



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Α΄ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΛΟΥΤΡΑΔΗΣ

ΜΟΝΑΔΑ ΥΠΟΒΟΘΗΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

Διπλωματική εργασία

**«Ο πολυμορφισμός *GSTM1* στην ενδομητρίωση, στον ελληνικό
γυναικείο πληθυσμό»**

Λιόκαρη Μαρία-Εμμανουέλα

Αθήνα, 2018

Επιβλέπουσα

Μαυρογιάννη Δέσποινα, Ε.ΔΙ.Π.

Τριμελής επιτροπή

Λουτράδης Δημήτρης, Τακτικός Καθηγητής Μαιευτικής - Γυναικολογίας
του Πανεπιστημίου Αθηνών και διευθυντής της Α΄ Μαιευτικής και
Γυναικολογικής Κλινικής στο ΓΝΑ «Αλεξάνδρα»

Δρακάκης Πέτρος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής -Γυναικολογίας
του Πανεπιστημίου Αθηνών

Ντόμαλη Κατερίνα, Επίκουρη Καθηγήτρια Μαιευτικής - Γυναικολογίας
του Πανεπιστημίου Αθηνών

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ	5
1.2	ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ.....	7
1.2.1	ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΗΣ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗΣ	10
1.2.2	ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ	21
1.2.3	ΔΙΑΓΝΩΣΗ	22
1.2.4	ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ	23
1.2.5	ΑΚΤΙΝΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ	24
1.2.6	ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗ	25
1.2.7	ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ	25
1.2.8	ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ.....	26
1.2.9	ΘΕΡΑΠΕΙΑ	27
1.2.10	ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ.....	29
1.3	S-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΕΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (Glutathione S-transferases-GSTs).....	30
1.3.1	ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ	33
1.3.2	ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ	34
1.3.3	ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΓΙΑ ΤΑ GSTs.....	35
1.3.4	<i>GSTM1</i> ΚΑΙ ΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΟΥ.....	37
1.3.5	ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥ <i>GSTM1</i> ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ..	39
1.3.6	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟ <i>GSTM1</i>	41
2	ΣΚΟΠΟΣ	43
3	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	44
3.1	ΥΛΙΚΑ	44
3.1.1	ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΡΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΗΜΑΤΑ	44
3.1.2	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	45
3.2	ΜΕΘΟΔΟΙ	46
3.2.1	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA.....	46
3.2.2	ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction)	49
3.2.3	ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	52
3.2.4	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ	52
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	54

4.1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	54
4.2	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	55
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	67
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	70

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Ο συνδυασμός του απλοειδούς γονιδιώματος από τον θηλυκό και τον αρσενικό γαμέτη είναι το πιο σημαντικό γεγονός για την ανθρώπινη αναπαραγωγή. Οι γαμέτες υποβάλλονται σε ορισμένους μηχανισμούς και διαδικασίες, ώστε να προετοιμαστούν για την ωρίμανση, τη γονιμοποίηση και την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Καθένας φέρει το ήμισυ του γενετικού υλικού για ένα πλήρες έμβρυο και παρέχουν συστατικά, που χρειάζονται για να διατηρηθούν τα αναπτυσσόμενα κύτταρα. Μόλις οι γαμέτες διαφοροποιηθούν σε ένα ώριμο εξειδικευμένο κύτταρο, υποβάλλονται σε μια σειρά από διαδικασίες πριν αποκτήσουν τη δυνατότητα να ενωθούν μεταξύ τους. Μετά τη γονιμοποίηση, το ζυγωτό πολλαπλασιάζεται και στη συνέχεια εμφυτεύεται στο ενδομήτριο της γυναίκας, όπου αυτό θα εξελιχθεί σε έμβρυο.

Ο ρόλος του σπέρματος είναι να φέρει το απλοειδές γονιδίωμα στο ωοκύτταρο, να περάσει τη διάφανη ζώνη (zona pellucida) και να ενωθεί με το ωοκύτταρο. Το σπέρμα πρέπει να αντιμετωπίσει το “αυστηρό” περιβάλλον της γυναικείας αναπαραγωγικής οδού, το οποίο δρα επιλεκτικά προς τα εκατομμύρια των σπερματοζωαρίων, ανάλογα με τη μορφολογία και τη λειτουργική τους ακεραιότητα. Το θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα βοηθά, ελέγχει και ρυθμίζει την κίνηση και τον αριθμό των σπερματοζωαρίων, που εισέρχονται στον ωαγωγό, όπου είναι και η περιοχή της γονιμοποίησης.

Μερικές από τις πιο σημαντικές δομές του ωοκυττάρου, όσον αφορά τη γονιμοποίηση, είναι η διάφανη ζώνη (zona pellucida, ZP) και τα πολικά σωμάτια. Το ωοκύτταρο, όμως, είναι υπεύθυνο για μερικές ακόμη λειτουργίες, όπως η θρέψη του εμβρύου, η παροχή δομικού προσανατολισμού και η προστασία του εμβρύου. Η ZP είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση του σπέρματος από το ωάριο, επάγει την ακροσωμική αντίδραση του σπερματοζωαρίου, προλαμβάνει την πολυσπερμία και περιβάλλει το έμβρυο μέχρι την εμφύτευση. Τα πολικά σωμάτια, από την άλλη, είναι υπεύθυνα για την ασύγχρονη διαίρεση κατά τη διάρκεια της πρώτης μειωτικής διαίρεσης.

Η προετοιμασία των σπερματοζωαρίων είναι το πρώτο βήμα για την έναρξη της γονιμοποίησης, η οποία πραγματοποιείται κατά τη μετακίνησή τους προς το ωοκύτταρο με μια διαδικασία ενεργοποίησης ή αλλιώς capacitation. Μέσω της αντίδρασης του ακροσώματος επιτυγχάνεται η αναγνώριση, η προσκόλληση και η σύντηξη με το ωοκύτταρο, αφού έχουν προηγηθεί μορφολογικές μεταβολές τόσο στο ακρόσωμα όσο και στην εξωκυττάρια στιβάδα του ωαρίου. Το επόμενο βήμα στη γονιμοποίηση είναι η ενσωμάτωση του σπερματοζωαρίου στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου. Έτσι το τελευταίο ενεργοποιείται και αρχίζει ο σχηματισμός των προπυρήνων. Το τελικό στάδιο της γονιμοποίησης είναι η έναρξη της πρώτης διαίρεσης, που οδηγεί στην πρώιμη ανάπτυξη του εμβρύου. (Ashok Agarwal, Andrew Luu, 2014)

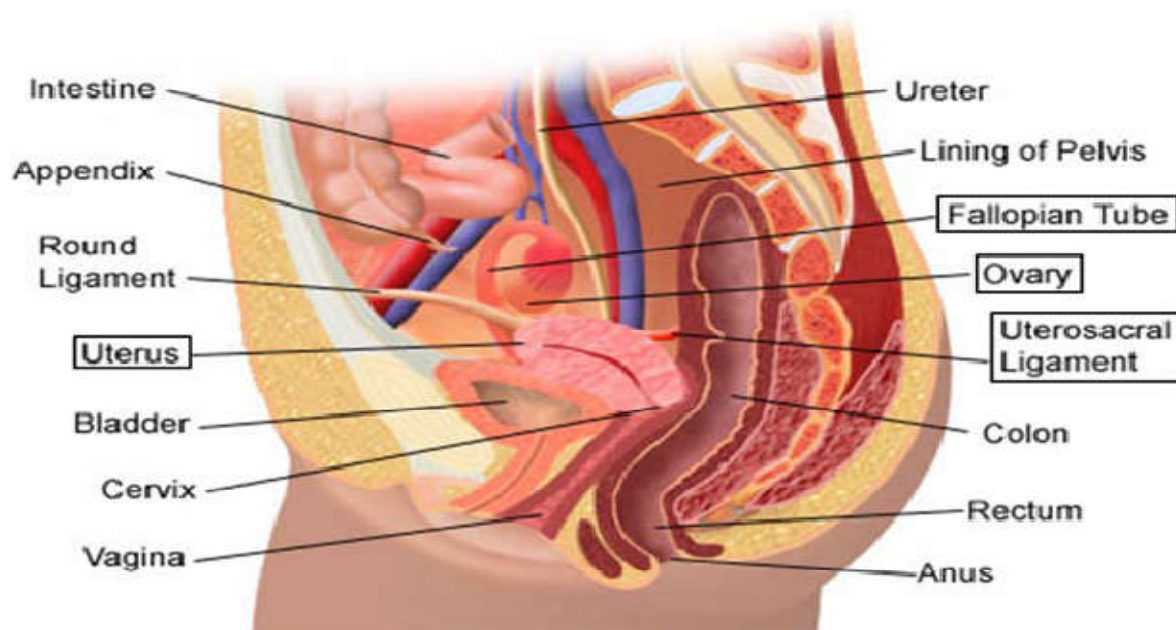
Η γονιμότητα ορίζεται ως η ικανότητα σύλληψης και δημιουργίας απογόνων. Η υπογονιμότητα αναφέρεται στην μειωμένη ικανότητα των δύο παραπάνω και σε αντίθεση με την στειρότητα, δεν είναι μια μη αναστρέψιμη κατάσταση. Ο τρέχων κλινικός ορισμός της υπογονιμότητας είναι η αδυναμία σύλληψης μετά από 12 μήνες προσπάθειών με ελεύθερες επαφές. Ο επιπολασμός της υπογονιμότητας στις γυναίκες ηλικίας 20 έως 44 ετών ήταν 8,5% το 1982 και 7,4% το 2002. Πιο πρόσφατες δημογραφικές μελέτες από το 2009 και το 2012 ανέφεραν υψηλότερο επιπολασμό της υπογονιμότητας και εκτιμάται ότι κυμαίνεται από 12% έως 24% (Bushnik T et al., 2012, Slama R et al., 2012, Bhattacharya S et al., 2009). Οι συχνότερες διαταραχές, που μπορεί να οδηγήσουν στη γυναικεία υπογονιμότητα είναι ορμονικές διαταραχές, έλλειψη ωορρηξίας, κατεστραμμένες ή βουλωμένες σάλπιγγες, ανεπαρκής τραχηλική βλέννη, αντισπερματικά αντισώματα, αποτυχία του εμβρύου να συγκολληθεί στη μήτρα, ινομώματα, πρόωρη εμμηνόπαυση, σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, συμφύσεις από προηγούμενες εγχειρήσεις, φλεγμονές των αναπαραγωγικών οργάνων, όπως πυελική φλεγμονή (PID) και η ενδομητρίωση. Η ενδομητρίωση, με την οποία θα ασχοληθούμε στην παρούσα εργασία, εκτιμάται ότι ευθύνεται για το 6% περίπου του συνόλου των άτεκνων ζευγαριών, αν και ο ακριβής μηχανισμός δράσης της παραμένει ασαφής. Η ανδρική υπογονιμότητα επηρεάζει το 15% των ανδρών στην αναπαραγωγική ηλικία παγκοσμίως και σε πολλές περιπτώσεις είναι θεραπεύσιμη (Martinez G et al.,

2012). Διαταραχές που μπορεί να προκαλέσουν ανδρική υπογονιμότητα είναι ο χαμηλός αριθμός σπερματοζωαρίων κατά την ανάλυση σπέρματος (λιγότερο από 20 εκατομμύρια σπερματοζωάρια ανά ml σπέρματος), χαμηλός όγκος σπέρματος (προκαλείται από μηχανική απόφραξη ή από την απουσία των απαγωγών αγγείων του σπέρματος), χαμηλή κινητικότητα σπέρματος (ανικανότητα του σπέρματος να προχωρήσει ικανοποιητικά ώστε να συναντήσει το ωάριο για γονιμοποίηση), ανώμαλη μορφολογία σπερματοζωαρίων με αποτέλεσμα την ανικανότητα γονιμοποίησης του ωαρίου, χαμηλός αριθμός φυσιολογικού σπέρματος, ανυπαρξία σπέρματος και ανικανότητα ή αποτυχία εκσπερμάτωσης. Πολύ συχνά συνυπάρχει ένα μικρό πρόβλημα υπογονιμότητας στη γυναίκα με ένα μικρό πρόβλημα στον άντρα. Αυτά από μόνα τους δεν αποτελούν σοβαρή αιτία υπογονιμότητας, ο συνδυασμός τους, όμως, επιφέρει την αδυναμία επίτευξης εγκυμοσύνης.

1.2 ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ

Η ενδομητρίωση είναι μια πάθηση η οποία επηρεάζει περίπου 176.000.000 γυναίκες και τις οικογένειές τους παγκοσμίως (Rogers *et al.*, 2009, Adamson *et al.*, 2010). Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι η συνολική εμφάνιση της ενδομητρίωσης μεταξύ ασυμπτωματικών γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας είναι 6 έως 11% (Buck Louis GM *et al.*, 2011). Πρόκειται για μια χρόνια και οιστρογονοεξαρτώμενη διαταραχή, με κύριο χαρακτηριστικό την παρουσία λειτουργικού ενδομητρικού ιστού (ενδομητρικούς αδένες και στρώμα) σε θέσεις εκτός της ενδομητρικής κοιλότητας (Giudice and Kao 2004, Bulun 2009). Το έκτοπο ενδομήτριο, ανεξάρτητα με το πού βρίσκεται, τυπικά μοιάζει με το φυσιολογικό ενδομήτριο ως προς τον πολλαπλασιασμό και την εξάπλωση. Για αυτό το λόγο και οι δύο τύποι ιστών θεωρείται ότι παρουσιάζουν παρόμοιες ορμονικές αντιδράσεις. Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει ότι κάτι τέτοιο δεν ισχύει και εμπλέκονται κι άλλοι παράγοντες στην ανάπτυξη και ρύθμιση των έκτοπων εστιών (Metzger 1993). Η ενδομητρίωση διακρίνεται σε περιτοναϊκή, ωοθηκική και εν τω βάθει διηθητική ενδομητρίωση. Οι ενδομητρικές εστίες μπορεί να εντοπιστούν στις ωοθήκες, στις σάλπιγγες, στο

περιτόναιο της πυέλου, καθώς επίσης και στους ιερομητρικούς συνδέσμους, στο έντερο και την ουροδόχο κύστη (Garai et al. 2006).



Εικόνα 1. Πιθανές θέσεις ενδομητρίωσης. Η ενδομητρίωση παρουσιάζεται συχνότερα στις ωοθήκες αλλά και σε άλλες περιοχές όπως στις σάλπιγγες, στο τοίχωμα της μήτρας, στους συνδέσμους της μήτρας, στο περιτόναιο και στην κυστεομητρική και ορθομητρική πτυχή. Λιγότερο συχνές εντοπίσεις είναι στην ουροδόχο κύστη, στο έντερο, στο ορθό, στον τράχηλο, στον κόλπο και στο αιδοίο.

Η ενδομητρίωση έχει βρεθεί σε γυναίκες με μεγάλο εύρος ηλικιών, από 12 ετών έως και 80, με μέση ηλικία διάγνωσης μεταξύ 25 και 30 ετών. Έχει φανεί ότι η έκθεση σε ωοθηκικές ορμόνες παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και την ανάπτυξη εστιών, γι' αυτό η πλειονότητα των περιπτώσεων εντοπίστηκε σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας. Πιο συγκεκριμένα, η ετήσια επίπτωση σε χειρουργικά διαγνωσμένη ενδομητρίωση κυμαίνεται στις 1,6 περιπτώσεις σε 1000 γυναίκες ηλικίας μεταξύ 15 και 49 ετών (Houston *et al.*, 1987). Σε σοβαρές περιπτώσεις εκδήλωσης της νόσου, φαίνεται να υπάρχει ένας οικογενειακός συσχετισμός. Ωστόσο, δεν έχει εντοπιστεί σαφής γενετική Μενδελική κληρονομικότητα και οι περισσότεροι ερευνητές πιστεύουν ότι είναι πολύπλοκη και πολυπαραγοντική (Malinak LR *et al.*, 1980).

Η εκτίμηση της πραγματικής επίπτωσης της ενδομητρίωσης σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας είναι δύσκολο να εκτιμηθεί διότι συχνά δεν εμφανίζουν συμπτώματα. Σε ασθενείς με χρόνια πυελικό άλγος, η ενδομητρίωση εντοπίζεται σε

ποσοστό 38% ενώ φθάνει σχεδόν 70% σε περιπτώσεις με έντονα συμπτώματα (Laufer MR et al., 1997, Vercellini P et al., 1989). Σε υπογόνιμες γυναίκες, ο επιπολασμός κυμαίνεται από 21% έως 47%. Αυτή η υψηλή συχνότητα μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η ενδομητρίωση παίζει αιτιολογικό ρόλο στην υπογονιμότητα. Ο σωματότυπος κατά την παιδική ηλικία και την πρώιμη εφηβεία επηρεάζει την εμφάνιση ενδομητρίωσης, έτσι που ένας χαμηλότερος δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ) σχετίζεται με χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισής της (Vitonis AF et al., 2010). Αυτό μπορεί να σχετίζεται και με το γεγονός ότι κατά την εφηβεία, ένας χαμηλότερος ΔΜΣ συνδέεται με μεταγενέστερη ηλικία εμμηναρχής και χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης της νόσου (OR, 0.3; 95% CI, 0.1-0.6) (Treloar SA et al., 2010).

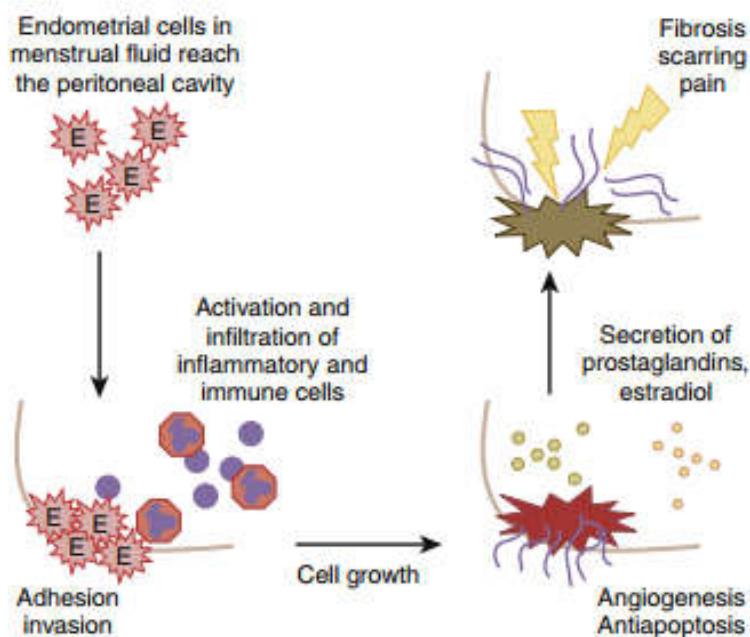
Τα κύρια συμπτώματα της ενδομητρίωσης είναι ο πόνος κατά την περίοδο (δυσμηνόρροια), χρόνιος πυελικός πόνος και πόνος κατά τη σεξουαλική επαφή (δυσπαρεύνια) (Farquhar 2007, Bulun, 2009). Υπάρχουν περιπτώσεις γυναικών (2-50%) που δεν εμφανίζουν συμπτώματα (Farquhar 2007). Άλλες γυναίκες με σοβαρή ενδομητρίωση δεν έχουν καθόλου πόνο ή εκλαμβάνουν τα συμπτώματά τους ως συνήθη πόνο της περιόδου. Η δραστηριότητα και τα συμπτώματα της ενδομητρίωσης ποικίλλουν κατά τη διάρκεια του κύκλου, ακολουθώντας τις αυξομειώσεις των ορμονών. Μερικές γυναίκες παραπονιούνται για έντονο πόνο ακριβώς πριν (24 με 48 ώρες) ή κατά τη διάρκεια της περιόδου (<http://www.endometriosis-gr.eu/>). Επειδή τα συμπτώματα της ενδομητρίωσης είναι κοινά με άλλες παθήσεις, η διάγνωση της ενδομητρίωσης δεν μπορεί να βασιστεί στην παρουσία των συμπτωμάτων και μόνο. Η διάγνωση της ενδομητρίωσης γίνεται κατά βάση με διαγνωστική λαπαροσκόπηση. Το διακολπικό υπερηχογράφημα μπορεί να διαγνώσει τα ωοθηκικά ενδομητρίωματα αλλά υπολείπεται στην διάγνωση της εν τω βάθει και της περιτοναϊκής ενδομητρίωσης. Στις περιπτώσεις διηθητικής ενδομητρίωσης η μαγνητική τομογραφία και το διορθικό υπερηχογράφημα μπορεί να συμβάλουν στην διάγνωση. Ο καρκινικός δείκτης CA-125 δεν μπορεί να διαγνώσει την ενδομητρίωση (Giudice and Kao 2004, Engemise et al. 2010, <http://www.endometriosis-gr.eu/>). Έχει αναπτυχθεί ένα σύστημα λαπαροσκοπικής ταξινόμησης ανάλογα με τη σοβαρότητα της ασθένειας

σύμφωνα με την American Fertility Society (1987) το οποίο αναθεωρήθηκε από την American Society of Reproductive Medicine (ASRM) το 1996. Αποτελεί το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο σύστημα ταξινόμησης και ανάλογα με την βαθμολογία η ενδομητρίωση διακρίνεται σε ελάχιστη, ελαφρά, μέτρια ή σοβαρή. Αν η νόσος βρίσκεται σε προχωρημένα στάδια είναι πιθανό να δημιουργηθούν πυελικές συμφύσεις ή αλλαγές στην ανατομία της πυέλου και κατ'επέκταση να οδηγηθούμε σε υπογονιμότητα (Giudice and Kao 2004). Στην περίπτωση σοβαρής ενδομητρίωσης προτείνεται χειρουργική αφαίρεση των ενδομητρικών εστιών, αν και η πιθανότητα τα συμπτώματα να εμφανιστούν ξανά είναι πάνω από 75% μέσα σε δύο χρόνια, επομένως συχνά επαναλαμβάνεται το χειρουργείο. Στις φαρμακευτικές θεραπείες περιλαμβάνονται τα στεροειδή αντισυλληπτικά, προγεστερόνη και προγεσταγόνα, ανάλογα GnRH και αναστολείς αρωματάσης. Στόχος των παραπάνω είναι να περιοριστούν τα επίπεδα των οιστρογόνων και καταστέλλοντας τον κύκλο να σταματήσει η εμμηνορρυσία και να συρρικνωθούν οι ενδομητρικές εστίες (<http://www.endometriosis-gr.eu/>).

1.2.1 ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΗΣ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗΣ

Σήμερα υπάρχουν τρεις κύριες θεωρίες για την αιτιολογία της ενδομητρίωσης. Και οι τρεις έχουν υποστηριχτεί από πολλούς (Vinatier 2001), παρόλα αυτά, η επικρατέστερη θεωρία είναι της παλίνδρομης έμμηνης ροής, που προτάθηκε από τον Dr. John Sampson, που περιέγραψε πρώτος το 1920 την ενδομητρίωση (Sampson 1927). Ο Sampson πρότεινε την υπόθεση ότι οι ενδομητριοειδείς εστίες προήλθαν από νησίδες αποπίπτοντος ενδομητρίου, που παλινδρομούν μέσω των σαλπίγγων κατά τη διάρκεια της εμμηνορροίας προς την περιτοναϊκή κοιλότητα, οι οποίες στη συνέχεια, εμφυτεύθηκαν σε περιτοναϊκές επιφάνειες και αναγεννήθηκε μια επιθηλιακή επένδυση του ενδομητρίου (Sampson JA, 1927). Η θεωρία αυτή, όμως, αδυνατεί να εξηγήσει γιατί μόνο μερικές γυναίκες από το 90% που εμφανίζουν παλίνδρομη έμμηνη ροή θα αναπτύξουν ενδομητρίωση. Επίσης δεν μπορεί να εξηγήσει την εμφάνιση ενδομητρίωσης σε γυναίκες που έχουν αφαιρέσει τη μήτρα τους ή έχουν κλειστές σάλπιγγες (<http://www.endometriosis-gr.eu/>). Αυτή

η θεωρία αποτελεί τη βάση για πολλές πρόσφατες έρευνες, που προσπαθούν να βρουν πιθανούς ανοσολογικούς, αγγειογενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, που επιτρέπουν την ανάπτυξη έκτοπου ενδομητρικού ιστού. Οι άλλες ευρέως γνωστές θεωρίες είναι του Meyer της μετάπλασης του επιθηλίου του εμβρυϊκού κοιλώματος και του Halban της λεμφογενούς και αιματογενούς διασποράς, που αναπτύχθηκαν περίπου την ίδια περίοδο. Η θεωρία της μετάπλασης του επιθηλίου του εμβρυϊκού κοιλώματος στηρίζεται στην πιθανή μορφολογική αλλαγή των κυττάρων της ωοθήκης. Επειδή τα κύτταρα που συνθέτουν τόσο την ωοθήκη όσο και την μήτρα προέρχονται από τα ίδια πρόδρομα κύτταρα, υπάρχει η πιθανότητα μετάπλασης. Σύμφωνα με την θεωρία του Halban, ενδομητρικός ιστός περνά μέσα από τα λεμφαγγεία και το αγγειακό σύστημα, δημιουργώντας απομακρυσμένες εστίες (Hoffman 2011). Σήμερα, πλέον υποστηρίζεται ότι ο κίνδυνος εμφάνισης ενδομητρίωσης είναι αποτέλεσμα γενετικών, ανατομικών, ενδοκρινολογικών, ανοσολογικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Ως εκ τούτου, για μια ολοκληρωμένη άποψη σχετικά με το σύνδρομο, απαιτείται μια ευρύτερη αντίληψη της αιτιολογίας και των μηχανισμών με τους οποίους η ενδομητρίωση παράγει τα κλινικά συμπτώματα.



