

2^η ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΑΡΕΤΑΙΕΙΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΡΕΑΤΣΑΣ

**«ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΣΤΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ
ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕ ΕΝΔΟΠΥΕΛΙΚΗ
ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ»**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΔΗΜ. ΚΕΛΛΑΡΗΣ

ΜΑΙΕΥΤΗΡΑΣ-ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2016

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΚΕΛΛΑΡΗΣ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ
ΕΠΑΓΓΕΛΜΑ
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ
ΤΗΛΕΦΩΝΑ
E-mail

11.04.1976
ΜΑΙΕΥΤΗΡΑΣ-ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ
ΕΓΓΑΜΟΣ, ΔΥΟ ΤΕΚΝΑ
210-6800569, 6972910304
dockellaris@hotmail.com

ΣΠΟΥΔΕΣ

- | | |
|-------------------------|---|
| 2013- | MSc στο τμήμα «Reproduction and Development», School of Clinical Science, Bristol University, UK |
| 2010-2012 | MSc στην Παθολογία Εγκυμοσύνης Υψηλού Κινδύνου, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών |
| 2008 | Κάτοχος Διπλώματος Εξειδίκευσης στη Διοίκηση και Οργάνωση Μονάδων Υγείας του Ανοιχτού Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών |
| 2005-
σήμερα | Υποψήφιος Διδάκτωρ Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών |
| 2003 | Diploma A.L.S.O. (Advanced Life Support in Obstetrics), U.K. |
| 2002 | Πτυχίο Ιατρικής, Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών |

ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΕΣ

- Επιστημονικός Συνεργάτης στα μαιευτήρια «ΜΗΤΕΡΑ» και «ΛΗΤΩ» του Ομίλου «ΥΓΕΙΑ»
- Επιστημονικός Συνεργάτης και Μέλος ΔΣ της Ε.Ε.Α.Ι. (Ελληνική Εταιρεία Αναπαραγωγικής Ιατρικής) του Κέντρου Εξωσωματικής «ΓΕΝΕΣΙΣ ΑΘΗΝΩΝ» και Μέλος της Συντονιστικής Επιτροπής του ΚΕΚ για την Ανθρώπινη Αναπαραγωγή
- Editor στην επιστημονική επιθεώρηση BMJ
- Μέλος της ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology)
- Μέλος του GFA (Global Fertility Academy)
- Μέλος του European Academy of Gynecological Surgery

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

2010-2012	Ειδ. Ιατρός Μαιευτικής 3 ^{ης} Πανεπιστημιακής, Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής, «ΑΤΤΙΚΟ»
2008-2014	Διευθυντής Πωλήσεων και Μάρκετινγκ, Επιστημονικός Σύμβουλος, και Αντιπρόεδρος Stem-Health Hellas S.A.
2005-2008	Επιστημονικός Συνεργάτης, «CRYO SAVE Ltd Balcanica»
2006-2008	Ειδ. Ιατρός Γυναικολογίας, Γυναικολογική κλινική, Νοσοκομείο «ΕΛΠΙΣ», Αθήνα
2005-2006	Ειδ. Ιατρός Χειρουργικής, Χειρουργική Κλινική, Νοσοκομείο Παίδων, «Αγλαΐα Κυριακού», Αθήνα
2003-2004	Στρατιωτικός Ιατρός στη Σχολή Ευελπίδων
2002-2003	Αγροτικός Ιατρός στο Νοσοκομείο Σάμου, «Άγιος Παντελεήμων»
2002	Τρίμηνη εκπαίδευση ως γενικός Ιατρός, Παθολογικό-Καρδιολογικό και Χειρουργικό Τμήμα, Νοσοκομείο «Άγιος Παντελεήμων», Σάμος

ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

2013	ISGE Certified Practitioner, The International Society of Gynecological Endocrinology
2012	ART & IVF – Μετεκπαίδευση στο πεδίο της Υπογονιμότητας – Μεθόδων Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο UZ Brussel
2012	Πιστοποιημένος Υπερηχογραφιστής, Κάτοχος Διπλώματος «Focus on Gynecology»

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά	Άριστο επίπεδο
Γαλλικά	Καλό επίπεδο

ΑΛΛΑ ΠΡΟΣΟΝΤΑ ΚΑΙ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ

Χειρισμός Windows, Word, Excel, Access, Power Point, Internet

Μέλος του Ιατρικού Συλλόγου Αθηνών

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΓΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1.** Γεώργιος Κρεατσάς, τ.Αντιπρύτανης, Καθηγητής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Διευθυντής της Β' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Αρεταιείου Νοσοκομείου
- 2.** Ευαγγελία Κουσκούνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιοπαθολογίας του Αρεταιείου Νοσοκομείου
- 3.** Εμμανουήλ Οικονόμου, Επίκουρος Καθηγητής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Εργαστήριο Βιοπαθολογίας του Αρεταιείου Νοσοκομείου

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Γεώργιος Κρεατσάς, τ.Αντιπρύτανης, Καθηγητής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Διευθυντής της Β' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Αρετাইείου Νοσοκομείου
2. Ευαγγελία Κουσκούνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιοπαθολογίας του Αρετাইείου Νοσοκομείου
3. Εμμανουήλ Οικονόμου, Επίκουρος Καθηγητής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Εργαστήριο Βιοπαθολογίας του Αρετাইείου Νοσοκομείου
4. Γεώργιος Χριστόδουλακος αναπληρωτής καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών
5. Κωνσταντίνος Πάνουλης αναπληρωτής καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών
6. Μαριάννα Πολίτου αναπληρωτρια καθηγήτρια Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών
7. Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Μοριακής Διάγνωσης, Εργαστήριο Βιοπαθολογίας του Αρετাইείου Νοσοκομείου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αισθάνομαι την ανάγκη και την ηθική υποχρέωση να ευχαριστήσω θερμά όλους εκείνους που συνέβαλαν, στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Τον κύριο Γεώργιο Κρεατσά, Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και Διευθυντή της Β' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Αρεταιείου Νοσοκομείου, για την ανάθεση της παρούσας διατριβής, αλλά και την επιστημονική εποπτεία, καθοδήγηση και γόνιμη κριτική καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της.

Την κυρία Ευαγγελία Κουσκούνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιοπαθολογίας του Αρεταιείου Νοσοκομείου για την καθοριστική συμβολή της στην προσπάθεια ανεύρεσης κατάλληλου και ικανού αριθμού ασθενών. Το ενδιαφέρον της και η συμπαράστασή της στην εκπόνηση αυτής της μελέτης υπήρξαν πολύτιμα και της είμαι ευγνώμων.

Τον κύριο Εμμανουήλ Οικονόμου, Επίκουρο Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Εργαστήριο Βιοπαθολογίας του Αρεταιείου Νοσοκομείου για την καθοριστική συμβολή του στην εκτέλεση των πειραμάτων, την ενθάρρυνση, την ευγένεια και τη στήριξή του.

Το προσωπικό του Εργαστηρίου Βιοπαθολογίας και Εργαστηρίου Θεραπευτικής εξατομίκευσης του Αρεταιείου Νοσοκομείου, όπου πραγματοποιήθηκαν εξ'ολοκλήρου τα πειράματα της διατριβής μου.

Ολοκληρώνοντας θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου και τα παιδιά μου, για την αγάπη και υποστήριξή τους.

ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των θεών ότι θα εκτελέσω κατά τη δύναμη και την κρίση μου τον όρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή.

Να θεωρώ τον διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονείς μου και την κοινωνό του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδέρφια μου και να τους διδάσκω αυτήν την τέχνη αν θέλουν να την μάθουν χωρίς δίδακτρα ή άλλη συμφωνία.

Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο.

Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω. Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη.

Παρομοίως, δεν θα εμπιστευτώ σε έγκυο μέσο που προκαλεί έκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου. Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης.

Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους. Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ασχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά.

Αν τηρώ τον όρκο αυτό και δεν τον παραβώ, ας χαίρω πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου. Αν όμως τον παραβώ και επιορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	10
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΝΔΟΠΥΕΛΙΚΗ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ	12
1.1. Ορισμός- Στατιστικά - Επίπτωση	12
1.1.1. Συννοσηρότητα	14
1.2. Συμπτωματολογία της ενδοπυελικής ενδομητρίωσης	16
1.2.1 Αιτία του πόνου κατά την ενδοπυελική ενδομητρίωση	19
1.2.2 Σταδιοποίηση της ενδοπυελικής ενδομητρίωσης	19
1.3 Διαγνωστικές μέθοδοι ενδοπυελικής ενδομητρίωσης	20
1.4 Θεραπεία- Πρόγνωση- Υποτροπή της ενδοπυελικής ενδομητρίωσης	23
1.4.1 Θεραπεία	23
1.4.2 Πρόγνωση ενδοπυελικής ενδομητρίωσης	25
1.4.3 Υποτροπιάζουσα / επίμονη ενδομητρίωση	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΕΝΔΟΠΥΕΛΙΚΗΣ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗΣ	26
2.1 Μηχανισμός της παθογένεσης της ενδοπυελικής ενδομητρίωσης	26
2.1.1 Ο ρόλος των ενζύμων της εξωκυττάριας ουσίας στην ενδομητρίωση	29
2.2 Ανοσολογική ανοχή και ενδοπυελική ενδομητρίωση (ΕΕ)	32
2.3 Κυτταρική ανοσολογική απάντηση στην ενδοπυελική ενδομητρίωση	35
2.4 Χυμική ανοσολογική απάντηση στην ενδοπυελική ενδομητρίωση	36
2.5 Συστηματική κυκλοφορία και ενδοπεριτοναϊκή ενδομητρίωση	38
2.5.1 Τα μακροφάγα	38
2.5.2 NK- Φυσικά κύτταρα φονείς	40
2.5.3 Λεμφοκύτταρα	40
2.5.4 Ορμόνες	42
2.5.5 Προσταγλανδίνες	42
2.5.6 Κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες	43
2.6 Δείκτες κυτταρικής απόπτωσης σε γυναίκες με ενδοπυελική ενδομητρίωση	

2.6.1 Τί είναι η απόπτωση;	51
2.6.2 Bcl-2 στο φυσιολογικό ενδομήτριο	54
2.6.3 Το Fas/FasL σύστημα στο φυσιολογικό ενδομήτριο	56
2.6.4 Απόπτωση στην ενδομητρίωση	58
2.6.4.1 Απόπτωση ευτοπικού και έκτοπου ενδομήτριου ιστού στην ενδομητρίωση	58
2.6.4.2 Η έκφραση της Bcl-2 σε ευτοπικό και έκτοπο ενδομήτριο ιστό σε ενδομητρίωση	59
2.6.4.3 Το Fas / FasL σύστημα σε ευτοπικό και έκτοπο ενδομητριοειδές ιστό	60
2.6.4.4 Η απόπτωση σε περιτοναϊκά μακροφάγα σε ασθενείς με ενδομητρίωση	61
2.6.4.5 Η απόπτωση στην παθοφυσιολογία της ενδομητρίωσης	62

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΙ ΕΝΔΟΠΥΕΛΙΚΗ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ

3.1 Μηχανισμός παθογένεσης αθηροσκλήρυνσης	64
3.1.1 Παθογένεια οξέων στεφανιαίων επεισοδίων	67
3.1.2 Σταθερότητα και αστάθεια της αθηροσκληρωτικής βλάβης	70
3.2 Προϊόντα γονιδίων που ελέγχουν την απόπτωση και την αθηρωμάτωση	
3.3 NO, υπεροξειδίο του υδρογόνου και αγγειακή νόσος : Η σημασία της δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου	73
3.3.1 Πηγές αυξημένης παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου στα ανθρώπινα αγγεία	74
3.3.2 Συσχέτιση αυξημένης παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου στα αγγεία και δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου στην αθηροσκλήρωση	75
3.3.3 Γενετικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την παραγωγή υπεροξειδίου στα αγγεία	77
3.3.4 Ενδοθηλιακή συνθετάση του NO ως πηγή υπεροξειδίου στα αγγεία : Ο ρόλος της Τετραϋδροβιοπτερίνης	78
3.3.5 Συμπεράσματα	80
3.4 Συσχέτιση ενδοπυελικής ενδομητρίωσης με αθηροσκλήρυνση	81
3.5 Γονιδιακοί πολυμορφισμοί	84

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	85
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	86
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ	87
2.1 Ασθενείς	87
2.2 Πρωτόκολλο	87
2.3 Στατιστική ανάλυση	88
2.4 Μέτρηση επιπέδων sCD40L	88
2.5 Απομόνωση γενωμικού DNA	89
2.5.1 T786C πολυμορφισμός: eNOS (-786 T/C)	90
2.5.2 Πολυμορφισμός NADox (C242T - His72Tyr)	90
2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR-Polymerase Chain Reaction) (Mullis KB and Fallona FA, 1987)	91
2.6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – Αρχή της μεθόδου	92
2.6.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - Η μέθοδος	93
2.7 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	95
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	97
3.1 Μέτρηση επιπέδων sCD40L	97
3.2. T786C πολυμορφισμός: eNOS (-786 T/C)	99
3.3 Πολυμορφισμός NADox (C242T - His72Tyr)	101
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	104
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	111
SUMMARY	113
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	115

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η Ενδοπυελική Ενδομητρίωση (Ε.Ε.) αποτελεί μία κοινή γυναικολογική νόσο που προσβάλλει σχεδόν το 10% των γυναικών στην αναπαραγωγική ηλικία και χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό κυττάρων του ενδομητρίου, με μορφή ενδοπυελικών εμφυτευμάτων σε έκτοπες θέσεις όπως το περιτόναιο και οι ωοθήκες. Οι γυναίκες με Ε.Ε. παρουσιάζουν την εξής κλινική συμπτωματολογία: α. Δυσμηνόρροια, β. Δυσπαρεύνια και γ. Χρόνιο άλγος κατά την διάρκεια του κύκλου. Η Ε.Ε. αποτελεί μια σχετιζόμενη με το ανοσοποιητικό σύστημα, άσηπτη, χρόνια φλεγμονώδη νόσο.

Η Ε.Ε. αναπτύσσεται και εξελίσσεται μόνο όταν το ενδομήτριο, για συγγενείς ή επίκτητους λόγους εμφανίζει ανοσολογική ανοχή. Το περιτοναϊκό υγρό έχει αποδειχθεί ότι συγκεντρώνει σχεδόν όλο το φορτίο της τοπικής ανοσολογικής και φλεγμονώδους αντίδρασης, με παρουσία αυξημένου αριθμού λευκοκυττάρων και αυξημένου τίτλου κυτταροκινών.

Επιπλέον τα επίπεδα της ανοσορυθμιστικής προφλεγμονώδους και αγγειογενετικής λεπτίνης και της C αντιδρώσας πρωτεΐνης είναι αυξημένα σε γυναίκες με Ε.Ε.

Πρόσφατη μελέτη για πρώτη φορά συνδέει τη συστηματική άσηπτη φλεγμονή με την ανάπτυξη και εξέλιξη αθηρωσκήρυνσης .

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΝΔΟΠΥΕΛΙΚΗ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ

1.1 Ορισμός- Στατιστικά - Επίπτωση

Η ενδομητρίωση είναι μια ιδιαίτερα συχνή, διηθητική αλλά όχι νεοπλασματική πάθηση της αναπαραγωγικής ηλικίας της γυναίκας, οριζόμενη ως παρουσία και ανάπτυξη ενδομητρικού ιστού (στρώματος και αδένων) εκτός της μήτρας (1). Ανάλογα με την περιοχή που εντοπίζεται, η ενδομητρίωση χαρακτηρίζεται ενδοπυελική ή εξωπυελική. Η ενδοπυελική ενδομητρίωση περιλαμβάνει όλες τις αλλοιώσεις που αφορούν τα αναπαραγωγικά όργανα (μήτρα, σάλπιγγες, ωοθήκες), ενώ η εξωπυελική περιλαμβάνει αλλοιώσεις του ουροποιητικού, του γαστρεντερικού, της θωρακικής κοιλότητας και των πνευμόνων, καθώς επίσης όλες τις αλλοιώσεις εκτός περιτοναϊκής και θωρακικής κοιλότητας.

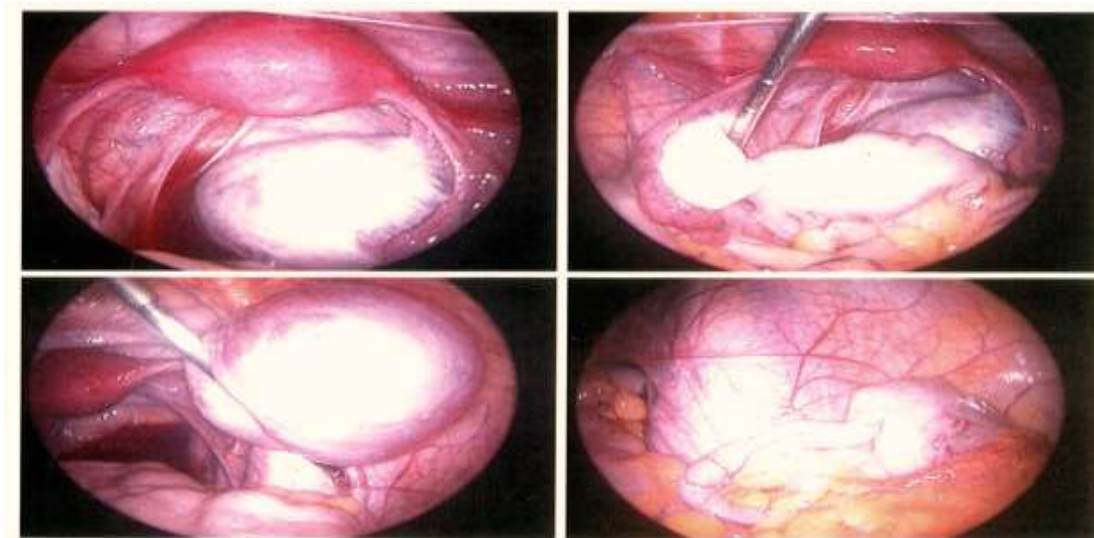
Η ενδομητρίωση μπορεί να επηρεάσει οποιαδήποτε γυναίκα, από την προεμμηναρχή έως την μετεμμηνόπαυση, ανεξάρτητα από φυλή ή εθνότητα ή αν έχει ή δεν έχει αποκτήσει παιδιά. Οι εκτιμήσεις για την επικράτηση της ποικίλλουν, αλλά το 5-10% είναι ένα λογικό ποσοστό, όντας πιο κοινό σε γυναίκες με υπογονιμότητα (20-50%) και σε γυναίκες με χρόνιο πυελικό πόνο (περίπου 80%) (2). Ως οιστρογονοεξαρτώμενη διαδικασία, μπορεί να επιμένει πέρα από την εμμηνόπαυση και επιμένει μέχρι και 40% των ασθενών μετά από την υστερεκτομή (3).

Οι πιο συχνές θέσεις ενδοπυελικής ενδομητρίωσης βρίσκονται στις παρακάτω ανατομικές δομές:

- Ωοθήκες (η πιο κοινή θέση) (εικόνα 1)
- Σάλπιγγες
- Το πίσω μέρος της μήτρας και του οπίσθιου Cul-de-Sac
- Το μπροστινό μέρος της μήτρας και το πρόσθιο Cul-de-Sac
- Σε συνδέσμους της μήτρας
- Πυελικό και οπίσθιο τοίχωμα

- Στο έντερο, συνηθέστερα στο ορθοσιγμοειδές
- Στην ουροδόχο κύστη και στους ουρητήρες

Εικόνα 1: Ωοθηκική κύστη σε ενδομητρίωση



Η ενδομητρίωση εντός του εντέρου επηρεάζει περίπου το 10% των γυναικών με ενδομητρίωση και μπορεί να προκαλέσει πόνο με τις κινήσεις του εντέρου.

Η ενδομητρίωση μπορεί να εξαπλωθεί στον τράχηλο και στον κόλπο ή στους χώρους όπου υπάρχει μια κοιλιακή χειρουργική τομή.
Σημείωση: Λιγότερο συχνά ενδομητριοτικές βλάβες μπορούν να βρεθούν στο διάφραγμα. Διαφραγματική ενδομητρίωση είναι σπάνια, σχεδόν πάντα στο δεξιό ημιδιάφραγμα και μπορεί να προκαλέσει πόνο στο δεξιό ώμο, λίγο πριν και κατά τη διάρκεια της εμμηνορρυσίας. Σπάνια, η ενδομητρίωση μπορεί να είναι εξωπεριτοναϊκή και να βρίσκεται στους πνεύμονες και το ΚΝΣ (4).

1.1.1 Συννοσηρότητα

Η ενδομητρίωση δεν έχει καμία σχέση με τον καρκίνο του ενδομητρίου. Η τρέχουσα έρευνα έχει καταδείξει μια σχέση μεταξύ ενδομητρίωσης και ορισμένων τύπων καρκίνων, κυρίως με τον καρκίνο των ωοθηκών, το μη-Hodgkin λέμφωμα και τον καρκίνο του εγκεφάλου (5-7). Η ενδομητρίωση συχνά συνυπάρχει με ινομύωμα ή αδеноμύωμα, καθώς και με αυτοάνοσες διαταραχές. Μια έρευνα που διενεργήθηκε το 1988 στις ΗΠΑ διαπίστωσε σημαντικά μεγαλύτερο επιπολασμό κρουσμάτων υποθυρεοειδισμού, ινομυαλγίας, συνδρόμου χρόνιας κόπωσης, αυτοάνοσου νοσήματος, αλλεργίας και άσθματος σε γυναίκες με ενδομητρίωση σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό (7).

1.2 Συμπτωματολογία της ενδοπυελικής ενδομητρίωσης

Ένα σημαντικό σύμπτωμα της ενδομητρίωσης είναι ο επαναλαμβανόμενος πυελικός πόνος. Ο πόνος μπορεί να είναι ήπιος έως σοβαρός με κράμπες που εμφανίζονται και στις δύο πλευρές της πυέλου, στο κάτω μέρος της πλάτης και στην πρωκτική περιοχή, ακόμη και κάτω από τα πόδια. Το μέγεθος του πόνου που αισθάνεται μια γυναίκα σχετίζεται ελάχιστα με την έκταση ή το στάδιο (1 έως 4) της ενδομητρίωσης, με μερικές γυναίκες να έχουν λίγο ή καθόλου πόνο παρά την εκτεταμένη ενδομητρίωση ή έχοντας ενδομητρίωση με ουλές, ενώ, από την άλλη πλευρά, άλλες γυναίκες μπορεί να έχουν έντονο πόνο, ακόμη κι αν έχουν μόνο μερικές μικρές περιοχές με ενδομητρίωση (8).

Τα συμπτώματα της ενδομητρίωσης που σχετίζονται με πόνο μπορεί να περιλαμβάνουν: (9)

- δυσμηνόρροια - επώδυνη, μερικές φορές με κράμπες κατά τη διάρκεια της εμμηνόρροιας. Ο πόνος μπορεί να επιδεινωθεί με το χρόνο (προοδευτικός πόνος), ενώ επίσης άλγη στην πλάτη συνδέονται με την πύελο.
- χρόνιο πυελικό άλγος - Συνήθως συνοδεύεται από πόνους στη μέση ή κοιλιακό άλγος.

- δυσπαρεΰνια - Επώδυνη σεξουαλική επαφή
- δυσουρία - Επιτακτική ακράτεια, συχνή και μερικές φορές επώδυνη ούρηση

Επίσης, συχνότερα στις γυναίκες με ενδομητρίωση αναφέρεται παλλόμενος, βασανιστικός, και διάχυτος πόνος στα πόδια (8). Σε σύγκριση με τις γυναίκες με επιφανειακή ενδομητρίωση, τα άτομα με βαθιά ασθένεια φαίνεται να είναι πιο πιθανό να αναφέρουν πόνο στο ορθό και μια εσωτερική αίσθηση τα εσωτερικά τους όργανα είναι τραβιούνται προς τα κάτω (8). Οι περιοχές όπου εντοπίζεται ο πόνος και η έντασης του πόνου φαίνεται να μην έχουν σχέση με τη χειρουργική διάγνωση και η περιοχή του πόνου να μη σχετίζεται με την περιοχή της ενδομητρίωσης (8).

Επιπλέον, πολλές γυναίκες με υπογονιμότητα μπορεί να έχουν ενδομητρίωση. Δεδομένου ότι η ενδομητρίωση μπορεί να οδηγήσει σε στρεβλώσεις και ανατομικές συμφύσεις (ή ουλές που διαμορφώνονται μεταξύ ιστών και οργάνων μετά από τραυματισμούς), η αιτιότητα μπορεί να είναι εύκολο να γίνει αντιληπτή. Ωστόσο, η σχέση μεταξύ της στειρότητας και της ενδομητρίωσης παραμένει αινιγματική, όταν η έκταση της ενδομητρίωσης είναι περιορισμένη (9). Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι οι ενδομητριοτικές βλάβες απελευθερώνουν παράγοντες που είναι βλαβεροί για τους γαμέτες ή τα έμβρυα. Εναλλακτικά, η ενδομητρίωση μπορεί να έχει περισσότερες πιθανότητες να αναπτύχθει σε γυναίκες που αποτυγχάνουν να συλλάβουν για άλλους λόγους και έτσι να εμφανίζεται ως ένα δευτερεύον φαινόμενο: για το λόγο αυτό είναι προτιμότερο να μιλούμε για ενδομητρίωση που σχετίζονται με υπογονιμότητα (1), σε τέτοιες περιπτώσεις.

Άλλα συμπτώματα μπορεί να είναι παρόντα, όπως: (9)

- δυσκοιλιότητα
- χρόνια κόπωση
- βαριά ή μεγάλης διάρκειας ανεξέλεγκτη έμμηνος ρύση με μικρούς ή μεγάλους θρόμβους αίματος
- γαστρεντερικά προβλήματα όπως διάρροια, φούσκωμα και επώδυνη αφόδευση
- ακραίες εκδηλώσεις πόνου στα πόδια και τους μηρούς
- πόνος στην πλάτη

- πόνος από συμφύσεις που μπορεί να ενώσουν μια ωοθήκη με το πλευρικό πυελικό τοίχωμα, ή μπορούν να εκτείνονται μεταξύ της ουροδόχου κύστης και του εντέρου, της μήτρας, κλπ.
- έντονος πόνος με ή χωρίς την παρουσία της εμμηνορρυσίας
- προεμμηνορροϊκές κηλίδες αίματος
- ήπιος έως υψηλός πυρετός
- πονοκέφαλοι
- κατάθλιψη
- υπογλυκαιμία (χαμηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα)
- άγχος

Επιπρόσθετα, γυναίκες που έχουν διαγνωστεί με ενδοπυελική ενδομητρίωση μπορεί να έχουν γαστρεντερικά συμπτώματα που μιμούνται το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου.

Οι ασθενείς που έχουν υποστεί ρήξη μιας ενδομητριοτικής κύστης μπορεί να παρουσιάζουν οξεία κοιλία και να αντιμετωπίζονται ως επείγον χειρουργικό περιστατικό.

Μερικές φορές ο πόνος μπορεί να εμφανιστεί και σε άλλες περιοχές. Οι κύστεις μπορεί να εμφανιστούν στην ουροδόχο κύστη (αν και σπάνια) και προκαλούν πόνο και ακόμη και αιμορραγία κατά την ούρηση. Η ενδομητρίωση μπορεί να εισβάλει στο έντερο και να προκαλέσει επώδυνες κινήσεις του εντέρου ή διάρροια.

Εκτός από τον πόνο κατά την έμμηνο ρύση, ο πόνος της ενδομητρίωσης μπορεί να συμβεί και σε άλλες περιόδους του μήνα. Μπορεί να υπάρχει πόνος κατά την ωορρηξία, πόνος που σχετίζεται με συμφύσεις, πόνος που προκαλείται από φλεγμονή στην πυελική κοιλότητα, πόνος κατά τη διάρκεια της κινητικότητας του εντέρου και κατά την ούρηση, κατά τη διάρκεια της γενικής σωματικής άσκησης, πόνος σε όρθια θέση, ή στη βάδιση και πόνος με τη σεξουαλική επαφή. Αλλά πιο απελπιστικός πόνος εμφανίζεται συνήθως με την εμμηνόρροια και πολλές γυναίκες φοβούνται την περίοδό τους. Ο πόνος μπορεί επίσης να ξεκινήσει μια εβδομάδα πριν από την έμμηνο

ρύση, κατά τη διάρκεια και ακόμη και μια εβδομάδα μετά την έμμηνο ρύση, ή μπορεί να είναι σταθερός (10).

1.2.1 Αιτία του πόνου κατά την ενδοπυελική ενδομητρίωση

Ο τρόπος που η ενδομητρίωση προκαλεί πόνο αποτελεί αντικείμενο πολλών ερευνών. Πολλές γυναίκες με ενδομητρίωση αισθάνονται πόνο κατά τη διάρκεια ή γύρω από τις περιόδους τους.

Οι ενδομητριωτικές βλάβες αντιδρούν στην ορμονική διέγερση και μπορεί να «αιμορραγούν» κατά τη στιγμή της εμμήνου ρύσεως. Το αίμα συσσωρεύεται σε τοπικό επίπεδο, προκαλεί πρήξιμο και φλεγμονώδεις αντιδράσεις με την ενεργοποίηση των κυτταροκινών. Θεωρείται ότι αυτή η διαδικασία μπορεί να προκαλέσει πόνο.

Ο πόνος μπορεί επίσης να προκύψει από συμφύσεις (εσωτερικός ουλώδης ιστός) συνδέοντας εσωτερικά όργανα μεταξύ τους. Σάλπιγγες, ωοθήκες, η μήτρα, το έντερο και η ουροδόχος κύστη μπορεί να συνδέονται μεταξύ τους με τρόπους που είναι επώδυνες σε καθημερινή βάση, όχι μόνο κατά τη διάρκεια της εμμήνου ρύσης (10).

1.2.2 Σταδιοποίηση της ενδοπυελικής ενδομητρίωσης

Χειρουργικά, η ενδομητρίωση μπορεί να σταδιοποιηθεί σε στάδια I-IV (αναθεωρημένη ταξινόμηση της Αμερικανικής Εταιρείας Ιατρικής Αναπαραγωγικής) (11). Η διαδικασία είναι ένα πολύπλοκο σύστημα που αξιολογεί βλάβες και συμφύσεις στα όργανα της πυέλου, αλλά είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι αξιολογείται σωματική νόσος μόνο και όχι το επίπεδο του πόνου ή της υπογονιμότητας.

Ένας ασθενής με σταδίου I ενδομητρίωση μπορεί να έχει ήπια ασθένεια και έντονο πόνο, ενώ ένας ασθενής με σταδίου IV ενδομητρίωση μπορεί να έχει σοβαρή ασθένεια και όχι πόνο ή αντιστρόφως. Κατ' αρχήν τα διάφορα στάδια δείχνουν τα ακόλουθα ευρήματα:

Στάδιο I (Ελάχιστη): Τα ευρήματα περιορίζονται μόνο σε επιφανειακές αλλοιώσεις και πιθανόν λίγες μεμβρανώδεις συμφύσεις

Στάδιο II (Ήπια): Επιπλέον, κάποια βαθιά τραύματα είναι παρόντα στο Cul-de-Sac.

Φάση III (Μέτρια): Όπως και παραπάνω, συν την παρουσία του ενδομητριώματος στις ωοθήκες και περισσότερες συμφύσεις.

Στάδιο IV (Σοβαρή): Όπως και παραπάνω, συν μεγάλα ενδομητρίωματα και εκτεταμένες συμφύσεις (11).

1.3 Διαγνωστικές μέθοδοι ενδοπυελικής ενδομητρίωσης

Μερικές εργαστηριακές και απεικονιστικές μέθοδοι μπορεί να βοηθήσουν στη διάγνωση της νόσου, όμως καμία από αυτές δεν μπορεί από μόνη της να διαγνώσει την ενδομητρίωση. Τις περισσότερες φορές η διάγνωση γίνεται βάσει του συνδυασμού τυπικών συμπτωμάτων και κλινικών ευρημάτων. Μελέτες έχουν δείξει ότι η διάγνωση της ενδομητρίωσης γίνεται νωρίτερα στις γυναίκες που εξετάζονται για στειρότητα από ό,τι σε αυτές που παρουσιάζουν πυελικό πόνο, στις οποίες η νόσος διαγιγνώσκεται σε πιο προχωρημένα στάδια, κυρίως λόγω της καθυστερημένης επίσκεψης στον γυναικολόγο (12, 13).

Οι κυριότερες διαγνωστικές μέθοδοι διάγνωσης της ενδοπυελικής ενδομητρίωσης είναι οι ακόλουθες:

Πυελικό υπερηχογράφημα: Από τις διαθέσιμες απεικονιστικές τεχνικές, το πυελικό υπερηχογράφημα έχει αποδειχτεί χρήσιμο στη διάγνωση πυελικής ενδομητρίωσης, κυρίως σε σοβαρές μορφές της νόσου στις οποίες συνυπάρχουν κύστες ενδομητρίωσης στις ωοθήκες.

Μαγνητική τομογραφία: Σε αμφιλεγόμενες περιπτώσεις μπορεί να επιβεβαιώσει τη διάγνωση της ενδομητρίωσης και να αποκλείσει άλλες παθήσεις των γεννητικών οργάνων.

Διαγνωστική λαπαροσκόπηση με βιοψία ιστού: Παραμένει η πιο αξιόπιστη διαγνωστική μέθοδος καθώς ο σύγχρονος λαπαροσκοπικός εξοπλισμός εξετάζει όλη την πύελο κάτω από μεγέθυνση.

Ο μόνος τρόπος να διαγνωσθεί η ενδομητρίωση είναι με λαπαροσκόπηση ή άλλα είδη εγχείρησης που περιλαμβάνουν βιοψία της βλάβης. Η διάγνωση βασίζεται στην χαρακτηριστική εμφάνιση της νόσου και θα πρέπει να επιβεβαιώνεται με βιοψία. Η χειρουργική επέμβαση για διάγνωση επιτρέπει επίσης τη χειρουργική αντιμετώπιση της ενδομητρίωσης την ίδια στιγμή.

Οι ενδομητριοτικές βλάβες μπορεί να εμφανιστούν με σκούρο μπλε, μαύρο, κόκκινο, λευκό, κίτρινο, καφέ ή καθόλου χρώμα. Πρώιμη ενδομητρίωση εμφανίζεται συνήθως στις επιφάνειες των οργάνων της πυέλου και σε ενδο-κοιλιακές περιοχές. Οι μεγαλύτερες ενδομητριοτικές βλάβες εμφανίζονται μέσα στις ωοθήκες ως ενδομητρίωματα των ωοθηκών ή «σοκολατί κύστες», επειδή περιέχουν ένα παχύ καφετί υγρό, ως επί το πλείστον εξαιτίας παλιάς αιμορραγίας.

Συχνά τα συμπτώματα του καρκίνου των ωοθηκών είναι πανομοιότυπα με εκείνα της ενδομητρίωσης. Εάν γίνει λάθος στη διάγνωση λόγω αδυναμίας να επιβεβαιωθεί η διάγνωση ενδομητρίωσης με λαπαροσκόπηση, η έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για την επιτυχή θεραπεία του, μπορεί να χαθεί (12).

Δυστυχώς όμως πολλές φορές η λήψη βιοψιών δεν είναι εφικτή. Εάν η χειρουργική επέμβαση δεν γίνεται, τότε η διάγνωση της διαδικασίας αποκλεισμού χρησιμοποιείται. Αυτό σημαίνει ότι όλες οι άλλες πιθανές αιτίες του πυελικού πόνου αποκλείονται. Επιπλέον, υπάρχουν μορφές ενδομητρίωσης που δύσκολα μπορούν να διαγνωστούν ακόμη και από έμπειρους γιατρούς.

Βιοχημικοί δείκτες: Ένας τομέας της διαγνωστικής έρευνας είναι η αναζήτηση για τους δείκτες της ενδομητρίωσης. Αυτοί οι δείκτες είναι ουσίες που παράγονται από ή για την αντιμετώπιση της ενδομητρίωσης και οι ιατροί μπορούν να μετρήσουν σε βιοψίες, στο αίμα ή στα ούρα. Η ανίχνευση ενός τέτοιου δείκτη μπορεί να οδηγήσει σε έγκαιρη διάγνωση της ενδομητρίωσης από ό, τι μπορεί να επιτευχθεί από τα μάλλον μη ειδικά συμπτώματα και

μπορεί να αντικαταστήσει τις επεμβατικές χειρουργικές διαδικασίες για τη διάγνωση της νόσου (13). Ο βιοδείκτης θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί για να προσδιορίσει τα πρώτα σημάδια της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας ή υποτροπής της νόσου, καθώς η συμπτωματική ανακούφιση ή επιδείνωση συνήθως είναι δύσκολο να ποσοτικοποιηθούν. Ωστόσο, δεδομένου ότι τα οφέλη από τη θεραπεία των γυναικών με ασυμπτωματική ενδομητρίωση είναι ασαφή, είναι πιθανό ότι οποιοδήποτε βιοδείκτης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μόνο για τη διερεύνηση των γυναικών με συμπτώματα ενδεικτικά της ενδομητρίωσης (13). Ως εκ τούτου, ένας προγνωστικός βιοδείκτης πρέπει να διακρίνει μεταξύ γυναικών με ενδομητρίωση από τις γυναίκες με παρόμοια συμπτώματα (για παράδειγμα δυσμηνόρροια, πυελικό πόνο ή υπογονιμότητα) (13). Μια συστηματική μελέτη του 2010 για όλους τους προτεινόμενους βιοδείκτες της ενδομητρίωσης στον ορό, στο πλάσμα και τα ούρα κατέληξε στο συμπέρασμα ότι κανένας από αυτούς δεν έχουν δείξει σαφώς να έχει κλινική χρήση, αν και ορισμένοι φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενοι (13). Μια άλλη μελέτη το 2011 προσδιόρισε διάφορους δήθεν βιοδείκτες κατόπιν βιοψίας, συμπεριλαμβανομένων μικρών αισθητικών νευρικών ινών ή μειωμένης έκφρασης της υπομονάδας της β3 ιντεγκρίνης (13).

Ένας βιοδείκτης που έχει χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη τα τελευταία 20 χρόνια είναι ο CA-125 (13). Ωστόσο, η απόδοσή του στη διάγνωση της ενδομητρίωσης είναι χαμηλή, αν και παρουσιάζει κάποιο αποτέλεσμα στην ανίχνευση της πιο βαριάς μορφής της νόσου (13). Τα CA-125 επίπεδα φαίνεται να πέφτουν κατά τη διάρκεια της θεραπείας της ενδομητρίωσης, αλλά δεν έχει δείξει κάποιο συσχέτισμό με την ανταπόκριση της νόσου (13).

Περαιτέρω έρευνα επίσης διεξάγεται για άλλους πιθανούς γενετικούς δείκτες που να σχετίζονται με την ενδομητρίωση έτσι ώστε να μπορούν να αντικαταστήσουν τις χειρουργικές επεμβάσεις για τη βασική διάγνωση (14).

Τέλος, έχει προταθεί ως μελλοντικό διαγνωστικό εργαλείο για την ενδομητρίωση μια ομάδα πολλών βιολογικών δεικτών,

συμπεριλαμβανομένων τόσο των συγκεντρώσεων των ουσιών όσο και της γενετικής προδιάθεσης (14).

1.4 Θεραπεία - Πρόγνωση - Υποτροπή της ενδοπυελικής ενδομητρίωσης

1.4.1 Θεραπεία

Οι θεραπευτικές επιλογές στην αντιμετώπιση της ενδομητρίωσης εξαρτώνται από την έκταση της νόσου, τις ανάγκες της ασθενούς και την επιθυμία για διατήρηση της αναπαραγωγικής ικανότητας. Αυτές οι επιλογές περιλαμβάνουν (15-21):

- 1) απλή παρατήρηση,
- 2) χειρουργική αντιμετώπιση,
- 3) φαρμακευτική αντιμετώπιση και
- 4) συνδυασμένη θεραπεία.

Απλή παρατήρηση: Στο παρελθόν η απλή παρατήρηση χωρίς καμία παρέμβαση είχε θεωρηθεί κατάλληλη για τα αρχικά στάδια της νόσου, όταν δεν εμφανίζονται συμπτώματα ή αυτά είναι απλώς περιορισμένα. Σήμερα η θεραπευτική παρέμβαση μετά τη διάγνωση της ενδομητρίωσης είναι απαραίτητη καθώς οι αλλοιώσεις της νόσου αυξάνονται με την πάροδο του χρόνου.

Συντηρητική χειρουργική αντιμετώπιση: Εφαρμόζεται σε ασθενείς που επιθυμούν να διατηρήσουν την αναπαραγωγική τους ικανότητα και μπορεί να περιλαμβάνει αφαίρεση ή καταστροφή (εξάτμιση με laser, ηλεκτροκαυτηριασμό, θερμική πήξη) επιφανειακών αλλοιώσεων ή ενδομητριομάτων (κύστες), η οποία συνδυάζεται με καθαρισμό των συμφύσεων και αποκατάσταση της φυσιολογικής ανατομίας. Η χειρουργική αντιμετώπιση της νόσου γίνεται είτε λαπαροσκοπικά είτε λαπαροτομικά (ανοιχτό χειρουργείο). Ανεξάρτητα από τη χειρουργική τεχνική (λαπαροσκόπηση ή λαπαροτομία), η αφαίρεση όλων των ενδομητρικών

αλλοιώσεων με προσεκτικό καθαρισμό των συμφύσεων είναι απαραίτητη για την αντιμετώπιση του πυελικού πόνου και της στειρότητας σε γυναίκες που επιθυμούν να διατηρήσουν την αναπαραγωγική τους ικανότητα.

Οριστική χειρουργική αντιμετώπιση: Εφαρμόζεται σε ασθενείς που δεν επιθυμούν τη διατήρηση της αναπαραγωγικής τους ικανότητας και περιλαμβάνει: 1. ολική αφαίρεση της μήτρας μαζί με ή χωρίς τα εξαρτήματα (σάλπιγγες, ωοθήκες), 2. εξάλειψη όλων των αλλοιώσεων στην περιοχή της κοιλιάς, 3. λύση των συμφύσεων και 4. αποκατάσταση άλλων ανατομικών αλλοιώσεων. Η διατήρηση μιας ή μέρους της ωοθήκης ως μια «φυσική» πηγή οιστρογόνου έως την εμμηνόπαυση μπορεί να οδηγήσει σε υποτροπή της νόσου. Γι' αυτό η «ημι-οριστική» διαδικασία δεν ακολουθείται εκτός από εξαιρετικές περιπτώσεις.

Φαρμακευτική θεραπεία: Θεωρητικά, η φαρμακευτική αντιμετώπιση θα ήταν ιδεώδης στην αντιμετώπιση της ενδομητρίωσης. Στην πράξη όμως, η φαρμακευτική θεραπεία από μόνη της συνοδεύεται από μια προσωρινή βελτίωση του πόνου, καθώς μετριάζονται μεν τα συμπτώματα αλλά με την πάροδο του χρόνου αυτά συνήθως επανέρχονται. Μπορεί βέβαια να μειωθεί το μέγεθος των ενδομητριωμάτων και να διευκολυνθεί η χειρουργική τους αφαίρεση. Τα αντισυλληπτικά χάπια αποτελούν μία από τις κύριες φαρμακευτικές θεραπείες, καθώς προκαλούν μείωση της ποσότητας του αίματος της εμμήνου ρήσης και οδηγούν σε μείωση του πόνου που προκύπτει από εστίες της ενδομητρίωσης. Η αποτελεσματικότητα της φαρμακευτικής θεραπείας στη βελτίωση της αναπαραγωγικής ικανότητας είναι αμφίβολη. Γι' αυτό η φαρμακευτική θεραπεία δεν συνιστάται ως αποκλειστική θεραπεία γυναικών με ενδομητρίωση, εκτός από σπάνιες περιπτώσεις στις οποίες η χειρουργική αντιμετώπιση δεν είναι δυνατή ή παρουσιάζει σημαντικό κίνδυνο για τη ζωή της ασθενούς.

