



**ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
&
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΑΘΗΝΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ**



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
“ΕΡΕΥΝΑ ΣΤΗ ΓΥΝΑΙΚΕΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ”**

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

“Μελέτη της επίδρασης της καμπεργολίδης και της N-ακέτυλο-κυστεΐνης στην αναστολή της ανάπτυξης ενδομητριωσικών εμφυτευμάτων σε πειραματικό μοντέλο ενδομητρίωσης. Μελέτη σε επίμυες του γένους Wistar”.

Μαρία Μιζαμτσίδα

Ειδικευόμενη Ενδοκρινολόγος, Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια

A.M. : 2008328

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- 1. ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΒΛΑΧΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)**
- 2. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΜΑΣΤΟΡΑΚΟΣ**
- 3. ΙΣΜΗΝΗ ΔΟΝΤΑ**

ΑΘΗΝΑ, 2012

Μιζαμτσιόδη Μαρία Ειδικευόμενη Ενδοκρινολόγος, Τμήμα Ενδοκρινολογίας & Μεταβολισμού, ΓΝΑ Κοργιαλένιο-Μπενάκειο-Ελληνικός Ερυθρός Σταυρός, Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Βλάχος Φ. Νικόλαος (Επιβλέπων) Μαιευτήρας-Γυναικολόγος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Β' Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών.

Μαστοράκος Γεώργιος Ενδοκρινολόγος, Αναπληρωτής Καθηγητής Β' Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών.

Δοντά Ισμήνη Κτηνίατρος, Καθηγήτρια Κτηνιατρικής – Πειραματικής Χειρουργικής Έρευνας, Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας "Ν.Σ. Χρηστέας", Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

Ευχαριστίες:

Μέσα από τη σελίδα αυτή θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή κύριο Νικόλαο Βλάχο για την μεταλαμπάδευση των ερευνητικών του εμπειριών πάνω στο συγκεκριμένο νόσημα και την καθοδήγησή του, τον αναπληρωτή καθηγητή κύριο Γεώργιο Μαστοράκο για την πολύχρονη εμπιστοσύνη του, την υποστήριξή του και την εκπαίδευσή μου με βάση τις αρχές που διέπουν την επιστήμη και την έρευνα και την καθηγήτρια κυρία Ισμήνη Δοντά, η οποία μας δίδαξε -με την εμπειρία και τις γνώσεις της- τον ιδανικό τρόπο προσέγγισης των πειραματοζώων, ώστε να έχουμε τα καλύτερα δυνατά ερευνητικά αποτελέσματα σε συνδυασμό με την άριστη αντιμετώπιση των ζώων, με γνώμονα πάντα τους κανόνες της Βιοηθικής.

Ειδική μνεία θα πρέπει να πραγματοποιηθεί και στα υπόλοιπα μέλη της ερευνητικής μας ομάδας. Την παθολογοανατόμο κυρία Κόνδη-Παφίτη Αγάθη, το μαιευτήρα-γυναικολόγο κύριο Αθανάσιο Βλάχο, το σύζυγό μου γενικό χειρουργό κύριο Κωνσταντίνο Νάστο, τον αναισθησιολόγο κύριο Κωνσταντίνο Χονδρογιάννη και τις κτηνιάτρους κυρία Ευτυχία Αραβίδου και κυρία Σταυρούλα Λουκαΐδου για τη συμμετοχή τους στα πειράματα. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους Υπεύθυνους του Πειραματικού Χειρουργείου του Αρεταιείου Νοσοκομείου κύριο Ιωάννη Μπερδούση και κύριο Μιχάλη Μεταξάρακη.

Ας ελπίσουμε ότι η μελέτη αυτή θα συμβάλλει στην διερεύνηση των μηχανισμών που διέπουν την ενδομητρίωση. Με απόλυτο σεβασμό στα υπογόνιμα ζευγάρια που αντιμετωπίζουν τη νόσο.

Σας ευχαριστώ
Μαρία Μιζαμτσιδη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

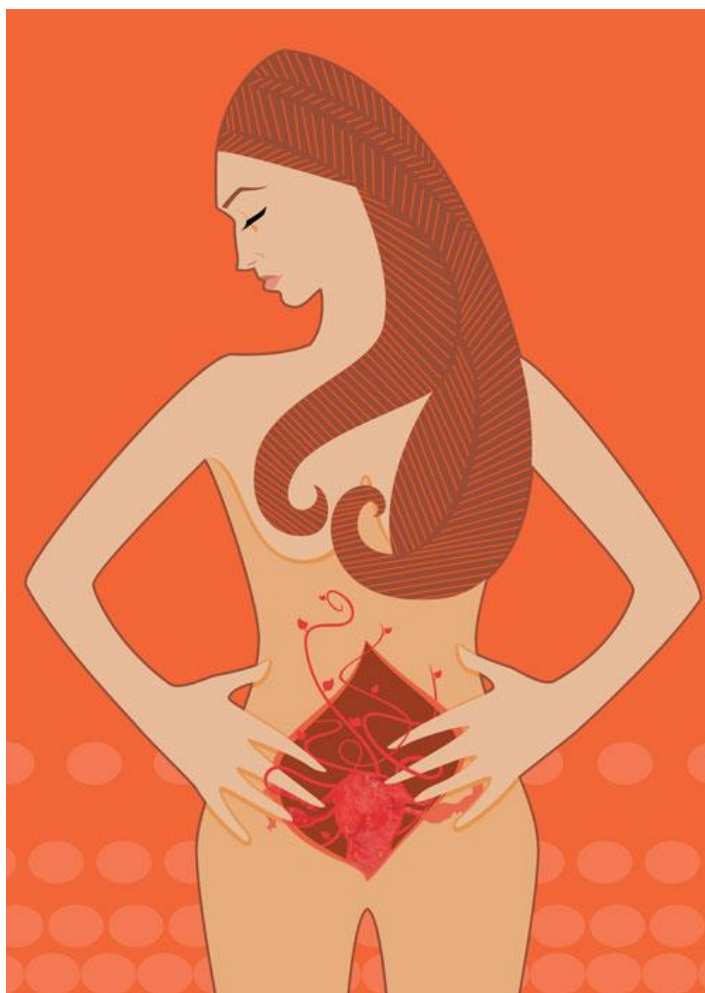
Περίληψη-Abstract.....	6
------------------------	---

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή.....	7
2. Ορισμός, επίπτωση και επιδημιολογία ενδομητρίωσης.....	7
3. Ιστορικές αναφορές.....	7
4. Ιστολογία ενδομητρίου-ενδομητρίωσης.....	8
5. Κατάταξη ενδομητρωσικών βλαβών.....	9
6. Θεωρίες-μηχανισμοί ανάπτυξης ενδομητρίωσης.....	10
6.1. Εμφύτευση μοσχευμάτων αποπίπτοντος ενδομητρίου.....	10
6.2. Θεωρία της κυτταρικής μεταπλασίας.....	10
6.3. Κατάλοιπα εμβρυϊκών κυττάρων.....	10
6.4. Θεωρία της πρόκλησης.....	10
6.5. Λεμφογενής ή αιματογενής διασπορά.....	10
6.6. Συνθετική θεωρία.....	11
6.7. Επέκταση κατά συνέχεια ιστού.....	11
7. Αιτιολογία.....	11Γ
ενετικοί παράγοντες.....	11
7.2. Περιβαλλοντική έκθεση σε χημικές ουσίες.....	11
7.3. Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου, οξειδωτικό stress και ενδομητρίωση.....	12
7.4. Μεταλλοπρωτεΐνάσες του στρώματος και ενδομητρίωση.....	13
7.5. Τοπικοί περιτοναϊκοί και ανοσολογικοί παράγοντες.....	16
7.5.1. Το κυτταρικό περιεχόμενο του περιτοναϊκού υγρού.....	16
7.5.2. Η ενδομητρίωση είναι μια φλεγμονώδης νόσος.....	17
7.5.3. Κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες που παράγονται από τα κύτταρα του περιτοναϊκού υγρού.....	17
7.5.4. Μηχανισμός πλημμελούς καταστροφής των ενδομητρικών κυττάρων του περιτοναϊκού υγρού.....	19
7.5.5. Μηχανισμός συγκόλλησης και εμφύτευσης των ενδομητρικών κυττάρων του περιτοναϊκού υγρού στο υγιές περιτόναιο.....	19
7.5.6. Μηχανισμός αύξησης και πολλαπλασιασμού των εμφυτευμένων ενδομητρικών κυττάρων (ενδομητρωσικές εστίες).....	20
8. Κλινική εικόνα.....	22
9. Διαφορική Διάγνωση.....	22
10. Απεικονιστικά/Εργαστηριακά Ευρήματα-Διάγνωση.....	23
11. Θεραπευτικές προσεγγίσεις (επεμβατικές – μη επεμβατικές).....	23
12. Πειραματικά μοντέλα ενδομητρίωσης.....	24
13. Ανατομία και φυσιολογία του γεννητικού συστήματος του θήλεος επίμου.....	28
14. Ιστολογία ενδομητρίου – ενδομητρίωσης θήλεος επίμου.....	35
15. Νέα θεραπευτικά σχήματα για την αντιμετώπιση της ενδομητρίωσης. Πειραματικά δεδομένα.....	36

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή.....	41
2. Σκοπός.....	42
3. Υλικά & Μέθοδος.....	42
3.1. Πειραματικό πρωτόκολλο.....	42
3.2. Αναισθησιολογικό πρωτόκολλο	44
3.3. Χειρουργικό πρωτόκολλο	44
4. Μετρήσεις.....	45
4.1. Ιστολογική Εκτίμηση.....	45
4.2. Υπολογισμός Όγκου Ενδομητρωσικού Ιστού.....	45
4.3. Στατιστική ανάλυση.....	46
5. Αποτελέσματα.....	46
6. Συζήτηση.....	53
7. Βιβλιογραφία.....	57



Περίληψη:

Σκοπός: Η ενδομητρίωση είναι μια από τις συχνότερες αιτίες υπογονιμότητας που απασχολεί μεγάλο μέρος των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας. Σκοπός της μελέτης είναι η διερεύνηση της συνέργειας μεταξύ ενός ντοπαμινεργικού αγωνιστή, της καμπεργολίδης (CAB) που δρα ως αντι-αγγειογενετικός παράγοντας, και της Ν-ακετυλοκυστεΐνης (NAC), ενός αντιοξειδωτικού παράγοντα, στην ανάπτυξη των ενδομητριωσικών εμφυτευμάτων, σε ένα πειραματικό μοντέλο ενδομητρίωσης επίμυων.

Μέθοδος: Πραγματοποιήθηκε λαπαροτομία σε επίμυες του γένους Wistar για την εμφύτευση αυτόλογων ενδομητρικών μοσχευμάτων και μετά την χειρουργική επαγωγή της νόσου, η οποία επιβεβαιώθηκε με δεύτερη λαπαροτομία, τα πειραματόζωα τυχαιοποιήθηκαν σε τέσσερις ομάδες (ομάδα ελέγχου, ομάδα CAB, ομάδα NAC και ομάδα που έλαβε το συνδυασμό CAB και NAC) και έλαβαν θεραπεία για τρεις εβδομάδες. Μετά το πέρας των τριών εβδομάδων τα πειραματόζωα ευθανατώθηκαν αφού μετρήθηκε ο αριθμός και ο μέσος όγκος των ενδομητριωσικών εμφυτευμάτων.

Αποτελέσματα: Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του συνολικού μέσου όγκου των ενδομητριώσεων, πριν και μετά τη θεραπευτική μας παρέμβαση, στις ομάδες που έλαβαν καμπεργολίδα και το συνδυασμό καμπεργολίδης και NAC. Δεν παρατηρήθηκε μείωση των εστιών με τη χρήση της NAC, ούτε συνεργική δράση της με την CAB.

Συμπερασμα: Η καμπεργολίδα δρα αθροιστικά και όχι συνεργικά με την Ν-ακετυλοκυστεΐνη στη μείωση του μέσου όγκου των ενδομητριωσικών εμφυτευμάτων.

Abstract:

Aim: Endometriosis is a common cause of infertility between women of reproductive age. Our study aimed to evaluate if a synergistic effect exists between cabergoline (CAB) -a dopamine agonist- as an anti-VEGF factor and N-acetyl-cysteine (NAC) -an antioxidant- on the reduction of endometrial implant volume, in an experimental protocol of surgically induced endometriosis.

Methods: Forty Wistar rats were subjected to laparotomy and surgical induction of endometriosis. After the evaluation of the implantation process, animals were divided into 4 groups (control group, CAB group, NAC group and combination of NAC and CAB group) and they received therapy for three weeks respectively, followed by euthanasia. The number and mean volume of endometriotic implants were recorded.

Results: The mean volume of the endometriotic implants was reduced after treatment in CAB group and CAB+NAC group. No differences were found in NAC group and in controls. In addition, synergistic effect of NAC with CAB was not found.

Conclusions: CAB and NAC have an additive and not synergistic effect on the reduction of the mean volume of endometriotic implants.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια η ολοένα αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης υπογονιμότητας, ακόμα και σε νεαρά ζευγάρια, κατέστησε αναγκαία την εξονυχιστική διερεύνηση των αιτιών της. Κατά τη διάρκεια αυτού του ελέγχου ανέκυψε ως προεξάρχουσα αιτία, μια συχνότατη και αινιγματική νοσολογική οντότητα, η ενδομητρίωση. Η νόσος αυτή αποτελεί μια πραγματική πρόκληση για την έρευνα, καθώς η διεθνής βιβλιογραφία διχάζεται σε πολλά επιμέρους στοιχεία που την καθορίζουν.

2. Ορισμός, επίπτωση και επιδημιολογία ενδομητρίωσης.

Ως ενδομητρίωση ορίζεται η παρουσία ενδομητρικού ιστού (αδένων και στρώματος) εκτός των ανατομικών ορίων της μήτρας. Αυτά τα έκτοπα ενδομητρωσικά εμφυτεύματα συνήθως εδράζονται στην πύελο, αλλά μπορούν να εντοπιστούν σχεδόν οπουδήποτε μέσα στο σώμα (1). Χαρακτηριστικό τους είναι ότι εμφανίζουν κυκλικότητα και περιοδικότητα που αντιστοιχεί σε εκείνη της εμμήνου ρύσεως.

Η επίπτωση της ενδομητρίωσης δεν έχει υπολογιστεί με ακρίβεια. Φαίνεται όμως ότι η μελέτη που προσεγγίζει περισσότερο την πραγματικότητα για τη συχνότητα της νόσου στο γενικό πληθυσμό προσδιορίζει ότι 6% των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών πάσχουν από ενδομητρίωση (2). Οι γυναίκες που βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο για την ανάπτυξη ενδομητρίωσης είναι οι άτοκες γυναίκες, οι γυναίκες με πρόωμη εμμηναρχή, συχνομηνόρροια και μηνορραγίες (3). Η ενδομητρίωση φαίνεται επίσης να σχετίζεται με υψηλό και λεπτό σωματότυπο και χαμηλό δείκτη σωματικής μάζας (4). Η επίπτωση φαίνεται πως είναι υψηλότερη στην καυκάσια φυλή σε σχέση με τη μαύρη φυλή ή τους ασιατικούς πληθυσμούς (5).

Η ανάπτυξη και διατήρηση των ενδομητρωσικών εμφυτευμάτων επηρεάζεται από τα ωοθηκικά στεροειδή. Συνεπώς η ενδομητρίωση εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας και ιδιαίτερα σε γυναίκες 25 έως 35 ετών (4, 6). Η ενδομητρίωση σπανίζει σε κορίτσια πριν ή αμέσως μετά την εμμηναρχή (7, 8) και σε γυναίκες μετεμμηνοπαυσιακής ηλικίας που λαμβάνουν ορμονική υποκατάσταση.

3. Ιστορικές αναφορές

Παρόλο που τα περισσότερα γυναικολογικά νοσήματα περιγράφονται στα κείμενα του Ιπποκράτη (460-377 π.Χ.), του Σωρανού του Εφεσίου (2^{ος} αιώνας μ.Χ.) και ακολούθως του Ασκληπιού, θεού της Ιατρικής που λατρευόταν σε όλο τον ελλαδικό χώρο κατά την αρχαιότητα, η πρώτη καταγεγραμμένη αναφορά στην ενδομητρίωση φαίνεται πως πραγματοποιείται από το γερμανό ιατρό Daniel Schroen το 1690 μ.Χ. στο βιβλίο του με τίτλο "*Disputatio Inauguralis Medica de Ulceritus Ulceri*". Στο βιβλίο αυτό περιγράφει την ύπαρξη διαφόρων "ελκών" με κατανομή στο περιτόναιο (στομάχι, όπως το αποκαλούσε) και εντόπιση στην ουροδόχο κύστη, το λεπτό έντερο, τον πλατύ σύνδεσμο και την εξωτερική πλευρά της μήτρας και του τραχήλου. Περιέγραφε δε με ιδιαίτερη έμφαση πως

αυτή η διαταραχή του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος είναι χαρακτηριστική στις γυναίκες που ωριμάζουν σεξουαλικά (9).

Παρόλο που άλλες αναφορές κατά τη διάρκεια του 17^{ου} και 18^{ου} αιώνα, συσχέτισαν τη νόσο με την ανάπτυξη ουλώδους ιστού, την ιστική καταστροφή και το πυελικό άλγος (10), η χαρακτηριστικότερη περιγραφή της νόσου παρουσιάστηκε από τους Σκωτσέζους μαιευτήρες Balfour και Smellie στο βιβλίο τους με τίτλο *“Dissertatio Medica Inauguralis de Utero Inflammatione Ejusdem”*. Στο βιβλίο αυτό οι συγγραφείς περιγράφουν τη νόσο ως *“μια θλίψη που διαπνέει όλο το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα, προκαλώντας ολέθρια αποτελέσματα που καθορίζουν της μεταβολές της διάθεσης όλου του σώματος”*(9).

Η πρώτη λαπαροτομία και εκτομή σοκολατοειδούς ενδομητριοειδούς κύστης από την ωθήκη πραγματοποιήθηκε από τον Ephraim McDowell ανήμερα των Χριστουγέννων του 1809 στο Danville, Kentucky (9).

4. Ιστολογία ενδομητρίου-ενδομητρίωσης

Το ενδομήτριο που καλύπτει την ενδομητρική κοιλότητα αποτελείται από το καλυπτικό επιθήλιο, το αδενικό επιθήλιο και το στρώμα. Οι ιστοί αυτοί διαμορφώνουν τις δύο στιβάδες του ενδομητρίου που είναι η λειτουργική, η οποία αποπίπτει και ανανεώνεται σε κάθε εμμηνορρυσιακό κύκλο, και η βασική που αναλαμβάνει την ανανέωση της λειτουργικής. Το επιθήλιο των αδένων αποτελείται από μία στοιβάδα κυλινδρικών επιθηλιακών κυττάρων που χαρακτηρίζονται από μεγάλη ευαισθησία στα οιστρογόνα. Κατά τη διάρκεια της παραγωγικής φάσης του κύκλου εμφανίζουν έντονη μιτωτική δραστηριότητα που ελαττώνεται με την ωοθυλακιορρηξία. Το καλυπτικό επιθήλιο που προκύπτει από τη συνένωση του αδενικού επιθηλίου γειτονικών αδένων αποτελείται από κύτταρα που μοιάζουν με το αδενικό επιθήλιο, αλλά είναι λιγότερο ευαίσθητα στη δράση των οιστρογόνων. Το στρώμα αποτελείται από πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα που συνδέονται μεταξύ τους με κυτταροπλασματικές γέφυρες και βρίσκονται σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε δικτυωτές ίνες. Κατά τη διάρκεια της εκκριτικής φάσης του κύκλου ο συνεκτικός ιστός του στρώματος πλημμυρίζει από μακροφάγα και λεμφοκύτταρα.

Το ανθρώπινο ενδομήτριο είναι εμπλουτισμένο σε λευκοκύτταρα, στην πλειοψηφία τους λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και κύτταρα φονείς (NK κύτταρα). Τα λεμφοκύτταρα βρίσκονται συσσωρευμένα σε ομάδες στη βασική στοιβάδα και μεμονωμένα στη λειτουργική. Τα T-λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα NK κύτταρα ανευρίσκονται αυξημένα μόνο στην εκκριτική φάση ενώ τα B-κύτταρα εμφανίζονται σε μεμονωμένες ομάδες (11). Κατά την διάρκεια της εμμήνου ρύσεως, ένας μεγάλος αριθμός λεμφοκυττάρων χάνεται και επανεμφανίζεται κατά την παραγωγική φάση του κύκλου. Οι περισσότερες αναφορές συγκλίνουν ότι τα λευκοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των T-λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων, προέρχονται από το περιφερικό αίμα με εξαγγείωση. Η διαδικασία της εξαγγείωσης από τα αγγεία του ενδομητρίου αρχίζει με τη συγκόλληση των λευκοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα του τοιχώματος των αγγείων μέσω διαφόρων μορίων προσκόλλησης πχ. μέσω του Ενδοκυτταρικού Συγκολλητικού Μορίου 1, (Intracellular Adhesion Molecule-1, ICAM-1), του Ενδοαγγειακού Συνδετικού

Μορίου 1, (Vascular Adhesion Molecule-1, VCAM-1), της Σελεκτίνης E (E-Selectin), καθώς και της Ιντεγκρίνης $\alpha_4\beta_1$. Υπάρχουν επίσης και οι χυμοκίνες, ουσίες δηλαδή που παράγονται από τα λευκοκύτταρα και τα κύτταρα του ενδοθηλίου και είναι υπεύθυνες για την επιστράτευση και μετανάστευση των λευκοκυττάρων. Οι χυμοκίνες διαιρούνται σε 4 οικογένειες από τις οποίες οι κυριότερες διακρίνονται μορφολογικά μεταξύ τους από την ύπαρξη ή μη ενός αμινοξέος (X) μεταξύ δύο συγκεκριμένων κυστεϊνών (CC ή CXC). Ο κύριος εκπρόσωπος της οικογένειας CC είναι η Χυμοτακτική Πρωτεΐνη-1 των Μονοκυττάρων (Monocyte Chemotactic Protein-1, MCP-1) που είναι υπεύθυνη για το μήνυμα της επιστράτευσης και μετανάστευσης των μονοκυττάρων και των T-λεμφοκυττάρων και των NK κυττάρων, ενώ η Ιντερλευκίνη 8 (IL-8) και το Ρυθμιστικό Ογκογονίδιο της Ανάπτυξης (Growth Regulated Oncogene- α , GRO- α) εκπροσωπούν την οικογένεια CXC και εκπέμπουν το αντίστοιχο μήνυμα για τα ουδετερόφιλα. (11)

5. Κατάταξη ενδομητριωσικών βλαβών

Κατά καιρούς έχουν προταθεί διάφορα συστήματα κατάταξης των ενδομητριωσικών βλαβών, όμως αυτό που χρησιμοποιείται συχνότερα είναι το σύστημα που προτάθηκε από την Αμερικάνικη Εταιρεία Αναπαραγωγής (12). Η σταδιοποίηση καθορίζεται με βάση τη βαρύτητα της νόσου. Έτσι, τα στάδια ορίστηκαν ως εξής:

- Στάδιο I (ελάχιστη) βαθμοί 1 – 5
- Στάδιο II (ελαφριά) βαθμοί 6 – 15
- Στάδιο III (μέτρια) βαθμοί 16 – 40
- Στάδιο IV (βαριά) βαθμοί > 41

	ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ	< 1 cm	1 – 3 cm	> 3 cm
ΠΕΡΙΤΟΝΑΙΟ	Επιφανειακή	1	2	4
	Βαθεία	2	4	6
ΩΟΘΗΚΗ	Δ. Επιφανειακή	1	2	4
	Βαθεία	4	16	20
	Αρ. Επιφανειακή	1	2	4
	Βαθεία	4	16	20
ΟΠΙΣΘΙΟΣ ΔΟΥΓΛΑΣΕΙΟΣ	Μερικώς		Πλήρως	
		4	40	
ΩΟΘΗΚΗ	ΣΥΜΦΥΣΕΙΣ	<1/3 κατάληψη οργάνου	1/3–2/3 κατάληψη οργάνου	>2/3 κατάληψη οργάνου
	Δ. Χαλαρές	1	2	4
	Στέρες	4	8	16
	Αρ. Χαλαρές	1	2	4
	Στέρες	4	8	16
ΣΑΛΠΙΓΓΕΣ	Δ. Χαλαρές	1	2	4
	Στέρες	4	8	16
	Αρ. Χαλαρές	1	2	4
	Στέρες	4	8	16

Πίνακας 1

Πίνακας 1. Φαίνεται η βαθμολόγηση των βλαβών ανάλογα με την θέση και την έκτασή τους.