Εικόνα 2. Προτεινόμενος τρόπος δημιουργίας περιτοναϊκών εμφυτευμάτων ενδομητρίου μέσω παλίνδρομης έμμηνης ροής, προσκόλλησης, πολλαπλασιασμού, μετανάστευσης, νεοαγγείωσης, φλεγμονής και ίνωσης. (Flores I. et al., 2007.)

E: κύτταρα ενδομητρίου

➤ Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Ο τρόπος ζωής μπορεί να παίζει καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση της ενδομητρίωσης. Η κατανάλωση αλκοόλ και καφεΐνης έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο πρόκλησης ενδομητρίωσης, ενώ το κάπνισμα και η τακτική άσκηση φαίνεται να έχουν αντίθετα αποτελέσματα (McLeod and Retzliff 2010). Αν και οι επιστημονικές αποδείξεις δεν είναι και τόσο ισχυρές, τοξικοί παράγοντες, όπως οι διοξίνες, διαταράσσουν την ορμονική και ανοσολογική λειτουργία του σώματος, επιτρέποντας στην ενδομητρίωση να αναπτυχθεί (<http://www.endometriosis-gr.eu/>).

➤ Γενετικοί παράγοντες

Η ενδομητρίωση φαίνεται να κληρονομείται με έναν πολυγονιδιακό και πολυπαραγοντικό τρόπο, επομένως ο φαινότυπος καθορίζεται από έναν συνδυασμό πολλών γονιδίων και περιβαλλοντικών επιδράσεων. Παρόλο που δεν έχει επιβεβαιωθεί η απλή Μενδελική κληρονομικότητα, συγγενείς πρώτου βαθμού έχουν έξι φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να διαγνωστούν με ενδομητρίωση (Simpson *et al.*, 1980, Vichi *et al.*, 2012). Πρώτου βαθμού γυναίκες συγγενείς (μητέρες και αδελφές) γυναικών με σοβαρή ενδομητρίωση, έχουν 7% πιθανότητα να εμφανίσουν την νόσο σε αντίθεση με πρώτου βαθμού γυναίκες συγγενείς των συζύγων τους, με πιθανότητα λιγότερο του 1% (Simpson J *et al.*, 1980). Σύμφωνα με το παραπάνω είναι το γεγονός ότι, η ενδομητρίωση, που παρουσιάζεται σε οικογένειες, τείνει να είναι πιο σοβαρή και έχουν μια πρώιμη εμφάνιση συμπτωμάτων, σε σχέση με μεμονωμένες περιπτώσεις (Hansen και Eyster 2010).

Πρόσφατα, πολλές γενετικές μελέτες έδειξαν μια συσχέτιση ανάμεσα στην ανάπτυξη της ενδομητρίωσης και αρκετούς πολυμορφισμούς, κάποιοι από τους οποίους αφορούν γονίδια, που εμπλέκονται στο ανοσολογικό σύστημα και στην εμφάνιση κακοήθειας. Τέτοια γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες όπως τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNFα) (Lee *et al.*, 2008), το ενδοκυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1 (ICAM-1) (Vigano *et al.*, 2003), τα αποτοξινωτικά ένζυμα της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης M1 και T1 (GSTM1,GSTT1) (Lin *et al.*, 2003), τις μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας (MMPs) (Borghese *et al.*, 2008), καθώς και τους υποδοχείς των οιστρογόνων και της προγεστερόνης (Georgiou *et al.*, 1999, Wieser *et al.*, 2002). Παρόλα αυτά, τέτοιες μελέτες συχνά αφορούν μικρό αριθμό δειγμάτων, με αποτέλεσμα τα ευρήματά τους να μην μπορούν να επιβεβαιωθούν από επόμενες μελέτες (Montgomery *et al.*, 2008).

➤ Καρκίνος και ενδομητρίωση

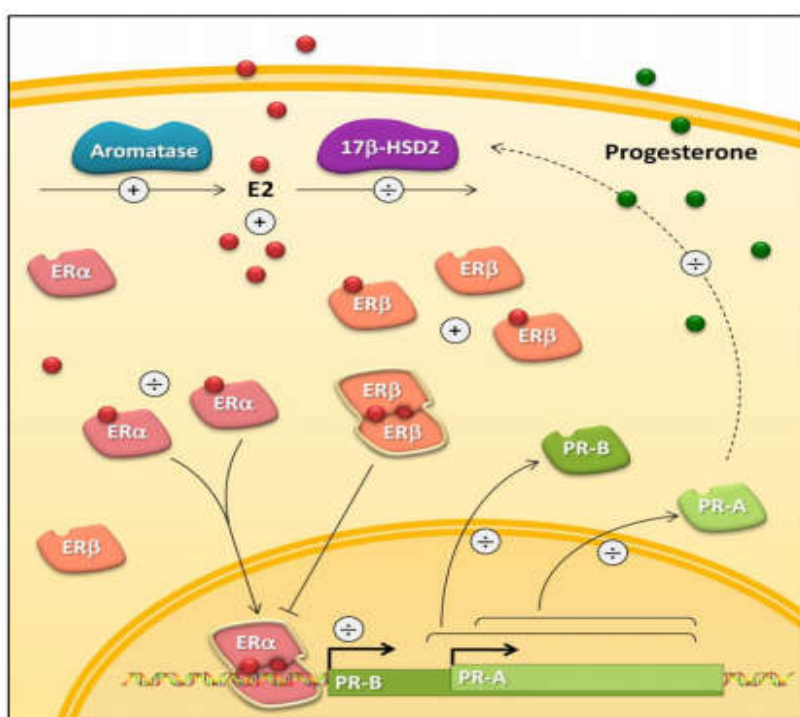
Κατά την ενδομητρίωση, ενδομητρικός ιστός έχει τη δυνατότητα να διηθείται σε άλλους ιστούς και να αναπτύσσεται σε έκτοπες θέσεις, χαρακτηριστικά κοινά με

εκείνα του καρκίνου. Γυναίκες με ενδομητρίωση είναι πιο επιρρεπείς σε εμφάνιση κακοήθειας, όπως καρκίνο των ωοθηκών και λέμφωμα non-Hodgkin (Melin et al., 2007) ή η ενδομητρίωση μπορεί να μετατραπεί σε καρκινώματα στην πυελική περιοχή (Leiserowitz et al., 2003, Prowse et al., 2006, Nezhat et al., 2008). Ένα ακόμα κοινό χαρακτηριστικό του καρκίνου και της ενδομητρίωσης είναι η μειωμένη ικανότητα των κυττάρων να υφίστανται απόπτωση. Αυτή η επιβλαβής επιβίωση των κυττάρων θεωρείται ότι οφείλεται στην αποδιοργάνωση της ισορροπίας των ρυθμιστών της απόπτωσης. Η έκφραση του αντι-αποπτωτικού γονιδίου *BCL2* είναι ενισχυμένη τόσο στο φυσιολογικό ενδομήτριο όσο και στις έκτοπες εστίες σε γυναίκες με ενδομητρίωση, ενώ η έκφραση προ-αποπτωτικών γονιδίων, όπως το *BAX*, είναι μειωμένη ή και μηδενική (Meresman et al., 2000, Johnson et al., 2005, Agic et al. 2009). Κατά την ενδομητρίωση, η έκφραση πολλών γονιδίων ελέγχεται επιγενετικά εν μέρει από την μεθυλίωση του DNA στον εκκινητή τους (Guo 2009). Η καρκινογένεση στο ενδομήτριο έχει συσχετιστεί με την μεθυλίωση συγκεκριμένων γονιδίων (Muraki et al., 2009) και αλλαγές στο τρόπο μεθυλίωσης συμβάλλουν στην ικανότητα διήθησης των κυττάρων του ενδομητρίου. Τέτοια φαινόμενα έχουν εντοπιστεί στους εκκινητές του οιστρογονικού υποδοχέα (ESR2) καθώς και του υποδοχέα της προγεστερόνης (PGR) (Wu et al., 2005, Wu et al., 2006, Xue et al., 2007, Guo 2009).

➤ Ορμόνες και ενδομητρίωση

Ένα από τα καθοριστικά χαρακτηριστικά της ενδομητρίωσης είναι η ενδοκρινικής της απόκριση. Τυπικά η ενδομητρίωση γίνεται συμπτωματική μετά την εμφάνιση της εμμηνορρυσίας και στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, επιλύεται αυθόρμητα με την εμμηνόπαυση (Goldstein D et al., 1980). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ενδομητρίωση είναι μια οιστρογονοεξαρτώμενη ασθένεια, κατά την οποία τα αυξημένα επίπεδα οιστραδιόλης (E2) συμβάλλουν στην πρόοδο της νόσου (Bulun 2009, Rizner 2009). Υπάρχουν πολλά ένζυμα που μεταβολίζουν την E2 στις έκτοπες εστίες ενδομητρίωσης και αυτό οδηγεί σε αυξημένη βιοσύνθεσή της και κατ' επέκταση στον αυξημένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων στις εστίες αυτές. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι η αρωματάση, που παράγει E2 από πρόδρομες

ουσίες, είναι περισσότερο ενεργοποιημένη σε έκτοπες θέσεις σε σχέση με το υγιές ενδομήτριο, όπως και στο ενδομήτριο ασθενών, σε αντίθεση με αυτό υγιών γυναικών (Noble et al., 1996, Dassen et al., 2007, Bukulmez et al., 2008). Γι' αυτό αναστολείς αρωματάσης, που εμποδίζουν την τοπική παραγωγή οιστογόνων, χρησιμοποιούνται επιτυχώς για να μετριάσουν τα συμπτώματα της ενδομητρίωσης (Takayama et al., 1998, Verma and Konje 2009). Η έκφραση της 17β-δυϊδρογενάσης τύπου 2 (17β-HSD2), που μετατρέπει την E2 σε ανενεργή οιστρόνη, βρίσκεται σε καταστολή στις εστίες ενδομητρίωσης, με αποτέλεσμα να αυξάνονται τοπικά τα επίπεδα της E2 (Zeitoun et al., 1998, Dassen et al., 2007).



Σχήμα 3. Μοντέλο τροποποιημένης ρύθμισης οιστρογόνων και προγεστερόνης στην ενδομητρίωση. Στην ενδομητρίωση, η αρωματάση ρυθμίζεται μέσω θετικής ανάδρασης ενώ η 17β-HSD2 ρυθμίζεται αρνητικά, οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα οιστραδιόλης (E2). Μια μείωση στην αναλογία των υποδοχέων οιστρογόνου ERα / ERβ μπορεί να αναστείλει την επαγωγή μέσω ERα της μεταγραφής των υποδοχέων προγεστερόνης PR-A και B, οδηγώντας σε χαμηλά επίπεδα προγεστερόνης και στη συνέχεια αντίσταση σε αυτήν. Η προγεστερόνη συνήθως διεγείρει έμμεσα την μεταγραφή της 17β-HSD2 μέσω επαγωγής άλλων παραγόντων (διακεκομμένο βέλος), λόγω όμως των χαμηλών επιπέδων της ενισχύεται η αύξηση των επιπέδων E2, σχηματίζοντας ένα βρόχο θετικής ανάδρασης.

Όπως και το εύτοπο ενδομήτριο, έτσι και οι ενδομητριοειδείς αλλοιώσεις εκφράζουν τους υποδοχείς οιστρογόνου και προγεστερόνης. Στο πέρασμα των χρόνων, ωστόσο, αρκετοί συγγραφείς έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις αυτών των πρωτεϊνικών υποδοχέων μπορεί να είναι διαφορετικές στις ενδομητρικές εστίες (John O et al., 1981, Lessey B et al., 1989, Bergqvist A et al., 1993). Σε καλλιεργημένα στρωματικά κύτταρα από αυτές τις εστίες, η έκφραση των ισομορφών τόσο του οιστρογονικού υποδοχέα όσο και της προγεστερόνης, παρουσιάζουν διαφορές από εκείνη του υγιούς ενδομητρίου (Attia G et al., 2000, Brandenberger AW et al., 1999). Η οιστραδιόλη δρα μέσω των δύο υποδοχέων της ERα και ERβ και μαζί ως μεταγραφικοί παράγοντες συνδέονται στις περιοχές ERE (Estrogen Response Elements) των υποκινητών των γονιδίων στόχων (Rizner 2009). Ο υποδοχέας ERβ παρουσιάζει αυξημένη έκφραση στα στρωματικά κύτταρα των έκτοπων εστιών σε αντίθεση με αυτά του φυσιολογικού ενδομητρίου, λόγω μειωμένης μεθυλίωσης του υποκινητή του (Xue et al., 2007). Επιπλέον, ο υποδοχέας ERβ εμποδίζει την έκφραση του υποδοχέα ERα, οδηγώντας έτσι σε μία αυξημένη αναλογία ERβ/ERα, η οποία μπορεί να προκαλεί αλλαγή από ενεργοποίηση της έκφρασης του υποδοχέα της προγεστερόνης (PR) από την E2, σε καταστολή της (Bulun et al. 2010a). Πράγματι, τα επίπεδα του υποδοχέα της προγεστερόνης A (PR-A) και κυρίως του υποδοχέα B (PR-B) είναι σημαντικά χαμηλότερα στην ενδομητρίωση σε σχέση με το υγιές ενδομήτριο (Attia et al., 2000). Γνωρίζοντας ότι η προγεστερόνη ελέγχει την προετοιμασία του ενδομητρίου για την εμφύτευση και τη διατήρηση της εγκυμοσύνης, πιστεύεται ότι ο υποδοχέας PR-B είναι ο κύριος υποδοχέας που συμμετέχει σε αυτή τη διαδικασία, αφού τα επίπεδά του ελέγχονται από την E2 κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου (Attia et al., 2000, Bulun et al., 2010b).

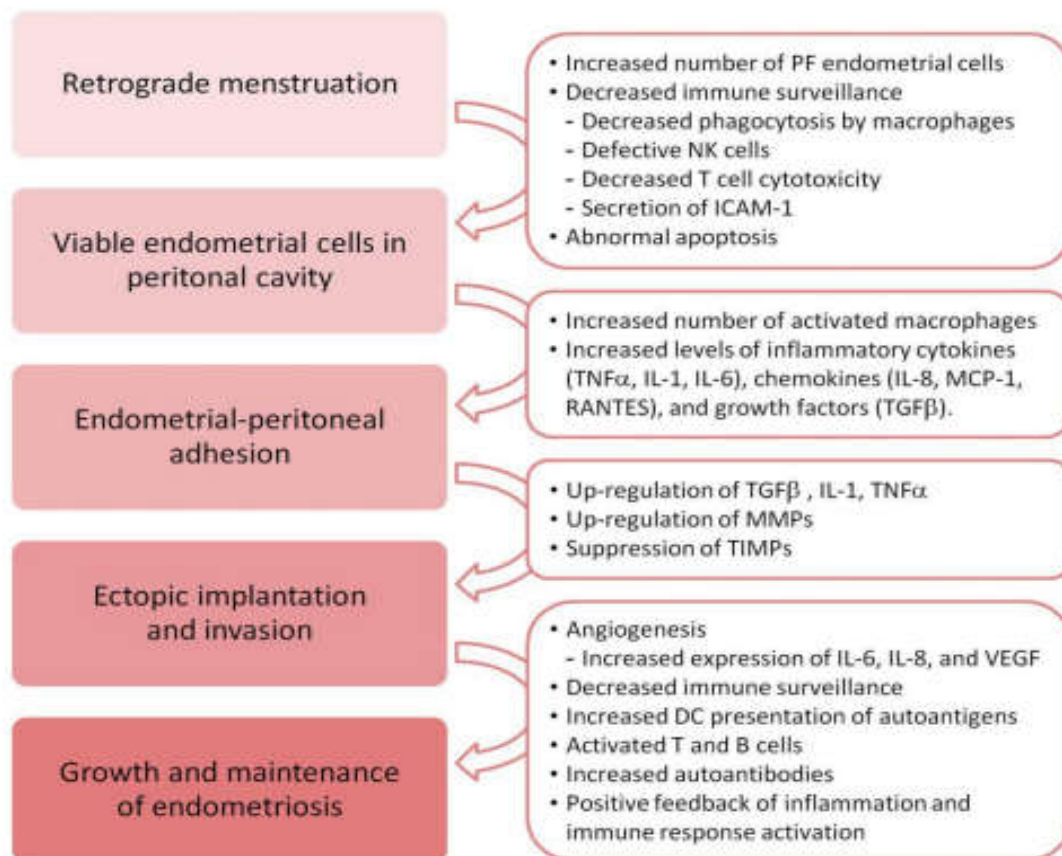
Ένα άλλο ένζυμο, που συμβάλλει στην σύνθεση ορμονών και παίζει σημαντικό ρόλο στη παθογένεια της ενδομητρίωσης, είναι η κυκλοοξυγενάση 2 (COX-2). Μέσω της COX-2 συντίθεται η προσταγλανδίνη E₂ (PGE₂) από το πρόδρομο μόριο του αραχιδονικού οξέος. Το ένζυμο εντοπίζεται αυξημένο στις έκτοπες εστίες ενδομητρίωσης σε ασθενείς με σοβαρή εκδήλωση της νόσου σε αντίθεση με το ενδομήτριο των μαρτύρων και επιπλέον η έκφρασή του έχει συσχετιστεί με το μέγεθος των εστιών (Chishima et al., 2002, Cho et al., 2010). Η χρήση ειδικών αναστολέων για το COX-2 μειώνουν τον πυελικό πόνο σε ασθενείς με ενδομητρίωση

(Cobellis et al., 2004). Ο μηχανισμός, που το COX-2 έχει παθογενετικό αντίκτυπο στην ενδομητρίωση, αποδίδεται στην επαγωγή της έκφρασης της αρωματάσης μέσω πολλών μεταγραφικών παραγόντων, που οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα E2 (Attar et al., 2009). Παρόλα αυτά, η PGE₂ προκαλεί μείωση στην δραστηριότητα της μεταλλοπρωτεϊνάσης μήτρας 9 (MMP-9) και έτσι μειώνεται και η φαγοκυτταρική ικανότητα των μακροφάγων του περιτοναϊκού υγρού, προκαλώντας πιθανώς μειωμένη εκκαθάριση του ενδομητρικού ιστού κατά την ανάστροφη εμμηνόρροια (Wu et al., 2005).

Η δράση των ανδρογόνων στην ενδομητρίωση δεν είναι σαφής, ωστόσο οι υποδοχείς τους φαίνεται να εκφράζονται τόσο στο υγιές ενδομήτριο όσο και στις έκτοπες εστίες (Horie K et al., 1992).

➤ Ανοσολογία και φλεγμονή κατά την ενδομητρίωση

Η φλεγμονή, που χαρακτηρίζεται από ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, ουδετερόφιλα και μακροφάγα, είναι βασικό στοιχείο του ενδομητρικού ιστού και σχετίζεται με υπερπαραγωγή προσταγλανδινών, μεταλλοπρωτεϊνών, κυτοκινών και χημειοκινών (Lebonic et al., 2001, Kayisli et al., 2002, Bulun 2009). Είναι ακόμα αμφιλεγόμενο αν η περιτοναϊκή φλεγμονή είναι συνέπεια ή αιτία της ενδομητρίωσης ή και τα δύο. Πιστεύεται ότι στην ανάπτυξη έκτοπου ενδομητρικού ιστού σε γυναίκες με ενδομητρίωση συμβάλλει η αναποτελεσματική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Lebonic et al., 2001). Φυσιολογικά, μετά την ανάστροφη εμμηνόρροια τα κύτταρα του ενδομητρίου θα έπρεπε να απομακρυνθούν από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος από την περιτοναϊκή κοιλότητα, κάτι το οποίο δεν συμβαίνει στην περίπτωση της ενδομητρίωσης και υπάρχουν μερικοί πιθανοί μηχανισμοί. Οι μηχανισμοί αυτοί φαίνονται συνοπτικά στο παρακάτω διάγραμμα (διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1. Ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος στην ανάπτυξη και τη συντήρηση

της **ενδομητρίωσης**. Μετά την ανάστροφη εμμηνόρροια, πολλαπλές τροποποιημένες ενέργειες του ανοσοποιητικού συστήματος επηρεάζουν την πρόοδο της νόσου.

PF (peritoneal fluid): περιτοναϊκό υγρό, NK (natural killer cells): φυσικά φονικά κύτταρα (Kyama *et al.* 2003).

Η αδυναμία απομάκρυνσης των βιώσιμων ενδομητρικών κυττάρων από το περιτόναιο μπορεί να οφείλεται εν μέρει στον αυξημένο τους αριθμό έναντι αυτών του ανοσοποιητικού συστήματος (D'Hooghe *et al.*, 1994) ή στην μειωμένη φαγοκυτταρική ικανότητα των περιτοναϊκών μακροφάγων (Dmowski *et al.*, 1998). Ένα ακόμη στοιχείο, που μαρτυρά ανοσολογική δυσλειτουργία κατά την ενδομητρίωση, είναι η μειωμένη κυτταροτοξική δράση των NK κυττάρων (natural killers cells) έναντι των αυτόλογων ενδομητρικών κυττάρων, το οποίο είναι συνυφασμένο με την σοβαρότητα της νόσου (Oosterlynck *et al.*, 1991). Η αυστηρά ελεγχόμενη ισορροπία μεταξύ των Τ βοηθητικών κυττάρων τύπου 1 (TH1) και 2 (TH2) τροποποιείται σε γυναίκες με ενδομητρίωση έχοντας υψηλότερη

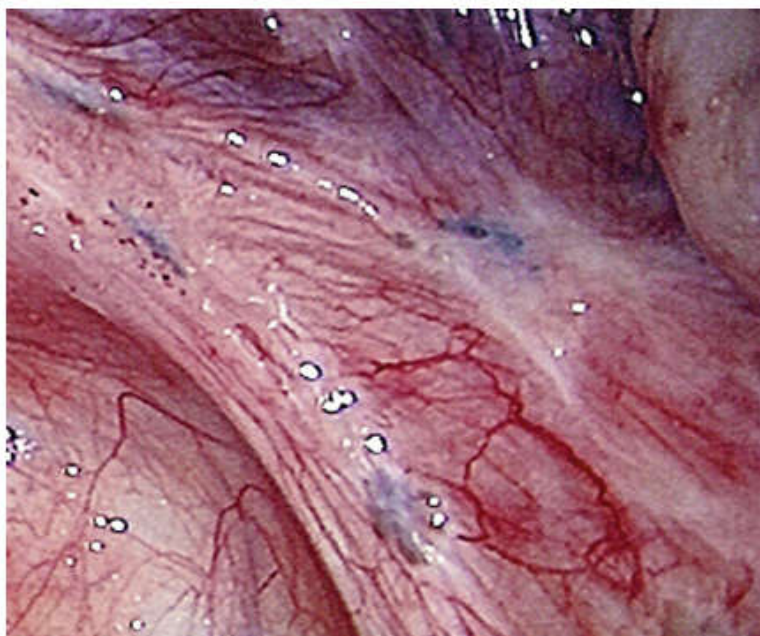
δραστηριότητα των TH2 κυττάρων. Αυτά εκκρίνουν IL-4 και IL-10, που εικάζεται ότι μειώνουν την κυτταροτοξικότητα των NK και T κυττάρων (Hsu et al., 1997, Harada et al., 1999).

Το ανοσολογικό σύστημα πιστεύεται ότι βοηθά στην πρόσφυση βιώσιμων ενδομητρικών κυττάρων στο περιτόναιο, αφού σε γυναίκες με ενδομητρίωση έχει βρεθεί αυξημένη περιτοναϊκή διήθηση λευκοκυττάρων και ειδικά ενεργοποιημένων μακροφάγων (Halme et al., 1987, Hill et al., 1988). Σύμφωνα με τους Haider και Knöfler, ο παράγοντας νέκρωσης όγκων TNFα, που παράγεται κυρίως σε μονοκύτταρα και μακροφάγα, ενεργοποιεί την έκκριση ιντερλευκινών IL-1, IL-6 και IL-8 από κύτταρα του ενδομητρίου (Haider and Knöfler 2009). Ο TNFα είτε προωθεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, μέσω του μονοπατιού του NFκΒ, είτε επάγει απόπτωση, μέσω ενός καταρράκτη αντιδράσεων κασπασών. Τα παραπάνω εξαρτώνται από την τοπική συγκέντρωση του παράγοντα, την έκφραση των υποδοχέων του και την παρουσία αναστολέων. Στο περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση έχουν εντοπιστεί υψηλά επίπεδα TNFα, τα οποία μπορούν να συσχετιστούν με την σοβαρότητα της ασθένειας (Eisermann et al., 1988, Mori et al., 1991), αφού όπως φαίνεται τα μακροφάγα εκκρίνουν μεγάλα ποσά αυτού, σε σύγκριση με υγιείς γυναίκες (Rana et al., 1996). Τέλος, ο TNFα διεγείρει την αύξηση στρωματικών κυττάρων τόσο στο έκτοπο ενδομήτριο όσο και στο υγιές, σε γυναίκες με ενδομητρίωση, ενώ στις φυσιολογικές έχει το αντίθετο αποτέλεσμα (Harada et al., 1999, Braun et al., 2002).