Συνδυασμένη θεραπεία: Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος θεραπείας της ενδομητρίωσης είναι ο συνδυασμός της χειρουργικής αφαίρεσης όλων των ορατών ενδομητρικών αλλοιώσεων και της φαρμακευτικής αγωγής.

1.4.2 Πρόγνωση ενδοπυελικής ενδομητρίωσης

Η σωστή παροχή συμβουλών σε ασθενείς με ενδομητρίωση απαιτεί προσοχή. Πρωταρχικής σημασίας είναι η αρχική σταδιοποίηση της νόσου και οι επαρκείς πληροφορίες προς την ασθενή και στις οποίες θα βασίσει τις μελλοντικές αποφάσεις της σχετικά με τη θεραπεία. Τα συμπτώματα της ασθενούς και η επιθυμία για τεκνοποίηση υπαγορεύει την κατάλληλη θεραπεία. Δεν είναι όλες οι θεραπείες λειτουργικές για όλους τους ασθενείς. Μερικές ασθενείς έχουν υποτροπές μετά από χειρουργική επέμβαση. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η θεραπεία θα δώσει σημαντική ανακούφιση από πυελικό άλγος και θα τις βοηθήσει στην επίτευξη της εγκυμοσύνης (22). Είναι σημαντικό για τις ασθενείς να είναι συνεχώς σε επαφή με το γιατρό τους και να διατηρούν ένα ανοικτό διάλογο κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Με τη σωστή επικοινωνία, μια γυναίκα με ενδομητρίωση μπορεί να προσπαθήσει να ζήσει μια φυσιολογική, λειτουργική ζωή. Χρησιμοποιώντας κυστεκτομή και αφαιρετική χειρουργική επέμβαση, τα ποσοστά εγκυμοσύνης είναι περίπου 40% (22, 23).

1.4.3 Υποτροπιάζουσα / επίμονη ενδομητρίωση

Ένα σοβαρό πρόβλημα στη θεραπεία της ενδομητρίωσης είναι το μεγάλο ποσοστό υποτροπής / επιμονής της νόσου μετά από επιμελή θεραπεία. Δύο βιολογικοί μηχανισμοί έχουν ενοχοποιηθεί για την υποτροπή της νόσου. Σύμφωνα με τον πρώτο, ενδομητρικά κύτταρα μπορεί να επιζήσουν στην περιοχή που εμφυτεύτηκαν ακόμα και μετά από εμφανή ολική αντιμετώπιση της νόσου, ενώ, σύμφωνα με το δεύτερο, η αφαίρεση των ωοθηκών δεν αποκλείει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ενδομητρίου καθώς οι ορμόνες στις ωοθήκες δεν είναι ο μόνος παράγοντας που εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό τους. Η πιθανότητα υποτροπής της νόσου μειώνεται ανάλογα με την επιτυχία της αρχικής αντιμετώπισης. Οι θεραπευτικές επιλογές στην αντιμετώπιση της υποτροπιάζουσας νόσου δεν διαφέρουν από την αρχική αντιμετώπιση (20-23).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΕΝΔΟΠΥΕΛΙΚΗΣ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗΣ

2.1 Μηχανισμός της παθογένεσης της ενδοπυελικής ενδομητρίωσης

Η ενδομητρίωση είναι μία από τις πλέον αινιγματικές και μυστηριώδεις γυναικολογικές παθήσεις. Η αιτιολογία και η παθογένεσή της, η γνώση των οποίων αποτελεί τη βάση για την αντιμετώπισή της, εξακολουθεί να παραμένει εν πολλοίς αδιευκρίνιστη. Από το 1860 που ο Von Rokitanski (24) έκανε την πρώτη λεπτομερή περιγραφή της πάθησης αυτής, έχουν αναπτυχθεί πολλές θεωρίες για την αιτιολογία και την παθογένεση της ενδομητρίωσης, καμία δεν καλύπτει πλήρως την παθολογική της οντότητα. Οι πρώτες σκέψεις γύρω από την αιτιολογία-παθογένεση της ενδομητρίωσης διατυπώθηκαν το 1885 από τον Von Recklinghausen, ο οποίος θεώρησε ότι εμβρυϊκά στοιχεία του μεσόνεφρου ευθύνονται για την ανάπτυξη της ενδομητρίωσης (25). Η άποψη του Von Recklinghausen υιοθετήθηκε το 1942 από τον Grunwald ο οποίος υποστήριξε ότι κατά την εμβρυϊκή ηλικία κύτταρα από τους αναπτυσσόμενους πόρους του Muller μπορούν να αποκτήσουν την ικανότητα μετατροπής τους σε κύτταρα του ενδομητρίου (26).

Σήμερα τρεις θεωρίες φαίνεται να απηχούν, αν και παλιές, την τρέχουσα επιστημονική σκέψη. Αυτές είναι η θεωρία της μεταπλασίας, η θεωρία της μεταπλασίας, η θεωρία της διασποράς και «μετεμφύτευσης» ενδομητρίου και η θεωρία της επαγωγής. Θα πρέπει, όμως, να τονιστεί ότι από τις θεωρίες αυτές παραμένει μόνον η κύρια ιδέα. Πλείστα στοιχεία έχουν προστεθεί, ώστε τελικά να μην προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι ο αναγνώστης μπορεί να συναντήσει στη διεθνή βιβλιογραφία διάφορες μορφές παρουσίας ή ακόμα και ονομασίες των θεωριών αυτών. Επίσης, σήμερα, με τα στοιχεία που έχουν προκύψει από την εκτεταμένη έρευνα αμφισβητείται η ύπαρξη της ενδομητρίωσης ως ενιαίας οντότητας αλλά και η ορθότητα των παραπάνω θεωριών.

Η πρώτη θεωρία είναι η θεωρία της μεταπλασίας του ορογόνου πετάλου του περιτόναιου. Η θεωρία αυτή προτάθηκε από τον Meyer το 1903 (27). Σύμφωνα με αυτήν η ανάπτυξη της πάθησης οφείλεται σε μια

διεργασία συνεχούς ιστικής διαφοροποίησης των μεσοθηλιακών κυττάρων του περιτόναιου υπό την επίδραση ορμονικών ή φλεγμονώδων παραγόντων, με αποτέλεσμα τη διαμόρφωση κυτταρικών σχηματισμών οι οποίοι προοδευτικά βυθίζονται στα υποκείμενα όργανα, ενώ ταυτόχρονα μεταπλάσσονται σε ενδομήτριους αδένες και στρώμα. Η θεωρία αυτή, που είχε βρει μεγάλη απήχηση τις πρώτες δεκαετίες του εικοστού αιώνα, θα μπορούσε να εξηγήσει την ανάπτυξη της ενδομητρίωσης σε γυναίκες με αγενεσία των πόρων του Muller. Υπάρχουν όμως αρκετά προβλήματα και ερωτήματα που δεν μπορούν να απαντηθούν με τη θεωρία αυτή. Ωστόσο, η θεωρία της μεταπλασίας, με την ευρεία έννοια του όρου, μπορεί κάλλιστα να ερμηνεύσει την ανάπτυξη της ενδομητρίωσης σε πλέον απομακρυσμένα όργανα.

Η δεύτερη θεωρία της αιτιολογίας και παθογένεσης της ενδομητρίωσης είναι αυτή της διασποράς και «μετεμφύτευσης» ενδομητρίου. Η διασπορά ενδομητρικών κυττάρων μέσω των λεμφαγγείων προτάθηκε από τον Halban το 1924, προκειμένου να ερμηνεύσει τις εξωπυελικές εντοπίσεις της ενδομητρίωσης, ενώ η αιματογενής διασπορά υποστηρίχθηκε για τον ίδιο λόγο από τον Sampson το 1925. Ιστολογική επιβεβαίωση αυτού έγινε από τον Javert το 1952, ο οποίος βρήκε ενδομητρικό ιστό σε πυελικές φλέβες (28). Η πλέον όμως κατανοητή και αποδεκτή θεωρία διασποράς προτάθηκε τη δεκαετία του 1920 από τον Sampson, ο οποίος υποστήριξε ότι κατά την εμμηνορυσία είναι δυνατόν να συμβαίνει παλίνδρομη διασπορά ζώντων κυττάρων ενδομητρίου στην περιτοναϊκή κοιλότητα και στις ωοθήκες. Παρατηρήσεις που υποστηρίζουν τη θεωρία αυτή είναι η ανεύρεση ζώντων κυττάρων ενδομητρίου στον εμμηνορρυσιακό κύκλο (28), η τοπογραφική διασπορά των βλαβών στην περιτοναϊκή κοιλότητα (28) Επίσης, η διαπίστωση παρουσίας ενδομητρικών κυττάρων στην περιτοναϊκή κοιλότητα με κυτταρολογικό έλεγχο (28), επιδημιολογικά δεδομένα που δείχνουν ότι γυναίκες με συχνότερη και πλέον βαρεία εμμηνορυσία, άρα και αυξημένη έκθεση σε παλίνδρομη διασπορά, έχουν υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (28). Επιπρόσθετα, η μεγαλύτερη επίπτωση της νόσου σε γυναίκες με συγγενείς ανωμαλίες των πόρων του Muller με αποτέλεσμα την αδυναμία εκβολής του εμμηνορρυσιακού

υλικού (28), η ομοιότητα των ανοσοϊστοχημικών χαρακτηριστικών του παλινδρομηθέντος ενδομητρίου με εκείνα του *in situ* (28) και, τέλος, η πειραματική ανάπτυξη ενδομητρίωσης από μετεμφυτευθέν ενδομήτριο στο τοιχωματικό περιτόναιο (28).

Η τρίτη θεωρία είναι αυτή της επαγωγής, η οποία μπορεί να θεωρηθεί συνδυασμός των δύο προηγούμενων θεωριών (29). Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, άγνωστες προς το παρόν ουσίες που απελευθερώνονται από το παλινδρομηθέν ενδομήτριο προκαλούν μετατροπή των αδιαφοροποίητων μεσεγχυματικών κυττάρων σε κύτταρα ενδομητρικού ιστού. Η θεωρία αυτή υποστηρίχθηκε πειραματικά από τον Merrill, ο οποίος προκάλεσε περιτοναϊκή ενδομητρίωση σε κουνέλι, εμφυτεύοντας στην περιτοναϊκή κοιλότητα φίλτρα με ζώντα ενδομητρικό ιστό (30, 31).

Οι πιο σύγχρονες θεωρίες αιτιοπαθογένεσης της ενδοπυελικής ενδομητρίωσης συνίστανται επιπλέον στους εξής άξονες:

Τα οιστρογόνα: Η ενδομητρίωση είναι μια κατάσταση που είναι οιστρογόνο-εξαρτώμενη και ως εκ τούτου θεωρείται ότι εμφανίζεται κατά κύριο λόγο κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας. Σε πειραματικά μοντέλα, τα οιστρογόνα είναι απαραίτητα να προκαλέσουν ή να διατηρήσουν την ενδομητρίωση. Η θεραπεία συχνά αποσκοπεί στη μείωση των επιπέδων των οιστρογόνων για τον έλεγχο της νόσου. Επιπλέον, η τρέχουσα έρευνα της αρωματάσης, ενός οιστρογόνο-συνθετικού ενζύμων, προσκόμισε αποδεικτικά στοιχεία ως προς το γιατί και πώς η ασθένεια εξακολουθεί να υφίσταται μετά την εμμηνόπαυση και την υστερεκτομή (1).

Γενετική: Κληρονομικοί παράγοντες φαίνεται να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο. Είναι γνωστό ότι οι κόρες ή αδελφές των ασθενών με ενδομητρίωση διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο να αναπτύξουν ενδομητρίωση και οι ίδιες. Για παράδειγμα, τα χαμηλά επίπεδα προγεστερόνης μπορεί να έχουν γενετική αιτιολογία και μπορεί να συμβάλουν σε μια ορμονική ανισορροπία. Υπάρχει μια περίπτωση 10-πλάσια αύξηση της συχνότητας σε γυναίκες με επηρεασμένη συγγενή πρώτου βαθμού (32). Μια μελέτη του 2005 που δημοσιεύτηκε στο *American Journal of Human Genetics* έδειξε μια συσχέτιση μεταξύ ενδομητρίωσης και χρωμοσώματος 10q26, (33), ενώ μια μελέτη του 2010 του

Nature Genetics εντόπισε σχέση με την περιοχή 7p15.2 (34). Μια μελέτη διαπίστωσε ότι στις γυναίκες-αδέλφια των ασθενών με ενδομητρίωση, ο σχετικός κίνδυνος για ενδομητρίωση είναι 5.7:1 έναντι του γενικού πληθυσμού (34).

Μεταμόσχευση: Είναι αποδεκτό ότι σε συγκεκριμένες ασθενείς η ενδομητρίωση μπορεί να εξαπλωθεί άμεσα. Έτσι, ενδομήτριος έκτοπος ιστός έχει βρεθεί σε κοιλιακές χειρουργικές ουλές μετά από επέμβαση για ενδομητρίωση (35).

Ανοσοποιητικό σύστημα: Η έρευνα επικεντρώνεται στην πιθανότητα ότι το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να μην είναι σε θέση να αντιμετωπίσει την παλίνδρομη εμμηνορρυσία. Στο πλαίσιο αυτό, υπάρχει ενδιαφέρον για τη μελέτη της σχέσης της ενδομητρίωσης με αυτοάνοση νόσο, αλλεργικές αντιδράσεις και της δράσης τοξινών (36, 37). Είναι ακόμα ασαφές ποια ενδεχομένως είναι η αιτιώδης σχέση μεταξύ τοξινών, αυτοάνοσης ασθένειας και ενδομητρίωσης.

Περιβάλλον: Υπάρχει μια αυξανόμενη υποψία ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να προκαλούν ενδομητρίωση, ειδικά μερικά πλαστικά και το μαγείρεμα με ορισμένους τύπους πλαστικών εμπορευματοκιβωτίων με φούρνους μικροκυμάτων (38) καθώς και η δράση της διοξίνης (39). Άλλες πηγές δείχνουν ότι τα φυτοφάρμακα και ορμόνες στα τρόφιμα μας προκαλούν μια ορμονική δυσαρμονία (40).

Εκ γενετής ελάττωμα: Σε σπάνιες περιπτώσεις όπου ο άτρητος υμένος υμένος δεν λύεται πριν από την πρώτη έμμηνο ρύση και παραμένει παγιδευμένος μέσα στη μήτρα της ασθενούς μέχρις ότου επιλυθεί το πρόβλημα με χειρουργική εκτομή. Πολλοί επαγγελματίες υγειονομικής περίθαλψης δεν αντιμετωπίζουν αυτό το ελάττωμα και συχνά αγνοείται μέχρι πολλαπλές εμμήνες ρύσεις να περάσουν.

Ωστόσο, η πιο ευρέως αποδεκτή θεωρία για την αιτιοπαθογένεια της ενδομητρίωσης είναι η θεωρία της έκτοπης εμφύτευσης ενδομητρίου, μέσω παλίνδρομης εμμηνορρυσίας (41). Κατά παρόμοιο τρόπο, η ενδομητρίωση σε απομακρυσμένα σημεία του σώματος μπορεί να εξηγηθεί από τη μετανάστευση κυττάρων του ενδομητρίου μέσω λεμφικών και αιμοφόρων

αγγείων. Έτσι, η ενδομητρίωση αποτελεί ένα μοναδικό παράδειγμα καλοήθους διασποράς και μετάστασης.

Σε κυτταρικό επίπεδο, η ενδομητρίωση χαρακτηρίζεται από μονοκλωνική ανάπτυξη και μπορεί να έχει χαρακτηριστικά κακοήθους συμπεριφοράς, συμπεριλαμβανομένης της τοπικής διήθησης και της μετάστασης (42). Για αυτό και η ενδομητρίωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο για τη μελέτη των μοριακών και γενετικών προϋποθέσεων που χρειάζονται για τη διασπορά κακοήθων ή μη κυττάρων.

Γενικά, η συσχέτιση της ενδομητρίωσης με τον καρκίνο είναι ασαφής. Παρόλο που η ενδομητρίωση είναι μη-νεοπλασματική νόσος και δεν οδηγεί σε καταβολικό σύνδρομο και καχεξία, ορισμένες διαδικασίες που χαρακτηρίζουν τη μετάσταση και την καρκινογένεση είναι επίσης παρούσες και στην ενδομητρίωση. Σε αυτές περιλαμβάνονται η κυτταρική κινητικότητα, η κυτταρική προσκόλληση και διήθηση, ανοσολογικοί παράγοντες, η διατήρηση της αρχικής δομής και της αρχιτεκτονικής των ιστών σε έκτοπα σημεία, η αγγειογένεση και η μεταπλασία (43).

Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι εστίες ενδομητρίωσης παρουσιάζουν γενετικές μεταβολές παρόμοιες με ορισμένες κακοήθειες (44, 45), ενώ μία άμεση συσχέτιση μεταξύ καρκίνου των ωοθηκών και ενδομητρίωσης έχει περιγραφεί στο παρελθόν σε ορισμένες αναφορές και σειρές περιστατικών (46-48). Όπως και κάθε άλλος ιστός, έτσι και ο ενδομητρικός ιστός μπορεί να υποστεί κακοήθη εξαλλαγή. Σε αντίθεση, μεγάλες αναδρομικές επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι οι γυναίκες με ενδομητρίωση έχουν αυξημένο κίνδυνο ωοθηκικού και μερικών άλλων μορφών καρκίνου συγκρινόμενες με το γενικό πληθυσμό (49-51).

2.1.1 Ο ρόλος των ενζύμων της εξωκυττάριας ουσίας στην ενδομητρίωση

Μία σειρά από μελέτες έχει δείξει ότι διάφορα ένζυμα της εξωκυττάριας ουσίας δρουν σε εστίες ενδομητρίωσης ή και στο φυσιολογικό ενδομήτριο γυναικών με ενδομητρίωση, οδηγώντας σε αυτοκαταστροφή της εξωκυττάριας ουσίας. Με τον τρόπο αυτό, διευκολύνεται η διείσδυση των επιθηλιακών κυττάρων του ενδομητρίου σε βαθύτερες στιβάδες, γεγονός απαραίτητο είτε για την τοπική ανάπτυξη των ενδομητριοειδών εστιών είτε για τη διασπορά

της νόσου. Από τα διάφορα ένζυμα της εξωκυττάριας ουσίας που δρουν κατά αυτό τον τρόπο, έχουν μελετηθεί κυρίως το σύστημα των μεταλλοπρωτεασών και το σύστημα του πλασμινογόνου.

Το σύστημα των μεταλλοπρωτεασών ή μεταλλοπρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας (MMP–matrix metalloproteases or metalloproteinases) αποτελείται από ένα ενζυματικό στοιχείο, τις MMPs και από ένα ανασταλτικό στοιχείο των ενζύμων, τους ιστικούς αναστολείς των μεταλλοπρωτεασών τους TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteases) (52). Είναι καλά τεκμηριωμένο το ότι το σύστημα των MMPs παίζει καθοριστικό ρόλο στη φυσιολογική εξέλιξη και ανάπτυξη του ενδομητρίου, καθώς και σε πολλές άλλες φυσιολογικές διαδικασίες σε άλλους ιστούς. Εξαιτίας της αναγκαιότητας για ισορροπία ανάμεσα σε MMPs και TIMPs, δεν είναι παράξενο που μία διαφορική έκφραση των MMPs και TIMPs σχετίζεται με την παθοφυσιολογία της ενδομητρίωσης και η ανισορροπία ανάμεσα στην έκκριση της MMP-9 και του φυσικού της αναστολέα TIMP-1 στο καλλιεργητικό μέσο του ενδομητριοειδούς ιστού, πιθανόν να αντανάκλα την αυξημένη ικανότητα του ιστού αυτού να διασπά *in vivo* την εξωκυττάρια ουσία, διευκολύνοντας έτσι την έκτοπη εμφύτευση και ανάπτυξη του ενδομητρίου.

Ο πιθανός ρόλος της MMP-9 και του TIMP-1 στην παθογένεια της ενδομητρίωσης μελετήθηκε επίσης στο περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση, από τους Stamatowicz και συνεργάτες (53). Τα ευρήματα αυτής της εργασίας συμφωνούν επίσης με την υπόθεση ότι η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ MMP-9 και TIMP-1 μπορεί να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου.

Οι Gaetje και συνεργάτες (54) μελέτησαν την έκφραση της MMP-5-μεμβρανικού τύπου με ανάλυση μικροσυστοιχιών και real time PCR. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι στο ενδομήτριο και αυτό το μέλος του συστήματος των μεταλλοπρωτεασών της εξωκυττάριας ουσίας συμβάλλει σε μία αυξημένη ιστική αναδιαμόρφωση (tissue remodeling) και επιτρέπει την κυτταρική μετανάστευση σε ασθενείς με ενδομητρίωση.

Οι Gillabert-Estelles και συνεργάτες (55) μελέτησαν την έκφραση αγγειογενετικών παραγόντων στην ενδομητρίωση και τη σχέση τους με το σύστημα των μεταλλοπρωτεασών. Στη μελέτη αυτή, παρατηρήθηκε μία σημαντική αύξηση, στο περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση, των

επιπέδων του αγγειακού-ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor-VEGF), του ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (urokinase-type Plasminogen Activator-uPA) και των επιπέδων της MMP-3 σε σύγκριση με γυναίκες-μάρτυρες, χωρίς ενδομητρίωση.

Οι MMP-3 και uPA μελετήθηκαν επίσης από τους Ramon και συνεργάτες (56) με τη χρήση ποσοτικής RT-PCR. Στη μελέτη αυτή, παρατηρήθηκε μία αύξηση στα επίπεδα του uPA και της MMP-3 στο ενδομήτριο γυναικών με ενδομητρίωση, κάτι που μπορεί να διευκολύνει την προσκόλληση του ενδομητριοειδούς ιστού στο περιτόναιο και στην επιφάνεια της ωοθήκης, καθώς και τη διείσδυση στην εξωκυττάρια ουσία, με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό πρώιμων ενδομητριοειδών εστιών.

Μία άλλη μελέτη από τους Gillabert-Estelles και συνεργάτες (57), κατέληξε σε παρόμοια συμπεράσματα. Στην εργασία αυτή, αναλύθηκε η έκφραση διαφορετικών μελών των συστημάτων του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου και των MMPs στην ενδομητρίωση και βρέθηκε ότι οι ωοθηκικοί ενδομητριοειδείς ιστοί εμφάνιζαν υψηλότερα επίπεδα του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου 1 (Plasminogen Activator Inhibitor-PAI-1) και του TIMP-1, σε σύγκριση με το φυσιολογικό ενδομήτριο.

Το συνολικό συμπέρασμα είναι ότι η αύξηση των uPA και MMP-3 στο ενδομήτριο γυναικών με ενδομητρίωση οδηγεί σε αύξηση της διεισδυτικής ικανότητας των ενδομητριοειδών κυττάρων. Από τη στιγμή που δημιουργηθεί μία ενδομητριοειδής εστία, ανιχνεύεται μία αύξηση των PAI-1 και TIMP-1, με αποτέλεσμα την παύση περαιτέρω πρωτεολυτικής δραστηριότητας.

Η αύξηση των αναστολέων και η μείωση της πρωτεολυτικής δραστηριότητας θα μπορούσε επίσης να εξηγήσει το συχνό κλινικό εύρημα απομονωμένων ενδομητριοειδών κύστεων χωρίς διήθηση του γύρω ωοθηκικού ιστού.

Σε μία άλλη μελέτη, οι Chung και συνεργάτες (58) ανέλυσαν την έκφραση της MMP-9 και του TIMP-3 σε έκτοπο και φυσιολογικό ενδομήτριο γυναικών με ενδομητρίωση. Τα ευρήματά τους δείχνουν ότι, τόσο το έκτοπο όσο και το φυσιολογικό ενδομήτριο ασθενών με ενδομητρίωση, μπορεί να είναι περισσότερο διεισδυτικά και περισσότερο ικανά για να εμφυτευτούν στο

περιτόναιο, λόγω της αυξημένης έκφρασης MMP και της ελαττωμένης έκφρασης TIMP-3 σε σύγκριση με γυναίκες χωρίς ενδομητρίωση.

Η έκφραση ενός άλλου μέλους της οικογένειας των MMPs, της MMP-2, αναλύθηκε από τους Kim και συνεργάτες μαζί με την έκφραση των CD44s, του VEGF και του Ki-67 σε περιτοναϊκή, ορθοκολπική και ωοθηκική ενδομητρίωση. Σε ερυθρές και λευκές εστίες ενδομητρίωσης, παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση MMP-2 στο στρώμα από ό,τι σε μελανές εστίες. Επίσης, η έκφραση της MMP-2 ήταν σημαντικά υψηλή σε προχωρημένη ενδομητρίωση (στα στάδια III και IV σύμφωνα με την αναθεωρημένη ταξινόμηση της Αμερικανικής Εταιρίας Γονιμότητας), κάτι που δείχνει ότι η MMP-2 μπορεί να είναι υπεύθυνη για την εξέλιξη της ενδομητρίωσης. Παραπλήσια ευρήματα σε ό,τι αφορά την MMP-2 και τον VEGF είχαν και οι Lu και συνεργάτες (59) σε ένα πειραματικό μοντέλο σε ποντικούς.

Όπως και τα άλλα μέλη της οικογένειας των MMPs, έτσι και η MMP-1 φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στους μηχανισμούς της τοπικής διήθησης. Οι Hudelist και συνεργάτες (60) παρατήρησαν ότι η ιντερλευκίνη-1α και η MMP-1 είναι αυξημένες σε έκτοπο ενδομήτριο ασθενών με ενδομητρίωση, κάτι που υποδηλώνει την ανάμειξή τους στους παθογενετικούς μηχανισμούς που οδηγούν σε τοπική διήθηση και ιστική καταστροφή.

Συνοψίζοντας τα ευρήματα από τη βιβλιογραφία, γίνεται σαφές ότι η οικογένεια των μεταλλοπρωτεασών της εξωκυττάριας ουσίας (MMPs) και οι φυσικοί ανταγωνιστές τους, οι αναστολείς των μεταλλοπρωτεασών (TIMPs), καθώς και το σύστημα του πλασμινογόνου παίζουν σημαντικό ρόλο στην αιτιοπαθογένεια της ενδομητρίωσης. Χρειάζεται πάντως, ακόμα σημαντική ερευνητική προσπάθεια για να αναγνωριστεί ποια μόρια είναι πιο σημαντικά στο μηχανισμό της δημιουργίας και της εξέλιξης της ενδομητρίωσης, καθώς και για να ανακαλυφτεί ποια μόρια θα ήταν πιο κατάλληλα ως δείκτες της νόσου και ποια ως στόχοι σε θεραπευτικά μοντέλα.

2.2 Ανοσολογική ανοχή και ενδοπυελική ενδομητρίωση (ΕΕ)

Όπως αναφέρθηκε κατά την ανάπτυξη της παθογένειας της ενδοπυελικής ενδομητρίωσης, έκτοπος ενδομήτριος ιστός πιστεύεται ότι συσσωρεύεται σε διάφορα τμήματα της

πυέλου προσκολλάται στην περιτοναϊκή επιφάνεια. Ανατομικές βλάβες μπορούν να επιτρέπουν στα κύτταρα να επικοινωνούν με τον υπομεσοθηλιακό χώρο (61), όπου πολλαπλασιάζονται, διαδίδονται, αναπτύσσονται και, μερικές φορές εισβάλλουν βαθιά στον υποπεριτοναϊκό χώρο (62).

Έτσι, πρέπει να υπάρχουν ενισχυτικοί παράγοντες που διευκολύνουν τη συνέχιση της ενδομητρίωσης, σε ωοθυλακιορρηκτικές γυναίκες (10%-15%) που εμφανίζουν κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου αυτού (**εικόνα 2**). Άλλοι ερευνητές έχουν προτείνει ότι η μειωμένη ανοσοεπιτήρηση σε γυναίκες που προορίζονται για να αναπτύξουν ενδομητρίωση μπορεί να υποστηρίξουν την προσκόλληση, διατήρηση και εξέλιξη του έκτοπου ενδομήτριου ιστού σε αυτές τις γυναίκες (63). Πράγματι, πολλές μελέτες δείχνουν ότι η ενδομητρίωση σχετίζεται με την καταστολή των κυττάρων του ανοσοποιητικού μηχανισμού.

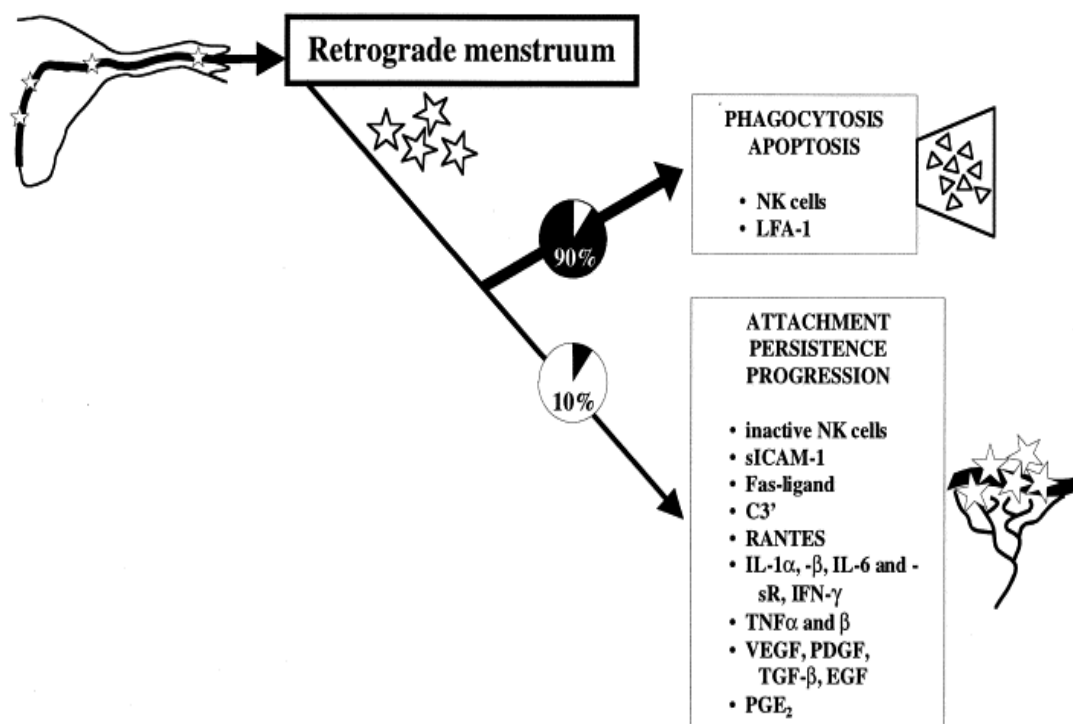
Τα κύτταρα του ενδομητρίου έχει αναφερθεί ότι είναι εγγενώς ανθεκτικά σε απόπτωση και φαγοκυττάρωση (64), αλλά η ενδομητρίωση εμφανίζεται μόνο σε μια μειοψηφία των εμμηνορρυσιακών γυναικών (10%-15%). Οι μηχανισμοί με τους οποίους κύτταρα ενδομητρίου απομακρύνονται από την περιτοναϊκή κοιλότητα, στην πλειοψηφία των γυναικών, είναι ελάχιστα κατανοητοί. Ωστόσο, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι οι φυσικοί φονείς (NK-κύτταρα) μπορούν να υποβοηθούν για αυτό το λόγο.

Τα NK-κύτταρα είναι δραστικά κύτταρα που αναγνωρίζουν και συνήθως καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα, τα προσβεβλημένα από ιό κύτταρα του ξενιστή και μεταμοσχευμένα ξένα κύτταρα. Ο Oosterlynck και οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που απέδειξαν μειωμένη δράση των NK-κυττάρων και μειωμένη κυτταροτοξικότητα έναντι των αυτόλογων κυττάρων του ενδομητρίου σε γυναίκες με ενδομητρίωση, η οποία σχετίζεται με το στάδιο της νόσου (65).

Η ίδια ομάδα έδειξε αργότερα ότι στο περιτοναϊκό υγρό σε γυναίκες με ενδομητρίωση η δράση των NK-κυττάρων ήταν σημαντικά μειωμένη σε σχέση με υγιείς γυναίκες (66). Άλλοι ερευνητές επιβεβαίωσαν αυτά τα ευρήματα σε

ορό (67) και πνευλικό υγρό (68) ασθενών με ενδομητρίωση. Ένας μηχανισμός με τον οποίο μπορεί να αποφευχθεί η ανοσοεπιτήρηση είναι μέσω της έκκρισης πρωτεϊνών που διαμεσολαβούν στην αναγνώριση μεταξύ των ανοσοκυττάρων και του έκτοπου ενδομήτριου ιστού. Ένας τέτοιος παράγοντας είναι η διαλυτή μορφή του μορίου προσκόλλησης ICAM-1. Το ICAM-1 είναι ένας συν-υποδοχέας για τον σύνδεση μόριου προσδέτη-ιντεγκρίνης της επιφάνειας του κυττάρου και εκφράζεται σε μια ποικιλία κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο Viganò και οι συνεργάτες του έχουν δείξει ότι απομονωμένα ενδομητριοτικά στρωματικά κύτταρα εκκρίνουν περισσότερο sICAM-1 από στρωματικά κύτταρα που προέρχονται από ευτοπικό ενδομήτριο. Επιπλέον, η έκφραση του ICAM-1 mRNA και της αντίστοιχης πρωτεΐνης ενισχύεται σε ενδομητριοτικά κύτταρα έναντι στρωματικών κυττάρων ενδομητρίου σε καλλιέργεια (69).

Μια άλλη υπόθεση αφορά την έκφραση του συστήματος Fas-Fas προσδέτη (FasL). Τα FasL-κύτταρα επάγουν την απόπτωση όταν συνδέονται με Fas-κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι Garcia-Velasco et al. έδειξαν ότι περιτοναϊκά μακροφάγα σε ενδομητρίωση ίσως υποκινούν μια Fas-μεσολαβούμενη απόπτωση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος ως περαιτέρω μέσο διαφυγής από την ανοσοεπιτήρηση (70).



Εικόνα 2: Ανοσολογική ανοχή και ενδοπυελική ενδομητρίωση

2.3 Κυτταρική ανοσολογική απάντηση στην ενδοπυελική ενδομητρίωση

Υπάρχουν αρκετά δεδομένα που δείχνουν μια κυτταρική ανοσολογική βάση για την ενδομητρίωση που σχετίζεται με την υπογονιμότητα. Η αύξηση του αριθμού των περιτοναϊκών μακροφάγων (όπως αναλύεται παρακάτω) και αύξηση αριθμού λεμφοκυττάρων μπορούν να βρεθούν σε υπογόνιμες γυναίκες με ενδομητρίωση (71, 72). Μερικά από τα κύτταρα αυτά φαίνεται να ενεργοποιούνται σε ενδομητρίωση (73-75).

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι μια ποικιλία λεμφοειδικών κυττάρων μπορούν να εντοπιστούν σε έκτοπο ενδομήτριο ιστό και τα κύτταρα αυτά είναι πιθανό να συμβάλουν στην παθοφυσιολογία της ενδομητρίωσης (76). Εκτός από τον αυξημένο αριθμό των μακροφάγων, γυναίκες με προχωρημένη ενδομητρίωση έχουν επίσης αυξημένο αριθμό T-λεμφοκυττάρων του πυελικού υγρού (77). Όπως αναφέρεται παρακάτω, πρωτεΐνες του συμπληρώματος, όπως η C3 θα μπορούσαν να διαδραματίσουν ένα ρόλο στην αύξηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Μειωμένη δράση των NK-κυττάρων παρατηρείται στο περιτοναϊκό υγρό (66) και στον ορό (67) γυναικών με ενδομητρίωση.

2.4 Χυμική ανοσολογική απάντηση στην ενδοπυελική ενδομητρίωση

Περίπου 20 χρόνια πριν, οι Weed και Arquembourg (78) παρατηρήθηκαν την ύπαρξη αντισωμάτων IgG και πρωτεϊνών του συμπληρώματος στο ευτοπικό ενδομήτριο γυναικών με ενδομητρίωση. Οι ερευνητές υπέθεσαν ότι ένας αυτοάνοσος μηχανισμός θα μπορούσε εξηγήσει τα αποτελέσματα πτωχής αναπαραγωγικής ικανότητας σε ορισμένες γυναίκες με το σύνδρομο αυτό. Μια δεκαετία αργότερα, οι Mathur et al. (79) ήταν οι πρώτοι που κατάφεραν να περιγράψουν σε ασθενείς με ενδομητρίωση αυτοαντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν αντιγόνα του ενδομητρίου (που κυμαίνονται σε μέγεθος 34-140 kDa) που είναι υποψήφια για αυτοαντιγόνα υπεύθυνα για την ανοσολογική απόκριση (80). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και αλλού (81).

Οι Wild et al., χαρακτηρίσαν ένα από τα πιθανά αυτοαντισώματα ως μια πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το ένζυμο της ανθρακικής ανυδράσης (82). Έχει προταθεί ότι η ποσότητα αυτού του αντισωμάτος στον ορό ή άλλων αυτοαντιγόνων θα μπορούσε να είναι χρήσιμη ως διαγνωστική εξέταση για τη διερεύνηση κινδύνου ενδομητρίωσης. Χρησιμοποιώντας τεχνική ανοσοφθορισμού βασισμένη σε ενδομήτριο οι Wild et al. παρατήρησαν ευαισθησία της τάξης του 83% και ειδικότητα σε ποσοστό 65% μεταξύ των υπογόνιμων ασθενών με λαπαροσκοπικά αποδεδειγμένη ενδομητρίωση (83). Ο Gleicher και οι συνεργάτες του (84) παρατήρησαν ότι ένα σημαντικό ποσοστό των γυναικών με ενδομητρίωση (40%-60%) έχουν αυξημένους τίτλους αυτοαντισωμάτων στον ορό όταν δοκιμάζονται ως προς ένα πάνελ αυτοαντιγόνων. Έτσι, εκτός από την ανάπτυξη ειδικών αντιενδομητρικών αντισωμάτων, μια γενικευμένη αυτοάνοση ενεργοποίηση πολυκλωνικών Β-κυττάρων συνδέεται με ορισμένες περιπτώσεις ενδομητρίωσης (85).

Οι Dmowski et al. (86) αξιολόγησαν την επίδραση των αυτοαντισωμάτων σχετικά με τα ποσοστά επιτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) σε γυναίκες με ενδομητρίωση. Σε αναδρομική ανάλυση 50 ασθενών που είχαν ιστορικό ενδομητρίωσης, οι γυναίκες με στοιχεία #3 αυτοαντισωμάτων («θετικά») είχαν σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό εγκυμοσύνης ανά μεταφορά (23% έναντι 46%)

από τις γυναίκες με αυτοαντισώματα #2 ("αρνητικά"). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το 80% των «θετικών σε αντισώματα» ασθενών είχαν ένδειξη ενεργού ενδομητρίωσης, ενώ μόνο το 36% εκείνων που ταξινομούνται με «αρνητικά αντισώματα» είχαν ενεργή νόσο κατά τη διάρκεια του κύκλου εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Σε ένα μικρότερο υποσύνολο αυτών των «θετικών σε αντισώματα» ασθενών, 8 από 10 που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με 10-15 mg/d πρεδνιζόνη κατά τη διάρκεια ολόκληρου του κύκλου της εξωσωματικής γονιμοποίησης, έμειναν έγκυες, ενώ καμία από τις 25 με «θετικά αντισώματα» ασθενείς με ενδομητρίωση που δεν υποβλήθηκαν σε θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή συνέλαβαν. Αυτή η πολύ πρώιμη διαπίστωση αντιπροσωπεύει μερικά από τα μόνα αποδεικτικά στοιχεία που υποδηλώνουν ότι η θεραπεία με στεροειδή που στοχεύει στην αντιμετώπιση της αυτοφλεγμονής που σχετίζεται με την ενδομητρίωση μπορεί να έχει κλινικό όφελος σε σχέση με την ύπαρξη στειρότητας.

Άλλα στοιχεία του μονοπατιού της χυμικής ανοσίας που φαίνεται να αυξάνονται με την ενδομητρίωση, περιλαμβάνουν το συστατικό του καταρράκτη του συμπληρώματος C39 (87) και της φιμπρονεκτίνης (87). Αν και ορισμένοι ερευνητές έχουν αναφέρει αύξηση στη συγκέντρωση των προσταγλανδινών στο Cul-de-Sac περιτοναϊκό υγρό των ασθενών με ενδομητρίωση (88), άλλοι δεν είναι σε θέση να επιβεβαιώσουν αυτά τα αποτελέσματα (89). Οι επιπτώσεις κατά την έμμηνο ρύση και η επιλογή των ασθενών της ομάδας-ελέγχου δεν εξηγεί πλήρως τις διαφορές σε αυτά τα ευρήματα.

2.5 Συστηματική κυκλοφορία και ενδοπεριτοναϊκή ενδομητρίωση

Το περιτοναϊκό υγρό περιέχει μια ποικιλία από ελεύθερα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, τα NK-κύτταρα, τα λεμφοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα, τα μεσοθηλιακά κύτταρα και τα μαστοκύτταρα. Επιπρόσθετα, κατά την ενδοπεριτοναϊκή ενδομητρίωση έχουμε αύξηση στη συστηματική

κυκλοφορία διαφόρων ορμονών, προσταγλανδινών, κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων.

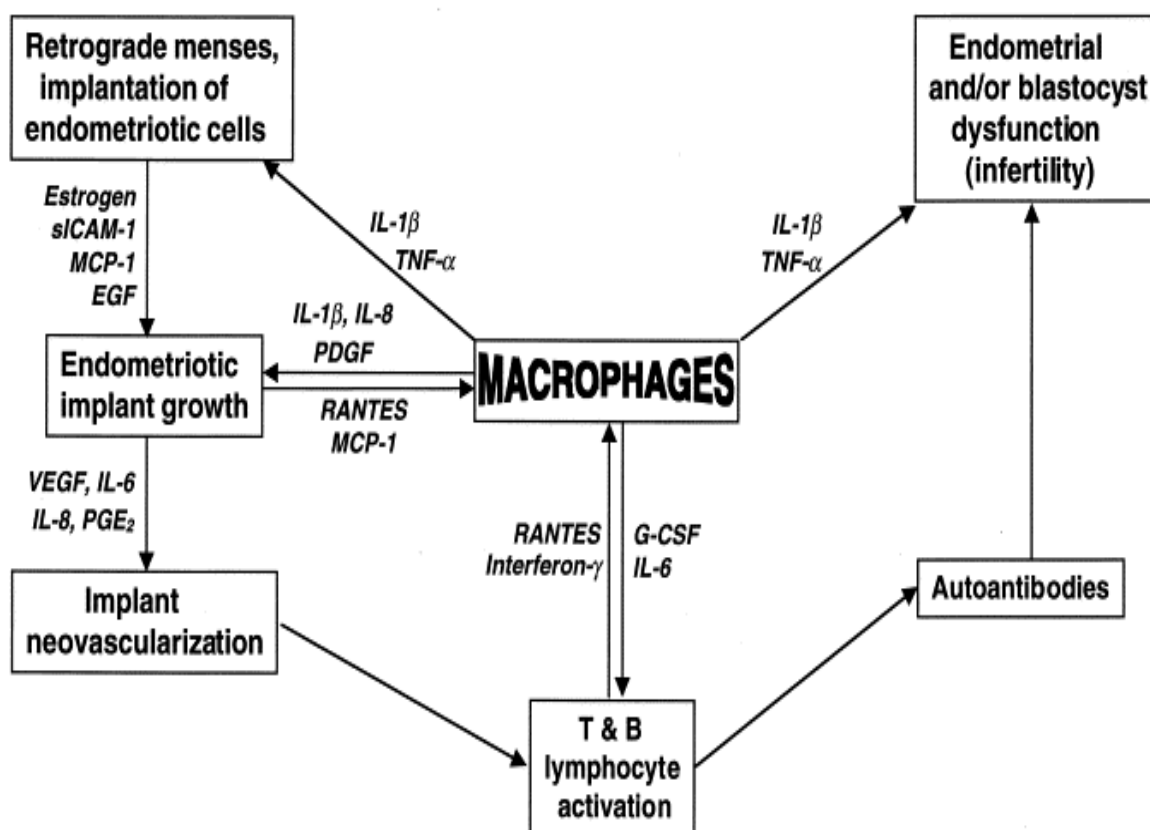
2.5.1 Τα μακροφάγα

Τα μακροφάγα είναι ο πιο άφθονος τύπος κυττάρου στο περιτοναϊκό υγρό και μπορεί να έχει ένα ρόλο στην παθογένεια της ενδομητρίωσης (90). Κανονικά, το περιτοναϊκό υγρό περιέχει $0.5-2.0 \times 10^6$ λευκοκύτταρα/ml, εκ των οποίων το 85% είναι μακροφάγα (91). Η συγκέντρωση των μακροφάγων φαίνεται να παρουσιάζει διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου και είναι υψηλότερη κατά τη διάρκεια της εμμηνορρυσίας (92).

