W=0,972$; $p=0,665$), jak również wartości względnej ilości białka kontrolnego β -Aktyny charakteryzuje rozkład zbliżony do normalnego ($S-W=0,936$; $p=0,111$).



Rycina 19. Histogram rozkładu wartości względnej ilości białka DFF w endometriozie jajnikowej.



Rycina 20. Histogram rozkładu wartości względnej ilości β -Aktyny w endometriozie jajnikowej.

Analizie poddano ekspresję białka DFF45 w endometriozie jajnika w porównaniu do endometrium kobiet bez endometriozy pobranego w fazie proliferacyjnej i w fazie sekrecyjnej cyklu menstruacyjnego. Ponieważ rozkład badanych białek przynajmniej w jednej z analizowanych grup był różny od normalnego, do analizy użyto testów nieparametrycznych, a względną ilość analizowanych białek przedstawiono w formie median.

Tabela 14. Względna ilość białka DFF45 oraz β -Aktyny w endometriozie jajnikowej (dane przedstawione są kolejno w porządku rosnącym według oznaczenia protokołu).

Lp.	Nr protokołu	Symbol próbki	Względna ilość białka DFF45	Względna ilość β -Aktyny	Stopień endometriozy
1	K-9	E53	0,166791	1,876473	4
2	K-10	E8	0,152815	1,720718	3
3	K-11	E9	0,310703	1,471293	1
4	K-12	E51	0,432467	1,590701	1
5	K-13	E12	0,156068	1,876473	4
6	K-14	Z61	0,275586	0,685724	2
7	K-15	Z20	0,174662	0,638765	4
8	K-16	Z17	0,109831	0,609795	4
9	K-20	X18	0,083933	1,291231	4
10	K-23	X2	0,188697	1,147845	4
11	K-26	X33	0,166792	0,699112	4
12	K-31	M38	0,267807	1,653994	2
13	K-32	M29	0,199248	0,752815	3
14	K-33	M20	0,102493	0,494347	4
15	K-34	B21	0,226657	1,201778	2
16	S-1	X30	0,267954	1,311578	2
17	S-14	Z11	0,190074	0,812542	4
18	S-24	B22	0,311215	0,765098	2
19	S-30	M37	0,326511	1,187654	2
20	S-31	M53	0,060821	1,128874	4
21	S-35	M60	0,387184	1,219221	1
22	S-36	M27	0,255114	0,803336	3
23	S-37	M19	0,101588	1,184572	4
24	S-38	M34	0,204037	0,750619	3
25	S-43	M26	0,207641	1,173345	3
26	S-48	M35	0,226855	1,154387	3

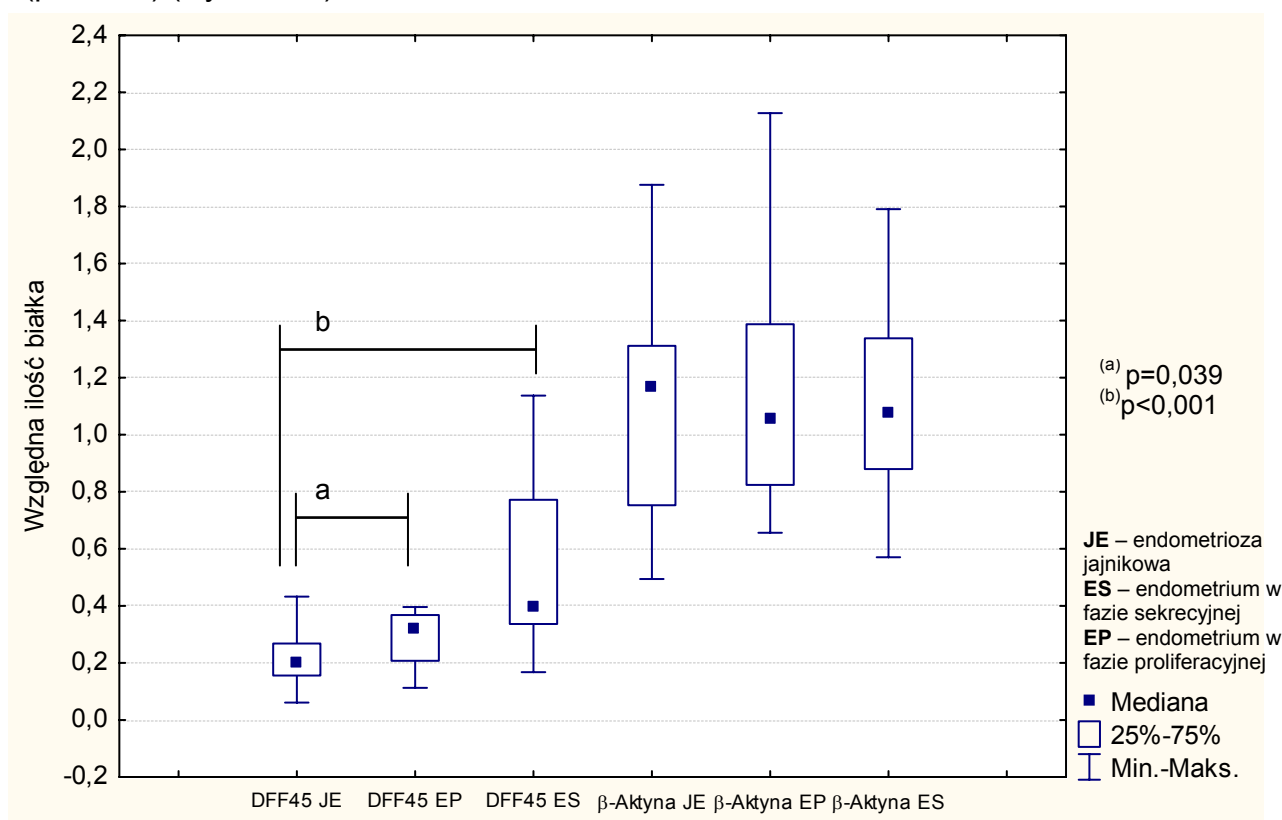
Mediana względnej ilości białka DFF45 była najniższa w endometriozie jajnikowej i wynosiła 0,202 w porównaniu do mediany względnej ilości białka DFF45 w endometrium kobiet bez endometriozy w fazie proliferacyjnej i w fazie sekrecyjnej cyklu miesięczkowego (odpowiednio 0,317 oraz 0,395; $p < 0,001$) (Tabela 15). Nie wykazano różnic we względnej ilości białka kontrolnego β -Aktyny w porównanych tkankach.

Tabela 15. Porównanie mediany względnej ilości białka DFF45 i β -Aktyny w endometriozie jajnikowej, endometrium proliferacyjnym i sekrecyjnym kobiet bez endometriozy.

	Endometrioza jajnikowa (n=26)	Endometrium		Wartość p
		proliferacyjne (n=31)	sekrecyjne (n=28)	
Mediana względnej ilości DFF45 (rozstęp kwartyłowy)	0,202 (0,112)	0,317 (0,160)	0,395 (0,435)	<0,001 [#]
Mediana względnej ilości β -Aktyny (rozstęp kwartyłowy)	0,908 (0,559)	1,055 (0,564)	1,078 (0,459)	0,616

[#]wartość statystycznie istotna

W analizie *post hoc* wykazano różnicę statystycznie istotną we względnej ilości białka DFF45 pomiędzy endometriozą jajnikową a endometrium proliferacyjnym ($p=0,011$) jak również endometriozą jajnikową a endometrium sekrecyjnym ($p<0,001$) (Rycina 21).



Rycina 21. Porównanie mediany względnej ilości białka DFF45 i β -Aktyny w ogniskach endometriozy oraz w endometrium proliferacyjnym i sekrecyjnym kobiet bez endometriozy.

Rozkład białka DFF45 w endometriozie jajnika oraz prawidłowej tkance jajnikowej był zbliżony do normalnego, tak więc do analizy statystycznej użyto testów parametrycznych, a wyniki przedstawiono za pomocą średnich względnej ilości białka DFF45 w poszczególnych tkankach. W przypadku analizy β -Aktyny, której rozkład w porównywanych grupach był również zbliżony do normalnego zastosowano testy parametryczne, przedstawiając względną ilość β -Aktyny w poszczególnych tkankach jako wartość średnią.

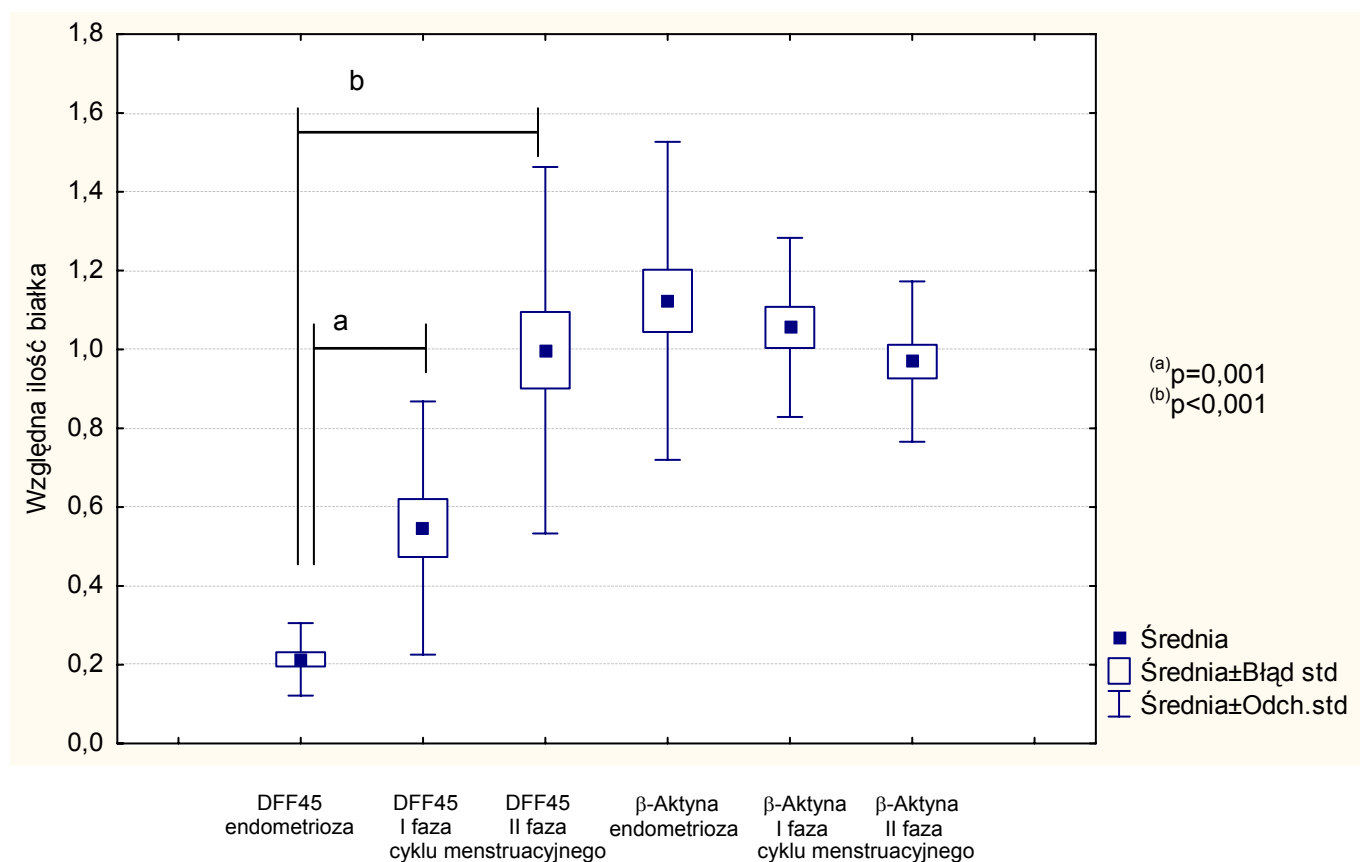
Średnia względna wartość ekspresji DFF45 była najniższa w endometriozie i wynosiła 0,213 w porównaniu do średniej względnej ekspresji DFF45 w tkance jajnika w fazie I cyklu oraz w tkance jajnika w fazie II cyklu menstruacyjnego (odpowiednio 0,547 oraz 0,998; $p < 0,001$) (Tabela 17). Analizę statystyczną przeprowadzono metodą jednoczynnikowej analizy wariancji. Nie wykazano różnic w ekspresji białka kontrolnego β -Aktyny w porównanych tkankach.

Tabela 16. Porównanie średniej względnej ilości białka DFF45 i β -Aktyny w endometriozie jajnikowej i w zdrowej tkance jajnika.

	Endometrioza jajnikowa (n=26)	Prawidłowa tkanka jajnikowa		Wartość p
		I faza cyklu menstruacyjnego (n=19)	II faza cyklu menstruacyjnego (n=23)	
Średnia względna ilość DFF-45 (odchylenie standardowe)	0,213 (0,092)	0,547 (0,321)	0,998 (0,465)	<0,001 [#]
Średnia względna ilości β -Aktyny (odchylenie standardowe)	1,123 (0,404)	1,056 (0,227)	0,969 (0,203)	0,211

[#]wartość statystycznie istotna

W analizie *post hoc* wykonanej testem Fishera wykazano różnicę statystycznie istotną w ekspresji DFF45 pomiędzy endometriozą jajnikową a tkanką jajnikową pobraną w I fazie cyklu menstruacyjnego ($p=0,001$) jak również endometriozą jajnikową a tkanką jajnikową badaną w II fazie cyklu menstruacyjnego ($p < 0,001$) (Rycina 22).



Rycina 22. Porównanie średniej względnej ilości białka DFF45 i średniej względnej ilości β -Aktyny w ogniskach endometriozy i tkance jajnikowej w I fazie i w II fazie cyklu menstruacyjnego u kobiet bez endometriozy.