Άλλος ένας παράγοντας που διευκολύνει τόσο την πρόσφυση όσο και την εμφύτευση έκτοπου ενδομητρικού ιστού είναι ο Transforming growth factor β (TGF-β), του οποίου η έκφραση ποικίλει ανάμεσα στα διάφορα στάδια του έμμηνου κύκλου, φτάνοντας στο μέγιστο κατά την εμμηνόρροια (Omwandho et al., 2009). Έχει φανεί ότι μετριάξει την καταστολή της έκφρασης των MMPs (matrix metalloproteinases) από την προγεστερόνη στον ενδομητρικό ιστό, οι οποίες με τη σειρά τους επηρεάζουν και αυτές την εμφύτευση των προσφυόμενων έκτοπων ενδομητρικών κυττάρων, κατά την ενδομητρίωση (Kyama et al., 2003). Στο περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση τα επίπεδα των MMPs είναι

αυξημένα σε αντίθεση με αυτά των αναστολέων τους TIMPs (Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases) (Szamatowicz et al., 2002, Laudanski et al., 2005).

Μετά την εγκατάσταση του έκτοπου ενδομητρικού ιστού ακολουθεί η ανάπτυξη και η διατήρησή του στις εστίες αυτές, στα οποία συμβάλλουν διάφοροι παράγοντες, όπως έχουμε αναφέρει παραπάνω (διάγραμμα 1). Αρχικά, αυτός ο ιστός έχει αυξημένες ανάγκες για αγγείωση, γι' αυτό και έχουν αναφερθεί υψηλές συγκεντρώσεις αρκετών αγγειογενετικών παραγόντων, όπως IL-6 και IL-8 (Barcz et al., 2002). Το περιτοναϊκό υγρό παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη νεοαγγείωση. Σε γυναίκες σε προχωρημένα στάδια ενδομητρίωσης έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα IL-6 και VEGF (vascular endothelial growth factor) στο περιτοναϊκό υγρό, σε σύγκριση με γυναίκες με πιο ήπια εκδήλωση της νόσου αλλά και με τις υγιείς, κάτι που μαρτυρά ότι η αγγειογένεση είναι σημαντικό χαρακτηριστικό της έξαρσης της ασθένειας (Mahnke et al., 2000). Επιπλέον, υψηλά ποσά τόσο του VEGF όσο και του υποδοχέα του έχουν συσχετιστεί με μεγάλη πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων των ενδομητρικών εστιών (Bourlev et al., 2006).



Εικόνα 4. Λαπαροσκοπική φωτογραφία ενδομητριοειδών εμφυτευμάτων στο περιτόναιο. (Taylor RN et al., 2009.)

Μια θετική ανατροφοδότηση της ενεργοποιημένης ανοσολογικής απόκρισης συμβάλλει περαιτέρω στη διατήρηση της ενδομητρίωσης. Η ελαττωματική ανοσολογική επιτήρηση κατά την ενδομητρίωση, πιστεύεται ότι προκαλεί την προσέλκυση αποπτωτικών κυττάρων λόγω ακατάλληλης ενεργοποίησης των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, τα οποία με τη σειρά τους θα ενεργοποιήσουν την παραγωγή αυτοαντισωμάτων (Seery 2006). Επιπλέον, η μειωμένη δραστηριότητα των NK κυττάρων φαίνεται να έχει ως αποτέλεσμα την λιγότερο αποτελεσματική νέκρωση των αυτόλογων δενδριτικών κυττάρων (DCs), που συνδέονται με αυτό-αντιγόνα ενδομητρίου. Αυτό θα διευκόλυνε την παρουσία του αυτοαντιγόνου στα T κύτταρα και την επακόλουθη παραγωγή των αυτοαντισωμάτων (Matarese et al., 2003). Πράγματι, η ποσότητα των αυτοαντισωμάτων έναντι αντιγόνων του ενδομητρίου είναι αυξημένη, τόσο στον ορό όσο και στο περιτοναϊκό υγρό των γυναικών με ενδομητρίωση σε σύγκριση με τα αντίστοιχα υγιών γυναικών (Gorai et al., 1993). Ενεργοποίηση της Th2 ανοσοαπόκρισης σε γυναίκες με ενδομητρίωση και αυξημένα επίπεδα B κυττάρων έχουν αναφερθεί σε έκτοπες εστίες ενδομητρίωσης (Antsiferova et al., 2005), το οποίο προκαλεί παρατεταμένη παραγωγή αυτοαντισωμάτων και συνεχή διήθηση των ανοσοποιητικών κυττάρων. Επί πλέον, οι γυναίκες με ενδομητρίωση έχουν αυξημένο κίνδυνο να παρουσιάσουν αυτοάνοσα νοσήματα, όπως η ρευματώδης αρθρίτιδα (Sinaii et al., 2002).

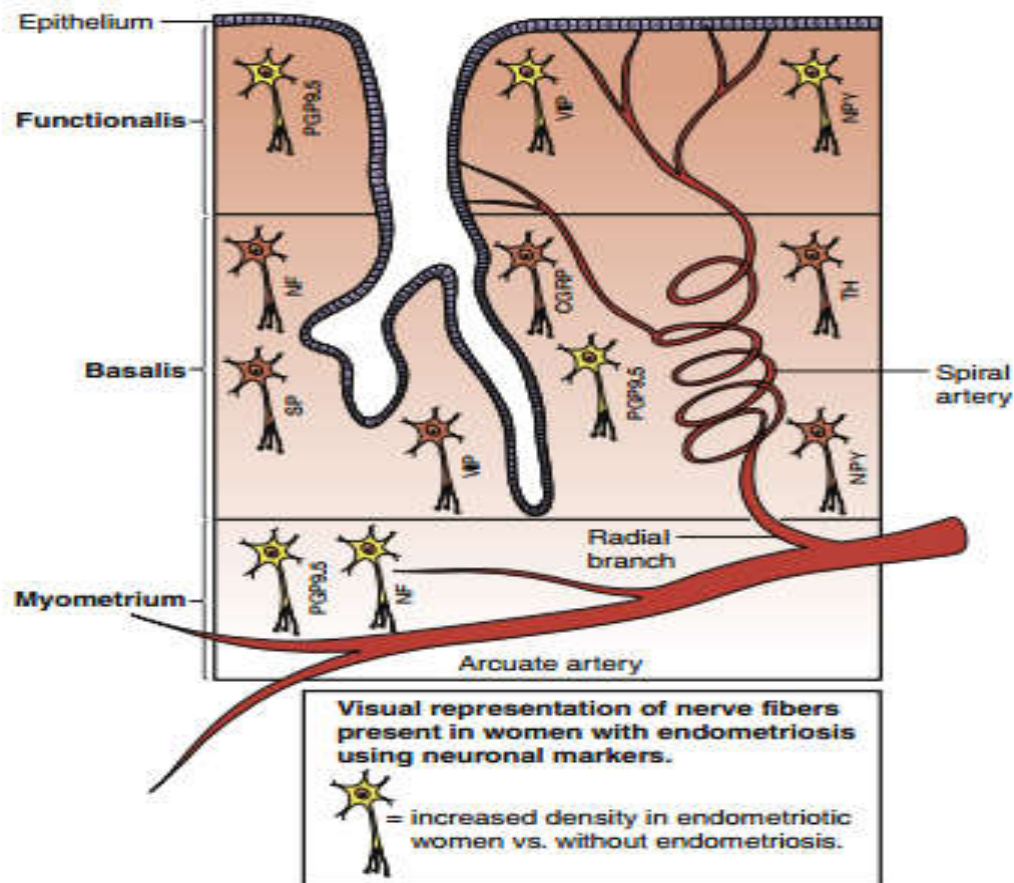
1.2.2 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ

Το πιο συνηθισμένο σύμπτωμα σε γυναίκες με ενδομητρίωση είναι προοδευτική, δευτερογενής δυσμηνόρροια. Ο πόνος συνήθως αρχίζει πριν από την εμμηνόρροια και συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της εμμηνορροϊκής ροής. Μπορεί να συνοδεύεται από δυσπαρέυνεια, δυσουρία ή δυσχέρεια. Ο πόνος επίσης μπορεί να αφορά μυοσκελετικές περιοχές, όπως η πλάτη ή χαμηλά στη μέση. Κυκλική *in situ* εμμηνόρροια στη θέση μιας ενδομητρικής εστίας πιστεύεται ότι οδηγεί σε μια χρόνια φλεγμονώδη νόσος (Anaf V et al., 2002). Το δεύτερο πιο συνηθισμένο σύμπτωμα είναι η υπογονιμότητα με συχνότητα εμφάνισης που πλησιάζει αυτή της ανεξήγητης υπογονιμότητας. Από καιρό έχει γίνει αποδεκτό ότι γυναίκες με μέτρια

και σοβαρή ενδομητρίωση παρουσιάζουν προβλήματα γονιμότητας λόγω της μηχανικής παρεμβολής με την ένωση ωαρίου-σπερματοζωαρίου ή τη μεταφορά του ζυγωτού, ως αποτέλεσμα πυελικών συμφύσεων και διαταραχής της φυσιολογικής ανατομίας. Είναι αρκετά ενδιαφέρον, ότι γυναίκες με ελάχιστη ή ήπια ενδομητρίωση επίσης έχουν μειωμένη ικανότητα γονιμοποίησης, σε σύγκριση με ασθενείς χωρίς κλινικές ενδείξεις της νόσου.

1.2.3 ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η άμεση απεικόνιση των ενδομητριομάτων είναι το πιο σημαντικό στοιχείο για τη διάγνωση. Αν και η ενδομητρίωση συνδέεται με ορισμένα βιοχημικά χαρακτηριστικά, κανένα από αυτά δεν παρέχει επαρκή ευαισθησία ή ειδικότητα για κλινική εφαρμογή. Ως εκ τούτου, η διαγνωστική λαπαροσκόπηση και πιο σπάνια η λαπαροτομία, είναι η πιο κοινή μέθοδος έγκυρης διάγνωσης. Η ιστοπαθολογική επιβεβαίωση της ενδομητρίωσης γίνεται με την μικροσκοπική ταυτοποίηση του έκτοπου ενδομητρικού επιθηλίου και στρώματος. Ακτινοδιαγνωστικές τεχνικές έχουν αξιολογηθεί ως μη επεμβατικές προσεγγίσεις για τη διάγνωση της ενδομητρίωσης, αλλά αυτές οι μέθοδοι δεν έχουν αντικαταστήσει τη χειρουργική επαλήθευση των εστιών. Έχοντας διαπιστώσει ότι, στη λειτουργική στιβάδα του εύτοπου ενδομητρίου ασθενών υπάρχει μεγαλύτερη πυκνότητα νευρικών ινών σε σύγκριση με τους υγιείς (εικόνα 5) , προτείνεται μια ελάχιστα επεμβατική βιοψία του ενδομητρίου, το οποίο θα συμβάλει στη μείωση του χρόνου καθυστέρησης της διάγνωσης και κατ'επέκταση της θεραπείας της ενδομητρίωσης (Matsuzaki S et al., 2009, Al-Jefout M et al., 2009, Bokor A et al., 2009).



Εικόνα 5. Νευρωνικοί δείκτες που δηλώνουν ποιες νευρικές ίνες υπάρχουν στα διάφορα στρώματα του ενδομητρίου. (Medina MG et al., 2009.)

1.2.4 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Το σύστημα που χρησιμοποιείται ευρέως για την σταδιοποίηση της έκτασης και της οσβαρότητας της ενδομητρίωσης εκδόθηκε από την αμερικανική κοινότητα γονιμότητας το 1985 (American FS: Revised American Fertility Society classification of endometriosis:1985, *Fertil Steril* 43:1–2, 1985). Αυτό το σύστημα χαρακτηρίζει την έκταση της νόσου με βάση τον συνολικό τρισδιάστατο όγκο ενδομητρίωσης. Σημασία δίνεται από το βάθος της διείσδυσης, την εμπλοκή των ωοθηκών, καθώς και την πυκνότητα των σχετικών συμφύσεων και την έκταση της εμπλοκής. Χρησιμοποιώντας αυτή την ταξινόμηση, τα αποτελέσματα βαθμολογούνται για να συγκρίνουν αντικειμενικά το ιστορικό και τα αποτελέσματα θεραπείας μεταξύ διαφορετικών κέντρων και χειρουργών. Οι βαθμολογίες από 1 έως 15

χαρακτηρίζουν την ασθένεια ελάχιστη ή ήπια, 16 έως 40 μέτρια και πάνω από 40 σοβαρή. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, αυτό το σύστημα σταδιοποίησης δεν μπορεί να συσχετιστεί με την πρόβλεψη κύησης ή με το κοινό σύμπτωμα του πυελικού πόνου (Guzick DS et al., 1997). Νέες ταξινομήσεις προωθούνται ώστε να διορθωθούν πιθανές ασάφειες στο ήδη υπάρχον σύστημα, αλλά η πολυπλοκότητα και η έλλειψη ευαισθησίας, εμποδίζουν την διαδικασία (Adamson GD et al., 2010, Ballester M et al., 2012, Haas D et al., 2011). Κάποιοι συγγραφείς έχουν προτείνει την ενσωμάτωση αντικειμενικών βιοχημικών δεικτών φλεγμονής ως μέσο για την εκτίμηση των παραμέτρων της νόσου πέραν των ορατών λαπαροσκοπικά εστιών, απαιτούνται όμως περισσότερες μελέτες (Hoeger K et al., 1999, Lebovic D et al., 2001).

1.2.5 ΑΚΤΙΝΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ

Το υψηλό κόστος και οι εγχειρητικοί κίνδυνοι έχουν διεγείρει προσπάθειες για την ανάπτυξη μη επεμβατικών εξετάσεων για την ενδομητρίωση, όπως η μαγνητική τομογραφία (MRI) και η υπερηχογραφία. Σε σύγκριση με άλλες μορφές απεικόνισης, η μαγνητική τομογραφία είναι η καλύτερη τεχνική για τον εντοπισμό της ενδομητρίωσης. Ωστόσο, στερείται επαρκούς ευαισθησίας και ειδικότητας, όσον αφορά στην ανίχνευση μικρών εστιών και συμφύσεων. Η μαγνητική τομογραφία μπορεί επίσης να έχει ένα σημαντικό ρόλο στην αξιολόγηση της απόκρισης της θεραπείας για την ενδομητρίωση (Sugimura K et al.,1993, Outwater E et al., 1995). Η συνολική ευαισθησία της MRI στην ανίχνευση εστιών έκτοπου ενδομητρίου είναι 77%, με ειδικότητα 78% ,(Telimaa S et al.,1987) η αναγνώριση όμως των ενδομητριομάτων μέσω MRI είναι πιο ικανοποιητική με υψηλή ευαισθησία (90% έως 92%) και ειδικότητα (91% έως 98%) (Sugimura K et al.,1993). Μια άλλη οικονομική, εύκολη στη χρήση και στη προσβασιμότητα τεχνική απεικόνισης είναι η υπερηχογραφία. Συχνά επιλέγεται για την ανίχνευση εστιών και κυρίως για την αξιολόγηση των ωοθηκών για ενδομητρίωματα. Τα ενδομητρίωματα μπορεί να είναι δύσκολο, ωστόσο, να διαφοροποιηθούν από τα νεοπλάσματα των ωοθηκών, μιας και τα μιμούνται, όμως διαθέτουν χαρακτηριστική υπερηχογραφική

εμφάνιση (Abrao MS et al., 2007). Συχνά απαιτούνται πολλά ηχογράμματα προτού ο γιατρός συμπεράνει αξιόπιστα ότι μια μάζα είναι ενδομητρίωμα.

1.2.6 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Μια ποικιλία ανθρώπινων αυξητικών παραγόντων διεγείρει τη μιτογόνο δραστηριότητα των ενδομητρικών κυττάρων. Πολλοί από αυτούς τους παράγοντες έχουν επίσης εντοπιστεί σε ενδομητρικούς ιστούς και στο περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση. Αν και ο ρόλος τους στην ενδομητρίωση δεν είναι ακριβής, αυτοί οι παράγοντες είναι πιθανοί ρυθμιστές του πολλαπλασιασμού των κυττάρων των εστιών ενδομητρίωσης.

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (απόπτωση) είναι επίσης σημαντικός μηχανισμός της κυκλικής αναδιαμόρφωσης του ενδομητρίου (Vaskivuo T et al., 2000). Η απόπτωση του εύτοπου ενδομητρίου φαίνεται να είναι μειωμένη σε γυναίκες με ενδομητρίωση (Meresman G et al., 2000), καθώς και στο ενδομητρικό επιθήλιο (Zhang H et al., 2009, Dmowski W et al., 2001). Τα παραπάνω ευρήματα δείχνουν ένα ακόμη πιθανό επιλεκτικό πλεονέκτημα για την παρουσία ενδομητριοειδών εστιών στην περιτοναϊκή κοιλότητα. (Agić A et al., 2009).

1.2.7 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ

Ο ρόλος των ελεύθερων ριζών οξυγόνου ως ρυθμιστών της κυτταρικής παθολογίας, που σχετίζεται με την ενδομητρίωση, έχει προταθεί τα τελευταία χρόνια. Οι ελεύθερες ρίζες είναι ιδιαίτερα δραστικά μόρια, που παροδικά έχουν ένα ή δύο ελεύθερα ηλεκτρόνια. Η μεταφορά των ηλεκτρονίων σε άλλα δομικά ή ρυθμιστικά μόρια μπορεί να προκαλέσει βλάβη στα κύτταρα. Οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες βιολογικής σημασίας είναι είδη οξυγόνου (ROS), όπως ρίζες υδροξυλίου ($\text{HO}\bullet$), υπεροξυλίου ($\text{ROO}\bullet$) ή υπεροξειδίου ($\text{O}_2\bullet^-$). Το οξειδωτικό στρες συνεπάγεται μια ομοιοστατική απόκλιση, όπου το προ-οξειδωτικό περιβάλλον υπερσχύει της αμυντικής ικανότητας των αντιοξειδωτικών βιταμινών και ενζύμων σε ένα φυσιολογικό σύστημα. Τα στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου *in vitro* έχουν μια

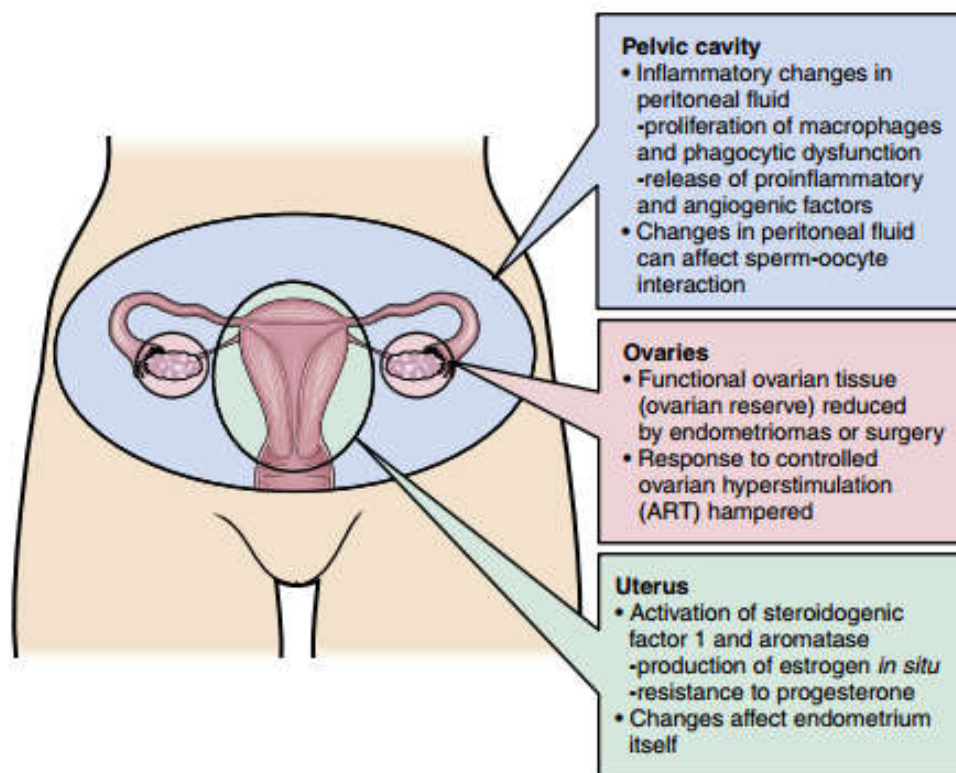
μιτογόνο απόκριση στο οξειδωτικό στρες (Foyouzi N et al., 2004) και οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να συμβάλουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των εστιών.

1.2.8 ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ

Το κατά πόσο η ήπια έως μέτρια ενδομητρίωση μειώνει τη γονιμότητα είναι μία από τις πιο αμφιλεγόμενες πτυχές της έρευνας σε αυτό το πεδίο. Μια μελέτη έδειξε πως υπάρχουν σημαντικά χαμηλότερη ποσότητα AMH στον ορό 87 γυναικών με μέτρια έως σοβαρή ενδομητρίωση σε σύγκριση με 306 γυναίκες χωρίς την ασθένεια (Shebl O et al., 2009). Εκτός από τις μηχανικές επιδράσεις των εστιών και τις συμφύσεις, τα στοιχεία υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η ενδομητρίωση προκαλεί ένα ανοσολογικά εχθρικό περιβάλλον εντός της πυελικής περιοχής. Στοιχεία από προγράμματα δωρεάς ωαρίων δείχνουν ότι τα ωάρια ή η πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη διαταράσσονται σε γυναίκες με ενδομητρίωση (Garrido N et al., 2002, Bodri D et al., 2007) και συγκεκριμένες χημειοκίνες βρίσκονται σε αυξημένες συγκεντρώσεις στο ωοθυλακικό υγρό των γυναικών που νοσούν και υποβάλλονται σε in vitro γονιμοποίηση (IVF) (Xu H et al., 2006). Γενικά, οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις στην περιοχή των έκτοπων εστιών ενδομητρίωσης πιστεύεται ότι βλάπτουν την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (Oral E et al., 1996), την διαβατότητα των σαλπίγγων (Mastroianni L J 1999) και την ανάπτυξη των ωοκυττάρων (Yamashita Y et al., 2002).

Προστανοειδή προτείνονται για ανακούφιση του πόνου που προκαλείται από την ενδομητρίωση, όμως μπορεί επίσης να επηρεάσει τη γονιμότητα μέσω παρεμβολής στην κινητικότητα των σαλπίγγων και την κίνηση του ωαρίου μέσα σε αυτές (Syrop CH et al., 1987). Όταν σπερματοζωάρια επώαστηκαν σε περιτοναϊκό υγρό από υγιείς γυναίκες σε σύγκριση με αυτά που επώαστηκαν σε υγρό από γυναίκες με ενδομητρίωση, βρέθηκε ότι στα τελευταία υπήρχε σημαντικό ποσοστό θρυμματισμού του DNA στο σπέρμα (Mansour G et al., 2009). Επιπλέον, υπάρχουν ορισμένες μελέτες που δείχνουν ότι, το ποσοστό αυθόρμητων αποβολών αυξάνεται στις γυναίκες με ενδομητρίωση (Metzger DA et al., 1986) αν και αυτό αμφισβητείται από άλλες μελέτες (Vercammen EE et al., 2000). Σε μια μετα-ανάλυση

αποτελεσμάτων εξωσωματικής γονιμοποίησης, οι γυναίκες με προχωρημένη ενδομητρίωση είχαν σημαντικά χαμηλότερη πιθανότητα γονιμοποίησης και εμφύτευσης, σε σχέση με άλλα περιστατικά (Barnhart K et al., 2002).



Εικόνα 6. Μηχανισμοί υπογονιμότητας που σχετίζονται με την ενδομητρίωση

ART: assisted reproductive technologies. (Ziegler D et al., 2010.)