6. Θεωρίες ανάπτυξης ενδομητρίωσης

Μετά την πλήρη περιγραφή της νόσου από τον Τσέχο παθολογοανατόμο Rokitansky το 1860 και τη βελτίωση της μικροσκόπησης κατά τη διάρκεια του 19^{ου} αιώνα, άρχισαν να αναπτύσσονται διάφορες θεωρίες για την καταβολή και την παθογένεση της νόσου (1). Οι κυριότερες θεωρίες για την ιστογένεση της ενδομητρίωσης φαίνονται παρακάτω.

6.1. Εμφύτευση μοσχευμάτων αποπίπτοντος ενδομητρίου.

Η θεωρία αυτή προτάθηκε από τον Sampson το 1921 και υποστηρίζει πως κατά τη διάρκεια της εμμήνου ρύσεως λειτουργικά κύτταρα του στρώματος και των αδένων προωθούνται μαζί με την αιμορραγική μάζα προς το τραχηλικό και τα δύο σαλπινγικά στόμια, με αποτέλεσμα το προϊόν της εμμηνορρυσίας να διοχετευθεί στο μεγαλύτερο ποσοστό του προς τον κόλπο μέσω του τραχηλικού στομίου και μικρό μέρος του να διαφύγει μέσω των σαλπίνγων στην περιτοναϊκή κοιλότητα (παλίνδρομη εμμηνορρυσία). Τα κύτταρα που παλινδρομούν είναι βιώσιμα και έχουν τη δυνατότητα εμφύτευσης σε άλλες θέσεις.

6.2. Θεωρία της κυτταρικής μεταπλασίας. (Coelemic metaplasia)

Η θεωρία αυτή παρουσιάστηκε από τους Iwanoff και Mayer στις αρχές του 20^{ου} αιώνα και υποστηρίζει ότι τα κύτταρα γενικά μπορούν να αλλάζουν λειτουργικότητα και χαρακτήρα κάτω από την επίδραση ορισμένων ερεθισμάτων ή παραγόντων. Θεωρούν, λοιπόν, ότι το έκτοπο ενδομήτριο προέρχεται από μεταπλασία των κυττάρων του περιτοναϊκού μεσοθηλίου.

6.3. Κατάλοιπα εμβρυϊκών κυττάρων.

Η θεωρία υποστηρίζει ότι οι μυλλεριανοί πόροι περιέχουν κύτταρα, τα οποία κάτω από ορισμένες συνθήκες και υπό την επίδραση συγκεκριμένων ερεθισμάτων μπορούν να αναπτύξουν έκτοπο λειτουργικό ενδομήτριο. Η εντόπιση εμβρυϊκών καταλοίπων είναι σπάνια σε περιπτώσεις ενδομητρίωσης και ως εκ τούτου φαίνεται ότι πρόκειται για σπάνια μορφή ιστογένεσης.

6.4. Θεωρία της πρόκλησης.

Η θεωρία αυτή αποτελεί ένα συνδυασμό της θεωρίας της μετάπλασης και της θεωρίας του Sampson. Αναφέρει ότι το αποβληθέν ενδομήτριο που είχε μεταφερθεί στην περιτοναϊκή κοιλότητα με την παλίνδρομη εμμηνορρυσία εκκρίνει κάποιες ουσίες που προκαλούν μετάπλαση του αδιαφοροποίητου μεσεγχύματος σε μεταπλαστικό.

6.5. Λεμφογενής ή αιματογενής διασπορά.

Το πλούσιο λεμφαγγειακό δίκτυο μεταξύ της μήτρας, των ωοθηκών, των ωαγωγών, των πυελικών και κοιλικών λεμφαδένων δίνει τη δυνατότητα λεμφαγγειακής διασποράς των ενδομητρικών κυττάρων. Ο εντοπισμός ενδομητριοειδών εστιών σε απομακρυσμένες

περιοχές του σώματος, όπως για παράδειγμα στην περιοχή των πνευμόνων, καθιστά ικανή την πιθανότητα αιματογενούς διασποράς.

6.6. Συνθετική θεωρία.

Η θεωρία αυτή αναφέρει ότι η ιστογένεση της ενδομητρίωσης εξαρτάται από την περιοχή που εντοπίζεται. Έτσι η γενικευμένη πυελική διασπορά μπορεί να ερμηνευθεί με τη θεωρία της παλίνδρομης εμμηνορρυσίας, τα ωθηκικά ενδομητριώματα με τη θεωρία της κυτταρικής μεταπλασίας, ενώ οι ορθοκολπικές εντοπίσεις της με τη θεωρία για τα εμβρυικά κατάλοιπα.

6.7. Επέκταση κατά συνέχεια ιστού.

Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή το φυσιολογικό ενδομήτριο έχει την ικανότητα διήθησης των τοιχωμάτων της μήτρας και εγκατάστασης σε περιοχές της ουροδόχου κύστεως, του εντέρου, των ουρητήρων κλπ.

7. Αιτιολογία

7.1. Γενετικοί παράγοντες

Έχει διατυπωθεί η άποψη πως η ενδομητρίωση έχει γενετική βάση. Παρόλο που δεν έχει διαπιστωθεί συσχέτιση με τους απλότυπους HLA (13), υπάρχει αυξημένη επίπτωση της ενδομητρίωσης σε συγγενείς πρώτου βαθμού των προσβεβλημένων γυναικών σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (14). Επιπλέον, μελέτη 16 ζευγαριών μονοζυγωτικών διδύμων έδειξε ότι τα 14 από αυτά έπασχαν από ενδομητρίωση (15). Η άποψη που επικρατεί όμως μεταξύ των ερευνητών είναι πως η ενδομητρίωση είναι μια γενετικώς μεταδιδόμενη νόσος, που έχει ως αποτέλεσμα τη διαφορετική ανοσολογική απόκριση, άρα και διαφορετική ανοχή, στην προσκόλληση και την ανάπτυξη του έκτοπου ενδομητρικού ιστού.

7.2. Περιβαλλοντική έκθεση σε χημικές ουσίες

Τα τελευταία χρόνια η μελέτη περιβαλλοντικών ουσιών που παρεμβάλλονται στην ομαλή λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος της γυναίκας αποτελεί πόλο έλξης για πολλούς διακεκριμένους ερευνητές. Οι ουσίες αυτές καλούνται διαταράκτες. Η περιβαλλοντική έκθεση σε ορισμένες από αυτές τις ουσίες έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση της ενδομητρίωσης. Πρόκειται για πολυαλογονομένους αρωματικούς υδρογονάνθρακες, όπως οι διοξίνες και τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs). Τα PCBs βρίσκονται σε αφθονία στο περιβάλλον, προσδίδουν αντοχή στη θερμοκρασία και σταθερότητα και εντοπίζονται κυρίως στον ηλεκτρολογικό εξοπλισμό, στα λιπαντικά και στα πλαστικά. Οι διοξίνες παράγονται ως ίχνη κατά τη διάρκεια της καύσης οργανικών στοιχείων και κατά τη διάρκεια διαφόρων βιομηχανικών επεξεργασιών. Η έκθεση στις διοξίνες επιτυγχάνεται μέσω της συσσώρευσής τους στα διατροφικά μας στοιχεία (16). Η δράση των διοξινών και των PCBs φαίνεται πως διαμεσολαβείται από την αλληλεπίδρασή τους με των υποδοχέα των αρυλ-υδρογοναθράκων (AhR). Πρόκειται για ένα πυρηνικό υποδοχέα που προσδένει κάποια άγνωστη περιβαλλοντική ουσία που δρα ως

μεταγραφικός παράγοντας. Επιπλέον, τα PCBs μπορεί να δράσουν και ανεξάρτητα από τον AhR και να επηρεάσουν τον υποδοχέα των οιστρογόνων (17, 18).

Οι Rier et al. σε μελέτη τους κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει αυξημένη επίπτωση της ενδομητρίωσης σε πειραματόζωα που είχαν εκτεθεί χρονίως σε διοξίνες και PCBs. Ανέφεραν επίσης μεταβολές στην ανοσολογική απόκριση των πειραματοζώων. Η έκθεση σε διοξίνες συσχετίστηκε με αύξηση της παραγωγής του TNF- α και μείωση της κυτταροτοξικότητας των NK κυττάρων (17).

Σε ότι αφορά όμως αντίστοιχες μελέτες στο ανθρώπινο είδος, τα αποτελέσματα δεν καταδεικνύουν ευκρινώς τη σχέση αιτίας-αποτελέσματος. Οι Eskinazi και συνεργάτες πραγματοποίησαν μια μελέτη στον πληθυσμό της πόλης Σεβέσο της Ιταλίας, στην οποία η πρόκληση έκρηξης σε ένα εργοστάσιο είχε ως αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη έως τώρα γνωστή έκθεση πληθυσμού στην ουσία 2,3,7,8-τετραχλωροδιβενζο-p-διοξίνη (TCDD). Οι γυναίκες που είχαν υψηλά επίπεδα της ουσίας στο αίμα τους, είχαν σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης ενδομητρίωσης 2,1 σε σύγκριση με τις γυναίκες με χαμηλά επίπεδα TCDD στο αίμα τους, χωρίς όμως την εμφάνιση στατιστικά σημαντικής σχέσης (19).

7.3. Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου, οξειδωτικό stress και ενδομητρίωση

Κάποιοι ερευνητές αναφέρουν ότι οι δραστικές μορφές του οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS) θα μπορούσαν να εμπλακούν στην παθογένεση της ενδομητρίωσης. Οι ROS παράγονται κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού του οξυγόνου στον αναπνευστικό κύκλο όταν ένα ηλεκτρόνιο μεταφέρεται στο οξυγόνο παράγοντας ένα υπεροξειδικό ανιόν (O_2^-) (20). Με τη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης και την αναγωγή του υπεροξειδικού ανιόντος με την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου, σχηματίζεται το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Στη συνέχεια το υπεροξείδιο του υδρογόνου με τη δράση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και της καταλάσης μετατρέπεται σε H_2O και O_2 (21).

Οι ROS προκαλούν βλάβες στα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊνικά οξέα. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων είναι ιδιαίτερος επιζήμια, καθώς προκαλεί βλάβες στην κυτταρική μεμβράνη. Επιπλέον, αυτές οι αντιδράσεις πολλές φορές καταλύονται από μεταβατικά μέταλλα. Ο δισθενής σίδηρος αλληλεπιδρώντας με το υπεροξείδιο του υδρογόνου προκαλεί την απελευθέρωση ελευθέρων ριζών υδροξυλίου. Συνεπώς, η διαπίστωση αυτή μας οδηγεί στην υπόθεση πως η παρουσία σιδήρου στην περιτοναϊκή κοιλότητα, ως αποτέλεσμα της παλίνδρομης εμμήνου ρύσεως εμπλέκεται στην παθογένεση της ενδομητρίωσης (20, 21). Επιπλέον, διάφοροι ερευνητές έχουν διαπιστώσει αυξημένες συγκεντρώσεις προϊόντων υπεροξειδωσης των συμπλεγμάτων των λιποπρωτεϊνών στο περιτοναϊκό υγρό ασθενών με ενδομητρίωση (22). Συγκεκριμένες λιποπρωτεΐνες που έχουν υποστεί οξείδωση μπορούν να αποτελέσουν χυμικά ερεθίσματα για την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και των T-λεμφοκυττάρων (23).

Το οξειδωτικό stress είναι η κατάσταση που προκαλείται όταν υπάρχει μια ανισορροπία μεταξύ των οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων που ευνοεί την επικράτηση της οξείδωσης (24). Το οξειδωτικό stress μπορεί να έχει πολύ σημαντικές επιδράσεις στην

αναπαραγωγική υγεία της γυναίκας, επηρεάζοντας την ωοθυλακιορρηξία, τη γονιμοποίηση, την εμβρυική ανάπτυξη και την εμφύτευση (25). Συνεπώς το οξειδωτικό stress μπορεί να θεωρηθεί αιτία υπογονιμότητας της γυναίκας, κάτι που είναι εμφανές στην περίπτωση της ενδομητρίωσης. Ειδικότερα, μελέτες έχουν δείξει πως οι δείκτες οξειδωτικού stress είναι αυξημένοι στο περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση. Κύτταρα που επάγουν το οξειδωτικό stress είναι τα ερυθροκύτταρα, τα κύτταρα του ενδομητρίου που δεν υφίστανται απόπτωση και τα ενδομητρικά κύτταρα που παλινδρομούν και δε φαγοκυτταρώνονται κατά την έμμηνο ρύση. Οι παράγοντες αυτοί προκαλούν ενεργοποίηση και στρατολόγηση των φαγοκυττάρων. Επίσης, τα ενεργοποιημένα μακροφάγα επάγουν το οξειδωτικό stress, την υπεροξειδωση των λιπιδίων και άλλων προϊόντων του μεταβολισμού. Το οξειδωτικό stress προάγει την εμφάνιση τοπικής πυελικής φλεγμονώδους αντίδρασης με αποτέλεσμα την αύξηση των συγκεντρώσεων των κυτταροκινών, των αυξητικών παραγόντων και άλλων μεσολαβητών της φλεγμονής (26). Οι Szczerańska και συνεργάτες (27) παρατήρησαν μια μείωση της υπεροξειδικής δισμουτάσης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στο περιτοναϊκό υγρό των ασθενών με ενδομητρίωση. Επίσης, στην ενδομητρίωση έχουμε υπερπαραγωγή των αντιοξειδωτικών ενζύμων ως αποτέλεσμα της αθρόας παραγωγής των ελευθέρων ριζών. Έτσι, η οξειδάση της ξανθίνης και η υπεροξειδική δισμουτάση υπερεκφράζονται στην ενδομητρίωση (28-30).

7.4. Μεταλλοπρωτεϊνάσες του στρώματος και ενδομητρίωση

Το σύστημα των μεταλλοπρωτεασών ή μεταλλοπρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας (MMP–matrix metalloproteases or metalloproteinases) αποτελείται από ένα ενζυματικό στοιχείο, τις MMPs, και από ένα ανασταλτικό στοιχείο των ενζύμων, τους ιστικούς αναστολείς των μεταλλοπρωτεασών τους TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteases) (31). Είναι καλά τεκμηριωμένο το ότι το σύστημα των MMPs παίζει καθοριστικό ρόλο στη φυσιολογική εξέλιξη και ανάπτυξη του ενδομητρίου, καθώς και σε πολλές άλλες φυσιολογικές διαδικασίες σε άλλους ιστούς. Εξαιτίας της αναγκαιότητας για ισορροπία ανάμεσα σε MMPs και TIMPs, δεν είναι παράξενο που η διαφορετική αναλογία έκφρασης των MMPs και TIMPs σχετίζεται με την παθοφυσιολογία της ενδομητρίωσης. Τόσο το έκτοπο όσο και το φυσιολογικό ενδομήτριο γυναικών με ενδομητρίωση παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση των MMPs και TIMPs, κάτι που ευνοεί την ιστική διεισδυτικότητα και την αλλαγή της δομής στον ενδομητριωσικό ιστό. Ως εκ τούτου, έχει προταθεί ότι μία επιτυχής θεραπευτική παρέμβαση στο σύστημα των MMPs θα μπορούσε να περιορίσει ή να προλάβει τα βήματα που είναι απαραίτητα για την πρόκληση ή και την εξέλιξη της ενδομητρίωσης, διανοίγοντας νέους δρόμους στη φαρμακευτική αντιμετώπιση της ενδομητρίωσης.

Οι Paul και συνεργάτες (32) μελέτησαν το ρόλο της μελατονίνης στη ρύθμιση της MMP-9 μέσω του ιστικού αναστολέα της μεταλλοπρωτεάσης-1 (TIMP-1), με τελικό αποτέλεσμα την προστασία από την ανάπτυξη ενδομητρίωσης. Στη μελέτη αυτή, ανθρώπινοι ενδομητριωσικοί ιστοί, διαφορετικού σταδίου, εξετάστηκαν για την έκφραση της προ-MMP-9 και του TIMP-1. Η έκφραση της προ-MMP-9 βρέθηκε αυξημένη, ενώ η έκφραση

του TIMP-1 ακολουθούσε αντίστροφη τάση. Η δράση της μελατονίνης, ενός σημαντικού εκκριτικού παραγώγου της επίφυσης, εξετάστηκε σε πειραματικά μοντέλα μυών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μελατονίνη ανέστειλε την υπεροξειδωση των λιπιδίων και την οξειδωση των πρωτεϊνών και ελάττωσε τη δραστηριότητα και την έκφραση της προ-MMP-9 με ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο, ενώ λειτούργησε προστατευτικά προκαλώντας ύφεση των εστιών της περιτοναϊκής ενδομητρίωσης. Επιπρόσθετα, η ελαττωμένη δραστηριότητα και έκφραση της προ-MMP-9 συσχετίστηκε με επακόλουθη αύξηση της έκφρασης του TIMP-1. Συμπερασματικά, ο λόγος της έκφρασης του προ-MMP-9 προς την έκφραση του TIMP-1 αναγνωρίστηκε ως παράγοντας για την εκτίμηση της βαρύτητας και της εξέλιξης της ενδομητρίωσης.

Σε μία άλλη μελέτη, οι Collette και συνεργάτες (33) μελέτησαν την έκφραση της MMP-9 στο φυσιολογικό ενδομήτριο γυναικών με ενδομητρίωση. Τα ευρήματά τους έδειξαν ότι η διαταραχή της ισορροπίας MMP-9/TIMP-1 συμβάλλει στην αύξηση της διεισδυτικότητας του ενδομητριοσικού ιστού σε ασθενείς με ενδομητρίωση και στην έκτοπη ανάπτυξη ενδομητρίου. Η ίδια ερευνητική ομάδα (34) εργάστηκε περαιτέρω πάνω στη διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στις MMPs και το φυσικό τους αναστολέα, τον TIMP-1, και διαπίστωσε μία αυξημένη πρωτεολυτική δράση στο φυσιολογικό ενδομήτριο γυναικών με ενδομητρίωση και έναν ιδιαίτερο ρόλο της MMP-9. Με τη χρήση western blotting, οι MMP-9 και MMP-2 ανιχνεύτηκαν στο καλλιεργητικό μέσο σε κυτταροκαλλιέργειες ενδομητρίωσης. Επιπρόσθετα, με τη χρήση ELISA, βρέθηκε ότι η έκκριση MMP-9 ήταν αυξημένη σε γυναίκες με ενδομητρίωση σε σύγκριση με υγιείς γυναίκες. Το συμπέρασμα που προέκυψε ήταν ότι η αύξηση της πρωτεόλυσης και η ανισορροπία ανάμεσα στην έκκριση της MMP-9 και του φυσικού της αναστολέα TIMP-1 στο καλλιεργητικό μέσο του ενδομητριοσικού ιστού πιθανόν να αντανakλά την αυξημένη ικανότητα του ιστού αυτού να διασπά *in vivo* την εξωκυττάρια ουσία, διευκολύνοντας έτσι την έκτοπη εμφύτευση και ανάπτυξη του ενδομητρίου. Ο πιθανός ρόλος της MMP-9 και του TIMP-1 στην παθογένεια της ενδομητρίωσης μελετήθηκε επίσης στο περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση, από τους Stamatowicz και συνεργάτες (35). Τα ευρήματα αυτής της εργασίας συμφωνούν επίσης με την υπόθεση ότι η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ MMP-9 και TIMP-1 μπορεί να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου.

Οι Gaetje και συνεργάτες (36) μελέτησαν την έκφραση της MMP-5-μεμβρανικού τύπου με microarrays και real time PCR. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι στο ενδομήτριο, και αυτό το μέλος του συστήματος των μεταλλοπρωτεασών της εξωκυττάριας ουσίας συμβάλλει σε μία αυξημένη ιστική αναδιαμόρφωση (tissue remodeling) και επιτρέπει την κυτταρική μετανάστευση σε ασθενείς με ενδομητρίωση.

Οι Gillibert-Estelles και συνεργάτες (37) μελέτησαν την έκφραση αγγειογενετικών παραγόντων στην ενδομητρίωση και τη σχέση τους με το σύστημα των μεταλλοπρωτεασών. Στη μελέτη αυτή, παρατηρήθηκε μία σημαντική αύξηση, στο περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση, των επιπέδων του αγγειακού-ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor-VEGF), του ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (urokinase-type Plasminogen Activator-uPA) και των επιπέδων της MMP-3 σε σύγκριση με γυναίκες-μάρτυρες, χωρίς ενδομητρίωση.