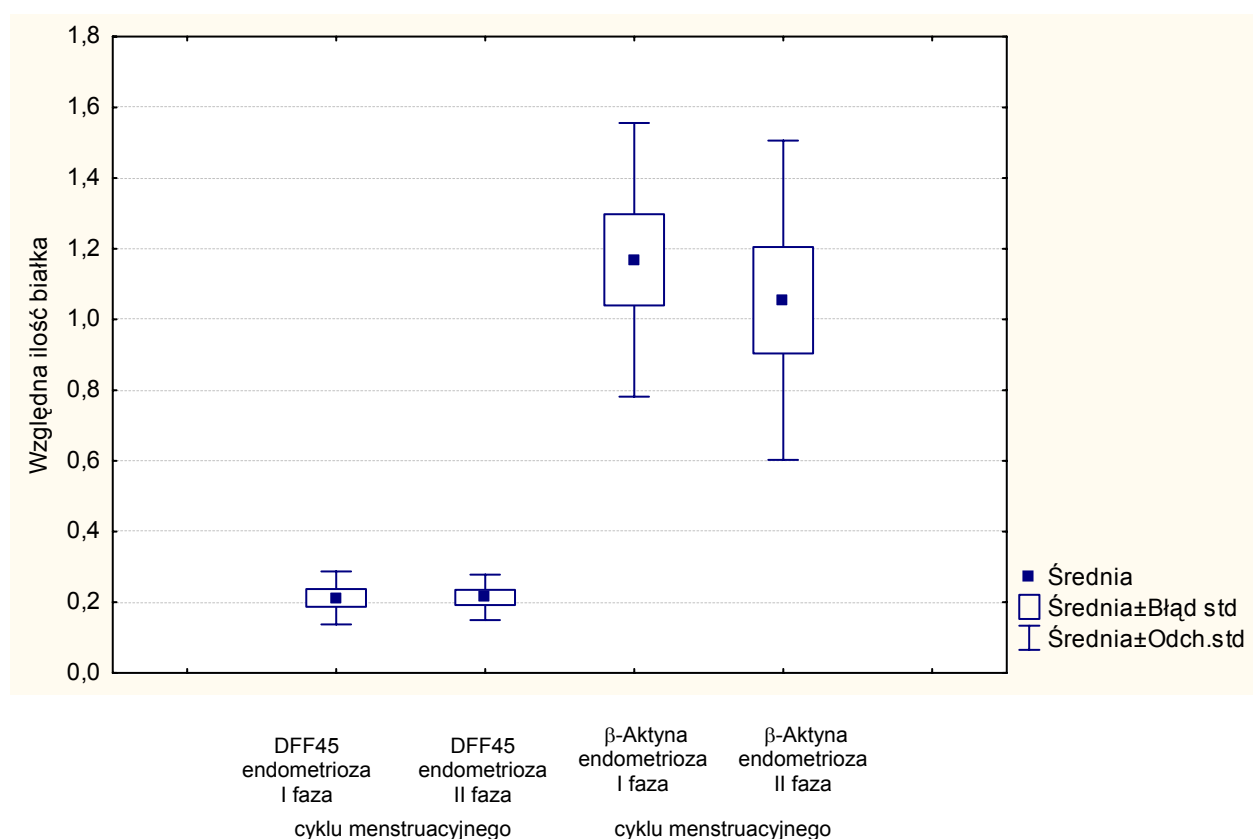
W analizowanej grupie 26 kobiet z endometriozą wyróżniono podgrupę 18 przypadków endometriozy jajnika i endometrium eutopowego pobranego z jamy macicy. Na podstawie wyniku badania histopatologicznego eutopowego endometrium wyróżniono próbki pobrane w fazie proliferacyjnej (protokoły numer: K-11; K-13; K-15; K-20; K-23; K-34; S-1; S-14; S-24) oraz sekrecyjnej (protokoły numer: K-9; K-16; K-26; K-31; K-32; S-30; S-36; S-38; S-48) cyklu miesięczkowego.

Badając ekspresję białka DFF45 w ogniskach endometriozy jajnikowej wykazano brak różnic we względnej ilości białka DFF45 w zależności od fazy funkcjonalnej cyklu, którą oceniono na podstawie wyniku badania histopatologicznego endometrium eutopowego. Średnia względna ilość białka DFF45 w endometriozie jajnikowej pobranej w fazie proliferacyjnej cyklu miesięczkowego nie różniła się od

średniej względnej ilości pobranej w fazie sekrecyjnej cyklu menstruacyjnego (0,212 vs. 0,214; $p=0,965$). Również nie wykazano różnic w ekspresji białka kontrolnego β -Aktyny w porównanych tkankach (Tabela 13; Rycina 25).

Tabela 17. Porównanie średniej względnej ilości białka DFF45 i średniej względnej ilości β -Aktyny w endometriozie jajnikowej pobranej w fazie proliferacyjnej i sekrecyjnej cyklu miesięczkowego.

	Endometrioza jajnikowa		Wartość p
	faza proliferacyjna cyklu	faza sekrecyjna cyklu	
	(n=9)	(n=9)	
Średnia względna ilość białka DFF45 (odchylenie standardowe)	0,212 (0,075)	0,214 (0,064)	0,965
Średnia względna ilości β -Aktyny (odchylenie standardowe)	1,168 (0,387)	1,054 (0,452)	0,573



Rycina 23. Porównanie średniej względnej ilości białka DFF45 i średniej względnej ilości β -Aktyny w próbkach tkankowych endometriozy jajnikowej pobranej w fazie proliferacyjnej i sekrecyjnej cyklu menstruacyjnego.

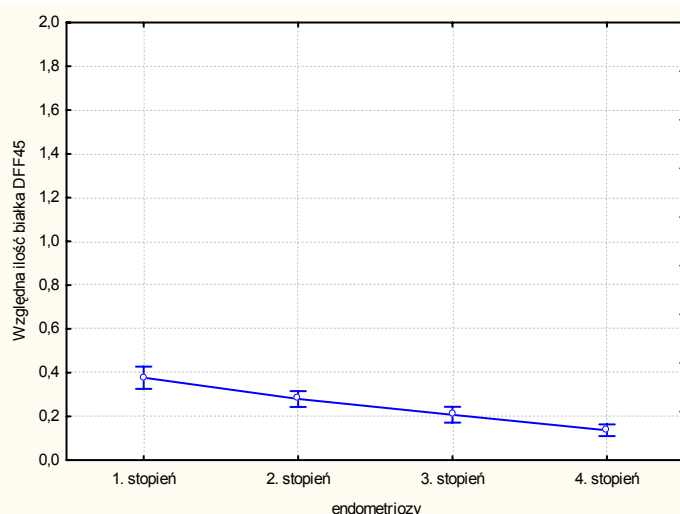
4.3.4 Analiza ekspresji DFF45 i β -Aktyny w aspekcie danych klinicznych

Przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji porównano średnią ekspresję białka DFF45 w czterech grupach pacjentek zależnie o stopnia endometriozy ocenianej śródoperacyjnie w skali RCE według AFS. Najniższą średnią względną ilość białka DFF45 stwierdzono w grupie pacjentek z rozpoznany czwartym stopniem endometriozy. Wykazano istotne różnice w średnim poziomie ekspresji białka DFF45 między analizowanymi grupami pacjentek (Tabela 18). Nie zanotowano statystycznie istotnych różnic między analizowanymi grupami dla średnich wartości β -Aktyny.

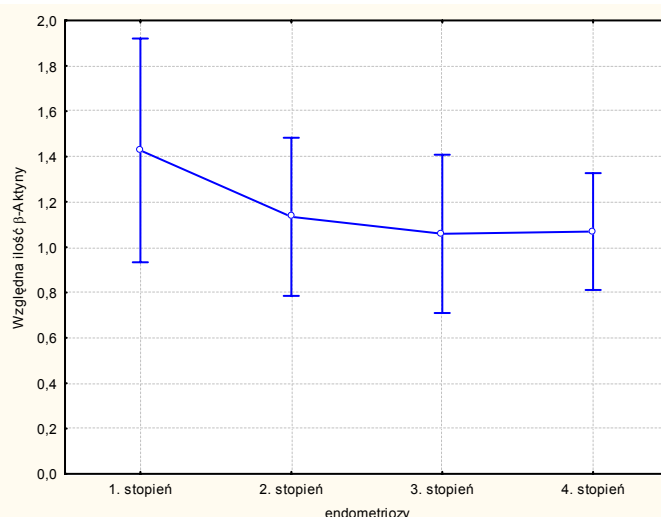
Tabela 18. Porównanie średniej względnej ilości białka DFF45 i średniej względnej ilości β -Aktyny w tkance endometriotycznej w zależności od stopnia zaawansowania endometriozy.

	Stopień endometriozy według RCE*				Wartość p
	1.	2.	3.	4.	
Średnia względna ilość białka DFF45 (błąd standardowy)	0,327 ($\pm 0,026$)	0,268 ($\pm 0,026$)	0,241 ($\pm 0,017$)	0,112 ($\pm 0,017$)	<0,001 [#]
Średnia względna ilość β -Aktyny (błąd standardowy)	1,427 ($\pm 0,189$)	1,134 ($\pm 0,359$)	1,059 ($\pm 0,378$)	1,069 ($\pm 0,480$)	0,587

[#]wartość statystycznie istotna; *Zrewidowana Skala Endometriozy



Rycina 24. Ocena średniej względnej ilości białka DFF45 w zależności od stopnia endometriozy ocenianej śródoperacyjnie według skali RCE (średnia $\pm$ oczekiwane średnie brzegowe).



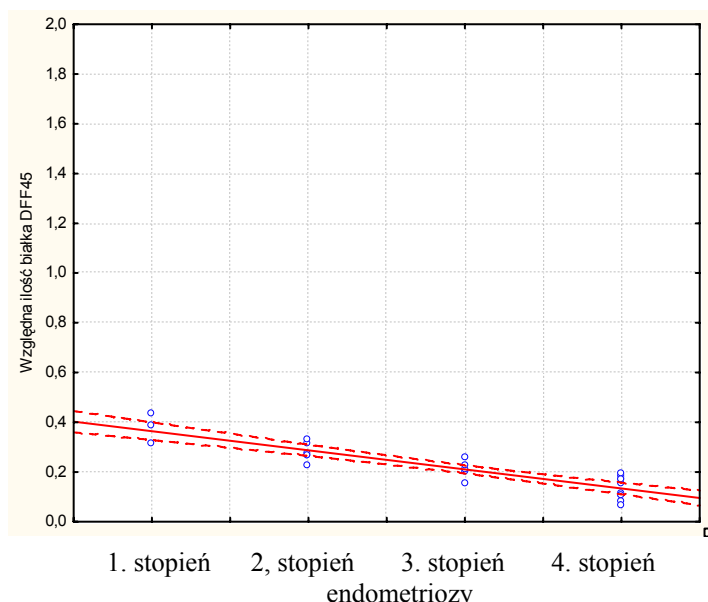
Rycina 25. Ocena średniej względnej ilości β -Aktyny w zależności od stopnia endometriozy ocenianej śródoperacyjnie według skali RCE (średnia $\pm$ oczekiwane średnie brzegowe).

Przy pomocy korelacji Spearmana analizowano związek pomiędzy ekspresją białka DFF45 w ogniskach endometriozy jajnikowej, a nasileniem klinicznym endometriozy ocenianej śródoperacyjnie według skali AFS. Wykazano silną, ujemną korelację pomiędzy ekspresją między poziomem ekspresji DFF45 a punktacją w skali AFS – wskaźnik korelacji Spearmana wyniósł -0,823, poziom istotności statystycznej $p < 0,001$. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy wartościami β -Aktyny a wartością punktacji AFS (Tabela 19; Rycina 26 i 27).

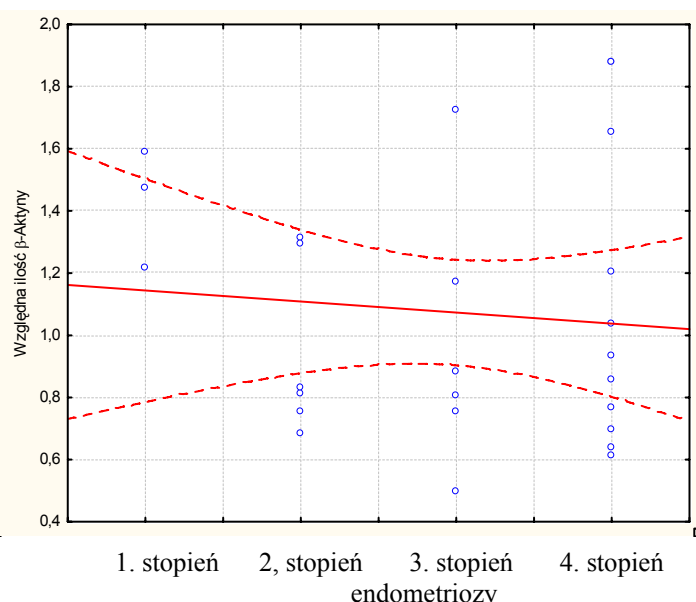
Tabela 19. Analiza korelacji względnej ilości białka DFF45 i β -Aktyny ze stopniem zaawansowania endometriozy.

	Wskaźnik korelacji Gamma	Wartość p
Korelacja względnej ilości białka DFF45 ze stopniem zaawansowania endometriozy	- 0,845	<0,001 [#]
Korelacja względnej ilości β -Aktyny ze stopniem zaawansowania endometriozy	-0,305	0,130

[#]wartość statystycznie istotna



Rycina 26. Korelacja względnej ilości białka DFF45 ze stopniem endometriozy ocenianej śródoperacyjnie według skali RCE (--- 95% przedział ufności).



Rycina 27. Korelacja względnej ilości β -Aktyny ze stopniem endometriozy ocenianej śródoperacyjnie według skali RCE (--- 95% przedział ufności).

Nie wykazano wpływu takich zmiennych klinicznych, jak:

1. wiek,
2. wiek wystąpienia pierwszej miesiączki,
3. czas trwania cykli menstruacyjnych,
4. czas trwania miesiączek,
5. nasilenie krwawienia miesiączkowego
6. liczba ciąż,
7. liczba porodów,

na ekspresję białka DFF45 w endometrium, jak również nie stwierdzono wpływu wyżej wymienionych czynników klinicznych na poziom białka DFF45 w endometriozie jajnikowej.

4.4 Podsumowanie wyników

W analizowanym materiale klinicznym potwierdzono obecność białka DFF45 metodą immunohistochemiczną i *Western blot* we wszystkich badanych tkankach to znaczy w endometriozie jajnika, endometrium proliferacyjnym i sekrecyjnym kobiet zdrowych oraz w prawidłowej tkance jajnikowej z uwzględnieniem faz cyklu menstruacyjnego.

1. Stwierdzono znamienne niższą ekspresję białka DFF45 w endometrium proliferacyjnym w porównaniu z endometrium sekrecyjnym u kobiet bez endometriozy.
2. Wykazano znamienne niższą ekspresję białka DFF45 w prawidłowej tkance jajnika w I fazie cyklu menstruacyjnego porównaniu z prawidłową tkanką jajnika w II fazie cyklu menstruacyjnego.
3. Potwierdzono znamienne niższą ekspresję białka DFF45 w endometriozie jajnika w porównaniu z endometrium zdrowych kobiet zarówno w fazie proliferacyjnej jak i sekrecyjnej cyklu miesiączkowego.
4. Stwierdzono znamienne niższą ekspresję białka DFF45 w endometriozie jajnika w porównaniu ze zdrową tkanką jajnikową w I i II fazie cyklu menstruacyjnego.
5. Nie stwierdzono zmian w ekspresji białka DFF45 w ogniskach endometriozy w zależności od fazy cyklu miesiączkowego.

6. Wykazano silną, statystycznie istotną, ujemną korelację pomiędzy poziomem białka DFF45 w ogniskach endometriozy a stopniem nasilenia zmian endometriotycznych ocenianych śródoperacyjnie w skali RCE według AFS.
7. Nie wykazano związku pomiędzy wiekiem pacjentek, wiekiem wystąpienia pierwszej miesiączki, czasem trwania cykli menstruacyjnych, czasem trwania miesiączek, nasileniem krwawienia miesięczkowego, liczbą ciąż, liczbą porodów a względną ilością białka DFF45 zarówno w endometrium zdrowych kobiet jak i w endometriozie jajnikowej.

5. Dyskusja

W endometrium oraz prawidłowej tkance jajnika stwierdzono cykliczne zmiany w ekspresji białka DFF45. Zarówno w prawidłowej tkance jajnikowej [203] jak i w endometrium kobiet bez endometriozy większą ekspresję białka DFF45 stwierdzono w II fazie cyklu menstruacyjnego.

Zastosowanie dwóch metod oceny ekspresji białka DFF45 pozwoliło w pierwszym etapie badania na jego immunohistochemiczną lokalizację w badanych tkankach, a następnie na półilościową ocenę ekspresji metodą *Western-blot*.