1.2.9 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Λόγω της περιτοναϊκής τους θέσης, οι περισσότερες ενδομητρικές εστίες υποβάλλονται σε λαπαροσκοπική αφαίρεση. Τεχνικές, που περιλαμβάνουν επιθετική εκτομή των εστιών, θερμοπηξία ή εξάχνωση με λέιζερ έχουν ενσωματωθεί μέσω ενδοσκοπικών διαδικασιών και έχουν διδαχθεί ευρέως σε γυναικολόγους χειρουργούς. Είναι σχετικά σπάνιο να καταφεύγουν σε λαπαροτομή ή υστερεκτομή ως θεραπεία, ειδικά όταν αφορά γυναίκες, που επιθυμούν να διατηρήσουν τη μήτρα τους.

Η θεραπεία για τα ενδομητρίωματα των ωοθηκών (σοκολατοειδείς κύστες) μπορεί να είναι ιδιαίτερα δύσκολη. Αυτές οι κύστες δεν ανταποκρίνονται πολύ καλά σε

φαρμακευτική θεραπευτική αγωγή, και ως εκ τούτου, προτιμάται η χειρουργική τους αφαίρεση.

Ορμονικές θεραπείες, εγκεκριμένες για θεραπεία ενδομητρίωσης από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA), περιλαμβάνουν GnRH ανάλογα, οξεϊκή μεδροξυπρογεστερόνη (medroxyprogesterone acetate,) και το ανδρογόνο δαναζόλη. Επιπλέον, αντισυλληπτικά από το στόμα έχουν αξιολογηθεί θετικά και χρησιμοποιούνται ευρέως (Vercellini P et al., 2003). Μια εναλλακτική μορφή προγεστερόνης, που έχει εγκριθεί για χρήση στην Ευρώπη, η διενογέστη, είναι στην πραγματικότητα ένα συστατικό του συνδυασμένου αντισυλληπτικού που έχει εγκριθεί από την FDA, Natazia [™] (Strowitzki T et al., 2010). Όταν χρησιμοποιούνται τα αντισυλληπτικά επανειλημμένα, μετά από χειρουργική επέμβαση για ενδομητρίωμα, υπάρχει σημαντικά μειωμένη επανεμφάνιση, σε σύγκριση με μη χρήστες (Seracchioli R et al., 2010, Vercellini P et al., 2008). Η πλειοψηφία των στοιχείων που υποστηρίζουν την ιατρική θεραπεία για την ενδομητρίωση γίνεται μέσω παρατήρησης των νοσούντων. Ωστόσο, έχουν εφαρμοστεί και μερικές τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες (Rice V 2002).

Η λαπαροσκοπική χειρουργική για τη βελτίωση της υπογονιμότητας, σε γυναίκες με ελάχιστη έως ήπια ενδομητρίωση, είναι από καιρό μια αποδεκτή προσέγγιση. Πρόσφατα έγινε μια μετα-ανάλυση δύο ελεγχόμενων τυχαιοποιημένων μελετών: μια πολυκεντρική καναδική μελέτη (Marcoux S et al., 1997) και μια μικρότερη Ιταλική (Olive D et al., 2002). Στην ανάλυση αυτή φάνηκε ότι, η καταστροφή των εστιών ακόμη και σε πρώιμα στάδια της ασθένειας σε συνδυασμό με υπογονιμότητα, οδήγησε σε βελτιωμένα ποσοστά εγκυμοσύνης στις γυναίκες που επιχειρούν αυθόρμητη σύλληψη.

Υπάρχουν αρκετά στοιχεία, που υποδεικνύουν ότι η αφαίρεση των ενδομητριομάτων σε περιπτώσεις ελαφριάς έως και ήπιας ενδομητρίωσης, αποφέρουν υψηλά ποσοστά επιτυχημένης κύησης, όταν υποβληθούν σε εξωσωματική γονιμοποίηση (Oroien HK et al., 2011).

Καμία δημοσιευμένη μελέτη δεν συγκρίνει τη χειρουργική θεραπεία έναντι μη θεραπείας σε γυναίκες με μέτρια έως σοβαρή ενδομητρίωση. Ωστόσο, πολλές δημοσιεύσεις αναφέρουν ένα ποσοστό σχεδόν μηδενικής εγκυμοσύνης για γυναίκες με εκτεταμένη νόσο. Τυχαιοποιημένες μελέτες δείχνουν αυξημένα

ποσοστά εγκυμοσύνης σε γυναίκες, που έχει αποκατασταθεί η φυσιολογική ανατομία της πυέλου (Falcone T et al., 1996).

Όταν εξετάζεται η χειρουργική απομάκρυνση των ενδομητριομμάτων, τα δεδομένα είναι περιορισμένα και αντικρουόμενα. Μερικές μελέτες δείχνουν, ότι η κυστεκτομή μπορεί να είναι επιβλαβής για τα υπολειπόμενα ωάρια και την ορμονική λειτουργία (Benaglia L et al., 2010, Loh FH et al., 1999, Hemmings R et al., 1998), ενώ μια άλλη δεν έδειξε διαφορές στα αποτελέσματα γονιμότητας μεταξύ γυναικών με χειρουργημένο ενδομητρίωμα, με ενδομητρίωση και με σαλπινγικό παράγοντα (Canis M et al., 2001). Η κυστεκτομή ωοθηκών έχει συσχετιστεί σημαντικά με μειωμένη AMH μετά τη χειρουργική επέμβαση (Hirokawa W et al., 2011, Biacchiardi CP et al., 2011). Θα χρειαστούν περαιτέρω μελέτες για να αποσαφηνιστεί ο λόγος κίνδυνος προς όφελος για την αφαίρεση ενδομητριομμάτων σε γυναίκες με υπογονιμότητα, που σχετίζεται με την ενδομητρίωση (Garcia-Velasco JA et al., 2009). Σε περιπτώσεις υπογονιμότητας λόγω μέτριας έως σοβαρής ενδομητρίωσης, ορισμένοι συγγραφείς προτείνουν συνδυασμό φαρμακευτικής αγωγής και χειρουργικής θεραπείας (Donnez J et al., 2002). Η χρήση αγωνιστών GnRH ή πιθανώς αντισυλληπτικών από το στόμα, για 3 μήνες πριν από την εξωσωματική γονιμοποίηση, αυξάνει το ποσοστό εγκυμοσύνης κατά τέσσερις φορές (Sallam HN et al., 2006, de Ziegler D et al., 2010).

1.2.10 ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Έχουν γίνει τρεις τυχαιοποιημένες μελέτες συγκρίνοντας την επαγωγή ωοθυλακιωρρηξίας (Fedele L et al., 1992) και την επαγωγή της σε συνδυασμό με ενδομήτρια σπερματέγχυση, σε γυναίκες με ενδομητρίωση (Deaton JL et al., 1990). Έχει αποδειχθεί εμφανώς στις μελέτες αυτές ότι οι συγκεκριμένες θεραπείες αυξάνουν τη γονιμότητα όταν υπάρχει μόνο προγραμματισμένη συνουσία.

Έχει αναφερθεί μία μεμονωμένη τυχαιοποιημένη IVF μελέτη, αλλά μόνο 15 ασθενείς υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση και 6 δεν είχαν καμία θεραπεία. Αυτοί οι αριθμοί είναι πολύ μικροί για να αποδώσουν αξιόλογα

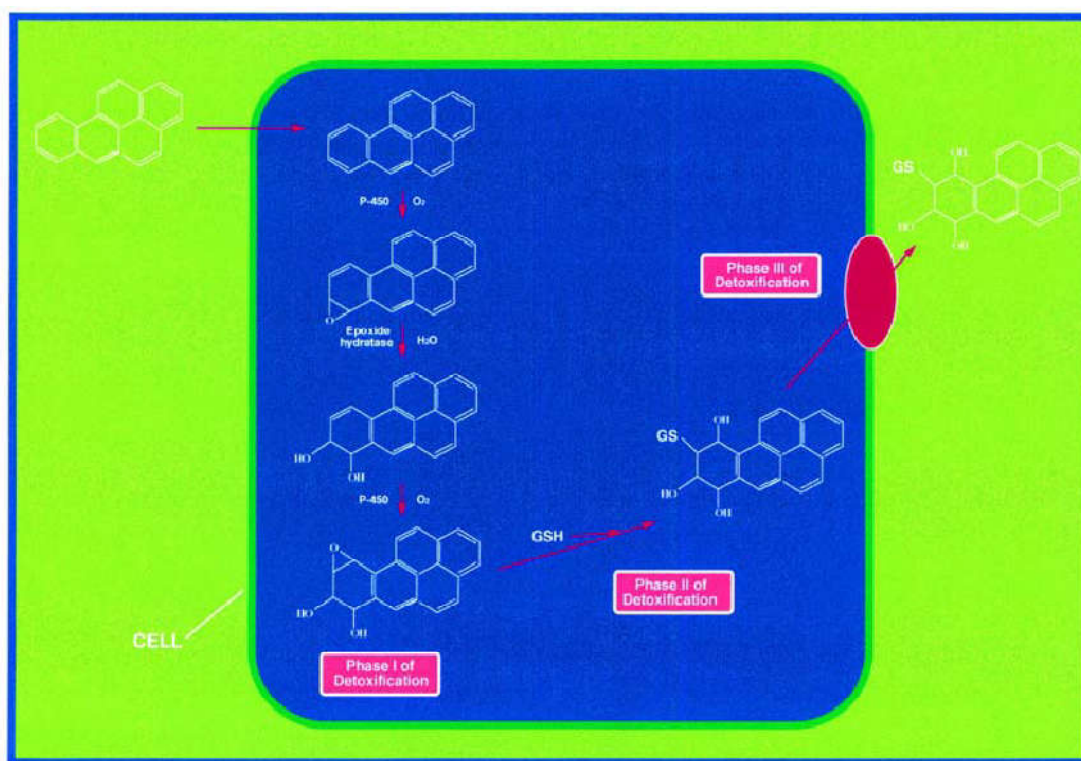
συμπεράσματα (Soliman S et al., 1993). Σε μια αναδρομική μελέτη, δεν υπήρχαν διαφορές ανάμεσα σε γυναίκες, που υποβάλλονταν σε εξωσωματική γονιμοποίηση και σε αυτές που ακολουθούν την αναμενόμενη θεραπευτική αγωγή κατά τη διάρκεια μιας τριετούς περιόδου (Kodama H et al., 1996). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η εξωσωματική γονιμοποίηση δεν αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την επανεμφάνιση ενδομητρίωσης (Benaglia L et al., 2010).

Σε μια μετα-ανάλυση 22 ανεξάρτητων μελετών, ο Barnhart και οι συνεργάτες του (Barnhart K et al., 2002) διαπίστωσαν ότι η συνολική πιθανότητα για επίτευξη κύησης ήταν σημαντικά χαμηλότερη για τους ασθενείς με ενδομητρίωση σταδίου III-IV, σε σύγκριση με τους μάρτυρες που είχαν σαλπιγγικό παράγοντα. Τέλος, μια πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε μια μείωση των ποσοστών γονιμοποίησης και εμφύτευσης και λιγότερα ωκύτταρα στις ασθενείς με ενδομητρίωση, το οποίο συμφωνεί με τα χαμηλότερα επίπεδα AMH σε μέτρια έως σοβαρή ενδομητρίωση (Shebl O et al., 2009).

1.3 S-TPANΣΦΕΡΑΣΕΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (*Glutathione S-transferases-GSTs*)

Οι ζωντανοί οργανισμοί εκτίθενται συνεχώς σε μη θρεπτικά ξένα χημικά είδη. Αυτά τα ξενοβιοτικά μπορεί να βλάψουν τον οργανισμό, προκαλώντας τοξικές και μερικές φορές καρκινογόνες επιδράσεις. Φυσικές τοξικές ενώσεις περιλαμβάνουν φυτικές και μυκητιακές τοξίνες (π.χ. φυτικές φαινόλες και αφλατοξίνες) και ενεργές ρίζες οξυγόνου (π.χ. ρίζες υπεροξειδίου και υπεροξείδιο του υδρογόνου). Η ενζυμική αποτοξίνωση των ξενοβιοτικών, όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAH), έχει ταξινομηθεί σε τρεις ξεχωριστές φάσεις. Οι φάσεις I και II περιλαμβάνουν τη μετατροπή ενός λιπόφιλου, μη πολικού ξενοβιοτικού σε ένα περισσότερο υδατοδιαλυτό και ως εκ τούτου λιγότερο τοξικό μεταβολίτη, ο οποίος στη συνέχεια μπορεί να εξαλειφθεί ευκολότερα από το κύτταρο (φάση III). Η φάση I καταλύεται κυρίως από το σύστημα του κυτοχρώματος P450. Τα ένζυμα της φάσης II καταλύουν τη σύζευξη ενεργοποιημένων ξενοβιοτικών σε ενδογενή υδατοδιαλυτά υποστρώματα, όπως η μειωμένη γλουταθειόνη (GSH), το UDP-

γλυκουρονικό οξύ ή η γλυκίνη. Σε πολλά είδη, η σύζευξη με τη γλουταθειόνη, που καταλύεται από GSTs, είναι η κύρια αντίδραση φάσης II. (Hayes JD και McLellan LI, 1999). (εικόνα 7).



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση των τριών φάσεων της ενζυμικής αποτοξίνωσης (Sheehan D. *et al.*, 2001)

Οι S-Τρανσφεράσες της Γλουταθειόνης ανήκουν στα ένζυμα της Φάσης-II του μεταβολισμού. Οι GSTs εμπλέκονται σε διάφορες διαδικασίες, σημαντικές για τη ζωή, όπως μηχανισμούς αποτοξίνωσης επικίνδυνων παραγόντων και εντοπίζονται σε διάφορους ιστούς με διαφορετικά χαρακτηριστικά των ισοενζύμων. (Hirvonen *et al.*, 1996).

Ο βασικός ρόλος των GSTs είναι να αποτοξινώνει ξενοβιοτικά καταλύοντας την ένωση της γλουταθειόνης (GSH) με πολλά υποστρώματα, όπως φαρμακευτικά και περιβαλλοντικά μολυσματικά προϊόντα (Nebert *et al.*, 2004). Συγκεκριμένα, η GSH αλληλεπιδρά με ηλεκτρόφιλα άτομα άνθρακα, θείου και αζώτου, που είναι ικανά να δημιουργήσουν ελεύθερες ρίζες και κατ'επέκταση οξειδωτικό στρες, τα μετατρέπει σε μη πολικά υποστρώματα και με αυτό τον τρόπο εμποδίζει την αλληλεπίδρασή

τους με σημαντικές κυτταρικές πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα (Hayes et al., 1986, Josephy 2010a).

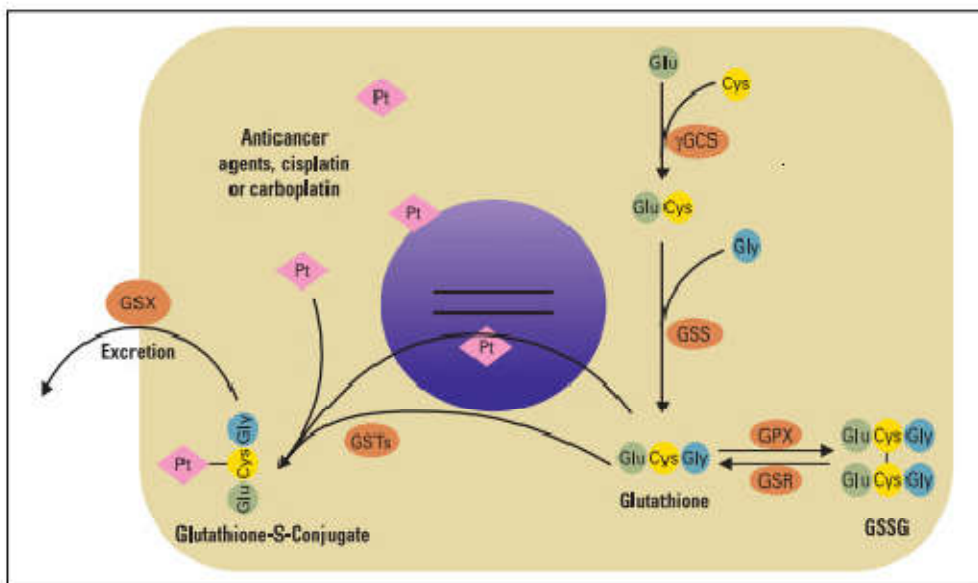
Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων HUGO (Human Genome Organization) Human Gene Nomenclature Committee υπάρχουν 21 γνωστά λειτουργικά γονίδια για τα GSTs (Nebert et al., 2004). Ορισμένα από αυτά θεωρείται ότι έχουν παρόμοια δράση με τα GSTs, όπως το GST -kappa 1 (GSTK1), η συνθετάση της Προσταγλανδίνης E (PTGES) και τρία GSTs μικροσώματος (microsomal GSTs) (MGST1, MGST2, MGST3). Όμως τα γονίδια αυτά δεν έχουν συσχετιστεί εξελικτικά με την οικογένεια των GST γονιδίων. Σύμφωνα με την αλληλουχία αμινοξέων/νουκλεοτιδίων και ανοσολογικές, κινητικές και τριτοταγείς/τεταρτοταγείς δομικές ιδιότητες, έχει πλέον διαπιστωθεί ότι η οικογένεια γονιδίων GST αποτελείται από 16 γονίδια κατανεμημένα σε έξι διακριτές υποοικογένειες- alpha (GSTA), mu (GSTM), omega (GSTO), pi (GSTP), theta (GSTT) and zeta (GSTZ). Μεταξύ των παραπάνω έχουν εντοπιστεί πολυμορφισμοί στα γονίδια που κωδικοποιούν για το *GSTA1* (α τάξη), το *GSTM1* (μ τάξη), το *GSTP1* (π τάξη), το *GSTT1* (θ τάξη) και το *GSTZ1* (ζ τάξη). Τα τελευταία χρόνια, έχουν μελετηθεί εκτενώς οι γονότυποι των *GSTM1*, *GSTP1* και *GSTT1* για τον πιθανό τροποποιητικό τους ρόλο στην εξατομικευμένη ευαισθησία σε ασθένειες που σχετίζονται με περιβαλλοντικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. (Stucker et al., 2002).

Μια υπεροικογένεια GST ενζύμων αποτελείται από τα *GSTM1*, *GSTT1* και *GSTP1* ως διμερή μόρια, που ενεργοποιούν την σύνδεση της γλουταθειόνης (GSH) με τοξικές χημικές ουσίες προς μετατροπή τους σε μη τοξικές (Lewis et al., 2002). Τα *GSTM1*, *GSTT1* και *GSTP1* είτε βρίσκονται σε ομοδιμερή είτε σε ετεροδιμερή μορφή, διαθέτουν μια θέση που δεν συνδέεται κάποιο υπόστρωμα, όπως και μία θέση σύνδεσης με την GSH. Οι κυτοσολικές τάξεις mu και alpha φτιάχνοντας ετεροδιμερή συμπλέγματα, δημιουργούν ένα κενό ανάμεσα στις δύο υπομονάδες, το οποίο λειτουργεί ως θέση υψηλής συγγένειας για ξενοβιοτικά (Hayes et al., 1986). Έτσι το μόριο αποκτά διπλή δράση, στην υδρόφοβη περιοχή H του ενζύμου ενώνεται το εκάστοτε υπόστρωμα και στην γειτονική υδρόφιλη G περιοχή ενώνεται η γλουταθειόνη, ώστε τελικά να έχουμε το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Στη συνέχεια,

ενεργοποιούνται οι θειόλες της GSH, με αποτέλεσμα την νουκλεοφιλική επίθεση της GSH στην τοξική ουσία (Eaton et al., 1999b).

1.3.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ

Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Όταν η γλουταθειόνη οξειδωθεί μέσα στα κύτταρα, μέσω της αντίδρασής της με οξείδια και περοξειδία, δημιουργεί με μια δεύτερη οξειδωμένη γλουταθειόνη έναν δισουλφιδικό δεσμό (GSSG) μέσω των θεικών ομάδων των κυστεϊνών του κάθε μορίου. Η σύνθεση της GSH ξεκινά με την ένωση της κυστεΐνης με το γλουταμικό μέσω της αντίστοιχης συνθετάσης (glutamyl cysteine synthetase - GCS). Στη συνέχεια η συνθετάση της γλουταθειόνης προσθέτει την γλυκίνη για να σχηματιστεί η γλουταθειόνη. Μόλις η γλουταθειόνη οξειδωθεί από την περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPX), τότε δύο μόρια ενώνονται και δημιουργούν τον δισουλφιδικό δεσμό. Αυτή η διαδικασία μπορεί να αντιστραφεί μέσω της GSR (glutathione reductase) και διπλής οξείδωσης του NADPH. Η δραστηριότητα των GSTs εξαρτάται από μια σταθερή παροχή GSH από τις συνθετάσες της, καθώς και από την δράση ειδικών μεταφορέων συμπλεγμάτων GSH και ξενοβιοτικών ή τοξικών υπεροξειδίων εκτός κυττάρου. Το σύμπλεγμα GSH-ξενοβιοτικό είναι πολύ υδρόφιλο για να διαχέεται ελεύθερα από το κύτταρο και πρέπει να αντλείται ενεργά από μια διαμεμβρανική ΑΤΡάση όπως η αντλία GS-X (Ishikawa T. 1992). Επιπλέον, η γλουταθειόνη αποτοξινώνει περοξειδία που δημιουργούνται από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και μειώνει της οξειδωμένες περιοχές στο DNA, σε πρωτεΐνες και άλλα βιομόρια, μέσω τρανς-υδρογενασών. Η GCS και οι GSTs φαίνεται να είναι τα σημαντικότερα ένζυμα στο σύστημα της γλουταθειόνης. (Ping Yang et al., 2004)



Εικόνα 8. Το μονοπάτι της γλουταθειόνης και ο ρόλος της στην αποτοξίνωση. Ελεύθερο Pt στο κυτταρόπλασμα ή και στον πυρήνα, μπορεί να ενωθεί με την γλουταθειόνη και να αποβληθεί από το κύτταρο.

Glu: glutamate, Cys: cysteine, Pt: platinum-based anticancer drugs, GCS: gamma-glutamylcysteine synthetase, GSS: glutathione synthetase, Gly: glycine, GPX: glutathione peroxidase, GSR: glutathione reductase, GSTs: glutathione-S-transferases, GSX: glutathione-conjugation complex export pump, GSSG: glutathione disulfide. (Ping Yang et al., 2004)

1.3.2 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ

Ο όρος «πολυμορφισμός» συχνά χρησιμοποιείται με μάλλον ασαφείς και εύκολους τρόπους. Από τεχνικής άποψης, μια πολυμορφική περιοχή είναι εκείνη της οποίας το πιο σπάνιο αλληλόμορφο ή αλλαγή εμφανίζεται με συχνότητα μεγαλύτερη από 1% του πληθυσμού. Εντούτοις, η χρήση πολυμορφισμού σε σύγχρονες γενετικές πρωτοβουλίες προέκυψε τελικά από τη μελέτη της φυσιολογικής και βιοχημικής παραλλαγής, όπως αυτή που εμφανίζεται σε πρωτεϊνικές ισομορφές και αντιγόνα ομάδων αίματος (Botstein et al., 1980, Cargill et al., 1999, Schull, 1973). Το Πρόγραμμα Ανθρώπινου Γονιδιώματος έδειξε ότι εμείς οι άνθρωποι είμαστε 99,9% όμοιοι στο επίπεδο του DNA μας. Ωστόσο, το υπόλοιπο 0,1% μάς καθιστά μοναδικούς - όχι μόνο στην εμφάνιση και τη συμπεριφορά μας, αλλά και στον κίνδυνο να αναπτύξουμε ορισμένες ασθένειες, όπως και στην ανταπόκρισή μας σε

διαφορετικά είδη φαρμάκων. Ο γενετικός πολυμορφισμός είναι μια διαφορά στην αλληλουχία DNA μεταξύ ατόμων, ομάδων ή πληθυσμών. Σε αυτές τις διαφορές συμπεριλαμβάνονται τα SNPs (single nucleotide polymorphisms), επαναλήψεις αλληλουχιών, ελλείψεις και ανασυνδυασμοί. Οι γενετικοί πολυμορφισμοί μπορεί να είναι το αποτέλεσμα τυχαίων διεργασιών ή μπορεί να έχουν προκληθεί από εξωτερικούς παράγοντες (όπως ιοί ή ακτινοβολία). Εάν μια διαφορά στην αλληλουχία DNA μεταξύ των ατόμων έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με κάποια ασθένεια, συνήθως ονομάζεται γενετική μετάλλαξη. Οι μεταβολές στην αλληλουχία του DNA, που έχουν επιβεβαιωθεί ότι προκαλούνται από εξωτερικούς παράγοντες, ονομάζονται επίσης μεταλλάξεις και όχι πολυμορφισμοί (Smith 2002).