Καθώς αυξάνονται σε αριθμό, τα περιτοναϊκά μακροφάγα ενεργοποιούνται περισσότερο στην ενδομητρίωση (92). Μόλις ενεργοποιηθούν, τα μακροφάγα μπορούν να εκκρίνουν προϊόντα, όπως κυτταροκίνες, προσταγλανδίνες (PGS), συστατικά του συμπληρώματος και υδρολυτικά ένζυμα, που ρυθμίζουν τα γεγονότα στην περιτοναϊκή κοιλότητα (εικόνα 3). Τα μακροφάγα μπορεί να αφαιρέσουν ερυθρά αιμοσφαίρια, κατεστραμμένα θραύσματα ιστού και πιθανώς κύτταρα του ενδομητρίου που αποκτούν πρόσβαση στην περιτοναϊκή κοιλότητα (93).

Ο μεγαλύτερος αριθμός και η ενεργοποίηση των μακροφάγων στον περιτοναϊκή κοιλότητα είναι επίσης πιθανό να συνοδεύει από μία αύξηση κυτταροκινών παραγόμενων από μακροφάγα. Μερικές από αυτές τις κυτταροκίνες μπορεί να ενεργοποιήσουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των T-κυττάρων και στη συνέχεια παράγοντες που προέρχονται από τα T-κύτταρα μπορούν να διαδραματίσουν ένα κρίσιμο ρόλο στην ενεργοποίηση των B-κυττάρων (93). Επιπλέον, είναι πιθανό ότι αυτές οι κυτταροκίνες να επηρεάζουν και άλλα κύτταρα που υπάρχουν στην περιτοναϊκή κοιλότητα, όπως έκτοπα κύτταρα ενδομητρίου. Τα διαθέσιμα δεδομένα δείχνουν ότι τα προϊόντα μακροφάγων του περιτοναϊκού υγρού διαδραματίζουν ενεργό ρόλο στην έναρξη, διατήρηση και την εξέλιξη της ενδομητρίωσης (94). Τα μακροφάγα μπορεί να προκαλέσουν τον πολλαπλασιασμό κυττάρων, όπως ινοβλάστες και

ενδοθηλιακών κυττάρων, που εμπλέκονται στην φλεγμονή και την επισκευή των ιστών μέσω έκκρισης παραγόντων νεοαγγείωσης, όπως οι ιντερλευκίνες, ο $TNF-\alpha$, ο MDGF και ο MCP-1 (92), καθώς και ο VEGF (95).



Εικόνα 3: Ο κεντρικός ρόλος των μακροφάγων στην ανοσοβιολογία της ενδομητρίωσης

2.5.2 NK- Φυσικά κύτταρα φονείς

Μία μείωση στη δραστηριότητα των NK-κυττάρων σε γυναίκες με ενδομητρίωση έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη κυτταροτοξικότητα σε αυτόλογο ενδομήτριο όπως αναφέρθηκε από τους Oosterlynck et al. (96). Η δραστηριότητα των NK κυττάρων μειώθηκε στο περιφερικό αίμα καθώς και στο περιτοναϊκό υγρό των γυναικών με ενδομητρίωση και αυτή η μείωση

σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την πρόοδο του σταδίου της ασθένειας (97). Οι Ho et al. (90) ανέφεραν ότι στο περιτοναϊκό υγρό των γυναικών με σταδίου III-IV ενδομητρίωση, η NK-κυτταροτοξικότητα ήταν σημαντικά χαμηλότερη από ότι σε γυναίκες χωρίς ενδομητρίωση.

Τα ευρήματα αυτά προκάλεσαν τη θεωρία των NK-κυττάρων για την ενδομητρίωση, η οποία προϋποθέτει ότι τα ενδομητριακά κύτταρα είναι στόχοι των φυσικών NK-κυττάρων και ότι η μειωμένη κάθαρση της έκτοπης ενδομήτριου εστίας από τα NK κύτταρα στην περιτοναϊκή κοιλότητα συμβάλλει στην ανάπτυξη της νόσου. Ωστόσο, μπορεί ακόμα να υποστηριχθεί ότι οι μεταβολές στη δράση των NK-κυττάρων που σχετίζονται με την ενδομητρίωση μπορεί να είναι συνέπεια της νόσου. Η μη φυσιολογική δράση των NK κυττάρων μπορεί να είναι το αποτέλεσμα μιας ανισορροπίας στην ανοσολογική απάντηση σε ένα χρόνιο αντιγονικό ερέθισμα, όπως ο έκτοπος ενδομητριακός ιστός, ή σε μια ήδη υπάρχουσα αυτοάνοση αντίδραση που δεν σχετίζεται με την ενδομητρίωση (98). Οι Kikuchi et al. (99) πρότειναν ότι οι αλλαγές στη διαφοροποίηση των NK-κυττάρων ήταν συνέπεια της παρουσίας ενδομήτριου ιστού.

2.5.3 Λεμφοκύτταρα

Περίπου το 30-50% του περιτοναϊκού υγρού είναι λεμφοκύτταρα (96) και ο συνολικός τους αριθμός είναι υψηλότερος σε γυναίκες με ενδομητρίωση (100). Επειδή η T-διαμεσολαβούμενη ανοσία εμπλέκεται με την απόρριψη των ομόλογων μοσχευμάτων (101), μια μοναδική μεταβολή στη λειτουργία των T-κυττάρων σε σχέση με την απόρριψη έχει παρατηρηθεί από καιρό σε γυναίκες με ενδομητρίωση. Τα στοιχεία μέχρι σήμερα δείχνουν ότι οι αλλαγές στην κυτταρική ανοσία συμβαίνουν σε γυναίκες με ενδομητρίωση (102).

Μια αύξηση των T- βοηθητικών κυττάρων (Th) σε σχέση με τον λόγο CD4:CD8 έχει σημειωθεί σε δείγματα περιτοναϊκού υγρού γυναικών με ενδομητρίωση, υποδηλώνοντας μια αυξημένη κυτταρική ανοσιακή δράση στο περιτοναϊκό περιβάλλον αυτών των γυναικών (103). Ωστόσο, οι Ho et al. (90) ανέφεραν ότι δεν υπάρχει συγκεκριμένη μεταβολή του λόγου CD4: CD8 στο περιφερικό αίμα ή στο περιτοναϊκό υγρό σε γυναίκες με

ενδομητρίωση. Σημαντικά υψηλότερος αριθμός των T-κυττάρων και NK-κυττάρων, αλλά μειωμένος αριθμός B-λεμφοκυττάρων και κυττάρων του πλάσματος έχει παρατηρηθεί στο περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση σε σύγκριση με εκείνο σε γυναίκες χωρίς τη νόσο (104).

Γενικά, προβληματίζει το γεγονός ότι τα T-κύτταρα έχουν ειδική κυτταροτοξικότητα έναντι αυτόλογων κυττάρων του ενδομητρίου στα οποίες εκτίθενται τακτικά κατά την έμμηνο ρύση. Όταν υπάρχει έκτοπος ενδομήτριος ιστός στην περιτοναϊκή κοιλότητα, υποβάλλεται σε επεξεργασία από ενεργοποιημένα μακροφάγα και παρουσιάζεται στα T κύτταρα. Με την επίδραση των κυκλοφορούντων μακροφάγων και κυτταροκινών, διαφορετικά T-κυτταρικά υποσύνολα (Th1 και Th2) μπορούν να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται σε ενεργοποιημένα λειτουργικά κύτταρα.

Μετά από την ενεργοποίηση των T-κυττάρων, δύο διαφορετικές ομάδες κυτταροκινών, οι Th1 και Th2 κυτταροκίνες, εκκρίνονται από τα αντίστοιχα κύτταρα. Οι Th1 κυτταροκίνες, συμπεριλαμβανομένων των ιντερλευκινών IL-2 και IL-12 του IFN- γ , καθώς και των TNF- α και TNF- β , γενικά έχουν ως αποτέλεσμα την κυτταρική ανοσία, ενώ οι Th2 κυτταροκίνες, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 και IL-13, ενεργοποιούν τα B-κύτταρα, με συνέπεια τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό τους σε αντισωματο-εκκριτικά κύτταρα του πλάσματος.

2.5.4 Ορμόνες

Η επίδραση των ορμονών στην ανάπτυξη της ενδομητρίωσης πρωτοπαρατηρήθηκε από τον Novak (105). Η πιθανότητα ορμονικής επίδρασης στην εμφάνιση ενδομητρίωσης υποστηρίζεται από την παρουσία υποδοχέων οιστρογόνων της προγεστερόνης σε ενδομητριοτικές βλάβες (106). Πρέπει να γίνει διάκριση μεταξύ της επίδρασης των ορμονών στην έναρξη και στη διατήρηση της ενδομητρίωσης. Η έναρξη της ανάπτυξης της ενδομητρίωσης σε πιθήκους έχει αποδειχθεί ότι είναι ανεξάρτητη από την παρουσία οιστρογόνων. Ωστόσο, η παρουσία οιστραδιόλης ή προγεστερόνης, μόνης ή σε συνδυασμό, απαιτείται για τη διατήρηση της μακροπρόθεσμης βιωσιμότητας του έκτοπου ιστού ενδομητρίου (107). Αυτές οι μελέτες για την

επίδραση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης έγιναν σε ένα ζωικό μοντέλο με ενδομήτριο που εμφυτεύτηκε χειρουργικά.

Στην ενδομητρίωση, η κυκλική έκκριση ωοθηκικών ορμονών φαίνεται να είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη ή τον πολλαπλασιασμό του έκτοπου ενδομητρίου ιστού. Ωστόσο, οι ακριβείς μηχανισμοί που διέπουν τη διαφοροποίηση στην εξάπλωση του ενδομητρίου ιστού δεν είναι σαφείς. Είναι κατανοητό ότι η μιτογόνος επίδραση των οιστρογόνων είναι διαμορφωμένη με τοπικά παραγόμενους παρακρινείς και αυτοκρινείς παράγοντες (108). Ωστόσο, φαίνεται να υπάρχει σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης στο περιτοναϊκό υγρό μεταξύ των γυναικών με ενδομητρίωση και ασθενών απαλλαγμένων από τη νόσο (109).

2.5.5 Προσταγλανδίνες

Οι προσταγλανδίνες είναι δυνατόν να εμπλέκονται στην παθογένεια της ενδομητρίωσης (110). Περιτοναϊκά μακροφάγα από τις γυναίκες με ενδομητρίωση απελευθερώνουν πολύ περισσότερο PGE2 και PGF2a σε σύγκριση με μακροφάγα από γυναίκες χωρίς ενδομητρίωση (111). Ο ιστικός εντοπισμός της οικογένειας των υποδοχέων της προσταγλανδίνης σε ενδομήτριο ιστό δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, αλλά υπάρχουν ενδείξεις ότι οι συγκεντρώσεις των προσταγλανδινών είναι αυξημένες στο περιτοναϊκό υγρό των γυναικών με ενδομητρίωση, υποδηλώνοντας τον πιθανό ρόλο τους στην αιτιολογία της νόσου.

2.5.6 Κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα μακροφάγα της περιτοναϊκής κοιλότητας απελευθερώνουν κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες για την αντιμετώπιση μιας ποικιλίας από φλεγμονώδη ερεθίσματα. Οι ποικίλες δραστηριότητες των κυτταροκινών περιλαμβάνουν: πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, επαγωγή της απελευθέρωσης ορμονών, ενζύμων και πρωτεϊνών οξείας φάσης, ενίσχυση διαφόρων κυτταροτοξικών δραστηριοτήτων, ρύθμιση της έκκρισης ανοσοσφαιρίνης και χημειοταξία. Σε γενικές γραμμές, οι κυτταροκίνες ασκούν βιολογικές επιδράσεις σε διάφορους τύπους κυττάρων (δηλαδή είναι

πλειοτροπικές), αλλά επιπρόσθετα μπορούν να προκαλέσουν είτε αρνητική ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης είτε παραγωγή άλλων κυτταροκινών.

Ιντερλευκίνη 1. Υψηλές συγκεντρώσεις IL-1 έχουν βρεθεί στο περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση (103). Σε καλλιέργεια, μακροφάγα από το περιτοναϊκό υγρό ασθενών με ενδομητρίωση παράγουν περισσότερη IL-1 από ότι σε υγιείς γυναίκες (112). Υπάρχουν πολλές φυσιολογικές και παθολογικές επιπτώσεις που αποδίδονται στην IL-1 και μπορεί να σχετίζονται με την ενδομητρίωση. Η IL-1 επάγει τη σύνθεση των προσταγλανδινών και διεγείρει τον πολλαπλασιασμό ινοβλαστών, την εναπόθεση κολλαγόνου και το σχηματισμό ινωδογόνου, που θα μπορούσαν να συμβάλουν στην ίνωση και στο σχηματισμό πρόσφυσεων που σχετίζονται με την ενδομητρίωση. Επιπλέον, η IL-1 διεγείρει τον πολλαπλασιασμό Β-κυττάρων και την παραγωγή αντισωμάτων που θα μπορούσαν να σχετίζονται με τα αντισώματα που συνδέονται με την ασθένεια (105). Η IL-1 διεγείρει επίσης την έκκριση IL-2 από τα Τ-κύτταρα και τα NK-κυττάρα, τα οποία με τη σειρά τους μπορούν να προκαλέσουν τον πολλαπλασιασμό των NK-κυττάρων και τη διαφοροποίηση των Τ-κυττάρων (113).

Ιντερλευκίνη 6. Η IL-6 είναι μια ισχυρή κυτταροκίνη που έχει διφορούμενες επιπτώσεις, πολλές από τις οποίες ενδεχομένως να σχετίζονται με την επισκευή ιστών, συμπεριλαμβανομένης της διέγερσης της αγγειογένεσης (114). Η IL-6 μπορεί να εκκρίνεται από τα μακροφάγα ως απόκριση σε μια ποικιλία από ουσίες που βρίσκονται στο περιτοναϊκό υγρό, συμπεριλαμβανομένης της IL-1 (115). Η IL-6 είναι ένας ενεργοποιητής των μακροφάγων (116) και προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό του ενδομητρίου (117). Ενδομητριοτικά στρωματικά κύτταρα παράγουν IL-6 mRNA και πρωτεΐνη IL-6 (118). Επιπλέον, αυξημένες συγκεντρώσεις της IL-6 έχουν παρατηρηθεί σε ιστοκαλλιέργεια έκτοπου ενδομητρίου (119), σε περιφερικό αίμα (120) και περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση (122). Στο σύνολό τους, τα διαθέσιμα στοιχεία δείχνουν ότι η IL-6 μπορεί να συμμετέχει στην παθογένεση της ενδομητρίωσης. Ωστόσο, περαιτέρω έρευνα χρειάζεται να διευκρινίσει τον ακριβή ρόλο της στη διαδικασία της νόσου.

Ιντερλευκίνη 8. IL-8 είναι μια ισχυρή αγγειογενετική, προφλεγμονώδης, αυξητική κυτταροκίνη (122). Προκαλεί χημειοταξία για τα ουδετερόφιλα και την έκφραση πολλών μορίων κυτταρικής προσκόλλησης (122). Μπορεί επίσης να

οδηγήσει σε ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων (123) και ως εκ τούτου να συμβάλει στην παθογένεση φλεγμονωδών νόσων, όπως η ενδομητρίωση. Η παρουσία της φλεγμονής και η νεοαγγείωση που παρατηρείται στα έκτοπα ενδομητριακά εμφυτεύματα, καθώς και η παρουσία φλεγμονωδών ουδετερόφιλων σε αυτές τις βλάβες είναι συμβατή με τις βιολογικές δράσεις της IL-8 (124).

Οι Rana et al. (125) έχουν αναφέρει αυξημένες συγκεντρώσεις της IL-8 στο περιτοναϊκό υγρό σε γυναίκες με ενδομητρίωση. Επίσης, έχει προταθεί ότι η IL-8 διεγείρει την ανάπτυξη των έκτοπων (126) καθώς και των ευτοπικών ενδομητριακών κυττάρων (127).

Επιπλέον, το ενδομήτριο παράγει IL-8 (128), η οποία, με τη σειρά της, διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των στρωματικών κυττάρων του ενδομητρίου (129). Αυτό το εύρημα μπορεί να είναι σημαντικό, δεδομένου ότι είναι πιθανό ότι η υπερβολική ενδομητριακή αγγειογένεση παίζει ρόλο στην παθογένεση της ενδομητρίωσης. Φαίνεται ότι η IL-8 σχετίζεται με την παθογένεση της ενδομητρίωσης.

Ιντερλευκίνη 10. Σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις της IL-10 βρίσκονται σε γυναίκες που παρουσιάζουν πρώιμα στάδια της ενδομητρίωσης σε σύγκριση με φυσιολογικές γυναίκες (130). Η IL-10 βρίσκεται επίσης σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο περιτοναϊκό υγρό, γεγονός το οποίο μπορεί να είναι αποτέλεσμα της ενισχυμένης δραστηριότητας των μακροφάγων σε γυναίκες με ενδομητρίωση (125). Δεδομένου ότι τόσο η IL-10 όσο και η IL-6 είναι ισχυροί ρυθμιστές της φλεγμονώδους αντίδρασης, είναι πιθανό ότι η αύξηση της IL-10 και της IL-6 είναι υπεύθυνη, εν μέρει, για τη διαταραγμένη ανοσοποιητική ρύθμιση που παρατηρείται σε ασθενείς με ενδομητρίωση.

Ιντερλευκίνη 13. Η IL-13 είναι μια κυτταροκίνη ανασταλτική της δράσης των μακροφάγων. Οι McLaren et al. (115) ανέφεραν ότι οι γυναίκες με ενδομητρίωση είχαν σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις IL-13 στο περιτοναϊκό υγρό, σε σύγκριση με τις γυναίκες χωρίς ενδομητρίωση. Ωστόσο, περαιτέρω εργασίες απαιτούνται για να επιβεβαιωθούν τα ευρήματα και να αποσαφηνιστεί ο ρόλος της IL-13 στην παθογένεια της ενδομητρίωσης.

Παράγοντας νέκρωσης όγκου-α (TNF-α). Η συγκέντρωση του TNF-α, μιας κυτταροκίνης με ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων, είναι επίσης

αυξημένη στο περιτοναϊκό υγρό των γυναικών με ενδομητρίωση (131) και οι συγκεντρώσεις του μπορούν να συσχετίζονται με το στάδιο της νόσου (131). Ο TNF-α εκκρίνεται από μια μεγάλη ποικιλία κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών, των μακροφάγων και των T- και B-κυττάρων και έχει διφασική επίδραση στην ανάπτυξη ανθρώπινων κυττάρων αδενοκαρκινώματος *in vitro* (132). Οι Iwabe et al. (123) έδειξαν ότι ο TNF-α διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των ενδομητριοειδών στρωματικών κυττάρων μέσω της επαγωγής της έκφρασης της IL-8 και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ο TNF-α μπορεί να είναι ένας από τους βασικούς παράγοντες για την παθογένεση της ενδομητρίωσης.

Διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1 (ICAM-1). Το ICAM-1 είναι ένα διαλυτό μόριο που μπορεί να επηρεάσει τις ανοσολογικές λειτουργίες και να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην έναρξη ανάπτυξης ενδομητριοειδούς βλάβης. Η ICAM-1-διαμεσολαβούμενη κυτταρική πρόσφυση είναι σημαντική για διάφορες ανοσολογικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταροτοξικής δράσης των NK κυττάρων εναντίον του ενδομητρίου. Σε ασθενείς με ενδομητρίωση, η συγκεντρώση του διαλυτού ICAM-1 στο περιτοναϊκό υγρό είναι αυξημένη και αυτό σχετίζεται με τη δραστηριότητα των NK-κυττάρων. Αυτό το εύρημα υποδηλώνει ότι η αυξημένη έκφραση του ICAM-1 μειώνει τη δράση των NK-κυττάρων και επιταχύνει την εξέλιξη της νόσου (133). Συνοψίζοντας, τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με το ICAM-1 είναι σύμφωνα με τον ισχυρισμό ότι αυτή η κυτταροκίνη παίζει ρόλο στην παθοφυσιολογία της ενδομητρίωσης.

Χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων 1 (MCP-1). Έχει βρεθεί σε περιτοναϊκό υγρό από ασθενείς με ενδομητρίωση αυξημένη χημειοτακτική δραστηριότητα για τα μακροφάγα (134). Ο MCP-1 είναι ένας ισχυρός χημειοτακτικός και ειδικός παράγοντας ενεργοποίησης μονοκυττάρων. Ο MCP-1 εκκρίνεται από ένα αριθμό κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών κυττάρων, των ινοβλαστών (135) και των λευκοκυττάρων (136). Η συγκέντρωση της MCP-1 είναι υψηλή στο περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση (124) και σχετίζεται με τη βαρύτητα της νόσου.

Αυξημένες συγκεντρώσεις της MCP-1 μπορεί να διαδραματίσουν ρόλο στην ανάπτυξη και διατήρηση έκτοπου ενδομητρίου ιστού, όχι μόνο με ενεργοποίηση των μακροφάγων και έκκριση αυξητικών παραγόντων και

κυτταροκινών, αλλά και από την απευθείας ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του ενδομητρίου (124). Το εάν η αύξηση της MCP-1 στο περιτοναϊκό υγρό αποτελεί αιτία ή συνέπεια της νόσου δεν είναι γνωστό.

RANTES. Η RANTES (ρυθμιζόμενη από την ενεργοποίηση, κανονικής έκφρασης και έκκρισης T-κυττάρων) είναι μία κυτταροκίνη με ικανότητες χημειοταξίας και ενεργοποίησης μονοκυττάρων, μακροφάγων, T-λεμφοκυττάρων και ηωσινοφίλων που ανακαλύφθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1990 (137). Η συγκέντρωση της RANTES στο περιτοναϊκό υγρό είναι αυξημένη σε γυναίκες με ενδομητρίωση και η συγκέντρωσή της σχετίζεται με τη βαρύτητα της νόσου (126). Ο ακριβής ρόλος αυτής της κυτταροκίνης στην παθοφυσιολογία της ενδομητρίωσης δεν είναι ακόμα απολύτως κατανοητός.

Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF). Ο VEGF είναι ένας ισχυρός αγγειογενετικός παράγοντας, που εμπλέκεται τόσο στη φυσιολογική όσο και στην παθολογική αγγειογένεση. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η οικογένεια του VEGF εμπλέκεται τόσο με την αιτιολογία όσο και με τη διατήρηση της περιτοναϊκής ενδομητρίωσης (138). Το περιτοναϊκό υγρό ασθενών με ενδομητρίωση περιέχει σημαντικά μεγαλύτερες ποσότητες VEGF σε σχέση με φυσιολογικές γυναίκες και υπάρχει αυξημένη συγκέντρωση του VEGF στο περιτοναϊκό υγρό γυναικών με προχωρημένη ενδομητρίωση (139). Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι η φλεγμονή που σχετίζεται με την ενδομητρίωση μπορεί να προωθήσει την αγγειογένεση για τη σταδιακή ανάπτυξη της νόσου μέσω αυξημένων συγκεντρώσεων VEGF (119). Η θεραπεία των γυναικών με ενδομητρίωση με κάποιον GnRH αγωνιστή έχει ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση στη μέση συγκέντρωση του VEGF στο περιτοναϊκό υγρό (140), υποδεικνύοντας ένα σημαντικό ρόλο για τον VEGF στη δημιουργία και τη διατήρηση της ενδομητρίωσης.

Ινσουλινικός αυξητικός παράγοντας (IGF). Ο ινσουλινικός αυξητικός παράγοντας (IGF) είναι ένα άλλο γνωστό μιτογόνο πεπτιδίο και έχει πιθανό ρόλο ως ένας από τους πολλούς διαμεσολαβητές των οιστρογόνων και άλλων αυξητικών παραγόντων σε διάφορους ιστούς του σώματος (141). Η συγκέντρωση του IGF-I στο περιτοναϊκό υγρό είναι σημαντικά υψηλότερη (142), ενώ η συγκέντρωση της IGF-δεσμευτικής πρωτεΐνης-3 (IGFBP-3) και το

σχετικό ποσοστό της IGFBP-2 είναι σημαντικά χαμηλότερα σε ασθενείς με ενδομητρίωση από ότι στις γυναίκες χωρίς ενδομητρίωση, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή του συστήματος IGF στην παθοφυσιολογία της ενδομητρίωσης.

Τα πεπτίδια του IGF και οι υποδοχείς τους έχουν επίσης βρεθεί ανοσοϊστοχημικά σε έκτοπους ενδομήτριους ιστούς (143). Επιπλέον, τα IGFs έχουν μιτογόνο δράση σε στρωματικά κύτταρα ενδομητρίου που καλλιεργήθηκαν *in vitro* (128), υποδηλώνοντας το ρόλο της ομάδας αυτή των πεπτιδίων στον παθογένεια της ενδομητρίωσης.

Αυξητικός παράγοντας ανάπτυξης αιμοπεταλίων (PDGF). Ο PDGF είναι ένα καλά χαρακτηρισμένο προϊόν έκκρισης των ενεργοποιημένων μακροφάγων και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην φλεγμονώδη αντίδραση, ως ένα ισχυρό μιτογόνο για τους ινοβλάστες και τα αγγειογενετικά πρόδρομα κύτταρα καθώς και για κύτταρα του ενδομητρίου (144). Ο PDGF έχει εντοπιστεί στο περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση (145) και έχει σημαντική δόσο-εξαρτώμενη πολλαπλασιαστική επίδραση στο ενδομήτριο στρωματικών και επιθηλιακών κυττάρων (146). Απαιτούνται περαιτέρω προσπάθειες για να διευκρινίσει ο ακριβής ρόλος του PDGF στην ενδομητρίωση.

Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF). Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) έχει μιτογόνο δράση στα ανθρώπινα ενδομητριακά κύτταρα (147). Η συγκέντρωση του EGF στο περιτοναϊκό υγρό είναι πλούσια σε γυναίκες με ενδομητρίωση (148). Επίσης, η συγκέντρωση του EGF σχετίζεται θετικά με την ημέρα του εμμηνορυσιακού κύκλου και είναι υψηλότερη κατά την ωχρινική φάση (149). Η δράση των οιστρογόνων στο ενδομήτριο μπορεί να ρυθμίζεται από πεπτιδικούς παράγοντες αύξησης, ιδίως από τον EGF (150). Ο EGF επιδρά μέσω της σύνδεσής του με τον κυτταρικό υποδοχέα του, ο οποίος εκφράζεται στους αδένες και το στρώμα του ευτοπικού και έκτοπου ενδομητρίου των γυναικών με ενδομητρίωση (151). Ο ρόλος του EGF στην παθογένεια της ενδομητρίωσης παραμένει ασαφής.

Βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (bFGF). Ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (bFGF) είναι μια ηπαρίνο- δεσμευτική αγγειογενετική πρωτεΐνη που είναι ιδιαίτερα μιτογόνος για τα τριχοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro* και μπορεί να προκαλέσει την αγγειογένεση *in*

νίνο (152). Η έκκριση του bFGF από τα κύτταρα του ενδομητρίου αυξάνεται ως απόκριση στην οιστραδιόλη και αναστέλλεται από την προγεστερόνη (153). Ο bFGF είναι παρών στο ενδομητριακό αδενικό επιθήλιο και είναι ένα ισχυρό μιτογόνο για τα στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου σε κυτταρική καλλιέργεια (131). Η συγκέντρωση του bFGF στο περιτοναϊκό υγρό δε διαφέρει σημαντικά μεταξύ των γυναικών με ή χωρίς ενδομητρίωση (154). Παρά το γεγονός ότι τα *in vitro* ευρήματα δείχνουν ότι μπορεί ο bFGF να εμπλέκεται στην ενδομητρίωση, δεν υπάρχουν ακόμα επαρκή στοιχεία που να υποστηρίζουν αυτή τη θεωρία.

Παράγοντας διέγερσης αποικιών των μακροφάγων (M-CSF). Η συγκέντρωση του αυξητικού παράγοντα των αποικιών των μακροφάγων (M-CSF), σχετίζεται με τον συνολικό αριθμό των μακροφάγων (155). Ο M-CSF έχει εντοπιστεί σε σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις στο περιτοναϊκό υγρό των γυναικών με ενδομητρίωση (155) και σχετίζεται με τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων προς φαινοτυπικά ενεργοποιημένα μακροφάγα, εκτός του να λειτουργούν ως χημειοτακτικός παράγοντας για τα μονοκύτταρα του αίματος. Ο M-CSF μπορεί να ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό του ενδομητρικού ιστού (156) και ως εκ τούτου έχει ένα ρόλο στην ανάπτυξη της ενδομητρίωσης.

Μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β (TGF-β). Εκτός από την αυξητική του δράση, ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β (TGF-β) είναι ένα από τα πιο ισχυρά χημειοτακτικά για τα ανθρώπινα μονοκύτταρα και είναι επαγωγέας της ίνωσης και της αγγειογένεσης (110). Επιπλέον, ο TGF-β έχει ανοσολογικές επιδράσεις και αναστέλλει τη λειτουργία T-λεμφοκυττάρων, B-λεμφοκυττάρων και τις λειτουργίες των NK-κυττάρων (Rook et al., 1986). Το περιτοναϊκό υγρό των γυναικών με ενδομητρίωση περιέχει αυξημένη TGF-β δραστηριότητα. Οι Oosterlynck et al. (117) πρότειναν ότι η μειωμένη NK-δραστηριότητα στο περιτοναϊκό υγρό σε γυναίκες με ενδομητρίωση είναι δευτερεύουσα σε σχέση με την αυξημένη TGF-β δραστηριότητα. Οι γυναίκες με σταδίου III και IV ενδομητρίωση έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις TGF-β σε σύγκριση με τις γυναίκες με ηπιότερη ενδομητρίωση και ότι επιτεύχθηκε σημαντική μείωση στις συγκεντρώσεις μετά τη θεραπεία με κάποιον αγωνιστή GnRH (138), υποδεικνύοντας ένα ρόλο για παρακρινή δραστηριότητά του στην ενδομητρίωση.

Ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας (HGF). Ο Ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας (HGF) είναι ένας αυξητικός παράγοντας που η έκκρισή του επάγεται ύστερα από τραυματισμό αγγείου με ποικίλες επιδράσεις σε επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα. Αυτές οι επιδράσεις περιλαμβάνουν τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την εξωκυττάρια παραγωγή (157). Η συγκέντρωση του HGF στο περιτοναϊκό υγρό των γυναικών με στάδιο III-IV είναι σημαντικά υψηλότερη από ότι σε γυναίκες χωρίς ενδομητρίωση. Η συγκέντρωσή του σε γυναίκες με σταδίου I-II ενδομητρίωση φαίνεται να είναι ενδιάμεση (158). Η έκκριση του HGF είναι σημαντικά αυξημένη σε καλλιέργεια στρωματικών κυττάρων του ενδομητρίου (159) και ο HGF διεγείρει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τις μορφογενετικές αλλαγές σε ενδομητριακά επιθηλιακά κύτταρα (159). Δεδομένης της γνωστής μιτογόνου ιδιότητάς του HGF, η αυξημένη έκκρισή του από ευτοπικά στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου και η υψηλότερη συγκέντρωσή του σε περιτοναϊκό υγρό προχωρημένης ενδομητρίωσης, σημαίνει ότι μπορεί να διαδραματίσει έναν ρόλο στην εξέλιξη της νόσου.

Επιπλέον, τα επίπεδα της ανοσορυθμιστικής, προφλεγμονώδους και αγγειογενετικής λεπτίνης και της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), που συνδέεται θετικά με την αύξηση της λεπτίνης κατά τη συστηματική φλεγμονή είναι αυξημένα σε γυναίκες με ενδοπυελική ενδομητρίωση.

2.6 Δείκτες κυτταρικής απόπτωσης σε γυναίκες με ενδοπυελική ενδομητρίωση

Το γεγονός ότι το ευτοπικό ενδομήτριο γυναικών με ενδομητρίωση εμφανίζει μεταβολές σε έκτοπο ιστό και ότι αυτές αλλαγές δεν βρίσκονται στο ευτοπικό ενδομήτριο γυναικών χωρίς ενδομητρίωση έχει ενισχύσει την άποψη ότι η πρωταρχικός ανωμαλία στην ενδομητρίωση μπορεί να βρεθεί στο ευτοπικό ενδομήτριο. Τα κύτταρα και οι ιστοί που προέρχονται από ένα τέτοιο μεταλλαγμένο ενδομήτριο και διασπείρονται στην περιτοναϊκή κοιλότητα, έχει προταθεί ναότι έχουν μια μεγαλύτερη δυνατότητα για εμφύτευση και ανάπτυξη στο περιτόναιο, οδηγώντας στην ανάπτυξη ενδομητρίωσης. Από την άλλη πλευρά, πολλές διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ ευτοπικού ενδομητρίου και

έκτοπου ιστού ασθενών με ενδομητρίωση που μπορεί να εξηγηθεί ως άμεση συνέπεια του διαφορετικού περιβάλλοντος του περιτοναϊκού υγρού (135-140). Μία από τις μεταβολές του ενδομητρίου που εμφανίζονται σε ευτοπικό και έκτοπο ενδομήτριο από τις γυναίκες με ενδομητρίωση αναφέρεται στην ρύθμιση της απόπτωσης. Μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν αποκαλύψει την παρουσία της απόπτωσης σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα ενδομητρίου κατά το τέλος της εκκριτικής φάσης.

Η απόπτωση εντοπίστηκε στο αδενικό επιθήλιο στο ενδομήτριο στο τέλος της εκκριτικής φάσης και κατά την έμμηνο ρύση, ενώ πολύ μικρή απόπτωση εντοπίστηκε κατά τη διάρκεια της παραγωγικής φάσης ή στην αρχή της εκκριτικής φάσης. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων του ενδομητρίου στην παραγωγική φάση σχετίζεται γενικά με τη δράση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης, ενώ πιστεύεται ότι η προγεστερόνη οδηγεί τα κύτταρα στο μονοπάτι της διαφοροποίησης, με αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης.

Λαμβάνοντας υπόψη τον κύκλο της απόπτωσης στο φυσιολογικό ενδομήτριο, φαίνεται πιθανό ότι τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη μπορεί να ρυθμίσουν τα σήματα που οδηγούν σε απόπτωση σε αυτόν τον ιστό.

2.6.1 Τί είναι η απόπτωση;

Η **απόπτωση** είναι μια διεργασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης το κύτταρο συρρικνώνεται, το ίδιο και η χρωματίνη, η μιτοχονδριακή μεμβράνη διαρρηγνύεται και το κύτταρο αποδομείται και σχηματίζει αποπτωτικά σώματα, τα οποία φαγοκυτταρώνονται, χωρίς φλεγμονή. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης έχουμε πρωτεϊνοσύνθεση. Η διαδικασία της απόπτωσης είναι καταστροφική και αυτοενισχυόμενη και μη αντιστρεπτή.

Πριν η πραγματική διαδικασία απόπτωσης λάβει χώρα, αποπτωτικά σήματα πρέπει να ωθήσουν τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες να αρχίσουν το αποπτωτικό μονοπάτι. Αυτό το στάδιο επιτρέπει στα αποπτωτικά σήματα να προκαλέσουν τον κυτταρικό θάνατο ή η διαδικασία να σταματήσει αν το

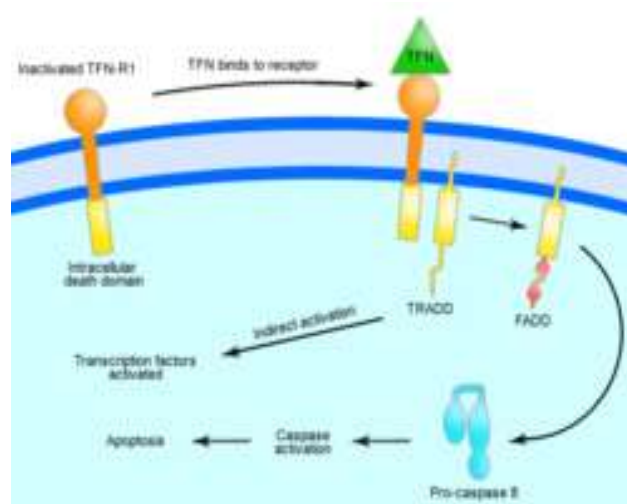
κύτταρο δε χρειάζεται να πεθάνει. Πολλές πρωτεΐνες συμμετέχουν στην απόπτωση, αλλά έχουν αναγνωριστεί δύο κύριες μέθοδοι ρύθμισης: η στόχευση της λειτουργικότητας των μιτοχονδρίων (μονοπάτι εκ των έσω) και η άμεση με τη μεταβίβαση του σήματος μέσω πρωτεϊνών-προσαρμογέων. Ένα άλλο εξωγενές μονοπάτι ενεργοποίησης που έχει μελετηθεί είναι η αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου μέσα στο κύτταρο που προκαλεί απόπτωση μέσω μιας πρωτεΐνης που προσδένει ασβέστιο, την καλπαΐνη (calpain).

Άμεση σηματοδοτική οδός

Δύο θεωρίες σχετικά με την άμεση εκκίνηση των αποπτωτικών μηχανισμών στα θηλαστικά έχουν προταθεί: το μοντέλο που θεωρεί ότι η απόπτωση προκαλείται από τον παράγοντα TNF (παράγοντας νέκρωσης όγκων) και το μοντέλο σύνδεσης Fas-συνδέτη Fas. Και τα δύο μοντέλα περιλαμβάνουν τους υποδοχείς TNF (TNFR) οι οποίοι ενεργοποιούνται από εξωγενή σήματα.

Μονοπάτι του TNF

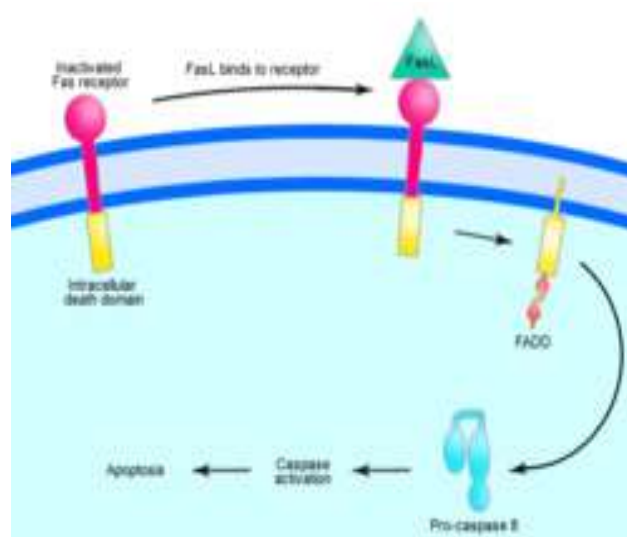
Ο TNF είναι μια κυτταροκίνη που παράγεται κυρίως από ενεργοποιημένα μακροφάγα και αποτελεί το κύριο εξωκυττάριο ενδιάμεσο της απόπτωσης. Τα περισσότερα ανθρώπινα σωματικά κύτταρα έχουν δύο υποδοχείς TNF: TNF-R1 και TNF-R2. Η πρόσδεση του TNF στον TNF-R1 έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί στην ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών, μέσω πρωτεϊνών που προσδένονται στην περιοχή θανάτου του υποδοχέα TNF (TNF receptor-associated death domain ή TRADD). Αντίστοιχα, η ενεργοποίηση των κασπασών πραγματοποιείται με τη δημιουργία του συμπλέγματος DISC, που ακολουθεί τη στρατολόγηση της πρωτεΐνης FADD (Fas-associated death domain protein ή FADD) στην περιοχή θανάτου του υποδοχέα FAS (160). Η πρόσδεση του συνδέτη στον υποδοχέα θανάτου μπορεί επίσης να οδηγήσει έμμεσα στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση και την αντίδραση σε φλεγμονές (161) (**εικόνα 4**).



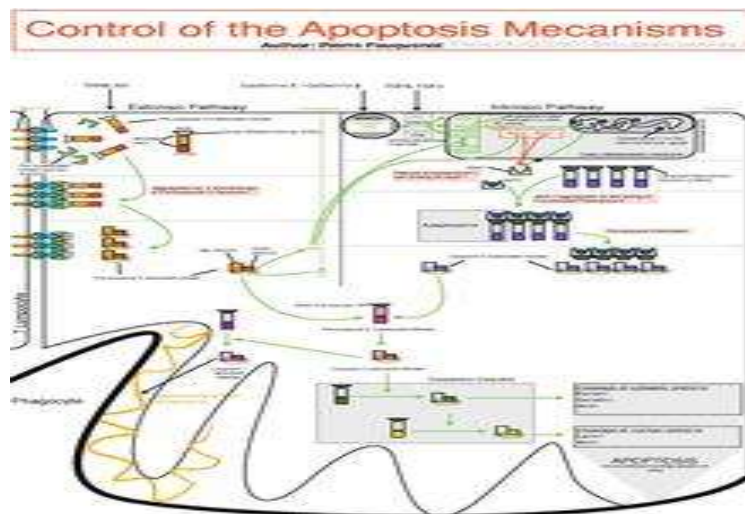
Εικόνα 4: Μονοπάτι του TNF

Μονοπάτι του Fas

Ο υποδοχέας Fas (γνωστός ως Apo-1 ή CD95) προσδένει τον συνδέτη Fas (FasL), μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια TNF. Η αλληλεπίδραση Fas και FasL έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπλόκου DISC, το οποίο περιλαμβάνει το FADD, την κασπάση-8 και την κασπάση-10. Σε κάποιους τύπους κυττάρων (τύπου I), η κασπάση-8 ενεργοποιεί άμεσα άλλες κασπάσες και πυροδοτεί την εκτέλεση της απόπτωσης. Σε άλλους τύπους κυττάρων (τύπου II), το Fas-DISC ξεκινά μια διαδικασία που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση προαποπτωτικών παραγόντων από τα μιτοχόνδρια και την ενεργοποίηση της κασπάσης-8 (162) (εικόνα 5).