Οι MMP-3 και uPA μελετήθηκαν επίσης από τους Ramon και συνεργάτες (38) με τη χρήση ποσοτικής realtime RT-PCR. Στη μελέτη αυτή, παρατηρήθηκε μία αύξηση στα επίπεδα του uPA και της MMP-3 στο ενδομήτριο γυναικών με ενδομητρίωση, κάτι που μπορεί να διευκολύνει την προσκόλληση του ενδομητριωσικού ιστού στο περιτόναιο και στην επιφάνεια της ωοθήκης, καθώς και τη διείσδυση στην εξωκυττάρια ουσία, με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό πρώιμων ενδομητριωσικών εστιών. Μία άλλη μελέτη, από τους Gillabert-Estelles και συνεργάτες (39), κατέληξε σε παρόμοια συμπεράσματα. Στην εργασία αυτή, αναλύθηκε η έκφραση διαφορετικών μελών των συστημάτων του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου και των MMPs στην ενδομητρίωση και βρέθηκε ότι οι ωοθηκικοί ενδομητριωσικοί ιστοί εμφάνιζαν υψηλότερα επίπεδα του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου 1 (Plasminogen Activator Inhibitor-PAI-1) και του TIMP-1, σε σύγκριση με το φυσιολογικό ενδομήτριο. Το συνολικό συμπέρασμα είναι ότι η αύξηση των uPA και MMP-3 στο ενδομήτριο γυναικών με ενδομητρίωση οδηγεί σε αύξηση της διεισδυτικής ικανότητας των ενδομητριωσικών κυττάρων.

Από τη στιγμή που θα δημιουργηθεί μία ενδομητριωσική εστία, ανιχνεύεται μία αύξηση των PAI-1 και TIMP-1, με αποτέλεσμα την παύση περαιτέρω πρωτεολυτικής δραστηριότητας. Η αύξηση των αναστολέων και η μείωση της πρωτεολυτικής δραστηριότητας θα μπορούσε επίσης να εξηγήσει το συχνό κλινικό εύρημα απομονωμένων ενδομητριωσικών κύστεων χωρίς διήθηση του γύρω ωοθηκικού ιστού. Σε μία άλλη μελέτη, οι Chung και συνεργάτες (40) ανέλυσαν την έκφραση της MMP-9 και του TIMP-3 σε έκτοπο και φυσιολογικό ενδομήτριο γυναικών με ενδομητρίωση. Τα ευρήματά τους δείχνουν ότι, τόσο το έκτοπο όσο και το φυσιολογικό ενδομήτριο ασθενών με ενδομητρίωση, μπορεί να είναι περισσότερο διεισδυτικά και περισσότερο ικανά για να εμφυτευτούν στο περιτόναιο, λόγω της αυξημένης έκφρασης MMP και της ελαττωμένης έκφρασης TIMP-3 σε σύγκριση με γυναίκες χωρίς ενδομητρίωση.

Η έκφραση ενός άλλου μέλους της οικογένειας των MMPs, της MMP-2, αναλύθηκε από τους Kim και συνεργάτες (41) μαζί με την έκφραση των CD44s, του VEGF και του Ki-67 σε περιτοναϊκή, ορθοκολπική και ωοθηκική ενδομητρίωση. Σε ερυθρές και λευκές εστίες ενδομητρίωσης, παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση MMP-2 στο στρώμα, από ό,τι σε μελανές εστίες. Επίσης, η έκφραση της MMP-2 ήταν σημαντικά υψηλή σε προχωρημένη ενδομητρίωση (στα στάδια III και IV σύμφωνα με την αναθεωρημένη ταξινόμηση της Αμερικανικής Εταιρίας Γονιμότητας), κάτι που δείχνει ότι η MMP-2 μπορεί να είναι υπεύθυνη για την εξέλιξη της ενδομητρίωσης. Παραπλήσια ευρήματα σε ό,τι αφορά την MMP-2 και τον VEGF είχαν και οι Lu και συνεργάτες (42) σε ένα πειραματικό μοντέλο σε ποντικούς. Όπως και τα άλλα μέλη της οικογένειας των MMPs, έτσι και η MMP-1 φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στους μηχανισμούς της τοπικής διήθησης. Οι Hudelist και συνεργάτες (43) παρατήρησαν ότι η ιντερλευκίνη-1α και η MMP-1 είναι αυξημένες σε έκτοπο ενδομήτριο ασθενών με ενδομητρίωση, κάτι που υποδηλώνει την ανάμειξή τους στους παθογενετικούς μηχανισμούς που οδηγούν σε τοπική διήθηση και ιστική καταστροφή.

Συνοψίζοντας τα ευρήματα από τη βιβλιογραφία, γίνεται σαφές ότι η οικογένεια των μεταλλοπρωτεασών της εξωκυττάριας ουσίας (MMPs) και οι φυσικοί ανταγωνιστές τους, οι αναστολείς των μεταλλοπρωτεασών (TIMPs), καθώς και το σύστημα του

πλασμινογόνου παίζουν σημαντικό ρόλο στην αιτιοπαθογένεια της ενδομητρίωσης. Χρειάζεται πάντως, ακόμα σημαντική ερευνητική προσπάθεια για να αναγνωριστεί ποια μόρια είναι πιο σημαντικά στο μηχανισμό της δημιουργίας και της εξέλιξης της ενδομητρίωσης, καθώς και για να ανακαλυφτεί ποια μόρια θα ήταν πιο κατάλληλα ως δείκτες της νόσου και ποια ως στόχοι σε θεραπευτικά μοντέλα (44).

7.5. Τοπικοί περιτοναϊκοί και ανοσολογικοί παράγοντες

Τοπικοί παράγοντες του περιτοναϊκού υγρού και η διαφορετική ανοσολογική απάντηση κατά τη διάρκεια της παλίνδρομης εμμήνου ρύσεως φαίνεται να σχετίζονται με την παθογένεια και την επιβίωση των έκτοπων ενδομητριωσικών εμφυτευμάτων. Η ενδομητρίωση αποτελεί ουσιαστικά τη συνισταμένη τριών μηχανισμών που λειτουργούν παράλληλα. Οι μηχανισμοί αυτοί είναι η πλημμελής καταστροφή των κυττάρων του ενδομητρίου που καταλήγουν στο περιτοναϊκό υγρό, η ικανότητα εμφύτευσής τους στην επιφάνεια του περιτοναίου και η επιβίωση, η αύξηση και ο πολλαπλασιασμός τους ώστε να δημιουργηθούν οι ενδομητριωσικές εστίες. Για την καλύτερη κατανόηση όμως των μηχανισμών αυτών θα πρέπει πρώτα να παραθέσουμε ορισμένα στοιχεία φυσιολογίας για την κυτταρική και ανοσολογική συμμετοχή των τοπικών παραγόντων του περιτοναϊκού υγρού.

7.5.1. Το κυτταρικό περιεχόμενο του περιτοναϊκού υγρού

Το περιτοναϊκό υγρό περιέχει σε φυσιολογικές συνθήκες 10^6 κύτταρα ανά ml που στην πλειοψηφία είναι μακροφάγα (85% περίπου), λεμφοκύτταρα και μεσοθηλιακά κύτταρα (15% περίπου). Σε γυναίκες που εμφανίζουν ενδομητρίωση και ανεξήγητη υπογονιμότητα διαπιστώνονται αυξημένες συγκεντρώσεις διαφορετικών λευκοκυτταρικών υποπληθυσμών όπως είναι τα μακροφάγα, τα T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK κύτταρα) (45). Στο φυσιολογικό ενδομήτριο τα λευκοκύτταρα αποτελούν το 25% των κυττάρων του στρώματος. Η πλειονότητα αυτών των κυττάρων είναι μακροφάγα και T-λεμφοκύτταρα. Στα ενδομητριωσικά εμφυτεύματα έχουν ανευρεθεί αυξημένες συγκεντρώσεις λευκοκυττάρων στο στρώμα σε σύγκριση με το φυσιολογικό ενδομήτριο. Επιπλέον, ο αριθμός των NK κυττάρων εμφανίζεται μειωμένος στις έκτοπες εστίες(46-49).

Τα μακροφάγα λειτουργούν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα προς τα T-λεμφοκύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους στέλνουν τα κατάλληλα μηνύματα για την παραγωγή αντισωμάτων και την ενεργοποίηση της ανοσολογικής απάντησης. Στην περιτοναϊκή κοιλότητα τα κύτταρα αυτά εμπλέκονται στην απομάκρυνση τόσο των ξένων αντιγόνων όσο και των ίδιων κατεστραμμένων κυττάρων. Η αναγνώριση των αντιγόνων και η δημιουργία κυττάρων μνήμης μπορεί γενικά να προκαλέσει την πυροδότηση της ανοσολογικής απάντησης και την εμφάνιση 1) αυτοάνοσου νόσου, 2) ανοσολογικής αντοχής και 3) απόρριψης μοσχεύματος που περιέχει αλλο-αντιγονικό δυναμικό. Ο

τελευταίος αυτός μηχανισμός φαίνεται να κινητοποιείται στις γυναίκες με παλίνδρομο έμμηνο ρύση και εξουδετερώνει τις έκτοπες ενδομητριωσικές εστίες (50).

7.5.2. Η ενδομητρίωση είναι μια φλεγμονώδης νόσος

Η ενδομητρίωση σχετίζεται με αλλαγές τόσο στην κυτταρική όσο και στη χυμική ανοσία. Αν και το περιτοναϊκό υγρό των γυναικών με ενδομητρίωση εμφανίζει μεγάλο αριθμό ανοσοκυττάρων, η λειτουργικότητα των οποίων ποικίλλει από ανασταλτικό έως και ευωδωτικό ρόλο. Τα λευκοκύτταρα τα οποία φυσιολογικά θα ήταν υπεύθυνα για την απομάκρυνση των ενδομητρικών κυττάρων από την περιτοναϊκή κοιλότητα, επιτρέπουν την στρατολόγησή τους μέσω ενός μεγάλου αριθμού κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων. Δεν έχει διαλευκανθεί ωστόσο ακόμα εάν αυτές οι ανοσολογικές διαταραχές προάγουν την εμφάνιση της ενδομητρίωσης ή αν είναι αποτέλεσμά της. Παρόλα αυτά, η έκταση των ανοσολογικών μεταβολών φαίνεται να σχετίζεται με την εμφύτευση και ανάπτυξη των ενδομητριωσικών κυττάρων, τη δημιουργία δηλαδή ενδομητριωσικών εστιών, και την ανάπτυξη σε όλα τα στάδια της νόσου.

Οι ανοσολογικές μεταβολές που ανευρίσκονται στις γυναίκες με ενδομητρίωση, φαίνεται να σχετίζονται με τη συμπτωματολογία του άλγους και της υπογονιμότητας. Η συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων αυξάνει την απελευθέρωση των προσταγλανδινών, προάγοντας έτσι περαιτέρω τη φλεγμονή, την ιστική βλάβη και την εμφάνιση συμφύσεων. Αποτέλεσμα τούτου μπορεί να είναι η εξέλιξη της δυσμηνόρροιας σε δυσπαρέυνεια και χρόνια πυελικό άλγος. Επιπλέον, η δημιουργία συμφύσεων μπορεί να επηρεάσει τη βατότητα των ωαγωγών, ενώ το φλεγμονώδες περιβάλλον μπορεί να επιδράσει επιβαρυντικά για την ωοθυλακιογένεση, τη γονιμοποίηση και την εμφύτευση του εμβρύου. Για όλους τους ανωτέρω λόγους η ενδομητρίωση θεωρείται μια φλεγμονώδης νόσος. Είναι σχεδόν αδύνατο να απομονώσει κανείς τις επιδράσεις των ενδομητριωσικών εστιών από τις αντίστοιχες ανοσολογικές μεταβολές (51).

7.5.3. Κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες που παράγονται από τα κύτταρα του περιτοναϊκού υγρού

Μετά από μια σειρά από ερεθίσματα, τα μακροφάγα και τα Τ-λεμφοκύτταρα υπόκεινται σταδιακή ενεργοποίηση. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παρουσιάζουν αυξημένη φαγοκυττάρωση, αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου και αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων, προσταγλανδινών και λυσοζυμικών ενζύμων (11). Έτσι τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παράγουν τις προφλεγμονώδεις κυττοκίνες IL-1 και TNF-α. Η IL-1 προκαλεί αύξηση της παραγωγής IL-2 από τα Τ-λεμφοκύτταρα, που εφενός μεν προκαλεί αύξηση της παραγωγής ιντερφερόνης-γ (INF-γ) από αυτά και αφετέρου αυξάνει τον πληθυσμό των υποδοχέων της IL-2 σε αυτά. Ο TNF-α ενεργοποιεί τη φλεγμονώδη απάντηση και διεγείρει τα μακροφάγα να παράγουν άλλες κυτταροκίνες όπως IL-1, IL-6 και περισσότερο TNF-α. Η IL-1 δρα επίσης στα μονοκύτταρα και αυξάνει περαιτέρω την παραγωγή IL-1 και IL-6. Η ενεργοποίηση των NK κυττάρων δεν είναι αντιγονοεξαρτώμενη αλλά επηρεάζεται θετικά από τις κυτταροκίνες IL-1, IL-2 και TNF-α, ενώ ταυτόχρονα παράγουν και INF-γ (11).

Πιθανολογείται ότι τα ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα του περιτοναϊκού υγρού συμβάλλουν στην παθολόγηση της ενδομητρίωσης με την έκκριση κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων. Σε ασθενείς με ενδομητρίωση έχουν διαπιστωθεί αυξημένα επίπεδα της IL-1 και του TNF-α στο περιτοναϊκό υγρό, όπως επίσης και δύο άλλων κυτταροκινών των IL-6 και IL-8. Οι τελευταίες συμβάλλουν σημαντικά στην αγγειογένεση (52), ενώ η IL-8 αποτελεί παράγοντα που προκαλεί μετανάστευση των λευκοκυττάρων.

Μετά την ενεργοποίησή τους τα Τ-βοηθοί λεμφοκύτταρα (Th) διαφοροποιούνται σε Th I και Th II λεμφοκύτταρα. Τα Th I παράγουν IL-2, INF-γ και IL-12 που αποτελούν τους κύριους παράγοντες κυτταρικής ανοσοποίησης (52). Τα Th II παράγουν τις κυτταροκίνες IL-4, IL-5, IL-10 και IL-13 που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση Β-λεμφοκυττάρων και στην αναστολή της κυτταρικής ανοσίας (53). Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει αυξημένα επίπεδα των κυτταροκινών που παράγονται από τα Th II και μειωμένα επίπεδα κυτταροκινών που παράγονται από τα Th I στο περιτοναϊκό υγρό των γυναικών με ενδομητρίωση (54, 55).

Παρά τις διαπιστώσεις για τις αυξημένες ή μειωμένες συγκεντρώσεις των διαφόρων κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων στο περιτοναϊκό υγρό των ασθενών με ενδομητρίωση, δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμη εάν οι κυτταροκίνες συμβάλλουν στη δημιουργία των ενδομητριωσικών εστιών ή αν αποτελούν το αποτέλεσμα της ανοσολογικής απάντησης.

Ένας άλλος παράγοντας ο TGF-β (transforming growth factor-β) που παράγεται από τα ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα βρίσκεται σε αυξημένες συγκεντρώσεις στο περιτοναϊκό υγρό των γυναικών με ενδομητρίωση (56). Πρόκειται για έναν πλειοτροπικό παράγοντα με άλλοτε άλλες δράσεις. Φαίνεται πως σχετίζεται με την κυτταρική αύξηση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών. Στην ενδομητρίωση είναι ιδιαίτερος σημαντικός καθώς ανταγωνίζεται πολλές από τις δράσεις των λεμφοκυττάρων. Για παράδειγμα, ο TGF-β μπορεί να αναστείλει την μετανάστευση, μετά από διέγερση, των Τ λεμφοκυττάρων και να αναστείλει την ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων. (57)

Στην ολική θεώρηση της ενδομητρίωσης δε θα πρέπει να παραληφθεί ο ρόλος αγγειογενετικών παραγόντων όπως ο VEGF (vascular endothelial growth factor). Έχει υπολογιστεί πως για αύξηση του κυτταρικού όγκου της τάξεως των 10^6 κυττάρων, θα χρειαστεί μια καινούρια αγγειακή παροχή αίματος. Η παραγωγή των αγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων από τις ενδομητριωσικές βλάβες, θεωρείται πως είναι ένας από τους μηχανισμούς που συμβάλλουν στην εδραίωση και αύξησή τους. Συγκεκριμένα, οι Oosterlynck και συνεργάτες διαπίστωσαν αυξημένες συγκεντρώσεις αγγειογενετικών παραγόντων στο περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση (58). Έχει αποδειχθεί ότι τα μακροφάγα (τόσο του περιτοναϊκού υγρού όσο και του στρώματος των ενδομητριωσικών εμφυτευμάτων) είναι η κύρια πηγή του VEGF. Επίσης έχουν διαπιστωθεί υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης στα μακροφάγα και η διέγερση με τα δύο αυτά στεροειδή προκάλεσε την αύξηση της παραγωγής του VEGF (59). Εκτός όμως από τα μακροφάγα, η επίδραση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης στα κύτταρα του

στρώματος του ενδομητρίου φαίνεται επίσης να αυξάνει την παραγωγή του VEGF (60). Ως εκ τούτου, ο παράγοντας VEGF που παράγεται από τα κύτταρα του ενδομητρίου αλλά και από τα μακροφάγα, θα μπορούσε να επηρεάζει την αύξηση των ενδομητριωσικών βλαβών.

7.5.4. Μηχανισμός πλημμελούς καταστροφής των ενδομητρικών κυττάρων του περιτοναϊκού υγρού

Τα NK κύτταρα αποτελούν ένα κυτταρικό πληθυσμό, οι λειτουργικές δραστηριότητες του οποίου επικεντρώνονται στη διαφύλαξη από την εισβολή ξένων αντιγόνων όπως πχ. φυσιολογικά κύτταρα προσβεβλημένα από ιό ή νεοπλασματικά κύτταρα. Η κυτταρική αποδομή επιτυγχάνεται ταχέως με την έκκριση κυτταροκινών ή έμμεσα με την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων (IL-1, IL-2, IL-12, TNF- α , INF- γ)(53, 61). Σήμερα αποτελεί κοινή παραδοχή ότι τα NK κύτταρα του περιτοναϊκού υγρού αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στην εμφύτευση των ενδομητρικών κυττάρων που προέρχονται από την παλινδρόμηση της έμμηνου ρύσεως (62, 63). Επίσης, τα NK κύτταρα έχει αποδειχθεί πως προκαλούν λύση ενδομητριωσικών εστιών *in vitro* (64). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε γυναίκες με ενδομητρίωση έχει επιβεβαιωθεί μείωση της κυτταροτοξικότητας των NK κυττάρων (65) και μειωμένη τοπική δραστικότητα των NK κυττάρων στο περιτοναϊκό υγρό (66).

Η μειωμένη δραστικότητα των NK κυττάρων στο αίμα φαίνεται να σχετίζεται με την αυξανόμενη στάθμη των οιστρογόνων κατά τη διάρκεια της παραγωγικής φάσης του κύκλου (67), αφού η χορήγηση GnRH αναλόγων προκάλεσε αύξηση της δραστικότητας των NK κυττάρων στο περιφερικό αίμα σε γυναίκες με ενδομητρίωση (68).

Πάντως, η αιτία της μειωμένης δραστικότητας των NK κυττάρων στην ενδομητρίωση παραμένει αδιευκρίνιστη, επειδή τα αποτελέσματα των κυτταροκινών που την επηρεάζουν είναι αντιφατικά. Για παράδειγμα, από τους παράγοντες TGF- β , TNF- α , IL-1 και PGE₂ που βρίσκονται να έχουν αυξημένες συγκεντρώσεις στο περιτοναϊκό υγρό των γυναικών με ενδομητρίωση, ο TGF- β και η PGE₂ καταστέλλουν τη δραστικότητα των NK κυττάρων, (56, 69) ενώ η IL-1 και ο TNF- α τη διεγείρουν (62). Οποσδήποτε όμως, η επικρατούσα άποψη σήμερα είναι πως τα ενδομητρικά κύτταρα που παλινδρομούν με την έμμηνο ρύση αυτολύονται πλημμελώς σε γυναίκες με ενδομητρίωση, επειδή η δραστικότητα των NK κυττάρων είναι ελαττωμένη (11).

7.5.5. Μηχανισμός συγκόλλησης και εμφύτευσης των ενδομητρικών κυττάρων του περιτοναϊκού υγρού στο υγιές περιτόναιο.

Τα τελευταία χρόνια έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος στην απομόνωση ουσιών (χυμοκίνες) και υποδοχέων των κυτταρικών μεμβρανών (ιντεγκρίνες) που συμβάλλουν στην κατανόηση της παθογένεσης της ενδομητρίωσης.

Η παρουσία των χυμοκινών όπως η πρωτεΐνη MCP-1 δίνει το έναυσμα για τη μετανάστευση των μονοκυττάρων, των T-λεμφοκυττάρων και των NK κυττάρων στο περιτοναϊκό υγρό, ενώ η IL-8 και το GRO- α δίνουν το αντίστοιχο μήνυμα στα

ουδετερόφιλα. Τόσο τα μακροφάγα που αφθονούν στο περιτοναϊκό υγρό των γυναικών με ενδομητρίωση όσο και τα μεσοεπιθηλιακά και ενδομητρικά κύτταρα, αποτελούν δυνητικές πηγές βιοσύνθεσης χυμοκινών.

Στο περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση, όλες οι χυμοκίνες βρίσκονται σε αφθονία προκαλώντας μαζική μετανάστευση των κυττάρων της λευκής σειράς (70, 71). Επιπλέον, οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1 β και TNF- α που επίσης είναι αυξημένες στο περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση (72, 73), διεγείρουν την παραγωγή χυμοκινών (70, 71). Στα εκκριτικά κύτταρα του φυσιολογικού ενδομητρίου ανιχνεύεται όλη η σειρά των ιντεγκρινών α_1 - α_6 και α_v των οικογενειών β_1 και β_3 . Ειδικά η ιντεγκρίνη $\alpha_4\beta_1$ που απουσιάζει στο περιτοναϊκό υγρό των γυναικών χωρίς ενδομητρίωση, βρίσκεται αυξημένη σε γυναίκες με τη νόσο (74). Η ιντεγκρίνη $\alpha_4\beta_1$ λειτουργεί ως υποδοχέας της φμπρονεκτίνης, η οποία επίσης βρίσκεται αυξημένη στις γυναίκες με ενδομητρίωση. Έτσι, θα μπορούσε να προκαλέσει τη συγκόλληση των ενδομητρικών κυττάρων που προέρχονται από την παλίνδρομη εμμηνορροσία με το εξωκυττάριο πλέγμα του περιτοναϊκού επιθηλίου. Η όλη διαδικασία κατευθύνεται από τον επίσης αυξημένο παράγοντα TNF- α . (62)

Ένα άλλο μόριο έχει εμπλακεί επίσης στην παθογένεση της ενδομητρίωσης. Πρόκειται για την πρωτεΐνη RANTES (Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted) που είναι παράγωγο των T-λεμφοκυττάρων και ρυθμίζει τη στρατολόγηση και ενεργοποίηση των μακροφάγων. Σε ασθενείς με ενδομητρίωση έχουν ανευρεθεί αυξημένες συγκεντρώσεις της ουσίας στο περιτοναϊκό υγρό (75). Αξίζει να σημειωθεί πως στις περιπτώσεις γυναικών με ενδομητρίωση έχει βρεθεί πως τα μακροφάγα του περιτοναϊκού υγρού εκτός από τη στρατολόγησή τους έχουν και παρατεταμένη διάρκεια ζωής, καθώς έχουν αυξημένη έκφραση του γονιδίου Bcl-2, μιας πρωτεΐνης δηλαδή που δρα αναστέλλοντας τη διαδικασία της απόπτωσης (76).