1.3.3 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΓΙΑ ΤΑ GSTs

Έχει περιγραφεί ένας σημαντικός αριθμός γενετικών πολυμορφισμών μεταξύ των διαλυτών GSTs (Hayes and Strange 2000). Είναι σημαντικό ότι η μεταβολή στα αλληλόμορφα των GSTs είναι πολύ συχνή στον πληθυσμό. Έχουν αναφερθεί ελλείψεις γονιδίων για το *GSTM1* και το *GSTT1* και έχουν βρεθεί αλλαγές σε κωδικοποιητικές αλληλουχίες αμινοξέων για τα *GSTA2*, *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT2* και *GSTZ1* (Hayes et al., 1986). Μία από τις αλληλόμορφες μορφές του *GSTT2* κωδικοποιεί μία κολοβωμένη πρωτεΐνη (Coggan et al., 1998). Τέλος, μια αλλαγή στο ισώνιο 6 του *GSTM3* προκαλεί έλλειψη μιας θέσης δέσμευσης του παράγοντα μεταγραφής YY1 (Inskip et al., 1995).

Πίνακας 1. Κατανομή των GSTs στου διάφορους ιστούς και τα υποστρώματα που συνδέονται με αυτά (Comstock et al., 1993, Hayes and al., 1995, Rowe et al., 1997.)

ΥΠΟΜΟΝΑΔΑ	kDA	ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ	ΙΣΤΟΣ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ
A1	25,6	6p12	Συκώτι, νεφροί, πάγκρεας, πνεύμονας, όρχεις, καρδιά, εγκέφαλος, επινεφρίδια	CDNB, DCNB, CHP, ECA
A2	26	6p12	Συκώτι, νεφροί, πάγκρεας, πνεύμονας, όρχεις, καρδιά, εγκέφαλος, επινεφρίδια	CDNB, DCNB, CHP, ECA
A3	?	?	Πλακούντας	Άγνωστο
A4	25,7	?	Λεπτό έντερο, σπλήνας	CDNB, CHP, ECA
M1a, M1b	26.7	1p13.3	Συκώτι, νεφροί, πάγκρεας, πνεύμονας, όρχεις, καρδιά, εγκέφαλος, επινεφρίδια	CDNB, DCNB, CHP, ECA, οξείδιο του trans-στιλβενίου
M2	26.7	1p13.3	Συκώτι, νεφροί, πάγκρεας, πνεύμονας, όρχεις, καρδιά, εγκέφαλος, επινεφρίδια	CDNB, DCNB, CHP, ECA, κινόνες κατεχολαμίνης
M3	26.7	1p13.3	Εγκέφαλος, όρχεις, σπλήνας	CDNB, DCNB, CHP, ECA
M4	26.7	1p13.3	Συκώτι, σκελετικοί μύες, καρδιά, εγκέφαλος, πάγκρεας, πνεύμονας, νεφροί, πλακούντας	CDNB, DCNB, CHP, ECA
M5	26	1p13.3	Εγκέφαλος, όρχεις, πνεύμονας	CDNB
P1	23	11q13	Συκώτι, νεφροί, πάγκρεας, πνεύμονας, όρχεις, καρδιά, εγκέφαλος, επινεφρίδια	BPDE, CDNB, DCNB, CHP, ECA

T1	27	22q11.2	Νεφροί, συκώτι, λεπτό έντερο, σπλήνας, προστάτης, πάγκρεας, όρχεις, καρδιά, πνεύμονας	CDNB, CHP, ECA, διχλωρομεθάνιο
T2	27	22q11.2	Συκώτι	CDNB, CHP
Z1	24,2	14q24.3	?	Διχλωροακετικό οξύ

CDNB (1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο), DCNB (1,2-διχλωρο-4-νιτροβενζόλιο), CHP (υδροϋπεροξειδίο
κουμενίου

1.3.4 *GSTM1* ΚΑΙ ΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΟΥ

Το *GSTM1* καταλύει την αποτοξίνωση από εποξειδία αρωματικών υδρογονανθράκων και προϊόντα οξειδωτικού στρες όπως τα υδροπεροξειδία του DNA (Heagerty et al., 1994). Το γονίδιο *GSTM1* είναι πολυμορφικό και αποτελείται από δύο ενεργά αλληλόμορφα και ένα μη λειτουργικό, που προκύπτει από την απουσία ολόκληρου του γονιδίου *GSTM1*. Υπάρχουν πέντε γονίδια της τάξης *mu* που είναι τοποθετημένα διαδοχικά (5'-*GSTM4-GSTM2-GSTM1-GSTM5-GSTM3*-3') στο χρωμόσωμα 1p13.3. Οι περισσότερες μελέτες, που αφορούν τους πολυμορφισμούς του *GSTM1*, έχουν επικεντρωθεί στη σύγκριση της ομόζυγης έλλειψης του γονιδίου με την ύπαρξη στον γονότυπο τουλάχιστον ενός λειτουργικού αλληλόμορφου. Έτσι το *GSTM1*, σύμφωνα με τα τρία αλληλόμορφα, μπορεί να διαχωριστεί σε δύο κατηγορίες: στο μη λειτουργικό *GSTM1-null* σε ομοζυγωτία, όταν απουσιάζει το αλληλόμορφο (*GSTM1-0*) και στο λειτουργικό *GSTM1-1*, όταν υπάρχει τουλάχιστον ένα από τα *GSTM1A* ή *GSTM1B* (Seidegard et al., 1985). Οι ομοζυγώτες για το *GSTM1-0* δεν παράγουν καθόλου πρωτεΐνη. Τα αλληλόμορφα *GSTM1A* και *GSTM1B* διαφέρουν κατά μια βάση στο εξώνιο 7 και κωδικοποιούν μονομερή που στη συνέχεια οργανώνονται σε ομοδιμερή ή ετεροδιμερή ένζυμα παρόμοιας καταλυτικής αποτελεσματικότητας. Συγκεκριμένα στα *GSTM1A* και *GSTM1B* στη θέση 534 υπάρχει μια αντικατάσταση C>G, που έχει

ως αποτέλεσμα την αλλαγή του ασπαραγινικού οξέος σε λυσίνη στην αμινοξική θέση 172. Αυτή η αντικατάσταση δεν δημιουργεί καμία λειτουργική αλλαγή στη κωδικοποίηση των δύο αλληλόμορφων. (McLellan et al., 1997) .

```
AGAAAACACAGACCACATTTCTTTACTCTGGCCCTTTCTGCGGGTCTTCCTATACC
ACTGACACTGTTCTGTGTAGGCGGGGCTAGAGGGGAGACTAAGCCCTGGGAGTAGCTTT
CGGATCAGAGGAAGTCTGCTCTTACAGTGACAGGGGCTGAATTAAATCCCAGTTGGG
GCCACCACTTTTCTAGTCTGACCCCTGCAGCCGGAGTCTCCAGAGCCCTTGGGAACGCG
CAGCGGAGAGAAGGCTGAGGGACACCGCGGGCAGGGAGGAGAAGGGAGAAGAGCTTTGCT
CCGTTAGGATCTGGCTGGTGTCTCAAGCGCACAGCCAAGTCGCTGTGGACCTAGCAAGGG
CTGGATGGACTCGTGGAGCCTCAGGGCTGGGTAGGGAAGCTGGCGAGGCCGAGCCCCGCC
TTGGGCTTCTGGGCGCCCTGACTTCGCTCCCGGAACCTCGGGCCTGGGAGGCGGGAGGA
AGTCTTACTGAGTGACGCCCCAGGCGCCCTCTCCCGGGCCTCCAGAATGGCGCCTTTCGG
GTTGTGGCGGGCCGAGGGGCGGGGTGCGAGCAAGGCCCCGCTGTCCCCTCTCCGGAGCT
CTTATACTCTGAGCCCTGCTCGGTTTAGGCCTGTCTGCGGAATCCGCACCAACCAGCACC
ATGCCCATGATACTGGGGTACTGGGACATCCGCGGGGTGAGCGAGGGTCCGCTGGACGGT
GGGACGAGGGCGCAGGGGAGGGAAGTGCGAAGCAGCTGCGGGACGGACTCTAGGGACCGT
TCCTCTCAGGGCTGCCCGCCTCAGAAGGGCCTGTGCATGCCGCTGTGTGTGTGTTGGG
GTGTGGGCGGGTAGAGGAGGCAACGGGTACGTGCAGTGTAACCTGGGGGCTTCCCTGGTG
CAGACAAAGTCAGGGACCCTCCATCTCTGACGCGACCTGCGGGCCATCTCTCCAGCTGG
CCCACGCCATCCGCTGCTCCTGGAATACACAGACTCAAGCTATGAGGAAAAGAAGTACA
CGATGGGGGACGTAATGGCACCCCTGTGTTCCGGGCTCTGCCACTCACGCTAAGTTGGC
ACCAAGCAACCCATGGTGGCCACCTGTGGCTGCCTCTGCAGGCCTCCCTGCTGGAGCTG
CAGGCTGTCTTCCCTGAGCCCCGGTGAGGGAGCCCTCTGGCCTTGCAAGGCAGAATGC
TGGGGTGGGATGCTGGGCCCCCTGTCTAATTGGGACGGGTGTCCCTCAGGGCTTGCTTAA
ACCCTGGAAGCCTTAGCTGTGTGGGGTCCAGAGCCCTCAGCGGGATTCTTTGTCCCTGAA
CCCTGGGATGTGGGACTGAGTGGTCAGATTCTAGATCCACCTGTCTCAGGGATCTTGCCA
CTGGCTCCGTGGGAGGGTCCCCGGAAGGAGGGCTGGGCTCTGGGGAGGTTTGTTCAC
TTCTTCTTCCCCACCACAGCTCCTGATTATGACAGAAGCCAGTGGCTGAATGAAAAATTC
AAGCTGGGCCTGGACTTTCCCAATGTAGGTGCAGGGGAAGGGGCGGTTTTGGGGGAAAGT
GCAACGTGTCTCTGACTGCATCTCCTCTCCCCAGCTTAGAGGTGTTAAGATCAGGAGTCT
TCTGCCAATTCTCTCACTCCTGGCTGTCTAAACAGTCCTTCCATGATGTTCTGTGTCC
ACCTGCATTGTTTCATGTGACAGTATTCTTATTTAGTCCTGCCATGAGCAGGCACAGTG
AGTGCCCGGTCTCCTCTCTGCTCTTGTATGGGAAGGGGATGCTGGGGAGCCTGGTGGC
CCAAGTGAAGCTTCGCGGTTTCCCATCCATCCAGCTGCCCTACTTGATTGATGGGGCTCA
CAAGATCACCCAGAGCAACGCCATCTTGTGCTACATTGCCCGCAAGCACAACTGTGTGA
GTGTGGGTGGCTGCAATGTGTGGGGGGAAGGTGGCCTCCTCCTTGCTGGGCTGTGATGC
TGAGATTGAGTCTGTGTTTGTGGGTGGCAGGTGGGGAGACAGAAGAGGAGAAGATTCTGT
GTGGACATTTTGGAGAACCAGACCATGGACAACCATATGCAGCTGGGCATGATCTGTAC
AATCCAGAATTTGTGAGTGTCCCCAGTGAGCTGCATCTGACAGAGTTTGGATTGGGGCC
```

Εικόνα 9. *GSTM1**A και *GSTM1**B πολυμορφισμός και η θέση 534 που γίνεται η αντικατάσταση C>G (με κίτρινο) στη θέση 534 (<http://www.ensembl.org>, accessed date: May 8, 2010).

Πίνακας 2. Ονοματολογία και γονιδιακές αλλαγές των αλληλόμορφων του *GSTM1* (Sherratt et al., 2002)

ΤΑΞΗ	ΓΟΝΙΔΙΟ	ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟ	ΑΛΛΑΓΗ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ	ΠΡΩΤΕΪΝΗ Ή ΑΜΙΝΟΞΥ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΣΤΗΚΕ
mu	<i>GSTM1</i>	<i>GSTM1*A</i>	G534	Lys172
		<i>GSTM1*B</i>	C534	Asn172
		<i>GSTM1*0</i>	ΕΛΛΕΙΨΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ	ΚΑΜΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗ
	<i>GSTM3</i>	<i>GSTM3*A</i>	ΚΑΜΙΑ	WILD TYPE
		<i>GSTM3*B</i>	ΕΛΛΕΙΨΗ 3bp ΣΤΟ ΕΣΩΝΙΟ 6	ΚΑΜΙΑ ΑΛΛΑΓΗ
	<i>GSTM4</i>	<i>GSTM4*A</i>	ΚΑΜΙΑ	WILD TYPE
		<i>GSTM4*B</i>	ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΕ ΕΣΩΝΙΑ	ΚΑΜΙΑ ΑΛΛΑΓΗ

1.3.5 ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥ *GSTM1* ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ

Η κατανομή συχνότητας των αλληλόμορφων του *GSTM1* ποικίλει. Εξαρτάται από τον υπό εξέταση πληθυσμό και είναι υπεύθυνη ακόμα και για την αποτελεσματικότητα ή τοξικότητα κάποιων φαρμάκων (Kurose et al., 2012). Μεταξύ του 38% και 67% των Καυκάσιων φέρουν την έλλειψη και των δύο αλληλόμορφων του γονιδίου *GSTM1*, με αποτέλεσμα την ολική απουσία του ενζύμου (Rebbeck 1997).

Πίνακας 3. Γονοτυπική συχνότητα του *GSTM1* σε διαφορετικούς πληθυσμούς ανά τον κόσμο.(Muhammad Nasir Uddin 2013)

ΧΩΡΑ/ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ	No (N)	<i>GSTM1</i> (%)		p	ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ
		ΑΠΟΥΣΙΑ	ΠΑΡΟΥΣΙΑ		
ΒΟΡΕΙΑ ΙΝΔΙΑ	370	33	67	0,1125	Dhruba Mishra et al., 1999
Newcastle, ΑΓΓΛΙΑ	178	50,8	49,2	0,01	Welfare et al., 1999
ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΕΥΡΩΠΗ	127	45	55	0,11	Steinhoff C et al., 2000
ΤΟΥΡΚΙΑ	133	51,9	48,1	0,01	Ada et al., 2004
ΙΤΑΛΙΑ	273	46,9	53,1	0,06	D'Alo et al., 2004
ΝΟΤΙΑ ΙΝΔΙΑ	517	30,4	69,9	0,76	Naveen et al, 2004
ΚΙΝΑ	477	51	49	0,01	Sctiawan et al., 2000
ΚΑΥΚΑΣΙΟΙ	166	48,8	51,2	0,03	Gsur et al., 2001
ΙΑΠΩΝΙΑ	88	55,7	44,3	0,1	Kiyohara et al., 2000
ΦΙΛΑΝΔΟΙ ΚΑΥΚΑΣΙΟΙ	478	41,8	58,2	0,24	Mitrunen et al., 2001
ΑΦΡΟΑΜΕΡΙΚΑΝΟΙ	271	28	72	0,54	Millikan et al., 2000
ΛΕΥΚΟΙ ΑΜΕΡΙΚΑΝΟΙ	392	52	48	0,01	Millikan et al., 2000
ΛΕΥΚΟΙ ΒΡΑΖΙΛΙΑΝΟΙ	319	48,9	51,1	0,02	Rossini et al., 2002

ΜΗ-ΛΕΥΚΟΙ ΒΡΑΖΙΛΙΑΝΟΙ	272	34,2	65,8	1,00	Rossini et al., 2002
--------------------------	-----	------	------	------	-------------------------

1.3.6 ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟ *GSTM1*

Τα GSTs μεταβολίζουν πολλά φάρμακα, εξωγενείς ουσίες και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση προκαρκινογόνων ουσιών.

Το εύρος των πιθανών υποστρωμάτων για τα GSTs είναι πολύ μεγάλο, δεδομένου ότι μπορούν να μεταβολίζουν ενώσεις με ένα ηλεκτρόφιλο κέντρο λόγω της της θειόλης αυτών των ενζύμων. Ωστόσο, από βιολογικής άποψης τα υποστρώματα αυτών των ενζύμων μπορούν να ταξινομηθούν ως προϊόντα οξειδωτικού στρες και ξενοβιοτικής ενεργοποίησης (Strange et al., 1999). Ακολουθεί πίνακας (πίνακας 3) με τα υποστρώματα που ενώνονται οι πρωτεΐνες των γονιδίων της τάξης mu.

Πίνακας 3. Υποστρώματα που συνδέονται με τα γονίδια των GSTs της τάξης mu (Eaton DL et al., 1999).

ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	ΤΑΞΗ	ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ	ΕΝΖΥΜΟ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ
			<i>GSTM1-1</i>	CDNB (1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο), trans-4-φαινυλ-3-βουτενιο, B1-εποξείδιο αφλατοξίνης, οξείδιο trans-στιλβενίου
			<i>GSTM2-2</i>	CDNB (1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο), 1'2-διχλωρο-4-νιτροβενζόλιο, αμινοχρώμιο

GST	Mu	1p13.3		
			<i>GSTM3-3</i>	CDNB(1-χλωρο-2,4 δινιτροβενζόλιο) ,, H ₂ O ₂
			<i>GSTM4-4</i>	Δεν έχει καθοριστεί
			<i>GSTM5-5</i>	CDNB(1-χλωρο-2,4- δινιτροβενζόλιο)

2 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο μοριακός έλεγχος του πολυμορφισμού *GSTM1* για την παρουσία ή απουσία του γονιδίου σε κλινικά ύποπτα δείγματα με ενδομητρίωση καθώς και σε υγιείς γυναίκες ελληνικού πληθυσμού, ώστε στη συνέχεια να εκτιμηθεί αν υπάρχει συσχετισμός του πολυμορφισμού με την εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου.

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν το αν η ύπαρξη του πολυμορφισμού επηρεάζει την εκδήλωση συμπτωμάτων της ενδομητρίωσης και με ποιον τρόπο, είναι περιορισμένα. Η σχέση των δύο παραπάνω έχει αρχίσει και μελετάται τις δύο τελευταίες δεκαετίες, γεγονός που περιορίζει τις διαθέσιμες πληροφορίες.

Ο τελικός στόχος της μελέτης μας είναι η εφαρμογή γενετικών δεικτών ως συνήθων διαγνωστικών εξετάσεων, προκειμένου να προβλεφθεί η έκβαση της νόσου και επίσης να προσδιοριστεί η κατάλληλη ανταπόκριση στα φάρμακα.

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

3.1.1 ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΗΜΑΤΑ

Στους παρακάτω πίνακες αναφέρονται τα χημικά αντιδραστήρια (πίνακας 4) και τα μηχανήματα (πίνακας 5) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία κατά τις πειραματικές διαδικασίες καθώς και ο οίκος κατασκευής τους.

Πίνακας 4. Χημικά αντιδραστήρια

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΙΚΟΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	Buffer 10x	INVITROGEN
	MgCl ₂	
	dNTPs	
	Εκκινητές(Primers)	
	Taq Polymerase	
	Ενέσιμο H ₂ O	
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA (EXTRACTION DNA) PureLink Genomic DNA kit	Αιθανόλη 100%	INVITROGEN
	Πρωτεΐνάση K	
	RNase A	
	Διάλυμα Lysis	
	Washing Buffer I	
	Washing Buffer II	
	Elution Buffer	

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ	TRIS	Sigma Aldrich
	Βορικό οξύ	Sigma Aldrich
	EDTA	Sigma Aldrich
	Αγαρόζη	Takara
	Βρωμιούχο Αιθίδιο	Nipon Genetics
	Πυκνή Χρωστική Bromophenol Blue	Takara
	Μάρτυρας (100 bp ή 50 bp)	Takara

Πίνακας 5. Μηχανήματα

ΜΗΧΑΝΗΜΑΤΑ	ΟΙΚΟΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ
Master cycler	Eppendorf
Vortex Genie2	Bacacos Scientific
Υδατόλουτρο	INBIT
Φυγόκεντρος	Hettich
Τροφοδοτικό	Thermo Scientific
Φωτόμετρο	Qubit

3.1.2 ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Η μελέτη διεξήχθη σε πανεπιστημιακό νοσοκομείο. Χρησιμοποιήσαμε ενδομητρικό ιστό από 29 Ελληνίδες με υπογονιμότητα και ιστολογικά επιβεβαιωμένα

ενδομητρίωση, καθώς και δείγματα αίματος από 49 μάρτυρες χωρίς αποβολές και με τουλάχιστον μία επιτυχή εγκυμοσύνη.

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Το DNA είναι η πρώτη ύλη πολλών πειραμάτων Μοριακής Βιολογίας. Η απομόνωσή του σε καθαρή μορφή είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τις περαιτέρω διαδικασίες. Για κάθε διαφορετικό τύπο DNA (χρωμοσωμικό, πλασμιδιακό, μιτοχονδριακό, κλπ) υπάρχουν διαφορετικές μέθοδοι απομόνωσης. Όλες, όμως, έχουν κοινά στάδια, που είναι η απελευθέρωση του DNA σε διαλυτή μορφή μετά από σπάσιμο των κυτταρικών μεμβρανών καθώς και μεμβρανών υποκυτταρικών οργανιδίων, όπως οι πυρήνες και ο διαχωρισμός του από άλλα μακρομόρια.

Στην παρούσα εργασία, για την ανίχνευση μεταλλαγών απομονώθηκε γενωμικό DNA από περιφερικό αίμα, από ιστό (ωοθήκη, κύστεις, οζίδια) και από ιστό που είχε μονιμοποιηθεί σε παραφίνη. Δείγματα των 4ml ολικού αίματος συλλέχθηκαν σε σωληνάρια με αντιπηκτικό EDTA, ενώ ο νωπός ιστός διατηρήθηκε στους -180 °C μέχρι την επεξεργασία. Χρησιμοποιήθηκε η εμπορική συσκευασία PureLink Genomic DNA kit και πραγματοποιήθηκε το προτεινόμενο πρωτόκολλο από την εταιρεία INVITROGEN ως ακολούθως:

- **Απομόνωση DNA από ολικό αίμα**

Σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου erpendorf όγκου 1,5 ml:

- Μεταφέρουμε 200μl ολικού αίματος, προσθέτουμε 20μl πρωτεϊνάσης K και 20μl RNάσης A και ανακινούμε με vortex.
- Επωάζουμε το παραπάνω δείγμα για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθέτουμε 200μl ρυθμιστικού διαλύματος Lysis Buffer και ανακινούμε σε vortex.
- Επωάζουμε στους 55° C για 10 λεπτά.
- Προσθέτουμε 200μl απόλυτης αιθανόλης και ανακινούμε καλά σε vortex.

Σε στήλη διαχωρισμού:

- Μεταφέρουμε το παραπάνω διάλυμα των 640 μl σε στήλη διαχωρισμού που παρέχεται από το kit.
- Φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στα 12.500 g.
- Προσθέτουμε 500μl Washing Buffer I, το οποίο είχε αραιωθεί με 15 ml απόλυτης αιθανόλης.
- Φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στα 12.500 g.
- Προσθέτουμε 500μl Washing Buffer II, αραιωμένο και αυτό με 15 ml απόλυτης αιθανόλης.
- Φυγοκεντρούμε για 4 λεπτά στα 14.000 g.
- Μεταφέρουμε τη στήλη σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου erpendorf του 1,5 ml.
- Προσθέτουμε 150 μl διαλύματος Elution Buffer.
- Φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στα 14.000 g.
- Συλλέγουμε και διατηρούμε το δείγμα στους -20°C.

- **Απομόνωση DNA από ιστό**

Σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου erpendorf όγκου 1,5 ml:

- Παίρνω τμήμα του ιστού, περίπου 25mg και προσθέτω 180 μl Digestion Buffer και 20μl πρωτεϊνάνης K. Vortex 1 λεπτό.
- Επωάζουμε στους 55 °C για 1,5-2 ώρες και ανακινούμε με Vortex κάθε 1 τέταρτο.
- Προσθέτουμε 20μl RNάσης A και ανακινούμε με vortex.
- Επωάζουμε το παραπάνω δείγμα για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθέτουμε 200μl ρυθμιστικού διαλύματος Lysis Buffer και ανακινούμε σε vortex.
- Προσθέτουμε 200μl απόλυτης αιθανόλης και ανακινούμε καλά σε vortex.

Σε στήλη διαχωρισμού:

- Μεταφέρουμε το παραπάνω διάλυμα σε στήλη διαχωρισμού που παρέχεται από το kit.
- Φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στα 12.500 g.
- Προσθέτουμε 500μl Washing Buffer I, το οποίο είχε αραιωθεί με 15 ml απόλυτης αιθανόλης.
- Φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στα 12.500 g.
- Προσθέτουμε 500μl Washing Buffer II, αραιωμένο και αυτό με 15 ml απόλυτης αιθανόλης.
- Φυγοκεντρούμε για 4 λεπτά στα 14.000 g.
- Μεταφέρουμε τη στήλη σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου errendorf του 1,5 ml.
- Προσθέτουμε 50 μl διαλύματος Elution Buffer.
- Φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στα 14.000 g.
- Συλλέγουμε και διατηρούμε το δείγμα στους -20°C.