Uzyskane wyniki wydają się potwierdzać rezultaty innych badań przedstawiające znaczny wzrost indeksu apoptotycznego komórek endometrium sekrecyjnego [49;89;94].

Białko DFF45 jest kluczowym białkiem w procesie przekazywania sygnału apoptotycznego, jego ekspresja bezpośrednio związana jest z aktywnością białka DFF40 odpowiedzialnego za fragmentację DNA kończącą proces apoptozy. W licznych badaniach potwierdzono znaczne osłabienie apoptozy komórek ogniska endometriozy jajnikowej w porównaniu do endometrium zdrowych kobiet [89;94;202;204]. Poziom apoptozy w ognisku endometriozy jest niezależny od faz cyklu menstruacyjnego i w obu fazach jest niższy niż w endometrium [170].

Do podstawowych białek uczestniczących w indukcji i regulacji apoptozy zalicza się: białko Fas oraz FasL receptorowego szlaku apoptozy oraz białka bcl-2 i bax mitochondrialnego szlaku apoptozy [86;205;206;207;208]. Wykazano, że u kobiet z endometriozą źródłem obecnego w płynie otrzewnowym sFasL są nie tylko makrofagi [204;207], lecz także komórki ognisk endometriozy [209]. Potwierdzono, że komórki endometrialne obecne w ogniskach endometriozy charakteryzują się wyższą błonową ekspresją FasL w porównaniu do komórek prawidłowego endometrium [210], a w następstwie działania metaloproteinaz, których stężenie w płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą jest podwyższone [211;212], powstaje sFasL wydzielany do płynu otrzewnowego [49].

Białko Fas podlega ekspresji w błonie komórek endometrium w trakcie całego cyklu menstruacyjnego [208;210;213]. Badania z zastosowaniem mikroskopu elektronowego wykazały, że w fazie proliferacyjnej białka Fas i FasL są zlokalizowane w aparacie Golgiego i wakuolach cytoplazmatycznych komórek

endometrialnych, co zapobiega ich wzajemnej interakcji i przypadkowej indukcji apoptozy [208;214]. W fazie sekrecyjnej białka te zostają wbudowane do błony komórek endometrium [208;214]. Indukcja apoptozy może zachodzić w wyniku połączenia białka Fas znajdującego się na komórce endometrium z FasL komórki układu immunologicznego, jak również komórki endometrialne w wyniku błonowej koekspresji Fas i FasL mogą wzajemnie regulować swoją proliferację i apoptozę [215].

Białko bcl-2 jest jednym z najlepiej poznanych inhibitorów mitochondrialnego szlaku apoptozy [216;217], a jego ekspresję potwierdzono zarówno w komórkach gruczołowych jak i zrębu endometrium [213]. Ekspresja białka bcl-2 w endometrium zdrowych kobiet podlega cyklicznym zmianom, osiągając szczyt w fazie proliferacyjnej, w której apoptoza komórek endometrium jest ograniczona [213]. Białko bax, przeciwnie do bcl-2, wykazuje właściwości proapoptotyczne. Według Tao i współpracowników ekspresja białka bax w endometrium również ulega cyklicznym zmianom osiągając maksimum w fazie sekrecyjnej, kiedy to obserwuje się nasilenie apoptozy komórek endometrium [88], natomiast McLaren ze współpracownikami postulują, że ta ekspresja w komórkach endometrium jest stała i niezależna od fazy cyklu menstruacyjnego [87].

Poprzez wysoką ekspresję na swojej powierzchni FasL i wydzielanie sFasL do płynu otrzewnowego komórki ognisk endometriozy prawdopodobnie mogą obronić się przed zniszczeniem przez komórki układu immunologicznego. Prawidłowe oddziaływanie Fas - FasL odgrywa bowiem zasadniczą rolę w utrzymaniu prawidłowej homeostazy tkankowej, równocześnie wykazano, że zaburzenia w ekspresji tych białek mogą ułatwiać ucieczkę komórek spod wpływu układu immunologicznego (*immune escape*) [218]. Wysoka ekspresja FasL obserwowana w takich tkankach jak jądro, rogówka, czy łożysko, poprzez indukcję apoptozy Fas-dodatnich komórek układu immunologicznego zapewnia uprzywilejowanie immunologiczne tych tkanek [219;220;221]. Ekspresja przez komórki w ogniskach endometriozy FasL prawdopodobnie chroni je przed zniszczeniem przez limfocyty T [202]. Wykazano, że w obecności makrofagów komórki endometriotyczne zwiększają ekspresję FasL [94].

W endometrium potwierdzono występowanie kilku rodzajów komórek układu immunologicznego jak: eozynofile, neutrofile, limfocyty T, limfocyty B, komórki tłuszczne, makrofagi oraz limfocyty NK [212]. Populacja leukocytów w endometrium

dynamicznie się zmienia, a fluktuacja w liczbie komórek jest konsekwencją ich migracji z naczyń krwionośnych, tkankowej proliferacji oraz apoptozy [222]. Endometrialna populacja eozynofików i neutrofili jest stała. Limfocyty B i T, których podstawowym zadaniem jest utrzymywanie tolerancji immunologicznej podczas implantacji, a następnie w ciąży, również w niewielkim stopniu wpływają na remodeling endometrium w trakcie cyklu miesięczkowego. Komórkami, które biorą aktywny udział w selektywnym indukowaniu apoptozy w endometrium, są makrofagi i komórki NK [212]. W endometrium sekrecyjnym stwierdzono większą liczbę komórek NK w porównaniu do endometrium proliferacyjnego [212;222;223;224]. Makrofagi stanowią do 15% populacji leukocytów w endometrium [212]. Wicherek i współpracownicy nie stwierdzili zmian w liczbie i aktywności endometrialnych makrofagów w zależności od fazy cyklu menstruacyjnego [224], jednakże Rieger i współpracownicy wykazali zwiększoną liczbę makrofagów w endometrium sekrecyjnym w porównaniu do endometrium proliferacyjnego, choć różnica nie była statystycznie istotna [225]. W badaniach przeprowadzonych przez Salomona i Wolleya wykazano natomiast znamieny wzrost liczby makrofagów w fazie sekrecyjnej endometrium [226]. Należy podkreślić, że endometrium w fazie proliferacyjnej charakteryzuje się niższym indeksem apoptozy* w porównaniu do fazy sekrecyjnej [49], tak więc nasilenie apoptozy w endometrium następuje wraz z wzrostem liczby komórek NK i makrofagów w fazie sekrecyjnej cyklu menstruacyjnego.

Makrofagi obecne w płynie otrzewnowym charakteryzują się wysoką ekspresją białka bcl-2, co prawdopodobnie pozwala im przetrwać w skrajnie niekorzystnym środowisku o wysokim stężeniu białek indukujących apoptozę, ale być może upośledza ich funkcję.

Wraz z rozpoczęciem fazy sekrecyjnej w endometrium następuje rekrutacja limfocytów (w tym głównie komórek NK). Stanowią one około 90% komórek cytotoksycznych obecnych w endometrium w fazie sekrecyjnej. Charakteryzują się obecnością w ziarnistościach komórkowych Granzym B i perforym, dodatkowo różnicującą je cechą od obwodowych komórek NK jest brak antygenu CD16 kluczowego dla reakcji cytotoksycznej zależnej od przeciwciał (ADCC antibody dependent cell cytotoxicity).

* **indeks apoptozy** – iloraz liczby komórek, które uległy apoptozie do całkowitej liczby komórek w badanym fragmencie tkankowym.

Jako jeden z możliwych mechanizmów ochrony przed apoptozą przyjęto fakt zwiększonej ekspresji białka bcl-2 w komórkach ognisk endometriozy, podobnie jak ma to miejsce w makrofagach płynu otrzewnowego kobiet z endometriozą. Antyapoptotyczne białko bcl-2 szlaku mitochondrialnego poprzez hamowanie aktywacji kaspazy-8 może blokować receptorowy szlak indukcji apoptozy. Należy jednak uwzględnić fakt, że w wyniku indukcji białka Fas sygnał proapoptotyczny może zostać przekazany poprzez rekrutację białka RIP i aktywację kaspazy-2 [118;119] oraz niezależną aktywację kinazy Jun [120;121]. Równocześnie w przypadku białaczki limfatycznej i chłoniaków nie-Hodgkinowskich stwierdzono brak związku pomiędzy ekspresją białka bcl-2 a podatnością na apoptozę indukowaną drogą receptorową za pomocą TNF α , sugerując inny mechanizm oporności na apoptozę tych komórek [227]. Tak więc hamowanie receptorowego szlaku apoptozy przez białko bcl-2 regulujące przede wszystkim mitochondrialny szlak apoptozy szczególnie w środowisku o dużym stężeniu induktorów apoptozy może okazać się mało efektywne.

Aktywacja błonowego receptora Fas ostatecznie doprowadza do aktywacji białka DFF40 ale istnieją mechanizmy aktywacji DFF40 z pominięciem receptorów błonowych oraz związanych z nimi cytoplazmatycznych molekuł śmierci. Granzym B obecny w cytoplazmatycznych ziarnistościach komórek NK może bezpośrednio z pominięciem kaskady kaspaz aktywować kompleks DFF40/DFF45, indukując apoptozę komórek docelowych [228].

Tak więc poprzez niską ekspresję białka DFF45 komórki w ogniskach endometriozy nie tylko stają się odporne na receptorową indukcję apoptozy (*resistant to apoptosis*) i mogą proliferować w środowisku płynu jamy otrzewnowej o silnych właściwościach indukcji receptorowego szlaku apoptozy, lecz równocześnie wykorzystują tę zdolność do atakowania komórek układu immunologicznego poprzez wysoką błonową ekspresję FasL i wydzielanie sFasL (*Fas counter-attac*) [202;209].

W świetle doniesień klinicznych mówiących, że obniżony poziom ekspresji białka DFF45 koreluje z gorszymi wynikami leczenia raka przełyku i okrężnicy przeanalizowano również związek pomiędzy ekspresją białka DFF45 a stopniem nasilenia endometriozy ocenianej śródoperacyjnie według skali RCE. Dmowski współpracownicy zaobserwowali, że indeks apoptozy komórek endometrialnych u kobiet z III i IV stopniem endometriozy był niższy niż u kobiet, u których

śródooperacyjnie rozpoznano I lub II stopień endometriozy według kryteriów RCE, choć różnica nie była istotna statystycznie [7]. Również Garcia-Velasco i współpracownicy obserwowali wyższe stężenia sFasL w płynie otrzewnowym kobiet z zaawansowaną endometriozą w porównaniu do pacjentek z minimalnym i umiarkowanym stopniem endometriozy [94]. W analizowanym materiale klinicznym wykazano związek pomiędzy ocenianym śródooperacyjnie stopniem endometriozy, a ekspresją białka DFF45 przez komórki z ognisk endometriozy. Wraz ze wzrostem stopnia endometriozy obserwowano zmniejszenie ekspresji białka DFF45 w komórkach endometriotycznych. Prawdopodobnie niska ekspresja białka DFF45 wraz ze zwiększeniem stężenia sFasL w płynie otrzewnowym lepiej chroni komórki endometriotyczne przed atakiem układu immunologicznego, co pozwala na rozrost ogniska endometriotycznego i niestety, predysponuje do rozwoju zaawansowanej endometriozy.

Na podstawie licznych badań epidemiologicznych przeprowadzonych w latach 80. i 90. poprzedniego stulecia stwierdzono, że krótkie cykle, długie i obfite krwawienia miesięczne oraz wcześniejszy wiek wystąpienia pierwszej miesiączki zwiększają ryzyko wystąpienia endometriozy [229;230;231]. W przedstawionym badaniu kobiety z endometriozą nie różnią się w sposób statystycznie istotny pod względem wymienionych cech klinicznych. Wyniki badań klinicznych przeprowadzonych w ostatnich pięciu latach stwierdzają, że kobiety z rozpoznaną endometriozą nie różnią się statystycznie istotnie pod względem długości, regularności cykli menstruacyjnych, czasu trwania i nasilenia krwawień miesięcznych oraz wieku menarche od kobiet zdrowych [232;233;234]. Sprzeczność wyników tłumaczona jest nieścisłościami w kwalifikacji pacjentek w poszczególnych pracach badawczych. Obecnie złotym standardem rozpoznawania endometriozy jest śródooperacyjne uwidocznienie ognisk endometriozy drogą laparoskopii (wymagającym w niektórych przypadkach weryfikacji histopatologicznej), natomiast w badaniach wcześniejszych stosowano różne metody rozpoznawania endometriozy i kwalifikacji pacjentek, co najprawdopodobniej przyczyniło się do uzyskania odmiennych wyników.

Nie wykazano różnic w wieku pacjentek z rozpoznaną endometriozą w porównaniu z grupą pacjentek bez endometriozy, u których głównym wskazaniem do interwencji chirurgicznej był mięśniakowaty rozrost macicy. Średni wiek kobiet, w którym wykonywane zostały zabiegi operacyjne, wynosił w przypadku pacjentek z

endometriozą 41 lat a u pozostałych kobiet 43 lata. Obserwacja ta jest zgodna z badaniami Vebilliego i współautorów, którzy ocenili, że zarówno chirurgiczna interwencja z powodu objawów klinicznych endometriozy jak i operacyjne leczenie rozrostów mięśniakowatych narządu rodnego jest najczęściej wykonywana u kobiet pomiędzy 40. a 44. rokiem życia [235]. Badania epidemiologiczne potwierdzają również częste występowanie mięśniaków macicy u kobiet cierpiących na endometriozę, lecz nie diagnozowanych z powodu niepłodności [232].

6. Wnioski

Zależne od cyklu menstruacyjnego zmiany ekspresji białka DFF45 w endometrium zdrowych kobiet korespondują ze zmianami aktywności innych białek kluczowych dla indukcji i regulacji apoptozy. Cykliczne zmiany nasilenia apoptozy w komórkach endometrium zdrowych kobiet wymagają prawidłowej, funkcjonalnie zmiennej, ekspresji białka DFF45. W komórkach z ognisk endometriozy, które nie wykazują charakterystycznych dla endometrium zdrowych kobiet cyklicznych zmian w procesach apoptozy, ekspresja białek indukujących i regulujących apoptozę w tym badanego DFF45 traci zależność od fazy cyklu menstruacyjnego. Co więcej, ekspresja białka DFF45 w komórkach endometriotycznych jest znacznie niższa niż w endometrium zdrowych kobiet. Prawdopodobnie poprzez zmniejszoną ekspresję białka DFF45 komórki endometriotyczne mogą przerwać receptorowy oraz mitochondrialny szlak indukcji apoptozy, jak również unikać proapoptotycznego efektu działania Granzymu B. Zmniejszenie ekspresji białka DFF45 i cykliczność tej ekspresji prawdopodobnie odgrywa rolę w mechanizmie oporności komórek endometriotycznych na apoptozę.