Εικόνα 5: Μονοπάτι του FAS



Εικόνα 7: Έλεγχος του μηχανισμού της απόπτωσης

2.6.2 Bcl-2 στο φυσιολογικό ενδομήτριο

Μέχρι σήμερα, ο ακριβής μηχανισμός της απόπτωσης στο ανθρώπινο ενδομήτριο δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος, αν και το BCL-2 θεωρείται ότι αναστέλλει την απόπτωση στο ανθρώπινο ενδομήτριο κατά τη διάρκεια της παραγωγικής φάσης (163). Το BCL-2 εκφράζεται κυκλικά σε αδενικά και στρωματικά κύτταρα ενδομητρίου αιχμές κατά το τέλος της παραγωγικής φάσης και μειώνεται κατά το τέλος της εκκριτικής φάσης και της εμμήνου ρύσης (164). Σε αντίθεση, τα λεία μυϊκά κύτταρα του μυομητρίου έδειξαν συνεχή παραγωγή Bcl-2 πρωτεΐνης σε όλη τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου (164). Σε ποντίκια με έλλειψη Bcl-2-, πολλοί αποπτωτικοί δείκτες συχνά παρατηρούνται στους αδένες και το μυομήτριο (165). Ως εκ τούτου, το BCL-2 μπορεί να είναι ένα βασικό γονιδιακό προϊόν για την επιβίωση και των αδενικών κυττάρων του ενδομητρίου και για τα λεία μυϊκά κύτταρα του μυομητρίου.

Μερικά μεταγραφικά μόρια μπορούν να ρυθμίζουν την έκφραση της Bcl-2 στο ανθρώπινο ενδομήτριο. Η πρωτεΐνη P53 δεν εντοπίζεται σε αδενικά ή στρωματικά κύτταρα κατά τη διάρκεια του κύκλου (164). Σε αντίθεση, το πρότυπο χρώσης του c-Jun και SP-3 σε αδενικά κύτταρα ήταν παρόμοιο με εκείνο της Bcl-2, σε σχέση με το πρότυπο, την ένταση και την κυτταρική κατανομή σε όλη τη διάρκεια του

έμμηνου κύκλου, γεγονός που υποδηλώνει ότι η c-Jun και SP-3 μπορεί να έχουν κάποιο ρόλο στην ρύθμιση της έκφρασης της BCL-2 (165).

Αν και έκφραση της BCL-2 στο ανθρώπινο ενδομήτριο έχει περιγραφεί (163), το bcl-2 γονίδιο είναι μόνο ένα μέλος της πολυγονιδιακής αυτής οικογένειας, που αποτελείται από πολυάριθμες ομόλογες πρωτεΐνες της BCL-2 (166). Άλλα μέλη της οικογένειας γονιδίων bcl-2 είναι πιθανό να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της απόπτωσης από τους μηχανισμούς που είναι ανεξάρτητοι ή συμπληρωματικοί προς τη δράση της BCL-2. Μέλη της οικογένειας BCL-2 αλληλεπιδρούν μέσω ομοδιμερών ενώσεων και ετεροδιμερών (167), έτσι ώστε η ευαισθησία του κάθε κυττάρου σε ένα δυνητικό αποπτωτικό ερέθισμα να μπορεί να καθορίζεται από την αναλογία των προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών γονιδίων της Bcl-2 οικογένειας που βρίσκονται στο κύτταρο εκείνη τη στιγμή (167).

Η BAX είναι ένα μέλος της BCL-2 οικογένειας που προάγει την ευαισθησία στον κυτταρικό θάνατο, ενδεχομένως με την αντίθετη επίδραση στη δράση της BCL-2 στην κυτταρική επιβίωση μέσω της αλληλεπίδρασης ετεροδιμερών (167).

Ένα άλλο μέλος αυτής της οικογένειας των γονιδίων, το bcl-x, αποτελεί ένα ενδιαφέρον παράδειγμα ενιαίου γονιδίου που, μέσω μηχανισμών εναλλακτικού ματίσματος, κωδικοποιεί ένα θετικό και έναν αρνητικό ρυθμιστή της απόπτωσης (166).

Οι Tao et al. (168) ανέφεραν ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης BAX ήταν μειωμένα σε παραγωγικό ενδομήτριο και αυξημένα δραματικά στην εκκριτική φάση, όταν η απόπτωση ήταν πιο διαδεδομένη.

Η BAK (BCL-2 ομόλογη ανταγωνιστής/δολοφόνος) είναι ένα άλλο προαποπτωτικό μέλος της BCL-2 οικογένειας και πιστεύεται ότι επιταχύνει την απόπτωση σε κύτταρα θηλαστικών, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω αλληλεπίδρασης με την BCL-2 και την BCL-XI (169).

Τέλος, αρκετοί επιστήμονες έχουν προτείνει ότι τα στεροειδή των ωοθηκών μπορεί να ρυθμίσουν την απόπτωση του ενδομητρίου μέσω αύξησης και μείωσης της έκφρασης της Bcl-2 και της Bax (170). Ο κύκλος της έκφρασης της BCL-2 στα αδενικά κύτταρα του ενδομητρίου σχετίζεται με τις μεταβολές των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης σε όλη τη διάρκεια του κύκλου (163). Στο πλαίσιο αυτό, οι Critchley et al. (171)

ανέφεραν αύξηση της έκφρασης της BCL-2 πρωτεΐνης στο αδενικό και επιφανειακό επιθήλιο ενδομητρίου ατόμου που λάμβανε θεραπεία με αντιπρογεσταγόνα. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η έκφραση αυτού του γονιδίου μπορεί να διεγείρεται από τα οιστρογόνα και η έκφρασή του να ρυθμίζεται από την προγεστερόνη (πίνακας 1).

2.6.3 Το Fas/FasL σύστημα στο φυσιολογικό ενδομήτριο

Το Fas/FasL σύστημα διαδραματίζει καίριο ρόλο στη φυσιολογική ομοιοστάση των ιστών και σε παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένης της διαφυγής των καρκινικών κυττάρων από την ανοσοεπιτήρηση (172). Η έκφραση της FasL από κύτταρα ιστών όπως του ματιού, των όρχεων και του πλακούντα μπορεί να εμπλέκεται στη διατήρηση του ανοσοποιητικού ελέγχου αυτών των ιστών από την απόπτωση που επάγει την απόπτωση των Fas-θετικών δραστικών κυττάρων (173).

Οι Fas και FasL εκφράζονται στο ανθρώπινο ενδομήτριο σε όλη τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου (174). Κατά το τέλος της παραγωγικής φάσης, αυτές οι πρωτεΐνες παραμένουν κατά κύριο λόγο στο σύμπλεγμα Golgi του κυττάρου και σε κυτταροπλασματικά κυστίδια και δεν είναι σε θέση να αλληλεπιδράσουν και να προκαλέσουν απόπτωση (163). Αντίθετα, κατά τη διάρκεια της εκκριτικής φάσης, αυτές οι πρωτεΐνες εκκρίνονται ως μέρος της κυτταρικής μεμβράνης, όπου η Fas μπορεί να δεσμεύσει τον FasL και να ενεργοποιήσει αποπτωτικά σήματα (163).

Υπάρχουν δύο μορφές του FasL: μεμβρανική και διαλυτή. Η μεμβρανική FasL μετατρέπεται στην ενεργό διαλυτή FasL από τη δράση ορισμένων μεταλλοπρωτεϊνών (MMP) (175). Στην παραγωγική φάση, τα αδενικά κύτταρα του ενδομητρίου υποβάλλονται σε απόπτωση. Αυτό μπορεί να οφείλεται στον εντοπισμό της FasL στα αδενικά κύτταρα σε μια αδρανοποιημένη μεμβρανική μορφή (163) ή/και την τοποθέτησή της στο σύμπλεγμα Golgi του κυττάρου. Υπάρχουν αυξημένες δραστηριότητες της MMP, όπως MMP- 1, -3 και -9, πριν και κατά τη διάρκεια της φάσης της εμμήνου ρύσης (176).

Η ενδεχόμενη αναστολή της Fas-επαγόμενης απόπτωσης από την Bcl-2 κατά τη διάρκεια της παραγωγικής φάσης δείχνει ότι η Bcl-2 μπορεί να ελέγξει το Fas / FasL αποπτωτικό μονοπάτι. Η Bcl-2 αναστέλλει τη Fas-

διαμεσολαβούμενη απόπτωση μέσω αδρανοποίησης του μετατρεπτικού ενζύμου της ιντερλευκίνης (ICE), μιας πρωτεάσης που εντοπίζεται στην πορεία του Fas / FasL αποπτωτικού μονοπατιού (177) (**πίνακας 1**).

Παραγωγική φάση			Εκκριτική φάση			
	Αρχή	Μέση	Τέλος	Αρχή	Μέση	Τέλος
BCL-2						
Αδένας	+++	+++	+++	++	+	+
Στρώμα	+	+	+	+	+	+
BAX						
Αδένας	+/-	+/-	+/-	++	++	+++
Στρώμα	-	-	-	+/-	+/-	+/-
BCL-X						
Αδένας	ND	++	++	+	++	+++
Στρώμα	ND	-	-	-	-	-
BAK						
Αδένας	+	+	+	++	++	+++
Στρώμα	-	-	-	-	-	-
FasL						
Αδένας	+	+	++	++	++	++
Στρώμα	+	++	+++	+++	+++	+++
Fas						
Αδένας	+	ND	++	++	ND	+++
Στρώμα	+	ND	+	++	ND	++

Πίνακας 1: Έκφραση της οικογένειας BCL-2 και Fas/FasL στο φυσιολογικό ενδομήτριο

(ND = Δεν έχει καθοριστεί. Τα επίπεδα έκφρασης έχουν καθοριστεί ανοσοϊστοχημικά βάσει της υπάρχουσας βιβλιογραφίας. BCL-2: Watanabe et al. (1997), Jones et al. (1998), Konno et al. (2000), Otsuki (2001); Bax: Meresman et al. (2000), Vaskivuo et al. (2001); BCL-X: Tao et al. (1997); BAK: Tao et al. (1998); Fas/FasL: Watanabe et al. (1997), Yamashita (1999), Selam et al. (2001, 2002).)

2.6.4 Απόπτωση στην ενδομητρίωση

2.6.4.1 Απόπτωση ευτοπικού και έκτοπου ενδομήτριου ιστού στην ενδομητρίωση

Ένας από τους μηχανισμούς που πρόσφατα απέκτησε μεγάλο ενδιαφέρον είναι η ανακάλυψη ότι η απόπτωση εμφανίζεται σε ευτοπικό και έκτοπο ενδομήτριο ασθενών με ενδομητρίωση. Οι Gebel et al. (178) ανέφεραν ότι το ποσοστό της απόπτωσης σε κύτταρα του ενδομητρίου έχει μειωθεί σημαντικά μεταξύ των γυναικών με ενδομητρίωση, πράγμα που σημαίνει ότι ο αριθμός των κυττάρων που επιβιώνουν και εισέρχονται στην περιτοναϊκή κοιλότητα είναι μεγαλύτερος στις γυναίκες που αναπτύσσουν ενδομητρίωση. Οι Dmowski et al. (179) έδειξαν ότι ο δείκτης απόπτωσης στο αδενικό επιθήλιο ήταν σημαντικά χαμηλότερος σε γυναίκες με ενδομητρίωση σε σχέση με φυσιολογικές. Αυτή η διαφορά προκαλείται κυρίως από σημαντική μείωση της απόπτωσης κατά τη διάρκεια του τέλους της εκκριτικής φάσης / εμμήνου ρύσης και στις αρχές της παραγωγικής φάσης στις γυναίκες με ενδομητρίωση. Ο κύκλος της απόπτωσης χάθηκε σε αυτές τις γυναίκες.

Εδώ δημιουργείται το ερώτημα ότι εάν η μείωση στην απόπτωση διευκολύνει την επιβίωση του έκτοπου ιστού και την εμφύτευση των ενδομητριακών κυττάρων, στη συνέχεια μπορεί να υπάρχει μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου της απόπτωσης και της σοβαρότητας της νόσου. Για να ελεγχθεί η υπόθεση αυτή, οι Dmowski et al. (179) ανέλυσαν τον αποπτωτικό δείκτη ανάλογα με το στάδιο της ενδομητρίωσης και διαπίστωσε ότι υπήρχε μια τάση προς μειωμένη απόπτωση σε προχωρημένο στάδιο της νόσου, αλλά αυτή η διαφορά δεν είχε στατιστική σημασία.

2.6.4.2 Η έκφραση της Bcl-2 σε ευτοπικό και έκτοπο ενδομήτριο ιστό σε ενδομητρίωση

Οι Watanabe et al. (180) εξέτασαν την έκφραση της Bcl-2 στην σε ευτοπικό και έκτοπο ενδομήτριο σε ασθενείς με ενδομητρίωση, αποδεικνύοντας ότι η έκφραση της Bcl-2 στα αδενικά κύτταρα του ενδομητρίου εμφανίζει μια κυκλική πορεία στο ευτοπικό ενδομήτριο σε ασθενείς με ενδομητρίωση, αλλά οι κυκλικές αυτές μεταβολές δεν ήταν εμφανείς σε ενδομητριοειδείς ιστούς εντός περιτόναιου και σε

ενδομητριοτικούς ιστούς εντός των ωοθηκών. Σε μια μελέτη από τους Jones et al. (181), οι συγγραφείς δεν παρατήρησαν απόπτωση σε στρωματικά κύτταρα περιτοναϊκών ενδομητριοτικών ιστών. Σύμφωνα με αυτά τα ευρήματα, η Bcl-2 εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό σε στρωματικά κύτταρα από έκτοπους ιστούς (181). Η υπερέκφρασή της μπορεί να σχετίζεται άμεσα με την αύξηση του αριθμού των υποδοχέων των οιστρογόνων που εκφράζονται από το έκτοπο στρώμα (182)

Η αυξημένη έκφραση της Bcl-2 πρωτεΐνης βρέθηκε σε παραγωγικό ευτοπικό ενδομήτριο από γυναίκες με ενδομητρίωση σε σύγκριση με το φυσιολογικό ενδομήτριο από υγιείς γυναίκες (183). Στην ίδια μελέτη, η έκφραση της Bax ήταν απύσχα σε παραγωγικό ενδομήτριο, ενώ υπήρχε μια αύξηση στην έκφραση της στο εκκριτικό ενδομήτριο σε γυναίκες με ενδομητρίωση και υγιείς γυναίκες. Η μεταβαλλόμενη έκφραση της BCL-2 σε ευτοπικό ενδομήτριο γυναικών με ενδομητρίωση οδήγησε σε μείωση του αριθμού των αποπτωτικών κυττάρων και, κατά συνέπεια, στη μη φυσιολογική επιβίωσή τους στις έκτοπη τοποθεσίες (183).

2.6.4.3 Το Fas / FasL σύστημα σε ευτοπικό και έκτοπο ενδομητριοτικό ιστό

Λίγες μελέτες έχουν δημοσιευθεί σχετικά με την έκφραση του Fas σε ενδομητριοτικούς ιστούς. Επιπλέον, δεν υπάρχουν γνωστές μελέτες που να δείχνουν ποσοτική σύγκριση της έκφρασης του Fas μεταξύ ενδομητριοτικών ιστών και του ενδομητρίου σε υγιείς γυναίκες. Οι Harada et al. (184) διαπίστωσαν ότι η Fas εκφράζεται τυχαία σε τόσο σε ευτοπικούς όσο και σε έκτοπους ενδομητριοτικούς ιστούς.

Οι ερευνητές υποστήριζαν ότι η έκφραση του αντιγόνου Fas μπορεί να εμπλέκεται λιγότερο στην απόπτωση των ευτοπικών και έκτοπων ενδομητριοτικών ιστών, όπως ένας ρυθμιστής-απόπτωσης. Σύμφωνα με αυτό εύρημα, οι Watanabe et al. (180) παρατήρησαν επίσης έκφραση του Fas στα αδενικά κύτταρα τόσο έκτοπου όσο και ευτοπικού ενδομητριοτικού ιστού. Σε αντίθεση με την κυκλική έκφραση της Bcl-2, η έκφραση της Fas ήταν συνεχής και στους δύο ιστούς σε όλη τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου.

Σε αντίθεση με τη FAS, υπάρχουν πολλές μελέτες που δείχνουν ότι η υψηλότερη έκφραση της FasL από ενδομητριοειδείς ιστούς συμβάλλει στην επιβίωσή τους και την ανάπτυξη της ενδομητρίωσης. Μια πρόσφατη μελέτη των Garcia-Velasco et al. (185) δείχνει ότι τα επίπεδα της διαλυτής/ενεργής FasL είναι υψηλότερα στον ορό και στο περιτοναϊκό υγρό σε γυναίκες με μέτρια έως σοβαρή ενδομητρίωση σε σχέση με τις γυναίκες σε πρώιμο στάδιο της νόσου ή υγιείς γυναίκες. Τα υψηλότερα επίπεδα διαλυτής FasL στο περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση μπορεί να συμβάλει στην αύξηση της απόπτωσης των Fas-κυττάρων στην περιτοναϊκή κοιλότητα, με αποτέλεσμα τη μείωση της ανιχνευτικής τους δράσης (185). Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε παρατεταμένη επιβίωση των κυττάρων του ενδομητρίου στην περιτοναϊκή κοιλότητα.

Οι θέσεις όπου ήταν αυξημένα τα επίπεδα του διαλυτού FasL στη περιτοναϊκή κοιλότητα ήταν σε ενδομητριοειδείς βλάβες και σε λευκοκύτταρα του περιτοναϊκού υγρού. Πολλοί ερευνητές έχουν δείξει ότι τα αδενικά και τα στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου εκφράζουν FasL, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης. Αυτή η μεμβρανική FasL μπορεί να μετατραπεί σε μια ενεργή, διαλυτή μορφή του υποδοχέα (186). Τα λευκοκύτταρα του περιτοναϊκού υγρού είναι μια άλλη πιθανή πηγή για υψηλά επίπεδα του διαλυτού FasL σε γυναίκες με ενδομητρίωση, επειδή τα ανθρώπινα ενεργοποιημένα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος έδειξαν ότι εκφράζουν FasL mRNA (187).

Τέλος, είναι πιθανό ότι πολλά ενδομητριοειδή κύτταρα, όχι μόνο να γίνουν πιο ανθεκτικά στην απόπτωση από το Fas μονοπάτι, αλλά και να αποκτήσουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιούν αυτό το μονοπάτι προς όφελός τους, με τη έναρξη ενός «συστήματος αντεπίθεσης έναντι του Fas» κατά του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Η αυξημένη έκφραση FasL από ενδομητριοειδή κύτταρα συμπίπτει με την εγγενή αντίστασή τους σε απόπτωση από το Fas-μονοπάτι που τα προστατεύει από την «κυτταρική αυτοκτονία».

2.6.4.4 Η απόπτωση σε περιτοναϊκά μακροφάγα σε ασθενείς με ενδομητρίωση

Οι McLaren et al. (188) ανέφεραν αυξημένο ποσοστό των Bcl-2-θετικών μακροφάγων στο περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση σε σύγκριση με υγιείς γυναίκες, με αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των κυττάρων που επιζούν της διαδικασίας της ενεργοποίησης και καθυστερώντας έτσι την απόπτωση. Αυτό μπορεί να εξηγήσει την αύξηση του αριθμού των μακροφάγων που βρέθηκαν στο περιτοναϊκό υγρό ασθενών με ενδομητρίωση.

Οι Jones et al. (181) σημείωσαν σημαντική αύξηση της έκφρασης της BCL-2 στο στρώμα φυσιολογικού και ευτοπικού ενδομητρίου με μια περαιτέρω αύξηση κατά τα τέλος της εκκριτικής φάσης. Οι ερευνητές έδειξαν ότι τα περισσότερα BCL-2-θετικά κύτταρα ήταν λευκοκύτταρα. Το έκτοπο στρώμα περιείχε σημαντικά υψηλότερο αριθμό Bcl-2-θετικών κυττάρων από το ευτοπικό, μερικά από τα οποία ήταν λευκοκύτταρα.

Η ανοσοϊστοχημική χρώση αποκάλυψε έναν πληθυσμό BCL-2-θετικών και BAX-αρνητικών ιστικών μακροφάγων που περιέχονται μόνο σε έκτοπο ιστό κατά τη διάρκεια και των δύο φάσεων του εμμηνορρυσιακού κύκλου (188). Η έκφραση της BCL-2 και η απουσία της BAX μπορεί να παρέχει σε αυτά τα μακροφάγα μειωμένη ευαισθησία στην απόπτωση, λόγω των γνωστών ιδιοτήτων της BCL-2 και της BAX και μπορεί να οδηγήσει σε επιμήκυνση του προσδόκιμου επιβίωσης. Η αυξημένη αναλογία των BCL-2-θετικών μακροφάγων που βρίσκονται σε γυναίκες με ενδομητρίωση μπορεί να προδιαθέτει τα κύτταρα αυτά στο να αντιστέκονται στην απόπτωση.

2.6.4.5 Η απόπτωση στην παθοφυσιολογία της ενδομητρίωσης

Τα δεδομένα δείχνουν ότι τα κύτταρα του ενδομητρίου από γυναίκες με ή χωρίς ενδομητρίωση έχουν θεμελιώδεις διαφορές. Τα ενδομητριακά κύτταρα από τις γυναίκες με ενδομητρίωση έχουν αυξημένη πολλαπλασιαστική και εμφυτευτική ικανότητα ώστε να επιβιώσουν σε έκτοπη θέσεις. Η μειωμένη ευαισθησία του ενδομητρικού ιστού σε αυθόρμητη απόπτωση συμβάλλει στην ανώμαλη εμφύτευση

και την ανάπτυξη ενδομητριακού ιστού σε έκτοπους χώρους. Η αδυναμία των κύτταρων του ενδομητρίου να διαβιβάσουν σήματα «θανάτου» ή η ικανότητά τους να αποφεύγουν τον κυτταρικό θάνατο σχετίζεται με την αυξημένη έκφραση αντιαποπτωτικών παραγόντων (π.χ. BCL-2) και τη μειωμένη έκφραση προαποπτωτικών παραγόντων (π.χ. BAX) (183).

Ωστόσο, παραμένει ασαφές αν η ανώμαλη απόπτωση στο ευτοπικό ενδομήτριο σε ασθενείς με ενδομητρίωση εμφανίζεται πρώτιστα ή δευτερευόντως μετά την εμφάνιση ενδοπυελικής ενδομητρίωσης. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι κατά τη στιγμή της κλινικής εξέτασης και τη διάγνωση, οι περισσότερες γυναίκες έχουν ήδη εγκατεστημένη νόσο και ως εκ τούτου είναι δύσκολο να διερευνηθούν τα αρχικά στάδια της ενδομητρίωσης.

Τέλος, θα πρέπει να αναφέρουμε πως πρόσφατη, ανάλυση γονιδιακών μικροσυστοιχιών έδειξε μια διαφοροποιημένη εικόνα του προφίλ της γονιδιακής έκφρασης σε ασθενείς με ενδομητρίωση. Χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο, οι Arimoto et al. (189) βρήκαν 97 υπερεκφραζόμενα και 337 υποεκφραζόμενα γονίδια σε γυναίκες με ενδομητρίωση. Γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση (GADD34, GADD45A, GADD45B, PIG11) και το ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 ήταν υποεκφραζόμενα σε ενδομητριοειδείς ιστούς. Αυτά τα ευρήματα συνάδουν με τη μειωμένη απόπτωση που παρατηρείται σε ευτοπικό ενδομήτριο σε γυναίκες με ενδομητρίωση. Τα δεδομένα αυτά παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για εύρεση υποψήφιων γονιδίων των οποίων τα προϊόντα θα μπορούσαν να ρυθμίζουν τον αποπτωτικό μηχανισμό στην ενδομητρίωση και επιπλέον θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως μοριακοί στόχοι για τη διάγνωση ή τη θεραπεία της ενδομητρίωσης. Επιπλέον, η διαφοροποιημένη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση σε γυναίκες με ενδομητρίωση μπορεί να εξηγήσει την ευαισθησία του κάθε ατόμου στη νόσο και μπορεί να απαντήσει στο ερώτημα γιατί μόνο μερικές γυναίκες αναπτύσσουν ενδομητρίωση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΙ ΕΝΔΟΠΥΕΛΙΚΗ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ

3.1 Μηχανισμός παθογένεσης αθηροσκλήρυνσης

Η αρτηριακή αθηροσκλήρωση είναι σήμερα η σημαντικότερη απειλή του ανθρωπίνου γένους και η στεφανιαία εντόπισή της υπεύθυνη για την κυριότερη και σοβαρότερη επιπλοκή της.

Παρόλο ότι συνεχίζουμε να αγνοούμε την αιτία της αθηροσκλήρωσης, γνωρίζουμε από στατιστικές συσχετίσεις το ρόλο που παίζουν γενετικοί παράγοντες, παράγοντες που σχετίζονται με τον τρόπο ζωής καθώς και τη συμμετοχή άλλων καταστάσεων όπως της υπέρτασης και του σακχαρώδη διαβήτη. Επίσης, για πρώτη φορά τα τελευταία χρόνια έχει τεκμηριωθεί ότι η αποτελεσματική θεραπευτική παρέμβαση σε μερικούς από τους παράγοντες αυτούς επιβραδύνει τη εξέλιξή της.

Η τεράστια όμως πρόοδος τις τελευταίες δύο δεκαετίες αφορά τη μελέτη της βιολογίας της αθηροσκληρωτικής νόσου και την αναγνώριση των μοριακών παραγόντων που μεσολαβούν στην εξέλιξή της. Παρόλο που οι γνώσεις αυτές δεν έχουν οδηγήσει ακόμα σε ειδικές θεραπείες, βρισκόμαστε κυριολεκτικά στα πρόθυρα νέων προσεγγίσεων.

Οι περιοχές στις οποίες τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σημαντική πρόοδος είναι οι εξής (190-192):

- Κατανόηση των εξελικτικών βιολογικών και κυτταρικών φαινομένων που οδηγούν στη δημιουργία της αθηροσκληρωτικής αλλοίωσης και των μοριακών παραγόντων που μεσολαβούν.
- Αναγνώριση της αιτιολογικής σχέσης της υπερχοληστερολαιμίας με την αθηροσκλήρωση.
- Αναγνώριση του ρόλου της φλεγμονώδους αντίδρασης της οξειδωτικής βλάβη και πιθανώς του λοιμώδους παράγοντα στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης.
- Κατανόηση των παραγόντων που ευνοούν την διάσπαση της αθηροσκληρωτικής πλάκας και του μηχανισμού της επακόλουθης θρόμβωσης, ιδιαίτερα του ρόλου των αιμοπεταλίων που προκαλεί το έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Η μελέτη των αθηροσκληρωτικών βλαβών διαφόρων σταδίων στον άνθρωπο σε συνδυασμό με τη μελέτη της εξέλιξης των βλαβών σε

πειραματόζωα στα οποία επιταχύνεται η δημιουργία τους με αθηρογόνο δίαιτα επέτρεψε την αναγνώριση της διαδοχής των μεταβολών που οδηγούν στην ώριμη βλάβη (190). Αναγνωρίστηκε εξάλλου ότι η αθηροσκλήρωση αποτελεί μία αντιδραστική επεξεργασία του αρτηριακού τοιχώματος στην οποία εμπλέκονται τέσσερις κυτταρικοί πληθυσμοί: τα ενδοθηλιακά κύτταρα που καλύπτουν το εσωτερικό της αρτηρίας, τα μονοκύτταρα του αίματος που εισβάλλουν στην περιοχή της βλάβης, τα T-λεμφοκύτταρα που και αυτά εισέρχονται και παραμένουν στη βλάβη καθώς και τα λειομυοκύτταρα του μέσου χιτώνα της αρτηρίας που μεταναστεύουν κάτω από το ενδοθήλιο, πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται.

Τη δεκαετία του '70 αναπτύχθηκε η θεωρία της αντίδρασης στην ενδοθηλιακή βλάβη ως η αφορμή που πυροδοτεί τη διαδοχή των φαινομένων που οδηγούν στη δημιουργία της αθηροσκληρωτικής βλάβης (191). Απεδείχθη όμως ότι δεν είναι απαραίτητη η βλάβη, ούτε η δυσλειτουργία, ούτε καν η αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου για να ξεκινήσει η αθηρωματική βλάβη. Σήμερα γίνεται αποδεκτή ή άποψη ότι η κατακράτηση της LDL χοληστερίνης από την θεμέλιο ουσία του υποενδοθηλιακού χώρου του έσω χιτώνα της αρτηρίας αποτελεί τον πρωταρχικό στάδιο της αθηροσκλήρωσης (192).

Ωστόσο, η σχέση της αθηροσκλήρωσης με την υπέρταση και η προτίμηση της εντόπισης των αθηροσκληρωτικών βλαβών σε θέσεις του αρτηριακού δικτύου με ασταθείς συνθήκες γραμμικής ροής του αίματος, όπως σε θέσεις διακλάδωσης ή διχασμού, υποδηλώνει τη σχέση των τοπικών αιμοδυναμικών συνθηκών με τη λειτουργία του ενδοθηλίου και της υπενδοθηλιακής στιβάδας. Στις θέσεις αυτές και απουσία αθηρώματος ο έσω χιτώνας είναι παχύτερος, η δε προσθήκη κάποιου παράγοντος κινδύνου μετατρέπει τις θέσεις αυτές σε εστίες με παθολογική πορεία.

Η πιθανή διαδοχή των μεταβολών που οδηγεί στην παραγωγή της βλάβης θεωρείται η εξής: Η πρωταρχική ανωμαλία είναι η κατακράτηση υπενδοθηλιακά της LDL που φυσιολογικά διέρχεται μέσα στο αρτηριακό τοίχωμα και απομακρύνεται χωρίς να κατακρατηθεί. Η κατακρατημένη LDL οδηγείται σε οξειδωση από τους οξειδωτικούς παράγοντες που παράγονται από κυτταρικές οξυγενάσεις στο προστατευμένο από τα αντιοξειδωτικά περιβάλλον της θεμελίου ουσίας. Η οξειδωμένη LDL είναι ικανή να διεγείρει τα

ενδοθηλιακά κύτταρα να εκφράσουν φλεγμονώδη μόρια για την πρώτη κυτταρική διεργασία που αφορά τα μονοκύτταρα του κυκλοφορούντος αίματος. Τα φλεγμονώδη αυτά μόρια περιλαμβάνουν τη χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων (MCP-1) και μία ποικιλία από προσκολλητικά πρωτεϊνικά μόρια που προσελκύουν και προσκολλούν τα μονοκύτταρα στο ενδοθήλιο όπου κυλίνουν μέχρι να ακινητοποιηθούν, να ενεργοποιηθούν, να αποκτήσουν ψευδοπόδια και να μεταναστεύσουν υπενδοθηλιακά.

Η υπενδοθηλιακή συγκέντρωση μονοκυττάρων που τώρα έχουν μετατραπεί σε μακροφάγα παρέχει τεράστια οξειδωτική ικανότητα για παραπέρα οξείδωση της LDL. Η πλήρως οξειδωμένη LDL αναγνωρίζεται από τον εκκαθαριστικό υποδοχέα των μακροφάγων που την φαγοκυττώνουν αδηφάγα και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Η υπενδοθηλιακή συγκέντρωση αφρωδών κυττάρων χαρακτηρίζει τις πρώιμες λιπώδεις γραμμώσεις που αποτελούν την πρώτη αναγνωρίσιμη μακροσκοπικά αθηρωματική βλάβη.

Τα μακροφάγα παράγουν σημαντικές ποσότητες αυξητικών και χημειοτακτικών παραγόντων που οδηγούν τα λειομυοκύτταρα του μέσου χιτώνα να μεταναστεύσουν στην περιοχή της βλάβης όπου πολλαπλασιάζονται και αλλάζουν φαινότυπο και από συσταλτικά γίνονται κύτταρα που συνθέτουν και παράγουν θεμέλιο ουσία.

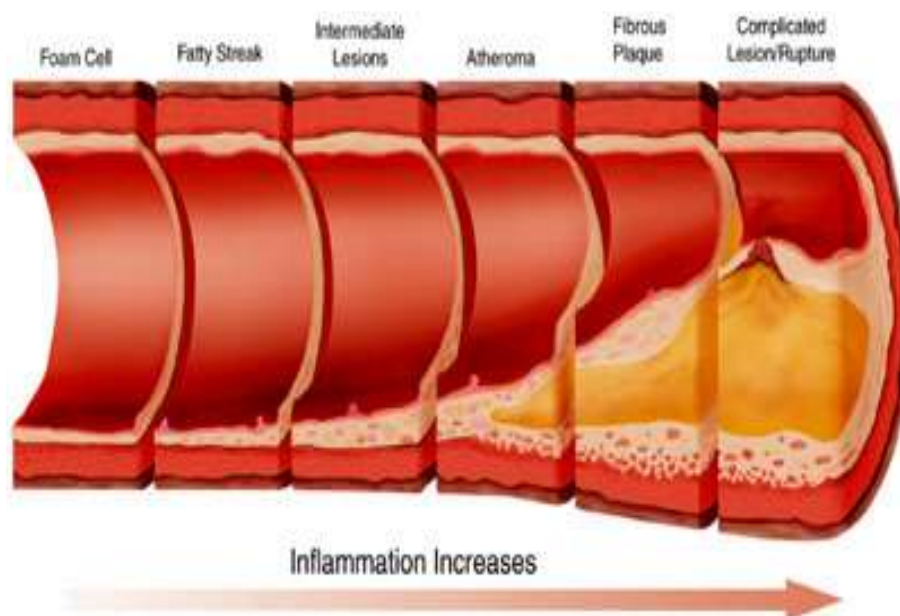
Η άθροιση λειομυοκυττάρων κάτω από το ενδοθήλιο δημιουργεί την ινώδη κάψα της βλάβης.

Εξάλλου η φαγοκύτωση της έντονα κυτταροτοξικής οξειδωμένης LDL μπορεί να θεωρηθεί προστατευτική για το ενδοθήλιο. Όταν όμως τα φαγοκύτταρα κορεστούν ή νεκρωθούν, επαυξάνεται η φλεγμονώδης αντίδραση και οδηγεί στο σχηματισμό του νεκρωτικού πυρήνα της βλάβης. Τα δε σταγονίδια λίπους που ελευθερώνονται μπορεί να φαγοκυτταρωθούν από τα λειομυοκύτταρα που και αυτά μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα.

Η βλάβη μεγεθύνεται παραπέρα με την είσοδο και πολλαπλασιασμό περισσότερων μονοκυττάρων, λειομυοκυττάρων και παραγωγή υπερβολικών ποσοτήτων εξωκυτταρίου ουσίας αλλά και από τη διάβρωση του ενδοθηλίου, την τοιχωματική θρόμβωση και οργάνωση του επιφανειακού θρόμβου.

Το ποσό και η ποιότητα του ινώδους που περιέχεται στη βλάβη και ιδιαίτερα εκείνο της κάψας έχει σημασία όχι μόνο για την αύξηση του μεγέθους της βλάβης αλλά κυρίως για την ευπάθειά της στη ρήξη.

Σημασία έχει και η αποτιτάνωση της πλάκας που καθορίζεται από την παρουσία ειδικών κυττάρων που προέρχονται από τα τριχοειδή της μικροκυκλοφορίας με οστεοβλαστικού τύπου δραστηριότητες. Έχει διαπιστωθεί τα τελευταία χρόνια ότι η αποτιτάνωση εμφανίζεται πολύ νωρίτερα στην εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας από ό,τι πιστευόταν στο παρελθόν. Η αναζήτηση ασβεστίου στις στεφανιαίες αρτηρίες με ευαίσθητες σύγχρονες μεθόδους, όπως πολυτομική αξονική τομογραφία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώιμη μη επεμβατική διαγνωστική μέθοδος (193) (εικόνα 8).



Εικόνα 8: Παθογένεση της αθηροσκλήρυνσης

3.1.1 Παθογένεια οξέων στεφανιαίων επεισοδίων

Τα καταστροφικά κλινικά συμβάματα, ο αιφνίδιος θάνατος, το έμφραγμα μυοκαρδίου και η ασταθής στηθάγχη οφείλονται στη ρήξη αθηρωματικής πλάκας με συνέπεια τη δημιουργία θρόμβου. Πρώτος ο Έλληνας παθολογοανατόμος Κωνσταντίνιδης περιέγραψε τη σχάση της

πλάκας ως αιτία στεφανιαίας θρόμβωσης ήδη από το 1966 (194). Είκοσι χρόνια αργότερα, μετά τις μελέτες του Άγγλου παθολογοανατόμου Davies (195), το φαινόμενο μελετήθηκε εντατικά και σήμερα αναγνωρίζεται ως ο κρίσιμος παθογόνος μηχανισμός της αθηροσκληρυντικής νόσου.

Στα αρχικά στάδια η αθηρωματική πλάκα αναπτύσσεται κάτω από τον έσω χιτώνα μέσα στο πάχος του αρτηριακού τοιχώματος και παίρνει σχήμα ημισελινοειδές. Καθώς αυξάνει ο λιπιδικός πυρήνας και σχηματίζεται ινώδης κάψα, προβάλλει μέσα στον αυλό ως μία διόγκωση. Έχει διαπιστωθεί παθολογοανατομικά ότι τα συχνότερα σημεία σχάσης της κάψας που οδηγεί σε ρήξη της πλάκας είναι στη βάση-αυχένα της διόγκωσης. Η θέση αυτή φαίνεται πως είναι σημείο μέγιστης καταπόνησης από τη τριβή διαχωρισμού της ροής του αίματος (shear stress) (196). Στο ίδιο σημείο εξασκείται και η μέγιστη εσωτερική τάση εφελκυσμού, ιδιαίτερα όταν υπάρχει μαλακός λιπιδικός πυρήνας.

Πλάκες που υπόκεινται συχνότερα σε ρήξη είναι μικρού μεγέθους με πλούσιο λιπιδικό, μαλακό πυρήνα και λεπτή ινώδη κάψα, ενώ πλάκες που προκαλούν σοβαρή στένωση του αυλού του αγγείου είναι συχνά πιο ινώδεις και σταθερές.

Ωστόσο, η ευπάθεια της βλάβης στη ρήξη εξαρτάται κυρίως από βιολογικούς παράγοντες. Η συγκέντρωση φαγοκυττάρων και T-λεμφοκυττάρων στην κάψα προδιαθέτει σε ρήξη (197). Σε ευπαθείς θέσεις έχει διαπιστωθεί αυξημένη έκφραση μεταλλοπρωτεϊνάσης της θεμελίου ουσίας και αυξημένη αποδομή της.

Η διεργασία αυτή θα μπορούσε να παρομοιαστεί με την αντίδραση του δέρματος στην είσοδο ξένου σώματος π.χ. ενός αγκαθιού: Εάν η παραγωγή ιστοκυττάρων μπορέσει να περιχαράκώσει και να οργανώσει την τοπική αντίδραση τότε δεν παράγεται έντονη φλεγμονή και παράγεται μόνο μια τοπική σκληρία. Εάν όμως διεγερθούν και αθροιστούν τα φαγοκύτταρα και παραχθεί νεκρωτική εστία γύρω από το ξένο σώμα, τότε γίνεται λέπτυνση και διάβρωση του υπερκείμενου δέρματος και διάνοιξη του αποστήματος προς τα έξω. Στην περίπτωση της αρτηρίας το ξένο σώμα είναι η οξειδωμένη LDL και η διάνοιξη γίνεται προς τον αυλό του αγγείου.

Οι συνέπειες της ρήξης της πλάκας εξαρτώνται βέβαια από συστηματικούς θρομβογόνους παράγοντες, όπως η πρωτογενής υπερπηκτική

ή θρομβογενής κατάσταση της κυκλοφορίας, αλλά εξαρτάται και από το βάθος της διάσπασης της πλάκας (198). Μικρές επιφανειακές ρήξεις μπορεί να προκαλέσουν το σχηματισμό εύθραυστου θρόμβου που παρασύρεται από την κυκλοφορία του αίματος, ενώ βαθιές ρήξεις που προκαλούν εξέλκωση και έκθεση του κολλαγόνου οδηγούν σε ισχυρούς, πλούσιους σε αιμοπετάλια θρόμβους που δεν διασπώνται εύκολα. Σημασία έχει και η δραστηριότητα των φυσικών θρομβολυτικών του πλάσματος στη φάση της ρήξης.

Ο μηχανισμός της θρόμβωσης που ακολουθεί την αρτηριακή βλάβη (ρήξη της πλάκας) οφείλεται στο ότι αποκαλύπτεται ο ιστικός παράγοντας, διεγείρονται και προσκολλώνται αιμοπετάλια στην εκτεθειμένη υποενδοθηλιακή στιβάδα, διεγείρονται αιμοπετάλια και παράγεται θρομβίνη (197). Η θρομβίνη αποτελεί ισχυρότατο ερέθισμα ενεργοποίησης και συσσώρευσης αιμοπεταλίων ενώ μετατρέπει το ινωδογόνο σε ινώδες, οι ίνες του οποίου καθιζάνουν και δημιουργούν το θρόμβο τον οποίο η θρομβίνη ισχυροποιεί περαιτέρω με την ενίσχυση των εγκαρσίων γεφυρών μεταξύ των ινών του ινώδους. Στο ινώδες του θρόμβου παραμένουν δεσμευμένα μόρια της θρομβίνης όπου διατηρούν την καταλυτική τους δράση προάγοντας την καθήλωση ινώδους και την παραπέρα ενεργοποίηση και συσσώρευση αιμοπεταλίων. Επίσης προάγουν την παραγωγή της ίδιας της θρομβίνης. Είναι για αυτό το λόγο που η επιφάνεια του θρόμβου είναι η πλέον θρομβογόνος επιφάνεια που έχει παρατηρηθεί.

Ο ρόλος της θρομβίνης στα οξέα ισχαιμικά σύνδρομα τονίζει τη σημασία των θεραπειών που έχουν στόχο την αναστολή της παραγωγής θρομβίνης και της δράσης της συνδεδεμένης με το θρόμβο θρομβίνης. Η διέγερση των αιμοπεταλίων συμβαίνει με την αποκάλυψη και ενεργοποίηση της γλυκοπρωτεΐνης IIb/IIIa που βρίσκεται σε αφθονία στις μεμβράνες τους και αποτελεί τους υποδοχείς δέσμευσης των μορίων του ινωδογόνου. Τα μόρια του ινωδογόνου αποτελούν τις γέφυρες σύνδεσης των αιμοπεταλίων μεταξύ τους και οδηγούν στην άθροιση και συσσώρευσή τους. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα GPIIb/IIIa είναι αποτέλεσμα της διέγερσης μίας ποικιλίας επιφανειακών υποδοχέων που αντιδρούν με την θρομβίνη, το κολλαγόνο, τις κατεχολαμίνες και το ADP.

Η διέγερση των υποδοχέων αυτών ενεργοποιεί την GPIIb/IIIa είτε απευθείας είτε μέσω της παραγωγής θρομβοξανής οδό την οποία αναστέλλει

η ασπιρίνη. Έτσι η ασπιρίνη εν μέρει μόνο εμποδίζει την διέγερση των αιμοπεταλίων όπως άλλωστε και οι άλλοι ανταγωνιστές των υποδοχέων διέγερσης (β-αποκλειστές τον κατεχολαμινικό, ηπαρίνη τον θρομβινικό και η κλοπιδογρέλη τον ADP). Ο αποκλεισμός - αναστολή δράσης- της GPIIb/IIIa που αποτελεί τον κοινό τελικό εκφραστή της αιμοπεταλιακής διέγερσης μπορεί να αδρανοποιήσει πλήρως το αιμοπετάλιο.