- **Απομόνωση DNA από ιστό σε παραφίνη**

Σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου errendorf όγκου 1,5 ml:

- Παίρνουμε τμήμα 20-50mm² ιστού και προσθέτουμε 1ml ξυλόλης.
- Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στα 14000g και αφαιρούμε το υπερκείμενο.
- Προσθέτουμε 1ml απόλυτης αιθανόλης, φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στα 14000g και αφαιρούμε το υπερκείμενο.
- Επαναλαμβάνουμε ακόμη μια φορά το παραπάνω βήμα.
- Τοποθετούμε το δείγμα σε υδατόλουτρο για 10-15 λεπτά στους 37 °C με ανοιχτό καπάκι.
- Προσθέτω 180 μl Digestion Buffer και 20μl πρωτεϊνάνης K. Vortex 1 λεπτό.
- Επωάζουμε στους 55 °C για 1,5-2 ώρες και ανακινούμε με Vortex κάθε 1 τέταρτο.
- Προσθέτουμε 20μl RNάσης A και ανακινούμε με vortex.
- Επωάζουμε το παραπάνω δείγμα για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

- Προσθέτουμε 200μl ρυθμιστικού διαλύματος Lysis Buffer και ανακινούμε σε vortex.
- Προσθέτουμε 200μl απόλυτης αιθανόλης και ανακινούμε καλά σε vortex.

Σε στήλη διαχωρισμού:

- Μεταφέρουμε το παραπάνω διάλυμα σε στήλη διαχωρισμού που παρέχεται από το kit.
- Φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στα 12.500 g.
- Προσθέτουμε 500μl Washing Buffer I, το οποίο είχε αραιωθεί με 15 ml απόλυτης αιθανόλης.
- Φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στα 12.500 g.
- Προσθέτουμε 500μl Washing Buffer II, αραιωμένο και αυτό με 15 ml απόλυτης αιθανόλης.
- Φυγοκεντρούμε για 4 λεπτά στα 14.000 g.
- Μεταφέρουμε τη στήλη σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου errendorf του 1,5 ml.
- Προσθέτουμε 30 μl διαλύματος Elution Buffer.
- Φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στα 14.000 g.
- Συλλέγουμε και διατηρούμε το δείγμα στους -20°C.

3.2.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction)

Μια δυναμική μέθοδος για την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων DNA, διαφορετική από την κλωνοποίηση και την αναπαραγωγή μέσω του κυττάρου ξενιστή, είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η διαδικασία αυτή γίνεται εξ ολοκλήρου *in vitro*. Αν και η αρχή της μεθόδου είχε περιγραφεί από τις αρχές της δεκαετίας του 1970, η ανακάλυψη των θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών και η αυτοματοποίηση της μεθόδου από τον Kary Mullis, που του απέδωσε το βραβείο Nobel Χημείας το 1993, οδήγησαν στην εδραίωση της PCR ως ένα από τα πλέον χρήσιμα εργαλεία στο χώρο της Μοριακής Βιολογίας.

Η μέθοδος βασίζεται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους πολυμερισμού του DNA με τη βοήθεια μιας DNA πολυμεράσης και δύο ειδικών μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητών), τα οποία καθορίζουν τα όρια του τμήματος DNA που θα πολλαπλασιαστεί. Η αντίδραση πολυμερισμού απαιτεί την παρουσία τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και ιόντων Mg^{2+} .

Κάθε κύκλος πολυμερισμού αποτελείται από τα εξής κύρια βήματα: α) αποδιάταξη του DNA-μήτρα, β) υβριδισμό, πρόσδεση (annealing) των ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών (primers) με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA, γ) επιμήκυνση, πολυμερισμό του κάθε υβριδίου μεταξύ εκκινητή και συμπληρωματικής αλυσίδας DNA με τη δράση του ενζύμου Taq DNA πολυμεράση.

Για την PCR χρησιμοποιήθηκε η Taq DNA πολυμεράση, που έχει απομονωθεί από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus* (Saiki et al. 1988) και επιτρέπει τη χρησιμοποίηση υψηλών θερμοκρασιών στα βήματα υβριδισμού και επιμήκυνσης. Χάρη σε αυτό το ένζυμο υπάρχει η δυνατότητα αυτοματοποίησης της διαδικασίας και βελτιώνεται η απόδοση της αντίδρασης τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά.

Κατά το σχεδιασμό κάθε ζεύγους εκκινητών πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν να έχουν παρόμοιο σημείο τήξης (T_m), η αλληλουχία των βάσεων τους να μην επιτρέπει τη δημιουργία εσωτερικών δευτεροταγών δομών, καθώς επίσης να μην υπάρχει συμπληρωματικότητα μεταξύ των εκκινητών για να αποφεύγεται ο μεταξύ τους υβριδισμός.

Ο υπολογισμός του σημείου τήξεως έγινε με βάση τον τύπο :

$$T_m = 4(G+C) + 2(T+A)$$

Για την αντίδραση PCR εφαρμόστηκαν οι παρακάτω συνθήκες: αρχική αποδιάταξη στους $94^{\circ}C$ για 10min και για 35 κύκλους αποδιάταξη στους $94^{\circ}C$ για 1min, υβριδισμός εκκινητών στους $58^{\circ}C$ για 1min, σύμφωνα με το T_m του ζεύγους

εκκινητών, επιμήκυνση στους 72°C για 1min και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10min.

Σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου errendorf όγκου 0,5 ml προσθέτουμε 100ng DNA, 20-30 pmoles από κάθε εκκινητή, 10μM από το μίγμα των τεσσάρων dNTPs, 1,5-2,5 mM από το διάλυμα του MgCl₂, 1,5-2U Taq DNA πολυμεράση και 1/10 του όγκου της αντίδρασης PCR ρυθμιστικό διάλυμα 10X. Συμπληρώνουμε, τέλος, με απεσταγμένο νερό μέχρι τον όγκο των 25λ. Στη συνέχεια, τα σωληνάρια τύπου errendorf, που περιέχουν τα αντιδραστήρια, τοποθετούνται στο μηχάνημα της PCR για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση του πολυμερισμού.

Ακολουθεί ο πίνακας (πίνακας 6) με τις αλληλουχίες των εκκινητών, την θερμοκρασία υβριδισμού τους, που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές διαδικασίες και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της αντίδρασης PCR.

Πίνακας 6. Αλληλουχίες των εκκινητών, θερμοκρασία υβριδισμού του ζεύγους εκκινητών και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της αντίδρασης PCR

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ PCR
GSTM1	<u>Forward:</u> 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3'	58 ⁰ C	219bp
	<u>Reverse:</u> 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG- 3'		

3.2.3 ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Η επιλογή των εκκινητών έγινε από την βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που προτείνει ο Kim SH στην εργασία του το 2007, με απόλυτη επιτυχία (Sung Hoon Kim et al., 2007).

3.2.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Μετά το πέρας της PCR ελέγχουμε την απόδοση της με την ηλεκτροφόρηση του 1/10 του όγκου της αντίδρασης στο κατάλληλο πήκτωμα αγαρόζης.

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθαρισμό τμημάτων DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η τεχνική είναι απλή, γρήγορη και ικανή να διαχωρίζει μίγματα τμημάτων DNA που δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες τεχνικές. Επιπλέον, η θέση του DNA στο πήκτωμα μπορεί να προσδιοριστεί άμεσα, αφού οι ζώνες DNA χρωματίζονται με μικρή συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου (φθορίζουσα χρωστική που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA) και έτσι με υπεριώδη ακτινοβολία μπορούμε να δούμε ακόμα και 1ng DNA.

Η ηλεκτροφορητική ικανότητα του DNA εξαρτάται: από το μέγεθός του, τη συγκέντρωση της αгарόζης, την στερεοδιάταξη του DNA και την ένταση του ρεύματος. Για την ηλεκτροφόρηση χρειάζεται να παρασκευαστούν: το ρυθμιστικό διάλυμα TBE, που θα τοποθετηθεί στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αгарόζης καθώς και να προετοιμαστούν τα δείγματα που θα φορτωθούν στο πήκτωμα.

Για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος 1x TBE χρησιμοποιήθηκαν 100 ml TBE 10x και 900ml απιονισμένου νερού για τελικό όγκο 1l.

Για την παρασκευή πηκτώματος αгарόζης χρειάστηκαν 100ml ρυθμιστικού διαλύματος 1x TBE για εκμαγείο cm x cm στο οποίο προστέθηκαν 3gr αгарόζης. Θερμαίναμε ανακινώντας το διάλυμα ώσπου να διαλυθεί πλήρως η αгарόζη. Τέλος, προστέθηκαν 10ml βρωμιούχου αιθιδίου 10mg/ml. Το μίγμα τοποθετήθηκε προσεκτικά στο εκμαγείο, καθώς και η ειδική “χτένα” για να δημιουργηθούν οι θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων.

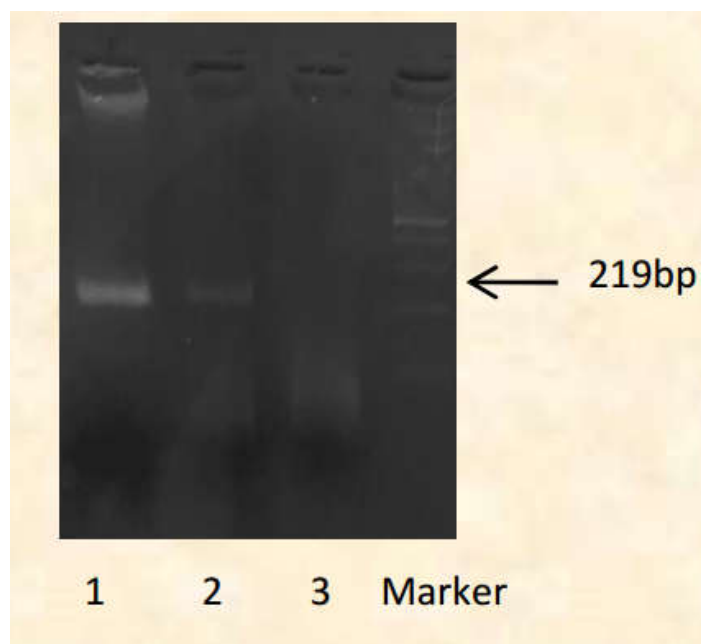
Για την παρασκευή της ποσότητας των δειγμάτων, που φορτώθηκαν σε κατάλληλες θέσεις στο πήκτωμα αгарόζης, χρησιμοποιήθηκαν 6μl του υπό μελέτη δείγματος αναμεμιγμένο με 4μl πυκνής χρωστικής Bromophenol Blue. Για τον έλεγχο του μεγέθους των προϊόντων PCR που μελετούσαμε κάθε φορά, χρησιμοποιήθηκε 100bp μάρτυρας. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε gel αгарόζης περιεκτικότητας 3% με βάση το μέγεθος του τμήματος DNA που θέλαμε να διαχωρίσουμε.

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των τμημάτων DNA που περιείχαν την υπό μελέτη περιοχή, ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία ή όχι του γονιδίου *GSTM1* και στη συνέχεια να αναγνωριστεί και το μέγεθός τους στην πρώτη περίπτωση. Η παρουσία του αλληλόμορφου *GSTM1* παρουσιάστηκε ως θραύσμα 219bp, ενώ αν το υποκείμενο της μελέτης είναι μηδενικό για το γονίδιο, δεν υπάρχει κανένα προϊόν PCR. (εικόνα 10)

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης 3% με βάση το μέγεθος του τμήματος DNA που θέλαμε να διαχωρίσουμε. Για τον έλεγχο του μεγέθους των προϊόντων PCR που μελετούσαμε κάθε φορά, χρησιμοποιήθηκε 100bp μάρτυρας.



Εικόνα 10. Απεικόνιση των μεγεθών του τμήματος DNA, που ενισχύθηκε με PCR, σε πήκτωμα αγαρόζης, συγκρινόμενα με μάρτυρα των 100 bp (marker). Τα δείγματα 1 και 2 παρουσιάζουν το αλληλόμορφο GSTM1 ως θραύσμα 219bp, ενώ στο δείγμα 3 απουσιάζει το γονίδιο.

4.2 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τη στατιστική ανάλυση, έγινε συσχετισμός του γονιδίου *GSTM1* με ποσοτικές μεταβλητές (ηλικία, διάρκεια κύκλου, αριθμός κυήσεων) και ποιοτικές μεταβλητές (εκπαίδευση, οικογενειακή κατάσταση, πυελικός πόνος), καθώς και με παραμέτρους που παρουσιάζονται στο ερωτηματολόγιο αξιολόγησης της ποιότητας ζωής της ασθενούς με ενδομητρίωση (The Endometriosis Health Profile Questionnaire (EHP 30)) και στο ερωτηματολόγιο που διερευνά τις παραμέτρους της σεξουαλικής λειτουργίας, βασισμένο στο Sexual Satisfaction Subscale of the Derogatis Sexual Functioning Inventory (DSFI) (Derogatis LR 1979), όπως τροποποιήθηκε από τους Ferrero et al (Simone Ferrero 2005) και συμπληρώνεται από τον Global Sexual Satisfaction Index (GSSI). Ακολουθούν τα στατιστικά κριτήρια (tests) που εφαρμόστηκαν.

- Ελέγχοντας το συσχετισμό των ποσοτικών μεταβλητών (ηλικία, διάρκεια κύκλου, ...SEX15) με την έκφραση ή μη του γονιδίου, εφαρμόσαμε το μη παραμετρικό τεστ **Mann-Whitney U test**.

Η δοκιμή Mann-Whitney U (που ονομάζεται επίσης δοκιμασία Mann-Whitney-Wilcoxon (MWW), Wilcoxon, ή Wilcoxon-Mann-Whitney) είναι μια μη παραμετρική δοκιμασία, της μηδενικής υπόθεσης ότι είναι εξίσου πιθανό μια τυχαία επιλεγμένη τιμή από ένα δείγμα να είναι μικρότερη ή μεγαλύτερη από μια τυχαία επιλεγμένη τιμή από ένα δεύτερο δείγμα. Η δοκιμή Mann-Whitney U χρησιμοποιείται για να συγκρίνει τις διαφορές μεταξύ δύο ανεξάρτητων ομάδων, όταν η εξαρτημένη μεταβλητή είναι είτε κανονική είτε συνεχής αλλά όχι κανονικά κατανομημένη. Η δοκιμή Mann-Whitney U θεωρείται συχνά η μη-παραμετρική εναλλακτική λύση της ανεξάρτητης t-δοκιμής, αφού δεν απαιτεί την παραδοχή των κανονικών κατανομών.

Σε αντίθεση με το t-test ανεξάρτητων δειγμάτων, η δοκιμή Mann-Whitney U μας επιτρέπει να καταλήξουμε σε διαφορετικά συμπεράσματα σχετικά με τα δεδομένα μας, ανάλογα με τις υποθέσεις που κάνουμε σχετικά με τη διανομή τους. Αυτά τα συμπεράσματα εξαρτώνται από το σχήμα των κατανομών των δεδομένων μας (<https://statistics.laerd.com/spss-tutorials/mann-whitney-u-test-using-spss-statistics.php>).

Η στατιστική ανάλυση έγινε στο λογισμικό SPSS version 19. Ως κατώφλι στατιστικής σημαντικότητας χρησιμοποιήθηκε η στάθμη του 5%. Ακολουθεί πίνακας με τα αποτελέσματα (πίνακας 7).

Πίνακας 7. Συσχετισμός των ποσοτικών μεταβλητών με την έκφραση ή μη του γονιδίου *GSTM1*

	GSTM1	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	P-VALUE
ΗΛΙΚΙΑ	OXI	10	31.10	5.043	1.595	.083
	NAI	17	35.00	5.990	1.453	
ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΚΥΚΛΟΥ	OXI	10	26.90	2.807	.888	.726
	NAI	16	26.63	1.668	.417	
ΔΙΑΡΚΕΙΑ Ε.Ρ	OXI	10	5.60	1.174	.371	.617
	NAI	16	5.44	1.315	.329	
ΗΛΙΚΙΑ ΕΜΜΗΝΑΡΧΗΣ	OXI	10	12.15	1.599	.506	.200
	NAI	15	12.67	1.345	.347	
ΚΥΗΣΕΙΣ	OXI	10	.10	.316	.100	.226
	NAI	17	.47	.874	.212	
ΗΛΙΚΙΑ ΠΡΩΤΟΥ ΚΥΗΣΗΣ	OXI	10	3.00	9.487	3.000	.444
	NAI	16	6.38	11.442	2.860	
ΗΛΙΚΙΑ ΠΡΩΤΟΥ ΤΟΚΕΤΟΥ	OXI	10	3.00	9.487	3.000	.399
	NAI	16	7.00	12.780	3.195	
VAS ΧΡ.ΠΥΕΛ ΠΟΝΟΥ	OXI	10	5.45	3.989	1.262	.953
	NAI	14	5.68	3.428	.916	
VAS ΣΤΟ ΣΕΞ	OXI	8	4.00	3.665	1.296	.623
	NAI	14	3.04	3.478	.929	
ΗΛΙΚΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗΣ	OXI	10	29.10	5.384	1.703	.127
	NAI	13	32.62	6.475	1.796	
ΗΛΙΚΙΑ ΕΝΑΡΞΗΣ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΩΝ	OXI	10	19.00	13.573	4.292	.044
	NAI	9	29.67	6.595	2.198	
ΕΗΡ 30-1	OXI	9	.67	1.118	.373	.924
	NAI	17	.53	.800	.194	
ΕΗΡ 30-2	OXI	9	1.00	1.000	.333	.252
	NAI	16	.63	.957	.239	
ΕΗΡ 30-3	OXI	9	1.33	1.118	.373	.122
	NAI	16	.75	1.183	.296	
ΕΗΡ 30-4	OXI	9	1.11	1.269	.423	.080
	NAI	16	.44	.814	.203	
ΕΗΡ 30-5	OXI	9	1.00	.707	.236	.149
	NAI	16	.63	.885	.221	
ΕΗΡ 30-6	OXI	9	1.33	1.000	.333	.196
	NAI	16	.81	1.047	.262	
ΕΗΡ 30-7	OXI	9	.44	1.014	.338	.371
	NAI	16	.63	.806	.202	
ΕΗΡ 30-8	OXI	9	.78	1.093	.364	.782
	NAI	16	.94	1.237	.309	

EHP 30-9	OXI	9	1.22	.972	.324	.722
	NAI	16	1.19	1.377	.344	
EHP 30-10	OXI	9	1.00	1.118	.373	.712
	NAI	16	.88	1.147	.287	
EHP 30-11	OXI	9	1.11	1.269	.423	.529
	NAI	16	.88	1.310	.328	
EHP 30-12	OXI	9	1.33	.707	.236	.596
	NAI	16	1.25	1.291	.323	
EHP 30-13	OXI	9	1.44	1.590	.530	.695
	NAI	16	1.19	1.471	.368	
EHP 30-14	OXI	9	1.22	1.563	.521	.798
	NAI	16	1.06	1.652	.413	
EHP 30-15	OXI	9	1.11	1.269	.423	.601
	NAI	16	.88	1.147	.287	
EHP 30-16	OXI	9	1.11	1.269	.423	.928
	NAI	16	1.06	1.289	.322	
EHP 30-17	OXI	9	1.00	1.323	.441	.925
	NAI	16	.94	1.340	.335	
EHP 30-18	OXI	9	.89	1.167	.389	.900
	NAI	16	.81	1.109	.277	
EHP 30-19	OXI	9	1.11	1.167	.389	.719
	NAI	16	1.00	1.155	.289	
EHP 30-20	OXI	9	.78	.972	.324	.585
	NAI	16	1.00	1.033	.258	
EHP 30-21	OXI	9	1.56	.882	.294	.538
	NAI	16	1.88	1.310	.328	
EHP 30-22	OXI	9	1.33	.866	.289	.423
	NAI	16	1.75	1.125	.281	
EHP 30-23	OXI	9	.56	.726	.242	.772
	NAI	16	.81	1.109	.277	
EHP 30-24	OXI	9	.67	1.118	.373	.127
	NAI	16	1.38	1.147	.287	
EHP 30-25	OXI	9	1.00	1.118	.373	.348
	NAI	16	1.56	1.413	.353	
EHP 30-26	OXI	9	1.11	1.167	.389	.617
	NAI	16	1.44	1.365	.341	
EHP 30-27	OXI	9	.44	.882	.294	.306
	NAI	16	.88	1.204	.301	
EHP 30-28	OXI	9	1.00	1.118	.373	.511
	NAI	16	.81	1.276	.319	
EHP 30-29	OXI	9	.89	1.167	.389	.676
	NAI	16	.69	1.078	.270	
EHP 30-30	OXI	9	1.00	1.118	.373	.928
	NAI	16	1.00	1.211	.303	
SEX 1	OXI	8	5.00	.926	.327	.772

	NAI	15	5.07	.961	.248	
SEX 2	OXI	8	2.63	1.598	.565	.868
	NAI	15	2.73	1.580	.408	
SEX 3	OXI	8	2.63	1.188	.420	.095
	NAI	15	1.93	1.486	.384	
SEX 4	OXI	8	5.13	1.356	.479	.779
	NAI	15	4.93	1.534	.396	
SEX 5	OXI	8	2.00	1.309	.463	.460
	NAI	15	1.67	1.234	.319	
SEX 6	OXI	8	1.25	.707	.250	.167
	NAI	15	1.60	.828	.214	
SEX 7	OXI	8	4.25	1.581	.559	.073
	NAI	15	5.33	.976	.252	
SEX 8	OXI	8	5.13	1.356	.479	.151
	NAI	15	5.73	.594	.153	
SEX 9	OXI	8	2.75	2.252	.796	.443
	NAI	15	3.40	1.882	.486	
SEX 10	OXI	8	4.50	3.703	1.309	.974
	NAI	15	4.37	3.026	.781	
SEX 11	OXI	7	1.71	.951	.360	.214
	NAI	13	2.38	1.044	.290	
SEX 12	OXI	8	1.13	.354	.125	.122
	NAI	15	2.47	1.922	.496	
SEX 13	OXI	8	1.63	.916	.324	.398
	NAI	14	2.71	2.199	.588	
SEX 14	OXI	8	2.00	1.690	.598	.413
	NAI	15	2.73	2.017	.521	
SEX 15	OXI	8	6.00	1.069	.378	.504
	NAI	15	6.20	1.320	.341	

- Για το συσχετισμό των ποιοτικών μεταβλητών (εκπαίδευση, οικογενειακή κατάσταση....) με το γονίδιο, καθώς και για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ ασθενών και μαρτύρων, εφαρμόστηκε ο ακριβής έλεγχος κατά Fisher (**Fisher's exact test**).

Ο ακριβής έλεγχος κατά Fisher χρησιμοποιείται όταν έχουμε δύο ποιοτικές μεταβλητές και θέλουμε να δούμε αν οι αναλογίες της μιας μεταβλητής διαφέρουν, ανάλογα με την τιμή της άλλης μεταβλητής. Η ακριβής δοκιμασία του Fisher προτιμάται από τη δοκιμή chi-square ή τη δοκιμή G της ανεξαρτησίας όταν οι υπό μελέτη αριθμοί είναι μικροί (<http://www.biostathandbook.com/fishers.html>).

Η στατιστική ανάλυση έγινε στο λογισμικό SPSS version 19. Ως κατώφλι στατιστικής σημαντικότητας χρησιμοποιήθηκε η στάθμη του 5%. Ακολουθούν οι πίνακες με τα αποτελέσματα (πίνακες 8-19).