7. Streszczenie

WSTĘP

Endometrioza jest to występowanie tkanki endometrium poza jamą macicy. Szacuje się, że 10%-15% ogólnej populacji kobiet cierpi z powodu endometriozy, która ze względu na dolegliwości bólowe znacznie obniża jakość życia i często jest przyczyną niepłodności. Pomimo wielu badań etiologia powstawania ognisk endometriotycznych, które najczęściej lokalizują się w jajnikach, nie została jednoznacznie wyjaśniona. Wykazano natomiast, że endometrium zdrowych kobiet ulega cyklicznym zmianom histologicznym i funkcjonalnym. Znamienne większy indeks apoptozy komórek endometrium stwierdzono w fazie sekrecyjnej w porównaniu do fazy proliferacyjnej. W ogniskach endometriozy jajnikowej nie stwierdzono zależnych od fazy cyklu miesięczkowego różnic w liczbie komórek ulegających apoptozie. Tak więc zaburzenia w mechanizmach apoptozy mogą odgrywać istotną rolę w etiopatogenezie endometriozy.

Apoptoza jest procesem wieloetapowym prowadzącym do śmierci komórki. Szczególne nasilenie procesów apoptotycznych obserwuje się w trakcie owulacji, okresu płodowego oraz w układzie immunologicznym dorosłych ssaków. Stwierdzono, że zaburzenia apoptozy leżą u podstaw powstawania chorób autoimmunologicznych i nowotworowych. Indukcja apoptozy może się rozpocząć poprzez aktywację receptorów błonowych komórki z rodziny TNF (Fas/FasL), jak również brać początek od zmian występujących w mitochondriach. W wyniku pobudzenia domen śmierci zależnych od Fas następuje aktywacja kaskady kaspaz, z których ostatnia – kaspaza-3 – aktywuje kompleks DFF40/DFF45, co w końcowym efekcie prowadzi do degradacji DNA jądrowego.

DFF (DNA Fragmentation Factor) jest czynnikiem fragmentacji kwasu dezoksyrybonukleinowego obecnym w jądrze komórkowym. Fragmentacja DNA jest końcowym etapem apoptozy. DFF to dimer zbudowanym z cząsteczki o masie 40 kDa (DFF40), o aktywności nukleazy, oraz białka o masie 45 kDa (DFF45) będącego inhibitorem dla DFF40. DFF45 stanowi substrat dla kaspazy – 3. Aktywna forma DFF40 może powstać tylko w obecności DFF45. Udział DFF45 w procesach apoptozy został potwierdzony zarówno *in vitro* jak i w badaniach klinicznych. W warunkach *in vitro* wyhodowano linię komórkową mysich tymocytów, które

charakteryzował brak ekspresji DFF45, komórki te nie ulegały apoptozie, w porównaniu z tymocytami prawidłowymi. Pacjentów leczonych z powodu raka przełyku oraz raka okrężnicy, których komórki raka cechował zmniejszony poziom ekspresji DFF45, charakteryzował cięższy przebieg kliniczny i gorsze rokowanie, co do przeżycia.

CEL PRACY

Ocena ekspresji białka DFF45, jako ogniwa kaskady przekazywania sygnału proapoptotycznego oraz próba przedstawienia jego funkcji i znaczenia w etiopatogenezie endometriozy jajnika.

MATERIAŁ I METODY

W badaniu uczestniczyło 88 pacjentek zakwalifikowanych do rutynowych zabiegów laparoskopowych i hysteroskopowych, jak również laparotomii, z powodu mięśniaków macicy oraz zespołu bólowego miednicy mniejszej. Śródoperacyjnie oceniano zaawansowanie endometriozy według punktowej Zrewidowanej Klasyfikacji Endometriozy (RCE) Amerykańskiego Towarzystwa Płodności i na tej podstawie do 1. stopnia według RCE zakwalifikowano 3 pacjentki ; 2. stopień RCE – 6 pacjentek; 3. stopień według RCE – 6 pacjentek i 4. stopień według RCE również 6 pacjentek. U osób włączanych do badania nie stosowano leczenia hormonalnego przez ostatnie 6 miesięcy. Z badania wyłączono ciężarne oraz pacjentki z chorobami nowotworowymi.

W losowo wybranych 50 próbkach tkankowych (endometrioza n=10; endometrium proliferacyjne n=10; endometrium sekrecyjne n=10; jajnik I faza cyklu n=10 oraz jajnik II faza cyklu n=10) metodą immunohistochemiczną zlokalizowano komórki DFF45-pozytywne. Względą ilość białka DFF45 oceniono metodą *Western-blot* w 126 próbkach tkankowych (endometrioza n=26; endometrium proliferacyjne n=31; endometrium sekrecyjne n=28; jajnik I faza cyklu menstruacyjnego n=19 oraz jajnik II faza cyklu menstruacyjnego n=23).

Analizy statystycznej dokonano przy pomocy pakietu Statistica 7.0 (firma StatSoft) przyjmując za poziom istotności statystycznej wartość $p < 0,05$.

WYNIKI

W analizowanym materiale klinicznym potwierdzono ekspresję białka DFF45 metodą immunohistochemiczną i *Western blot* we wszystkich badanych tkankach. Stwierdzono statystycznie niższą ekspresję białka DFF45 w endometrium proliferacyjnym w porównaniu z endometrium sekrecyjnym, jak również stwierdzono statystycznie niższą ekspresję białka DFF45 w prawidłowej tkance jajnika w I fazie cyklu menstruacyjnego w porównaniu z prawidłową tkanką jajnika w II fazie cyklu menstruacyjnego. W endometriozie jajnikowej ekspresja białka DFF45 była najniższa w porównaniu z endometrium w I i II fazie cyklu jak również w porównaniu ze zdrową tkanką jajnikową w I i II fazie cyklu oraz nie wykazywała zmian w zależności od fazy cyklu menstruacyjnego. Wykazano silną, statystycznie istotną, ujemną korelację pomiędzy poziomem białka DFF45 w ogniskach endometriozy a stopniem nasilenia zmian endometriotycznych ocenianych śródoperacyjnie w skali RCE.

WNIOSKI

Zarówno w prawidłowej tkance jajnikowej, jak również w endometrium stwierdzono funkcjonalne zmiany ekspresji DFF45. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji białka DFF45 w ogniskach endometriozy jajnika w zależności od funkcjonalnej fazy cyklu menstruacyjnego. Tak więc tkanka endometriotyczna nie tylko obniża ekspresję białka DFF45, co może ułatwiać jej przeżycie w patologicznym dla siebie środowisku i ucieczkę spod mechanizmów immunologicznej kontroli, lecz traci również wrażliwość na stany funkcjonalne narządu rodneho.

8. Abstrakt

INTRODUCTION

Endometriosis is defined as endometrial tissue in ectopic localisation i.e. outside cavity of uterus. It is considered to be the most common benign gynaecological problem affecting up to 10%-15% women in general population involving mostly ovaries. Endometriosis influences negatively life quality and is the main cause of women's infertility. Although many research have been done to discover the pathology of endometriosis it still remains an unsolved phenomenon. Endometrium of healthy women undergoes histological and functional changes according to menstrual cycle. Many studies confirmed the increase in apoptosis of endometrial cell was noticed in secretory compared to proliferative phase of menstrual cycle. In endometriosis however no significant differences in apoptotic index of endometrial cells according to menstrual cycle were identified.

Apoptosis is a multi-step process resulting in cell death essential for tissue development and homeostasis. Alternation in apoptosis often results in auto-immune diseases and neoplasia development. Two major apoptotic pathways were identified: death-receptor pathway and mitochondrial pathway. Multiple apoptotic stimuli including Fas ligand, Tumor Necrosis Factor or ionizing radiation enable death-receptor or mitochondrial pathway proteases called caspases resulting in activation of DFF40/DFF45 complex.

DFF - DNA Fragmentation factor - complex exists in cell nucleus as a dimer composed of DFF40 (CAD) and DFF45 (ICAD-L). DFF45 acts as a substrate for caspase-3 and after cleavage active form of DFF40 is released proceeding with DNA fragmentation (DNA laddering). DFF45 does not act simply as a chaperon or inhibitor for DFF40. The presence of DFF45 is required for proper folding of DFF40 to obtain an active protein. DFF40 synthesised in the absence of DFF45 is a completely inactive molecule. Furthermore most cells have a stoichiometric 1:1 ratio of DFF40 and DFF45. *In vitro* studies revealed that mouse thymocytes negative for DFF45 were more resistant to apoptosis than thymocytes obtained from control group. Clinical research showed that patient suffering from oesophagus and colonic cancer had very poor prognosis if cancerous tissue expresses DFF45 at low level.

SUBJECT OF THE STUDY

The aim of the study was to evaluate DFF45 molecule as a last factor in apoptosis chain and present its role in pathogenesis of endometriosis.

MATERIAL AND METHODS

88 women who underwent standard surgery procedures were included to the study. Endometriosis was diagnosed in 26 patients and 62 women were operated for benign gynaecological problems. Pregnant women and patients with neoplastic disease were excluded from the study. Stage of endometriosis was assessed during surgery according to Revised Classification of Endometriosis (RCE). No hormonal treatment was introduced to the participants during the past 6 months.

Immunohistochemical analysis was performed on 50 random chosen paraffin-embaded tissues (ovarian endometriosis n=10; proliferative endometrium n=10; secretory endometrium n=10; normal ovarian tissue in the 1st phase of menstrual cycle n=10 and normal ovarian tissue in the 2nd phase of menstrual cycle n=10) by Envision method and DAKO Autostainer using specific polyclonal rabbit antibodies. Then *Western-blot* analysis was performed on 127 tissue species for evaluation of the DFF45 expression.

All calculations were made using Statistica v. 7.0 software and $p < 0.05$ was considered to be statistically significant value.

RESULTS

DFF45 expression was confirmed in all tissue samples using both methods: immunohistochemistry and *Western blot*. In endometriotic foci expression of DFF45 was decreased compared to the eutopic endometrium in proliferative and secretory phase of menstrual cycle and the difference was statistically significant. DFF45 expression was significantly higher in normal ovarian tissue compared to ovarian endometriosis. The increased DFF45 expression was detected in the 2nd phase of menstrual cycle subsequently in endometrium and in normal ovarian tissue. No changes in DFF expression according to menstrual cycle were observed in ovarian endometriomas.

Negative correlation between expression of DFF45 and stage of endometriosis (according to RCE) was confirmed.

Piśmiennictwo*

1. Beltran MA, Tapia QTF, Araos HF, Mrtinez GH, Cruces KS. Ileal endometriosis as a cause of intestinal obstruction. *Rev Med Chil* 2006;134:485-490.
2. Mausney AL, Wilgus A, Slawson DC. Diagnosis and management of endometriosis. *Am Fam Phis* 2006;74:594-600.
3. Rock JA. Endometriosis and pelvic pain. *Fertil Steril* 1993;60:950-951.
4. Taylor MM. Endometriosis - a missed malady. *AORN J* 2003;77:298-299.
5. Velebil P, Wingo PA, Xia Z, Wilcox LS, Peterson HB. Rate of hospitalization for gynecologic disorders among reproductive-age women in the United States. *Obstet Gynecol* 1995;86:764-769.
6. Gao X, Yeh YC, Outley J, Simon J, Botteman M, Spalding J. Health-related quality of life burden of women with endometriosis: a literature review. *Curr Med Res Opin* 2006;22:1787-1797.
7. Dmowski WP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB, Braun DP. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis. *Hum Reprod* 2001;16:1802-1808.
8. Winkel CA. A cost-effective approach to the management of endometriosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2000;12:317-320.
9. Philips Z, Barraza-Llorens M, Posnett J. Evaluation of the relative cost-effectiveness of treatments for infertility in the UK. *Hum Reprod* 2000;15:95-106.
10. Blackwell RE, Mercer WM. Hidden costs of infertility treatment in employee health benefits plans. *Am J Obstet Gyn* 2000;182:891-895.
11. Dhillon PK, Holt VL. Recreational physical activity and endometrioma risk. *Am J Epidemiol* 2003;158:156-164.
12. Ozawa Y, Murakami T, Terada Y, Yaegashi N, Okamura K, Kuriyama S, Tsuji I. Management of the pain associated with endometriosis: an update of the painful problem. *Tohoku J Exp Med* 2006;210:175-188.
13. Preciado Ruiz R, Torres Calleja J, Zuniga Montiel JA, Martinez Chequer JC, Manterola Alvarez D, Garcia Luna A. Incidence of endometriosis in infertile women: clinical and laparoscopic characteristics. *Ginecol Obstet Mex* 2005;73:471-476.
14. Eskazani B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997;24:235-258.
15. Moore JG. Endometriosis and adenomyosis. In: Hacker NF, Moore JG, editors. *Essentials of obstetrics and gynecology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1998: p. 432-439.
16. Grodziński T, Gackowski W, Radwański P. Niedrożność jelita cienkiego spowodowana endometriozą. *Ginekol Pol* 2003;74:234-236.

* Zgodnie z rekomendacjami Oddziału Informacji Naukowej Biblioteki Medycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego każda pozycja piśmiennictwa wykorzystanego w artykule otrzymała kolejny numer (podany cyframi arabskimi ujętymi w nawiasy) w miejscu tekstu, w którym Autor po raz pierwszy się na nią powołał. Styl przypisów bibliograficznych odpowiada zasadom stosowanym przez Amerykańską Państwową Bibliotekę Medyczną (NLM) w Index Medicus.

17. Sheikh HA, Krishnamuriti H, Bhat Y, Rajendiran S. A 42-year-old women with a 7-month history of abdominal pain. *Arch Patol Lab Med* 2005;129:218-221.
18. Kataoka ML, Togashi K, Yamaoka T, Koyama T, Ueda H, Kobayashi H, Rahman M, Higuchi T, Fujii S. Posterior cul-de-sac obliteration associated with endometriosis: MR imaging evaluation. *Radiology* 2005;234:815-823.
19. Khoo JJ, Ismaili MSA, Tiu CC. Endometriosis of the appendix presenting as acute appendicitis. *Singapore Med J* 2004;45:435-436.
20. Generao S, Keene KD, Das S. Endoscopic diagnosis and management of urethral endometriosis. *J Endourol* 2005;19:1177-1179.
21. Pałczyński B, Blok K, Blok R, Karmowski A, Gabryś M. Niedrożność moczowodu w przebiegu endometriozy. *Ginekol Pol* 2002;73:853-855.
22. Laghzaoui O, Laghzaoui M. Nasal endometriosis: apropos of 1 case. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2001;30:786-788.
23. Ogawa H, Nakayama T, Doi H, Manabe K, Sakaguchi S. A case of pulmonary parenchymal endometriosis. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 2005;43:165-170.
24. Bram A, Bagan P, Danel C, Badia A, Riquet M. Pleural endometriosis: an unusual presentation. *Rey Mal Respir* 2005;22:677-680.
25. Ichdia M, Gomi A, Hiranouchi N, Fujimoto K, Suzuki K, Yoshida M, Nokubi M, Masuzawa T. A case of cerebral endometriosis causing catamenial epilepsy. *Neurology* 1993;43:2708-2709.
26. Thibodeau LL, Prioleau GR, Mauelidid EE, Merino MJ, Heafner MD. Cerebral endometriosis. Case report. *J Neurosurg* 1987;66:609-610.
27. Selo-Ojme D, Freeman-Wang T, Khan NH. Post-coital bleeding: a rare and unusual presentation of cervical endometriosis. *Arch Ginecol Obstet* 2006;273:370-373.
28. Wicherek L, Dutsch-Wicherek M, Galazka K, Banas T, Popiela T, Lazar A, Kleinrok-Podsiadlo B. Comparison of RCAS1 and metallothionein expression and the presence and activity of immune cells in human ovarian and abdominal wall endometriomas. *Reprod Biol Endocrinol* 2006;14:41-50.
29. Wicherek L, Klimek M, Skret-Margiela J, Czekierdowski A, Banas T, Popiela TJ, Kraczowski J, Sikora J, Oplawski M, Nowak A, Skret A, Basta A. The obstetrical history in patients with Pfannenstiel scar endometriomas - an analysis of 81 patients. *Gynecol Obstet Invest* 2006;63:107-113.
30. Zheng W, Li N, Wang J, Ulukus EC, Ulukus M, Arici A, Liang SX. Initial endometriosis showing direct morphologic evidence of metaplasia in the pathogenesis of ovarian endometriosis. *Int J Gynecol Pathol* 2005;24:164-172.
31. El-Mahgoub S, Yaseen S. A positive proof for the theory of coelomic metaplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1980;137:137-140.
32. Doty DW, Gruber JS, Wolf GC, Winslow RC. 46,XY pure gonadal dysgenesis: report of 2 unusual cases. *Obstet Gynecol* 1980;55:61S-65S.