Εκτός από τη θρόμβωση που επιπλέκει τη ρήξη της πλάκας, στο μηχανισμό της οξείας ισχαιμίας υπεισέρχεται και ο αγγειοσπασμός ο οποίος μπορεί να προκληθεί από απλή δυσλειτουργία του ενδοθηλίου εγγύς μίας αθηρωματικής πλάκας αλλά συχνότερα από το αρτηριακό τραύμα που προκαλεί η ρήξη της πλάκας. Σε αυτές τις περιπτώσεις η αγγειοσύσπαση προκαλείται από αιμοπεταλιακούς παράγοντες μέσω σεροτονίνης και θρομβοξανής A₂ αλλά και από τη θρομβίνη που και αυτή διεγείρει τις λείες μυϊκές ίνες.

3.1.2 Σταθερότητα και αστάθεια της αθηροσκληρωτικής βλάβης

Ήδη από το 1988 δημοσιεύθηκαν μελέτες σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε διαδοχικές στεφανιογραφίες που έδειξαν ότι το έμφραγμα του μυοκαρδίου είχε συχνότερα αναπτυχθεί πάνω σε βλάβες που προκαλούσαν μικρότερου βαθμού στένωση. Παρατηρήθηκε δηλαδή μεγαλύτερος αριθμός εμφραγμάτων σε στένωση μικρότερη από 50% στην προηγούμενη στεφανιογραφία (197, 198). Είχε επίσης από νωρίς παρατηρηθεί ότι υπάρχει μεγάλη ποικιλία στη σύνθεση της πλάκας, στη σχέση λιποειδικού περιεχομένου προς τη θεμέλιο ουσία και σε σχέση με τους πληθυσμούς των φλεγμονωδών κυττάρων προς τα λειομυοκύτταρα.

Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στην εντατική μελέτη των παραγόντων που κάνουν μία πλάκα ευπαθή στη ρήξη. Σήμερα γνωρίζουμε ότι οι κύριοι παράγοντες που κάνουν μία πλάκα ευπαθή είναι ο πλούσιος, μαλακός λιποειδικός πυρήνας, η λεπτή ινώδης κάψα και η παρουσία μεγάλου αριθμού φλεγμονωδών κυττάρων.

Σταθερή, ανθεκτική στη διάσπαση πλάκα είναι η πλάκα με έντονη επουλωτική διεργασία και άφθονο αριθμό λειομυοκυττάρων που σχηματίζουν υγιή και ισχυρή ινώδη κάψα. Αντίθετα, η ασταθής, ευπαθής στη διάσπαση

πλάκα είναι εκείνη που φλεγμαίνει, με μεγάλο αριθμό μακροφάγων και Τα-λεμφοκυττάρων. Τη σταθερότητα επομένως, εξασφαλίζουν τα λειομυοκύτταρα και την αστάθεια δημιουργούν τα φλεγμονώδη κύτταρα. Χαρακτηριστικά ο Libby περιγράφει τα λειομυοκύτταρα ως τους «φρουρούς της ακεραιότητας της πλάκας». Τον αντίθετο ρόλο παίζουν τα φλεγμονώδη κύτταρα εξ αιτίας των παρακάτω δράσεων:

- Εκκρίνουν κυτταροκίνες που αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των λειομυοκυττάρων και την παραγωγή κολλαγόνου.
- Παράγουν μεταλλοπρωτεΐνες που διασπούν την θεμέλιο ουσία.
- Εκκρίνουν κυτταροκίνες που προκαλούν απόπτωση των λειομυοκυττάρων.
- Απευθείας επαφή -κύτταρο με κύτταρο- των μακροφάγων με τα λειομυοκύτταρα προκαλεί απόπτωση των δεύτερων.

Έχει διαπιστωθεί πειραματικά και από μελέτες σε ασθενείς, ότι αστάθεια προάγουν η αύξηση των λιπιδίων και η οξειδωσή τους καθώς επίσης γενετικοί παράγοντες και πιθανώς λοιμώδεις παράγοντες. Την σταθερότητα, από την άλλη μεριά, προάγουν η μείωση των λιπιδίων, πιθανώς τα αντιοξειδωτικά και οι αναστολείς του ενζύμου μετατροπής καθώς επίσης η επουλωτική διεργασία που ακολουθεί την τραυματική ρήξη και καταστροφή της πλάκας που προκαλεί η αγγειοπλαστική με μπαλόνι.

3.2 Προϊόντα γονιδίων που ελέγχουν την απόπτωση και την αθηρωμάτωση

Η συστηματική άσηπτη φλεγμονή αποτελεί εξωγενή παράγοντα διέγερσης οξείας και μαζικής αποπτωτικής διαδικασίας που συμβάλλει στην ανάπτυξη και εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης με την έγερση αυτοάνοσης αντίδρασης, τον χημειοτακτισμό μονοκυττάρων και μακροφάγων, τη διέγερση παραγωγής αυξητικών παραγόντων, τη συσσώρευση οξειδωμένης LDL, την εξασθένιση της ινώδους κάψας και τη συμβολή στη διάσπαση της αθηρωματικής πλάκας. Τα τελευταία χρόνια υποστηρίζεται πως, σε αντίθεση με ότι πιστευόταν μέχρι τότε, η οξεία και μαζική αποπτωτική διαδικασία οδηγεί σε συσσώρευση αποπτωτικών σωματίων που δεν προλαβαίνουν να

υποστούν φαγοκυττάρωση, με αποτέλεσμα να εγείρουν φλεγμονώδη η/και αυτοάνοση αντίδραση (199).

Γενικά, προϊόντα γονιδίων που ελέγχουν την απόπτωση, όπως ο υποδοχέας Fas/ APO-1 και ο συνδέτης του, Fas Ligand (FasL), το μετατρεπτικό ένζυμο της ιντερλευκίνης 1β (ICE) και τα προϊόντα του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 και του πρωτο-ογκογονιδίου c-myc, μετέχουν στον έλεγχο της αγγειακής απόπτωσης κατά την ανάπτυξη της αθηρωμάτωσης (200).

Οι FasL και Fas, μέλη του νεκρωτικού παράγοντα όγκου και του υποδοχέα του, αντίστοιχα, αποτελούν το σημαντικότερο φλεγμονώδες προ-αποπτωτικό σύστημα του ανθρώπινου οργανισμού. Οι Fas και FasL είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως προαναφέρθηκε στο 2^ο κεφάλαιο, που υφίστανται διάσπαση του εξωκυττάριου τμήματός τους, με αποτέλεσμα τη δημιουργία των διαλυτών μορφών τους. Το σύστημα Fas/ FasL διεγείρεται όταν ο διεγέρτης FasL ή ο TNF-α προσδεθούν στον ειδικό υποδοχέα Fas.

Το ICE είναι μια πρωτεάση που μετατρέπει την πρόδρομη μορφή της IL-1β στην ώριμη μορφή της και η οποία διαδραματίζει εξέχοντα ρόλο στο πλέγμα των αλληλεπιδράσεων των κυταροκινών, ελέγχοντας πληθώρα σημαντικών λειτουργιών μεταξύ των οποίων και τη φλεγμονώδη αντίδραση. Παράλληλα, το ICE αποτελεί το πρώτο μέλος της ομάδας των κασπασών που εμπλέκονται στην έναρξη και προώθηση της φλεγμονώδους, ανεξάρτητης από το Fas, αποπτωτικής διαδικασίας (201-203).

Η επαφή των κυττάρων τόσο μεταξύ τους όσο και με την εξωκυττάρια ουσία είναι αναγκαία για τη διατήρηση της ακεραιότητας και λειτουργικότητας του οργάνου που αυτά απαρτίζουν. Η απώλεια της επαφής οδηγεί σε απόπτωση. Η καντχερίνη του αγγειακού ενδοθηλίου (VE-cadherin) αποτελεί το διακυτταρικό σύνδεσμο των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων μεταξύ τους. Η πρωτεολυτική διάσπαση του εξωκυττάριου τμήματός της δημιουργεί τη διαλυτή μορφή της. Η πρωτεΐνη P53 αποτελεί μέτρο επαφής της εξωκυττάριας ουσίας με τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Η έναρξη της αποπτωτικής διαδικασίας των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων χαρακτηρίζεται από τη διαταραχή της κυταροπλασματικής μεμβράνης των αποπτιπόντων ενδοθηλιακών κυττάρων που οδηγεί στην έκθεση στον αγγειακό αυλό της φωσφατιδυλοσερίνης, ενός φωσφολιπιδίου

της κυτταρικής μεμβράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων. Η αννεξίνη V (ANX V) αποτελεί εκλεκτικό μόριο σύνδεσης στην εκτεθείσα φωσφατιδυλοσερίνη και για αυτό τα επίπεδά της στη συστηματική κυκλοφορία αποτελούν μέτρο αποπτωτικής διαδικασίας των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων (204, 205).

3.3 NO, υπεροξείδιο του υδρογόνου και αγγειακή νόσος : Η σημασία της δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου

Οι αγγειακές παθήσεις συμπεριλαμβανομένης της στεφανιαίας νόσου, των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων και των περιφερικών αγγειακών παθήσεων είναι η μεγαλύτερη αιτία θνησιμότητας και της νοσηρότητας σε βιομηχανικές χώρες. Πολλοί κοινοί παράγοντες κινδύνου για αγγειακή νόσο, όπως η υπέρταση και ο διαβήτης, εξακολουθούν να επικρατούν στη Δύση και σε άλλους πληθυσμούς, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αγγειακή νόσος θα συνεχίσει να έχει υψηλό επιπολασμό.

Οι πρώτες ανιχνεύσιμες αλλαγές σε αγγειακή νόσο είναι οι ανωμαλίες του ενδοθηλίου που οδηγούν στην απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας του ενδοθηλίου, που φυσιολογικά αναστέλλει διαδικασίες όπως η φλεγμονή και η θρόμβωση.

Ειδικότερα, το νιτρικό οξύ (NO) που παράγεται από τη συνθάση του NO (eNOS) στο αγγειακό ενδοθήλιο ρυθμίζει τη ροή του αίματος και την πίεση (199) και έχει σημαντικές αντιαθηρογενετικές επιδράσεις στα αιμοπετάλια, στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων και στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Στους ανθρώπους, η διαμεσολαβούμενη με το NO ενδοθηλιακή λειτουργία είναι ελλιπής σε προαθηροσκληρωτικές καταστάσεις, όπως η υπερχοληστερολαιμία, ο σακχαρώδης διαβήτης, η αρτηριακή υπέρταση και το κάπνισμα (200, 201) και συσχετίζεται με το προφίλ των παράγοντων κινδύνου (205). Περισσότερο σημαντικές, προοπτικές μελέτες προσδιορίζουν την ανεπάρκεια της διαμεσολαβούμενης με το NO ενδοθηλιακής λειτουργίας ως ποσοτικά, ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα των καρδιακών συμβαμάτων (206, 207) .

Πολυάριθμες μελέτες σε ζωικά μοντέλα αποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο του NO στην παθογένεια της αγγειακής νόσου. Η στοχευμένη εξάλειψη

του γονιδίου της eNOS σε ποντικούς οδηγεί σε αρτηριακή υπέρταση (208) και μειωμένη αγγειακή αναδιαμόρφωση (209), ενώ η αύξηση της παραγωγής του NO μέσω αύξησης της έκφρασης του γονιδίου της NOS σε γονιδιακούς φορείς βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία, περιορίζει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων του έσω χιτώνα των αγγείων και επάγει υποχώρηση των αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων (210).

Οι μηχανισμοί που οδηγούν σε απώλεια της βιοδραστικότητας του NO στην αγγειακή νόσο έχουν παρέμεινει λιγότερο σαφείς. Τα δεδομένα από πειραματικά μοντέλα δείχνουν ότι η αυξημένη παραγωγή οξειδωτικών ριζών όπως ανιόντων του υπεροξειδίου (OO⁻) αντιδρούν ταχέως με το NO και συμβάλλουν στη μείωση του NO σε αγγειακές παθήσεις (211-218).

Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η συμβολή των οξειδωτικών ριζών στην ανεπαρκή διαμεσολαβούμενη με το NO ενδοθηλιακή λειτουργία είναι ένας ανεξάρτητος δυσμενής προοπτικός δείκτης καρδιαγγειακού κινδύνου (208).

3.3.1 Πηγές αυξημένης παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου στα ανθρώπινα αγγεία

Οι κυτταρικές πηγές του υπεροξειδίου του υδρογόνου στο αγγειακό ενδοθήλιο ποικίλλουν σε διαφορετικούς τύπους αγγείων από διαφορετικά είδη (219, 220). Χρησιμοποιώντας φθορίζουσες χρωστικές στα ανθρώπινα αγγεία αποκαλύπτεται σημαντική παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου σε αγγεία ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II. Εντός αυτών των διαφορετικών κυττάρων στο τοίχωμα του αγγείου, υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί να παράγεται από αρκετά διαφορετικά ένζυμα οξειδάσης. Πιθανές πηγές αυξημένης παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου περιλαμβάνουν τις NAD(P)H εξαρτώμενες οξειδάσες, την οξειδάση της ξανθίνης, τη λιποξυγενάση, τις μιτοχονδριακές οξειδάσες και τις NO συνθετάσες. Αρκετές μελέτες έχουν εξετάσει τις πηγές παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ανθρώπινα αγγεία, παρατηρώντας την απόκριση σε διάφορους αναστολείς οξειδάσης ή/και υποστρώματα (221-225). Επιπρόσθετες μελέτες έχουν εντοπίσει μια συνδεδεμένη με την κυτταρική μεμβράνη οξειδάση που αναστέλλεται από ενώσεις όπως διφαινυλενο ιωδόνιο (ένας αναστολέας της φλαβινοξειδάσης) και διεγείρεται από NADH ή NADPH, υποδεικνύοντας ότι οι

NAD(P)H οξειδάσες αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής υπεροξειδίου σε ανθρώπινα αγγεία, όπως είναι σε διάφορα ζωικά μοντέλα της αγγειακής νόσου, συμπεριλαμβανομένου του διαβήτη (226). Οι πρωτεϊνικές υπομονάδες της NAD(P)H οξειδάσης είναι παρούσες σε ανθρώπινα αιμοφόρα αγγεία συμπεριλαμβανομένων των αθηροσκληρωτικών στεφανιαίων αρτηριών (227), σε σαφηνείς φλέβες και μαστικές αρτηρίες από ασθενείς με στεφανιαία νόσο (228) και σε ανθρώπινα αγγειακά λεία μυϊκά (229) και ενδοθηλιακά κύτταρα (230) σε κυτταρική καλλιέργεια. Το σύστημα της NAD(P)H οξειδάσης, περιλαμβάνει ένα πολύπλοκο σύμπλοκο ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων πολλών υπομονάδων όπως p47phox, P67PHOX, P22PHOX, Rac και GP91 PHOX ή άλλο ομόλογο της Nox οικογένειας (226, 231). Η υπομονάδα P22PHOX που απαιτείται για τη δραστηριότητα του ενζύμου σε όλες τις NAD(P)H οξειδάσες, συνδέεται με την υπομονάδα Nox για να σχηματίσει το δεσμευμένο στην μεμβράνη κυτόχρωμα b558. Αυξημένα επίπεδα των P22PHOX, p47phox, P67PHOX και Nox υπομονάδων εμφανίζονται σε ανθρώπινες αθηροσκληρωτικές στεφανιαίες αρτηρίες (227) και σε αγγεία διαβητικών ασθενών (228), σε συνδυασμό με την αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Αυτό υποδηλώνει ότι η αυξημένη γονιδιακή έκφραση ή/και οι μετα-μεταγραφικές αυξήσεις στα πρωτεϊνικά επίπεδα είναι σημαντικά αυξημένα στην αυξημένη δραστηριότητα της NAD(P)H οξειδάσης στην αγγειακή νόσο στον άνθρωπο.

Για παράδειγμα, η αγγειοτενσίνη II αυξάνει την μεταγραφική δραστηριότητα της NAD(P)H οξειδάσης με αυξημένη μεταγραφική έκφραση της υπομονάδας (232). Ωστόσο, είναι σαφές ότι οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες P47PHOX, P67PHOX και Rac παίζουν επίσης ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της δραστηριότητας της NAD(P)H οξειδάσης στην καρδιαγγειακή νόσο από οξεία ενεργοποίηση του ενζυματικού συμπλόκου, για παράδειγμα με φωσφορυλίωση και μετατόπιση του P47PHOX (229).

3.3.2 Συσχέτιση αυξημένης παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου στα αγγεία και δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου στην αθηροσκλήρωση

Η συσχέτιση μεταξύ μείωσης του NO εξαιτίας του υπεροξειδίου του υδρογόνου υποδηλώνει ότι η παραγωγή υπεροξειδίου μπορεί εν μέρει να αποτελεί τη βάση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας στην αθηροσκλήρωση

στον άνθρωπο, όπως συμβαίνει σε ορισμένα πειραματικά μοντέλα της αγγειακής νόσου. *In vivo* (206) και *in vitro* (233) δεδομένα δείχνουν ότι η μέσω ακετυλοχολίνης (ACh) αγγειοδιαστολή στα ανθρώπινα αγγεία σχετίζεται αντίστροφα με τον αριθμό των παρόντων αθηροσκληρωτικών παραγόντων κινδύνου. Ωστόσο, οι λειτουργικές μελέτες της παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ανθρώπινα αγγεία είναι πιο περιορισμένες (233, 234). Οι Huraux et al, βρήκαν μεγάλη μεταβλητότητα τόσο στην αγγειοδιαστολή εξαιτίας του NO όσο και στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου στις εσωτερικές μαστικές αρτηρίες, αλλά δεν κατάφεραν να βρουν συγκεκριμένες συσχετίσεις μεταξύ αυτών των δύο παραμέτρων ή με κλινικούς παράγοντες κινδύνου (233). Ερευνήθηκε η παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου με την NAD(P)H οξειδάση σε ανθρώπινα αγγεία και οι συσχετίσεις μεταξύ της παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου, του προφίλ αθηροσκληρωτικών παραγόντων κινδύνου και της δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου. Παρατηρήθηκε η αναμενόμενη αρνητική συσχέτιση μεταξύ του προφίλ των παραγόντων κινδύνου και της αγγειοδιαστολής του ενδοθηλίου μέσω του NO. Ωστόσο, βρέθηκε επίσης ότι η παραγωγή υπεροξειδίου από τις NAD(P)H οξειδάσες αυξήθηκε προοδευτικά με την αύξηση του προφίλ των παραγόντων κινδύνου (225).

Η σύνδεση μεταξύ της αυξημένης δραστηριότητας της αγγειακής NAD(P)H οξειδάσης και της μειωμένης ενδοθηλιακής αγγειοδιαστολής μπορεί να οφείλεται σε άμεση μείωση του NO από το υπεροξείδιο, όπως έχει καταδειχθεί σε ζωικά μοντέλα. Ωστόσο και τα δύο θα μπορούσαν να προκύψουν ανεξάρτητα από την αύξηση της έκθεσης του ενδοθηλίου, του μέσου και του εξωτερικού χιτώνα με παράγοντες που δρουν μέσω διαφορετικών οδών σηματοδότησης. Εναλλακτικά, το υπεροξείδιο μπορεί να διαμορφώνει την μεσολαβούμενη από το NO αγγειακή σηματοδότηση (235). Προηγούμενα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η λειτουργία του υποδοχέα που συνδέεται με G-πρωτεΐνη είναι ελλιπής στην αθηροσκλήρωση (236).

Η παρατήρηση ότι η αγγειοδιαστολή που προκαλείται από την ακετυλοχολίνη (ACh) ήταν σημαντικά μικρότερη από τη μέγιστη διαστολή που προκαλεί η χρήση του ιονοφόρου ασβεστίου A23187 είναι συνεπής με την υπόθεση αυτή και με τις παρατηρήσεις σε ανθρώπινες μαστικές αρτηρίες (233). Εντούτοις, η σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ACh και 23187 – για την

πρόκληση αγγειοδιαστολής και η σχέση του NADH-εξαρτώμενου υπεροξειδίου που παράγεται κατά την αγγειοδιαστολή που προκαλείται από ACh και A23187, προτείνουν ότι μια μεταβολή στη σηματοδότηση του υποδοχέα συζευγμένου με του G-πρωτεΐνη είναι απίθανο να είναι ο μοναδικός μηχανισμός που επιτυγχάνει μειωμένη αγγειοδιαστολή μεσολαβούμενη από το NO, καθώς το A23187 ενεργοποιεί τη συνθετάση του NO στο ενδοθήλιο ανεξάρτητα από οποιαδήποτε μονοπάτι συζευγμένου υποδοχέα. Εναλλακτικά, το υπεροξείδιο μπορεί να επηρεάσει την ενδοθηλιακή λειτουργία με άμεσες επιπτώσεις στην δραστηριότητα της ενδοθηλιακής NO συνθάσης (237), ενδεχομένως μέσω της οξειδωσης του συμπαραγόντα της NOS, τετραϋδροβιοπτερίνης (βλέπε παρακάτω).

3.3.3 Γενετικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την παραγωγή υπεροξειδίου στα αγγεία

Προσδιορίζοντας την NAD(P)H οξειδάση ως κύρια πηγή υπεροξειδίου σε αγγεία με αρτηριοσκλήρυνση, προκαλεί μεγάλο ενδιαφέρον η πιθανή συσχέτιση όποιας γενετικής παραλλαγής σε γονίδια που κωδικοποιούν για τις υπομονάδες της NAD(P)H οξειδάσης με την ευαισθησία στη νόσο και ιδίως του γονιδίου CYBA, το οποίο κωδικοποιεί την P22PHOX. Κοινοί γενετικοί πολυμορφισμοί εντός του υποκινητή και της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου CYBA, που κωδικοποιεί την P22PHOX, μπορεί να έχουν σημαντικές επιδράσεις στη γονιδιακή έκφραση, την ενζυμική δραστηριότητα και την παραγωγή υπεροξειδίου στα αγγεία, οδηγώντας σε σημαντικές λειτουργικές διαφορές μεταξύ ατόμων με αγγειακό οξειδωτικό στρες και με βιοδραστικότητα του NO.

Ο C242T CYBA πολυμορφισμός οδηγεί σε αντικατάσταση της τυροσίνης (Tyr) με ιστοδίνη (His) στο κατάλοιπο 72 της P22PHOX και οδηγεί σε εικασίες ότι ο πολυμορφισμός αυτός μπορεί να διαμορφώσει τη δραστηριότητα του ενζύμου με το να επιδρά κατά τη σύνδεση της αίμης (238). Ωστόσο, η αρχική παρατήρηση ύπαρξης αυξημένου επιπολασμού του αλληλόμορφου 242T σε άτομα ελέγχου χωρίς στεφανιαία νόσο (239) δεν υποστηρίχθηκε από την ανάλυση των δεδομένων αγγειογραφικής ανάλυσης από τη Μελέτη Λιποπρωτεϊνών και Στεφανιαίων Αρτηριών (Lipoprotein and Coronary Artery Study- LCAS), που πρότεινε συσχέτιση του αλληλόμορφου

CYBA 242T με αυξημένη εξέλιξη της στεφανιαίας νόσου (239). Άλλες μελέτες ασθενών-μαρτύρων ήταν χωρίς συσχέτιση ή δε βρήκαν ξεκάθαρη συσχέτιση αυτού του πολυμορφισμού με αγγειακή νόσο, πιθανόν εν μέρει λόγω της εγγενών περιορισμών στη μελέτη ασθενών-μαρτύρων που προέρχονταν από προκαταλήψεις του πληθυσμού.

Πιο πρόσφατες, λειτουργικές μελέτες έχουν ως στόχο να αξιολογήσουν τις πιθανές συσχετίσεις μεταξύ πολυμορφισμών του CYBA και της αγγειακής λειτουργίας με χρήση ποσοτικών ενδιάμεσων φαινοτύπων που μπορεί να σχετίζονται πιο άμεσα με την αγγειακή NAD(P)H οξειδάση και δεν εξαρτώνται από την κατάταξη των ατόμων ως ασθενών ή μαρτύρων. Με τη μέτρηση της παραγωγής υπεροξειδίου στα αγγεία *in vitro* σε τμήματα σαφηνούς φλέβας που λήφθηκαν από 110 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση παράκαμψης στεφανιαίας αρτηρίας, παρατηρήθηκε μια σημαντικά χαμηλότερη παραγωγή υπεροξειδίου σε αγγεία ασθενών με το αλληλόμορφο CYBA 242T, που ήταν ανεξάρτητη από άλλους παράγοντες κινδύνου για αθηροσκλήρυνση (240). Αντίστοιχες διαφορές παρατηρήθηκαν επίσης σε μια άλλη λειτουργική μελέτη αγγειοκινητικών αλλαγών της στεφανιαίας αρτηρίας που μετρήθηκε *in vivo* (241). Το αν και πώς, οι πολυμορφισμοί αυτοί πραγματικά συσχετίζονται με ενδεχόμενες αλλαγές στην ευαισθησία ατόμων να εκδηλώσουν αγγειακή νόσο παραμένει ασαφές. Είναι εξίσου δυνατό να αντικατοπτρίζουν έναν γενετικό δείκτη άλλων λειτουργικών παραλλαγών είτε στο ίδιο γονίδιο -π.χ. στην περιοχή του υποκινητή του CYBA- (242) ή αλλού.

3.3.4 Ενδοθηλιακή συνθετάση του NO ως πηγή υπεροξειδίου στα αγγεία : Ο ρόλος της Τετραϋδροβιοπτερίνης

Η περαιτέρω πολυπλοκότητα στη συσχέτιση μεταξύ NO και υπεροξειδίου στο αγγειακό τοίχωμα προτείνεται από την παρατήρηση ότι η eNOS μόνη της μπορεί να δημιουργήσει υπεροξείδιο και όχι NO υπό συνθήκες υποστρώματος ή ανεπάρκειας συμπαράγοντα (243-245) ή σε απόκριση προς αθηρογόνα ερεθίσματα όπως υπεργλυκαιμία (246) ή αύξηση LDL (247). Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στην έννοια της αποσύνδεσης της NOS, όταν η δραστηριότητα του ενζύμου για παραγωγή του NO είναι μειωμένη, σε συνδυασμό με μια αύξηση στην NOS-εξαρτώμενη παραγωγή υπεροξειδίου.

Σε αγγεία ασθενών με μη ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη, η συνολική παραγωγή υπεροξειδίου στα αγγεία αυξάνεται και αυτή η αύξηση φαίνεται να σχετίζεται ιδιαίτερα με αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίου του ενδοθηλίου. Σε αντίθεση με τα αγγεία μη διαβητικών, η αφαίρεση του ενδοθηλίου σε αγγεία από διαβητικούς ασθενείς μειώνει την καθαρή απελευθέρωση υπεροξειδίου (228). Επιπλέον, η ενδοθηλιακή παραγωγή υπεροξειδίου (όχι όμως στους μέσο και έξω χιτώνα) αναστέλλεται από την L-NAME, υποδηλώνοντας ότι η απσύζευξη της eNOS είναι μια πηγή υπεροξειδίου.

Η Τετραϋδροβιοπτερίνη (BH4) είναι ένας απαραίτητος συμπαραάγοντας τόσο για τις τρεις ισομορφές της NOS που απαιτούν BH4 για ομοδιμερισμό της (248) όσο και κατά τη διάρκεια της μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά την οξείδωση της αργινίνης (249).

Η παραγωγή της NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα απαιτεί επαρκή BH4 (250) και η ανασυνδυασμένη NOS που συντίθενται απουσία BH4 είναι ανενεργή για παραγωγή NO: η εξωγενής BH4 επαναφέρει την ενζυμική δραστηριότητα (248, 251, 252). Επιπλέον, η NOS με BH4-ανεπάρκεια παράγει υπεροξειδίο λόγω της μεταφοράς ηλεκτρονίων από την υπομονάδα αναγωγάσης στο μοριακό οξυγόνο, χωρίς οξείδωση της L –αργινίνης.

Αρκετές μελέτες προτείνουν ένα ρόλο για την BH4 στη ρύθμιση της βιοδιαθεσιμότητας της αγγειακής NO. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία βελτιώνεται με την προσθήκη BH4 στα αγγεία ζώων με αθηροσκλήρωση, διαβήτη ή υπέρταση (244). Η παραγωγή υπεροξειδίου στα αγγεία φαίνεται να επηρεάζεται τουλάχιστον εν μέρει από την BH4-εξαρτώμενη αποσύνδεση της eNOS σε αρκετά ζωικά μοντέλα αγγειακής νόσου, συμπεριλαμβανομένης της αθηροσκλήρωσης (253) του διαβήτη (254-256) και της υπερομοκυστεϊναιμίας (257). Σε ανθρώπους, η χορήγηση BH4 αυξάνει τα NO-εξαρτώμενα αποτελέσματα που προκαλούνται στο αντιβράχιο σε άτομα καπνιστές (255), με σακχαρώδη διαβήτη (256) και με υπερχοληστερολαιμία (243,257).

Παρόλο που αυτές οι φαρμακολογικές μελέτες μπορούν να επηρεαστούν από μη ειδικές αντιοξειδωτικές επιδράσεις των υψηλών δόσεων συμπληρωμάτων BH4, ορισμένες πρόσφατες μελέτες τώρα παρέχουν πιο άμεση απόδειξη για την BH4-εξαρτώμενη δυσλειτουργία της NOS στο αγγειακό ενδοθήλιο. Σε ασθενείς με χρόνια θεραπεία με νιτρώδη, η ανοχή στα

νιτρώδη σχετίζεται με ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και αυξημένη αγγειακή παραγωγή υπεροξειδίου (258). Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου που επάγεται από τη χρήση νιτρωδών σε ανθρώπους μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη χορήγηση φυλλικού οξέος, ενδεχομένως με συνέπειες στην BH4 αναγέννηση (259). Σε πειραματικά μοντέλα της αθηροσκλήρωσης (253) ή του διαβήτη (256), τα επίπεδα της eNOS πρωτεΐνης διατηρούνται ή αυξάνονται, παρά το έλλειμμα στην παραγωγή NO που αποκαθίσταται με χρήση BH4. Στα αιμοφόρα αγγεία ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη, η αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίου στο ενδοθήλιο αναστέλλεται από τον πρόδρομο της BH4: σεπιαπτερίνη (sepiapterin) (228). Η δυσλειτουργία της eNOS φαίνεται να ρυθμίζεται εν μέρει από τη σηματοδότηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), καθώς οι αναστολείς της PKC καταστέλλουν την αύξηση στην παραγωγή του υπεροξειδίου στα αγγεία (228, 256) και βελτιώνουν την NO-διαμεσολαβούμενη ενδοθηλιακή λειτουργία (260).

3.3.5 Συμπεράσματα

Η αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίου είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του αγγειακού φαινότυπου στην ανθρώπινη αθηροσκλήρωση, με επιπτώσεις στη χρήση του NO, την παραγωγή υπεροξεινιτρικού και τα οξειδοαναγωγο-ευαίσθητα μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης. Οι NAD(P)H οξειδάσες αποτελούν σημαντική πηγή υπεροξειδίου σε ανθρώπινα αγγεία, η δραστηριότητα αυτού του συστήματος ενζύμων είναι αυξημένη σε συνδυασμό με το προφίλ αθηροκληρωτικών παραγόντων κινδύνου και την πιο έντονη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου. Γενετικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων πολυμορφικών παραλλαγών στα γονίδια που κωδικοποιούν για τις NAD(P)H οξειδάσες, επίσης ρυθμίζουν την παραγωγή υπεροξειδίου σε ανθρώπους με αθηροσκλήρωση. Επιπλέον με την NAD(P)H οξειδάση, η αποσύζευξη της ενδοθηλιακής NOS συμβάλλει επίσης στην αγγειακή παραγωγή υπεροξειδίου και προκαλείται από την απώλεια της διαθεσιμότητας BH4. Η PKC σηματοδότηση φαίνεται να είναι ένα σημαντικό μονοπάτι που σηματοδοτεί την αύξηση της δραστηριότητας της NAD(P)H οξειδάσης και της αποσύζευξης της eNOS. Αυτοί οι μηχανισμοί που αυξάνουν την αγγειακή παραγωγή υπεροξειδίου και τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου

στην ανθρώπινη αγγειακή νόσο αποτελούν βασικούς στόχους για θεραπευτικές παρεμβάσεις .

3.4 Συσχέτιση ενδοπυελικής ενδομητρίωσης με αθηροσκλήρυνση

Η ενδομητρίωση επηρεάζει νεότερες γυναίκες, ενώ η αθηροσκλήρωση είναι μια ασθένεια που εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ηλικία. Στην πραγματικότητα, οι νεότερες γυναίκες προστατεύονται από τη στεφανιαία νόσο. Ωστόσο, αυτές οι δύο ασθένειες, αν και φαινομενικά ασύνδετες, είναι εντυπωσιακά όμοιες. Και στις δύο υπάρχουν ιστικά μακροφάγα που εκφράζουν συγκεκριμένους υποδοχείς και αυτά είναι εκτεθειμένα σε λιποπρωτεΐνες. Επίσης, τόσο οι αθηρωματικές αλλοιώσεις όσο και το περιτοναϊκό υγρό των γυναικών με ενδομητρίωση χαρακτηρίζονται από την παρουσία φλεγμονωδών κυτταροκινών, χημοκινών και αυξητικών παραγόντων. Για παράδειγμα, λιποπρωτεΐνες (LDL, HDL), μακροφάγα και κυτταροκίνες που παράγονται από τα μακροφάγα, Τα-κύτταρα και κυτταροκίνες που παράγονται από τα Τα-κύτταρα, χημειοτακτικοί παράγοντες για τα Τ-κύτταρα και μακροφάγα, αυξητικοί παράγοντες και ελαφρώς οξειδωμένη LDL έχουν σημειωθεί τόσο σε αθηρωματική βλάβη όσο και σε περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση. Επιπλέον, και οι δύο καταστάσεις φαίνεται να διαδραματίζουν παρόμοιους ρόλους, για παράδειγμα, στη «στρατολόγηση» των μονοκυττάρων, την προώθηση της ανάπτυξης και τη δημιουργία τοπικής φλεγμονής, στη θέση που αυτές εμφανίζονται.

Η παρουσία αυξημένου αριθμού των μονοκυττάρων / μακροφάγων στο περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωσ, σε σύγκριση με φυσιολογικές γυναίκες είναι καλά τεκμηριωμένη (261). Υπάρχει στοιχεία που δείχνουν ότι η παρουσία ενεργοποιημένων μακροφάγων και LDL μαζί, μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες (261, 262). Έχουν προταθεί περιπτώσεις ειδικής ενζυματικής οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών από τη 15-λιποξυγενάση και τη μυελοϋπεροξειδάση, είτε με άμεσες αλληλεπιδράσεις είτε με διάφορους μηχανισμούς (262-264). Τα μονοκύτταρα, που είναι οι πρόδρομοι των

μακροφάγων, δε διαθέτουν 15-λιποξυγενάση και εκφράζουν αυτό το ένζυμο κατά τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα.

Οι κυτταροκίνες, όπως η IL-4 και η IL-13 ενεργοποιούν αυτό το ένζυμο και η δραστηριότητα αυτού του ενζύμου έχει παρατηρηθεί μόνο σε ποντίκια σε μακροφάγα του περιτόναιου και σε ιστικά μακροφάγα (265-267). Παρατηρήθηκε η παρουσία του ενζύμου σε περιτοναϊκά μακροφάγα ποντικού (268), γεγονός που υποδηλώνει ότι τα μακροφάγα του περιτοναϊκού υγρού, τουλάχιστον στον ποντικό, είναι παρόντα σε μια ήδη διαφοροποιημένη μορφή. Δύο σημαντικές ασθένειες, η αρτηριοσκλήρυνση και η ενδομητρίωση, χωρίς προφανή σύνδεση μεταξύ τους, αντιπροσωπεύουν καταστάσεις όπου υπάρχουν ενεργοποιημένα μακροφάγα και λιποπρωτείνες μαζί. Και στις δύο νόσους, τα κοινά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν χημειοταξία και διατήρηση των μονοκυττάρων / μακροφάγων, διαφοροποίηση και ανάπτυξη μονοκυττάρων και λείων μυϊκών κυττάρων (ή κυττάρων του ενδομητρίου), ενεργοποίηση της φλεγμονώδους διαδικασίας και κυτταροτοξικότητα (269).

Στον **πίνακα 2** φαίνεται πως μπορεί το οξειδωτικό στρες να οδηγήσει στην επαγωγή συστατικών του περιτοναϊκού υγρού που σχετίζονται με την ενδομητρίωση.

	Ενεργοποιητές	
Συστατικό	Μη οξειδωτικός παράγοντας	Οξειδωτικός παράγοντας
MCP-1	IL-1, TNF-α, LPS	Οξειδωμένα φωσφολιπίδια με μέση Ox-LDL
CSF-1, M-CSF	IL-1, TNF-α	Οξειδωμένα φωσφολιπίδια με μέση Ox-LDL
IL-1	LPS	Υπεροξειδία λιπιδίων, προϊόντα υπεροξειδίων των λιπιδίων, Ox-LDL, οξειδωτικές πρωτείνες
RANTES	IFN-γ, TNF-α	Περιέχει NFκB-ενεργοποιούμενες περιοχές που υποδεικνύουν πιθανή ενεργοποίηση από οξειδωτικές ουσίες
IL-6	Glycodelin	
PDGF, FGF		Ox-LDL, lyso-PC
Προσταγλανδίνες	LPS, αναρίθμητοι κυτταρικοί ενεργοποιητές	Αναρίθμητα προϊόντα PG

Πίνακας 2. Μπορούν οξειδωμένα λιπίδια/λιποπρωτείνες να επάγουν τη δράση ουσιών που σχετίζονται με την ενδομητρίωση;

Συνοψίζοντας, η διαρκής παρουσία συστηματικής και φλεγμονώδους αντίδρασης σε γυναίκες με ενδοπυελική ενδομητρίωση θα αποτελούσε σοβαρό νοσογόνο παράγοντα για αυτές, με απώτερες συνέπειες για την υγεία τους, ιδιαίτερα στο καρδιαγγειακό σύστημα. Προς το παρόν, δεν έχει ερευνηθεί το κατά πόσο τα προϊόντα υπεροξειδωσής λιπιδίων οδηγούν σε πολλαπλασιασμό ενδομητριακά κύτταρα, ενώ υπάρχουν μελέτες που δείχνουν πως γυναίκες με ενδομητρίωση δεν εμφανίζουν συχνότερα υποκλινική αθηροσκληρίωση σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (170). Εντούτοις, υπάρχουν μελέτες που επιχειρούν να αναδείξουν ομοιότητες μεταξύ ενδοπυελικής ενδομητρίωσης και αθηροσκληρίωσης (270) και απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για να διερευνηθεί σε βάθος αυτή η συσχέτιση.

3.5 Γονιδιακοί πολυμορφισμοί

- T786C πολυμορφισμός: Το γονίδιο που κωδικοποιεί την eNOS βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7 (7q35-36) (271, 272). Διάφοροι πολυμορφισμοί του γονιδίου της eNOS έχουν αναφερθεί μέχρι τώρα, αλλά οι επιπτώσεις τους σχετικά με την παραγωγή και την έκφραση του eNO δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί. Οι γενετικοί πολυμορφισμοί T786C και G894T και είναι οι πλέον κλινικά σχετικοί πολυμορφισμοί ως προς το γονίδιο της eNOS που έχουν περιγραφεί (272, 273). Ωστόσο, ο G894T (Glu298Asp) γενετικός πολυμορφισμός και ιδιαιτέρως ο T786C γενετικός πολυμορφισμός (μια μετάλλαξη που βρίσκεται στην 5-περιοχή του γονιδίου eNOS) φαίνεται να εμπλέκονται στην ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου (ΣΝ) (274, 275). Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι αυτοί οι πολυμορφισμοί συνδέονται με μειωμένη παραγωγή eNO (271, 272). Επιπλέον, μπορούν να εμπλέκονται σε ανάπτυξη πρόωρου εμφράγματος του μυοκαρδίου (MI), αν και ο πραγματικός τους ρόλος έχει αμφισβητηθεί από αρκετές μελέτες (276-278).

-NADox (C242T - His72Tyr) πολυμορφισμός

Το σύστημα της NADPH οξειδάσης είναι μία ομάδα ενζύμων συνδεδεμένων με υποδοχείς κυτταροπλασματικής μεμβράνης, που

αποτελούνται από τρία κυτοσολικά συστατικά (P40Phox, p47Phox, P67Phox), δύο δεσμευμένες στην κυτταρική μεμβράνη υπομονάδες (P22 Phox και GP91 Phox) και μια χαμηλού μοριακού βάρους G-πρωτεΐνη. Η ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης προκαλείται από τη μετανάστευση των συστατικών του κυτοσολίου (κυτόχρωμα β) στην κυτταρική μεμβράνη και σύνδεση της υπομονάδας p47Phox με την υπομονάδα P22 Phox (279). Η υπομονάδα P22 Phox είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία της NADPH οξειδάσης καθώς σταθεροποιεί τη μεγάλη υπομονάδα του και χρησιμεύει ως μονάδα σύνδεσης για τους κυτοσολικούς παράγοντες. Το γονίδιο της υπομονάδας P22 phox (CYBA) βρίσκεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 16 (16q24) και κωδικοποιεί την α-υπομονάδα του συνδεδεμένου με τη μεμβράνη συστατικού, έχει μήκος 8,5 kb και περιέχει πέντε ιντρόνια και έξι εξόνια. Τρεις από τους γενετικούς πολυμορφισμούς του γονιδίου CYBA: C242T, A640G και -930A/G παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Ο πολυμορφισμός C242T (rs4673) που βρίσκεται στο εξόνιο 4, οδηγεί σε αλλαγή αμινοξέων (His/Tyr) στο κατάλοιπο 72, το οποίο βρίσκεται σε θέσεις σύνδεσης της αίμης. Δεδομένου ότι το κατάλοιπο ιστιδίνης είναι υποψήφιο ως συνδετικό μόριο της προσθετικής ομάδας της αίμης από το κυτόχρωμα b, αυτός ο πολυμορφισμός έχει προταθεί να συνδέεται άμεσα με τη λειτουργία της P22 Phox (280).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διευκρινιστεί εάν η ενδοπυελική ενδομητρίωση προκαλεί διέγερση των λευκοκυττάρων του αίματος, γεγονός που συνιστά συστηματική ανοσολογική και φλεγμονώδη αντίδραση και, διαμέσου αυτής, έναρξη βιοχημικών διεργασιών που θα συνέβαλαν σε μελλοντική ανάπτυξη αθηρωματικής νόσου.

Έτσι, στον ορό κάθε μιάς από τις γυναίκες που έλαβαν μέρος στη μελέτη μετρήθηκε ο δείκτης φλεγμονής CD40Ligand (CD40L) που προσδένεται στον υποδοχέα CD40 και παίζει καθοριστικό ρόλο στη θυμοεξαρτώμενη χυμική και κυτταρική ανοσοαντίδραση. Ο CD40L είναι μια κυτταροκίνη που εκφράζεται και εκκρίνεται από τα διεγερμένα T-λεμφοκύτταρα και τα βασεόφιλα. Ο CD40 υποδοχέας εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα μακροφάγα και στα λεία μυϊκά κύτταρα. Η διέγερση του CD40 από τον CD40L οδηγεί σε σειρά βιοχημικών γεγονότων (έκφραση διακυτταρικών μορίων προσκόλλησης, παραγωγή ιστικού παράγοντα και απελευθέρωση χημειοτακτικών και προφλεγμονωδών κυτταροκινών καθώς και μεταλλοπρωτεϊνών εξωκυττάριας ουσίας) που συγκλίνουν στην ανάπτυξη και προώθηση πρώιμης αθηροσκλήρυνσης ή στην αστάθεια και τη διάσπαση της αθηρωματικής πλάκας στην προχωρημένη αθηρωματική νόσο (301-306).