Μετά τη συγκόλληση, η εμφύτευση φαίνεται να προάγεται από τις μεταλλοπρωτεΐνάσες, ουσίες γενικά υπεύθυνες για την ανακατάταξη του εξωκυττάριου πλέγματος (77). Η παραγωγή τους ρυθμίζεται από τα στεροειδή της ωοθήκης. Έτσι κατά τη διάρκεια της παραγωγικής φάσης του κύκλου η παραγωγή τους αυξάνεται υπό την επίδραση των οιστρογόνων, ενώ η προγεστερόνη δρα ανασταλτικά (77, 78). Σε αυτή τη δραστηριότητα ίσως να οφείλεται η ευεργετική δράση της προγεστερόνης στην ενδομητρίωση.

7.5.6. Μηχανισμός αύξησης και πολλαπλασιασμού των εμφυτευμένων ενδομητρωσικών κυττάρων (ενδομητρωσικές εστίες).

Η άποψη που υποστηρίζει ότι η αύξηση και ο πολλαπλασιασμός των ενδομητρικών κυττάρων που δημιουργούν τις ενδομητρωσικές εστίες είναι ένας οιστρογονοεξαρτώμενος μηχανισμός (ιδιαίτερα από την οιστραδιόλη- E_2), αποτελεί κοινώς αποδεκτή θεωρία. Στην άποψη αυτή στηρίζεται μεγάλο μέρος της θεραπευτικής αντιμετώπισης της ενδομητρίωσης με τη δημιουργία υποοιστρογονισμού (11).

Σε φυσιολογικές γυναίκες η συνολική ποσότητα της E_2 προέρχεται από την αρωματοποίηση της Δ_4 -Ανδροστενδιόνης (Δ_4 -A). Κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου, η Δ_4 A παράγεται από τα κύτταρα της θήκης και μεταβολίζεται με τη βοήθεια της αρωματάσης (του ενζύμου που μετατρέπει τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα-P450_{arom}) των κοκκιωδών κυττάρων της ωοθήκης στο ασθενές βιολογικά οιστρογόνο την οιστρόνη (E_1) που με τη σειρά της μεταβολίζεται στο ισχυρό οιστρογόνο E_2 με τη βοήθεια του ενζύμου 17 β -υδροξυστεροειδικής αφυδρογονάσης τύπου 1 (17 β -HSD-1). Παράλληλα, η Δ_4 A που παράγεται από τα επινεφρίδια μεταβολίζεται από την αρωματάση των ινοβλαστών του δέρματος και του λίπους σε E_1 . (11)

Τόσο στο υγιές ενδομήτριο όσο και στο φθαρτό δεν ανιχνεύεται η έκφραση της αρωματάσης (79). Αυξημένες ποσότητες mRNA αρωματάσης διαπιστώνονται στον καρκίνο του ενδομητρίου, καθώς και στο υγιές ενδομήτριο σε γυναίκες με ενδομητρίωση, αλλά όχι στο ενδομήτριο γυναικών χωρίς τη νόσο (80). Έχει διαπιστωθεί ότι η προσταγλανδίνη E_2 (PGE_2) αυξάνει σημαντικά τη δραστηριότητα της αρωματάσης, άρα και τη βιοσύνθεση της E_2 , στα ενδομητριωσικά κύτταρα του στρώματος, αλλά όχι στα φυσιολογικά (81). Επιπλέον, η E_2 αυξάνει τη βιοσύνθεση της PGE_2 στα ενδομητριωσικά κύτταρα του στρώματος, δημιουργώντας έτσι ένα θετικό μηχανισμό αλληλοεξάρτησης.

Η αυξημένη δραστηριότητα της αρωματάσης των κυττάρων του στρώματος στις περιπτώσεις της ενδομητρίωσης ερμηνεύεται με τη διαταραχή της ισορροπίας που υφίσταται μεταξύ ενός διεγερτικού παράγοντα, του στεροειδογενετικού παράγοντα 1 (SF-1) και ενός ανασταλτικού παράγοντα, του προαγωγού της μεταγραφής παράγοντα (COUP-TF), οι οποίοι δρουν στην ίδια θέση του προαγωγού II (Promoter II) στο γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την έκφραση της αρωματάσης (82). Ο COUP-TF εκφράζεται τόσο στα φυσιολογικά κύτταρα του ενδομητρίου, όσο και στα ενδομητριωσικά κύτταρα, σε αντίθεση με τον SF-1 που εκφράζεται μόνο στα ενδομητριωσικά κύτταρα. Επειδή ο SF-1 έχει μεγαλύτερη χημική συγγένεια με τον Promoter II της αρωματάσης στα ενδομητριωσικά κύτταρα, εκτοπίζει τον παράγοντα COUP-TF προκαλώντας έτσι αυξημένη παραγωγή E_1 και με τη βοήθεια του 17 β -HSD-1 της E_2 (83).

Κατά τη διάρκεια της παραγωγικής φάσης του κύκλου στα φυσιολογικά κύτταρα του ενδομητρίου η 17 β -HSD-1 μεταβολίζει την E_1 σε E_2 , δηλαδή σε ισχυρό βιολογικά μόριο με τη μεγάλη μιτωτική δραστηριότητα. Αντίθετα, κατά τη διάρκεια της εκκριτικής φάσης του κύκλου η αυξανόμενη συγκέντρωση της προγεστερόνης (P), αυξάνοντας τη βιοσύνθεση του ενζύμου 17 β -υδροξυστεροειδικής αφυδρογονάση τύπου 2 (17 β -HSD-2) που μεταβολίζει την E_2 σε E_1 , αποδυναμώνει τη μιτωτική δραστηριότητα στα επιθηλιακά κύτταρα, δημιουργώντας έτσι τη γνωστή προστατευτική δράση της P στα κύτταρα του ενδομητρίου. Στις περιπτώσεις με ενδομητρίωση ενώ η βιοσύνθεση της 17 β -HSD-1 είναι κανονική, στα επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου διαπιστώνεται πλημμελής εμφάνιση της 17 β -HSD-2, με αποτέλεσμα τη μειωμένη μετατροπή της E_2 σε E_1 (84). Με τον τρόπο αυτό στις περιπτώσεις γυναικών με ενδομητρίωση, η αυξημένη σύνθεση της αρωματάσης στα κύτταρα του στρώματος, σε συνδυασμό με την κανονική σύνθεση του 17 β -HSD-1 και την μειωμένη σύνθεση του 17 β -HSD-2 στα επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου

δημιουργεί αύξηση της τοπικής συγκέντρωσης E₂. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της μιτωτικής δραστηριότητας, άρα τον πολλαπλασιασμό των εμφυτευμένων ενδομητριωσικών κυττάρων.

8. Κλινική εικόνα

Τα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου που προσβάλλει κυρίως γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας (συχνότερα 25-45 ετών), εξαρτώνται από τη θέση εντόπισης, τη βαρύτητα και την έκταση της νόσου. Τα συνήθη κλινικά συμπτώματα είναι το χρόνια πυελικό άλγος, η δυσμηνόρροια, η δυσπαρέυνεια, η υπογονιμότητα και η εμφάνιση αιμόρροιας ανεξάρτητα από τον εμμημορρυσιακό κύκλο.

9. Διαφορική Διάγνωση

Η διαφορική διάγνωση του χρόνιου πυελικού άλγους περιλαμβάνει:

1. Γυναικολογικά αίτια

- Ενδομητρίωση
- Αδενομύωση
- Χρόνια πυελική φλεγμονή
- Υδροσάλπιγγα
- Ινωμώματα μήτρας

2. Αίτια από το πεπτικό σύστημα

- Σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου
- Εκκολπωματίτιδα
- Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου

3. Ουροποιητικό σύστημα

- Κυστίτιδα
- Ουρηθρήτιδα
- Ασυνέργεια εξωστήρα και σφυγκτήρα μυ της κύστης
- Χρόνια λιθίαση

4. Μυοσκελετικά αίτια/Ρευματολογικά αίτια

- Ινομυαλγία
- Κήλη
- Δισκοπάθεια
- Αρθρίτιδα
- Σκολίωση

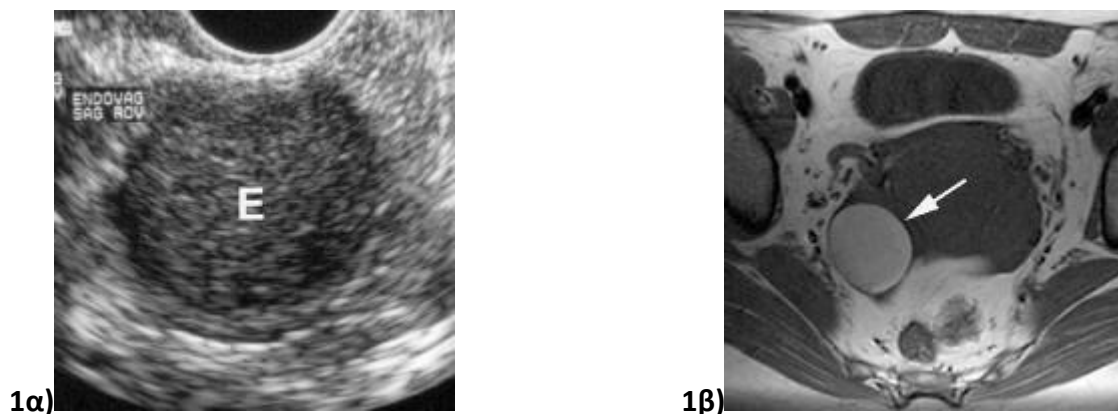
5. Ψυχιατρικά αίτια

- Κατάθλιψη
- Φυσική/Σεξουαλική Κακοποίηση

- Υποχονδρίαση
- Σωματοποίηση stress
- Εξάρτηση από φάρμακα

10. Απεικονιστικά/Εργαστηριακά ευρήματα-Διάγνωση

Η διερεύνηση του χρόνιου πυελικού άλγους και η διάγνωση της ενδομητρίωσης θα τεθεί μετά την ανάλυση του ιστορικού της ασθενούς, τη διενέργεια της φυσικής εξέτασης, τον απεικονιστικό και εργαστηριακό έλεγχο. Η διάγνωση της ενδομητρίωσης τίθεται με βεβαιότητα μόνο μετά τη διενέργεια λαπαροσκόπησης/λαπαροτομίας και την εντόπιση ενδομητριοειδών εστιών. Παρόλα αυτά η προσεκτική λήψη του ιστορικού, η διενέργεια λεπτομερούς κλινικής εξέτασης και ο εργαστηριακός έλεγχος με το CA-125, μπορούν να συμβάλλουν στην διαγνωστική προσέγγιση της ασθενούς. Επιπρόσθετα, ο υπερηχογραφικός έλεγχος και η μαγνητική τομογραφία προσφέρουν σημαντική βοήθεια στη διερεύνηση.



Εικόνα 1α) Υπερηχογραφική εικόνα ενδομητρίωματος, 1β) MRI πυέλου. Επισημαίνεται μια ενδομητριοειδής εστία.

11. Θεραπευτικές προσεγγίσεις (επεμβατικές – μη επεμβατικές)

Επιβεβαιωμένες μη επεμβατικές (φαρμακευτικές) θεραπευτικές μέθοδοι:

- Δαναζόλη
- Προγεσταγόνα (Οξική μεδροξυπρογεστερόνη, Γεστρινόνη, Λυναιστρενόλη, Οξική μεγεστρόλη, Οξική κυπροτερόνη)
- Συνδυασμός οιστρογόνων-προγεστερόνης
- Αγωνιστές της GnRH
- Αντιπρογεσταγόνα (Μιφεπριστόνη)

Πειραματικές μη επεμβατικές θεραπευτικές μέθοδοι:

- Ρυθμιστές των υποδοχέων της προγεστερόνης

- Αντιφλεγμονώδη
- Ανταγωνιστές της GnRH
- Αναστολείς της αρωματάσης
- Αναστολείς του TNF-α
- Αναστολείς της αγγειογένεσης
- Αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών του στρώματος
- Ανοσοτροποποιητικά φάρμακα
- Αγωνιστές του υποδοχέα των οιστρογόνων τύπου β (ER-β)

Επεμβατικές μέθοδοι (Χειρουργική Αντιμετώπιση):

- Λαπαροσκοπική Ηλεκτροκαυτηρίαση
- Λαπαροσκοπική Θερμοκαυτηρίαση
- Λαπαροσκοπική Εφαρμογή CO₂-Laser
- Λαπαροσκοπική εφαρμογή Argon-Laser
- Λαπαροτομία

12. Πειραματικά μοντέλα ενδομητρίωσης

Η διενέργεια κλινικών μελετών που αφορούν στην εμφάνιση της ενδομητρίωσης, στην αιτιολογία της και στην επέκτασή της είναι ιδιαίτερος δύσκολη, καθώς κατά τη διάγνωση της νόσου λαπαροσκοπικά η διάρκεια ύπαρξής της είναι άγνωστη. Επιπλέον, η πραγματοποίηση πειραματικών επεμβατικών τεχνικών ή χορήγηση μη εγκεκριμένων για τη νόσο φαρμάκων σε ανθρώπους αντικρούει τους κανόνες της βιοηθικής και για το λόγο αυτό η έρευνα γύρω από την ενδομητρίωση έχει στραφεί σε εναλλακτικά μοντέλα πειραματικής επαγωγής της νόσου. Αν και η κοινή φυλογενετική σχέση μεταξύ των ανθρώπων και των ζώων μπορεί να επιτρέψει τη μελέτη διαφόρων παραγόντων της νόσου, δεν είναι βέβαιο αν τα αποτελέσματα της πειραματικής μελέτης μπορούν να αναχθούν στο ανθρώπινο είδος. Τα πειραματικά πρωτόκολλα που έχουν χρησιμοποιηθεί έχουν καταφέρει να αναπαράγουν πλήρως την ενδομητρίωση, τόσο σε ήπιες όσο και σοβαρότερες μορφές και να διαφωτίσουν σε ένα βαθμό πτυχές της νόσου που σχετίζονται με την παθογένεσή της, την υπογονιμότητα και τη χρήση νέων θεραπευτικών μεθόδων και φαρμάκων.

Η ενδομητρίωση εμφανίζεται αυτόματα μόνο στον άνθρωπο και σε κάποια άλλα πρωτεύοντα είδη, καθώς μόνο αυτά έχουν έμμηνο ρύση με την κλασική μορφή του αποπτωθέντος ενδομητρίου και την εμφάνιση αιμορραγίας, γεγονός που αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την αυτόματη ανάπτυξή της. Η μελέτη της ενδομητρίωσης σε πρωτεύοντα είδη έχει χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς, όμως το πολύ υψηλό κόστος της διαχείρισης των πειραματοζώων περιορίζει τη χρήση τους. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται κατά κόρον τα τρωκτικά και η πλέον διαδεδομένη μέθοδος πειραματικής επαγωγής της νόσου είναι η μεταμόσχευση τμημάτων ενδομητρικού ιστού (αυτόλογων ή ετερόλογων μοσχευμάτων) σε έκτοπες θέσεις. Άλλη μια μέθοδος για τη

διενέργεια πειραματικής ενδομητρίωσης είναι η χρήση της χοριοαλλαντοϊκής μεμβράνης εμβρύου όρνιθας (CAM), όπως περιγράφεται παρακάτω (85).

Μελέτες σε τρωκτικά:

Στα τρωκτικά η ενδομητρίωση μπορεί να προκληθεί με τη μεταμόσχευση ενδομητρικού ιστού σε έκτοπες θέσεις. Έτσι μπορούν να διακριθούν δύο είδη μοντέλων, εκείνα με αυτόλογη και τα αντίστοιχα με ετερόλογη μεταμόσχευση ενδομητρίου. Τα αυτόλογα μοντέλα αφορούν ανοσοεπαρκή πειραματόζωα και χρησιμοποιούν τη χειρουργική μεταμόσχευση του ενδομητρίου του ίδιου πειραματόζωου. Τα ετερόλογα μοντέλα αφορούν ανοσολογικά τροποποιημένα και ανοσοανεπαρκή πειραματόζωα στα οποία μεταφέρεται κατά κύριο λόγο ανθρώπινος ενδομητρικός ιστός ενδοπεριτοναϊκά ή υποδόρια.

Η αυτόλογη μεταμόσχευση του μητρικού ιστού σε έκτοπες θέσεις δεν πραγματοποιήθηκε μόνο σε επίμυες (86-91) και μύες (92-94), αλλά επιπλέον σε κόνικλους (95-98) και ινδικά χοιρίδια (99). Σε αυτά τα μοντέλα, τμήματα της μήτρας αφαιρούνται, τεμαχίζονται και επανατοποθετούνται κυρίως με τη χρήση ραμμάτων στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Στις περισσότερες μελέτες το ενδομήτριο δε διαχωριζόταν από το μυομήτριο και έτσι εμφυτεύονταν και τα δύο τμήματα. Στους επίμυες το αποτέλεσμα ήταν να αναπτυχθούν ωοειδείς κυστικές δομές που αποτελούνταν από μυομήτριο και ενδομήτριο και περιείχαν υγρό. Οι κύστεις αυτές μεγαλώνουν για 2 περίπου μήνες στη συνέχεια σταθεροποιούνται και παραμένουν βιώσιμες για 10 περίπου μήνες (90). Στους μύες, τα έκτοπα μητρικά μοσχεύματα έχουν τους ίδιους χαρακτήρες με τη νόσο στον άνθρωπο, δηλαδή σχηματίζονται πολλαπλές βλάβες με αυξημένη αγγείωση που περιέχουν ενδομητρικούς αδένες, στρώμα και κύστεις, ανεξάρτητα από την εντόπισή τους (92).

Έχουν πραγματοποιηθεί ελάχιστες μελέτες στις οποίες αποχωρίστηκε το στρώμα του ενδομητρίου από το μυομήτριο και εμφυτεύτηκε μόνον το ενδομήτριο, τόσο σε μύες (94, 100, 101) όσο και σε επίμυες (102). Στη μελέτη των Somigliana και συνεργάτες χρησιμοποιήθηκαν μύες-δότες απομονωμένου ενδομητρίου, το οποίο εμφυτεύτηκε σε μύες-λήπτες των μοσχευμάτων. Τα ζώα, που ανήκαν στο ίδιο γένος, υποβλήθηκαν σε ωοθηκεκτομή και έλαβαν θεραπεία υποκατάστασης με οιστρογόνα. Μετά από διάστημα 3 εβδομάδων τα ζώα ανέπτυξαν στοιχεία περιτοναϊκής νόσου με τη νεοαγγείωση να εμφανίζεται στην επιφάνεια των βλαβών. Ωστόσο, στη μελέτη αυτή ο αριθμός των βιώσιμων βλαβών σε σχέση με τον αριθμό των ενοφθαλμισθέντων μοσχευμάτων ήταν σημαντικά μικρότερος, καθιστώντας το ποσοστό εμφύτευσης και ανάπτυξης των ενδομητριοσικών βλαβών στο 30% περίπου. Στη μελέτη των Hirata και συνεργάτες, χρησιμοποιήθηκε μοντέλο ομόλογης μεταμόσχευσης αποκλειστικά ενδομητρίου από μύες-δότες που εκφράζουν καθολικά τις πρωτεΐνες τους με πράσινο φθορίζον χρώμα (green mice) σε φυσιολογικούς μύες-λήπτες. Οι βιώσιμες ενδομητριοσικές βλάβες που αναπτύχθηκαν ήταν πολύ εύκολα αναγνωρίσιμες και το βάρος τους ήταν ανάλογο της έντασης του μετρούμενου φθορίζοντος σήματος. Το σήμα αυτό ήταν εντονότερο στους μύες που έλαβαν οιστρογονική υποκατάσταση σε σχέση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου, επιβεβαιώνοντας για μία ακόμη φορά την οιστρογονική εξάρτηση της ενδομητρίωσης.



Εικόνα 2. Green mice και nude mouse.

Κατά το σχεδιασμό μιας πειραματικής μελέτης οι ερευνητές προσπαθούν να προσομοιάσουν το μοντέλο στην ανθρώπινη ανατομία, παθολογία και φυσιολογία. Στην προκειμένη περίπτωση επειδή κάποιοι αιτιολογικοί παράγοντες της νόσου μπορεί να υπάρχουν στο ενδομήτριο των ανθρώπων, αλλά όχι στις επίμυες, η μεταμόσχευση τμημάτων ανθρώπινου ενδομητρίου σε μύες ή επίμυες αποτελεί μια διαφορετική προσέγγιση στη μελέτη της ενδομητρίωσης. Για να πραγματοποιηθεί όμως το εγχείρημα αυτό χρειάζονται γενετικά τροποποιημένοι μύες στους οποίους απουσιάζει ο θύμος αδένας. Ως εκ τούτου, οι μύες αυτοί δεν παράγουν ή παράγουν ελάχιστα ώριμα T-λεμφοκύτταρα και είναι δεκτικοί στην αλλογενή μεταμόσχευση, καθώς δεν εμφανίζουν ή εμφανίζουν καθυστερημένα την αντίδραση απόρριψης του μοσχεύματος. Οι μύες αυτοί καλούνται nude mice και το όνομά τους προκύπτει από την έλλειψη τριχώματος, γεγονός που τους αποδίδει ένα ροζ χρώμα.



Εικόνα 3. Albino και nude mouse.