33. Nakamura M, Katabuchi H, Tohya T, Fukumatsu Y, Matsuura K, Okamura H. Scanning electron microscopic and immunohistochemical studies of pelvic endometriosis. *Hum Reprod* 1993;8:2218-2226.
34. Matsuura K, Ohtake H, Katabuchi H, Okumara H. Coelomic metaplasia theory of endometriosis: evidence from in vivo studies and an in vitro experimental model. *Gynecol Obstet Invest* 1999;47 Suppl 1:18-20.
35. Javert CT. The spread of benign and malignant endometrium in the lymphatic system with a note on coexisting vascular involvement. *Am J Obstet Gynecol* 1952;64:780-806.
36. Gordon PH, Schottler JL, Balcos EG, Goldberg SM. Perianal endometrioma: report of five cases. *Dis Colon Rectum* 1976;19:260-265.
37. Thomakos N, Rodolakis A, Vlachos G, Papaspirou I, Markaki S, Antsaklis A. A rare case of rectovaginal endometriosis with lymph node involvement. *Gynecol Obstet Invest* 2006;62:45-47.
38. Sampson JA. Heterotopic or misplaced endometrial tissue. *Am J Obstet Gynecol* 1925;10:649-668.
39. Blumennkrantz M, Atasoy P, Erkul S. Laparoscopic management of endometriosis. *Fert Steril* 1997;43:347-351.
40. Godal A, Frank C, Eshop F. Renal insufficiency management. *Nephrolog* 1996;56:235-239.
41. Simpson JL, Elias S, Malinak LR, Buttram VC Jr. Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. *Am J Obstet Gynecol* 1980;137:327-331.
42. Moen MH, Magnus P. The familial risk of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1993;72:560-564.
43. Coxhead D, Thomas EJ. Familial inheritance of endometriosis in a British population. A case control study. *J Obstet Gynecol* 1993;13:42-44.
44. Taylor R, Lundeen S, Guidice LC. Emerging role of genomics in endometriosis research. *Fertil Steril* 2002;78:694-698.
45. Simpson JL. Where are the genes that cause endometriosis? *J Soc Gynecol Investig* 2005;12:143-144.
46. Weed JC, Arquembourg PC. Endometriosis: can it produce an autoimmune response resulting in infertility? *Clin Obstet Gynecol* 1980;23:885-893.
47. Dmowski WP, Steele RW, Baker CF. Deficient cellular immunity in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1981;141:377-387.
48. Dmowski WP, Braun DP, Gebe HM. Manipulation of the immune system in endometriosis. In: Brosens I, Donnez J, editors, *Proceedings of the 3rd World Congress on Endometriosis*. The New York: Parthenon Publishing Group. p. 257-258.
49. Dmowski WP, Gebel H, Braun DP. Decreased apoptosis and sensitivity to macrophage mediated cytotoxicity of endometrial cells in endometriosis. *Hum Reprod* 1998;4:696-701.
50. Kao LC, Germay A, Tlac S, Lobo S, Yang JP, Taylor RN, Osteen K, Lessey BA, Guidice LC. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate

- genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology* 2003;144:2870-2881.
51. Olive DL, Lindheim SR, Pritts EA. New medical treatments of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18:319-28.
 52. Kurita T, Beitel LK, Cookie PS, Lydon GR, Cunha JP. Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor and lactoferrin by progesterone in the mouse uterus. *Biol Reprod* 2000;62:831-838.
 53. Kastner P, Krust A, Turotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptors forms A and B. *EMBO J* 1990;9:1603-1614.
 54. Attia GR, Zeiteun K, Edwards D, Johns A, Carr BR, Bulun SE. Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2897-2902.
 55. Bulun SE, Cheng YH, Yin P, Imir G, Utsunomiya H, Attar E, Innes J, Julie Kim J. Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 2006;248:94-103.
 56. Vinatier D, Orazi G, Cosson M, Dufour P. Theories of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;96:21-34.
 57. Sharpe-Timms K, Young SL. Understanding endometriosis is the key to successful therapeutic management. *Fertil Steril* 2004;81:1201-1203.
 58. Mousey AL, Wilgus A, Slawson DC. Diagnosis and management of endometriosis. *Am Fam Physician* 2006;74:594-600.
 59. Meden H, Fattahi-Meibodi A. CA-125 in benign gynecological condition. *Int J Biol Markers* 1998;13:231-237.
 60. Bulsa M, Nowacki M, Perzanowski P. Podwyższony poziom antygenu CA 125 w chorobach nienowotworowych miednicy mniejszej u kobiet w wieku rozrodczym. *Ginekolog Pol* 2002;73:517-522.
 61. Bedaivi MA, Falcone T. Laboratory testing for endometriosis. *Clin Chim Acta* 2004;340:41-56.
 62. Harada T, Kubota T, Aso T. Usefulness of CA19-9 versus CA125 for the diagnosis of endometriosis. *Fertil Steril* 2002;78:733-739.
 63. Klimek M, Ludwikowski G, Obrzut B, Skamla K, Migdał M, Pabian W, Stangel K, Adamski D. Wskazania do laparoskopii u młodych – analiza porównawcza zabiegów wykonywanych w trzech ośrodkach klinicznych: Bydgoszczy, Krakowie i Rzeszowie w latach 1995-2001. *Gin Prakt* 2002;5:10-13.
 64. Klimek M, Wojtyś A, Wiecheć M, Kempf-Haber M, Wolak J. Zabiegi laparoskopowe w ciąży. *Gin Prakt* 2003;4:39-40.
 65. Demco L. Novel approaches to diagnosing and treating endometriosis. *Cont Obs Gyn* 200;49:12-15.

66. Vercellini P, Frontino G, De Giori O, Pietropalo G, Pasin R, Crosigani PG. Continuous use of an oral contraceptive for endometriosis-associated recurrent dysmenorrhea that does not respond to a cyclic pill regimen. *Fertil Steril* 2003;80:560-563.
67. Prentice A, Deary AJ, Bland E. Progestagens and antiprogestagens for pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;2:CD002122.
68. Selak V, Farquhar C, Prentice A, Singla A. Danazol for pelvic pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2001;4:CD000068.
69. Prentice A, Deary AJ, Goldbeck-Wood S, Farquhar C, Smith SK. Gonadotrophin-releasing hormone analogues for pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 1999;2:CD000346.
70. Namnoum AB, Hickman TN, Goodman SB, Gehlbach DL, Rock JA. Incidence of symptom recurrence after hysterectomy for endometriosis. *Fertil Steril* 1995;64:898-902.
71. Ventolini G, Horowitz GM, Long R. Endometriosis in adolescence: A long-term follow-up fecundability assessment. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:14-17.
72. Vaskivuo TE, Stenback E, Karhumaa P. Apoptosis and apoptosis-related proteins in human endometrium. *Mol Cell Endocrinol* 2000;165:75-83.
73. Markee JE. Menstruation in intraocular endometrial transplants in the rhesus monkey. *Contrib Embryol Carnegie Inst Wash* 1940;28:219-308.
74. Baetzelmetz GW. The form and the function of the uterine blood vessels in rhesus monkey. *Contrib Embryol Carnegie Inst Wash* 1957;36:153-182.
75. Kokawa K, Shikone T, Nakano R. Apoptosis in the human uterine endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:4144-4147.
76. Di Paola M, Loverro G, Caringella AM, Cormioselvaggi GL. Receptor and mitochondrial apoptotic pathways in normal and neoplastic human endometrium. *Int J Gynecol Cancer* 2005;15: 523-528.
77. Lifschitz-Mercer B, Czernobilsky B, Dgani R, Dallenbach-Hellweg G, Moll R, Franke WW. Immunocytochemical study of an endometrial diffuse clear cell stromal sarcoma and other endometrial stromal sarcomas. *Cancer* 1987;59:1494-1499.
78. King A, Wellings V, Gardner L, Loke YW. Immunohistochemical characterization of unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Immunol* 1989;24:195-205.
79. Blumer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod* 1991;6:791-798.
80. Young FDE, Liu CC. Multiple mechanisms of lymphocyte-mediated killing. *Immunol Today* 1988;9:140-143.
81. Peters PJ, Gueze JJ, Van der Donk HA, Slot JW, Griffith JM. Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1989;19:1469.

82. Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 1992;10:267.
83. Igarashi T, Konno R, Okamoto S, Mriya T, Satoh S, Yajima A. Involvement of granule-mediated apoptosis in the cyclic changes in the normal human endometrium. *Tohoku J Exp Med* 2001;193:13-25.
84. Jones RK, Blumer JN, Searle RF. Phenotypic and functional studies of leukocytes in human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod Update* 1998;4:702-709.
85. Gompel A, Sabourin JC, Martin A, Yaneva H, Audouin J, Decroix Y, Poitout P. Bcl-2 expression in normal endometrium during the menstrual cycle. *Am J Pathol* 1994;144:1195-1202.
86. Otsuki Y, Misaki O, Sugimoto O, Ito Y, Tsujimoto Y, Akao Y. Cyclic bcl-2 gene expression in human uterine endometrium during menstrual cycle. *Lancet* 1994;344:28-29.
87. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Smith SK. Immunolocalisation of the apoptosis regulating proteins Bcl-2 and Bax in human endometrium and isolated peritoneal fluid macrophages in endometriosis. *Hum Reprod* 1997;12:146-152.
88. Tao X-J, Tilly KI, Maravei DV, Shifren JL, Krajewski S, Reed JC, Tilly JT, Isaacson KB. Differential expression of members of the bcl-2 gene family in proliferative and secretory human endometrium: glandular epithelial cell apoptosis is associated with increased expression of bax. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2738-2746.
89. Beliard A, Noel A, Foidart JM. Reduction of apoptosis and proliferation in endometriosis. *Fertil Steril* 2004;82:80-85.
90. Huang FY, Lin OH, Fang XL. Expression of Bcl-2 and Bax protein in endometriosis. *Huan Yi Ke DaXue Bao* 2003;28:102-106.
91. Philippeaux MM, Piguet PF. Expression of tumor necrosis factor- α and its mRNA in the endometrial mucosa during the menstrual cycle. *Am J Pathol* 1993;143:180-186.
92. Keenan J, Chen T, Chadwell N. IL-1 β , TNF α and IL-2 in peritoneal fluid and macrophage-conditioned media of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1995;34:381-385.
93. Eisermann J, Gast MJ, Pineda J, Odem RR, Collins JL. Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of women undergoing laparoscopic surgery. *Fertil Steril* 1988;50:573-579.
94. Gracia-Velasco JA, Mulayim N, Kayisi UA, Arci A. Elevated soluble Fas ligand levels may suggest a role for apoptosis in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2002;78:855-859.
95. Jones RK, Searle RF, Blumer JN. Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod* 1998;13:396-3502.
96. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
97. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-356.
98. Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:589-598.

99. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999;68:383-424.
100. Hanayma R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 2002;417:182-187.
101. Podhorecka M. Proces apoptozy w patogenezie przewlekłej białaczki limfatycznej B komórkowej. *Postępy Hig Med Dośw* 2004;58:236-242.
102. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-1308.
103. Gartel AL., Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2002;1:69-649.
104. Smolewski P, Darzynkiewicz A, Robak T. Caspase-mediated cell death in hematological malignancies: theoretical considerations, methods of assessment and clinical implications. *Leuk Lymphoma* 2003;44:1089-1104.
105. French LE, Tschopp J. Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. *Cell Death Diff* 2003;10:117-123.
106. Pająk B, Orzechowski A. FLIP-przeciwnik, który może przegrać pojedynek w walce z czynnikami swoiście hamującymi translację. *Postępy Hig Med Dośw* 2005;59:140-149.
107. Philchenkov A. Caspases: potential targets for regulating cell death. *J Cell Mol Med* 2004;8:432-444.
108. Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel KL, Bui KL, Leonado MJ. A domain in TNF receptors that mediates liand-independent receptor assembly and singling. *Science* 2000;288:2351-2354.
109. TakadaH, Chen NJ, Mirstos C, Suzuki S, Suzuki N, Wakeham A, Mak TW, Yeh WC. Role of SODD in regulation of tumor necrosis factor responses. *Mol Cell Biol* 2003;23:4026-4033.
110. Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, Tschopp J. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with down-regulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med.* 1998;187:1205-1213.
111. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995;81:505-512.
112. Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 1995;270:7795-7798.
113. Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Kramer PH, Peter ME. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 1997;16:2794-2804.
114. Gross A, Jockel J, Wei MC, Krosmeier SJ. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* 1998;17:3878-3885.

115. Zong WX, Edelstein LC, Chen C, Bash C, Gelians C. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:382-387.
116. Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. Tumor necrosis factor. In: Thompson AW, Lotze MT, editors. *The Cytokine Handbook*. 4th Edition. London: Elsevier Science Ltd.; 2003. p. 837-860.
117. Chu ZL, McKinsey A, Lin L, Gentry JJ, Malim MH, Ballard DW. Suppression of tumor necrosis factor induced cell death by inhibitor of apoptosis cAP2 is under NF-kappaB control. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:10057-10062.
118. Duan H, Dixit VM. RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature* 1997;385:86-89.
119. Schneider-Brachert W, Tchikov V, Merkel O, Jakob M, Hallas C, Kruse ML, Groitl P, Lehn A, Hildt E, Held-Feindt J, Dobner T, Kabelitz D, Kronke M, Schutze S. Inhibition of TNF receptor 1 internalization by adenovirus 14.7K as a novel immune escape mechanism. *J Clin Invest* 2006;116:2901-2913.
120. Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 1997;89:1067-1076.
121. Villunger A, Huang DC, Holler N, Tschopp J, Strasser A. Fas ligand-induced c-Jun kinase activation in lymphoid cells requires extensive receptor aggregation but is independent of DAXX, and Fas-mediated cell death does not involve DAXX, RIP, or RAIDD. *J Immunol* 2000;165:1337-1343.
122. Huang DC, Hahne M, Schroeter M, Frei K, Fontana A, Villunger A, Newton K, Tschopp J, Strasser A. Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-x(L). *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:14871-14876.
123. Ding WX, Yin XM. Dissection of the multiple mechanisms of TNF- α -induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med* 2004;8:445-454.
124. Mannel DN, Echtenacher B. TNF in the inflammatory response. *Chem Immunol* 2000;74:141-161.
125. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988;53:45-53.
126. Tang P, Hung M-C, Klostergaard J. Human tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* 1996;35:8216-8225.
127. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. A metalloproteinase disintegrin that releases tumor-necrosis factor- α from cells. *Nature* 1997;385:729-733.
128. Locksley RM, Killeen N, Leonardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501.
129. Naismith JH, Sprang SR. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci* 1990;23:74-79.