Με βάση τα παραπάνω, σκοπό της μελέτης μας αποτέλεσε η διερεύνηση του ρόλου του μορίου CD40L σε ασθενείς με ενδομητρίωση.

Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε τη σχέση της γενετικής βάσης της αθηροσκλήρυνσης με την ανάπτυξη της ενδομητρίωσης, καθώς και την εντόπιση δεικτών αποπτωτικής διαδικασίας στη συστηματική κυκλοφορία των γυναικών με ενδοπυελική ενδομητρίωση. Για αυτό το σκοπό μελετήθηκαν δύο γενετικοί πολυμορφισμοί: eNOS (-786 T/C) και NADOX (C242T - His72Tyr).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υλικά- Μέθοδοι

2.1 Ασθενείς

Οι ασθενείς της μελέτης προέρχονται από τη Β' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Αρεταίειο Νοσοκομείο. Κριτήρια Ένταξης στη μελέτη αποτέλεσαν:

1. Λαπαροσκοπικά επιβεβαιωμένη ενδομητρίωση. Οι ενδείξεις της λαπαροσκόπησης ήταν η ανεξήγητη υπογονιμότητα, το πυελικό άλγος, η υπερηχογραφικά επιβεβαιωμένη εξαρτηματική μάζα και η περίδεση σαλπίγγων.
2. Απουσία ατομικού ιστορικού γυναικολογικού καρκίνου.
3. Απουσία ατομικού ιστορικού ισχαιμικής καρδιοπάθειας ή θρομβοεμβολικής νόσου.
4. Αποχή από οποιαδήποτε θεραπευτική αγωγή με αντιοξειδωτικά, αντιφλεγμονώδη φάρμακα ή σκευάσματα ορμονοθεραπείας για τουλάχιστον 6 μήνες πριν τη λαπαροσκόπηση.
5. Απουσία δεικτών φλεγμονής (C αντιδρώσα πρωτεΐνη, λευκά αιμοσφαίρια) ή εμπυρέτου νοσήματος.

2.2 Πρωτόκολλο

Από τις 90 γυναίκες που εξετάστηκαν, 76 πληρούσαν τα κριτήρια με λαπαροσκοπικά επιβεβαιωμένη ενδομητρίωση και εντάχθηκαν τελικά στην μελέτη. Πληροφορίες για το ιατρικό, γυναικολογικό και μαιευτικό ιστορικό, για το κληρονομικό ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου καθώς και κοινωνικο-δημογραφικά χαρακτηριστικά συλλέχθηκαν για κάθε ασθενή.

Η δειγματοληψία του αίματος λάμβανε χώρα 48 ώρες πριν τη λαπαροσκόπηση, σε πρωινή λήψη μετά από ολονύχτια νηστεία. Σε κάθε ασθενή ελήφθησαν δυο δείγματα ολικού αίματος. Το αίμα συλλέχθηκε σε αποστειρωμένα σωληνάρια και φυγοκεντρήθηκε σε 3000 rpm για 20 λεπτά. Ο

ορός αποθηκεύθηκε στους -80°C μέχρι να γίνει η ανάλυση των δειγμάτων και φυσικά των γενετικών πολυμορφισμών με PCR.

Όλες οι λαπαροσκοπικές επεμβάσεις γίνονταν από τον ίδιο λαπαροσκόπο. Η σταδιοποίηση της νόσου έγινε με βάση τα αναπροσαρμοσμένα κριτήρια της Αμερικανικής Εταιρείας Γονιμότητας (American Fertility Society). Σαρανταεπτά (47) γυναίκες, μέσης ηλικίας 33,1 (± 6.0 SD) έτη παρουσίαζαν επιβεβαιωμένη λαπαροσκοπικά ενδομητρίωση. Είκοσι-εννιά (29) γυναίκες, μέσης ηλικίας 36,9 (± 9.2 SD) έτη δεν παρουσίαζαν λαπαροσκοπικά επιβεβαιωμένη ενδομητρίωση και χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου. Από τις γυναίκες με ενδομητρίωση, δεκαπέντε (15) ήταν σταδίου I-II και τριάντα-δύο (32) σταδίου III-IV. Συνεναιτικό σημείωμα του νοσοκομείου συμπληρώθηκε για τη συμμετοχή στη μελέτη.

Όσο αφορά στη μελέτη των γονιδιακών πολυμορφισμών eNOS (-786 T/C) και NADOx (C242T - His72Tyr) μελετήσαμε 47 γυναίκες επιβεβαιωμένη λαπαροσκοπικά ενδομητρίωση και χρησιμοποιήσαμε παραπάνω γυναίκες ως μαρτυρες. Συγκεκριμένα: 103 υγιείς μάρτυρες για το γονιδιακό πολυμορφισμό eNOS (-786 T/C) και 139 υγιείς μάρτυρες για το γονιδιακό πολυμορφισμό NADOx (C242T - His72Tyr).

Η μελέτη διήρκεσε 18 μήνες.

2.3 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS (Statistical Package for the Social Sciences-version 10.1). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας p ορίστηκε στο $<0,05$.

2.4 Μέτρηση επιπέδων sCD40L

Τα επίπεδα sCD40L ορίσθηκαν με ειδικές ανοσολογικές εργαστηριακές μεθόδους, χρησιμοποιώντας ειδικά αντιδραστήρια του εμπορίου Quantikine Human sCD40L Immunoassay Kit-Catalog Number DCDL40 from R&D Systems Europe, Inc, 614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, United States of America. Η ευαισθησία ήταν 4.2 pg/ml. Ο εσωτερικός δείκτης

ανάλυσης και ο εξωτερικός δείκτης ανάλυσης ήταν <5,4% και <6,4%, αντίστοιχα.

2.5 Απομόνωση γενωμικού DNA

Η απομόνωση του ολικού γενωματικού DNA έγινε σε δείγματα περιφερικού αίματος χρησιμοποιώντας standard μεθόδους (CVD strip assay, A. Viennalab, Austria).

Πειραματική πορεία:

Σε 2ml δείγματος αίματος προστίθενται 3ml διάλυμα λύσης I (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 1mM EDTA), για τη λύση του κυττάρου και το δείγμα τοποθετείται για 30 min σε πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 15min στους 40C. Στο ίζημα προστίθενται 2ml διάλυμα λύσης I και τα δείγματα ανακινούνται προσεκτικά. Κατόπιν ακολουθεί φυγοκέντρηση όπως παραπάνω. Επαναλαμβάνεται το ίδιο βήμα με προσθήκη στο ίζημα 0.5ml διάλυμα λύσης I και φυγοκέντρηση.

Στη συνέχεια προστίθενται στο ίζημα 0.6ml διάλυμα λύσης II (400mM NaCl, 10mM Tris HCl pH 8.2, 2mM EDTA), 250μg/ml πρωτεΐνάση K και 0.6% SDS. Ακολουθεί επώαση στους 37⁰C και ανακίνηση για 24 ώρες. Η πρωτεΐνάση K είναι μία μη ειδική πρωτεάση σερίνης. Η δραστηριότητα της μπορεί να αυξάνεται με προσθήκη αποδιατακτικών παραγόντων όπως SDS και ουρία. Η πρωτεΐνάση K χρησιμοποιείται για την απενεργοποίηση ενδογενών νουκλεασών όπως RNA ή DNA από ιστούς και κυτταρικές σειρές. Η περιεκτικότητα του δείγματος σε DNA μπορεί να υπολογιστεί με μέτρηση της απορρόφησής του στα 260nm με βάση τη σχέση: μία οπτική πυκνότητα (OD) αντιστοιχεί σε 50μg/ml DNA. Στη συνέχεια αραιώνονται ώστε η τελική συγκέντρωση σε DNA να είναι 50ng/μl πριν αποθηκευτούν στους -20⁰C.

2.5.1 T786C πολυμορφισμός: eNOS (-786 T/C)

Η παρουσία του γενετικού πολυμορφισμού T786C του eNOS (-786 T/C) μελετήθηκε με τη διαδικασία της PCR και ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου με τη χρήση βιοτινυλιωμένων εκκινητών: 5'-CACCTGCATTCTGGAAGTGT-3' & 5'-GCCGCAGTAGCAGAGAGAGAC-3'. Οι κύκλοι της PCR ρυθμίστηκαν ως εξής: 2 min για αρχική αποδιάταξη στους 94°C, ακολούθως 35 κύκλοι ενίσχυσης (15 sec αποδιάταξης στους 94°C, 30 sec πρόσδεσης εκκινητών στους 58°C, 30 sec επιμήκυνσης στους 72°C) και τελική επιμήκυνση 3 min στους 72°C. Στα προϊόντα της επιμήκυνσης της PCR έγινε υβριδισμός με test strip που περιείχε αλληλο-ειδικούς ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές ακίνητους σε παράλληλη μικροσυστοιχία (T786C πολυμορφισμός αγρίου τύπου: 5'-CAAGCTCTTCCCTGGCAG-3' & μεταλλαγμένου τύπου: 5'-CAAGCTCTTCCCTGGCGG-3'). Οι συζευγμένες βιοτινυλιωμένες αλληλουχίες ανιχνεύτηκαν με τη χρήση στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης και ειδικού έγχρωμου υποστρώματος (CVD strip assay. A. Viennalab, Austria).

2.5.2 Πολυμορφισμός NADOx (C242T - His72Tyr)

Η παρουσία του γενετικού πολυμορφισμού NADOx (C242T - His72Tyr) μελετήθηκε με τη διαδικασία της PCR και ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου με τη χρήση βιοτινυλιωμένων εκκινητών: κωδικής αλληλουχίας 5'-TGCTTGTGGGTAAACCAAGGCCGGTG-3' & αντικωδικής αλληλουχίας 5'-AACACTGAGGTAAGTGGGGGTGGCTCCTGT-3'. Οι κύκλοι της PCR στανταρίστηκαν ως εξής: 5 min για αρχική αποδιάταξη στους 95°C, ακολούθως 30 κύκλοι ενίσχυσης (30 sec αποδιάταξης στους 95°C, 30 sec πρόσδεσης εκκινητών στους 56°C, 30 sec επιμήκυνσης στους 72°C) και τελική επιμήκυνση 8 min στους 72°C. Στη συνέχεια, το προϊόν PCR (348 bp) έγινε πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού RsaI (New England Biolabs, Inc.) για 8 ώρες στους 37°C. Η μετάλλαξη C σε T στο νουκλεοτίδιο 242 δημιουργεί RsaI θέση πέψης, ενώ το προϊόν PCR που προκύπτει από τον άγριο τύπο του γονιδίου p22-phox είναι ανθεκτικό στην πέψη από το RsaI. Τα PCR προϊόντα του άγριου τύπου του γονιδίου p22-phox και τα προϊόντα πέψης (160 και 188 bp) διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 2% με προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου και ακόλουθη έκθεση σε υπεριώδες

φως. Η πέψη των προϊόντων της PCR έδωσε ζώνες μεγέθους 353 bp σε CC-ομοζυγώτες, 188 και 160 bp σε TT-ομοζυγώτες και όλες τις τρεις ζώνες σε ετεροζυγώτες.

2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR-Polymerase Chain Reaction) (Mullis KB and Fallona FA, 1987)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια ενζυμική μέθοδος *in vitro* πολλαπλασιασμού συγκεκριμένων τμημάτων του γενετικού υλικού, μιμούμενη τον *in vivo* διπλασιασμό του DNA. Μέσω της PCR καθίσταται δυνατή η παραγωγή τεράστιου αριθμού πιστών αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA, χρησιμοποιώντας μικρές ποσότητες (0.1-1 µg) DNA ανάλογα με το αν αυτό είναι πλασμιδιακό ή γενωμικό DNA.

Η ευρεία εφαρμογή της μεθόδου ξεκίνησε αφού πρώτα ανακαλύφθηκε η θερμοανθεκτική Taq DNA-πολυμεράση (Chain et al., 1976). Με τη νέα πολυμεράση, από τη μία πλευρά το ένζυμο δεν καταστρεφόταν στο τέλος κάθε κύκλου λόγω θερμοκρασίας και από την άλλη δεν υπήρχε η ανάγκη να χρησιμοποιούνται χαμηλές θερμοκρασίες πρόσδεσης εκκινητών και επιμήκυνσης. Έτσι η μέθοδος έγινε πιο ακριβής και αποδοτική.

Γενικά, μια DNA-πολυμεράση καταλύει την αντίδραση σύνθεσης με κατεύθυνση 5'-3' μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA με μήτρα μονόκλωνο υπόστρωμα, ξεκινώντας όμως την αντιγραφή από ένα δίκλωνο τμήμα (εκκινητής-μήτρα). Η ίδια διαδικασία επιμήκυνσης του εκκινητή είναι η αρχή της μεθόδου της PCR και πολλών άλλων μοριακών τεχνικών σήμανσης του DNA ή ανάλυσης της πρωτοδιάταξής του. Τα απαραίτητα συστατικά του διαλύματος της αντίδρασης, είναι τα εξής:

- A) DNA- πολυμεράση
- B) Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοσίδια (dNTPs: ATP, CTP, GTP, TTP)
- Γ) Διάλυμα αντίδρασης: MgCl₂ και 10X buffer
- Δ) Εκκινητές (primers)
- Ε) DNA υπόστρωμα

Ένας από τους σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την πιστότητα της Taq πολυμεράσης είναι, εκτός των άλλων που αναφέρθηκαν και οι θερμοκρασίες δράσης του ενζύμου.

2.6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – Αρχή της μεθόδου

Η αντίδραση στηρίζεται στην κυκλική επανάληψη τριών αντιδράσεων, η κάθε μία από τις οποίες πραγματοποιείται στο ίδιο διάλυμα αλλά σε διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους. Η όλη διαδικασία έχει ως εξής:

1. Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation): Η αποδιάταξη γίνεται σε πολύ υψηλή θερμοκρασία (94-96°C).

2. Πρόσδεση εκκινητών (annealing): Στο στάδιο αυτό, κατάλληλα επιλεγμένοι εκκινητές (primers), σχεδιασμένοι για την αλληλουχία που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε, υβριδοποιούνται με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες πάνω στη μήτρα DNA.

3. Πρόσδεση της πολυμεράσης στο 3'-OH κάθε εκκινητή και επιμήκυνση των αλυσίδων (extension): Η Taq πολυμεράση προσδένεται στους εκκινητές και επιμηκώνει προς το 3' άκρο τους, αντιγράφοντας την μήτρα (γενομικό DNA). Η αντιγραφή γίνεται σε σχετικά υψηλή θερμοκρασία (περίπου 60°C) ώστε να μη δημιουργούνται δευτεροταγείς δομές που εμποδίζουν την αναγνώση.

Η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται κυκλικά, με τη μόνη διαφορά ότι σε κάθε κύκλο ως μήτρα, εκτός από το αρχικό DNA, χρησιμοποιούνται και οι αλυσίδες που έχουν συντεθεί. Σε κάθε κύκλο, η επιθυμητή αλληλουχία αυξάνεται με γεωμετρική πρόοδο. Έτσι, μετά από 25-35 κύκλους που πραγματοποιούνται συνήθως μέσα στο διάλυμα της αντίδρασης, έχουν παραχθεί κάποια εκατομμύρια αντίγραφα.

4. Τελική επιμήκυνση: Το τελευταίο στάδιο της όλης διαδικασίας περιλαμβάνει την τελική επιμήκυνση των παραχθέντων αλυσίδων, όπου αυτό χρειάζεται, σε θερμοκρασία περίπου 72°C. (McPherson M.J., Quirke P. and Taylor G.R. (1991). PCR. A Practical Approach. Oxford University).

Ο έλεγχος του προϊόντος της αντίδρασης γίνεται ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα αγαρόζης και βρωμιούχο αιθίδιο και παρατήρηση σε υπεριώδες φως.

2.6.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - Η μέθοδος

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια ενζυμική μέθοδος που επιτρέπει την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Μέσω της PCR καθίσταται δυνατή η παραγωγή τεράστιου αριθμού πιστών αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA, χρησιμοποιώντας μικρές ποσότητες (0.1-1 µg) DNA. Όλα τα συστατικά της αντίδρασης αναδεύονται και φυγοκεντρώνονται σύντομα πριν τη χρήση.

Ταυτόχρονα, πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις ελέγχου:

α) Μία αντίδραση με όλα τα συστατικά εκτός του DNA, ως αρνητικός μάρτυρας. Για κάθε αντίδραση προστίθενται και αναμειγνύονται σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο για PCR χωρητικότητας 0,2ml τα εξής:

1)	Ρυθμιστικό δ/μα της PCR (-MgCl ₂): C αρχ= 10X, C τελ= 1X → 10 µl από τα 100 µl της συνολικής αντίδρασης
2)	MgCl ₂ : C αρχ= 50mM, C τελ=1.5mM → 5 µl από τα 100 µl της συνολικής αντίδρασης
3)	Μείγμα dNTPs: C αρχ= 10mM, C τελ=0.2mM → 1 µl από τα 100 µl της συνολικής αντίδρασης
4)	5' εκκινητής: C αρχ=100pmol/ µl, C τελ= 1pmol/ µl → 1 µl (25pmol) από τα 100 µl της συνολικής αντίδρασης
5)	3' εκκινητής: C αρχ=100pmol/ µl, C τελ=1pmol/ µl → 1 µl (25pmol) από τα 100 µl της συνολικής αντίδρασης
6)	Ταq DNA πολυμεράση: C αρχ=5 U/ µl, C τελ=0.05 U/ µl → 0.5 µl από τα 100 µl της συνολικής αντίδρασης
7)	DNA (0,1- 0,5 µg): ω µg ανάλογα με τη συγκέντρωσή του
8)	Αποστειρωμένο ddH ₂ O: X=100-(18,25+ω) µl, ανάλογα με την αντίδραση
V Τελικός= 100 µl συνολικής αντίδρασης	

Πίνακας 2.1: Τα συστατικά της PCR

Πρακτικά, ετοιμάζεται ένα μείγμα της αντίδρασης με όλα τα συστατικά πλην του DNA υπολογισμένα για $n+2$ αντιδράσεις (όπου n ο πραγματικός αριθμός αντιδράσεων). Το μείγμα διαμοιράζεται σε $n+1$ σωληνάρια PCR και σε αυτά προστίθεται το DNA σε n σωληνάρια, ενώ στον αρνητικό μάρτυρα προστίθεται ίσος όγκος αποστειρωμένο ddH₂O.

Το προϊόν της αντίδρασης αναλύεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης κατάλληλης πυκνότητας.

Για την αντίδραση της PCR, σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι 500 μ l προστίθενται:

0.1-0.5 μ g DNA που περιλαμβάνει την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί.
• 1 μ l μείγματος dNTPs 10 mM (τελική συγκέντρωση 0.1 mM)
• 1 μ l primer-forward 25 pmol/ μ l
• 1 μ l primer-reverse 25 pmol/ μ l
• 5 μ l διαλύματος MgCl ₂ 50 mM (τελική συγκέντρωση 2.5 mM)
• 10 μ l 10X ρυθμιστικού διαλύματος πολυμεράσης.
• 0.5 μ l Taq DNA πολυμεράση (5 U).
Ο απαιτούμενος όγκος dsH ₂ O μέχρι να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος των 100 μ l.

Αποδιάταξη: 94 °C για 45 sec → για 3 κύκλους
Υβριδισμός: 45 °C για 30 sec → για 3 κύκλους
Επιμήκυνση: 72 °C για 1 min → για 3 κύκλους
Αποδιάταξη: 94 °C για 45 sec → για 25 κύκλους
Υβριδισμός: 56 °C για 30 sec → για 25 κύκλους
Επιμήκυνση: 72 °C για 1 min → για 25 κύκλους
Τελική επιμήκυνση: 72 °C για 10 min

Πίνακας 2.2: Το πρόγραμμα που χρησιμοποιείται για την PCR

2.7 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο έλεγχος του γενωμικού DNA μετά την απομόνωσή του από τα κύτταρα, πραγματοποιείται με οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η τελική συγκέντρωση της αγαρόζης είναι 0.8-1% w/v, ενώ ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται 0.5X TBE. Η τάση που εφαρμόζεται είναι 60 Volt με σταθερή ένταση.

Η ανίχνευση γίνεται με χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο τελικής συγκέντρωσης 0.5 µg/ml, το οποίο εισχωρεί και δεσμεύεται στην διπλή έλικα του DNA. Κατόπιν το σύμπλοκο DNA-βρωμιούχου αιθιδίου ανιχνεύεται σε λάμπα υπεριώδους, όπου καθίσταται ορατό με μορφή πορτοκαλόχρωμων ή ρόδινων ζωνών.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

Διάλυμα TBE (Tris-borate): 0.89 M Tris-base, 0.89 M Boric acid, 0.02 M EDTA, pH 8.3 → Το διάλυμα παρασκευάζεται σε συγκέντρωση 20 φορές μεγαλύτερη της τελικής (10X) και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Το τελικό διάλυμα (0.5X) παρασκευάζεται λίγο πριν την ηλεκτροφόρηση με κατάλληλη αραίωση του διαλύματος 10X.

Για να παρασκευαστεί 1lt, διαλύεται σε 800ml ddH₂O: 108gr Trisbase με M.B: 121.1, 55gr boric acid (βορικού οξέος) με M.B: 61.84 και 7.44gr EDTA με M.B: 372.2. Το pH προσαρμόζεται στο 8,3 με HCl και ογκομετρείται στο 1lt. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου: 3 mg/ml (w/v) pH 8.0 (διατηρείται στους 4 °C)

Διάλυμα φόρτωσης (Gel Loading Buffer, GLB): 0.25% (w/v) κυανού της βρωμοφαινόλης, 0.25% (w/v) κυανολικό ξυλένιο, 30% γλυκερόλη.

Παρασκευή πηκτώματος:

Ζυγίζονται 2 gr αγαρόζης και διαλύονται σε 200ml διαλύματος 1XTBE σε κωνική φιάλη. Η φιάλη θερμαίνεται με ταυτόχρονη ανάδευση, μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Προστίθεται το βρωμιούχο αιθίδιο (10λ), φθορίζουσα χρωστική που έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται ανάμεσα στις

βάσεις του DNA, γεγονός που το καθιστά ισχυρά καρκινογόνο (φυλάσσεται υπό μορφή διαλύματος 10mg/ml στο ψυγείο, σε σκουρόχρωμη φιάλη). Στη συνέχεια το διάλυμα, αφού κρυώσει λίγο, ρίχνεται σε κατάλληλα προετοιμασμένο εκμαγείο, στο οποίο έχει τοποθετηθεί ειδική «χτένα» για δημιουργία των θέσεων (slots), στις οποίες θα τοποθετηθούν τα δείγματα. Αφού πήξει το πήκτωμα, αφαιρούμε τη χτένα, απομακρύνουμε το πήκτωμα από το εκμαγείο και για να αποφύγουμε την αφυδάτωση, καλύπτουμε το πήκτωμα με διαφανή μεμβράνη για να διατηρηθεί για μερικές μέρες στο ψυγείο (περίπου 1 εβδομάδα). Τέλος, πριν την ηλεκτροφόρηση, βγάζουμε το πήκτωμα από το ψυγείο, κόβουμε το πήκτωμα κατάλληλα ώστε να δημιουργηθούν όσες θέσεις για «φόρτωμα» δειγμάτων θέλουμε κάθε φορά και το τοποθετούμε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Παράγοντες που επηρεάζουν την ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης:

1) Το μέγεθος του DNA: Δίκλωνα, γραμμικά κομμάτια κινούνται με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του $\log$ του μοριακού τους βάρους.

2) Η συγκέντρωση της αγαρόζης: Η κινητικότητα ενός τμήματος DNA διαφέρει ανάλογα με τη συγκέντρωση της αγαρόζης του πηκτώματος. Παρακάτω στον πίνακα βλέπουμε το εύρος των διαφόρων συγκεντρώσεων πηκτώματος που απαιτείται για αρκετά καλό διαχωρισμό συγκεκριμένου εύρους μεγεθών DNA.

3) Η στερεοδιάταξη του DNA: Η ηλεκτροφορητικότητα γραμμικού ή χαλαρού ή κυκλικού DNA ίδιου μοριακού βάρους διαφέρει και εξαρτάται από το βαθμό υπερελίκωσης.

4) Η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος: Η ταχύτητα με την οποία κινείται το DNA στο πήκτωμα κατά την ηλεκτροφόρηση είναι ανάλογη με την τάση του ρεύματος που εφαρμόζεται (ανάλογη και με την αντίστοιχη ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος που διαπερνά το πήκτωμα). Αν αυξηθεί η τάση αυτό οδηγεί σε αύξηση της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας κάθε τμήματος DNA ανάλογα πάντα με το μοριακό βάρος του κάθε κομματιού του DNA. Έτσι, μεγάλη αύξηση της τάσης οδηγεί σε μείωση της διαχωριστικής ικανότητας του πηκτώματος. Η ηλεκτροφορητική συμπεριφορά του DNA δεν επηρεάζεται αισθητά από τη θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Αποτελέσματα

3.1 Μέτρηση επιπέδων sCD40L

Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον **πίνακα 3.1**. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες όσον αφορά στην ηλικία, ηλικία από την εμμηναρχή, τον ΔΜΣ, το οικογενειακό ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου ή το κάπνισμα. Το 85.4% των ασθενών με ενδομητρίωση ήταν άτοκες σε σύγκριση με το 60.7% των γυναικών που ανήκαν στην ομάδα ελέγχου ($p=0.02$).

Τα επίπεδα CD40L του ορού ήταν σημαντικά υψηλότερα σε μέσες τιμές ΔΜΣ>23.4 με $p=0.043$ (**Εικόνα 3.1**).

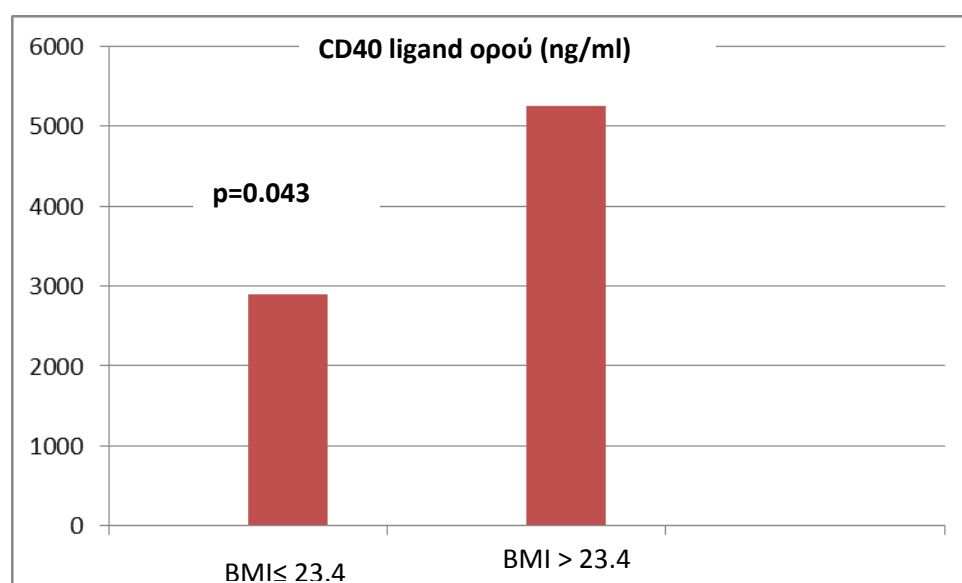
Δεν παρουσιάστηκαν διαφορές στα επίπεδα του CD40 Ligand με $p=0.818$ ανάμεσα στις δύο ομάδες (**πίνακας 3.2**).

Οι μέσες τιμές (SD, ng/ml) για το CD40L σε γυναίκες με ενδομητρίωση ήταν 5247,1 (**πίνακας 3.2**).

Οι μέσες τιμές (SD, ng/ml) για το CD40L σε υγιείς μάρτυρες ήταν 4976,25 (**πίνακας 3.2**).

Τα επίπεδα του CD40L ορού στις γυναίκες με ενδομητρίωση ήταν υψηλότερα σε σχέση με τους μάρτυρες χωρίς όμως αυτό να είναι στατιστικά σημαντικό ($p=0.818$) (**πίνακας 3.2- εικόνα 3.2**).

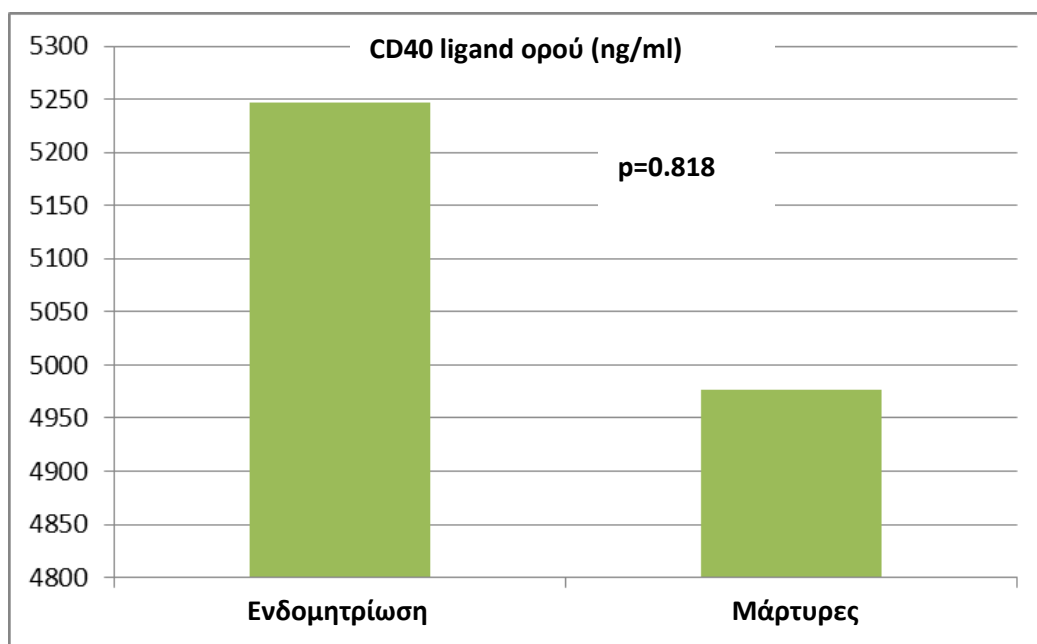
Εικόνα 3.1. Επίπεδα CD40 ligand ορού ανάλογα με τη διάμεσο του BMI



Πίνακας 3.1. Δημογραφικά χαρακτηριστικά 47 γυναικών με ενδομητρίωση και 29 υγιών μαρτύρων

Μεταβλητή	Ενδομητρίωση N=47	Μάρτυρες N=29	P- value
<u>Συνεχείς μεταβλητές</u>	Μέση τιμή (SD)	Μέση τιμή (SD)	
Ηλικία	33.1 (6.0)	36.9 (9.2)	0.034
Ηλικία εμμηναρχής	12.1 (1.3)	12.4 (1.5)	0.399
ΔΜΣ	23.2 (4.7)	22.7 (3.3)	0.736
Ημέρα κύκλου	11.0 (2.4)	12.5 (3.1)	0.31
<u>Κατηγοριοποιημένες μεταβλητές</u>	N (%)	N (%)	
Άτοκες γυναίκες	14 (85,4%)	17 (60,7%)	0.02
Οικογενειακό ιστορικό CVD	14 (35,0%)		0.22
Πρόσφατοι καπνιστές	11 (24,4%)	6 (28,6%)	0.24

Εικόνα 3.2. Επίπεδα CD40 ligand ορού στους ασθενείς με ενδομητρίωση και σε μάρτυρες



Πίνακας 3.2: Μέσες τιμές (SD) του CD40L γυναικών με ενδομητρίωση και υγιών μαρτύρων

Μεταβλητές	Ενδομητρίωση	Μάρτυρες	P- value
	Μέσες τιμές (SD)	Μέσες τιμές (SD)	
CD40L (ng/ml)	5247,10 (5109,02)	4976,25 (4685,50)	0.818

3.2 T786C πολυμορφισμός: eNOS (-786 T/C)

Ο επιπολασμός της ομοζυγωτίας για το αλληλόμορφο C ήταν σημαντικά υψηλότερος στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες (18% έναντι 6%, $p<0,001$) (πίνακας 3.3- εικόνα 3.3).

Όσο αφορά στον επιπολασμό της ομοζυγωτίας για το αλληλόμορφο T ήταν 29% για τους ασθενείς, ενώ ήταν 68% για τους μάρτυρες. Ένα εύρημα που καταδεικνύει το πόσο συχνότερη είναι η εμφάνιση του TT γονότυπου στους μάρτυρες έναντι των ασθενών ($p<0,001$).

Όσο αφορά στον επιπολασμό της ετερόζυγης κατάστασης TC, ήταν 53% για τους ασθενείς και 26% για τους μάρτυρες. Είναι εμφανές ότι ο TC γονότυπος εμφανίζεται σε διπλάσιο ποσοστό στους ασθενείς έναντι των μαρτύρων ($p<0,001$).

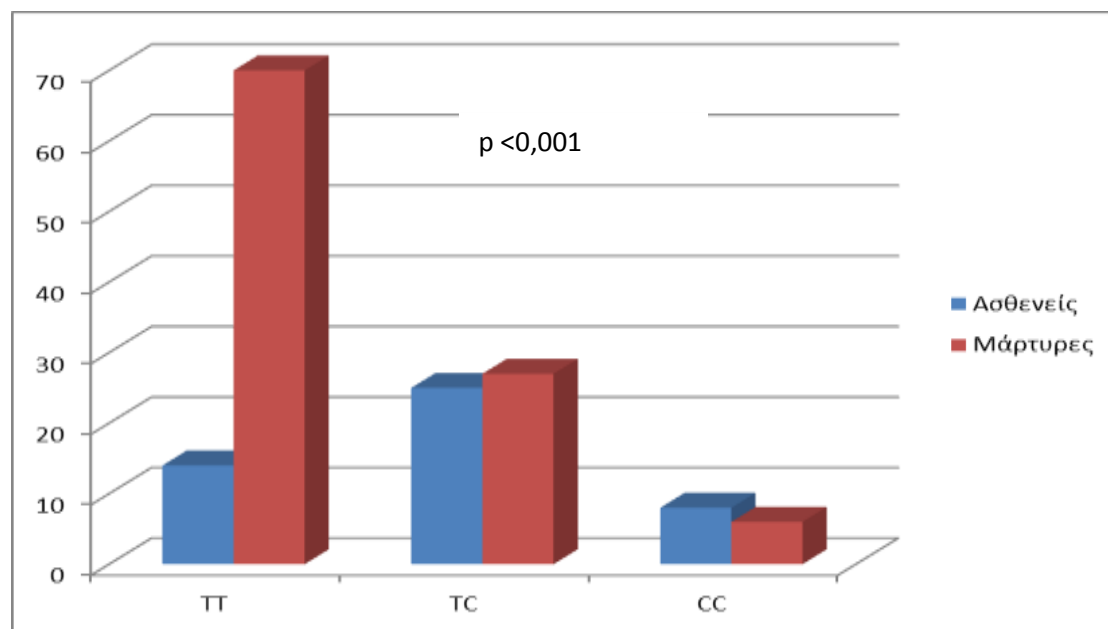
Επιπρόσθετα στα παραπάνω ευρήματα, η συχνότητα εμφάνισης του C αλληλόμορφου στους ασθενείς ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τους μάρτυρες (44% έναντι 19%, $p<0,001$) (πίνακας 3.3- εικόνα 3.4).

Πίνακας 3.3: Μελέτη πολυμορφισμού eNOS (-786 T/C)

Ασθενείς (n=47)				P
eNOS (-786 T/C)		Σύνολο	Controls (n=103)	P
	TT	14 (29%)	70 (68%)	<0,001
	TC	25 (53%)	27 (26%)	<0,001
	CC	8 (18%)	6 (6%)	<0,001
Συχνότητα αλληλόμορφων	T	53 (56%)	167(81%)	0,03
	C	41 (44%)	39 (19%)	<0,001

P: ασθενείς vs controls, NS: Not Significant

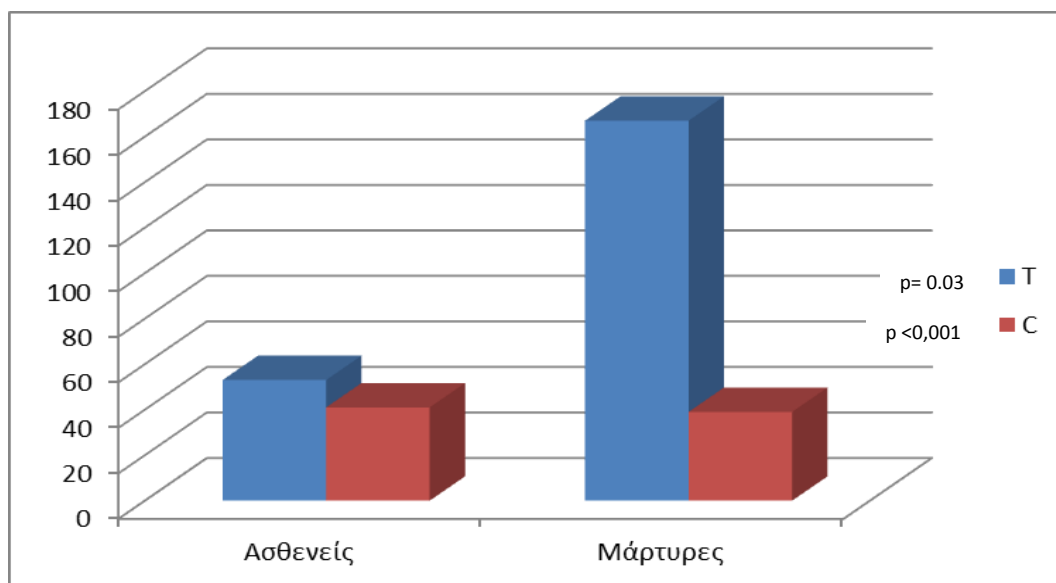
Εικόνα 3.3. Επιπολασμός γονοτύπων για τον T786C πολυμορφισμό: eNOS (-786 T/C) σε ασθενείς και μάρτυρες



Η επεξήγηση των γονοτύπων για την **eNOS (-786 T/C)** είναι:

- 1) Γονότυπος T/T- Φαινότυπος: Φυσιολογικός
- 2) Γονότυπος T/C- Φαινότυπος: Ετεροζυγώτης
- 3) Γονότυπος C/C- Φαινότυπος: Ομοζυγώτης

Εικόνα 3.4. Συχνότητα εμφάνισης C και T αλληλομόρφων σε ασθενείς και μάρτυρες



3.3 Πολυμορφισμός NADOx (C242T - His72Tyr)

Ο επιπολασμός της ομοζυγωτίας για το αλληλόμορφο T ήταν σε ίδια επίπεδα για τους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες -μη στατιστικά σημαντική διαφορά- 14,3% έναντι 18% (p: 0,608) (**πίνακας 3.4- εικόνα 3.5**).

Όσο αφορά στον επιπολασμό της ομοζυγωτίας για το αλληλόμορφο C ήταν 71,4% για τους ασθενείς και 28,8% για τους μάρτυρες (p: 0,608). Εμφανίζεται δηλαδή ο γονότυπος CC σε σχεδόν 2.5 φορές υψηλότερη συχνότητα στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες (p: 0,608) .

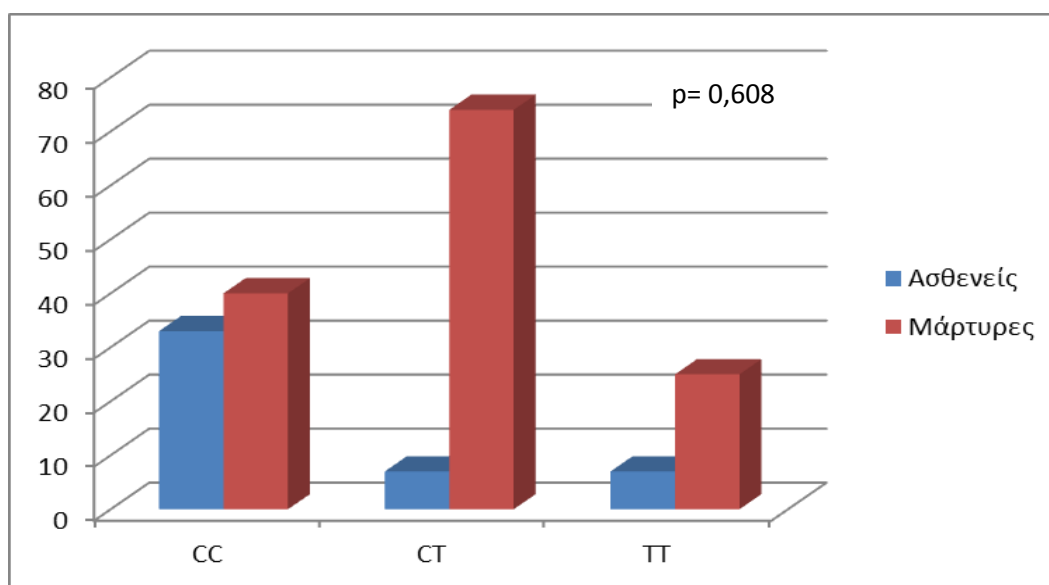
Όσο αφορά στον επιπολασμό της ετερόζυγης κατάστασης CT, ήταν 14,3% για τους ασθενείς και 53,2% για τους μάρτυρες. Εμφανίζεται δηλαδή ο γονότυπος CT σε σχεδόν τετραπλάσια συχνότητα στους μάρτυρες σε σχέση με τους ασθενείς (p: 0,608).

Επιπρόσθετα στα παραπάνω ευρήματα, η συχνότητα εμφάνισης του T αλληλόμορφου στους ασθενείς ήταν υποδιπλάσια σε σχέση με τους μάρτυρες: 21,4% έναντι 45% (p:0,453) (**πίνακας 3.4- εικόνα 3.6**).