Πίνακας 8. Συσχετισμός των ασθενών και των μαρτύρων για την έκφραση ή μη του γονιδίου *GSTM1*

	controls	cases
ΝΑΙ	40 (81,6%)	19 (65,5%)
ΟΧΙ	9 (18,4%)	10 (34,5%)
p-value	0.171	

Πίνακας 9. Συσχετισμός της εκπαίδευσης με την έκφραση ή μη του γονιδίου *GSTM1*

Crosstab					
			ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ		Total
			ΛΥΚΕΙΟ	ΑΝΩΤΕΡΗ	
GSTM1	OXI	Count	1	9	10
		% within GSTM1	10,0%	90,0%	100,0%
		% within ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ	16,7%	42,9%	37,0%
	NAI	Count	5	12	17
		% within GSTM1	29,4%	70,6%	100,0%
		% within ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ	83,3%	57,1%	63,0%
Total		Count	6	21	27
		% within GSTM1	22,2%	77,8%	100,0%
		% within ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ	100,0%	100,0%	100,0%

p-value: 0.363

Πίνακας 10. Συσχετισμός της οικογενειακής κατάστασης με την έκφραση ή μη του γονιδίου *GSTM1*

Crosstab						
			ΟΙΚΟΓΕΝΙΑΚΗ ΚΑΤ			Total
			ΑΓΓΑΜΗ	ΕΓΓΑΜΗ	ΧΗΡΑ	
GSTM1	OXI	Count	7	3	0	10
		% within GSTM1	70,0%	30,0%	,0%	100,0%
		% within ΟΙΚΟΓΕΝΙΑΚΗ ΚΑΤ	46,7%	27,3%	,0%	37,0%
	NAI	Count	8	8	1	17
		% within GSTM1	47,1%	47,1%	5,9%	100,0%
		% within ΟΙΚΟΓΕΝΙΑΚΗ ΚΑΤ	53,3%	72,7%	100,0%	63,0%
Total	Count	15	11	1	27	
	% within GSTM1	55,6%	40,7%	3,7%	100,0%	
	% within ΟΙΚΟΓΕΝΙΑΚΗ ΚΑΤ	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

p-value: 0.642

Πίνακας 11. Συσχετισμός των αυτόματων εκτρώσεων με την έκφραση ή μη του γονιδίου *GSTM1*

Crosstab					
			AE		Total
			OXI	NAI	
GSTM1	OXI	Count	10	0	10
		% within GSTM1	100,0%	,0%	100,0%
		% within AE	38,5%	,0%	37,0%
	NAI	Count	16	1	17
		% within GSTM1	94,1%	5,9%	100,0%
		% within AE	61,5%	100,0%	63,0%
Total	Count	26	1	27	
	% within GSTM1	96,3%	3,7%	100,0%	
	% within AE	100,0%	100,0%	100,0%	

p-value: 1

Πίνακας 12. Συσχετισμός των τεχνιτών εκτρώσεων με την έκφραση ή μη του γονιδίου *GSTM1*

Crosstab					
			TE		Total
			OXI	NAI	
GSTM1	OXI	Count	10	0	10
		% within GSTM1	100,0%	,0%	100,0%
		% within TE	38,5%	,0%	37,0%
	NAI	Count	16	1	17
		% within GSTM1	94,1%	5,9%	100,0%
		% within TE	61,5%	100,0%	63,0%
Total	Count	26	1	27	
	% within GSTM1	96,3%	3,7%	100,0%	
	% within TE	100,0%	100,0%	100,0%	

p-value: 1

Πίνακας 13. Συσχετισμός του φυσιολογικού τοκετού με την έκφραση ή μη του γονιδίου *GSTM1*

Crosstab					
			ΦT		Total
			OXI	NAI	
GSTM1	OXI	Count	9	1	10
		% within GSTM1	90,0%	10,0%	100,0%
		% within ΦT	40,9%	25,0%	38,5%
	NAI	Count	13	3	16
		% within GSTM1	81,3%	18,8%	100,0%
		% within ΦT	59,1%	75,0%	61,5%
Total	Count	22	4	26	
	% within GSTM1	84,6%	15,4%	100,0%	
	% within ΦT	100,0%	100,0%	100,0%	

p-value: 1

Πίνακας 14. Συσχετισμός της καισαρικής τομής με την έκφραση ή μη του γονιδίου *GSTM1*

Crosstab					
			KT		Total
			OXI	NAI	
GSTM1	OXI	Count	10	0	10
		% within GSTM1	100,0%	,0%	100,0%
		% within KT	41,7%	,0%	38,5%
	NAI	Count	14	2	16
		% within GSTM1	87,5%	12,5%	100,0%
		% within KT	58,3%	100,0%	61,5%
Total	Count	24	2	26	
	% within GSTM1	92,3%	7,7%	100,0%	
	% within KT	100,0%	100,0%	100,0%	

p-value: 0.508

Πίνακας 15. Συσχετισμός του πυελικού πόνου με την έκφραση ή μη του γονιδίου *GSTM1*

Crosstab					
			ΠΥΕΛΙΚΟΣ ΠΟΝΟΣ		Total
			OXI	NAI	
GSTM1	OXI	Count	3	7	10
		% within GSTM1	30,0%	70,0%	100,0%
		% within ΠΥΕΛΙΚΟΣ ΠΟΝΟΣ	50,0%	36,8%	40,0%
	NAI	Count	3	12	15
		% within GSTM1	20,0%	80,0%	100,0%
		% within ΠΥΕΛΙΚΟΣ ΠΟΝΟΣ	50,0%	63,2%	60,0%
Total	Count	6	19	25	
	% within GSTM1	24,0%	76,0%	100,0%	
	% within ΠΥΕΛΙΚΟΣ ΠΟΝΟΣ	100,0%	100,0%	100,0%	

p-value: 0.653

Πίνακας 16. Συσχετισμός της δυσμηνόρροιας με την έκφραση ή μη του γονιδίου *GSTM1*

Crosstab

			ΔΥΣΜΗΝΟΡΡΟΙΑ		Total
			ΟΧΙ	ΝΑΙ	
GSTM1	ΟΧΙ	Count	4	6	10
		% within GSTM1	40,0%	60,0%	100,0%
		% within ΔΥΣΜΗΝΟΡΡΟΙΑ	44,4%	40,0%	41,7%
	ΝΑΙ	Count	5	9	14
		% within GSTM1	35,7%	64,3%	100,0%
		% within ΔΥΣΜΗΝΟΡΡΟΙΑ	55,6%	60,0%	58,3%
Total	Count	9	15	24	
	% within GSTM1	37,5%	62,5%	100,0%	
	% within ΔΥΣΜΗΝΟΡΡΟΙΑ	100,0%	100,0%	100,0%	

p-value: 1

Πίνακας 17. Συσχετισμός του μη κυκλικού πόνου με την έκφραση ή μη του γονιδίου *GSTM1*

Crosstab

			ΜΗ ΚΥΚΛΙΚΟΣ		Total
			OXI	NAI	
GSTM1	OXI	Count	8	1	9
		% within GSTM1	88,9%	11,1%	100,0%
		% within ΜΗ ΚΥΚΛΙΚΟΣ	38,1%	50,0%	39,1%
	NAI	Count	13	1	14
		% within GSTM1	92,9%	7,1%	100,0%
		% within ΜΗ ΚΥΚΛΙΚΟΣ	61,9%	50,0%	60,9%
Total	Count	21	2	23	
	% within GSTM1	91,3%	8,7%	100,0%	
	% within ΜΗ ΚΥΚΛΙΚΟΣ	100,0%	100,0%	100,0%	

p-value: 1

Πίνακας 18. Συσχετισμός της ωορρηξίας με την έκφραση ή μη του γονιδίου *GSTM1*

Crosstab					
			ΩΟΡΡΗΞΙΑΣ		Total
			OXI	NAI	
GSTM1	OXI	Count	7	2	9
		% within GSTM1	77,8%	22,2%	100,0%
		% within ΩΟΡΡΗΞΙΑΣ	36,8%	50,0%	39,1%
	NAI	Count	12	2	14
		% within GSTM1	85,7%	14,3%	100,0%
		% within ΩΟΡΡΗΞΙΑΣ	63,2%	50,0%	60,9%
Total	Count	19	4	23	
	% within GSTM1	82,6%	17,4%	100,0%	
	% within ΩΟΡΡΗΞΙΑΣ	100,0%	100,0%	100,0%	

p-value: 1

Πίνακας 19. Συσχετισμός του πόνου στο σεξ με την έκφραση ή μη του γονιδίου *GSTM1*

Crosstab					
			ΠΟΝΟΣ ΣΤΟ ΣΕΞ		Total
			OXI	NAI	
GSTM1	OXI	Count	4	5	9
		% within GSTM1	44,4%	55,6%	100,0%
		% within ΠΟΝΟΣ ΣΤΟ ΣΕΞ	28,6%	50,0%	37,5%
	NAI	Count	10	5	15
		% within GSTM1	66,7%	33,3%	100,0%
		% within ΠΟΝΟΣ ΣΤΟ ΣΕΞ	71,4%	50,0%	62,5%
Total	Count	14	10	24	
	% within GSTM1	58,3%	41,7%	100,0%	
	% within ΠΟΝΟΣ ΣΤΟ ΣΕΞ	100,0%	100,0%	100,0%	

p-value: 0.403

Από τις παραπάνω στατιστικές δοκιμές προέκυψε ότι το 34,5% των περιπτώσεων ενδομητρίωσης έχουν σε ομοζυγωτία την απουσία του αλληλόμορφου σε αντίθεση με το 18,4% των μαρτύρων ($p\text{-value}=0.171$, 95% CI, $p = 0,171$). Ακόμη, η απουσία αλληλόμορφου φαίνεται να έχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων ($p = 0,044$). Επιπλέον, όταν μελετήθηκε το δείγμα αίματος και ο ενδομητριωσικός ιστός από την ίδια γυναίκα για την παρουσία του αλληλόμορφου, βρέθηκε σε 10 από τις 29 γυναίκες διαφορετικός γονότυπος.

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ενδομητρίωση φαίνεται να είναι μια διαταραχή που εξαρτάται από τα οιστρογόνα, καθώς τα οιστρογόνα και οι υποδοχείς τους έχουν βασικό ρόλο στην παθογένεση αυτής της νόσου, όπως και γενετικές ανωμαλίες, ανοσοποιητικοί, περιβαλλοντικοί και ορμονικοί παράγοντες μπορούν επίσης να συμβάλουν στην εμφάνισή της. Οι πολυμορφισμοί και οι σχετικοί με τους υποδοχείς οιστρογόνων γονότυποι μπορεί να επηρεάσουν το φύλο-στεροειδές σύστημα τόσο στο επίπεδο του υποδοχέα όσο και στη σύνθεση των ορμονών. Επιπροσθέτως, η παραγωγή οιστρογόνων παίζει έναν ουσιαστικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ενδομητρίωσης με την ενίσχυση της επιβίωσης του ενδομητριωσικού ιστού και μετριάζοντας τον πυελικό πόνο και την υπογονιμότητα με προσταγλανδίνες και κυτοκίνες. Ο μηχανισμός της ενδομητρίωσης μιμείται επίσης τον καρκίνο εξαιτίας της ικανότητας ενδομητρικών κυττάρων να εισβάλλουν στους περιβάλλοντες ιστούς, να προάγουν την αγγειογένεση και να αποφεύγουν την απόπτωση, που ευνοεί την επιβίωση του νεοσχηματισθέντος ενδομητριωσικού ιστού.

Η παρουσία πολυμορφισμών στα γονίδια GST και η σχέση τους με τον κίνδυνο εμφάνισης διαφορετικών ασθενειών έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον για μελέτη της συσχέτισης αυτής με την ενδομητρίωση. Δύο από τους πιο ευρέως μελετημένους πολυμορφισμούς είναι οι *GSTM1* και *GSTT1*, που χαρακτηρίζονται από απουσία των αντίστοιχων γονιδίων σε ομοζυγωτία. Η πρώτη μελέτη που αφορά τέτοιο γονότυπο για το *GSTM1* ως παράγοντα κινδύνου για την ενδομητρίωση, διεξήχθη από τον Baranov και τους συνεργάτες το 1996 (Baranov VS et al., 1996). Από τότε έχουν γίνει πολλές μελέτες που διερευνούν αν υπάρχει συσχέτιση της απουσίας του *GSTM1* και της ενδομητρίωσης, τα αποτελέσματα, όμως, είναι αρκετά διφορούμενα.

Ο Baranov το 1996 και ο Baranova το 1997 με τους συνεργάτες τους βρήκαν θετική συσχέτιση της απουσίας του γονιδίου με την εμφάνιση ενδομητρίωσης (Baranova H et al., 1997). Ομοίως, λίγο αργότερα το 2003 ο Jun και η ομάδα του βρήκαν μια

σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δύο (72,1% μηδενικός γονότυπος στην ενδομητρίωση έναντι 42,9% στους μάρτυρες).

Αντίθετα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν από τον Hur και τους συνεργάτες, οι οποίοι συμπεριέλαβαν στη μελέτη τους 194 γυναίκες από την Κορέα με ενδομητρίωση, που επιβεβαιώθηκαν με λαπαροσκόπηση και 259 μάρτυρες χωρίς την ασθένεια και δεν βρήκαν συσχέτισμό μεταξύ του πολυμορφισμού *GSTM1* και ενδομητρίωσης (57.7% στις γυναίκες με ενδομητρίωση έναντι 56% στους μάρτυρες) (Hur SE et al., 2004). Άλλη μια έρευνα που έγινε με γυναίκες από την Κορέα, από τον Kim SH το 2007, κατέληξε στα ίδια συμπεράσματα (57.9% versus 57.0%, $P = 0.865$, OR: 0.97, 95% CI: 0.69–1.35) (Sung Hoon Kim et al., 2007). Τέλος, πρόσφατα ο Frare και οι συνεργάτες του το 2013, ανίχνευσαν μεγαλύτερη απουσία *GSTM1* σε γυναίκες με ενδομητρίωση (61%), ενώ η ομάδα ελέγχου εμφάνισε μεγαλύτερη παρουσία του αντίστοιχου πολυμορφισμού, συμπεραίνοντας ότι το *GSTM1* δεν σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό της ενδομητρίωσης (A.B. Frare, et al., 2013). Στην παρούσα διπλωματική εργασία τα αποτελέσματα συμφωνούν με τις παραπάνω έρευνες μιας και βρέθηκε ότι το 34,5% των περιπτώσεων ενδομητρίωσης έχουν σε ομοζυγωτία την απουσία του αλληλόμορφου σε αντίθεση με το 18,4% των μαρτύρων, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά ($p\text{-value}=0.171$, 95% CI, $p = 0,171$).

Ενδιαφέροντα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν σε μια μετα-ανάλυση, που έγινε το 2014 από τον Zhu H. και τους συνεργάτες, όπου συμπεριέλαβαν 25 μελέτες με 3330 περιστατικά ασθενών και 3959 μάρτυρες. Η μετα-ανάλυση κατέληξε στην ύπαρξη σημαντικής συσχέτισης του πολυμορφισμού με την εμφάνιση αυξημένου κινδύνου για ενδομητρίωση (OR = 1.54, 95% CI: 1.30–1.83, $P<0.001$). Ο μεγάλος αριθμός μελετών και υποκειμένων που περιλαμβάνονται σε αυτή τη μετα-ανάλυση ήταν καθοριστικά για την επίλυση των συγκρουόμενων αποτελεσμάτων που προέκυψαν στις μεμονωμένες μελέτες, κυρίως λόγω του μικρού μεγέθους δείγματος. Επιπλέον, σε ανάλυση υποομάδων ανά εθνικότητα φάνηκε ότι υπάρχει συσχέτισμός του πολυμορφισμού με τη νόσο, τόσο στους Ευρωπαίους όσο και στους Ασιάτες (Haili Zhu et al., 2014). Μια ακόμη μετα-ανάλυση που έγινε λίγο νωρίτερα, το 2005, από τον Guo, έδειξε ότι, ενώ η απουσία του *GSTM1* δεν επηρεάζει την εμφάνιση της ενδομητρίωσης, αν μελετηθεί σε σχέση με την παρουσία/απουσία ενός άλλου

γονιδίου της οικογένειας των GST, το *GSTT1*, αυξάνεται σημαντικά η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου, το οποίο επιβεβαιώθηκε και από την μετα-ανάλυση του Zhu H. αργότερα (Guo SW., 2005).

Ένα ακόμη εύρημα από την μελέτη μας ήταν ο διαφορετικός γονότυπος σε 10 από τις 29 γυναίκες, όταν μελετήθηκε το δείγμα αίματος και ο ενδομητριοειδής ιστός, κυρίως ωοθήκη, από την ίδια γυναίκα, για την παρουσία του αλληλόμορφου. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, είναι η πρώτη μελέτη στην οποία ο πολυμορφισμός αυτός ανιχνεύεται σε διαφορετικούς ιστούς, εκτός του αίματος. Μια πιθανή εξήγηση για τα παραπάνω ευρήματα μπορεί να είναι η ύπαρξη κυτταρικών ή γονιδιακών μηχανισμών, που κατά τα πρώιμα εμβρυικά στάδια να καθορίζουν την εξέλιξη ή διατήρηση του γονιδίου. Εναλλακτικά, γνωρίζοντας πως οι περιβαλλοντικοί παράγοντες παίζουν καθοριστικό ρόλο και με το πέρασμα των χρόνων επηρεάζουν τη λειτουργία των κυττάρων, ίσως σε μοριακό επίπεδο να υπάρχουν μηχανισμοί, όπως μια μεθυλίωση ή ακετυλίωση, που καθορίζουν αυτόν τον διαφορετικό γονότυπο σε διαφορετικούς ιστούς στις γυναίκες. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τις παραπάνω υποθέσεις και το θέμα χρήζει επιπλέον διερεύνησης.

Η δημιουργία ενός γενετικού προφίλ μπορεί να βελτιώσει την πρόβλεψη της επανεμφάνισης των ενδομητριοειδών εστιών και η σύνδεση του πολυμορφισμού με τα κλινικά χαρακτηριστικά μπορούν να βοηθήσουν τους κλινικούς γιατρούς να συμβουλέψουν και να οργανώσουν μια θεραπευτική τακτική για τους ασθενείς με ενδομητρίωση.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας μπορούν να ισχυροποιηθούν με τον έλεγχο μεγαλύτερου αριθμού κλινικά υπόπτων δειγμάτων καθώς και φυσιολογικών γυναικών.

Τα στοιχεία στη διεθνή βιβλιογραφία για τον εν λόγω πολυμορφισμό είναι περιορισμένα και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για το λειτουργικό χαρακτηρισμό του.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- A.B. Frare, A.M. Barbosa, I.R. Costa et al.: GSTM1 and GSTT1 polymorphisms in endometriosis in women from Goiás, Brazil. *Genet. Mol. Res.* 12 (3): 2764-2770 (2013).
- Abrao MS, Goncalves MO, Dias JA Jr et al.: Comparison between clinical examination, transvaginal sonography and magnetic resonance imaging for the diagnosis of deep endometriosis, *Hum Reprod* 22:3092–3097, 2007.
- Adamson GD et al.: Creating solutions in endometriosis: global collaboration through the World Endometriosis Research Foundation. *J of Endometriosis* 2010;2(1):3-6.
- Agic A, Djalali S, Diedrich K et al.: Apoptosis in endometriosis, *Gynecol Obstet Invest* 68:217–223, 2009.
- Al-Jefout M, Dezarnaulds G, Cooper M et al.: Diagnosis of endometriosis by detection of nerve fibres in an endometrial biopsy: a double blind study, *Hum Reprod* 24:3019–3024, 2009.
- American FS: Revised American Fertility Society classification of endometriosis:1985, *Fertil Steril* 43:1–2, 1985 Adamson GD, Pasta DJ: Endometriosis fertility index: the new, validated endometriosis staging system, *Fertil Steril* 94:1609–1615, 2010.
- Anaf V, Simon P, El Nakadi I et al.: Hyperalgesia, nerve infiltration and nerve growth factor expression in deep adenomyotic nodules, peritoneal and ovarian endometriosis, *Hum Reprod* 17:1895–1900, 2002.
- Antsiferova Y. S., N. Y. Sotnikova, L. V. Posiseeva et al. (2005): "Changes in the T-helper cytokine profile and in lymphocyte activation at the systemic and local levels in women with endometriosis." *Fertil Steril* 84(6): 1705-1711.
- Ashok Agarwal, Andrew Luu: Understanding the physiology of fertilization, 27 January 2014.
- Attar E., H. Tokunaga, G. Imir et al. (2009): "Prostaglandin E2 Via Steroidogenic Factor-1 Coordinately Regulates Transcription of Steroidogenic

Genes Necessary for Estrogen Synthesis in Endometriosis." *J Clin Endocrinol Metab* 94(2): 623-631.

- Attia G. R., K. Zeitoun, D. Edwards et al. (2000): "Progesterone Receptor Isoform A But Not B Is Expressed in Endometriosis." *J Clin Endocrinol Metab* 85(8): 2897-2902.
- Ballester M, Oppenheimer A, d'Argent EM et al.: Nomogram to predict pregnancy rate after ICSI-IVF cycle in patients with endometriosis, *Hum Reprod* 27:451–456, 2012.
- Baranov VS, Ivaschenko T, Bakay B et al. (1996): Proportion of the GSTM1 0/0 genotype in some Slavic populations and its correlation with cystic fibrosis and some multifactorial diseases. *Hum Genet* 97:516–520.
- Baranova H, Bothorishvili R, Canis M et al. (1997): Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism and susceptibility to endometriosis in a French population. *Mol Hum Reprod* 3,775–780.
- Barcz et al. 2002.
- Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C: Effect of endometriosis on in vitro fertilization, *Fertil Steril* 77:1148–1155, 2002.
- Benaglia L, Somigliana E, Vercellini P et al.: The impact of IVF procedures on endometriosis recurrence, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 148:49–52, 2010.
- Benaglia L, Somigliana E, Vighi V et al.: Rate of severe ovarian damage following surgery for endometriomas, *Hum Reprod* 25:678–682, 2010.
- Bergqvist A, Ferno M: Oestrogen and progesterone receptors in endometriotic tissue and endometrium: comparison of different cycle phases and ages, *Hum Reprod* 8:2211–2217, 1993.
- Bhattacharya S, Porter M, Amalraj E et al.: The epidemiology of infertility in the North East of Scotland, *Hum Reprod* 24:3096–3107, 2009.
- Biacchiardi CP, Piane LD, Camanni M et al.: Laparoscopic stripping of endometriomas negatively affects ovarian function reserve even if performed by experienced surgeons, *Reprod Biomed Online* 23:740–746, 2011.

- Bodri D, Colodron M, Vidal R et al.: Prognostic factors in oocyte donation: an analysis through egg-sharing recipient pairs showing a discordant outcome, *Fertil Steril* 88:1548–1553, 2007.
- Bokor A, Kyama CM, Vercruysse L et al.: Density of small diameter sensory nerve fibres in endometrium: a semi-invasive diagnostic test for minimal to mild endometriosis, *Hum Reprod* 24:3025–3032, 2009.
- Borghese B., J.-D. Chiche, D. Vernerey et al. (2008): "Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinase 12 and 13 genes are implicated in endometriosis progression." *Hum Reprod* 23(5): 1207-1213.
- Botstein D, White RL, Skolnick M et al. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32(3): 314-331.
- Bourlev et al. 2006.
- Brandenberger AW, Lebovic DI, Tee MK et al.: Estrogen receptor (ER)-a and ER-b isoforms in normal endometrial and endometriosis-derived stromal cells, *Mol Hum Reprod* 5:651–655, 1999.
- Braun D. P., J. Ding and W. P. Dmowski (2002): "Peritoneal fluid-mediated enhancement of eutopic and ectopic endometrial cell proliferation is dependent on tumor necrosis factor- α in women with endometriosis." *Fertil Steril* 78(4): 727-732.
- Buck Louis GM, Hediger ML, Peterson CM et al.: Incidence of endometriosis by study population and diagnostic method: the ENDO study, *Fertil Steril* 96:360–365, 2011.
- Bukulmez O., D. B. Hardy, B. R. Carr et al. (2008): "Inflammatory Status Influences Aromatase and Steroid Receptor Expression in Endometriosis." *Endocrinology* 149(3): 1190-1204.
- Bulun S. E. (2009). "Endometriosis." *N Engl J Med* 360(3): 268-279.
- Bulun S. E., Y.-H. Cheng, M. E. Pavone et al. (2010a): "Estrogen Receptor- β , Estrogen Receptor- α , and Progesterone Resistance in Endometriosis." *Semin Reprod Med* 28(01): 036-043.

- Bulun S. E., Y.-H. Cheng, M. E. Pavone et al. (2010b): "17 β Hydroxysteroid Dehydrogenase-2 Deficiency and Progesterone Resistance in Endometriosis." *Semin Reprod Med* 28(01): 044-050.
- Bushnik T, Cook JL, Yuzpe AA et al.: Estimating the prevalence of infertility in Canada, *Hum Reprod* 27:738–746, 2012.
- Canis M, Pouly JL, Tamburro S et al.: Ovarian response during IVFembryo transfer cycles after laparoscopic ovarian cystectomy for endometriotic cysts of >3 cm in diameter, *Hum Reprod* 16:2583– 2586, 2001.
- Cargill M, Altshuler D, Ireland J et al. (1999): Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 22(3): 231-238.
- Chishima F., S. Hayakawa, K. Sugita et al. (2002): "Increased Expression of Cyclooxygenase-2 in Local Lesions of Endometriosis Patients." *Am J Reprod Immunol* 48(1): 50-56.
- Cho S., S. H. Park, Y. S. Choi et al. (2010): "Expression of Cyclooxygenase-2 in Eutopic Endometrium and Ovarian Endometriotic Tissue in Women with Severe Endometriosis." *Gynecol Obstet Invest* 69(2): 93-100.Cobellis et al. 2004).
- Dassen H., C. Punyadeera, R. Kamps et al. (2007): "Estrogen metabolizing enzymes in endometrium and endometriosis." *Hum Reprod* 22(12): 3148-3158.
- De Ziegler D, Gayet V, Aubriot FX et al.: Use of oral contraceptives in women with endometriosis before assisted reproduction treatmentimproves outcomes, *Fertil Steril* 94:2796–2799, 2010.
- Deaton JL, Gibson M, Blackmer KM et al.: A randomized, controlled trial of clomiphene citrate and intrauterine insemination in couples with unexplained infertility or surgically corrected endometriosis, *Fertil Steril* 54:1083–1088, 1990.
- D'Hooghe T. M., C. S. Bambra, M. A. Suleman et al. (1994): "Development of a model of retrograde menstruation in baboons (*Papio anubis*)." *Fertil Steril* 62(3): 635-8.