130. Jupp OJ, McFarlane SM, Anderson HM, Littlejohn AF, Mohamed AA, MacKay RH, Vandenabeele P, MacEwan DJ. Type II tumour necrosis factor- α receptor (TNFR2) activates c-Jun N-terminal kinase (JNK) but not mitogen-activated protein kinase (MAPK) or p38 MAPK pathways. *Biochem J* 2001;359:525-535.
131. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001;11:372-377.
132. Solomon KA, Pesti N, Wu G, Newton RC. Cutting edge: dominant negative form of TNF- α converting enzyme inhibits pro TNF and TNFRII secretion 1999;163:4105-4110.
133. Goodstell DS. The molecular perspective: Tumor Necrosis Factor. *Oncologist* 2006;11:83-84.
134. Papa S, Zazzeroni F, Pham CG, Bubici C, Franzoso G. Linking JNK signalling to NF- κ B: a key to survival. *J Cell Sci* 2004;5197-5208.
135. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1-16.
136. Cryns Y, Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev* 1998;12:1551-1570.
137. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996;87:171.
138. Mao PL, Jiang Y, Wee BY, Porter AG. Activation of caspase-1 in the nucleus requires nuclear translocation of pro-caspase-1 mediated by its prodomain. *J Biol Chem* 1998;273:23621-23624.
139. Zhivotovsky B, Samali A, Gahm A, Orrenius S. Caspases: their intercellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Diff* 1999;6:644-651.
140. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bertz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Kramer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/Apo-1) death inducing signaling complex. *Cell* 1996;85:817-827.
141. Yang X, Chang HY, Baltimore D. Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Molec Cell* 1998;1:319-325.
142. Martin DA, Siegel RM, Zheng L, Lenardo MJ. Membrane oligomerization and cleavage activates caspase-8 (FLICE/MACH α -1) death signal. *J Biol Chem* 1998;273:4345-4349.
143. Stennike HR, Jurgenmeister JM, Shin H, Devaraux Q, Wolf BB, Yang X, Zhou Q, Ellerby HM, Bredesen D, Green GR, Reed JC, Froelich CJ, Salvesen GS. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem* 1998;273:2084-27090.
144. Cichocki T, Litwin LA, Mirecka J (red.). *Kompedium histologii*. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego. Kraków 2002. ss. 384.
145. Nomura Y. Neuronal apoptosis and protection. Effects of nitric oxide and endoplasmic reticulum related proteins. *Biol Pharm Bull* 2004;27:961-963.
146. Cain K, Brown DG, Langlais C, Cohen GM. Caspase activation involves the formation of apoptosome, a large (approximately 700kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem* 1999;274:22686-22692.

147. Cain K, Bratton SB, Langlais C, Walker G, Brown DG, Sun XM, Cohen GM. Apaf-1 oligomerizes into biological active approximately 70kDa and inactive approximately 1,4MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem* 2000 Mar 3;275(9):6067-6070
148. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed J, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 1999;144:281-292.
149. van de Craen M, Declercq W, van den Brande I, Fiers W, Vandenabeele P. The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis. *Cell Death Diff* 1999;6:1117-1124.
150. Bras M, Queenan B, Susin SA. Programmed Cell Death via mitochondria: different models of dying. *Biochem* 2005;70:284-293.
151. Green DR. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 2000;102:1-4.
152. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000;6:513-519.
153. Huang DC, Strasser A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 2000;103:839-842.
154. Oltavi ZN, Milliman GL, Krosmeier SJ. Bcl-2 heterodimers in vivo with a conserved homolog Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-619.
155. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997;139:1281-1292.
156. Wei MC, Lindstein T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Krosmeier SJ. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerize BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 2000;14:2060-2071.
157. Saito M, Krosmeier SJ, Schlesinger PH. BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol* 2000;2:553-555.
158. Wei MC, Wei-Xing Z, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Krosmeier SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001;292:727-730.
159. Klekar A, Thompson CB. Bcl-2 family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* 1998;8:324-330.
160. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999;399:483-487.
161. Minn AJ, Valez P, Schendel SL, Liang M, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M, Thompson CB. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 1997;385:353-357.
162. Newmeyer DD, Bossy-Wetzel E, Kluck RM, Wolf BB, Beere HM, Green DR. Bcl-x(L) does not inhibit the function of Apaf-1. *Cell Death Diff* 2000;7:402-407.
163. Fleury C, Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 2000;84:131-141.
164. Simon HV, Haj-Yehia A, Levi-Strauss F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 2000;5:415-418.
165. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1308-1312.

166. Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* 2002;192:131-137.
167. Cote J, Ruiz-Carrillo A. Priors for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science* 1993;261:765-769.
168. Seo YW, Park SY, Yun CW, Kim TH. Differential efflux of mitochondrial endonuclease G by hNoxa and tBid. *J Biochem Mol Biol* 2006;39:556-559.
169. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic Dnase when released from mitochondria. *Nature* 2001;412:95-99.
170. Susin SA, Dauglas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Cotantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothes G, Mak TW, Penninger J, Earnhaw WC, Kroemer G. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med*. 2000;192:571-580.
171. Yang SH, Chien CM, Lu MC, Lin YH, Hu XW, Lin SR. Up-regulation of Bax and endonuclease G, and down-modulation of Bcl-x(L) involved in cardiotoxin III-induced apoptosis in K562 cells. *Exp Mol Med* 2006;38:435-444.
172. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (red.). *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2005; ss.1072.
173. Katayama T, Imaizumi K, Manabe T, Hitomi J, Kudo T, Tohyama M. Induction of neuronal death by ER stress in Alzheimer's disease. *J Chem Neuroanat* 2004;28:67-78.
174. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational control. *Genes Dev* 1999;13:1211-1233.
175. Takuma K, Yan S, Stern DM, Yamada K. Mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress and apoptosis in Alzheimer's disease. *J Pharmacol Sci* 2005;97:312-316.
176. Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 2004;430:31-639.
177. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:11-21.
178. Jaattela M. Multiple cell death pathways as regulator of tumor initiation and progression. *Oncogene* 2004;23:2746-2756.
179. Jimbo A, Fujiata E, Kouroku Y. ER stress induced caspase-8 activation stimulating cytochrome c release and caspase 9 activation. *Exp Cell Res* 2003;283:156-166.
180. Annis MG, Yethon JA, Leber B, Andrews DW. There is more to life and death than mitochondria: Bcl-2 proteins and the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644:115-123.
181. Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1010:186-194.
182. Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, del Rio G, Bredsen DE, Ellerby HM. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death programme. An Apaf-1 independent intrinsic pathway. *J Biol Chem* 2002;277:21836-21842.
183. Hu Q, Cang J, Tao L, Yan G, Xie M, Wang Z. Endometriosis and pelvic pain. *Fertil Steril* 1993;60:950-951.

184. Brun DP, Gebel HM, Murana A, Rotsztein D, Rana N, Rotman C. Differential endometrial cell proliferation in response to peripheral blood monocytes, peritoneal macrophages and macrophage derived cytokines in patients with endometriosis. Proceedings of the 48th Annual Meeting of the American Fertility Society. New Orleans, 1992.
185. Fukushima K, Kikuchi J, Koshiba S, Kigawa T, Kuroda Y, Yokoyama S. Solution structure of the DFF-C domain of DFF45/ICAD. A structural basis for the regulation of apoptotic DNA fragmentation. *J Mol Biol* 2002;321:317-327.
186. Inohara N, Koseki T, Chen S, Benedict MA, Nunez G. Identification of regulatory and catalytic domains in the apoptosis nuclease DFF40/CAD. *J Biol Chem* 1999;274:270-274.
187. Zgou P, Lugovskoy AA, McCarty JS, Li P, Wagner G. Solution structure of DFF40 and DFF45 N-terminal domain complex and mutual chaperone activity of DFF40 and DFF45. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:6051-6055.
188. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998;391:43-50.
189. Liu X, Li P, Widlak P, Zou H, Luo X, Garrard WT, Wang X. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:8461-8466.
190. Toh SY, Wang X, Li P. Identification of the nuclear factor HMG2 as an activator for DFF nuclease activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;250:598-601.
191. Widlak P, Lanuszevska J, Cary RB, Garrard WT. Subunit structures and stoichiometries of human DNA fragmentation factor proteins before and after induction of apoptosis. *J Biol Chem* 2003;278:26915-26922.
192. Samejima K, Earnshaw WC. Differential localization of ICAD-L and ICAD-S in cells due to removal of a C-terminal NLS from ICAD-L by alternative splicing. *Exp Cell Res* 2000;255:314-320.
193. Chen D, Stetler RA, Cao G, Pei W, O'Horo C, Yin XM, Chen J. Characterization of the rat DNA fragmentation factor 35/Inhibitor of caspase-activated DNase (Short form). The endogenous inhibitor of caspase-dependent DNA fragmentation in neuronal apoptosis. *J Biol Chem* 2000;275:38508-38517.
194. Gu J, Dong RP, Zhang C, McLaughlin DF, Wu MX, Schlossman SF. Functional interaction of DFF35 and DFF45 with caspase-activated DNA fragmentation nuclease DFF40. *J Biol Chem* 1999;274:20759-20762.
195. Zhang J, Wang X, Bove KE, Xu M. DNA fragmentation factor 45-deficient cells are more resistant to apoptosis and exhibit different dying morphology than wild-type control cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 37450-37454.
196. Boulares AH, Zoltoski AJ, Yakovlev A, Xu M, Smulson ME. Roles of DNA fragmentation factor and poly(ADP-ribose) polymerase in an amplification phase of tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:38185-38192.

197. Charrier L, Jarry A, Toquet C, Bou-Hanna C, Chedorge M, Denis M, Vallette G, Labois CL. Growth phase-dependent expression of ICAD-L/DFF45 modulates the pattern of apoptosis in human colonic cancer cells. *Cancer Res* 2002;62:2169-2174.
198. Jarry A, Charrier L, Bou-Hanna C, Devilder MC, Crussaire V, Denis MG, Vallette G, Labois CL. Position in cell cycle controls the sensitivity of colon cancer cells to nitric oxide-dependent programmed cell death. *Cancer Res* 2004; 64: 4227-4231.
199. Birks EJ, Yacoub MH, Burton PS, Owen V, Pomerance A, O'Halloran A, Banner NR, Khaghani A, Latif N. Activation of apoptotic and inflammatory pathways in dysfunctional donor hearts. *Transplantation* 2000;70:1498-1506.
200. von Rango U, Alfer J, Kertschanska S, Kemp B, Muller-Newen G, Heinrich PC, Beier HM, Classen-Linke I. Interleukin-11 expression: its significance in eutopic and ectopic human implantation. *Mol Hum Reprod* 2004;10:783-792.
201. Classen-Linke I, Muller-Newen G, Heinrich PC, Beier HM, von Rango U. The cytokine receptor gp130 and its soluble form are under hormonal control in human endometrium and decidua. *Mol Hum Reprod* 2004;10:495-504.
202. Harada T, Kaponis A, Iwabe T, Taniguchi F, Makrydimas G, Sofikitis N, Paschopoulos M, Paraskevidis E, Terakawa N. Apoptosis in human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod Update* 2004;10:29-38.
203. Banaś T, Wicherek Ł, Klimek M, Skotniczny K, Migdał M, Homa T. DFF45 level in ovarian simple cysts compared with normal ovarian tissue. *Centr Eur J Immunol* 2005;30 suppl 1:2-3.
204. Tanaka T. Effects of anti-endometriotic therapies on Fas-mediated endometrial epithelial apoptosis. *Oncol Rep* 2005;13:1235-1239.
205. Koh EAT, Illinworth PJ, Duncan WC, Critchley HOD. Immunolocalization of bcl-2 protein in human endometrium in the menstrual cycle and simulated early pregnancy. *Hum Reprod* 1995;10:1557–1562.
206. Tabibzadeh S, Zupi E, Babaknia A, Liu R, Marconi D, Romanini C. Site and menstrual cycle-dependent expression of proteins of the tumor necrosis factor (TNF) receptor family, and BCL-2 oncoprotein and phase-specific production of TNF alpha in human endometrium. *Hum Reprod* 1995;10:277–286.
207. Garcia-Velasco JA, Arici A, Naftolin F, Zreick T, Mor G. Macrophage-derived growth factors regulate FasL expression in endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 1998;5:642–650.
208. Song J, Rutherford T, Naftolin F, Brown S, Mor G. Hormonal regulation of apoptosis and the Fas and Fas ligand system in human endometrial cells. *Mol Hum Reprod* 2002;8:447–455.
209. Yamashita H, Otsuki Y, Ito Y, Matsumoto K, Ueki K, Ueki M. Fas ligand, fas antigen and bcl-2 expression in human endometrium during menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 1999;5:358-364.

210. Dauforinet C, Uzan C, Fauvet R, Corteza A, Siffroi JP, Darai E. Expression of apoptosis-related proteins in peritoneal, ovarian and colorectal endometriosis. *J Reprod Immunol* 2006;70:151-162.
211. Rodgers WH, Matrisian LM, Giudice LC, Dsupin B, Cannon P, Svitek C, Gorstein F, Osteen KG. Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J Clin Invest* 1994;94:946-953.
212. Salamonsen LA, Zhang J, Brasted M. Leukocyte networks and human endometrial remodelling. *J Reprod Immunol* 2002;57:95-108.
213. Watabene H, Kanzaki H, Narukawa S, Inoue T, Katsuragawa H, Kaneko Y, Mori T. Bcl-2 and Fas expression in eutopic and ectopic human endometrium during the menstrual cycle in relation to menstrual cell apoptosis. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:360-368.
214. Otsuki Y. Apoptosis in human endometrium: apoptotic detection methods and signaling. *Med Electron Microsc* 2001;34:166-173.
215. Runic R, Lockwood CJ, LaChapelle L, Dipasquale B, Demopoulos RI, Kumar A, Guller S. Apoptosis and Fas expression in human fetal membranes. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:660-666.
216. Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 1997;387:773-776.
217. Diebold J, Barretton G, Felchner M, Meier W, Dopfer K, Schmidt M, Lohrs U. Bcl-2 expression, p53 accumulation and apoptosis in ovarian carcinoma cell lines. *Am J Clin Pathol* 1996;105:341-349.
218. Lincz L. Deciphering the apoptotic pathway: all roads lead to death. *Immunol Cell Biol* 1998;76:1-19.
219. Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke R. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Science* 1995;377:630-632.
220. Griffith T, Brunner T, Fletcher S, Gree D, Ferguson T. Fas ligand induces apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995;270:1187-1192.
221. Mor G, Gutierrez L, Eliza M, Kahayaoglu F, Arici A. Fas-Fas ligand system-induced apoptosis in human placenta and gestational trophoblastic disease. *Am J Reprod Immunol* 1998;39:89-94.
222. Wicherek L, Dutsch-Wicherek M, Mak P, Klimek M. The role of RCAS1 and oxiocinase in immune tolerance during pregnancy. *Fetal Diagn Ther* 2005;20:420-425.
223. Wicherek L, Popiela TJ, Galazka K, Dutsch-Wicherek M, Oplawski M, Basta A, Klimek M. Metallothionein and RCAS1 expression in comparison to immunological cells activity in endometriosis, endometrial adenocarcinoma and endometrium according to menstrual cycle changes. *Gynecol Oncol* 2005;99:622-630.
224. Wicherek L, Klimek M, Galazka K, Obrzut B. Cycle dependent RCAS1 expression with respect to the immune cells presence and activity. *Neuro Endocrinol Lett* 2006;27:645-650.
225. Rieger L, Honig A, Sutterlin M, Kapp M, Dietl J, Ruck P, Kammerer U. Antigen-presenting cells in human endometrium during the menstrual cycle compared to early pregnancy. *J Soc Gynecol Investig* 2004;11:488-493.