Έτσι, μελέτες σε nude mice που πραγματοποιήθηκαν με λήψη ανθρώπινου μητρικού μοσχεύματος έδειξαν ότι επιτυγχάνεται επιτυχής μεταμόσχευσή του είτε υποδορίως, είτε ενδοπεριτοναϊκά, ανεξάρτητα από τη φάση του κύκλου στην οποία ελήφθησαν τα ανθρώπινα ιστοτεμαχίδια (103). Συγκεκριμένα, τμήματα ανθρώπινου ενδομητρίου που αφαιρέθηκαν είτε στην παραγωγική, είτε στην εκκριτική φάση του κύκλου (77, 103-108), ακόμα και κατά τη διάρκεια της εμμήνου ρύσεως (103, 109, 110) εμφυτεύτηκαν επιτυχώς και σχημάτισαν ενδομητριωσικές βλάβες αντίστοιχες με αυτές που παρατηρούνται σε ανθρώπους μακροσκοπικά αλλά και ιστολογικά. Τα εμφυτεύματα αυτά διατήρησαν τους οιστρογονικούς και προγεστερονικούς υποδοχείς τους, όπως και την αποκρισιμότητά τους στις στεροειδείς ορμόνες (77, 106, 108). Η νεοαγγείωση των εμφυτευμάτων παρατηρήθηκε από την τέταρτη ημέρα μετά την εμφύτευση (106). Αξίζει να σημειωθεί ότι το ποσοστό των ιστοτεμαχίων του ανθρώπινου ενδομητρίου που εμφυτεύθηκαν και

αναπτύχθηκαν ως βιώσιμες ενδομητρικές βλάβες δεν ξεπερνούσε το 30%, εκτός αν πραγματοποιούνταν συρραφή των ιστοτεμαχιδίων οπότε και το ποσοστό μπορεί και να έφτανε το 100% (106). Ωστόσο, μετά την εμφύτευση και τη διατήρηση βιώσιμων ανθρώπινων ενδομητριωσικών βλαβών, το χρονικό πλαίσιο που ορίζει την περαιτέρω βιωσιμότητα του μοσχεύματος είναι περιορισμένο και δεν ξεπερνάει τις 4 εβδομάδες. Από την τρίτη εβδομάδα παρατηρείται μια αποδιαφοροποίηση του μοσχεύματος και διήθησή του από T-λεμφοκύτταρα (106).

Προκειμένου να καταφέρουν οι ερευνητές να επιμηκύνουν το χρόνο επιβίωσης των ενδομητριωμάτων κατέφυγαν σε εμφύτευση σε άλλου είδους μύες με σοβαρή ανοσοανεπάρκεια που αφορούσε τόσο τα T- όσο και τα B-λεμφοκύτταρα. Τα επίπεδα των NK κυττάρων δεν φαίνονταν διαταραγμένα. Τα πειραματόζωα αυτά ήταν τα SCID (Severe Combined Immunodeficient Mice) (111-113) και τα μη παχύσαρκα, διαβητικά NOD-SCID (Non Obese-Diabetic SCID Mice) (106). Τα μοσχεύματα που επεβίωσαν στους SCID μύες ήταν συγκριτικά περισσότερα σε σχέση με τους nude μύες (111) και τα μοσχεύματα διατηρήθηκαν με πλήρη ακεραιότητα για 4 περίπου εβδομάδες (106). Τα τελευταία χρόνια μελετάται η χρήση μυών με ακόμη μεγαλύτερη ανοσοανεπάρκεια (ανεπαρκούν και τα NK κύτταρα), όμως στην περίπτωση αυτή απομακρυνόμαστε ιδιαίτερα από την προσομοίωση της ανθρώπινης ενδομητρίωσης, καθώς εκεί το ανθρώπινο ανοσολογικό σύστημα φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικότατο ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της νόσου.

Μελέτες σε πρωτεύοντα:

Τα πρωτεύοντα εμφανίζουν έμμηνο ρύση και μέσω του μηχανισμού της παλίνδρομης εμμηνορρυσίας ενδομητρικός ιστός εμφυτεύεται όπως ακριβώς και στον άνθρωπο. Αν και έχει αναφερθεί η εντόπιση αυτόματης ανάπτυξης ενδομητριωμάτων σε 11 πρωτεύοντα είδη εκτός από τον άνθρωπο, μελέτες έχουν παρατηρηθεί σε πιθήκους του γένους Rhesus macaques και σε μπαμπουΐνους (114). Από τις πρώτες μελέτες που είχαν γίνει στον τομέα αυτό ήταν η μελέτη των Te Linde και Scott το 1950 σε πιθήκους Rhesus, όπου πραγματοποιούνταν χειρουργική απομάκρυνση του τραχήλου της μήτρας από τη φυσική του θέση και εμφύτευσή του σε άλλη θέση που ευνοεί την παλίνδρομο έμμηνο ρύση (115). Αργότερα, άλλοι ερευνητές προτίμησαν τον αποκλεισμό του τραχήλου των μπαμπουΐνων, ώστε να επιτρέψουν σε μεγαλύτερο ποσοστό κυττάρων να εμφυτευθούν μέσα στην περιτοναϊκή κοιλότητα (116). Επιπλέον, η χειρουργική επαγωγή της νόσου με εμφύτευση αυτόλογων μητρικών μοσχευμάτων μετά από συρραφή τους σε έκτοπα σημεία ή με απλή διασπορά τους εντός της περιτοναϊκής κοιλότητας προκάλεσε την επιτυχή επαγωγή της νόσου (117-119). Στις μελέτες αυτές τα ενδομητριώματα εξέφραζαν τον υποδοχέα των οιστρογόνων ER-β, το μόριο MMP-7, τον παράγοντα VEGF και την αρωματάση (118, 120). Οι μελέτες σε πρωτεύοντα είναι εκείνες που προσομοιάζουν περισσότερο με την ανθρώπινη φυσιολογία και για το λόγο αυτό είναι πιο εξειδικευμένες στη μελέτη της έναρξης και της ανάπτυξης της νόσου, τις ανοσολογικές παραμέτρους, τους κανόνες κληρονομικότητας και τους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης με το φυσιολογικό ενδομήτριο. Παρόλα αυτά όπως ήδη αναφέρθηκε το κόστος διεξαγωγής

τέτοιων μελετών είναι υψηλό και τα ζητήματα βιοηθικής που ανακύπτουν είναι ισχυρά (85).

Η χρήση της χοριοαλλαντοϊκής μεμβράνης όρνιθας:

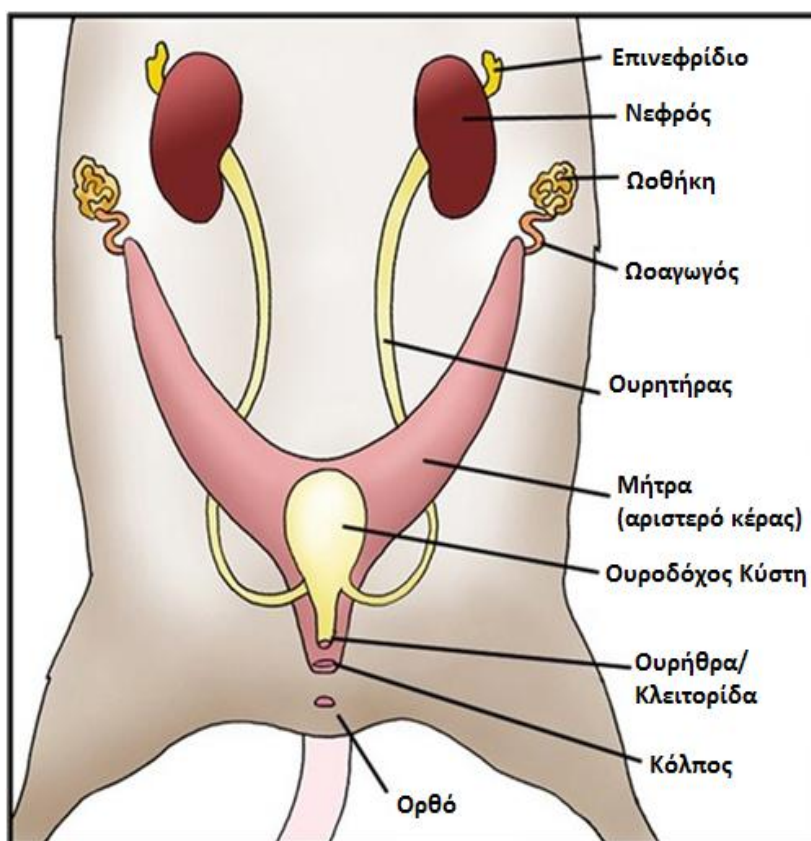
Το μοντέλο της χοριοαλλαντοϊκής μεμβράνης όρνιθας (chicken chorioallantoic membrane-CAM) αποτελεί γενικώς ένα χρήσιμο εργαλείο στην έρευνα. Αρχικά είχε χρησιμοποιηθεί προκειμένου να μελετηθεί η διεισδυτικότητα, το μεταστατικό και αγγειογενετικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων (121). Η διαδικασία για τη χρήση του μοντέλου έχει ως εξής: Τα γονιμοποιημένα αυγά της όρνιθας, μετά την παραλαβή τους, επωάζονται σε θάλαμο με θερμοκρασία 37°C και σχετική υγρασία 55%. Την τρίτη μέρα της ανάπτυξης αφαιρείται λεύκωμα από το εσωτερικό του αυγού, αφού αυτό διανοιχθεί με μία οπή στο οξύ τμήμα του με τη βοήθεια βελόνας ανατομίας. Με αντίστοιχο τρόπο ανοίγεται δεύτερη οπή στο αμβλύ άκρο του αυγού και αναρροφώνται περίπου 3 ml λευκώματος. Την τέταρτη μέρα ακολουθεί διάνοιξη "παραθύρων" στο πάνω μέρος κάθε αυγού. Η χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη που έχει αναπτυχθεί και επωαστεί για 7-10 ημέρες αποτελεί ένα άριστο μέσο για την καλλιέργεια ιστοτεμαχίων ενδομητρίου (122, 123). Τα ενδομητριωσικά τεμάχια διασπών το επιθήλιο έως το μεσεγγυματικό στρώμα του και μετά από 3 μέρες από την προσθήκη του ανθρώπινου μοσχεύματος, αναπτύσσονται ενδομητριωσικές βλάβες σε αυτό το στρώμα της CAM (122). Η αγγειογένεση μπορεί να αξιολογηθεί με την ανάπτυξη νεοαγγείων από την CAM προς τα μοσχεύματα (122). Αντιαγγειογενετικοί παράγοντες όπως η εντοστατίνη, ο παράγοντας TNP-470 και αντισώματα ενάντια στον παράγοντα VEGF, μείωσαν την αγγειογενετική ανταπόκριση στα ενδομητριωσικά εμφυτεύματα (124). Το μοντέλο αυτό πλεονεκτεί στη μελέτη των μηχανισμών διείσδυσης και εμφύτευσης και αγγειογένεσης. Τα έκτοπα μοσχεύματα είναι εύκολα προσβάσιμα και η παρακολούθηση είναι πολύ στενή. Ωστόσο, αυτό το μοντέλο δεν προσφέρεται για τη μελέτη των ανοσολογικών και φλεγμονωδών παραγόντων και γεγονότων που διέπουν την ενδομητρίωση (85).

13. Ανατομία και φυσιολογία του γεννητικού συστήματος του θήλεος επίμου

Το παρόν ερευνητικό πρωτόκολλο πραγματεύεται την ανασταλτική δράση της καμπεργολίδης και της N-ακέτυλο-κυστεΐνης στην ανάπτυξη των ενδομητριωσικών εμφυτευμάτων σε επίμους του γένους Wistar. Ως εκ τούτου, η περιγραφή της ανατομίας και της ιστολογίας του αναπαραγωγικού συστήματος του θήλεος επίμους αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάλυση και κατανόηση του παρόντος ερευνητικού πρωτοκόλλου.

Το αναπαραγωγικό σύστημα του θήλεος επίμους προσομοιάζει με αυτό του ανθρώπου τόσο στη δομή όσο και στη λειτουργία, καθώς ο ρόλος του είναι η παραγωγή ωοθυλακίων, η μεταφορά τους στο χώρο που πρόκειται να γονιμοποιηθούν, η εξασφάλιση ασφαλούς

περιβάλλοντος για την ανάπτυξη του εμβρύου και η απομάκρυνση του κυήματος από το σώμα την κατάλληλη χρονική στιγμή.



Εικόνα 4. Ανατομία θήλεος επίμου

Ανατομία:

Οι ωοθήκες βρίσκονται στα πλάγια όρια του ψοίτη μυ, τοποθετημένες πάνω στο περινεφρικό λίπος. Η ώριμη ωοθήκη αποτελεί ένα συνοθύλευμα ωοθυλακίων. Ο σπειροειδής αγωγός έχει το ανοικτό του άκρο τοποθετημένο πάνω στην ωοθήκη και το περιφερικό του άκρο πάνω στη δίκερο μήτρα. Ο αγωγός περιβάλλεται από το μεσεντέριο του αγωγού (μεσοσάλπιγγα) φτιάχνοντας έτσι τη δομή του ωοθηκικού θυλάκου. Παρόλο που τα μητρικά κέρατα φαίνεται να ενώνονται κεντρικά, υπάρχουν δύο διακριτά μητρικά στόμια στην περιοχή του κόλπου. Καθεμία από τις μητρικές αυτές εισόδους έχουν ένα εσωτερικό και ένα εξωτερικό στόμιο και ένα τραχηλικό κανάλι. Η μόνη δομή του γεννητικού συστήματος που συνδέεται με το ουροποιητικό σύστημα είναι η κλειτορίδα. Βρίσκεται πάνω από την ουρήθρα και κλείνεται μέσα σε μια ακροποσθία, κατά μήκος της οποίας υπάρχουν κλειτοριδικοί αδένες. Η κλειτορίδα αποτελεί το γυναικείο ανάλογο του ανδρικού πέους. Έτσι, το σύμπλοκο ουρήθρα/κλειτορίδα οπτικά προσομοιάζει πολύ με το πέος, κάνοντας έτσι πολλές φορές δύσκολο το διαχωρισμό του φύλου των επίμυων με ακρίβεια. Η ουροδόχος κύστη αποχετεύει τα ούρα μέσα στην ουρήθρα, η οποία ανοίγει προς το περιτόναιο στο ουρηθρικό στόμιο που εδράζεται στη βάση της κλειτορίδας. Το κοιλικό άνοιγμα βρίσκεται οπισθίως της ουρήθρας. Η ουρήθρα δεν εισέρχεται στον κόλπο ή στον πρόδρομό του, όπως παρατηρείται σε άλλα μικρά θηλαστικά.

Φυσιολογία εμμηνορρυσιακού κύκλου στο θήλυ επίμου:

Ο εμμηνορρυσιακός κύκλος του επίμου διαρκεί 4-5 ημέρες, συμβαίνει κατά τη διάρκεια του έτους χωρίς εποχικό καθορισμό και παρουσιάζεται από την έναρξη της εφηβείας μέχρι την περίοδο της εμμηνόπαυσης, συμπεριλαμβανομένου της επιλόχειας περιόδου. Ο εμμηνορρυσιακός κύκλος απαρτίζεται από 4 φάσεις: τον προοίστρο, τον οίστρο, τον μετοίστρο και τον διοίστρο. Οι ορμονικές διακυμάνσεις ρυθμίζονται από τις γοναδοτροπίνες που εκκρίνονται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, έχουν ως αποτέλεσμα μεταβολές στην ωθητική λειτουργία και στην ωρίμαση του ωοθυλακίου, όπως και ανιχνεύσιμες μεταβολές στο κολπικό επιθήλιο και στη συμπεριφορά του πειραματοζώου απέναντι στο αντίθετο φύλο. Κατά τη διάρκεια του προοίστρου, τα οιστρογόνα του πλάσματος και τα επίπεδα της προλακτίνης αυξάνουν μέχρι και ακριβώς πριν την ωοθηλακιορρηξία, προωθώντας έτσι ανατομικές μεταβολές στον κόλπο και στη μήτρα καθώς και αλλαγές της συμπεριφοράς που προάγουν το ζευγάρωμά τους. Η έκκριση της LH παρουσιάζεται κατά ώσεις με τις υψηλότερες συχνότητες κατά τη διάρκεια του προοίστρου και τις χαμηλότερες κατά τη φάση του οίστρου. Κάθε ώση της LH ανταποκρίνεται σε ώση της υποθαλαμικής GnRH. Η αιχμή της LH κατά τη διάρκεια της προοιστρικής φάσης διεγείρει την ωρίμαση των ωοθυλακίων, την ωοθυλακιορρηξία και την παραγωγή του ωχρού σωματίου. Τα οιστρογόνα επίσης διεγείρουν την απελευθέρωση της FSH, ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της ωρίμασης των ωοθυλακίων. Δύο ώσεις FSH περιωοθυλακιορρηκτικά διεγείρουν την αύξηση των μικρών ωοθυλακίων. Η πρώτη αιχμή συσχετίζεται με την αιχμή της LH, ενώ η δεύτερη αιχμή συσχετίζεται με τη μείωση της ινχιπίνης μετά την ωοθυλακιορρηξία. Η έκκριση των οιστρογόνων συνεχίζεται μέχρι να επιτευχθεί η αιχμή της LH, η οποία και απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια του οίστρου και η ωοθηλακιορρηξία πραγματοποιείται μεταξύ των επόμενων 8 και 14 ωρών. Αυτή η έκκριση της LH σχετίζεται με την ώρα της ημέρας και καθορίζεται από το νυχθημερήσιο κύκλο (παρουσία φωτός 05.00-19.00). Αυτή η αιχμή της LH, εκτός από την προαγωγή της ωοθηλακιορρηξίας, προκαλεί τη διακοπή της αύξησης των επιπέδων των οιστρογόνων και την αύξηση των επιπέδων της προγεστερόνης από την ωοθήκη. Η οιστρική φάση του κύκλου χαρακτηρίζεται από την αποδοχή του άρρενος και την εμφάνιση επιφανειακής στοιβάδας πλακώδους επιθηλίου στην περιοχή του κόλπου. Κατά τη διάρκεια του μετοίστρου το ωχρό σωματίο εκκρίνει προγεστερόνη. Τα επίπεδα της προγεστερόνης κατά τη διάρκεια του διοίστρου μειώνονται και η ανάπτυξη του ωοθυλακίου σχετίζεται με την αύξηση της 17β-οιστραδιόλης. Ως αποτέλεσμα της μείωσης των οιστρογονικών επιπέδων και της αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης στην FSH, η τελευταία αυτή ορμόνη μπορεί και πάλι να αυξηθεί ξεκινώντας και πάλι ένα νέο κύκλο ωρίμασης ωοθυλακίων. Ο κύκλος ολοκληρώνεται με την αιχμή των οιστρογόνων κατά τη διάρκεια του προοίστρου και τη διέγερση της απελευθέρωσης των γοναδοτροπινών με σκοπό την ωοθυλακιορρηξία (125). Στον Πίνακα 2 φαίνονται οι μεταβολές του κολπικού επιθηλίου κατά τη διάρκεια του οιστρικού κύκλου (125).

ΦΑΣΗ ΚΥΚΛΟΥ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ (ΩΡΕΣ)	ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ	ΚΟΛΠΙΚΗ ΕΚΚΡΙΣΗ
Προοίστρος	12	Αποδοχή Αρσενικού Στο Τέλος της Φάσης	Εμπύρνηνα Επιθηλιακά Κύτταρα
Οίστρος	12	Λόρδωση, Αποδοχή Αρσενικού	75% Εμπύρνηνα, 25% Κερατινοποιημένα Κύτταρα
Μετοίστρος	21	Απόρριψη Αρσενικού	Πολλά Λευκοκύτταρα Με Εμπύρνηνα και Κερατινοποιημένα Κύτταρα
Διοίστρος	57	Απόρριψη Αρσενικού	Λευκοκύτταρα

Πίνακας 2. Παρουσιάζεται η συμπεριφορά και το κολπικό έκκριμα ανάλογα με τη φάση του κύκλου.

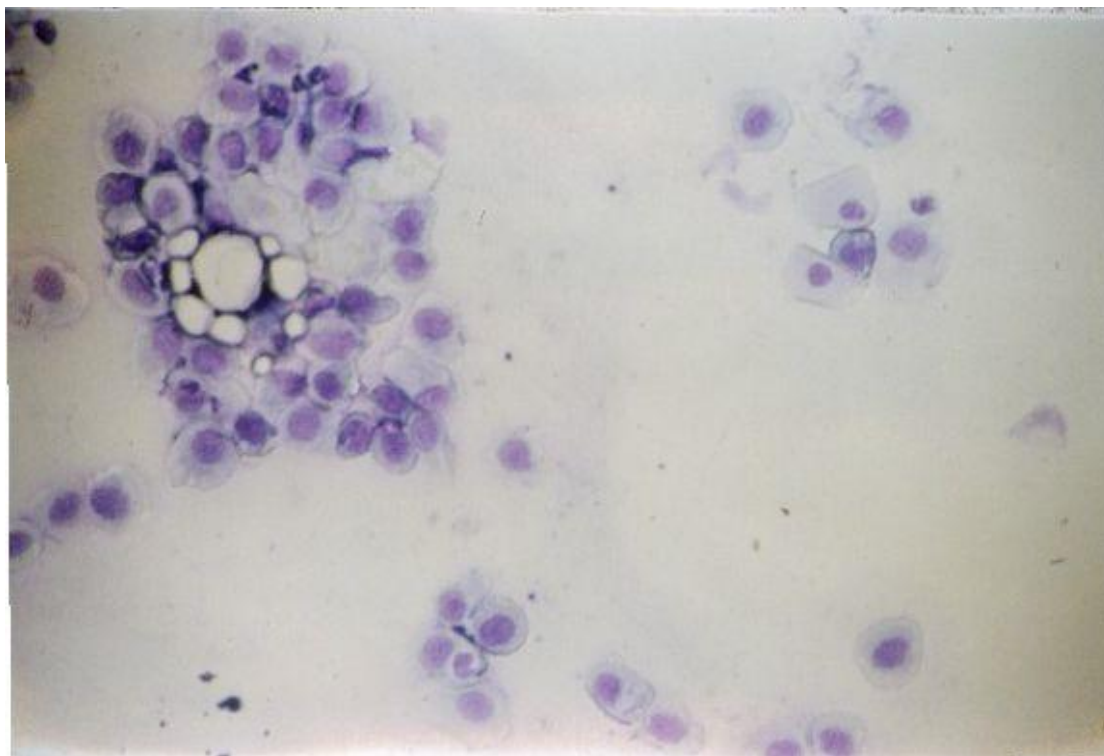
Αναγνώριση φάσης του οιστρικού κύκλου:

Διάφορες μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση της φάσης του κύκλου. Οι τεχνικές ποικίλλουν από απλή παρατήρηση των μεταβολών της συμπεριφοράς, κυτταρολογική εξέταση των κολπικών εκκρίσεων έως και μέτρηση της ηλεκτρικής εμπέδησης του κόλπου. Η διάρκεια του οίστρου είναι 9-15 ώρες και καθορίζεται ως η περίοδος κατά την οποία ο θηλυκός επίμυς είναι δεκτικός απέναντι στο αντίθετο φύλο και επιτρέπει τη συνεύρεση. Οι συμπεριφορικές μεταβολές που δείχνουν τη δεκτικότητα του επίμου είναι η αύξηση της δραστηριότητας (τρέξιμο), ταχεία κίνηση των πτερυγίων των ωτών, ελαφρά κτυπήματα της κεφαλής ή της ράχης και ραχιαία κάμψη δίκην λόρδωσης. Το κολπικό τοίχωμα είναι ξηρό κατά τη διάρκεια του οίστρου και το αιδοίο οιδηματώδες.