- Dmowski W, Ding J, Shen J et al.: Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis, *HumReprod* 16:1802–1808, 2001.
- Dmowski, W., H. Gebel and D. Braun (1998): "Decreased apoptosis and sensitivity to macrophage mediated cytotoxicity of endometrial cells in endometriosis." *Hum Reprod Update* 4(5): 696-701.
- Donnez J, Chantaine F, Nisolle M: The efficacy of medical and surgical treatment of endometriosis-associated infertility: arguments in favour of a medico-surgical approach, *Hum Reprod* 8:89–94, 2002.
- Eaton DL, Bammler TK (1999b). Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicological Sciences* 49(2):156-164.
- Eisermann J., M. J. Gast, J. Pineda et al. (1988): "Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of women undergoing laparoscopic surgery." *Fertil Steril* 50(4): 573-9.
- Engemise S., C. Gordon and J. C. Konje (2010): "Endometriosis." *BMJ* 340: c2168.
- Falcone T, Goldberg J, Miller K: Endometriosis: medical and surgical intervention, *Curr Opin Obstet Gynecol* 8:178–183, 1996.
- Farquhar C. (2007). "Endometriosis." *BMJ* 334(7587): 249-253.
- Fedele L, Bianchi S, Marchini M et al.: Superovulation with human menopausal gonadotropins in the treatment of infertility associated with minimal or mild endometriosis: a controlled randomized study, *Fertil Steril* 58:28–31, 1992.
- Flores I, Rivera E, Ruiz LA et al.: Molecular profiling of experimental endometriosis identified gene expression patterns in common with human disease. *Fertil Steril* 87:1180–1199, 2007.
- Foyouzi N, Berkkanoglu M, Arici A et al.: Effects of oxidants and antioxidants on proliferation of endometrial stromal cells, *Fertil Steril* 82(Suppl 3):1019–1022, 2004.

- Garai J., V. Molnar, T. Varga et al. (2006): "Endometriosis: harmful survival of an ectopic tissue." *Front Biosci* 11: 595-619.
- Garcia-Velasco JA, Somigliana E: Management of endometriomas in women requiring IVF: to touch or not to touch, *Hum Reprod* 24:496–501, 2009.
- Garrido N, Navarro J, Garcia-Velasco J et al.: The endometrium versus embryonic quality in endometriosis-related infertility, *Hum Reprod Update* 8:95–103, 2002.
- Georgiou I., M. Syrrou, I. Bouba et al. (1999): "Association of estrogen receptor gene polymorphisms with endometriosis." *Fertil Steril* 72(1): 164-166.
- Giudice L. C. and L. C. Kao (2004): "Endometriosis." *The Lancet* 364(9447): 1789-1799.
- Goldstein D, De Chonoky C, Emans S: Adolescent endometriosis, *J Adolesc Health Care* 1:37–41, 1980.
- Gorai I., M. Ishikawa, R. Onose et al. (1993): "Antiendometrial autoantibodies are generated in patients with endometriosis." *Am J Reprod Immunol* 29(2): 116-23.
- Guo SW.: Glutathione S-transferases M1/T1 gene polymorphisms and endometriosis: a meta-analysis of genetic association studies. *Mol Hum Reprod* 2005;11:729–743.
- Guo, S.-W. (2009): "Epigenetics of endometriosis." *Mol Hum Reprod* 15(10): 587-607.
- Guzick DS, Silliman NP, Adamson GD et al.: Prediction of pregnancy in infertile women based on the American Society for Reproductive Medicine's revised classification of endometriosis, *Fertil Steril* 67:822–829, 1997.
- Haas D, Chvatal R, Habelsberger A et al.: Comparison of revised American Fertility Society and ENZIAN staging: a critical evaluation of classifications of endometriosis on the basis of our patient population, *Fertil Steril* 95:1574–1578, 2011.α.

- Haider S. and M. Knöfler (2009): "Human Tumour Necrosis Factor: Physiological and Pathological Roles in Placenta and Endometrium." *Placenta* 30(2): 111-123.
- Haili Zhu, Jiming Bao, Shuguang Liu et al.: Null Genotypes of GSTM1 and GSTT1 and Endometriosis Risk: A Meta-Analysis of 25 Case-Control Studies. *PlosOne* September 2014.
- Halme J., S. Becker and S. Haskill (1987): "Altered maturation and function of peritoneal macrophages: possible role in pathogenesis of endometriosis." *Am J Obstet Gynecol* 156(4): 783-9.
- Hansen K. A. M. and K. M. P. Eyster (2010): "Genetics and Genomics of Endometriosis." *Clin Obstet Gynecol* 53(2): 403-412.
- Harada T., A. Enatsu, M. Mitsunari et al. (1999): "Role of Cytokines in Progression of Endometriosis." *Gynecol Obstet Invest* 47(Suppl. 1): 34-40.
- Hayes JD, Mantle TJ (1986): Use of immuno-blot techniques to discriminate between the glutathione S-transferase Yf, Yk, Ya, Yn/Yb and Yc subunits and to study their distribution in extrahepatic tissues. Evidence for three immunochemically distinct groups of transferase in the rat. *Biochem J* 233(3): 779-788.
- Hayes JD and McLellan LI (1999): Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 31, 273-300.
- Heagerty AHM, Fitzgerald D, Smith A et al. (1994): Glutathione S-transferase GSTM1 phenotypes and protection against cutaneous tumours. *The Lancet* 343(8892): 266-268.
- Hemmings R, Bissonnette F, Bouzayen R: Results of laparoscopic treatments of ovarian endometriomas: laparoscopic ovarian fenestration and coagulation, *Fertil Steril* 70:527–529, 1998.
- Hill J. A., H. M. Faris, I. Schiff et al. (1988): "Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis." *Fertil Steril* 50(2): 216-22.

- Hirokawa W, Iwase A, Goto M et al.: The post-operative decline in serum anti-mullerian hormone correlates with the bilaterality and severity of endometriosis, *Hum Reprod* 26:904–910, 2011.
- Hirvonen A, Saarikoski ST, Linnainmaa K et al. (1996): Glutathione S-transferase and N-acetyltransferase genotypes and asbestos-associated pulmonary disorders. *J Natl Cancer Inst* 88(24): 1853-1856.
- Hoeger K, Guzick D: An update on the classification of endometriosis, *Clin Obstet Gynecol* 42:611–619, 1999.
- Hoffman, BL and JW Williams 2011: Williams Gynecology. New York: McGraw-Hill Medical, 225-243.
- Horie K, Takakura K, Imai K et al.: Immunohistochemical localization of androgen receptor in the human endometrium, decidua, placenta and pathological conditions of the endometrium, *Hum Reprod* 7:1461–1466, 1992.
- Hsu C.-C., B.-C. Yang, M.-H. Wu et al. (1997): "Enhanced interleukin-4 expression in patients with endometriosis." *Fertil Steril* 67(6): 1059-1064.
- <http://www.biostathandbook.com/fishers.html>
- <http://www.endometriosis-gr.eu/>
- <https://statistics.laerd.com/spss-tutorials/mann-whitney-u-test-using-spss-statistics.php>
- Hur SE, Lee JY, Moon HS et al. (2004): Polymorphisms of the genes encoding the GSTM1, GSTT1 and GSTP1 in Korean women: no association with endometriosis. *Mol. Hum. Reprod.* 11: 15-19.
- Ishikawa T (1992): The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci* 17, 463-8.
- Johnson M. C., M. Torres, A. Alves et al. (2005): "Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: Expression of c-myc, TGF- β 1 and bax genes." *Reprod Biol Endocrinol* 3(1): 45.
- Josephy PD (2010b): Genetic Variations in Human Glutathione Transferase Enzymes: Significance for Pharmacology and Toxicology. *Human Genomics and Proteomics* 2(1).

- J  nne O, Kauppila A, Kokko E et al.: Estrogen and progestin receptors in endometriosis lesions: comparison with endometrial tissue, *Am J Obstet Gynecol* 141:562–566, 1981.
- Kayisli U. A., N. G. Mahutte and A. Arici (2002): "Uterine Chemokines in Reproductive Physiology and Pathology." *Am J Reprod Immunol* 47(4): 213-221.
- Kodama H, Fukuda J, Karube H et al.: Benefit of in vitro fertilization treatment for endometriosis-associated infertility, *Fertil Steril* 66:974–979, 1996.
- Kurose K, Sugiyama E, Saito Y (2012): Population differences in major functional polymorphisms of pharmacokinetics/pharmacodynamics-related genes in Eastern Asians and Europeans: implications in the clinical trials for novel drug development. *Drug Metab Pharmacokinetics*, 27, 9-54.
- Kyama C. M., S. Debrock, J. M. Mwenda et al. (2003): "Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis." *Reprod Biol Endocrinol* 1: 123.
- Laudanski P., J. Szamatowicz and P. Ramel (2005): "Matrix metalloproteinase-13 and membrane type-1 matrix metalloproteinase in peritoneal fluid of women with endometriosis." *Gynecol Endocrinol* 21(2): 106-110.
- Laufer MR, Goitein L, Bush M et al.: Prevalence of endometriosis in adolescent girls with chronic pelvic pain not responding to conventional therapy, *J Pediatr Adolesc Gynecol* 10:199–202, 1997.
- Lebovic D, Chao V, Martini J-F et al.: Interleukin-1b induction of RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted) chemokine gene expression in endometriotic stromal cells depends on an NF-kB site in the proximal promoter, *J Clin Endocrinol Metab* 86:4759–4764, 2001.
- Lebovic D. I., M. D. Mueller and R. N. Taylor (2001): "Immunobiology of endometriosis." *Fertil Steril* 75(1): 1-10.
- Lee G. H., Y. M. Choi, S. H. Kim et al. (2008): "Association of tumor necrosis factor- α gene polymorphisms with advanced stage endometriosis." *Hum Reprod* 23(4): 977-981.

- Leiserowitz G. S., J. L. Gumbs, R. Oi et al. (2003): "Endometriosis-related malignancies." *Int J Gynecol Cancer* 13(4): 466-471.
- Lessey B, Metzger D, Haney A et al.: Immunohistochemical analysis of estrogen and progesterone receptors in endometriosis: comparison with normal endometrium during the menstrual cycle and the effect of medical therapy, *Fertil Steril* 51:409–415, 1989.
- Lewis SJ, Cherry NM, Niven RM et al. (2002): GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms and lung cancer risk. *Cancer Lett* 180(2): 165-171.
- Lin J., X. Zhang, Y. Qian et al. (2003): "Glutathione S transferase M1 and T1 genotypes and endometriosis risk: a case-controlled study." *Chin Med J (Engl)* 116(5): 777-80.
- Loh FH, Tan AT, Kumar J et al.: Ovarian response after laparoscopic ovarian cystectomy for endometriotic cysts in 132 monitored cycles, *Fertil Steril* 72:316–321, 1999.
- Mahnke et al. 2000.
- Malinak LR, Buttram VC Jr, Elias S et al.: Heritage aspects of endometriosis. II. Clinical characteristics of familial endometriosis, *Am J Obstet Gynecol* 137:332–337, 1980.
- Mansour G, Aziz N, Sharma R et al.: The impact of peritoneal fluid from healthy women and from women with endometriosis on sperm DNA and its relationship to the sperm deformity index, *Fertil Steril* 92:61–67, 2009.
- Marcoux S, Maheux R, Berube S: Laparoscopic surgery in infertile women with minimal or mild endometriosis. Canadian Collaborative Group on Endometriosis, *N Engl J Med* 337:217–222, 1997.
- Martinez G, Daniels K, Chandra A: Fertility of men and women aged 15–44 years in the United States: National Survey of Family Growth, 2006–2010, *Nat Health Stat Reports* 51:1–29, 2012.
- Mastroianni L Jr: The fallopian tube and reproductive health, *J Pediatr Adolesc Gynecol* 12:121–126, 1999.

- Matarese G., G. De Placido, Y. Nikas et al. (2003): "Pathogenesis of endometriosis: natural immunity dysfunction or autoimmune disease?" *Trends Mol Med* 9(5): 223-228.
- Matsuzaki S, Canis M, Darcha C et al.: HOXA-10 expression in the mid-secretory endometrium of infertile patients with either endometriosis, uterine fibromas or unexplained infertility, *Hum Reprod* 24:3180–3187, 2009.
- McLellan RA, Oscarson M, Alexandrie AK et al. (1997): Characterization of a human glutathione S-transferase mu cluster containing a duplicated GSTM1 gene that causes ultrarapid enzyme activity. *Mol Pharmacol* 52(6): 958-965.
- McLeod B. S. M. and M. G. M. Retzliff (2010): "Epidemiology of Endometriosis: An Assessment of Risk Factors." *Clin Obstet Gynecol* 53(2): 389-396.
- Medina MG, Lebovic DI.: Endometriosis-associated nerve fibers and pain. *Acta Obstet Gynecol Scand* 88:968–975, 2009.
- Melin A., P. Sparen and A. Bergqvist (2007): "The risk of cancer and the role of parity among women with endometriosis." *Hum Reprod* 22(11): 3021-3026.
- Meresman G, Vighi S, Buquet RA et al.: Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis, *Fertil Steril* 74:760–766, 2000.
- Meresman G. F., S. Vighi, R. A. Buquet et al. (2000): "Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis." *Fertil Steril* 74(4): 760-766.
- Metzger DA, Olive DL, Stohs GF et al.: Association of endometriosis and spontaneous abortion: effect of control group selection, *Fertil Steril* 45:18–22, 1986.
- Metzger DA, CA Szpak and AF Haney (1993): Histologic features associated with hormonal responsiveness of ectopic endometrium. *Fertil Steril* 59 (1): 83-8.

- Montgomery G. W., D. R. Nyholt, Z. Z. Zhao et al. (2008): "The search for genes contributing to endometriosis risk." *Hum Reprod Update* 14(5): 447-457.
- Mori H., M. Sawairi, M. Nakagawa et al. (1991): "Peritoneal fluid interleukin-1 β and tumor necrosis factor in patients with benign gynecologic disease." *Am J Reprod Immunol* 26(2):62-7.
- Muhammad Nasir Uddin (2013): Genetic Polymorphism of GSTM1, GSTP1 in lung cancer patients of Bangladesh.
- Muraki Y., K. Banno, M. Yanokura et al. (2009): "Epigenetic DNA hypermethylation: clinical applications in endometrial cancer (Review)." *Oncol Rep* 22(5): 967-72.
- Nebert DW, Vasiliou V (2004): Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Hum Genomics* 1(6): 460-464.
- Nezhat F., M. S. Datta, V. Hanson et al. (2008): "The relationship of endometriosis and ovarian malignancy: a review." *Fertil Steril* 90(5): 1559-1570.
- Noble L., E. Simpson, A. Johns et al. (1996): "Aromatase expression in endometriosis." *J Clin Endocrinol Metab* 81(1): 174-179.
- Olive D, Pritts E: The treatment of endometriosis: a review of the evidence, *Ann N Y Acad Sci* 955:360–372, 2002.
- Omwandho C. O. A., L. Konrad, G. Halis et al. (2009): "Role of TGF- β s in normal human endometrium and endometriosis." *Hum Reprod* 25(1): 101-109.
- Oosterlynck D. J., F. J. Cornillie, M. Waer et al. (1991): "Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium." *Fertil Steril* 56(1): 45-51.
- Opoien HK, Fedorcsak P, Byholm T et al.: Complete surgical removal of minimal and mild endometriosis improves outcome of subsequent IVF/ICSI treatment, *Reprod Biomed Online* 23:389–395, 2011.

- Oral E, Arici A, Olive DL et al.: Peritoneal fluid from women with moderate or severe endometriosis inhibits sperm motility: the role of seminal fluid components, *Fertil Steril* 66:787–792, 1996.
- Outwater E and Dunton C: Imaging of the ovary and adnexa: clinical issues and applications of MR imaging, *Radiology* 194:1–18, 1995.
- Ping Yang, Jon O. Ebbert, Zhifu Sun et al. (2004).
- Prowse A. H., S. Manek, R. Varma et al. (2006): "Molecular genetic evidence that endometriosis is a precursor of ovarian cancer." *Int J Cancer* 119(3): 556-62.
- Rana N., D. P. Braun, R. House et al. (1996): "Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis." *Fertil Steril* 65(5): 925-30.
- Rebbeck TR (1997): Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6(9): 733-743.
- Rice V: Conventional medical therapies for endometriosis, *Ann N Y Acad Sci* 955:343–352, 2002.
- Rizner T. L. (2009): "Estrogen metabolism and action in endometriosis." *Mol Cell Endocrinol* 307(1-2): 8-18.
- Rogers PA et al.: Priorities for endometriosis research: recommendations from an international consensus workshop. *Reprod Sci* 2009;16(4):335-46.
- Saiki [RK](#), [Gelfand DH](#), [Stoffel S](#) et al.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239:487-91.
- Sallam HN, Garcia-Velasco JA, Dias S et al.: Long-term pituitary down-regulation before in vitro fertilization (IVF) for women with endometriosis, *Cochrane Database Syst Rev* CD004635, 2006.
- Sampson J. A. (1927): "Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity." *Am J Obstet Gynecol* 14: 422-69.
- Schull WJ (1973). The genetics of human populations.

- Seery J. P. (2006). "Endometriosis associated with defective handling of apoptotic cells in the female genital tract is a major cause of autoimmune disease in women." *Med Hypotheses* 66(5): 945-949.
- Seidegard J, Pero RW (1985). The hereditary transmission of high glutathione transferase activity towards trans-stilbene oxide in human mononuclear leukocytes. *Hum Genet* 69(1): 66-68.
- Seracchioli R, Mabrouk M, Frasca C et al.: Long-term cyclic and continuous oral contraceptive therapy and endometrioma recurrence: a randomized controlled trial, *Fertil Steril* 93:52–56, 2010.
- Shebl O, Ebner T, Sommergruber M et al.: Anti muellerian hormone serum levels in women with endometriosis: a case-control study, *Gynecological Endocrinology: the Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 1–4, 2009.
- Sheehan D, Meade G, Foley VM et al. (2001): Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 360, 1-16.
- Sherratt PJ, Hayes JD (2002): Glutathione S-transferases. In: (ed)^(eds). *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*, edn: John Wiley & Sons, Ltd. p^pp 319-352.
- Simpson J, Elias S, Malinak L et al.: (1980). "Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies." *Am J Obstet Gynecol* 137(3): 327-31.
- Sinaii N., S. D. Cleary, M. L. Ballweg et al. (2002): "High rates of autoimmune and endocrine disorders, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and atopic diseases among women with endometriosis: a survey analysis." *Hum Reprod* 17(10): 2715-2724.
- Slama R, Hansen OKH, Ducot B et al.: Estimation of the frequency of involuntary infertility on a nation-wide basis, *Hum Reprod* 1489–1498, 2012.
- Smith K (2002): Genetic Polymorphism and SNPs.

- Soliman S, Daya S, Collins J et al.: A randomized trial of in vitro fertilization versus conventional treatment for infertility, *Fertil Steril* 59:1239–1244, 1993.
- Strowitzki T, Marr J, Gerlinger C et al.: Dienogest is as effective as leuprolide acetate in treating the painful symptoms of endometriosis: a 24-week, randomized, multicentre, open-label trial, *Hum Reprod* 25:633–641, 2010.
- Stucker I, Hirvonen A, de Waziers I et al. (2002): Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases as modulators of lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 23(9): 1475-1481.
- Sugimura K, Okizuka H, Imaoka I et al.: Pelvic endometriosis: detection and diagnosis with chemical shift MR imaging, *Radiology* 188:435–438, 1993.
- Sung Eun Hur, Ji Young Lee, Hye-Sung Moon et al.: Polymorphisms of the genes encoding the GSTM1, GSTT1 and GSTP1 in Korean women: no association with endometriosis. *Molecular Human Reproduction* Vol.11, No.1 pp. 15–19, 2004.
- Sung Hoon Kim, Young Min Choi, Gyoung Hoon Lee et al.: Association between susceptibility to advanced stage endometriosis and the genetic polymorphisms of aryl hydrocarbon receptor repressor and glutathione-S-transferase T1 genes. *Human Reproduction* Vol.22, No.7 pp. 1866–1870, 2007.
- Syrop CH, Halme J: Peritoneal fluid environment and infertility, *Fertil Steril* 48:1–9, 1987.
- Szamatowicz J., P. Laudanski and I. Tomaszewska (2002): "Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1: a possible role in the pathogenesis of endometriosis." *Hum Reprod* 17(2):284-288.
- Takayama K., K. Zeitoun, R. T. Gunby et al. (1998): "Treatment of Severe Postmenopausal Endometriosis With an Aromatase Inhibitor." *Fertil Steril* 69(4): 709-713.
- Taylor RN, Yu J, Torres PB et al.: Mechanistic and therapeutic implications of angiogenesis in endometriosis. *Reprod Sci* 16:140–146, 2009.

- Telimaa S, Ronnberg L, Kauppila A: Placebo-controlled comparison of danazol and high-dose medroxyprogesterone acetate in the treatment of endometriosis after conservative surgery, *Gynecol Endocrinol* 1:363–371, 1987.
- Treloar SA, Bell TA, Nagle CM et al.: Early menstrual characteristics associated with subsequent diagnosis of endometriosis, *Am J Obstet Gynecol* 202(534):e1–e6, 2010.
- Vaskivuo T, Stenback F, Karhumaa P et al.: Apoptosis and apoptosis-related proteins in human endometrium, *Mol Cell Endocrinol* 165:75–83, 2000.
- Vercammen EE and D'Hooghe TM: Endometriosis and recurrent pregnancy loss, *Semin Reprod Med* 18:363–368, 2000.
- Vercellini P, Fedele L, Arcaini L et al.: Laparoscopy in the diagnosis of chronic pelvic pain in adolescent women, *J Reprod Med* 34:827–830, 1989.
- Vercellini P, Frontino G, De Giorgi O et al.: Continuous use of an oral contraceptive for endometriosis-associated recurrent dysmenorrhea that does not respond to a cyclic pill regimen, *Fertil Steril* 80:560–563, 2003.
- Vercellini P, Somigliana E, Dagupati R et al.: Postoperative oral contraceptive exposure and risk of endometrioma recurrence, *Am J Obstet Gynecol* 198(504):e1–e5, 2008.
- Verma A. and J. C. Konje (2009): "Successful treatment of refractory endometriosis related chronic pelvic pain with aromatase inhibitors in premenopausal patients." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 143(2): 112-115.
- Vichi S, Medda E, Ingelido AM et al. (2012): Glutathione transferase polymorphisms and risk of endometriosis associated with polychlorinated biphenyl exposure in Italian women: a gene-environment interaction. *Fertil Steril* 97: 1143–1151.
- Vigano P., M. Infantino, D. Lattuada et al. (2003): "Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene polymorphisms in endometriosis." *Mol Hum Reprod* 9(1): 47-52.
- Vinatier D, G Orazi, M Cosson et al. (2001): Theories of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 96 (1): 21-34.

- Vitonis AF, Baer HJ, Hankinson SE et al.: A prospective study of body size during childhood and early adulthood and the incidence of endometriosis, *Hum Reprod* 25:1325–1334, 2010.
- Wieser F., C. Schneeberger, D. Tong et al. (2002): "PROGINS receptor gene polymorphism is associated with endometriosis." *Fertil Steril* 77(2): 309-312.
- Wu M.-H., Y. Shoji, M.-C. Wu et al. (2005): "Suppression of Matrix Metalloproteinase-9 by Prostaglandin E2 in Peritoneal Macrophage Is Associated with Severity of Endometriosis." *Am J Pathol* 167(4): 1061-1069.
- Wu Y., A. Kajdacsy-Balla, E. Strawn et al. (2006): "Transcriptional Characterizations of Differences between Eutopic and Ectopic Endometrium." *Endocrinology* 147(1): 232-246.
- Xu H, Schultze-Mosgau A, Agic A et al.: Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) and monocyte chemotactic protein 1 in follicular fluid accumulate differentially in patients with and without endometriosis undergoing in vitro fertilization, *Fertil Steril* 86:1616–1620, 2006.
- Xue Q., Z. Lin, Y.-H. Cheng et al. (2007): "Promoter Methylation Regulates Estrogen Receptor 2 in Human Endometrium and Endometriosis." *Biol Reprod* 77(4): 681-687.
- Yamashita Y, Ueda M, Takehara M et al.: Influence of severe endometriosis on gene expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in granulosa cells from patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization—embryo transfer, *Fertil Steril* 78:865–871, 2002.
- Zeitoun K., K. Takayama, H. Sasano et al. (1998): "Deficient 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Expression in Endometriosis: Failure to Metabolize 17 β Estradiol." *J Clin Endocrinol Metab* 83(12): 4474-4480.
- Zhang H, Li M, Zheng X et al.: Endometriotic stromal cells lose the ability to regulate cell-survival signaling in endometrial epithelial cells in vitro, *Mol Hum Reprod* 15:653–663, 2009.
- Ziegler D, Borghese B, Chapron C.: Endometriosis and infertility: pathophysiology and management. *Lancet* 376:730–738, 2010.