226. Salamonsen LA, Woolley DE. Menstruation: induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells. *J Reprod Immunol* 1999;44:1-27.
227. Pituch-Noworolska A, Hajto B, Balwierz W, Klusk K. Induction of apoptosis and bcl-2 expression in acute lymphoblastic leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma in children. *Haematologia (Budap)* 2001;31:191-207.
228. Hameed A, Fox WM, Kurman RJ, Hurban RH, Podack ER. Perforine expression in endometrium during menstrual cycle. *Int J Gynecol Pathol* 1995;14:143-150.
229. McCann SE, Freudenheim JL, Darrow SL, Batt RE, Zielezny MA. Endometriosis and body fat distribution. *Obstet Gynecol* 1993;82:545-549.
230. Cramer DW, Wilson E, Stillman RJ, Berger MJ, Beliste S, Schiff I, Albrecht B, Gibson M, Stadel BV, Schoenbaum SC. The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking and exercise. *JAMA* 1986;255:1904-1908.
231. Darrow SL, Vena JE, Batt RE, Zielezny MA, Michalek AM, Selman S. Menstrual cycle characteristics and the risk of endometriosis. *Epidemiology* 1993;4:135-142.
232. Hemmings R, Rivard M, Olive DL, Polquin-Fieury J, Gagn D, Hugo P, Grosselin D. Evaluation of risk factors associated with endometriosis. *Fertil Steril* 2004;81:1513-1521.
233. Hediger ML, Hartnett HJ, Buck-Luis GM. Association of endometriosis with body size and figure. *Fertil Steril* 2005;84:1366-1374.
234. Missmer AS, Hankinson SE, Spiegelman D, Barbieri RL, Marshall LM, Hunter DJ. Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic anthropometric and lifestyle factors. *Am J Epidemiol* 2004;160:784-796.
235. Velebli P, Wingo PA, Xia Z, Wilcox LS, Peterson HB. Rate of hospitalization for gynecologic disorders among reproductive-age-women in the United States. *Obstet Gynecol* 1995;86:764-769.

Indeks skrótów

17 β -HSD-2 - dehydrogenaza 17- β -hydroksysteroidów typ 2

ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) – cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał

AFS (*American Fertility Society*) – Amerykańskie Towarzystwo Płodności

AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) – czynnik indukujący apoptozę

Apaf-1 (*protease-activating factor*) – czynnik aktywacji proteaz

CAD (*Caspase Activated DNase*) – DNaza aktywowana kaspazą; synonim DFF40

CARD (*CAspase Recruitment Domain*) – domena rekrutująca kaspaz

c-IAP (*cellular Inhibitors of Apoptosis*) – komórkowy inhibitor apoptozy, wyróżniono typ 1 i typ 2

CTL (*Cytotoxic T Lymphocytes*) - limfocyty cytotoksyczne T

dATP – kwas diadenozyno-trójfosforanowy

DAXX (*death domain associated protein*) – białka związane z domenami śmierci

DD (*Death Domain*) – domeny śmierci

DED (*Death Executive Domain*) – wykonawcza domena śmierci

DFF35 (*DNase Fragmentation Factor*) - czynnik fragmentacji DNA o masie cząsteczkowej 35kDa

DFF40 (*DNase Fragmentation Factor*) - czynnik fragmentacji DNA o masie cząsteczkowej 40kDa

DFF45 (*DNase Fragmentation Factor*) - czynnik fragmentacji DNA o masie cząsteczkowej 45kDa

DISC (*Death Initiated Signalling Complex*) – kompleks sygnałowy inicjujący śmierć komórki

DNA (*Deoxynucleic Acid*) – kwas dezoksyrybonukleinowy

DR (*Death Receptor*) – receptor śmierci

E₁ – estron

E₂ – estriol

EndoG (*Endonuclease G*) – endonukleaza G

ER (*Endoreticulum*) – retikulum cytoplazmatyczne

FADD (*Fas Associated Death Domain*) - domeny śmierci związane z Fas; synonim MORT1

Fas – błonowy receptor dla czynników z rodziny TNF; synonimy CD95; APO-1

FasL (*Fas Ligand*) – ligand białka Fas

FLICE (*FADD-like interleukine-1 β -convering enzyme*) – kaspaza-8

FLIP – (*FLICE-inhibitory proteins*) – białka hamujące kaspazę-8; należą tu: forma pełnowymiarowa FLIP(L) i forma krótka FLIP(S)

FSH (*Follicle-Stimulating Hormone*) - folikulostymulina

GF (*Growth Factor*) – czynnik wzrostu

GnRH (*Gonadotropin-Releasing Hormone*) - gonadoliberyna

IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*) – białka inhibitory apoptozy

ICAD-L (*Inhibitor of Caspase Activated DNase - Long*) – patrz DFF45

ICAD-S – (*Inhibitor of Caspase Activated DNase - Short*) - patrz DFF35

I κ -B (*I κ -B, inhibitory subunit of NF- κ B*) - podjednostka hamująca NF- κ B

IKK (*I κ B Kinase*) – kinaza podjednostki hamującej NF- κ B

IUD (*Intrauterine Device*) – wkładka wewnątrzmaciczna

IUD(L) (*Intrauterine Device with Levonogestrel*) – wkładka wewnątrzmaciczna uwalniająca lewonogestrel

LH (*Luteinizing Hormone*) – luteotropina

LT α (*lymphotoxin α*) – limfotoksyna α

memTNF (*membrane TNF*) – czynnik martwicy nowotworu związany z błoną komórkową

MMP (*Metalloproteases*) – metaloproteinazy

MPX (*Medroxyprogesterone*) – medroksyprogesteron

NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*) – jądrowy czynnik kappa B

NGF-R (*Nerve Growth Factor Receptor*) – receptor dla czynnika wzrostu nerwów

NK (*Natural Killers*) – limfocyty NK

NSAIDs (*NonSteroidal Antiinflammatory Drugs*) – niesteroidowe leki przeciwzapalne

OC (*Oral Contraception*) – antykoncepcja doustna

PLAD (*Preligand Binding Assembly Dmain*) – połączenie domen TNF-R tworzące preligand

PR (*Progesterone Receptor*) – receptor progesteronu; wyróżniono formę A i B

RCE (*Revised Classification of Endometriosis*) – zrewidowana klasyfikacja endometriozy

RIP (*Receptor Interacting Protein*) – białko oddziałujące z receptorem

RNA (*Ribonucleotid Acid*) – kwas rybonukleinowy

ROS (*Reactive Oxygen Species*) – reaktywne formy tlenu

sFasL (*soluble Fas Ligand*) – rozpuszczalna forma ligandu dla białka Fas

SODD (*Silencer of Death Domains*) – inaktywator domen śmierci

sTNF (*soluble TNF*) – rozpuszczalna forma czynnika martwicy nowotworu

TACE (*TNF Alfa Converting Enzyme*) – enzym konwertujący czynnik martwicy nowotworu α

TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*) – czynnik martwicy nowotworu α

TNF-R (*Tumor Necrosis Factor Receptor*) – receptor czynnika martwicy nowotworu

TRADD (*TNF α Receptor Associated Death Domain*) – domena śmierci związana z TNF α

TRAF2 (*TNF α Receptor Associated Factor 2*) – białko adapterowe drugiego typu związane z TNF α

UPR (*Unfolded Protein Response*) – odpowiedź przystosowawcza endopłazmatyku na syntezę nieprawidłowych białek (np. β -Amyloidu)

USG-TV (*Transvaginal Ultrasound*) – przezpochwowe badanie ultrasonograficzne.

VDAC (*voltage-dependent anion channel*) – zależne od potencjału kanały obecne w błonach mitochondrialnych.

Spis rycin

Rycina 1	Torbiel endometrialna jajnika lewego (TEJL).	str. 8
Rycina 2	Ognisko endometriozy (OE) otrzewnej ściennej.	str. 8
Rycina 3	Endometrioza jajnikowa - preparat histopatologiczny (powiększenie x40).	str. 8
Rycina 4	Endometrium sekrecyjne - preparat histopatologiczny (powiększenie x40).	str. 8
Rycina 5	Schemat postępowania terapeutycznego u kobiet z endometriozą. <i>NSAIDs</i> -niesteroidowe leki przeciwzapalne; <i>OC</i> -doustna antykoncepcja dwuskładnikowa; <i>MPX</i> -medroksyprogesteron w iniekcji; <i>IUD(L)</i> -wkładka domaciczna uwalniająca lewonogestrel; <i>GnRH</i> -gonadoliberyna.	str. 10
Rycina 6	Charakterystyka badanej grupy kobiet pod względem rozpoznania endometriozy.	str. 26
Rycina 7	Immunolokalizacja białka DFF45 w fazie proliferacyjnej w endometrium zdrowych kobiet (powiększenie x20).	str. 38
Rycina 8	Immunolokalizacja białka DFF45 w fazie sekrecyjnej w endometrium zdrowych kobiet (powiększenie x20).	str. 38
Rycina 9	Immunolokalizacja białka DFF45 w tkance endometriozy jajnikowej (powiększenie x20).	str. 39
Rycina 10	Immunolokalizacja białka DFF45 w prawidłowym jajniku zdrowej kobiety (powiększenie x10).	str. 39
Rycina 11	Immunolokalizacja białka DFF45 w prawidłowy jajniku zdrowej cyklu (fragment Ryciny 10 w powiększeniu x20).	str. 39
Rycina 12	Blot będący wynikiem dwurzędowej reakcji immunodetekcyjnej. Prążek o masie 45kD odpowiada badanemu białku DFF45, natomiast prążek o masie 42kD odpowiada białku kontrolnemu β -Aktynie.	str. 40
Rycina 13	Histogram wartości względnej ilości białka DFF w endometrium w grupie kobiet bez endometriozy.	str. 41
Rycina 14	Histogram wartości względnej ilości β -Aktyny w endometrium w grupie kobiet bez endometriozy.	str. 41
Rycina 15	Porównanie mediany wartości względnej ekspresji białka DFF45 i mediany wartości względnej ekspresji β -Aktyny w endometrium proliferacyjnym i endometrium sekrecyjnym kobiet bez endometriozy.	str. 43
Rycina 16	Histogram wartości względnej ilości białka DFF w tkance jajnikowej w grupie kobiet bez endometriozy.	str. 44
Rycina 17	Histogram wartości względnej ilości białka β -Aktyny w tkance jajnikowej w grupie kobiet bez endometriozy.	str. 44
Rycina 18	Porównanie ekspresji białka DFF45 i β -Aktyny w zdrowej tkance jajnika w I i w II fazie cyklu menstruacyjnego.	str. 46
Rycina 19	Histogram wartości względnej ilości białka DFF w endometriozie jajnikowej.	str. 47
Rycina 20	Histogram wartości względnej ilości β -Aktyny w endometriozie jajnikowej.	str. 47
Rycina 21	Porównanie mediany względnej ilości białka DFF45 i β -Aktyny w ogniskach endometriozy a endometrium proliferacyjnym i sekrecyjnym kobiet bez endometriozy.	str. 49

Rycina 22	Porównanie średniej względnej ilości białka DFF45 i średniej względnej ilości β -Aktyny w ogniskach endometriozy i tkance jajnikowej w I fazie i w II fazie cyklu menstruacyjnego u kobiet bez endometriozy	str. 51
Rycina 23	Porównanie średniej względnej ilości białka DFF45 i średniej względnej ilości β -Aktyny w powiązanych próbkach tkankowych endometriozy jajnikowej pobranej w fazie proliferacyjnej i sekrecyjnej cyklu menstruacyjnego.	str. 52
Rycina 24	Ocena średniej względnej ilości białka DFF45 w zależności od stopnia endometriozy ocenianej śródoperacyjnie według skali RCE (średnia $\pm$ oczekiwane średnie brzegowe).	str. 53
Rycina 25	Ocena średniej względnej ilości β -Aktyny w zależności od stopnia endometriozy ocenianej śródoperacyjnie według skali RCE (średnia $\pm$ oczekiwane średnie brzegowe).	str. 53
Rycina 26	Korelacja względnej ilości białka DFF45 ze stopniem endometriozy ocenianej śródoperacyjnie według skali RCE (--- 95% przedział ufności).	str. 54
Rycina 27	Korelacja względnej ilości β -Aktyny ze stopniem endometriozy ocenianej śródoperacyjnie według skali RCE (--- 95% przedział ufności).	str. 54

Spis tabel

Tabela 1	Przyczyny wyłączenia pacjentek z analizy.	str. 25
Tabela 2	Charakterystyka grupy kobiet z endometriozą pod względem schorzeń przewlekłych i przeszłości operacyjnej.	str. 27
Tabela 3	Skala oceny endometriozy według Amerykańskiego Towarzystwa Płodności.	str. 28
Tabela 4	Charakterystyka grupy kobiet bez endometriozy pod względem schorzeń przewlekłych i przeszłości operacyjnej.	str. 29
Tabela 5	Składniki kompleksów immunodetekcyjnych użytych w przeprowadzonych doświadczeniach.	str. 33
Tabela 6	Porównanie kliniczne pacjentek z endometriozą i kobiet bez endometriozy.	str. 37
Tabela 7	Liczebność badanych próbek tkankowych.	str. 40
Tabela 8	Względna ilość białka DFF45 oraz β -Aktyny w endometrium proliferacyjnym zdrowych kobiet (dane przedstawione są kolejno w porządku rosnącym według oznaczenia protokołu).	str. 42
Tabela 9	Względna ilość białka DFF45 oraz β -Aktyny w endometrium sekrecyjnym zdrowych kobiet (dane przedstawione są kolejno w porządku rosnącym według oznaczenia protokołu).	str. 42
Tabela 10	Porównanie względnej ilości białka DFF45 i β -Aktyny w endometrium proliferacyjnym i endometrium sekrecyjnym zdrowych kobiet.	str. 43
Tabela 11	Względna ilość białka DFF45 oraz β -Aktyny w prawidłowej tkance jajnika w I fazie cyklu jajnikowego (dane przedstawione są kolejno w porządku rosnącym według oznaczenia protokołu).	str. 45
Tabela 12	Względna ilość białka DFF45 oraz β -Aktyny w prawidłowej tkance jajnika w II fazie cyklu jajnikowego (dane przedstawione są kolejno w porządku rosnącym według oznaczenia protokołu).	str. 45
Tabela 13	Porównanie względnej ilości białka DFF45 i β -Aktyny w prawidłowej tkance jajnikowej pobranej w I i II fazie cyklu menstruacyjnego.	str. 46
Tabela 14	Względna ilość białka DFF45 oraz β -Aktyny w endometriozie jajnikowej (dane przedstawione są kolejno w porządku rosnącym według oznaczenia protokołu).	str. 48
Tabela 15	Porównanie mediany względnej ilości białka DFF45 i β -Aktyny w endometriozie jajnikowej, endometrium proliferacyjnym i sekrecyjnym kobiet bez endometriozy.	str. 49
Tabela 16	Porównanie średniej względnej ilości białka DFF45 i β -Aktyny w endometriozie jajnikowej i w zdrowej tkance jajnika.	str. 50
Tabela 17	Porównanie średniej względnej ilości białka DFF45 i średniej względnej ilości β -Aktyny w endometriozie jajnikowej pobranej w fazie proliferacyjnej i sekrecyjnej cyklu miesięczkowego.	str. 52
Tabela 18	Porównanie średniej względnej ilości białka DFF45 i średniej względnej ilości β -Aktyny w tkance endometriotycznej w zależności od stopnia zaawansowania endometriozy.	str. 53
Tabela 19	Analiza korelacji względnej ilości DFF45 i β -Aktyny ze stopniem zaawansowania endometriozy.	str. 54

Aneks 1. Charakterystyka kliniczna grupy kobiet z endometriozą (dane przedstawiono w porządku rosnącym według numerów protokołów).