Πίνακας 3.4: Μελέτη πολυμορφισμού NADox (C242T - His72Tyr)

Ασθενείς (n=47)				P
NADOx (C242T - His72Tyr)		Σύνολο	Controls (n=139)	P
	CC	33 (71,4%)	40 (28,8%)	0,608
	CT	7 (14,3%)	74 (53,2%)	
	TT	7 (14,3%)	25 (18%)	
Συχνότητα αλληλόμορφων	C	73 (78,6%)	154(55%)	0,453
	T	21 (21,4%)	124 (45%)	
P: ασθενείς vs controls, NS: Not Significant				

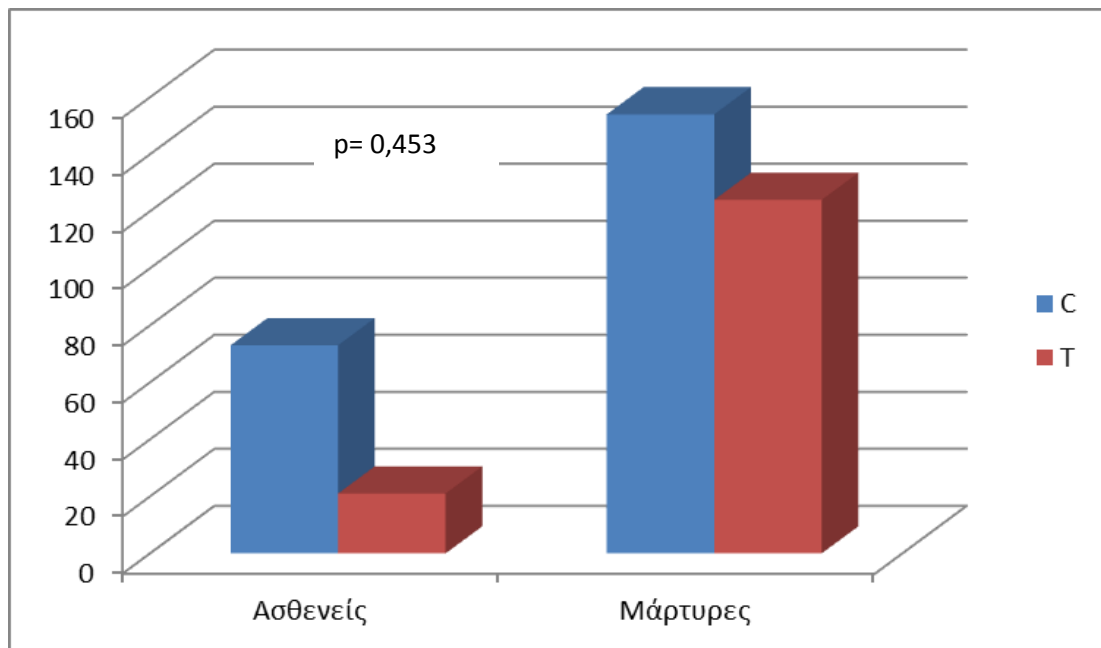
Εικόνα 3.5. Επιπολασμός γονοτύπων για τον πολυμορφισμό NADox (C242T - His72Tyr) σε ασθενείς και μάρτυρες



Η επεξήγηση των γονοτύπων για την **NADox (C242T - His72Tyr)** είναι:

- 1) Γονότυπος C/C - Φαινότυπος: Φυσιολογικός
- 2) Γονότυπος C/T- Φαινότυπος: Ετεροζυγώτης
- 3) Γονότυπος T/T- Φαινότυπος: Ομοζυγώτης

Εικόνα 3.6. Συχνότητα εμφάνισης T και C αλληλομόρφων σε ασθενείς και μάρτυρες



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Συμπεράσματα-Συζήτηση

Έχει δειχθεί από μελέτες ότι νεαρές γυναίκες με ενδομητρίωση έχουν σημαντικά μειωμένη ροή αίματος στα αγγεία τους (FMD: Flow-mediated dilation που μετρά την αγγειοδιαστολή που προκαλείται στα αγγεία από τη δράση του μονοξειδίου του αζώτου ύστερα από μια περίοδο ισχαιμίας-εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολή) σε σύγκριση με υγιή άτομα μάρτυρες, ενώ το πάχος της κοινής καρωτίδας (ccIMT) δε διαφέρει μεταξύ των δύο ομάδων. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι οι νέες γυναίκες με ενδομητρίωση, αν και δεν έχουν ακόμη δομικές αλλαγές στα αγγεία τους, έχουν μια λειτουργική ζημιά στο ενδοθήλιο των αγγείων.

Η ενδοθηλιακή αυτή δυσλειτουργία οφείλεται στην μειωμένη παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου από ενδοθηλιακά κύτταρα και θεωρείται ένα πρώιμο συμβάν της αθηροσκλήρωσης που προηγείται αθηροσκληρωτικών μεταβολών στο αγγειακό τοίχωμα (281). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η διαταραχή του FMD είναι προάγγελος για καρδιαγγειακά συμβάντα, δείχνοντας μια θετική συσχέτιση με παραδοσιακούς παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου, όπως η αρτηριακή υπέρταση, η δυσλιπιδαιμία, ο σακχαρώδης διαβήτης, το κάπνισμα, η καθιστική συμπεριφορά και η φλεγμονή (282, 283, 284, 285, 286, 287, 288). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η διαταραχή του FMD είναι προγνωστικός δείκτης για καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνησιμότητα ανεξάρτητα των παραδοσιακών παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου και του score Framingham (289, 290). Έτσι φαίνεται πως οι νέες γυναίκες με ενδομητρίωση έχουν περισσότερο υποκλινική αθηροσκλήρωση και διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο για μελλοντικές καρδιαγγειακές επιπλοκές σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό.

Βάσει μελετών, έχει δειχθεί ότι σε νέες γυναίκες με ενδομητρίωση, ακόμη και αν απουσιάζουν δομικές αλλαγές στα αγγεία τους, η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία έχει ήδη συμβεί, ανεξαρτήτως από την παρουσία παράγοντων καρδιαγγειακού κινδύνου όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η αρτηριακή υπέρταση και η παχυσαρκία καθώς και άλλων παραγόντων που παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης όπως η ηλικία, ο BMI, το λιπιδαιμικό προφίλ και το κάπνισμα, οι οποίοι ήταν παρόμοια μεταξύ γυναικών με ενδομητρίωση και υγιών μαρτύρων. Επιπλέον, έχει δειχθεί πως η ίδια η

ενδομητρίωση μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη υποκλινικής αθηροσκλήρωσης μέσω άλλων μηχανισμών. Ειδικότερα, μια χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση θα μπορούσε να διαδραματίσει καθοριστικό ρόλο, δεδομένου ότι η φλεγμονή έχει αποδειχθεί κατά την τελευταία δεκαετία ότι αποτελεί βασικό παθογενετικό μηχανισμό στην αθηροσκλήρωση (281). Ειδικότερα, σε γυναίκες με ενδομητρίωση, φλεγμονώδης κατάσταση έχει παρατηρηθεί όχι μόνο στην περιτοναϊκή κοιλότητα, αλλά επίσης και σε συστηματικό επίπεδο (291, 292). Βάσει αυτού, έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα στον ορό των: VCAM-1, ICAM-1, E-σελεκτίνη, συμπαράγοντα ριστοκετίνης και vWF σε γυναίκες με ενδομητρίωση είχαν στατιστικά υψηλότερη τιμή σε σύγκριση με εκείνη σε υγιή άτομα-μάρτυρες, καταδεικνύοντας ότι η φλεγμονή και η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων αποτελούν ένα πρώιμο στάδιο της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας σε αυτούς τους ασθενείς (293, 294, 295, 296, 297). Αντιθέτως, άλλοι βιοχημικοί δείκτες και κυτταροκίνες όπως CRP, IL-6 και TNF- α δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ γυναικών με ενδομητρίωση και υγιών ατόμων (298,299).

Επίσης, όσο αφορά πιθανή συσχέτιση μεταβολών κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου και των αλλαγών στην ενδοθηλιακή λειτουργία, δεν έχουν παρατηρηθεί σημαντικές μεταβολές μεταξύ γυναικών με ενδομητρίωση και υγιών ατόμων (300).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι καλά τεκμηριωμένο ότι η πλειονότητα των ασθενών που αναπτύσσουν έμφραγμα μυοκαρδίου έχουν σημαντικά υψηλότερες τιμές σε τουλάχιστον ένα από τους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου (κάπνισμα, υπέρταση, υπερλιπιδαιμία) που σχετίζονται με την αρτηριοσκλήρωση. Ωστόσο, σχεδόν το 20% των πολύ νεαρών ασθενών με έμφραγμα μυοκαρδίου εμφανίζονται με κανονικές ή σχεδόν φυσιολογικές αρτηρίες.

Έχει αναφερθεί πως ο CD40L, ο φυσιολογικός συνδέτης του CD40, προκαλεί φλεγμονώδη αντίδραση που εμπλέκει τουλάχιστον άλλους δύο υποδοχείς (301). Ο sCD40L μπορεί να ενωθεί παράλληλα στον CD40, $\alpha 5^{\beta 1}$ και $\alpha 11\beta^{\beta 3}$ υποδοχέα όταν εκφράζεται στο ίδιο κύτταρο, συμπεριλαμβανομένων των μονοκυττάρων, των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων (301) και η επιβεβαιωμένη αλληλεπίδραση μπορεί να συνεισφέρει στην παθογένεια μιας φλεγμονώδους-αυτοάνοσης κατάστασης

(301, 302), όπως στην εμφάνιση αθηρωματικής νόσου. Ο CD40L αποθηκεύεται σε μια μεγάλη ποικιλία κυττάρων όπου μετά από ενεργοποίησή τους μετατοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη (303). Πρωτεολυτικά ένζυμα δρουν στην κυτταρική μεμβράνη και ο CD40L απελευθερώνεται στην κυκλοφορία ως βιολογικά δραστικό μόριο στη μορφή sCD40L. Η αυξημένη έκφρασή του sCD40L έχει φανεί σε διάφορες χρόνιες φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες παθήσεις και ο ρόλος του στην αιτιοπαθογένεση και τη συνέχιση αυτών των παθήσεων έχει περιγραφεί σε μεγάλο αριθμό ανθρώπινων μελετών (304, 305).

Σε αυτήν την μελέτη και όσο αφορά στο sCD40L αυτό δε βρέθηκε αυξημένο στις γυναίκες με ενδομητρίωση, γεγονός που μπορεί να δημιουργεί ερωτήματα ως προς το φλεγμονώδη χαρακτήρα της νόσου. Παρόλα αυτά, η κυτταρική απόκριση τόσο στο CD40L όσο και στο sCD40L δεν αποδίδεται μόνο στην αλληλεπίδραση με τον αντίστοιχο υποδοχέα. Οι κυτταρικές απαντήσεις πρέπει να ακολουθούν την ενεργοποίηση των εξωκυττάρια ρυθμιζόμενων κινασών και την αυξημένη σύνθεση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως των IL-6, IL-8, IL-12, IL-1^β και του TNF-α, οι οποίες παίζουν κύριο ρόλο στην έναρξη της ανοσολογικής απάντησης (90-105). Η αλληλεπίδραση του sCD40L με κάθε κλασικό CD40 υποδοχέα είναι σημαντική στη ρύθμιση της φυσικής και της φλεγμονώδους ανοσιακής απόκρισης και επιτυγχάνεται μετά από την ενεργοποίηση των μακροφάγων, από την ωρίμανση των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και την ενεργοποίηση των T-κυττάρων (301-306).

Έχει δειχθεί η ύπαρξη του συμπλέγματος CD40- CD40L στο ανθρώπινο ενδομήτριο, μυομήτριο και τον τράχηλο της μήτρας (306). Εντούτοις, το περιβάλλον των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και το ενδοκρινικό υπόβαθρο της ενδομητρίωσης θα αναμέναμε να ευνοεί την έκφραση του συμπλέγματος CD40- CD40L. Μέχρι τώρα, δεν υπάρχει σαφής συσχέτιση ανάμεσα στην ενδομητρίωση και την έκφραση του συμπλέγματος CD40- CD40L. Όμοια, και σε αυτή την μελέτη το σύμπλεγμα CD40- CD40L δε φάνηκε να είναι αυξημένο στις γυναίκες με ενδομητρίωση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Το μπλοκάρισμα της αλληλεπίδρασης των CD40- CD40L μπορεί να επιβραδύνει τη φλεγμονώδη διαδικασία. Στην περίπτωση που αποδειχθεί ότι τα CD40- CD40L εμπλέκονται στην ενδομητρίωση, η διακοπή

της αλληλεπίδρασής τους με κάποιον τρόπο θα μπορούσε να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο.

Ωστόσο, και ενώ σε αυτή την μελέτη προσδοκούσαμε ότι μια αυξημένη έκφραση του CD40L θα μπορούσε να αποδείξει το φλεγμονώδη-αυτοάνοσο χαρακτήρα της ενδομητρίωσης νόσου και να οδηγεί έτσι στην ανάπτυξη και προώθηση πρώιμης αθηροσκλήρυνσης ή στην αστάθεια και στη διάσπαση της αθηρωματικής πλάκας στην προχωρημένη αθηρωματική νόσο, δε βρήκαμε τα επίπεδά του να είναι υψηλότερα σε ασθενείς με ενδομητρίωση και σε σχέση με τις υγιείς μάρτυρες. Βέβαια, η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων μας είναι περιορισμένη λόγω του μικρού αριθμού των γυναικών με ενδομητρίωση που έλαβαν μέρος στην μελέτη, καθώς εξαιτίας της έλλειψης παρόμοιων βιβλιογραφικών δεδομένων για τον CD40L, με τα οποία θα μπορούσαμε να συγκρίνουμε τα δικά μας αποτελέσματα.

Έχουν αναφερθεί γενετικοί παράγοντες που επηρεάζουν διάφορες οδούς όπως η ενδοθηλιακή λειτουργία και ο σπασμός των στεφανιαίων αρτηριών που μπορούν να προκαλέσουν ανάπτυξη εμφράγματος μυοκαρδίου σε νέους ασθενείς, οι οποίοι δεν έχουν ή έχουν ήσσονος σημασίας αθηρωματικές πλάκες, όπως αποδεικνύεται από δεδομένα αγγειογραφικών μελετών. Έχουν αξιολογηθεί ως προς τη συχνότητά τους διάφοροι κοινοί πολυμορφισμοί του γονιδίου της eNOS, όπως οι T786C και G894T που συνδέονται με μειωμένη παραγωγή του οξειδίου του αζώτου στο ενδοθήλιο και αναποτελεσματική αγγειοδιαστολή σε ομάδα πολύ νεαρών ασθενών με έμφραγμα του μυοκαρδίου. Έχει επίσης βρεθεί ότι οι ασθενείς που αναπτύσσουν πρόωρη εμφάνιση εμφράγματος μυοκαρδίου - παρότι η στεφανιογραφία απεικονίζει αγγειογραφικά κανονικές ή σχεδόν φυσιολογικές στεφανιαίες αρτηρίες – εμφανίζουν μεγαλύτερη συχνότητα ομοζυγωτίας για τους T786C και τις G894T γενετικούς πολυμορφισμούς του γονιδίου eNOS.

Άλλες μελέτες έχουν δείξει αντικρουόμενα αποτελέσματα όσον αφορά τη σύνδεση των γενετικών πολυμορφισμών του γονιδίου της eNOS με τον κίνδυνο εκδήλωσης εμφράγματος του μυοκαρδίου. Οι Nakayama et al. ανέφεραν ότι η συχνότητα του πολυμορφισμού T786C ήταν σημαντικά υψηλότερη σε ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου και με μη στενωμένα αγγεία σε σύγκριση με εκείνους με στενωμένα αγγεία και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι αυτός ο γενετικός πολυμορφισμός σχετίζεται με την

ανάπτυξη εμφράγματος μυοκαρδίου σε ασθενείς χωρίς σημαντική στεφανιαία νόσο (277). Οι Granath et al. δε βρήκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ασθενών και των υγιών ατόμων-μαρτύρων και αφορούν τη συχνότητα του CC (μεταλλαγμένου) γονότυπου (276). Επιπροσθέτως, οι Ciftçi et al. έδειξαν ότι η υψηλή συχνότητα του TT (άγριου τύπου) γονότυπου στους ασθενείς μπορεί να υποστηρίξει συσχέτιση του πολυμορφισμού T786C με πρώιμο έμφραγμα του μυοκαρδίου (307). Εντούτοις, άλλες μελέτες κατέδειξαν πως η ομοζυγωτία για τον πολυμορφισμό T786C (CC) παράγει μια σημαντική μείωση στη δραστηριότητα του υποκινητή του γονιδίου της eNOS και έτσι οδηγεί σε μείωση της παραγωγής eNO (272).

Σε κάθε περίπτωση, καταδεικνύεται από τις περισσότερες μελέτες πως ο T786C γενετικός πολυμορφισμός σχετίζεται με την ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου (274, 275, 278, 308, 309). Όσο αφορά στον κίνδυνο εμφάνισης μυοκαρδίου, σε νεαρά άτομα των οποίων οι στεφανιαίες αρτηρίες δεν χαρακτηρίζονται από σημαντικό βαθμό αθηρωματικές πλάκες, φαίνεται ο T786C γενετικός πολυμορφισμός να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο αν και απαιτούνται περισσότερες μελέτες, με μεγαλύτερο αριθμό συμμετεχόντων και διαφορετικών πληθυσμών.

Στη δική μας μελέτη μελετήσαμε 47 γυναίκες με ενδομητρίωση και 103 υγιείς γυναίκες χωρίς ενδομητρίωση ή αθηροσκλήρυνση και διαπιστώσαμε πως ο επιπολασμός της ομοζυγωτίας για το αλληλόμορφο C (CC) ήταν σημαντικά υψηλότερος στους ασθενείς σε σχέση με τα υγιή άτομα (18% έναντι 6%, $p < 0,001$) ενώ η συχνότητα εμφάνισης του C αλληλόμορφου στους ασθενείς ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τα υγιή άτομα (44% έναντι 19%, $p < 0,001$). Βάσει αυτών των δεδομένων, καταδεικνύεται πως γυναίκες με ενδοπυελική ενδομητρίωση έχουν μεγάλου βαθμού κίνδυνο να εμφανίσουν αθηροσκλήρυνση κάποια στιγμή στη ζωή τους.

Επιπλέον, έχει αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία ο πολυμορφισμός C242T που βρίσκεται στο CYBA γονίδιο και έχει βρεθεί να επηρεάζει τη δραστηριότητα και τη ρύθμιση της NADPH οξειδάσης. Ο C242T CYBA πολυμορφισμός οδηγεί σε αντικατάσταση της τυροσίνης (Tyr) με ιστοιδίνη (His) στο κατάλοιπο 72 της P22PHOX, που οδηγεί σε εικασίες ότι ο πολυμορφισμός αυτός μπορεί να διαμορφώσει τη δραστηριότητα του ενζύμου με το να επιδρά κατά τη σύνδεση της αίμης (235). Τα άτομα με TC

(ετεροζυγώτες) ή TT γονότυπους (φυσιολογικά άτομα) μπορεί να έχουν χαμηλότερο οξειδωτικό στρες, ως αποτέλεσμα μειωμένης παραγωγής οξειδωτικών ριζών ROS, σε σύγκριση με άτομα που φέρουν το γονότυπο CC (ομοζυγώτες) (232). Τα ουδετερόφιλα σε άτομα με CC και CT γονότυπους του C242T πολυμορφισμός του CYBA γονιδίου παράγουν σε σημαντικό βαθμό περισσότερο υπεροξειδίο σε σχέση με άτομα με γονότυπο TT, σε τέτοιο δε βαθμό που τα ουδετερόφιλα σε άτομα με γονότυπο TT παράγουν μόνο 32% όσου υπεροξειδίου παράγουν τα ουδετερόφιλα ατόμων με CC γονότυπο (233).

Ωστόσο, η αρχική παρατήρηση ύπαρξης αυξημένου επιπολασμού του αλληλόμορφου 242T σε άτομα ελέγχου χωρίς στεφανιαία νόσο (235) δεν υποστηρίχθηκε από την ανάλυση των δεδομένων αγγειογραφικής ανάλυσης από τη Μελέτη Λιποπρωτεϊνών και Στεφανιαίων Αρτηριών (Lipoprotein and Coronary Artery Study- LCAS), που πρότεινε συσχέτιση του αλληλόμορφου CYBA 242T με αυξημένη εξέλιξη της στεφανιαίας νόσου (236). Άλλες μελέτες ασθενών-μαρτύρων ήταν χωρίς συσχέτιση ή δεν βρήκαν ξεκάθαρη συσχέτιση αυτού του πολυμορφισμού με αγγειακή νόσο, πιθανόν εν μέρει λόγω της εγγενών περιορισμών στη μελέτη ασθενών-μαρτύρων.

Στη μελέτη μας ελέγξαμε 47 γυναίκες με ενδομητρίωση σε σχέση με 139 υγιείς γυναίκες χωρίς ενδομητρίωση ή αθηροσκλήρυνση για τον πολυμορφισμό NADOx (C242T - His72Tyr). Το δείγμα των ασθενών μας δεν ήταν ιδιαίτερα ενδεικτικό. Δε διαπιστώσαμε διαφορές ως προς τον πολυμορφισμό NADOx (C242T - His72Tyr) ή τη συχνότητα εμφάνισης του T αλληλόμορφου μεταξύ του πληθυσμού των ασθενών και των υγιών ατόμων (controls). Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με την ως τώρα υπάρχουσα βιβλιογραφία. Απαιτείται σίγουρα περαιτέρω μελέτη ως προς τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό ή άλλους πολυμορφισμούς της p22Phox υπομονάδας της NADPH οξειδάσης με μεγαλύτερο δείγμα ασθενών με ενδομητρίωση προκειμένου να δούμε αν υπάρχει αυξημένος κίνδυνος ή όχι για εκδήλωση αθηροσκλήρυνσης σε σχέση με τον παθογενετικό μηχανισμό που σχετίζεται με την NADPH οξειδάση.

Εν κατακλείδι, η διδακτορική μας διατριβή μας δείχνει ότι ο T786C γενετικός πολυμορφισμός γονιδίου της eNOS φαίνεται να σχετίζεται με μεγάλου βαθμού κίνδυνο για γυναίκες με ενδοπυελική ενδομητρίωση να

εκδηλώσουν αθηροσκλήρυνση κάποια στιγμή στη ζωή τους. Αντιθέτως, δεν αποδεικνύεται από τη μελέτη μας συσχέτιση του NADOx (C242T - His72Tyr) πολυμορφισμού της p22Phox υπομονάδας της NADPH οξειδάσης σε γυναίκες με ενδοπυελική ενδομητρίωση, με κίνδυνο εκδήλωσης αθηρωματικής νόσου. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω και μεγαλύτερες μελέτες σε αρκετούς πληθυσμούς με μεγαλύτερο αριθμό ατόμων που θα συμμετέχουν σε αυτές, προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η σχέση της γενετικής βάσης της αθηροσκλήρυνσης με την ανάπτυξη της ενδομητρίωσης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η ενδομητρίωση επηρεάζει τις νεότερες γυναίκες, ενώ η αθηροσκλήρωση είναι μια ασθένεια που εμφανίζεται σε ηλικιωμένες γυναίκες. Αυτές οι δύο ασθένειες, χωρίς προφανή σύνδεση μεταξύ τους, αντιπροσωπεύουν καταστάσεις όπου ενεργοποιημένα μακροφάγα και λιποπρωτεΐνες ανιχνεύονται μαζί. Και οι δύο έχουν τα μακροφάγα των ιστών που εκφράζουν ειδικούς υποδοχείς και οι υποδοχείς αυτοί εκτίθενται σε λιποπρωτεΐνες. Σε αμφότερες τις νόσους, τα κοινά χαρακτηριστικά γνωρίσματα περιλαμβάνουν: χημειοταξία, διατήρηση της διαφοροποίησης των μονοκυττάρων / μακροφάγων, ανάπτυξη των μονοκυττάρων και των λείων μυϊκών κυττάρων (ή κυττάρων του ενδομητρίου), ενεργοποίηση της φλεγμονώδους διαδικασίας και κυτταροτοξικότητα.

Η ενδοθηλιακή συνθάση νιτρικού οξειδίου (eNOS) διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της καρδιαγγειακής λειτουργίας. Υπάρχουν μερικές μελέτες που αφορούν στην επίδραση του πολυμορφισμού T786C του eNOS γονιδίου στην ανάπτυξη της πρόωρης εμφράγματος του μυοκαρδίου (MI), σε άτομα των οποίων οι στεφανιαίες αρτηρίες χαρακτηρίζονται από αθηρωματικό βάρος. Ειδικότερα, η ομοζυγωτία για τον πολυμορφισμό T786C έχει δείχθει ότι οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή eNOS.

Στόχος μελέτης: Στη μελέτη μας εξετάσαμε αν υπάρχει αυξημένη έκφραση του CD40L σε γυναίκες με ενδομητρίωση, που να αποδεικνύει το φλεγμονώδη-αυτοάνοσο χαρακτήρα της ενδομητρίωσης και να συγκλίνει στην ανάπτυξη και προώθηση πρώιμης αθηροσκλήρυνσης ή στην αστάθεια και τη διάσπαση της αθηρωματικής πλάκας στην προχωρημένη αθηρωματική νόσο. Επιπλέον, εξετάσαμε εάν οι ασθενείς με ενδομητρίωση εκφράζουν τον πολυμορφισμό T786C του eNOS γονιδίου και έτσι εάν υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της ενδομητρίωσης και της ανάπτυξης της αθηροσκλήρωσης στους ίδιους ασθενείς.

Μέθοδοι: Ελέγξαμε 47 ασθενείς με λαπαροσκοπικά επιβεβαιωμένη ενδομητρίωση και τους συγκρίναμε με 29 μάρτυρες για την έκφραση του CD40L, με 103 μάρτυρες για τον γονιδιακό πολυμορφισμό T786C του eNOS και με 139 μάρτυρες για τον γονιδιακό πολυμορφισμό NADOX (C242T - His72Tyr).

Αποτελέσματα: Στη μελέτη μας, δε διαπιστώθηκαν διαφορές στα επίπεδα του ορού για τον CD40L μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Βρήκαμε ότι 18% των ασθενών με ενδοπυελική ενδομητρίωση έχουν ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο T786C του eNOS γονιδίου (άρα CC γονότυπο) σε σύγκριση με 6% των ατόμων ελέγχου. Επίσης, δείξαμε ότι υπάρχει μια σημαντικά υψηλή συχνότητα του T786C αλληλίου με 44% σε ασθενείς με ενδομητρίωση, ενώ στην ομάδα ελέγχου η συχνότητα είναι 19%. Αντιθέτως, δε βρήκαμε συγκεκριμένες διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων, όσο αφορά στο γονιδιακό πολυμορφισμό NADOx (C242T - His72Tyr).

Συμπεράσματα: Τα στοιχεία μας δείχνουν ότι δεν υπάρχουν διαφορές στα επίπεδα του ορού για τον CD40L μεταξύ ασθενών και μαρτύρων που να συσχετίζουν την ενδομητρίωση με την αθηρωματική νόσο. Ωστόσο, η έλλειψη βιβλιογραφικών δεδομένων δεν επέτρεπε τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μας με αυτά άλλων παρόμοιων μελετών και έτσι χρειάζονται περαιτέρω έρευνες για να διαλευκανθεί ο ρόλος των παραγόντων φλεγμονώδους διεργασίας στην παθογένεια της ενδομητρίωσης. Πέρα από τα παραπάνω, τα στοιχεία μας δείχνουν ότι υπάρχει μια σημαντικά υψηλότερη συχνότητα της ομοζυγωτίας για το αλληλόμορφο T786C του γονιδίου eNOS (CC γονότυπος) σε ασθενείς με ενδοπυελική ενδομητρίωση σε σύγκριση με άτομα χωρίς ενδοπυελική ενδομητρίωση. Έτσι, φαίνεται ότι οι ασθενείς με ενδοπυελική ενδομητρίωση έχουν σημαντικό κίνδυνο ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης κάποια στιγμή στη ζωή τους.

Λέξεις-κλειδιά: Ενδομητρίωση, αθηροσκλήρωση, αιτιοπαθογένεια, δείκτες οξειδωτικού στρες, γονιδιακοί πολυμορφισμοί eNOS (-786 T/C) και NADOx (C242T - His72Tyr)

SUMMARY

Introduction: Endometriosis affects younger women, while atherosclerosis is a disease that occurs in elder women. These two diseases, with no apparent connection between them, represent situations where activated macrophages and lipoproteins come together. Both have tissue macrophages that expressing specific receptors and these receptors are exposed to lipoproteins. In both diseases, the common features include: chemotaxis, conservation of monocyte/macrophage differentiation, development of monocytes and smooth muscle cells (or endometrial cells), activation of the inflammatory process, and cytotoxicity.

Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) plays an important role in the regulation of cardiovascular function. There are some studies that relating the impact of T786C polymorphism of eNOS gene in the development of premature myocardial infraction (MI) in individuals whose coronary arteries are characterized by atheromatic burden. In particular, homozygosity for T786C has been shown to lead to elevated eNOS production.

Objective: In our study we examine if there is an increased expression of CD40L in women with endometriosis, which establishes the inflammatory-autoimmune nature of endometriosis and converges the development of early atherosclerosis or the instability and disruption of the atherosclerotic plaque in advanced atherosclerotic disease. Also, in our study we examined whether patients with endometriosis express the T786C polymorphism of eNOS gene and so if there is a strong correlation between endometriosis and the development of atherosclerosis in the same patients.

Methods: We recruited 47 patients with laparoscopically confirmed endopelvic endometriosis and we compared them with 29 controls for the expression of CD40L, with 103 controls for the gene polymorphism T786C of eNOS and 139 controls for the gene polymorphism NADOx (C242T - His72Tyr).

Results: In our study, we found no differences in serum levels of CD40L between patients and controls. Furthermore, we found that 18% of patients with endopelvic endometriosis have homozygosity for the T786C allele of the eNOS gene (thus CC genotype) compared to 6% of the controls.

Also, we showed that there is a significant high T786C allele frequency of 44% in patients with endometriosis, while in the control group the frequency is 19%.

Conclusions: Our data show that there are no differences in serum levels of CD40L between patients with laparoscopically confirmed endopelvic endometriosis and controls, in order to associate endometriosis with atherosclerotic disease. However, the lack of bibliographic data did not allow to us the comparison of our results with those of other similar studies, and so further research is needed to clarify the role of the inflammatory process' factors in the pathogenesis of endometriosis. Though, our data suggest that there is a significant higher frequency of homozygosity for the T786C allele of the eNOS gene (CC genotype) in patients with endopelvic endometriosis compared to the control group. So it seems that patients with endopelvic endometriosis have a significant risk of developing atherosclerosis sometime in their life .

Keywords: endometriosis, atherosclerosis, pathogenesis, markers of oxidative stress, gene polymorphisms of eNOS (-786 T / C) and NAD⁺Ox (C242T - His72Tyr)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Bulletti C, Coccia ME, Battistoni S, Borini A (August 2010). Endometriosis and infertility". J. Assist. Reprod. Genet. 27 (8): 441–7.
- 2) Culley L, Law C, Hudson N, Denny E, Mitchell H, Baumgarten M, Raine-Fenning N (2013). The social and psychological impact of endometriosis on women's lives: A critical narrative review. Human Reproduction Update 19 (6): 625–639.
- 3) Vercellini P, Eskenazi B, Consonni D, Somigliana E, Parazzini F, Abbiati A, Fedele L (2011). "Oral contraceptives and risk of endometriosis: a systematic review and meta-analysis". Hum. Reprod. Update 17 (2): 159–70.
- 4) Giarenis I, Giamougiannis P, Speakman CT, Nieto JJ, Crocker SG: Recurrent endometriosis following total hysterectomy with oophorectomy mimicking a malignant neoplastic lesion: a diagnostic and therapeutic challenge. Arch Gynecol Obstet 2009, 279:419–421.
- 5) Erzen M, Kovacic J: Relationship between endometriosis and ovarian cancer. Eur J Gynaecol Oncol 1998, 19:553–555.
- 6) Somigliana E, Vigano P, Parazzini F, Stoppelli S, Giambattista E, Vercellini P: Association between endometriosis and cancer: a comprehensive review and a critical analysis of clinical and epidemiological evidence. Gynecol Oncol 2006, 101:331–341.
- 7) Sinaii N, Cleary SD, Ballweg ML, Nieman LK, Stratton P: High rates of autoimmune and endocrine disorders, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and atopic diseases among women with endometriosis: a survey analysis. Hum Reprod 2002, 17:2715–2724.
- 8) Stratton P, Berkley KJ (2011). "*Chronic pelvic pain and endometriosis: translational evidence of the relationship and implications*". Hum. Reprod. Update 17 (3): 327–46.
- 9) Ballard K, Lane H, Hudelist G, Banerjee S, Wright J (June 2010). "Can specific pain symptoms help in the diagnosis of endometriosis? A cohort study of women with chronic pelvic pain". Fertil. Steril. 94 (1): 20–7.
- 10) Arbique D, Carter S, van Sell S. (2008). Endometriosis can evade diagnosis: being alert to signs of endometriosis can arrest the disease before it takes over a patient's life. Rn, 71(9), 28-32.
- 11) American Society For Reproductive M, (May 1997). "Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996". Fertility and Sterility 67 (5): 817–21.
- 12) Visouli AN, Darwiche K, Mpakas A, Zarogoulidis P, Papagiannis A, Tsakiridis K, Machairiotis N, Stylianaki A, Katsikogiannis N, Courcoutsakis N, Zarogoulidis K: Catamenial pneumothorax: a rare entity? Report of 5 cases and review of the literature. J Thoracic Dis 2012, 4:17–31.

- 13) Huang H, Li C, Zarogoulidis P, Darwiche K, Machairiotis N, Yang L, Simoff M, Celis E, Zhao T, Zarogoulidis K, et al: Endometriosis of the lung: report of a case and literature review. *European journal of medical research* 2013, 18:13.
- 14) Fauser BC, Diedrich K, Bouchard P, Domínguez F, Matzuk M, Franks S, Hamamah S, Simón C, Devroey P, Ezcurra D, Howles CM (2011). "Contemporary genetic technologies and female reproduction". *Hum. Reprod. Update* 17 (6): 829–47.
- 15) Attar E, Bulun SE: Aromatase inhibitors: the next generation of therapeutics for endometriosis? *Fertil Steril* 2006, 85:1307–1318.
- 16) Harada T, Momoeda M, Taketani Y, Hoshiai H, Terakawa N: Low-dose oral contraceptive pill for dysmenorrhea associated with endometriosis: a placebo-controlled, double-blind, randomized trial. *Fertil Steril* 2008, 90:1583–1588.
- 17) Tesone M, Bilotas M, Baranao RI, Meresman G: The role of GnRH analogues in endometriosis-associated apoptosis and angiogenesis. *Gynecol Obstet Invest* 2008, 66(Suppl 1):10–18.
- 18) Alkatout I, Mettler L, Beteta C, Hedderich J, Jonat W, Schollmeyer T, Salmassi A: Combined surgical and hormone therapy for endometriosis is the most effective treatment: prospective, randomized, controlled trial. *J Minim Invasive Gynecol* 2013, 20:473–481.
- 19) Somigliana E, Vercellini P, Vigano P, Benaglia L, Busnelli A, Fedele L: Postoperative medical therapy after surgical treatment of endometriosis: from adjuvant therapy to tertiary prevention. *J Minim Invasive Gynecol* 2013.
- 20) Acien P, Velasco I: Endometriosis: a disease that remains enigmatic. *ISRN Obstet Gynecol* 2013, 2013:242149.
- 21) Bailly E, Margulies AL, Letohic A, Fraieu-Louer B, Renouvel F, Panel P: Evolution of symptoms and quality of life of patients after surgery of digestive endometriosis. *Gynecol Obstet Fertil* 2013, 41(11):627-634.
- 22) Memarzadeh S, Muse KN, Fox, MD (September 21, 2006). "Endometriosis". *Differential Diagnosis and Treatment of endometriosis*. Armenian Health Network, Health.am. Retrieved 2006-12-19.
- 23) Bulletti C, Montini A, Setti PL, et al. (June 2009). "Vaginal parturition decreases recurrence of endometriosis". *Fertil. Steril.* 94 (3): 850–5.
- 24) Sangi-Haghpeykar H, Poindexter AN 3rd: Epidemiology of endometriosis among parous women. *Obstet Gynecol* 1995, 85:983–992.
- 25) Eskenazi B, Warner ML: Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997, 24:235–258.
- 26) Bischoff FZ, Simpson JL: Heritability and molecular genetic studies of endometriosis. *Hum Reprod Update* 2000, 6:37–44.
- 27) Simpson JL, Bischoff FZ, Kamat A, Buster JE, Carson SA: Genetics of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2003, 30:21–40.
- 28) Simpson JL, Elias S, Malinak LR, Buttram VC Jr: Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. *Am J Obstet Gynecol* 1980, 137:327–331.

- 29) Lamb K, Hoffmann RG, Nichols TR: Family trait analysis: a case–control study of 43 women with endometriosis and their best friends. *Am J Obstet Gynecol* 1986, 154:596–601.
- 30) Treloar SA, O'Connor DT, O'Connor VM, Martin NG: Genetic influences on endometriosis in an Australian twin sample. *Fertil Steril* 1999, 71:701–710.
- 31) Hadfield RM, Mardon HJ, Barlow DH, Kennedy SH: Endometriosis in monozygotic twins. *Fertil Steril* 1997, 68:941–942.
- 32) Rahmioglu N, Nyholt DR, Morris AP, et al. (2014). Genetic variants underlying risk of endometriosis: insights from meta-analysis of eight genome-wide association and replication datasets. *Human Reproduction Update* 20 (5): 702–716.
- 33) Painter JN, Anderson CA, Nyholt DR, et al. (January 2011). Genome-wide association study identifies a locus at 7p15.2 associated with endometriosis". *Nature Genetics* 43 (1): 51–4.
- 34) Treloar SA, Wicks J, Nyholt DR, et al. (September 2005). "Genomewide linkage study in 1,176 affected sister pair families identifies a significant susceptibility locus for endometriosis on chromosome 10q26". *American Journal of Human Genetics* 77 (3): 365–76.
- 35) Simoglou C, Zarogoulidis P, Machairiotis N, Porpodis K, Simoglou L, Mitrakas A, Esebidis A, Sarika E, Kouklakis G, Iordanidis A, Katsikogiannis N: Abdominal wall endometrioma mimicking an incarcerated hernia: a case report. *Intern J Gen Med* 2012, 5:569–571.
- 36) Gleicher N, el-Roeiy A, Confino E, Friberg J: Is endometriosis an autoimmune disease? *Obstet Gynecol* 1987, 70:115–122.
- 37) Capellino S, Montagna P, Villaggio B, Sulli A, Soldano S, Ferrero S, Remorgida V, Cutolo M: Role of estrogens in inflammatory response: expression of estrogen receptors in peritoneal fluid macrophages from endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1069:263–267.
- 38) Rier SE, Turner WE, Martin DC, Morris R, Lucier GW, Clark GC: Serum levels of TCDD and dioxin-like chemicals in Rhesus monkeys chronically exposed to dioxin: correlation of increased serum PCB levels with endometriosis. *Toxicol Sci* 2001, 59:147–159.
- 39) Guo SW: The link between exposure to dioxin and endometriosis: a critical reappraisal of primate data. *Gynecol Obstet Invest* 2004, 57:157–173.
- 40) Guo SW, Simsa P, Kyama CM, Mihalyi A, Fulop V, Othman EE, D'Hooghe TM: Reassessing the evidence for the link between dioxin and endometriosis: from molecular biology to clinical epidemiology. *Mol Hum Reprod* 2009, 15:609–624.
- 41) van der Linden PJ: Theories on the pathogenesis of endometriosis. *Human Reprod* 1996, 11(Suppl 3):53–65.
- 42) Donnez J, Van Langendonck A, Casanas-Roux F, Van Gossum JP, Pirard C, Jadoul P, Squifflet J, Smets M: Current thinking on the pathogenesis of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 2002, 54(Suppl 1):52–58. Discussion 59–62.

- 43) Starzinski-Powitz A, Handrow-Metzmacher H, Kotzian S: The putative role of cell adhesion molecules in endometriosis: can we learn from tumour metastasis? *Mol Med Today* 1999, 5:304–309.
- 44) Obata K, Hoshiai H: Common genetic changes between endometriosis and ovarian cancer. *Gynecol Obstet Invest* 2000, 50(Suppl 1):39–43.
- 45) Thomas EJ, Campbell IG: Molecular genetic defects in endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 2000, 50(Suppl 1):44–50.
- 46) Oral E, Ilvan S, Tustas E, Korbeyli B, Bese T, Demirkiran F, Arvas M, Kosebay D: Prevalence of endometriosis in malignant epithelial ovary tumours. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003, 109:97–101.
- 47) Modesitt SC, Tortolero-Luna G, Robinson JB, Gershenson DM, Wolf JK: Ovarian and extraovarian endometriosis-associated cancer. *Obstet Gynecol* 2002, 100:788–795.
- 48) Vercellini P, Scarfone G, Bolis G, Stellato G, Carinelli S, Crosignani PG: Site of origin of epithelial ovarian cancer: the endometriosis connection. *BJOG* 2000, 107:1155–1157.
- 49) Borgfeldt C, Andolf E: Cancer risk after hospital discharge diagnosis of benign ovarian cysts and endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004, 83:395–400.
- 50) Brinton LA, Gridley G, Persson I, Baron J, Bergqvist A: Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1997, 176:572–579.
- 51) Zafrakas M, Tarlatzis BC, Streichert T, Pournaropoulos F, Wolfle U, Smeets SJ, Wittek B, Grimbizis G, Brakenhoff RH, Pantel K, et al: Genome-wide microarray gene expression, array-CGH analysis, and telomerase activity in advanced ovarian endometriosis: a high degree of differentiation rather than malignant potential. *Int J Mol Med* 2008, 21:335–344.
- 52) Zhou HE, Nothnick WB: The relevancy of the matrix metalloproteinase system to the pathophysiology of endometriosis. *Front Biosci* 2005, 10:569–575.
- 53) Paul S, Sharma AV, Mahapatra PD, Bhattacharya P, Reiter RJ, Swarnakar S. Role of melatonin in regulating matrix metalloproteinase-9 via tissue inhibitors of metalloproteinases during protection against endometriosis. *J Pineal Res* 2008; 44: 439-449.
- 54) Collette T, Maheux R, Mailloux J, Akoum A. Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in the eutopic endometrial tissue of women with endometriosis. *Hum Reprod* 2006; 21: 3059-3067.
- 55) Collette T, Bellehumeur C, Kats R, Maheux R, Mailloux J, Villeneuve M, Akoum A. Evidence for an increased release of proteolytic activity by the eutopic endometrial tissue in women with endometriosis and for involvement of matrix metalloproteinase-9. *Hum Reprod* 2004; 19: 1257-1264.
- 56) Szamatowicz J, Laudański P, Tomaszewska I. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1: a possible role in the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod* 2002; 17: 284-288.

- 57) Gaetje R, Holtrich U, Engels K, Kourtis K, Cikrit E, Kissler S, Rody A, Karn T, Kaufmann M. Expression of membrane-type 5 matrix metalloproteinase in human endometrium and endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 2007; 23: 567-573.
- 58) Gilabert-Estellés J, Ramón LA, España F, Gilabert J, Vila V, Réganon E, Castelló R, Chirivella M, Estellés A. Expression of angiogenic factors in endometriosis: relationship to fibrinolytic and metalloproteinase systems. *Hum Reprod* 2007; 2: 2120-2127.
- 59) Ramón L, Gilabert-Estellés J, Castelló R, Gilabert J, España F, Romeu A, Chirivella M, Aznar J, Estellés A. mRNA analysis of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis using a real-time quantitative RT-PCR assay. *Hum Reprod* 2005; 20: 272-278.
- 60) Gilabert-Estellés J, Estellés A, Gilabert J, Castelló R, España F, Falcó C, Romeu A, Chirivella M, Zorio E, Aznar J. Expression of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis. *Hum Reprod* 2003; 18: 1516-1522.
- 61) Van der Linden PJQ, de Goeij AF, Dunselman GA, Erkens HW, Evers JLH. Endometrial cell adhesion in an *in vitro* model using intact amniotic membranes. *Fertil Steril* 1996;65:76–80.
- 62) Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 1997;68:585–96.
- 63) Taylor RN, Ryan IP, Moore ES, Hornung D, Shifren JL, Tseng JF. Angiogenesis and macrophage activation in endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 1997;828:194 –207.
- 64) Braun DP, Dmowski WP. Endometriosis: abnormal endometrium and dysfunctional immune response. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1998;10: 365–9.
- 65) Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 1991;56:45–51.
- 66) Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Koninckx PR, Vandeputte M. Immunosuppressive activity of peritoneal fluid in women with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1993;82:206 –12.
- 67) Kanzaki H, Wang HS, Kariya M, Mori T. Suppression of natural killer cell activity by sera from patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:257– 61.
- 68) Ho HN, Wu MY, Yang YS. Peritoneal cellular immunity and endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1997;38:400 –12.
- 69) Vigano` P, Gaffuri B, Somigliana E, Busacca M, Di Blasio AM, Vignali M. Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 mRNA and protein is enhanced in endometriosis versus endometrial stromal cells in culture. *Mol Hum Reprod* 1998;4:1150–6.