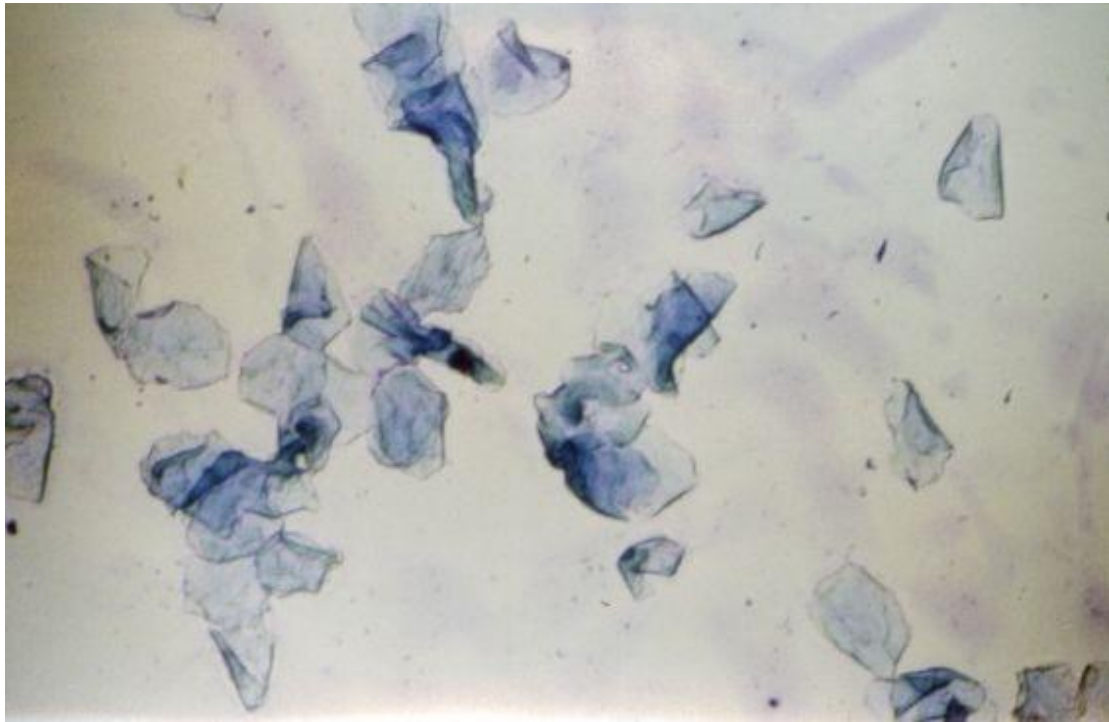
Η κυτταρολογική εξέταση των κολπικών εκκριμάτων είναι μια μέθοδος ευρέως χρησιμοποιούμενη για την αναγνώριση της φάσης του οιστρικού κύκλου. Η ακριβής αναγνώριση της φάσης του κύκλου εξαρτάται από το έκκριμα που λαμβάνεται καθημερινά την ίδια ώρα, καθώς οι κυτταρικοί πληθυσμοί ποικίλλουν κατά τη διάρκεια του 24ώρου. Τα εμπύρνηνα επιθηλιακά κύτταρα είναι χαρακτηριστικό εύρημα της προοιστρικής φάσης, η οποία και διαρκεί 12 ώρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια της προοιστρικής φάσης ειδικότερα στον επίμυ της προεφηβείας, η μήτρα φαίνεται πληρωμένη με υγρό. Αυτό δε θα πρέπει να συγχέεται με την κατάσταση της υδρόμητρας. Κατά τη διάρκεια της οιστρικής φάσης η κυτταρολογική εξέταση αναδεικνύει την εμφάνιση περίπου 75% εμπύρνηνων επιθηλιακών κυττάρων, 25% κερατινοποιημένων κυττάρων τα οποία εν συνεχεία εξελίσσονται σε οιδηματώδη κερατινοποιημένα κύτταρα χωρίς πυρήνα. Τις επόμενες ώρες του οιστρικού κύκλου τα κερατινοποιημένα

εκφυλίζονται και σχηματίζουν ένα επιθηλιακό πλακόστρωτο. Η μετοιστρική φάση εμφανίζεται μετά την ωοθυλακιωρηξία και διαρκεί περίπου 21 ώρες. Η κολπική κυτταρολογική εξέταση κατά τη διάρκεια της μετοιστρικής φάσης συνίσταται στην ύπαρξη λευκοκυττάρων ανάμεσα σε εμπύρνηνα επιθηλιακά κύτταρα και κερατινοποιημένα κύτταρα. Η διοιστρική φάση, που είναι και η μεγαλύτερη και διαρκεί 57 ώρες, το κολπικό έκκριμα αποτελείται κυρίως από λευκοκύτταρα.

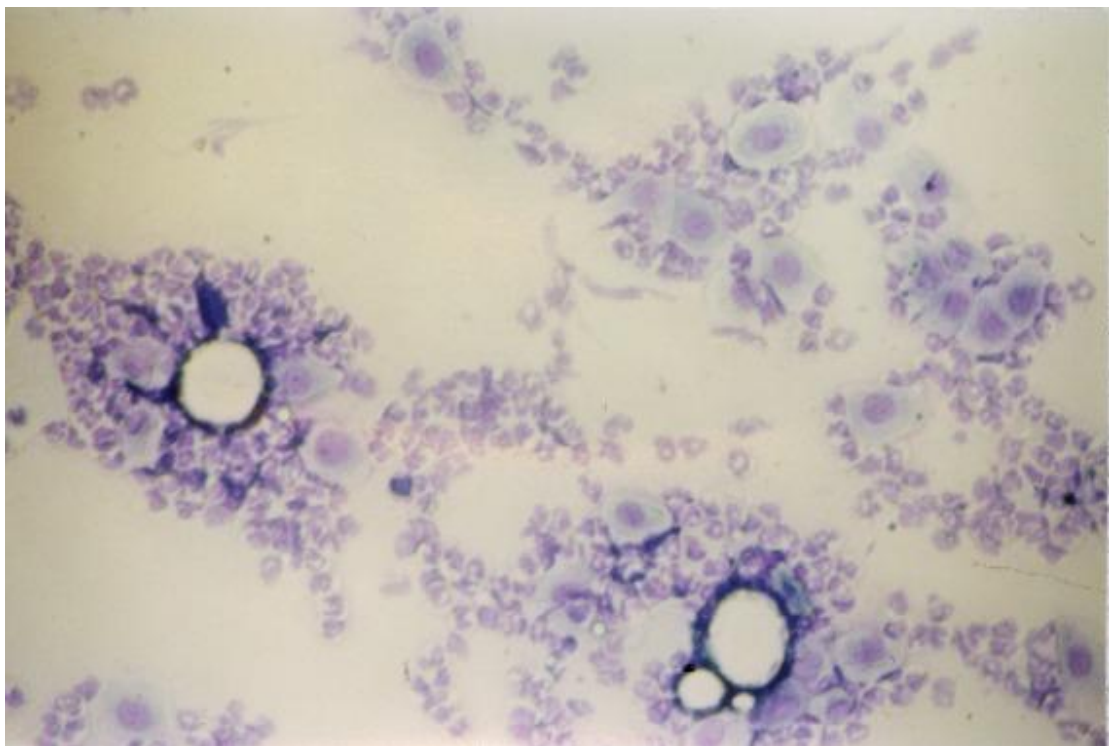
Οι Bartos και συνεργάτες περιέγραψαν τη χρήση της μέτρησης της κολπικής εμπέδησης ως κριτήριο καθορισμού της εμμηνορρυσιακής φάσης (126). Η μέτρηση της ηλεκτρικής αντίστασης της κολπικής βλενογονικής μεμβράνης με την διείσδυση ενός ηλεκτρονικού ηχοβολέα στον κόλπο. Μία αιχμή στην εμπέδηση συμβαίνει κατά τη διάρκεια της προοιστρικής φάσης με την τη χαμηλότερη αντίσταση κατά τη διάρκεια του οίστρου. Πολλοί ερευνητές έχουν πραγματοποιήσει μελέτες με σκοπό να βελτιώσουν αυτή τη μέθοδο (127-129).



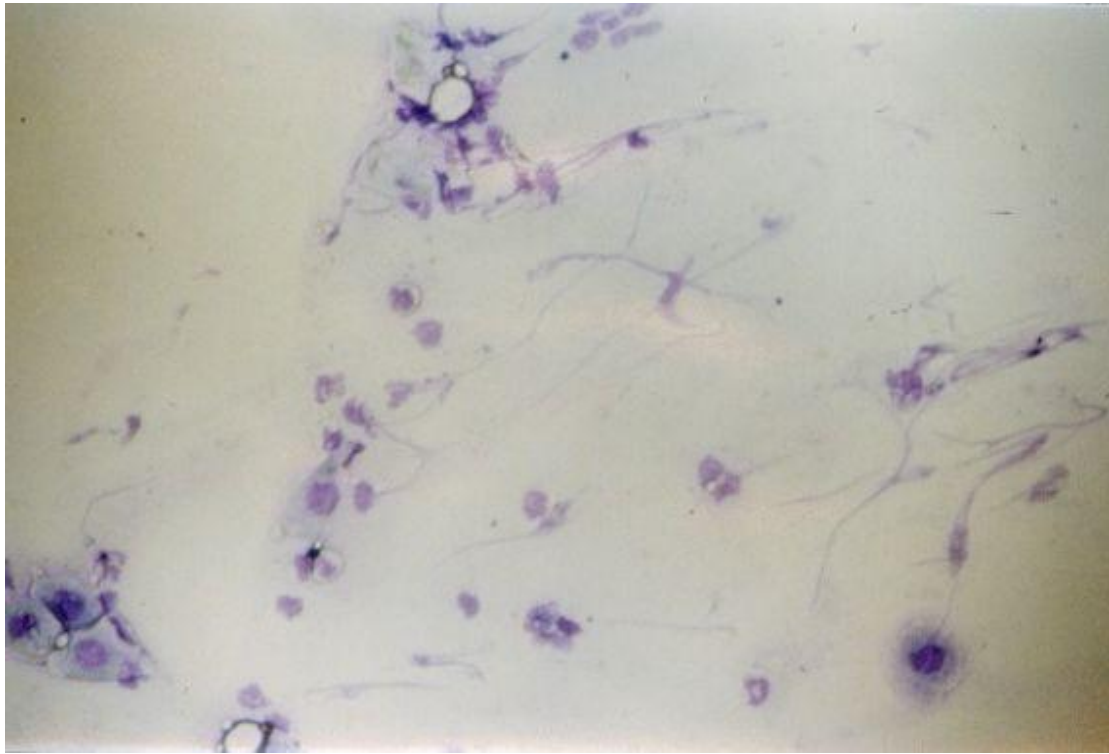
Εικόνα 5. Προοίστρος: Παρατηρούνται άφθονα εμπύρνηνα διάμεσα και ελάχιστα παραβασικά επιθηλιακά κύτταρα.



Εικόνα 6. Οίστρος: Παρατηρούνται άφθονα κερατινοποιημένα επιφανειακά κύτταρα που οργανώνονται μεταξύ τους σε ομάδες.



Εικόνα 7. Μετοίστρος: Παρατηρείται μεγάλος αριθμός λευκοκυττάρων και διάμεσα επιθηλιακά κύτταρα.



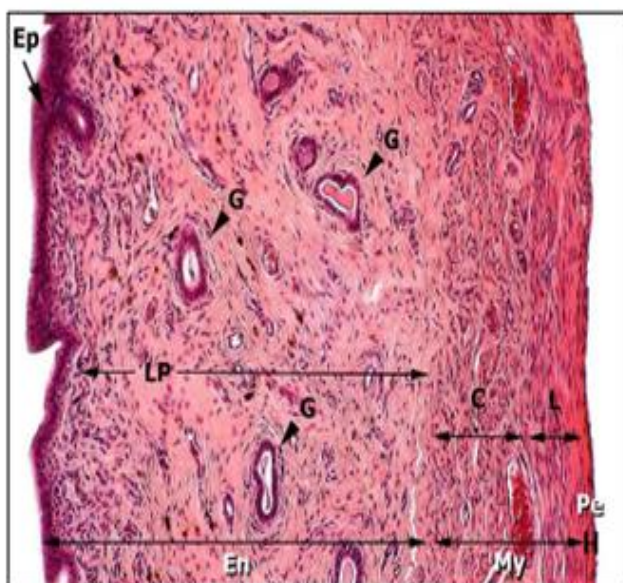
Εικόνα 8. Διοίστρος: Παρατηρείται σημαντική μείωση των κυτταρικών πληθυσμών και αύξησης της κολπικής βλέννης.(130)

Συγχρονισμός των κύκλων:

Προκειμένου να βελτιωθεί η ακρίβεια μιας μελέτης είναι προτιμώτερο να συγχρονιστούν οι κύκλοι των επίμυων που πρόκειται να μελετηθούν. Ο συγχρονισμός μπορεί να επιτευχθεί όταν οι επίμυες εγκλιματιστούν στο νυχθημερήσιο ρυθμό του εργαστηρίου και από την παρουσία αρσενικών επίμυων στο ίδιο δωμάτιο. Μελέτη που διενεργήθηκε κατά αυτόν τον τρόπο σε επίμυες του γένους Sprague-Dawley απέδειξε μετά από μελέτη των κολπικών τους εκκρίσεων πως οι επίμυες συγχρονίστηκαν σε ποσοστό 50-75% μετά από 2 ή 3 συνεχόμενες ημέρες (131). Ένα μεγάλο ποσοστό από θήλειες επίμυες θα συγχρονίσει τους κύκλους του μετά από διακοπή των καθημερινών ενέσεων προγεστερόνης (132). Το ερέθισμα της εγκατάστασης των επίμυων σε νέο περιβάλλον προκάλεσε την έναρξη νέων κύκλων. Οι επίμυες με κύκλο τεσσάρων και πέντε ημερών αντέδρασαν διαφορετικά, αλλά ανάμεσα στις δύο ομάδες παρατηρήθηκε μερικός συγχρονισμός των κύκλων (132).

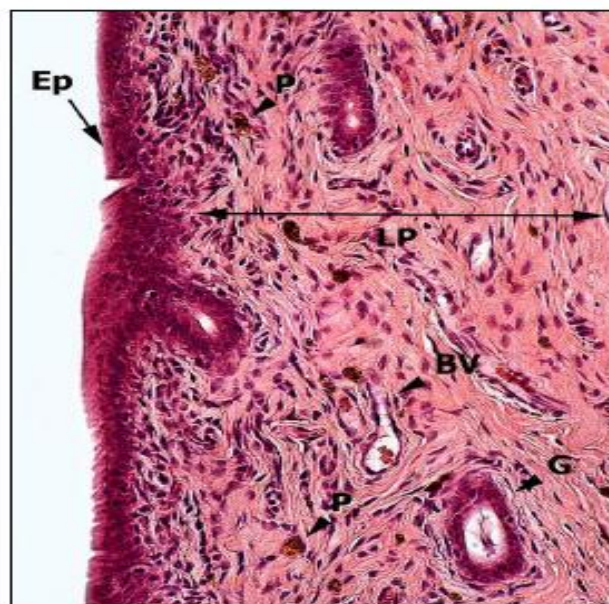
14. Ιστολογία ενδομητρίου του θήλεος επίμου

Η μήτρα του θήλεος επίμου είναι διπλή και αποτελείται από δύο μητρικά κέρατα που ενώνονται μαζί και σχηματίζουν τον κόλπο αφού διέλθουν από δύο ξεχωριστούς τραχήλους. Η βασική ιστολογική οργάνωση της μήτρας φαίνεται στην εικόνα 9 και 10.



En	Ενδομήτριο
Ep	Επιφανειακό Επιθήλιο
Lp	Χόριο του βλεννογόνου
G	Αδένας Ενδομητρίου
My	Μυομήτριο
C	Κυκλοτερής στοιβάδα (έσω)
L	Επιμήκης στοιβάδα (έξω)
Pe	Περιμήτριο

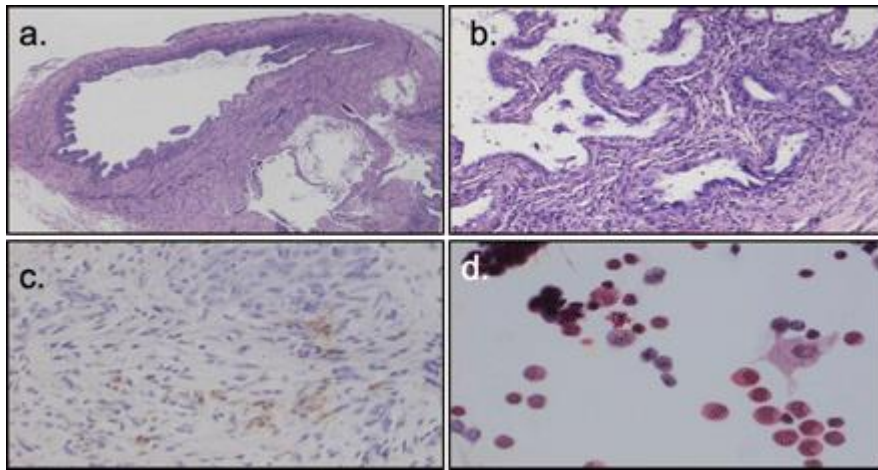
Εικόνα 9. Μητρικό κέρας θήλεος επίμου. Επιμήκης τομή



En	Ενδομήτριο
Ep	Επιφανειακό Επιθήλιο
Lp	Χόριο του βλεννογόνου
G	Αδένας Ενδομητρίου
My	Μυομήτριο
C	Κυκλοτερής στοιβάδα (έσω)
L	Επιμήκης στοιβάδα (έξω)
Pe	Περιμήτριο
P	Κεχρωσμένα κύτταρα

Εικόνα 10. Το ίδιο μητρικό κέρας σε μεγαλύτερη μεγέθυνση

Το ενδομήτριο του επίμου αποτελείται από ένα κυλινδρικό επιθήλιο επιφανείας, το οποίο επικαλύπτει το χόριο του βλεννογόνου, που περιέχει μεγάλο αριθμό αιμοφόρων αγγείων και ενδομητρικών αδενίων. Το μυομήτριο αποτελείται από ένα εσωτερικό στρογγύλο και ένα εξωτερικό επίμηκες στρώμα λείων μυικών ινών. Περιβάλλεται από το περιμήτριο, ένα λεπτό στρώμα συνδετικού ιστού που επικαλύπτεται από ένα λεπτό ορογόνο χιτώνα. Λεμφοκύτταρα και άλλα λευκά αιμοσφαίρια είναι παρόντα στην ανώτερη στοιβάδα του ενδομητρίου. Κεχρωσμένα στρωματικά κύτταρα που περιέχουν καφέ-πράσινα κοκκία γεμάτα με φερριτίνη, αιμοσιδηρίνη και λιποφουσκίνη φαίνονται στην *Εικόνα 11*.



Εικόνα 11. Ιστολογικές εικόνες ενδομητριωσικών εμφυτευμάτων επίμυων (a,b,c) και περιτοναϊκού υγρού (d) με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, 4 εβδομάδες μετά τη χειρουργική εμφύτευσή τους: a) κυστική διεύρυνση ενός ενδομητριωσικού αδενίου που περιβάλλεται από το χαρακτηριστικό ατρακτοειδές κυτταρικό στρώμα. b) Ενδομητριωσικό αδένιο, με στρώμα διηθημένο από κύτταρα χρόνιας φλεγμονής, συμπεριλαμβανομένου των λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων. c) Ενδομητριωσικό εμφύτευμα με χαρακτηριστική εντόπιση σημείων αιμοσιδηρίνης. d) Περιτοναϊκό υγρό όπου απεικονίζεται χαρακτηριστικά η ύπαρξη μεσοθηλιακών κυττάρων, ουδετεροφίλων, λεμφοκυττάρων και ενός μεγάλου μακροφάγου (δεξιά στο κέντρο). (130)

15. Νέα θεραπευτικά σχήματα για την αντιμετώπιση της ενδομητρίωσης. Πειραματικά δεδομένα

Η φαρμακευτική αντιμετώπιση της ενδομητρίωσης επικεντρωνόταν κατά κύριο λόγο στη δημιουργία ενός υποοιστρογονικού περιβάλλοντος με καταστολή των υποφυσιακών ορμονών ή με την επικράτηση ενός περιβάλλοντος πλούσιου σε προγεσταγόνα. Παρόλα αυτά και καθώς ολοένα και νέα δεδομένα διαφωτίζουν την πολυπαραγοντική αυτή νόσο, τα τελευταία χρόνια δοκιμάζονται όλο και πιο στοχευμένες θεραπείες. Η έρευνα επικεντρώνεται κατά κύριο λόγο σε φάρμακα που καταπολεμούν τους παράγοντες της νόσου που ευοδώνουν την ανάπτυξη και τη διατήρηση της ενδομητρίωσης. Τέτοια φάρμακα είναι οι τροποποιητές των υποδοχέων της προγεστερόνης, οι ανταγωνιστές της GnRH, οι αναστολείς της αρωματάσης, οι αναστολείς του TNF- α , οι αναστολείς της αγγειογένεσης, οι αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών του στρώματος, η πεντοξυφυλλίνη και άλλα ανοσοτροποποιητικά, καθώς και οι αναστολείς των υποδοχέων των οιστρογόνων- β (ER- β). Όλες οι ανωτέρω κατηγορίες φαρμάκων έχουν χρησιμοποιηθεί σε πειραματικές μελέτες με ευεργετικά αποτελέσματα σε ότι αφορά τη δημιουργία αλλά και την εξέλιξη της νόσου (133).

- **Η μifeπριστόνη (RU486) και άλλοι εκλεκτικοί τροποποιητές των υποδοχέων της προγεστερόνης.**

Οι τροποποιητές των υποδοχέων της προγεστερόνης μπορούν να δράσουν με έναν από τους παρακάτω μηχανισμούς:

1. *Τύπου I τροποποιητές:* Πρόκειται για ουσίες που δεσμεύονται στον υποδοχέα της προγεστερόνης και αποτρέπουν ή μειώνουν σημαντικά την πρόσδεση της προγεστερόνης. Παράδειγμα αποτελεί η ουσία οναπριστόνη.
2. *Τύπου II τροποποιητές:* Ουσίες που προάγουν την πρόσδεση της προγεστερόνης στον υποδοχέα της αλλά μεταβάλλουν την επακόλουθη γονιδιακή έκφραση. Παράδειγμα τέτοιας ουσίας είναι η μιφεπριστόνη (RU486) και τα μεσοπρογεσταγόνα.
3. *Τύπου III τροποποιητές:* Ουσίες που ενώ επιτρέπουν την πρόσδεση της προγεστερόνης στον υποδοχέα της, αναστέλλουν την επακόλουθη μεταγραφή.