Lp.	Nr protokołu	Wiek (lata)	Wiek menarche (lata)	Długość cyklu (dni)	Regularność cyklu	Długość miesiączki (dni)	Nasilenie krwawienia miesiączkowego	Dolegliwość bólowa w trakcie miesiączki	Liczba ciąż	Liczba porodów	Liczba poronień
1	K-9	41	13	27	regularne	5	mierne	niebolesne	0	0	0
2	K-10	51	12	32	regularne	6	mierne	niebolesne	2	2	0
3	K-11	47	12	31	nieregularne	5	obfite	bolesne	1	1	0
4	K-12	35	14	28	regularne	6	obfite	bolesne	0	0	0
5	K-13	53	13	30	regularne	7	obfite	bolesne	1	1	0
6	K-14	33	13	31	regularne	7	obfite	bolesne	0	0	0
7	K-15	40	13	26	regularne	5	obfite	bolesne	0	0	0
8	K-16	41	14	30	regularne	5	obfite	bolesne	1	1	0
9	K-20	42	12	28	regularne	6	skąpe	niebolesne	2	2	0
10	K-23	38	14	32	nieregularne	5	obfite	bolesne	1	1	0
11	K-26	49	15	28	regularne	7	obfite	bolesne	2	2	0
12	K-31	27	13	28	regularne	4	obfite	bolesne	0	0	0
13	K-32	31	12	31	regularne	6	obfite	bolesne	1	1	1
14	K-33	34	14	27	nieregularne	5	skąpe	niebolesne	2	1	1
15	K-34	36	11	30	nieregularne	6	mierne	bolesne	2	2	0
16	S-1	46	17	28	regularne	6	obfite	bolesne	1	1	0
17	S-14	47	12	30	nieregularne	5	obfite	niebolesne	1	1	0
18	S-24	46	17	30	regularne	3	skąpe	bolesne	2	2	0
19	S-30	48	14	28	regularne	6	obfite	bolesne	2	2	0
20	S-31	45	14	27	regularne	7	obfite	bolesne	1	0	1
21	S-35	43	15	28	regularne	5	mierne	niebolesne	2	2	0
22	S-36	46	12	31	regularne	7	obfite	bolesne	0	0	0
23	S-37	42	14	24	regularne	4	mierne	bolesne	1	1	0
24	S-38	41	13	27	regularne	5	obfite	bolesne	3	3	0
25	S-43	48	12	28	regularne	4	mierne	niebolesne	5	5	0
26	S-48	44	12	31	regularne	5	mierne	niebolesne	2	2	0

Aneks 2 (cz. 1). Charakterystyka kliniczna grupy kobiet bez endometriozy (dane rekordów od 1 do 30 przedstawiono w porządku rosnącym według numerów protokołów). Przyczyny wyłączenia z badania przedstawia tabela 1 strona 25.

Lp.	Nr protokołu	Wiek (lata)	Wiek menarche (lata)	Długość cyklu (dni)	Regularność cyklu	Długość miesiączki (dni)	Nasilenie krwawienia miesięczkowego	Dolegliwości bólowe w trakcie miesiączki	Liczba ciąż	Liczba porodów	Liczba poronień
1	K-1	46	14	31	regularne	3	mierne	bolesne	2	1	1
2	K-2	47	15	32	nieregularne	6	obfite	niebolesne	1	1	0
3	K-3	wyłączono z badania									
4	K-4	52	14	30	regularne	6	obfite	niebolesne	3	3	0
5	K-5	34	13	34	nieregularne	6	obfite	bolesne	0	0	0
6	K-6	46	16	24	regularne	4	obfite	niebolesne	2	1	1
7	K-7	wyłączono z badania									
8	K-8	44	12	26	regularne	7	obfite	bolesne	0	0	0
9	K-17	35	14	30	regularne	7	obfite	bolesne	0	0	0
10	K-18	36	12	26	nieregularne	7	obfite	niebolesne	0	0	0
11	K-19	wyłączono z badania									
12	K-21	wyłączono z badania									
13	K-22	42	12	29	nieregularne	4	obfite	niebolesne	1	1	0
14	K-24	wyłączono z badania									
15	K-25	33	13	28	nieregularne	6	mierne	bolesne	0	0	0
16	K-27	wyłączono z badania									
17	K-28	wyłączono z badania									
18	K-29	45	15	26	regularne	12	obfite	niebolesne	2	1	1
19	K-30	38	12	28	regularne	6	mierne	niebolesne	2	2	0
20	S-2	42	13	28	regularne	7	mierne	niebolesne	2	2	0
21	S-3	47	14	31	nieregularne	5	obfite	niebolesne	2	2	0
22	S-4	49	16	29	regularne	5	mierne	niebolesne	6	5	1
23	S-5	34	14	27	regularne	8	obfite	bolesne	3	3	0
24	S-6	47	14	28	regularne	5	mierne	niebolesne	4	4	0
25	S-7	46	13	30	nieregularne	7	mierne	niebolesne	2	2	0
26	S-8	49	14	28	regularne	5	obfite	niebolesne	2	2	0
27	S-9	45	15	26	regularne	4	obfite	niebolesne	2	2	0
28	S-10	41	14	28	regularne	5	mierne	niebolesne	1	1	0
29	S-11	45	15	27	regularne	4	obfite	bolesne	0	0	0
30	S-12	44	12	33	nieregularne	8	obfite	bolesne	4	4	0

Aneks 2 (cz. 2). Charakterystyka kliniczna grupy kobiet bez endometriozy (dane rekordów od 31 do 60 przedstawiono w porządku rosnącym według numerów protokołów). Przyczyny wyłączenia z badania przedstawia tabela 1 strona 25.

Lp.	Nr protokołu	Wiek (lata)	Wiek menarche (lata)	Długość cyklu (dni)	Regularność cyklu	Długość miesiączki (dni)	Nasilenie krwawienia miesięczkowego	Dolegliwości bólowe w trakcie miesiączki	Liczba ciąż	Liczba porodów	Liczba poronień
31	S-13	43	14	32	nieregularne	4	mierne	niebolesne	0	0	0
32	S-15	53	13	24	nieregularne	4	mierne	niebolesne	2	2	0
33	S-16	42	13	24	nieregularne	6	obfite	bolesne	4	3	1
34	S-17	35	14	29	regularne	8	obfite	bolesne	2	2	0
35	S-18	46	15	34	nieregularne	7	mierne	niebolesne	2	2	0
36	S-19	45	13	29	regularne	3	mierne	niebolesne	8	8	0
37	S-20	43	16	30	regularne	5	mierne	niebolesne	2	2	0
38	S-21	49	16	30	regularne	3	mierne	bolesne	2	2	0
39	S-22	39	14	29	regularne	5	obfite	niebolesne	3	2	1
40	S-23	wyłączono z badania									
41	S-25	49	12	27	regularne	4	mierne	niebolesne	4	4	0
42	S-26	49	15	30	regularne	3	obfite	niebolesne	3	3	0
43	S-27	50	12	26	regularne	3	obfite	niebolesne	2	2	0
44	S-28	43	13	26	regularne	5	mierne	bolesne	1	0	1
45	S-29	38	13	31	regularne	7	obfite	niebolesne	3	3	0
46	S-32	47	15	30	nieregularne	4	obfite	niebolesne	0	0	0
47	S-33	48	12	31	regularne	6	obfite	bolesne	3	2	1
48	S-34	41	16	29	regularne	5	mierne	niebolesne	1	1	0
49	S-39	38	15	28	regularne	7	mierne	bolesne	0	0	0
50	S-40	wyłączono z badania									
51	S-41	46	14	35	nieregularne	6	obfite	niebolesne	2	2	0
52	S-42	wyłączono z badania									
53	S-44	44	14	28	nieregularne	8	obfite	niebolesne	2	2	0
54	S-45	wyłączono z badania									
55	S-46	44	14	28	regularne	7	obfite	niebolesne	2	2	0
56	S-47	wyłączono z badania									
57	S-49	49	13	28	regularne	7	obfite	bolesne	2	2	0
58	S-50	38	14	31	nieregularne	5	obfite	bolesne	1	1	0
59	S-51	43	16	28	regularne	6	obfite	bolesne	1	1	0
60	S-52	45	12	29	nieregularne	4	obfite	niebolesne	1	1	0

Aneks 2 (cz. 3). Charakterystyka kliniczna grupy kobiet bez endometriozy (dane rekordów od 61 do 74 przedstawiono w porządku rosnącym według numerów protokołów). Przyczyny wyłączenia z badania przedstawia tabela 1 strona 25.

Lp.	Nr protokołu	Wiek (lata)	Wiek menarche (lata)	Długość cyklu (dni)	Regularność cyklu	Długość miesiączki (dni)	Nasilenie krwawienia miesiączkowego	Dolegliwości bólów w trakcie miesiączki	Liczba ciąż	Liczba porodów	Liczba poronień
61	S-53	42	12	28	regularne	6	skąpe	niebolesne	2	2	0
62	S-54	44	15	30	regularne	3	skąpe	bolesne	2	2	0
63	S-55	39	14	29	regularne	5	mierne	niebolesne	2	2	0
64	S-56	40	13	31	regularne	7	obfite	bolesne	0	0	0
65	S-57	42	12	27	nieregularne	5	skąpe	niebolesne	2	2	0
66	S-58	44	15	30	regularne	4	mierne	niebolesne	2	1	1
67	S-59	39	14	28	nieregularne	4	skąpe	niebolesne	3	2	1
68	S-60	45	16	28	regularne	3	mierne	bolesne	3	3	0
69	S-61	35	14	31	regularne	6	obfite	bolesne	1	1	0
70	S-62	36	12	27	nieregularne	5	obfite	niebolesne	0	0	0
71	S-63	45	13	32	regularne	4	skąpe	niebolesne	2	2	0
72	S-64	42	13	30	regularne	5	mierne	bolesne	0	0	0
73	S-65	42	12	29	nieregularne	4	obfite	niebolesne	1	1	0
74	S-66	53	14	27	regularne	3	mierne	niebolesne	2	2	0

Aneks 3



AMERYKANSKIE TOWARZYSTWO MEDYCYNY REPRODUKCYJNEJ ZREWIDOWANA KLASYFIKACJA ENDOMETRIOZY

Imię i nazwisko pacjenta _____ Data _____

Stopień I 1-5 punktów
Stopień II 6-15 punktów
Stopień III 16-40 punktów
Stopień IV > 40 punktów

Laparoskopia _____ Laparotomia _____ Zdjęcie _____

Rekomendowane postępowanie _____

Suma _____

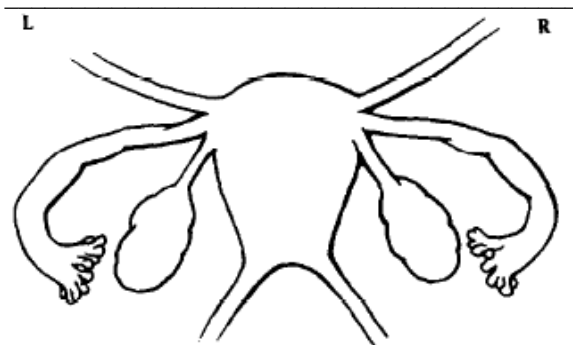
Prognoza _____

OTRZEWNA	ENDOMETRIOZA	<1cm	1-3cm	>3cm
	Powierzchnowa	1	2	4
	Głęboka	2	4	6
JAJNIK	R Powierzchnowa	1	2	4
	Głęboka	4	16	20
	L Powierzchnowa	1	2	4
	Głęboka	4	16	20
ZAJECIE ZATOKI DOUGLASA	Częściowe		Całkowite	
	4		40	
JAJNIK	ZROSTY	Obejmujące <1/3	Obejmujące 1/3 - 2/3	Obejmujące > 2/3
	R Delikatne	1	2	4
	Silne	4	8	16
	L Delikatne	1	2	4
	Silne	4	8	16
JAJOWÓD	R Delikatne	1	2	4
	Silne	4*	8*	16
	L Delikatne	1	2	4
	Silne	4*	8*	16

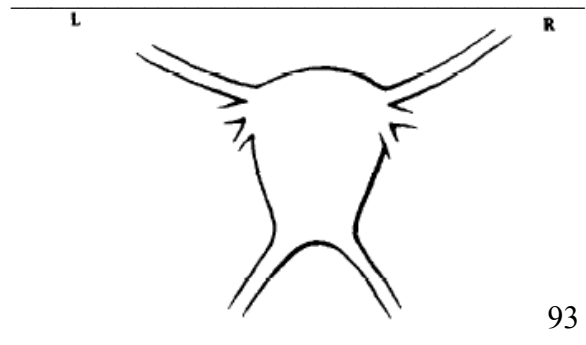
* jeżeli zrosty zamykają całkowicie szczepki lub obejmują cały jajowód należy przyporządkować 16 punktów

Należy odnotować makroskopowy wygląd powierzchniowych ognisk endometriozy jako czerwone [(R), czerwone, czerwono-różowe, ognisto-czerwone, podminowane pęcherzyki; płaskie pęcherzyki], białe [(W) ogniska na otrzewnej, żółto-brązowe] albo czarne [(B) czarne, złogi hemosyderyny, niebieskie]. Odnotuj udział procentowy każdego rodzaju zmian jako: R___%, W___% i B___%. Suma powinna wynosić 100%

Dodatkowa endometrioza _____



Dodatkowa patologia _____



PROTOKÓŁ DANYCH PACJENTA

K/S-XX (numer protokołu)		
Data zabiegu:	Rodzaj zabiegu:	
Wskazania do zabiegu:		
WYWIAD		
Pierwsza miesiączka wrż	Ostatnia miesiączka.....(dokładna data)	
Cykle (w ostatnim roku) regularne/nieregularne*, trwającedni.		
Miesiączki trwającedni.	Skąpe, miernie nasilone, obfite*	
	Bolesne/niebolesne*	
Rodziłarazy	Ostatni poród w roku	w tygodniu ciąży.....
Liczba dzieci.....	Przebieg porodów:	
Roniła.....razy	Ostatnie poronienie w roku..... wtygodniu ciąży.	Sztuczne/samoistne*
Leczona z powodu niepłodności	Leczona z pow. endometriozy	Antykoncepcja hormonalna
TAK / NIE*	TAK / NIE*	TAK / NIE*
Choroby przewlekłe:		
Inne zabiegi, operacje, urazy:		
Uwagi:		

* właściwe

ZAKREŚLIĆ