- 70) Garcia-Velasco JA, Arici A, Zreik T, Naftolin F, Mor G. Macrophage derived growth factors modulate Fas ligand expression in cultured endometrial stromal cells: a role in endometriosis. *Mol Hum Reprod* 1999;5:642–50.
- 71) Haney AF, Muscato JJ, Weinberg JB. Peritoneal fluid cell populations in infertility patients. *Fertil Steril* 1983;35:696–8.
- 72) Olive DL, Weinberg JB, Haney AF. Peritoneal macrophages and infertility: the association between cell number and pelvic pathology. *Fertil Steril* 1985;44:772–7.
- 73) Halme J, Becker S, Hammond MG, Raj MHG, Raj S. Increased activation of pelvic macrophages in infertile women with mild endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1983;145:333–7.
- 74) Hill JA, Anderson DJ. Lymphocyte activity in the presence of peritoneal fluid from fertile women and infertile women with and without endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:861–4.
- 75) Olive DL, Haney AF, Weinberg JB. The nature of the intraperitoneal exudate associated with infertility: peritoneal fluid and serum lysozyme activity. *Fertil Steril* 1987;48:802–6.
- 76) Klein NA, Montoya IA, Schenken RS. Characterization of the resident lymphoid cell population in endometriosis. In *Soc Gynecol Invest Abst #518*, 39th Annual Meeting, San Antonio, TX, 1992.
- 77) Khorram O, Taylor RN, Ryan IP, Schall TJ, Landers DV. Peritoneal fluid concentrations of the cytokine RANTES correlate with the severity of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:1545–9.
- 78) Weed JC, Arquembourg PC. Endometriosis: can it produce an autoimmune response resulting in infertility? *Clin Obstet Gynecol* 1980; 23:885–93.
- 79) Mathur S, Garza DE, Smith LF. Endometrial autoantigens eliciting immunoglobulin (Ig)G, IgA, and IgM responses in endometriosis. *Fertil Steril* 1990;54:56–63.
- 80) Mathur S, Peress MR, Williamson HO, Youmans CD, Maney SA, Garvin AJ, et al. Autoimmunity to endometrium and ovary in endometriosis. *Clin Exp Immunol* 1982;50:259–66.
- 81) Kennedy SH, Starkey PM, Sargent IL, Hicks BR, Barlow DH. Antiendometrial antibodies in endometriosis measured by an enzymelinked immunosorbent assay before and after treatment with danazol and nafarelin. *Obstet Gynecol* 1990;75:914 –7.
- 82) Wild RA, Hirisave V, Podczaski ES, Coulam C, Shivers CA, Satyaswaroop PG. Autoantibodies associated with endometriosis: can their detection predict presence of the disease? *Obstet Gynecol* 1991; 77:927–31.
- 83) Gleicher N, el-Roeiy A, Confino E, Friberg J. Is endometriosis an autoimmune disease? *Obstet Gynecol* 1987;70:115–22.

- 84) Badawy SZ, Cuenca V, Kaufman L, Stitzel A, Thompson M. The regulation of immunoglobulin production by B cells in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1989;51:770–3.
- 85) Dmowski WP, Rana N, Michalowska J, Friberg J, Papierniak C, el-Roeiy A. The effect of endometriosis, its stage and activity, and of autoantibodies on *in vitro* fertilization and embryo transfer success rates. *Fertil Steril* 1995;63:555–62.
- 86) Isaacson KB, Coutifaris C, Garcia CR, Lyttle CR. Production and secretion of complement component 3 by endometriotic tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;69:1003–9.
- 87) Kauma S, Clark MR, White C, Halme J. Production of fibronectin by peritoneal macrophages and concentration of fibronectin in peritoneal fluid from patients with or without endometriosis. *Obstet Gynecol* 1988;72:13–8.
- 88) Ylikorkala O, Koskimies A, Laatkainen T, Tenhunen A, Viinikk L. Peritoneal fluid prostaglandins in endometriosis, tubal disorders and unexplained infertility. *Obstet Gynecol* 1984;63:616–20.
- 89) Rezai N, Ghodgaonkar RB, Zacur HA, Rock JA, Dubin NH. Cul-desac fluid in women with endometriosis: fluid volume, protein and prostanoid concentration during the periovulatory period—days 13–18. *Fertil Steril* 1987;48:29–32.
- 90) Ho HN, Chao KH, Chen HF, Wu MY, Yang YS and Lee TY (1995) Peritoneal natural killer cytotoxicity and CD25+ CD3+ lymphocyte subpopulation are decreased in women with stage III–IV endometriosis *Human Reproduction* 10 2671–2675
- 91) Van Furth R, Raeburn JA and Van Zwet TI (1979) Characteristics of human mononuclear phagocytes *Blood* 54 485–500
- 92) Oral E, Olive DL and Arici A (1996) The peritoneal environment in endometriosis *Human Reproduction Update* 2 385–398
- 93) Dmowski WP (1995) Immunological aspects of endometriosis *International Journal of Gynaecology and Obstetrics* 50 Supplement 1 3–10
- 94) Senturk LM and Arici A (1999) Immunology of endometriosis *Journal of Reproductive Immunology* 43 67–83
- 95) McLaren J (2000) Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis *Human Reproduction Update* 6 45–55
- 96) Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M and Koninckx PR (1991) Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium *Fertility and Sterility* 56 45–51
- 97) Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Vandeputte M and Koninckx PR (1992) The natural killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis *Fertility and Sterility* 58 290–295
- 98) Hill JA (1992) Immunology and endometriosis *Fertility and Sterility* 58: 262–264

- 99) Kikuchi Y, Ishikawa N, Hirata J, Imaizumi E, Sasa H and Nagata I (1993) Changes of peripheral blood lymphocyte subsets before and after operation of patients with endometriosis *Acta Obstetrica et al Gynecologica Scandinavica* 72 157–161
- 100) Badawy SZ, Cuenca V, Marshall L, Munchback R, Rinas AC and Coble DA (1984). Cellular components in peritoneal fluid in infertile patients with and without endometriosis *Fertility and Sterility* 42 704–708
- 101) Bach FH and Sachs DH (1987) Current concepts: Immunology. Transplantation immunology *New England Journal of Medicine* 317:489–492
- 102) Ho HN, Wu MY and Yang YS (1997a) Peritoneal cellular immunity and endometriosis *American Journal of Reproductive Immunology* 38:400–412
- 103) Hill JN, Faris HM, Schiff I and Anderson DJ (1988) Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis *Fertility and Sterility* 50 216–222
- 104) Dmowski WP, Gebel HM and Braun DP (1994) The role of cell-mediated immunity in pathogenesis of endometriosis *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica Suppl* 159 7–14
- 105) Novak E (1931) Pelvic endometriosis *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 22 826–837
- 106) Bergqvist A, Ljungberg O and Skoog L (1993) Immunohistochemical analysis of oestrogen and progesterone receptors in endometriotic tissue and endometrium *Human Reproduction* 8 1915–1922
- 107) DiZerega GS, Barber DL and Hodgen GD (1980) Endometriosis: role of ovarian steroids in initiation, maintenance and suppression *Fertility and Sterility* 33 649–653
- 108) Tabibzadeh SS, Satyaswaroop PG and Rao PN (1988) Antiproliferative effect of interferon-g in human endometrial cells *in vitro* potential local growth modulatory role in endometrium *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 67 131–138
- 109) Mahmood TA and Templeton A (1991) Peritoneal fluid volume and sex steroids in the pre-ovulatory period in mild endometriosis *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 98 179–183
- 110) Bulun SE, Zeitoun KM, Takayama I, Simpson I and Sasano I (2000) Aromatase as a therapeutic target in endometriosis *Trends in Endocrinology and Metabolism* 11 22–27
- 111) Karck U, Reister F, Schafer W, Zahradnik HP and Breckwoldt M (1996) PGE2 and PGF2 alpha release by human peritoneal macrophages in endometriosis *Prostaglandins* 51 49–60
- 112) Mori H, Sawairi M, Makagawa M, Itoh N, Wada K and Tamaya T (1991) Peritoneal fluid interleukin 1-beta and tumor necrosis factor in patients with benign gynaecological disease *American Journal of Reproductive Immunology* 26 62–67
- 113) Dilloo D, Laws HJ, Hanenberg H, Korholz D, Nurnberger W and Burdach SE (1994) Induction of two distinct natural killer cell populations, activated T

cells and antineoplastic cytokines, by interleukin 2 therapy in children with solid tumors *Experimental Hematology* 22 1081–1088

114) Le J and Vilcek J (1989) Interleukin 6 multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response *Laboratory Investigation* 61 588–602

115) Sironi M, Breviario F, Proserpio P, Biondi A, Vecchi A, Van Damme J, Dejana E and Mantovani A (1989) IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells *Journal of Immunology* 142 549–553

116) Akira S, Taga T and Kishimoto T (1993) Interleukin 6 in biology and medicine *Advances in Immunology* 54 1–78

117) Giudice LC (1994) Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine *Fertility and Sterility* 61 1–11

118) Tsudo T, Harada T, Iwabe T, Tanikawa M, Nagano Y, Ito M, Taniguchi F and Terakawa N (2000) Altered gene expression and secretion of interleukin 6 in stromal cells derived from endometriotic tissues *Fertility and Sterility* 73 205–211

119) Keenan JA, Chen TT, Chadwell NL, Torry DS and Caudle MR (1994). Interferon-gamma and interleukin 6 (IL-6) in peritoneal fluid and macrophage-conditioned media of women with endometriosis *American Journal of Reproductive Immunology* 32 180–183

120) Koumantakis E, Matalliotakis I, Neonaki M, Froudarakis G and Georgoulas V (1994). Soluble serum interleukin 2 receptor, interleukin 6 and interleukin 1a in patients with endometriosis and in controls *Archives of Gynecology and Obstetrics* 255 107–112

121) Punnonen J, Teisala K, Ranta H, Bennett B and Punnonen R (1996) Increased levels of interleukin 6 and interleukin 10 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 174 1522–1526

122) Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elnor VM, Elnor SG, Strieter RM (1992) Interleukin 8 as a macrophage derived mediator of angiogenesis *Science* 258 1798–1801

123) Peveri P, Walz A, Dewald B and Baggiolini M (1988) A novel neutrophilactivating factor produced by human mononuclear phagocytes *Journal of Experimental Medicine* 167 1547–1559

124) Van Deuren M, Dofferhoff ASM and Vander Meer JWM (1992) Cytokines and the response to infection *Journal of Pathology* 168 349–356

125) Rana N, Braun DP, House R, Gebel H, Rotman C and Dmowski WP (1996). Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis *Fertility and Sterility* 65 925–930

126) Harada T, Enatsu A, Mitsunari M, Nagano Y, Ito M, Tsudo T, Taniguchi F, Iwabe T, Tanikawa M and Terakawa N (1999) Role of cytokines in progression of endometriosis *Gynecological and Obstetrical Investigation* 47 Supplement 1 34–39

- 127) Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Tanikawa M, Onohara Y and Terakawa N (1998). Pathogenetic significance of increased levels of interleukin 8 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis Fertility and Sterility 69 924–930
- 128) Arici A, Seli E, Senturk LM, Gutierrez LS, Oral E and Taylor HS (1998a) Interleukin 8 in the human endometrium Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 83 1783–1787
- 129) Arici A, Seli E, Zeyneloglu HB, Senturk LM, Oral E and Olive DL (1998b) Interleukin 8 induces proliferation of endometrial stromal cells a potential autocrine growth factor Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 83 1201–1205
- 130) Ho HN, Wu MY, Yang YS and Lee TY (1997b) Peritoneal interleukin 10 increases with activated CD4+ T lymphocytes in women with endometriosis Human Reproduction 12 2528–2533
- 131) Richter O, Mallmann P, Van Der Ven H and Krebs D (1998) TNF-alpha secretion by peritoneal macrophages in endometriosis Zentralbl Gynakologie 120 332–336
- 132) Innis EK, Gatanaga M, Cappuccini F, Dett CA, Yamamoto RS, Granger GA and Gatanaga T (1992) Growth of the endometrial adenocarcinoma cell line AN3CA is up-regulated by estrogen *in vitro*. Endocrinology 130 1852–1856
- 133) Koninckx PR, Kennedy SH and Barlow DH (1998) Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid Human Reproduction Update 4 741–751
- 134) Leiva MC, Hasty LA, Pfeifer S, Mastroianni L, Jr and Lyttle CR (1993) Increased chemotactic activity of peritoneal fluid in patients with endometriosis American Journal of Obstetrics and Gynecology 168 592–598
- 135) Yoshimura T and Leonard EJ (1990) Secretion by human fibroblasts of monocyte chemoattractant protein-1, the product of gene JE Journal of Immunology 144 2377–2383
- 136) Yoshimura T, Yukhi N, Moore SK, Appella E, Lerman MI and Leonard EJ (1989) Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE Federation of European Biochemical Societies 244 487–493
- 137) Schall TJ, Bacon K, Yoy KJ and Goeddel DV (1990) Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES Nature 347 669–671
- 138) McLaren J, Dealtry G, Prentice A, Charnock-Jones DS and Smith SK (1997) Decreased levels of a potent regulator of monocyte/macrophage activation, interleukin 13, in the peritoneal fluid of patients with endometriosis Human Reproduction 12 1307–1310
- 139) Mahnke JL, Dawood MY and Huang JC (2000) Vascular endothelial growth factor and interleukin 6 in peritoneal fluid of women with endometriosis Fertility and Sterility 73 166–170

- 140) Kupker W, Schultze-Mosgau A and Diedrich K (1998) Paracrine changes in the peritoneal environment of women with endometriosis Human Reproduction Update 4 719–723
- 141) Yap OW, Chandrasekher YA and Giudice LC (1998) Growth factor regulation of insulin-like growth factor binding protein secretion by cultured human granulosa–luteal cells Fertility and Sterility 70 535–540
- 142) Kim JG, Suh CS, Kim SH, Choi YM, Moon SY and Lee JY (2000) Insulin like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins (IGFBPs), and IGFBP-3 protease activity in the peritoneal fluid of patients with and without endometriosis Fertility and Sterility 73 996–1000
- 143) Chang SY and Ho Y (1997) Immunohistochemical analysis of insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-I receptor and insulin-like growth factor-II in endometriotic tissue and endometrium Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica 76 112–117
- 144) Chegini N, Rossi MJ and Masterson BJ (1992) Platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), and EGF and PDGF betareceptors in human endometrial tissue; localization and *in vitro* action Endocrinology 130 2373–2385
- 145) Halme J, White C, Kauma S, Estes J and Haskill S (1988) Peritoneal macrophages from patients with endometriosis release growth factor activity *in vitro*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 66 1044–1049
- 146) Surrey ES and Halme J (1991) Effect of platelet-derived growth factor on endometrial stromal cell proliferation *in vitro* a model for endometriosis Fertility and Sterility 56 792–797
- 147) Chegini N, Rossi MJ and Masterson BJ (1992) Platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), and EGF and PDGF betareceptors in human endometrial tissue; localization and *in vitro* action Endocrinology 130 2373–2385
- 148) Simms JS, Chegini N, Williams RS, Rossi AM and Dunn WA (1991) Identification of epidermal growth factor, transforming growth factoralpha, and epidermal growth factor receptor in surgically induced endometriosis in rats American Journal of Obstetrics and Gynecology 78 182–186
- 149) DeLeon FD, Vijayakumar R, Brown M, Rao CV, Yussman MA and Schultz G (1986) Peritoneal fluid volume, estrogen, progesterone, prostaglandin, and epidermal growth factor concentrations in patients with and without endometriosis Obstetrics and Gynecology 68 189–194
- 150) Mellor SJ and Thomas EJ (1994) The actions of estradiol and epidermal growth factor in endometrial and endometriotic stroma *in vitro*. Fertility and Sterility 62 507–513
- 151) Prentice A, Thomas EJ, Weddell A, McGill A, Randall BJ and Horne CH (1992) Epidermal growth factor receptor expression in normal endometrium and endometriosis: an immunohistochemical study British Journal of Obstetrics and Gynaecology 99 395–398

- 152) Folkman J and Klagsbrun M (1987) Angiogenic factors *Science* 235 442–444
- 153) Presta M (1988) Sex hormones modulate the synthesis of basic fibroblast growth factor in human endometrial adenocarcinoma cells: implications for the neovascularization of normal and neoplastic endometrium *Journal of Cell Physiology* 137 593–597
- 154) Seli E, Zeyneloglu HB, Senturk LM, Bahtiyar OM, Olive DL and Arici A (1998) Basic fibroblast growth factor peritoneal and follicular fluid levels and its effect on early embryonic development *Fertility and Sterility* 69 1145–1148
- 155) Weinberg JB, Haney AF, Xu FJ and Ramakrishnan S (1991) Peritoneal fluid and plasma levels of human macrophage colony-stimulating factor in relation to peritoneal macrophage content *Blood* 78 513–516
- 156) Stanley ER, Berg KL, Einstein DB, Lee PS, Pixley FJ, Wang Y and Yeung YG (1997) Biology and action of colony-stimulating factor 1 *Molecular Reproduction and Development* 46 4–10
- 157) Laping NJ (1999) Hepatocyte growth factor in renal disease: cause or cure? *Cell and Molecular Life Science* 56 371–377
- 158) Osuga Y, Tsutsumi O, Okagaki R, Takai Y, Fujimoto A, Suenaga A, Maruyama M, Momoeda M, Yano T and Taketani Y (1999) Hepatocyte growth factor concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis *Human Reproduction* 14 1611–1613
- 159) Fukaya T, Sugawara J, Yoshida H, Murakami T and Yajima A (1999) Intercellular adhesion molecule-1 and hepatocyte growth factor in human endometriosis: original investigation and a review of literature *Gynecological and Obstetrical Investigation* 47 Supplement 1 11–16
- 160) Chen G, Goeddel DV (2002). «TNF-R1 signaling: a beautiful pathway». *Science* 296 (5573): 1634–5.
- 161) Goeddel, DV. «Connection Map for Tumor Necrosis Factor Pathway». *Science STKE*
- 162) Wajant, H.. «Connection Map for Fas Signaling Pathway». *Science STKE*.
- 163) Otsuki Y, Misaki O, Sugimoto O, Ito Y, Tsujimoto Y and Akao Y (1994) Cyclic bcl-2 expression in human uterine endometrium during menstrual cycle. *Lancet* 344,28-29.
- 164) Otsuki Y (2001) Apoptosis in human endometrium: apoptotic detection methods and signaling. *Med Electron Microsc* 34,166-173.
- 165) Daikoku E, Ito Y and Otsuki Y (1998) The induction of apoptosis in ovaries and uteri of bcl-2 deficient mice. *Med Electron Microsc* 31,68-76.
- 166) Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G and Thompson CB (1993) bcl-x, a bcl-2 related gene that functions as dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74,597-608.
- 167) Oltvai ZN, Millman CL and Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes *in vitro* with a conserved homolog, Bax, the accelerated programmed cell death. *Cell* 74,609-619.

- 168) Tao X-J, Tilly KI, Maravei DV, Shifren JL, Krajewski S, Reed JC, Tilly JT and Isaacson KB (1997) 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* 82,2738-2746.
- 169) Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI and Guild BC (1995) Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374,731-733.
- 170) Rotello R, Lieberman RC, Lepoff RB and Gerschenson LE (1992) Characterization of uterine epithelium apoptotic cell death kinetics and regulation by progesterone and RU 486. *Am J Pathol* 140,449-456.
- 171) Critchley HOD, Tong S, Cameron ST, Drudy TA, Kelly RW and Baird DT (1999) Regulation of bcl-2 gene family members in human endometrium by antiprogestin administration *in vivo*. *J Reprod Fertil* 115,389-395.
- 172) Lincz L (1998) Deciphering the apoptotic pathway: all roads lead to death. *Immunol Cell Biol* 76,1-19.
- 173) Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A and Duke R (1995) A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Science* 377,630-632.
- 174) Garcia-Velasco J, Arici A, Zreick T, Naftolin F and Mor G (1999) Macrophage-derived growth factors regulate FasL expression in endometrial stromal cells: a role in endometriosis. *Mol Hum Reprod* 5,642-650.
- 175) Tanaka M, Suda T, Haze K, Nakamura N, Sato K, Kimura F, Motoyoshi K, Mizuki M, Tagawa S, Ohga S et al (1996) Fas ligand in human serum. *Nat Med* 2,317-322.
- 176) Salamonsen LA and Woolley DE (1996) Matrix metalloproteinase in normal menstruation. *Hum Reprod* 11(Suppl 2),124-133.
- 177) Enari M, Hase A and Nagata S (1995) Apoptosis by cytosolic extract from Fas-activated cells. *EMBO J* 14,5201-5208.
- 178) Gebel HM, Braun DP, Tambur A, Frame D, Rana N and Dmowski DP (1998) Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. *Fertil Steril* 9,1042-1047.
- 179) Dmowski WP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB and Braun DP (2001) Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis. *Hum Reprod* 16,1802-1808.
- 180) Watanabe H, Kanzaki H, Narukawa S, Inoue T, Katsuragawa H, Kaneko Y and Mori T (1997) Bcl-2 and Fas expression in eutopic and ectopic human endometrium during the menstrual cycle in relation to endometrial cell apoptosis. *Am J Obstet Gynecol* 176, 360-368.
- 181) Jones RK, Searle RF and Bulmer JN (1998) Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod* 13,3496-3502.
- 182) Fujishita A, Chavez RO, Nakane PK, Yamabe T, Koji T, Ishimau T and Masuzaki H (1997) Expression of estrogen and progesterone receptors in

endometrium and peritoneal endometriosis: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Fertil Steril* 67,856-864.

183) Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, Contreras-Ortiz O, Tesone M and Rumi LS (2000) Apoptosis and expression of Bcl-2, Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril* 74,760-766.

184) Harada M, Suganuma N, Furuchashi M, Nagasaka T, Nakashima N, Kikkawa F, Tomoda Y and Furui K (1996) Detection of apoptosis in human endometriotic tissues. *Mol Hum Reprod* 2,307-315.

185) Garcia-Velasco JA, Mulayim N, Kayisli UA and Arici A (2002) Elevated soluble Fas ligand levels may suggest a role for apoptosis in women with endometriosis. *Fertil Steril* 78, 855-859.

186) Powell WC, Fingleton B, Wilson CL, Boothby M and Matrisian L (1999) The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas-ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr Biol* 9,1441-1447.

187) Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, Nakao K and Nagata S (1995) Expression of the Fas ligand in T cell lineage. *J Immunol* 154,3806-3813.

188) McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Sharkey AM and Smith SA (1997). Immunocolonization of the apoptosis regulating proteins Bcl-2 and Bax in human endometrium and isolated peritoneal fluid macrophages in endometriosis. *Hum Reprod* 12,146-152.

189) Arimoto T, Katagiri T, Oda K, Tsunoda T, Yasugi T, Osuga Y, Yoshikawa H, Nishii O, Yano T, Taketani Y and Nakamura, Y (2003) Genome-wide cDNA microarray analysis of gene-expression profiles involved in ovarian endometriosis. *Int J Oncol* 22,551-560.

190) Palinski, W., M.E. Rosenfeld, S. Yla Hertualla *et al.* 1989. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 1372–1376.

191) Yla Hertualla, S., W. Palinski, M.E. Rosenfeld *et al.* 1989. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J. Clin. Invest.* 84: 1086–1095.

192) Steinbrecher, U.P., H.F. Zhang & M. Loughheed. 1990. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radical Biol. Med.* 9: 155–168.

193) Kontush A, Chapman MJ (March 2006). «Antiatherogenic small, dense HDL--guardian angel of the arterial wall?». *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3 (3): 144–53.

194) Hooper L, Summerbell CD, Thompson R, *et al.* (2012). Hooper, Lee. επιμ. «Reduced or modified dietary fat for preventing cardiovascular disease». *Cochrane Database Syst Rev* 5: CD002137.

195) Spector, R; Snapinn, SM (2011). "Statins for secondary prevention of cardiovascular disease: the right dose". *Pharmacology* 87 (1–2): 63–9.

196) Pignone, M (2005). "Primary prevention: dyslipidaemia". *Clin Evid* (14): 142–50.

197) Gami, A (2006). "Secondary prevention of ischaemic cardiac events". *Clin Evid* (15): 195–228.

- 198) Tang JL, Armitage JM, Lancaster T, Silagy CA, Fowler GH, Neil HA (1998). "Systematic review of dietary intervention trials to lower blood total cholesterol in free-living subjects". *BMJ* 316 (7139): 1213–20.
- 199) Umans JG, Levi R. Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure. *Annu Rev Physiol* 1995;57:771-790.
- 200) Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 1997;48:489-509.
- 201) Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction. *J Clin Invest* 1998;100:2153-157.
- 202) Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, et al. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1990;81:491-497.
- 203) Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000;101:1899-1906.
- 204) Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;104:2673-2678.
- 205) Huang PL, Huang ZH, Mashimo H, et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995;377:239-242.
- 206) Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest* 1998;101:731-736.
- 207) Channon KM, Qian HS, George SE. Nitric oxide synthase in atherosclerosis and vascular injury: insights from experimental gene therapy. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol* 2000;20:1873-1881.
- 208) White CR, Brock TA, Chang L-Y, et al. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:1044-1048.
- 209) Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986;320:454-456.
- 210) Harrison DG, Ohara Y. Physiologic consequences of increased vascular oxidant stresses in hypercholesterolemia and atherosclerosis: implications for impaired vasomotion. *Am J Cardiol* 1995;75:75B-81B.
- 211) Guzik TJ, West N, Pillai R, Taggart D, Channon KM. Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertension* 2002; 39: 1088-1094.
- 212) Wolin MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1430-1442.
- 213) Ballinger SW, Patterson C, Yan CN, et al. Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res* 2000;86:960-966.

- 214) Wu M, Pritchard KA, Jr., Kaminski PM, Fayngersh RP, Hintze TH, Wolin MS. Involvement of nitric oxide and nitrosothiols in relaxation of pulmonary arteries to peroxynitrite. *Am J Physiol* 1994;266:H2108-113.
- 215) Moro MA, Darley-Usmar VM, Goodwin DA, et al. Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:6702-6706.
- 216) Wang HD, Pagano PJ, Du Y, et al. Superoxide anion from the adventitia of the rat thoracic aorta inactivates nitric oxide. *Circ Res* 1998;82:810-818.
- 217) Miller FJ, Jr., Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res* 1998;82:1298-1305.
- 218) Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;87:840-844.
- 219) Cifuentes ME, Rey FE, Carretero OA, Pagano PJ. Upregulation of p67(phox) and gp91(phox) in aortas from angiotensin II-infused mice. *Am J Physiol* 2000;279:H2234-H2240.
- 220) Berry C, Hamilton CA, Brosnan MJ, et al. Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *Circulation* 2000;101:2206-2212.
- 221) Schmalzfuss CM, Chen LY, Bott JN, Staples ED, Mehta JL. Superoxide anion generation, superoxide dismutase activity, and nitric oxide release in human internal mammary artery and saphenous vein segments. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 1999;4:249-257.
- 222) Guzik TJ, West NEJ, Black E, et al. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res* 2000;86:E85-E90.
- 223) Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000;86:494-501.
- 224) Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, et al. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1429-1435.
- 225) Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: Role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002;105:1656-1662.
- 226) Touyz RM, Chen X, Tabet F, et al. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res* 2002;90:1205-1213.
- 227) Rueckschloss U, Galle J, Holtz J, Zerkowski HR, Morawietz H. Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells: antioxidative potential of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy. *Circulation* 2001;104:1767- 1772.

- 228) Lambeth JD, Cheng G, Arnold RS, Edens WA. Novel homologs of gp91phox. *Trends Biochem Sci* 2000;25:459-461.
- 229) Mollnau H, Wendt M, Szocs K, et al. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 2002;90:E58-65.
- 230) Huraux C, Makita T, Kurz S, et al. Superoxide production, risk factors, and endotheliumdependent relaxations in human internal mammary arteries. *Circulation* 1999;99:53-59.
- 231) Hamilton CA, Berg G, McIntyre M, McPhaden AR, Reid JL, Dominiczak AF. Effects of nitric oxide and superoxide on relaxation in human artery and vein. *Atherosclerosis* 1997;133:77-86.
- 232) Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1999;103:897-905.
- 233) Liao JK, Clark SL. Regulation of G-protein alpha i2 subunit expression by oxidized lowdensity lipoprotein. *J Clin Invest* 1995;95:1457-1463.
- 234) Peterson TE, Poppa V, Ueba H, Wu A, Yan C, Berk BC. Opposing effects of reactive oxygen species and cholesterol on endothelial nitric oxide synthase and endothelial cell caveolae. *Circ Res* 1999;85:29-37.
- 235) Inoue N, Kawashima S, Kanazawa K, Yamada S, Akita H, Yokoyama M. Polymorphism of the NADH/NADPH oxidase p22 phox gene in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1998;97:135-137.
- 236) Cahilly C, Ballantyne CM, Lim DS, Gotto A, Marian AJ. A variant of p22(phox), involved in generation of reactive oxygen species in the vessel wall, is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Circ Res* 2000;86:391-395.
- 237) Guzik TJ, West NEJ, Black E, et al. Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox subunit on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation* 2000;102:1744-1747.
- 238) Schachinger V, Britten MB, Dimmeler S, Zeiher AM. NADH/NADPH oxidase p22 phox gene polymorphism is associated with improved coronary endothelial vasodilator function. *Eur Heart J* 2001;22:96-101.
- 239) Zalba G, San Jose G, Beaumont FJ, Fortuno MA, Fortuno A, Diez J. Polymorphisms and promoter overactivity of the p22(phox) gene in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 2001;88:217-222.
- 240) Cosentino F, Katusic ZS. Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries. *Circulation* 1995;91:139-144.
- 241) Cosentino F, Patton S, d'Uscio LV, et al. Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J Clin Invest* 1998;101:1530-1537.

- 242) Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:6770-6774.
- 243) Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, Luscher TF. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation* 1997;96:25-28.
- 244) Pritchard KA, Jr., Groszek L, Smalley DM, et al. Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ Res* 1995;77:510- 518.
- 245) Cai S, Alp NJ, Mc Donald D, Canevari L, Heales S, Channon KM. GTP cyclohydrolase I gene transfer augments intracellular tetrahydrobiopterin in human endothelial cells: effects on nitric oxide synthase activity, protein levels and dimerization. *Cardiovasc Res* 2002;In press.
- 246) Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:217-30.
- 247) Schmidt K, Werner ER, Mayer B, Wachter H, Kukovetz WR. Tetrahydrobiopterin-dependent formation of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) in aortic endothelial cells. *Biochem J* 1992;281:297-300.
- 248) Tzeng E, Billiar TR, Robbins PD, Loftus M, Stuehr DJ. Expression of human inducible nitric oxide synthase in a tetrahydrobiopterin (H4B)-deficient cell line - H4B promotes assembly of enzyme subunits into an active enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:11771-11775.
- 249) Gross SS, Levi R. Tetrahydrobiopterin synthesis: an absolute requirement for cytokine-induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 1992;267:25722-25729.
- 250) Laursen JB, Somers M, Kurz S, et al. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between pYroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 2001;103:1282-1288.
- 251) Meininger CJ, Marinos RS, Hatakeyama K, et al. Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency. *Biochem J* 2000;349:353-356.
- 252) Shinozaki K, Nishio Y, Okamura T, et al. Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats. *Circ Res* 2000;87:566-573.
- 253) Hink U, Li H, Mollnau H, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 2001;88:E14-22.
- 254) Lang D, Kredan MB, Moat SJ, et al. Homocysteine-induced inhibition of endotheliumdependent relaxation in rabbit aorta: role for superoxide anions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:422-427.
- 255) Heitzer T, Brockhoff C, Mayer B, et al. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers : evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Circ Res* 2000;86:E36-E41.

- 256) Heitzer T, Krohn K, Albers S, Meinertz T. Tetrahydrobiopterin improves endotheliumdependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 2000;43:1435-1438.
- 257) Stroes E, Kastelein J, Cosentino F, et al. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 1997;99:41-46.
- 258) Schulz E, Tsilimingas N, Rinze R, et al. Functional and biochemical analysis of endothelial (dys)function and NO/cGMP signaling in human blood vessels with and without nitroglycerin pretreatment. *Circulation* 2002;105:1170-1175.
- 259) Gori T, Burstein JM, Ahmed S, et al. Folic acid prevents nitroglycerin-induced nitric oxide synthase dysfunction and nitrate tolerance: a human *in vivo* study. *Circulation* 2001;104:1119-1123.
- 260) Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Garrett LA, Creager MA. Inhibition of Protein Kinase C beta prevents impaired endothelium-dependent vasodilation caused by hyperglycemia in humans. *Circ Res* 2002;90:107-111.
- 261) Hoff, H.F., T.E. Whitaker & J. O'Neil. 1992. Oxidation of low density lipoprotein leads to particle aggregation and altered macrophage recognition. *J. Biol. Chem.* 267: 602–609.
- 262) Yla Hertualla, S., M.E. Rosenfeld, S. Parthasarathy *et al.* 1991. Gene expression in macrophage-rich human atherosclerotic lesions: 15-lipoxygenase and acetyl low density lipoprotein receptor messenger RNA colocalize with oxidation specific lipid-protein adducts. *J. Clin. Invest.* 87: 1146–1152.
- 263) Yla Hertualla, S., M.E. Rosenfeld, S. Parthasarathy *et al.* 1990. Colocalization of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of oxidized low density lipoprotein in macrophage-rich areas of atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 6959–6963.
- 264) Derian, C.K. & D.F. Lewis. 1992. Activation of 15-lipoxygenase by low density lipoprotein in vascular endothelial cells: relationship to the oxidative modification of low density lipoprotein. *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* 45: 49–57.
- 265) Sigal, E., D.L. Sloane & D.J. Conrad. 1993. Human 15-lipoxygenase: induction by interleukin-4 and insights into positional specificity. *J. Lipid Mediators* 6: 75–88.
- 266) Conrad, D.J., H. Kuhn, M. Mulkins *et al.* 1992. Specific inflammatory cytokines regulate the expression of human monocyte 15-lipoxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 217–221.
- 267) Nassar, G.M., J.D. Morrow, L.J. Roberts *et al.* 1994. Induction of 15-lipoxygenase by interleukin-13 in human blood monocytes. *J. Biol. Chem.* 269: 27631–27634.
- 268) Rankin, S.M., S. Parthasharathy & D. Steinberg. 1991. Evidence for a dominant role of lipoxygenase(s) in the oxidation of LDL by mouse peritoneal macrophages. *J. Lipid Res.* 32: 449–456.

- 269) Libby, P. & Z.S. Galis. 1995. Cytokines regulate genes involved in atherogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 748: 158–168; 168–170 (discussion).
- 270) Nalini Santanam, Ana A. Murphy, and Sampath Parthasarathy: Macrophages, oxidation, and endometriosis. Department of Gynecology and Obstetrics, Emory University, Atlanta, Georgia, Usa. *Annals New York Academy of Sciences*
- 271) D Colomba, G Duro, S Corrao, C Argano, T Chiara, D Nuzzo, F Pizzo, G Parrinello, R Scaglione, G Licata, Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular damage in hypertensive subjects: an Italian case-control study, *Immun Ageing* 5 (2008), 4.
- 272) G Ghilardi, ML Biondi, M DeMonti, M Bernini, O Turri, F Massaro, E Guagnellini, R Scorza, Independent risk factor for moderate to severe internal carotid artery stenosis: T786C mutation of the endothelial nitric oxide synthase gene, *Clin Chem* 48 (2002), 989-93.
- 273) C Antoniadis, D Tousoulis, C Vasiliadou, C Pitsavos, C Chrysoschoou, D Panagiotakos, C Tentolouris, K Marinou, N Koumallos, C Stefanadis, Genetic polymorphism on endothelial nitric oxide synthase affects endothelial activation and inflammatory response during the acute phase of myocardial infarction, *J Am Coll Cardiol* 46 (2005), 1101-9.
- 274) A Gluba, M Banach, J Rysz, G Piotrowski, W Fendler, T Pietrucha, Is polymorphism within eNOS gene associated with the late onset of myocardial infarction? A pilot study, *Angiology* 60 (2009), 588-95.
- 275) I Isordia-Salas, A Leños-Miranda, G Borrayo-Sánchez, The Glu298ASP polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with premature ST elevation myocardial infarction in Mexican population, *Clin Chim Acta* 411 (2010), 553-7.
- 276) B Granath, RR Taylor, FM van Bockxmeer, CD Mamotte. Lack of evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and coronary artery disease in the Australian Caucasian population, *J Cardiovasc Risk* 8 (2001), 235-41.
- 277) M Nakayama, H Yasue, M Yoshimura, Y Shimasaki, H Ogawa, K Kugiyama, Y Mizuno, E Harada, S Nakamura, T Ito, Y Saito, Y Miyamoto, Y Ogawa, K Nakao, T-786→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis, *Am J Cardiol* 86 (2000), 628-634.
- 278) MS Spence, PG McGlinchey, CC Patterson, AR Allen, G Murphy, U Bayraktutan, DG Fogarty, AE Evans, PP McKeown. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and ischemic heart disease, *Am Heart J* 148 (2004), 847-51.
- 279) Babior BM (2004) NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 16: 42–47
- 280) Dinanuer MC, Pierce EA, Bruns GA, Curnutte JT, Orkin SH (1990). Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure,

- chromosomal location, and mutations in cytochrome- negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Investig* 86:1729–1737.
- 281) Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Eng J Med* 1999; 340:115–126.
- 282) Salonen JT, Salonen R. Ultrasonographically assessed carotid morphology and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb* 1991; 11:1245–1249.
- 283) O’Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK Jr; for the Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. *N Engl J Med* 1999;340:14–22.
- 284) Simons PC, Algra A, Bots ML, Grobbee DE, van der Graaf Y. Common carotid intima-media thickness and arterial stiffness: indicators of cardiovascular risk in high-risk patients: the SMART Study (Second Manifestations of ARterial disease). *Circulation* 1999;100:951–957.
- 285) Li XP, Zhao SP, Zhang XY, Liu L, Gao M, Zhou QC. Protective effect of high density lipoprotein on endothelium-dependent vasodilatation. *Int J Cardiol* 2000;73:231–236.
- 286) Lee SJ, Lee DW, Kim KS, Lee IK. Effect of estrogen on endothelial dysfunction in postmenopausal women with diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2001;54:S81–S92.
- 287) Felmeden DC, Spencer CG, Blann AD, Beevers DG, Lip GY. Low density lipoprotein subfractions and cardiovascular risk in hypertension: relationship to endothelial dysfunction and effects of treatment. *Hypertension* 2003;41:528–533.
- 288) Quyyumi AA. Prognostic value of endothelial function. *Am J Cardiol* 2003; 91:19H–24H.
- 289) Chan SY, Mancini GB, Kuramoto L, Schulzer M, Frohlich J, Ignaszewski A. The prognostic importance of endothelial dysfunction and carotid atheroma burden in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1037–1043.
- 290) Grewal J, Chan S, Frohlich J, Mancini GB. Assessment of a novel risk factors in patients at low risk for cardiovascular events based on Framingham risk stratification. *Clin Invest Med* 2003;36:158–165.
- 291) Darai E, Detchev R, Hugol D, Quang NT. Serum and cyst fluid levels of interleukin (IL)-6, IL-8 and tumour necrosis factor-alpha in women with endometriosis and benign and malignant cystic ovarian tumours. *Hum Reprod* 2003;18:1681–1685.
- 292) Kondera-Anasz Z, Sikora J, Mielczarek-Palacz A, Jonca M. Concentrations of interleukin (IL)-1 alpha, IL-1 soluble receptor type II (IL-1 sRII) and IL-1 receptor antagonist (IL-1 Ra) in the peritoneal fluid and serum of infertile women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;123:198–203.

- 293) Pannekoek H, Voorberg J. Molecular cloning, expression and assembly of multimeric von Willebrand factor. *Baillieres Clin Haematol* 1989; 2:879–898.
- 294) Gearing AJ, Hemingway I, Pigott R, Hughes J, Rees AJ, Cashman SJ. Soluble forms of vascular adhesion molecules, E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1: pathological significance. *Ann N Y Acad Sci* 1992;667:324–331.
- 295) Blann AD. Is raised von Willebrand factor as a marker of endothelial cell damage? *Med Hypotheses* 1993;41:419–424.
- 296) Newman W, Beall LD, Carson CW, Hunder GG, Graben N, Randhawa ZI, Gopal TV, Wiener-Kronish J, Matthay MA. Soluble E-selectin is found in supernatants of activated endothelial cells and is elevated in serum of patients with septic shock. *J Immunol* 1993; 150:644–654.
- 297) Pearson JD. Markers of endothelial perturbation and damage. *Br J Rheumatol* 1993;32:651–652.
- 298) Van Haelst PL, Van Doormaal JJ, Asselbergs FW, van Roon AM, Veeger NJ, Henneman MM, Smit AJ, Tervaert JW, May JF, Gans RO. Correlates of endothelial function and their relationship with inflammation in patients with familial hypercholesterolaemia. *Clin Sci* 2003;104:627–632.
- 299) Makino H, Doi K, Hiuge A, Nagumo A, Okada S, Miyamoto Y, Suzuki M, Yoshimasa Y. Impaired flow-mediated vasodilatation and insulin resistance in type 2 diabetic patients with albuminuria. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;79:177–182.
- 300) Williams MR, Westerman RA, Kingwell BA, Paige J, Blombery PA, Sudhir K, Komesaroff PA. Variations in endothelial function and arterial compliance during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5389–5395.
- 301) Leveille C, Bouillon M, Guo W, et al. CD40 ligand binds to alpha5beta1 integrin and triggers cell signaling. *J Biol Chem* 2007;282: 5143-51
- 302) Danese S, Sans M, Fiocchi C. The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease. *Gut* 2004;53: 1035-43
- 303) Casamayor-Palleja M, Khan M, MacLennan IC. A subset of CD4+ memory T-cells contains preformed CD40 Ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T-cell receptor complex. *J Exp Med* 1995; 181:1293-301
- 304) Lum HD, Buhtoiarov IN, Schmidt BE, et al. *In vivo* Cd40 ligands can induce T-cell- independent antitumor effects that involve macrophages. *J Leukoc Biol* 2006; 79: 1181-92
- 305) Schonbeck U, Libby P. The Cd40/Cd154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 2001, 58:4-43
- 306) Jinnin M, Ihn H, Yazawa N, et al. Elevated circulating soluble CD40 ligand in patients with mixed connective tissue disease. *Clin Rheumatol* 2003, 22: 37-39
- 307) C Ciftçi, S Melil, Y Cebi, M Ersöz, P Cağatay, M Kiliçgedik, BS Duman, Association of endothelial nitric oxide synthase promoter region (T-786C)

gene polymorphism with acute coronary syndrome and coronary heart disease, *Lipids Health Dis* 7 (2008), 5.

308) MG Colombo, U Paradossi, MG Andreassi, N Botto, S Manfredi, S Masetti, A Biagini, A Clerico, Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease, *Clin Chem* 49 (2003), 389-95.

309) RG Dias, MM Gowdak, AC Pereira, Genetics and cardiovascular system: influence of human genetic variants on vascular function, *Genes Nutr* 6 (2011), 55-62. .