Οι τροποποιητές τύπου I και III δρουν ως ανταγωνιστές της δράσης της προγεστερόνης, ενώ οι τύπου II ως αγωνιστές, μερικοί αγωνιστές ή ανταγωνιστές ανάλογα με τη δόση της ουσίας, την παρουσία ή όχι της προγεστερόνης και της περιοχής που γίνεται η αντίδραση. Στη θεραπεία της ενδομητρίωσης έχουν χρησιμοποιηθεί μόνο οι τροποποιητές τύπου II.

Οι ανταγωνιστές της προγεστερόνης και οι ουσίες με δράση αγωνιστή-ανταγωνιστή έχει αποδειχθεί σε πειραματικά μοντέλα πρωτεύοντων οργανισμών ότι προκαλούν ατροφία του ενδομητρίου, ίδιου βαθμού με αυτή που προκαλείται από την προγεστερόνη. Όμως ο μηχανισμός φαίνεται πως είναι διαφορετικός. Η μιφεπριστόνη προκαλεί με δράση ανταγωνιστή περιαγγειακή εκφύλιση των σπειροειδών αρτηριών που αρδεύουν το ενδομήτριο (133).

- **Ανταγωνιστές της GnRH:**

Όπως και οι αγωνιστές της GnRH, οι ανταγωνιστές της GnRH είναι ανάλογα του μορίου της GnRH. Αυτά τα φάρμακα δρουν αποκλείοντας τον υποδοχέα της GnRH άμεσα και αποτρέποντας την ενεργοποίησή του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση της υπόφυσης, τη μείωση της έκκρισης των γοναδοτροπινών και την καταστολή των ωθηκικών στεροειδών. Δημιουργείται λοιπόν υποοιστρογονικό περιβάλλον, όπως και με τους αγωνιστές της GnRH. Αντίθετα όμως με τους αγωνιστές της GnRH τα φάρμακα αυτά δεν προκαλούν την αρχική διέγερση στην έκκριση των γοναδοτροπινών και την απελευθέρωση των ωθηκικών στεροειδών.

Σε μοριακό επίπεδο, οι ανταγωνιστές της GnRH παρεμβάλλονται στη διαδικασία ενεργοποίησης του υποδοχέα της GnRH. Όταν η GnRH προσδέεται στον υποδοχέα της, ο υποδοχέας διμερίζεται και ξεκινά ένας καταρράκτης γεγονότων που οδηγούν στη σύνθεση και απελευθέρωση της FSH και της LH. Με τους ανταγωνιστές, υπάρχει ανταγωνισμός με το βασικό μόριο της GnRH. Λαμβάνοντας ως δεδομένο την υψηλή συγγένεια πρόσδεσης, τη σχετική αφθονία και το μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής των ανταγωνιστών, αυτά τα μόρια καταλαμβάνουν μονομερώς το μόριο του υποδοχέα, αποτρέπουν το διμερισμό του και την παραγωγή των γοναδοτροπινών από τα γοναδοτρόπα κύτταρα.

Ως αποτέλεσμα των παραπάνω χαρακτηριστικών των ανταγωνιστών της GnRH, οι ουσίες αυτές προσφέρουν το θεωρητικό πλεονέκτημα ότι λειτουργούν πιο γρήγορα και πιο αποτελεσματικά από τους αγωνιστές της GnRH, με καλύτερη συμμόρφωση των ασθενών,

καθώς τα συμπτώματα υφίονται νωρίτερα. Οι μελέτες που έχουν διενεργηθεί ως τώρα κάνουν λόγο για μια αποτελεσματική θεραπευτική παρέμβαση χωρίς ιδιαίτερες επιπλοκές. Οι ουσίες αυτές βρίσκονται στην τρίτη φάση των κλινικών μελετών προκειμένου να ενταχθούν στη θεραπευτική φαρέτρα για την αντιμετώπιση της ενδομητρίωσης (133).

- **Αναστολείς της αρωματάσης:**

Είναι κοινώς αποδεκτή η άποψη που υποστηρίζει πως η ενδομητρίωση είναι μια οιστρογόνο-εξαρτώμενη νόσος. Στόχος είναι λοιπόν η μείωση των ωθητικών οιστρογόνων, αλλά και των οιστρογόνων που παράγονται από τους περιφερικούς ιστούς όπως ο λιπώδης ιστός και τα ενδομητριωσικά κύτταρα. Τα ενδομητριωσικά κύτταρα, σε αντίθεση με τα κύτταρα του φυσιολογικού ενδομητρίου, περιέχουν το ένζυμο αρωματάση, το οποίο ενεργοποιείται από την προσταγλανδίνη E2 (PGE2). Τα οιστρογόνα που παράγονται διεγείρουν περαιτέρω την PGE2, με αποτέλεσμα την ακόμη μεγαλύτερη παραγωγή οιστρογόνων. Έτσι, η αναστολή της λειτουργίας του ενζύμου αρωματάση θα μπορούσε να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο. Μελέτες που διενεργήθηκαν σε τρωκτικά είχαν θετικά αποτελέσματα, όμως δε θα πρέπει να αμελήσουμε το γεγονός πως η απώλεια της οστικής μάζας που συνοδεύει αυτές τις θεραπείες θα πρέπει να αξιολογηθεί ώστε η θεραπεία μας να είναι αποτελεσματική και ασφαλής.

- **Αναστολείς του TNF-α:**

Ο TNF-α είναι μια κυτταροκίνη που υπεραυξάνεται στις περιπτώσεις γυναικών με ενδομητρίωση. Η καταστολή λοιπόν των επιπέδων αυτής της κυτταροκίνης θεωρητικά θα μπορούσε να καταστείλει και την ενδομητρίωση. Σε μελέτες που διενεργήθηκαν σε μπαμπούινους χορηγήθηκε δεσμευτική πρωτεΐνη του TNF-α, GnRH ανταγωνιστής και placebo θεραπεία. Στο μοντέλο αυτό η ενδομητρίωση συρρικνώθηκε. Παρόλα αυτά δεν έχουν διενεργηθεί ακόμη κλινικές μελέτες (133).

- **Αναστολείς της αγγειογένεσης:**

Η παρουσία αγγειακής παροχής αίματος στο έκτοπο ενδομήτριο αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την εμφύτευση και επιβίωση των ενδομητριωσικών κυττάρων. Η διαδικασία αυτή που καλείται αγγειογένεση, είναι μια πολύπλοκη αλληλουχία γεγονότων. Έτσι, παράγοντες που προάγουν την αγγειογένεση όπως ο VEGF έχουν χρησιμοποιηθεί ως στόχοι προκειμένου να ανασταλλεί η διαδικασία της αγγειογένεσης. Το μόριο του VEGF έχει εντοπιστεί σε ενδομητριωσικές βλάβες και στο περιτοναϊκό υγρό των γυναικών με ενδομητρίωση. Η αναστολή λοιπόν του μορίου του VEGF με τη χρήση ουσιών όπως ενδοστατίνη, η σελεκοξίμπη και η ροσιγλιταζόνη μείωσαν το μέγεθος των ενδομητριωσικών βλαβών (133).

- **Αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών του στρώματος:**

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες του στρώματος (MMPs) είναι μια οικογένεια ενδοπεπτιδασών που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση και στην ανακύκλωση των εξωκυττάρων

πρωτεϊνών του στρώματος. Η δράση τους ρυθμίζεται από ειδικούς ιστικούς αναστολείς που καλούνται αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMPs). Η δραστηριότητα αυτών των ενζύμων στο ενδομήτριο καθορίζεται από τα επίπεδα των στεροειδών ορμονών. Έτσι, τα οιστρογόνα αυξάνουν τις MMPs του ενδομητρίου και η προγεστερόνη καταστέλλει τη δραστηριότητά τους.

Η δραστηριότητα των MMPs έχει περιγραφεί πως είναι αυξημένη στην ενδομητρίωση και φαίνεται να είναι αναπόσπαστο κομμάτι της ικανότητας του ενδομητρίου να εισβάλει σε άλλους ιστούς και να εμφυτεύεται με επιτυχία. Η αναστολή αυτών των ενζύμων θα μπορούσε να είναι αποτελεσματική στην αναστολή της ανάπτυξης της ενδομητρίωσης. Η αξία και η πρακτικότητα αυτών των θεραπευτικών μέτρων μένει να αξιολογηθεί.

- **Πεντοξυφυλλίνη και άλλα ανοσοτροποποιητικά φάρμακα:**

Η πεντοξυφυλλίνη είναι ένας ανοσοτροποποιητικός παράγοντας που αναστέλλει τη φαγοκυττάρωση, τη δημιουργία τοξικών ριζών οξυγόνου, πρωτεολυτικών ενζύμων από τα μακροφάγα και τα κοκκιοκύτταρα, μειώνει την παραγωγή TNF-α και τη φλεγμονώδη δράση του TNF-α και της IL-1. Το γεγονός ότι στην ενδομητρίωση παρατηρούνται πολλές ανωμαλίες στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, καθιστά τη μελέτη του φαρμάκου αυτού στη θεραπεία της ενδομητρίωσης μια λογική επιστημονική αντίδραση. Η πεντοξυφυλλίνη έχει ένα βασικό πλεονέκτημα σε αντίθεση με άλλες ουσίες: δεν προκαλεί ανωθυλακιορρηξία και ως εκ τούτου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της υπογονιμότητας που σχετίζεται με την ενδομητρίωση. Το φάρμακο αυτό είναι γενικώς καλά ανεκτό με λίγες ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με γαστρεντερικά ενοχλήματα και ζάλη.

Δύο άλλες αντίστοιχες ουσίες έχουν χρησιμοποιηθεί πειραματικά. Πρόκειται για την λοξοριμπίνη, έναν ανοσοτροποποιητικό παράγοντα που ενισχύει την παραγωγή κυτταροκινών και έχει ως αποτέλεσμα την υποστροφή των ενδομητριοεικών εμφυτευμάτων. Η ιντερφερόνη άλφα-2βήτα φαίνεται να αναστέλλει την ανάπτυξη των ενδομητριοεικών κυττάρων σε κυτταροκαλλιέργειες. Παρόλα αυτά μένει να δοκιμαστούν τα παραπάνω φάρμακα και σε πρωτεύοντα.

- **Αγωνιστές των οιστρογονικών υποδοχέων τύπου β:**

Μετά από εκτενή έρευνα έχει επιβεβαιωθεί το γεγονός ότι η ενδομητρίωση είναι μια οιστρογόνο-εξαρτώμενη νόσος. Ωστόσο, πρόσφατα ανακαλύφθηκε η παρουσία δύο τύπων υποδοχέα των οιστρογόνων: ο Υποδοχέας τύπου α (ER-α) και ο Υποδοχέας τύπου β (ER-β). Ο ER-α έχει συσχετιστεί με τον πολλαπλασιασμό του ενδομητρίου, η λειτουργία του ER-β παραμένει αδιευκρίνιστη. Αυτός ο υποδοχέας έχει εντοπιστεί σε διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου και του ανοσοποιητικού συστήματος, όμως εκφράζεται πλημμελώς ή και καθόλου στους αναπαραγωγικούς ιστούς. Το mRNA του ER-β έχει εντοπιστεί στο ενδομητρικό στρώμα, στο επιθήλιο και στα ενδομητρίωματα, αλλά ο πρωτεϊνικός υποδοχέας δεν έχει εντοπιστεί σε αυτούς τους ιστούς. Μελέτες ενδομητρίωσης που χρησιμοποίησαν γενετικά τροποποιημένα ποντίκια χωρίς θύμο αδένες, τα οποία παράγουν ελάχιστα ή και καθόλου ώριμα T-λεμφοκύτταρα και συνεπώς

δεν προκαλούν απόρριψη αλλογενών μοσχευμάτων (nude mice), έδειξαν πως η χρήση ενός αγωνιστή του ER-β υποδοχέα προκάλεσε υποστρόφη των βλαβών και ειδικά εκείνων που βρίσκονταν ενδοπεριτοναϊκά. Οι μηχανισμοί οι οποίοι πιθανόν να προκαλούν αυτού του είδους την δράση είναι αρκετοί. Μία εξήγηση μπορεί να είναι το γεγονός ότι ο αγωνιστής του υποδοχέα του ER-β λειτουργεί ως ανοσοτροποποιητής του ανοσολογικού συστήματος του μελετώμενου μυ, ενισχύοντας την ανοσολογική απάντηση απέναντι στα εμφυτεύματα. Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός περιλαμβάνει την αναγνώριση του ER-β στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του ενδομητρίου. Μια αντι-αγγειογενετική δράση μπορεί επίσης να εξηγήσει την υποστρόφη του ενδομητρικού εμφυτεύματος. Πιθανολογείται, αλλά δεν έχει αποδειχθεί ακόμη, η παρουσία του ER-β στην ενδομητρίωση, με την σκέψη πως δρα ενδοκυτταρικά ως αναστολέας του ER-α που διμερίζεται και σχηματίζει με αυτόν ένα λανθασμένο πρωτεϊνικό προϊόν που δε μπορεί να διεγερθεί από τα ενδογενή οιστρογόνα. Όλα αυτά όμως χρήζουν διερεύνησης και οι επερχόμενες μελέτες διαφωτίσουν τους ακριβείς μηχανισμούς.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΤΙΤΛΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ:

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΜΠΕΡΓΟΛΙΔΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ Ν-ΑΚΕΤΥΛΟ-ΚΥΣΤΕΪΝΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΙΚΩΝ ΕΜΦΥΤΕΥΜΑΤΩΝ ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗΣ. ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ WISTAR.

1. Εισαγωγή:

Η ενδομητρίωση θεωρείται απόρροια της παλίνδρομης εμμήνου ρύσεως, καθώς το αποπίπτον ενδομήτριο έχει την ικανότητα να προσκολλάται και να εμφυτεύεται εκτός της ενδομητρικής κοιλότητας (122, 134). Απαραίτητη προϋπόθεση για την επιβίωσή του σε έκτοπες θέσεις είναι η ύπαρξη επαρκούς αιματικής παροχής (122, 134). Το ενδομήτριο έχει αγγειογενετικό δυναμικό και οι ενδομητριωσικές βλάβες αναπτύσσονται σε περιοχές με συνεχή και επαρκή αιματική ροή (135). Αυτό σημαίνει ότι η αγγειογένεση είναι προαπαιτούμενο για την ανάπτυξη της ενδομητρίωσης (136). Η αγγειογένεση είναι μια δυναμική διαδικασία που συμπεριλαμβάνει πολλούς διαφορετικούς παράγοντες. Μερικοί προ-αγγειογενετικοί παράγοντες έχουν αποδειχθεί πως αυξάνονται στο περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση, ενώ τα επίπεδα άλλων παραγόντων με αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες είναι χαμηλότερα (137).

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor-VEGF) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη με αγγειογενετική δράση και χαρακτηρίζεται εκλεκτικής επιθηλιακής μιτογόνου δραστηριότητας. Με την ιδιότητά του να αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα θεωρείται ότι διαδραματίζει βασικό ρόλο στη φυσιολογική και παθολογική αγγειογένεση (138). Ο VEGF έχει αποδειχθεί πως εκκρίνεται σε μεγάλες ποσότητες από τα μακροφάγα του περιτοναϊκού υγρού των γυναικών με ενδομητρίωση (59, 139). Επιπλέον, υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της σοβαρότητας της νόσου και της έκκρισης του VEGF στο περιτοναϊκό υγρό (140). Έτσι, προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος του VEGF στη σχετιζόμενη με την ενδομητρίωση αγγειογένεση πραγματοποιήθηκαν πειραματικές μελέτες με προσδέτες του VEGF (141) και αντισώματα που αποκλείουν τον VEGFR-2, τα αποτελέσματα των οποίων ήταν ενθαρρυντικά σε ότι αφορά την μείωση του μεγέθους των ενδομητριωσικών εμφυτευμάτων.

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει επικεντρωθεί στο μονοπάτι της ενεργοποίησης του υποδοχέα της ντοπαμίνης τύπου 2 (Dp-r2) από τη ντοπαμίνη (Dp) και την ρύθμιση των αγγειογενετικών διαδικασιών που διαμεσολαβούνται από το σύστημα VEGF/VEGFR-2 (142). Σε μοντέλο πρόκλησης καρκίνου σε μύες, η χορήγηση υψηλών δόσεων αγωνιστών του Dp-r2 αποκλείει την σχετιζόμενη με τον όγκο αγγειογένεση, ενώ παράλληλα μειώνει τη διαπερατότητα του αγγειακού τοιχώματος, μέσω του συστήματος VEGF/VEGFR-2 (143). *In vitro* μελέτες προτείνουν ως μοριακό μηχανισμό την εσωτερίκευση του VEGFR-2 που προκαλείται από την ενεργοποίηση του Dp-r2 (143). Συνεπεία τούτου είναι η αναστολή της πρόσδεσης του VEGF στον υποδοχέα του και η αναστολή της δράσης του παράγοντα αυτού, δηλαδή η αναστολή της αγγειογένεσης.

Παράλληλα, ο ρόλος των αντιοξειδωτικών παραγόντων στην ενδομητρίωση βρίσκεται υπό μελέτη και κάποια αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα. Τα αντιοξειδωτικά συστήματα φαίνεται πως προστατεύουν τους ιστούς από τις ανεπιθύμητες δράσεις των ελευθέρων ριζών. Στη μελέτη των Szczeranska και συν (27) παρατηρήθηκε μείωση του συνολικού αντιοξειδωτικού δυναμικού του περιτοναϊκού υγρού των γυναικών με υπογονιμότητα και ενδομητρίωση, σε σχέση με τις γυναίκες με ιδιοπαθή υπογονιμότητα. Οι Portz και συν (144) έδειξαν πως ένας συνδυασμός ενζύμων που απενεργοποιούν τις δραστικές ρίζες του οξυγόνου, προκάλεσαν μείωση και στις ενδομητρωσικές συμφύσεις. Αντίθετα, οι Argumugam και Yip (145) δεν κατάφεραν να αναγνωρίσουν μια αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ των αντιοξειδωτικών και της ενδομητρίωσης. Εντούτοις, μελέτες έχουν δείξει πως ο πολλαπλασιασμός των ενδομητρωσικών κυττάρων αναστέλλεται και τα επιθηλιακά κύτταρα οδηγούνται προς την οδό της διαφοροποίησης, όταν χορηγείται ο αντιοξειδωτικός παράγοντας της Ν-ακέτυλο-κυστεΐνης (NAC) (146-149). Για το λόγο αυτό, η διερεύνηση του ρόλου της NAC φαίνεται να είναι απαραίτητη.

Στην παρούσα μελέτη λοιπόν, αναπτύξαμε ένα πειραματικό μοντέλο ενδομητρίωσης σε επίμυες και διερευνούμε την επίδραση ενός ντοπαμινεργικού αγωνιστή, της καμπεργολίδης, και μιας αντιοξειδωτικής ουσίας, της NAC, στην αναστολή της αύξησης του μεγέθους των ενδομητρωσικών εμφυτευμάτων. Η υπόθεσή μας υποστηρίζει ότι η χορήγηση της καμπεργολίδης θα μπορέσει να μειώσει την ανάπτυξη της ενδομητρίωσης μέσω της απενεργοποίησης του VEGFR-2 και ότι η συγχορήγηση της αντιοξειδωτικής αγωγής (NAC) θα μπορέσει να λειτουργήσει συνεργικά με εντυπωσιακότερα αποτελέσματα.

2. Σκοπός:

Σκοπός της μελέτης είναι η διερεύνηση της δράσης ενός ντοπαμινεργικού αγωνιστή (της καμπεργολίδης) και ενός αντιοξειδωτικού παράγοντα (της Ν-ακέτυλο-κυστεΐνης) στην ανάπτυξη του έκτοπου ενδομητρωσικού ιστού και η διερεύνηση πιθανής συνεργικής τους δράσης.

3. Υλικά & Μέθοδος:

3.1 Πειραματικό μοντέλο ενδομητρίωσης:

Για τη διενέργεια του πειράματός μας χρησιμοποιήθηκαν σαράντα θηλυκοί επίμυες του γένους Wistar, σεξουαλικά ώριμοι ηλικίας περίπου 3-4 μηνών και βάρους περί τα 300-400g. Τα πειραματόζωα παρελήφθησαν από το Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur φέροντας εγκεκριμένο πιστοποιητικό υγείας για την πιστοποίηση της καταγωγής τους, την απαλλαγή τους από παθογόνους μικροοργανισμούς και την ασφαλή χρήση τους ως πειραματόζωα. Τα ζώα στεγάστηκαν σε ειδικά κλουβιά στο Πειραματικό Χειρουργείο του Αρεταιείου Νοσοκομείου (2 ή 3 πειραματόζωα/κλουβί) σε συνθήκες θερμοκρασίας $22 \pm 2^\circ \text{C}$, σχετικής υγρασίας $55 \pm 10 \%$, αερισμού με 15 ± 3 εναλλαγές αέρα ανά ώρα και τεχνητού φωτισμού με διατήρηση του κερκάρδιου ρυθμού (12 ώρες ημέρα και 12 ώρες νύχτα). Τα πειραματόζωα παρέμειναν στο χώρο του πειραματικού χειρουργείου για 10 περίπου ημέρες προκειμένου να εγκλιματιστούν και να αποφευχθεί το stress που σχετίζεται με την

αλλαγή του χώρου διαβίωσής τους και σιτίζονταν με ελεύθερη πρόσβαση σε ειδική ξηρά τροφή και νερό. Η μελέτη έλαβε την έγκριση από την ειδική επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Αρεταιείου Νοσοκομείου και την Γενική Διεύθυνση Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής, Διεύθυνση Αγροτικής και Κτηνιατρικής Πολιτικής της Περιφέρειας Αθηνών σχετικά με την ορθή χρήση και τη φροντίδα των ζώων που έχουν προσδιοριστεί ως πειραματόζωα (Αριθμός Έγκρισης 487/10-2-2012). Η μελέτη διενεργήθηκε αυστηρά με βάση τους κανόνες που καθορίζουν τη χρήση των ζώων του εργαστηρίου.

Για την ταυτοποίηση του κάθε ζώου προτιμήθηκε η τεχνική της εγγραφής αριθμού με κωδικοποίηση γραμμών, με τη χρήση ανεξίτηλης μελάνης στην ουρά του επίμου. Προτού διενεργηθεί οποιοσδήποτε χειρουργικός χειρισμός στα πειραματόζωα ελήφθησαν δείγματα αίματος με τη βοήθεια της υπεύθυνης Κτηνιάτρου. Για το σκοπό αυτό τα πειραματόζωα έλαβαν γενική αναισθησία με αιθέρα και με τη χρήση λεπτής γυάλινης πιπέτας Pasteur πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες (0,5-1 ml αίματος/πειραματόζωο) από το οπισθοβολβικό φλεβικό πλέγμα. Τα δείγματα αυτά φυγοκεντρήθηκαν άμεσα σε ψυχόμενη φυγόκεντρο και οι οροί που προέκυψαν φυλάσσονται σε βαθειά κατάψυξη στους -80° C. Στη συνέχεια στους οφθαλμούς από τους οποίους έγιναν οι αιμοληψίες επιπωματίστηκαν τα κλειστά βλέφαρα με αποστειρωμένες γάζες για λίγα λεπτά και χρησιμοποιήθηκε οφθαλμικό κολλύριο τομπραμικίνης και δεξαμεθαζόνης (σκεύασμα Tobradex®) σε δοσολογία 1-2 σταγόνες/πειραματόζωο για την αποφυγή οφθαλμικής μόλυνσης και φλεγμονής. Τα πειραματόζωα βρίσκονταν υπό στενή παρακολούθηση μέχρις ότου αφυπνισθούν από τη γενική αναισθησία και για το πρώτο 24ωρο μετά τους χειρισμούς. Όλα τα ζώα ανένηψαν καλώς, ενώ δεν παρουσιάστηκε επιπλοκή από τον οφθαλμικό βολβό σε κανένα πειραματόζωο. Στη συνέχεια, τα πειραματόζωα παρέμειναν χωρίς κανέναν ιατρικό χειρισμό για την επόμενη εβδομάδα προκειμένου να παρακολουθηθούν και να ανανήψουν από το stress της αιμοληψίας.

Μία με δύο εβδομάδες αργότερα, τα ζώα υπεβλήθησαν σε χειρουργικώς επαγόμενη ενδομητρίωση με βάση το χειρουργικό πρωτόκολλο που προτείνεται από τους Vlahos NF και συν (91). Μετά από διάστημα τριών εβδομάδων τα πειραματόζωα υπεβλήθησαν υπό γενική αναισθησία και αναλγησία σε δεύτερη λαπαροτομία για να κριθεί η επαγωγή της ενδομητρίωσης και να αξιολογηθεί η βιωσιμότητα των εμφυτευμάτων, σύμφωνα με το ίδιο πρωτόκολλο (91). Στη συνέχεια για 3 εβδομάδες χορηγήθηκαν στα πειραματόζωα μέσω του πόσιμου νερού που ελάμβαναν τα θεραπευτικά σκευάσματα που μελετήθηκαν ως εξής: Η ομάδα control δεν έλαβε καμία ουσία, η δεύτερη ομάδα έλαβε NAC σε δόση 100 ml διαλύματος (10 mg/ml) (σκεύασμα παιδιατρικού σιροπιού Trebon-N®), σε δόση 44 mg/kg/ζώο ημερησίως, σύμφωνα με την πειραματική μελέτη των Pittaluga E και συν (150). Η επόμενη ομάδα έλαβε καμπεργολίδη (σκεύασμα Dostinex®) per os σε δόση 0,1 mg/kg βάρους σύμφωνα με το μοντέλο των Novella-Maestre E και συν για 3 εβδομάδες (151). Η τελευταία ομάδα έλαβε για το ίδιο χρονικό διάστημα των 3 εβδομάδων ταυτόχρονα NAC και καμπεργολίδη στις δόσεις που προαναφέρθηκαν. Μετά το πέρας των 3 εβδομάδων τα πειραματόζωα υπεβλήθησαν και πάλι σε λαπαροτομία υπό γενική αναισθησία και αναλγησία και εν συνεχεία σε ευθανασία ενώ ταχέως αναγνωρίστηκαν και αφαιρέθηκαν

τα ενδομητριωσικά εμφυτεύματα και πραγματοποιήθηκε αιμοληψία με παρακέντηση της κάτω κοίλης φλέβας.

3.2. Αναισθησιολογικό Πρωτόκολλο:

Για την πραγματοποίηση του πειράματος τα πειραματόζωα υπεβλήθησαν σε τρεις διαδοχικές λαπαροτομίες υπό γενική αναισθησία και αναλγησία, σύμφωνα με τις οδηγίες της υπεύθυνης Κτηνιάτρου. Η γενική αναισθησία επετεύχθη με τη χρήση υδροχλωρικής κεταμίνης (σκεύασμα Ketavet®) ενδομυϊκά σε δόση 70 mg/kg και ξυλαζίνης (σκεύασμα Rompun®) ενδομυϊκά σε δόση 3 mg/kg. Διεγχειρητικά και μετεγχειρητικά έλαβαν αναλγησία με ενδομυϊκή χορήγηση βουτορφανόλης (σκεύασμα Butador®) σε δόση 2 mg/kg. Στην άμεση μετεγχειρητική περίοδο και πριν ακόμα τα ζώα αφυπνισθούν έλαβαν υποδορίως 3 ml διαλύματος NaCl 0,9 % v/v προκειμένου να αποφευχθεί η αφυδάτωση. Όλα τα πειραματόζωα παρακολουθήθηκαν στενά κατά τη διάρκεια του πρώτου 24ώρου μετά τις χειρουργικές επεμβάσεις και 8-10 ώρες μετά το πέρας της επέμβασης έλαβαν επιπλέον δόση αναλγησίας. Η ανάνηψη ήταν ομαλή για όλα τα πειραματόζωα πλην δύο, τα οποία μετά το πέρας της πρώτης λαπαροτομίας εμφάνισαν αναπνευστική δυσχέρεια και κατέληξαν παρόλες τις προσπάθειες ανάνηψης που χρησιμοποιήθηκαν από την κτηνίατρο του πειράματος.

3.3 Χειρουργικό Πρωτόκολλο:

Η ενδομητρίωση επάχθηκε χειρουργικά με εμφύτευση ενός αυτόλογου τμήματος ενδομητρικού ιστού στην έσω επιφάνεια του πρόσθιου κοιλιακού τοιχώματος όπως προτείνεται από τους Vlahos NF και συν (91). Όλες οι παρεμβάσεις πραγματοποιήθηκαν κάτω από αυστηρά άσηπτες συνθήκες. Οι επίμυες τοποθετήθηκαν σε ύπτια θέση. Η διατομή του δέρματος των επίμυων διενεργήθηκε με μία μέση τομή 3-5 cm με τη χρήση νυστεριού. Στη συνέχεια αναγνωρίστηκαν τα δύο μητρικά κέρατα. Το περιφερικό τμήμα του δεξιού κέρατος μήκους 1 cm περίπου απολινώθηκε στο ύψος της υστεροσαλπινγικής συμβολής και διετάμη στο εγγύς άκρο του. Το αφαιρεθέν κομμάτι διατηρήθηκε σε αποστειρωμένο δοχείο που περιείχε NaCl 0,9 % στους 37 °C. Το δεξί ενδομητρικό κέρατος διανοίχθηκε κατά μήκος με νυστέρι No 11 και αφαιρέθηκαν 4 ιστοτεμαχίδια μεγέθους 5x5mm από το τοίχωμα της μήτρας, έτσι ώστε τα τεμαχίδια να περιέχουν όλες τις στοιβάδες του τοιχώματος. Τα ιστοτεμαχίδια τοποθετήθηκαν στην έσω επιφάνεια του πρόσθιου κοιλιακού τοιχώματος και σταθεροποιήθηκαν με μη απορροφήσιμο νάιλον ράμμα 5/0. Το κοιλιακό τοίχωμα συμπλησιάστηκε και τοποθετήθηκε ραφή σε δύο στρώματα: ένα στρώμα περιελάμβανε την περιτονία και το περιτόναιο και το άλλο στρώμα το δέρμα.

Τρεις εβδομάδες αργότερα τα ζώα υπεβλήθησαν σε δεύτερη λαπαροτομία υπό γενική αναισθησία και αναλγησία με τον ίδιο τρόπο προκειμένου να αξιολογηθεί η βιωσιμότητα και το μέγεθος του έκτοπου ενδομητρικού ιστού. Όλα τα εμφυτεύματα μετρήθηκαν με τη χρήση ενός ψηφιακού υποδεκάμετρου ακριβείας και μετρώντας όλες τις διαστάσεις τους, κατεγράφη ο όγκος τους πριν οποιαδήποτε θεραπευτική εφαρμογή. Στη συνέχεια τα πειραματόζωα κατατάχθηκαν τυχαία σε 4 ομάδες: Την ομάδα ελέγχου, την ομάδα που

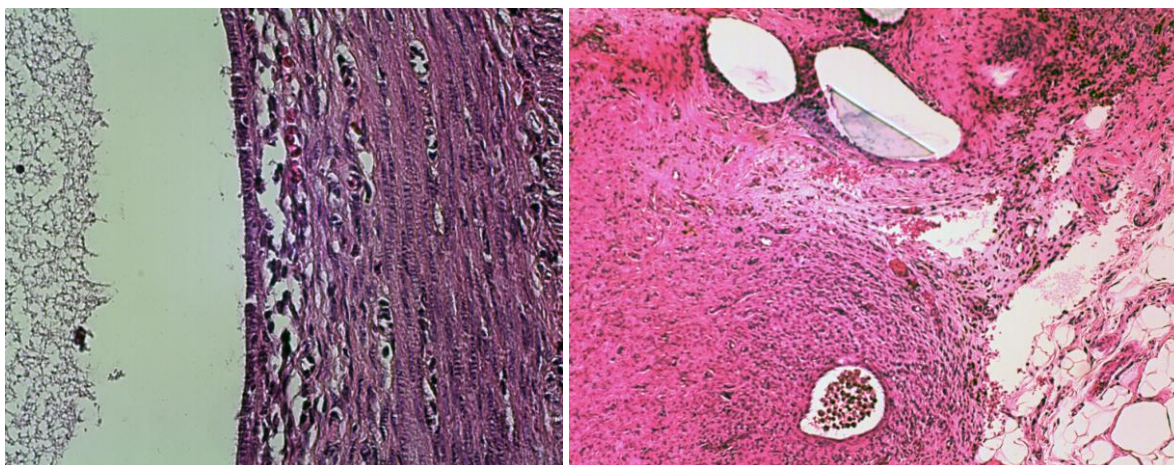
έλαβε ως θεραπεία NAC, την ομάδα που έλαβε θεραπευτικά καμπεργολίδη και την ομάδα που έλαβε το συνδυασμό NAC και καμπεργολίδης. Κατά την τυχαιοποίηση και εξαιτίας του θανάτου δύο πειραματόζων η ομάδα ελέγχου περιελάμβανε 9 πειραματόζωα, η ομάδα του NAC 10 πειραματόζωα, η ομάδα της καμπεργολίδης 9 πειραματόζωα και η ομάδα του συνδυασμού NAC-καμπεργολίδης 10 πειραματόζωα. Τα πειραματόζωα έλαβαν θεραπεία για 3 εβδομάδες και μετά το πέρας αυτού του διαστήματος υπεβλήθησαν στην τρίτη και τελική λαπαροτομία υπό γενική αναισθησία και αναλγησία.

Κατά τη διάρκεια της τρίτης και τελικής λαπαροτομίας αναγνωρίστηκαν, φωτογραφήθηκαν και αφαιρέθηκαν τα ενδομητριωσικά μοσχεύματα από όλα τα πειραματόζωα. Τα μοσχεύματα μετρήθηκαν με τη βοήθεια ψηφιακού υποδεκάμετρου ακριβείας από τους ίδιους χειρουργούς, φωτογραφήθηκαν με τη χρήση ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής και μονιμοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλίνης 10 %, στο οποίο και παρέμειναν για 24 ώρες περίπου. Από κάθε ζώο αφαιρέθηκαν το ελάχιστο 1 μόσχευμα και το μέγιστο 4. Στα ζώα που είχαν περισσότερα του ενός ενδομητριωσικά μοσχεύματα, το ένα αφού μετρήθηκε τοποθετήθηκε σε βαθιά κατάψυξη (στους -80°C). Μετά την εκτομή των ενδομητριωσικών μοσχευμάτων τα πειραματόζωα ευθανατώθηκαν με τη χρήση υπερβολικής δόσης κεταμίνης ενδοπεριτοναϊκώς. Αμέσως μετά πραγματοποιήθηκε αιμοληψία με παρακέντηση της κάτω κοίλης φλέβας.

4. Μετρήσεις:

4.1 Ιστολογική Εκτίμηση:

Τα μονιμοποιημένα παρασκευάσματα τοποθετήθηκαν από το διάλυμα της φορμαλίνης σε μπλοκ παραφίνης και κόπηκαν σε τομές πάχους 5 μm . Η παρουσία βιώσιμων ενδομητριωσικών εμφυτευμάτων επιβεβαιώθηκε με τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Η ιστολογική εξέταση έθεσε τη διάγνωση της ενδομητρίωσης με αναγνώριση του ενδομητρικού αδενικού ιστού και του στρώματος. Ο ερευνητής που αξιολόγησε τις τομές από κάθε εμφύτευμα δεν είχε γνώση της ομαδοποίησης και της κατάταξης των πειραματόζων. Παρακάτω φαίνονται τυπικές ιστολογικές εικόνες ενδομητριωσικών εστιών, οι οποίες ελήφθησαν από τα πειραματόζωα της μελέτης μας.



4.2 Υπολογισμός όγκου ενδομητριωσικού ιστού:

Τα ενδομητριωσικά εμφυτεύματων μετρήθηκαν με τη χρήση ψηφιακού υποδεκάμετρου ακριβείας από τους ίδιους χειρουργούς που είχαν αξιολογήσει τα μοσχεύματα στη δεύτερη λαπαροτομία, χωρίς εκείνοι να γνωρίζουν την ομάδα κατάταξης του κάθε ζώου. Τα εμφυτεύματα μετρήθηκαν σε τρεις διαστάσεις [μήκος(A), πλάτος(B), πάχος(C) σε mm] και ο όγκος του κάθε εμφυτεύματος υπολογίστηκε με τον τύπο που καθορίζει τον όγκο μιας ωοειδούς ελλειψοειδούς σφαίρας: $V (mm^3) = 0,52 \times A \times B \times C$. Μετά την καταγραφή των βιώσιμων εμφυτεύματων και τον υπολογισμό του όγκου του καθενός, υπολογίστηκε ο τελικός όγκος εμφυτεύματος ανά πειραματόζωο προσθέτοντας τους επιμέρους όγκους και τα στοιχεία αυτά χρησιμοποιήθηκαν για στατιστική μελέτη και ανάλυση.

4.3 Στατιστική Ανάλυση:

Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη μέθοδο T-test κατά ζεύγη, όταν οι κατανομές των τιμών κάθε μεταβλητής ήταν κανονικές. Όταν οι κατανομές δεν ήταν κανονικές, ή όταν οι μεταβλητές ήταν διακριτές ποσοτικές, ή όταν οι σταθερές αποκλίσεις των μέσων τιμών είχαν σημαντικές διαφορές χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική στατιστική ανάλυση με τη δοκιμασία Wilcoxon. Η κανονικότητα των κατανομών ελέγχθηκε με τη δοκιμασία Kolmogorov–Smirnov. Οι υπολογισμοί έγιναν με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS 15.0 για λειτουργικό πακέτο Microsoft Windows 7. Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε όταν $p < 0,05$. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν μέσος όρος \pm σταθερά απόκλιση. Ο έλεγχος της συνέργειας μεταξύ των δύο φαρμάκων έγινε με την εφαρμογή της μεθόδου Repeated Measures Two-way Analysis Of Variance. Ως κριτήριο στατιστικά σημαντικής συνέργειας των δύο φαρμάκων τέθηκε το $p < 0,05$.

5. Αποτελέσματα:

Τα πειραματόζωα είχαν την ίδια ηλικία και βάρος χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις. Το βάρος των πειραματοζώων που συμπεριελήφθηκαν στη μελέτη τόσο πριν όσο και μετά από κάθε θεραπευτική μας παρέμβαση δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε καμία ομάδα πειραματοζώων. Το πλήθος των βιώσιμων ενδομητριωσικών εμφυτεύματων που καταγράφηκαν πριν και μετά από κάθε θεραπεία, επίσης δεν είχε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όλες τις ομάδες. Παρατηρήθηκε μείωση του όγκου των ενδομητριωσικών εμφυτεύματων στην ομάδα της καμπεργολίδης (CAB) και στην ομάδα NAC+CAB σε βαθμό στατιστικά σημαντικό ($p = 0,038$ και $p = 0,002$ αντίστοιχα). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στις ομάδες NAC και control. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 3.

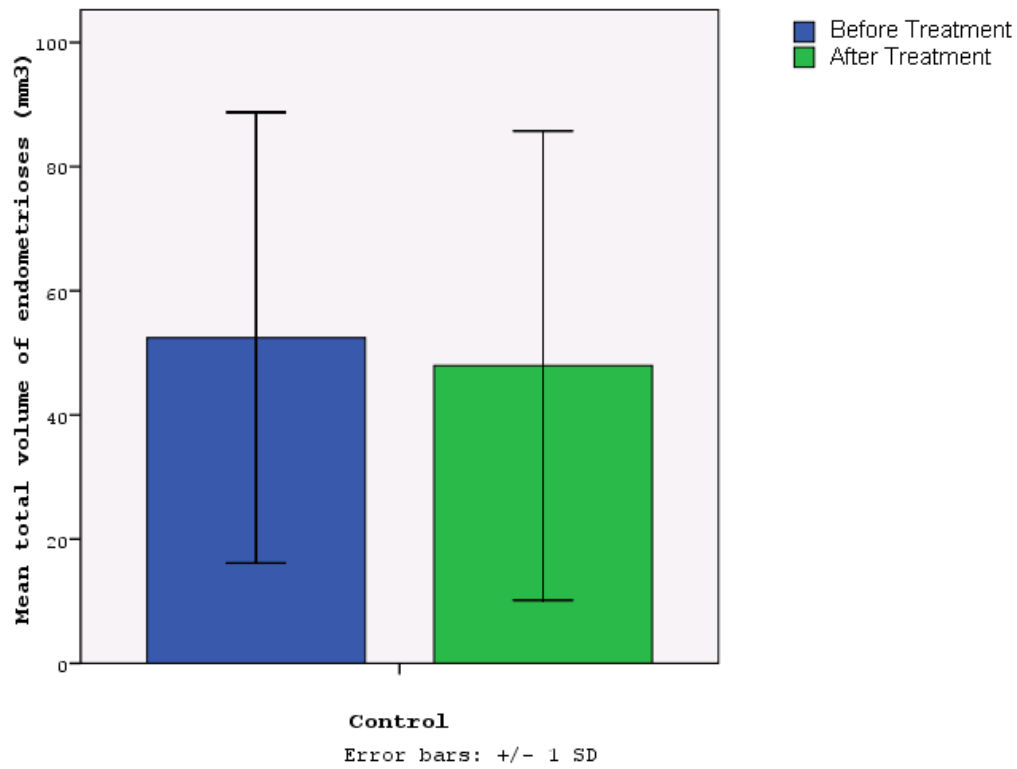
Με τη διενέργεια repeated measures two way analysis of variance, δεν παρατηρήθηκε συνεργική δράση των δύο ουσιών όσον αφορά στη μείωση του όγκου των ενδομητριωσικών εμφυτεύματων, παρά μόνο αθροιστική δράση ($p = 0,87$). (Εικόνα 17)

Descriptives

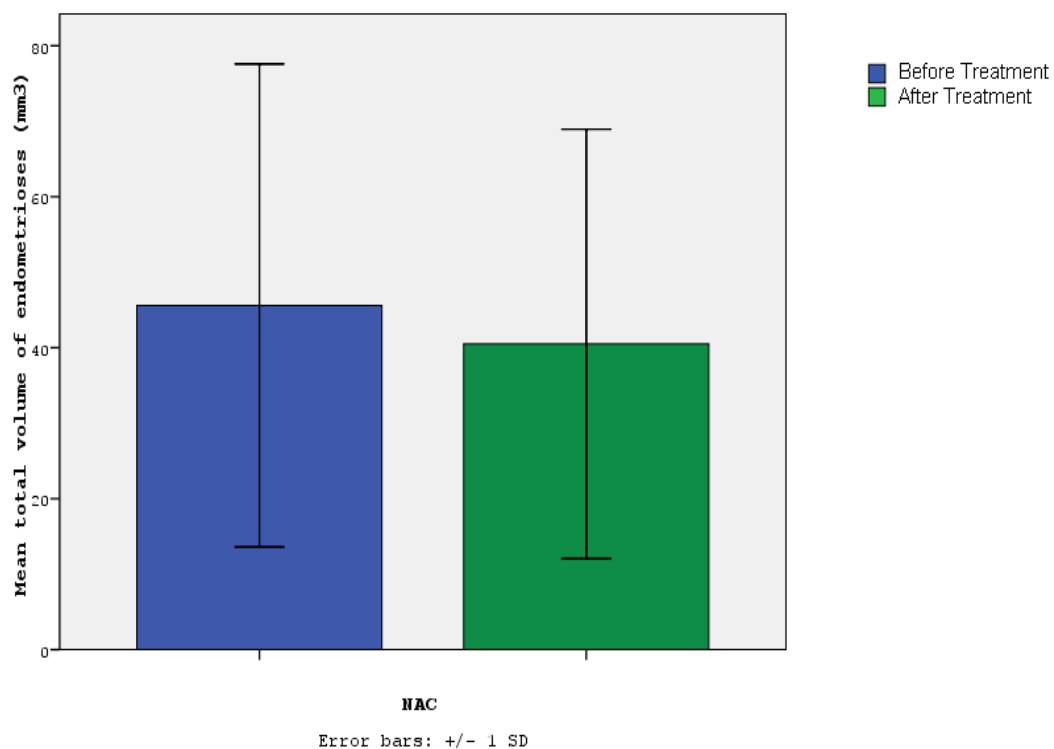
		N	Mean	Std. Deviation	p value
Implant volume before treatment (mm ³)	Control	9	52,4	36,3	
	NAC	10	45,6	32,0	
	CAB	9	58,1	53,4	
	NAC+CAB	10	78,1	32,4	
Implant volume after treatment (mm ³)	Control	9	47,9	37,8	,330
	NAC	10	40,5	28,4	,600
	CAB	9	23,7	20,0	,038
	NAC+CAB	10	34,1	18,3	,002
Animal weight at the strat of the experiment (grams)	Control	10	296,0	25,4	
	NAC	10	302,5	22,7	
	CAB	10	285,7	15,4	
	NAC+CAB	10	300,0	15,5	
Animal weight at the end of the experiment (grams)	Control	9	300,6	24,7	,420
	NAC	10	306,8	17,8	,220
	CAB	9	289,8	16,2	,130
	NAC+CAB	10	305,3	13,9	,330
Number of implants before treatment	Control	9	2,8	,7	
	NAC	10	2,3	,7	
	CAB	9	2,4	1,3	
	NAC+CAB	10	3,6	,7	
Number of implant after treatment	Control	9	2,9	1,1	,680
	NAC	10	2,5	1,0	,310
	CAB	9	2,2	1,0	,550
	NAC+CAB	10	3,6	,7	n/a

Πίνακας 3

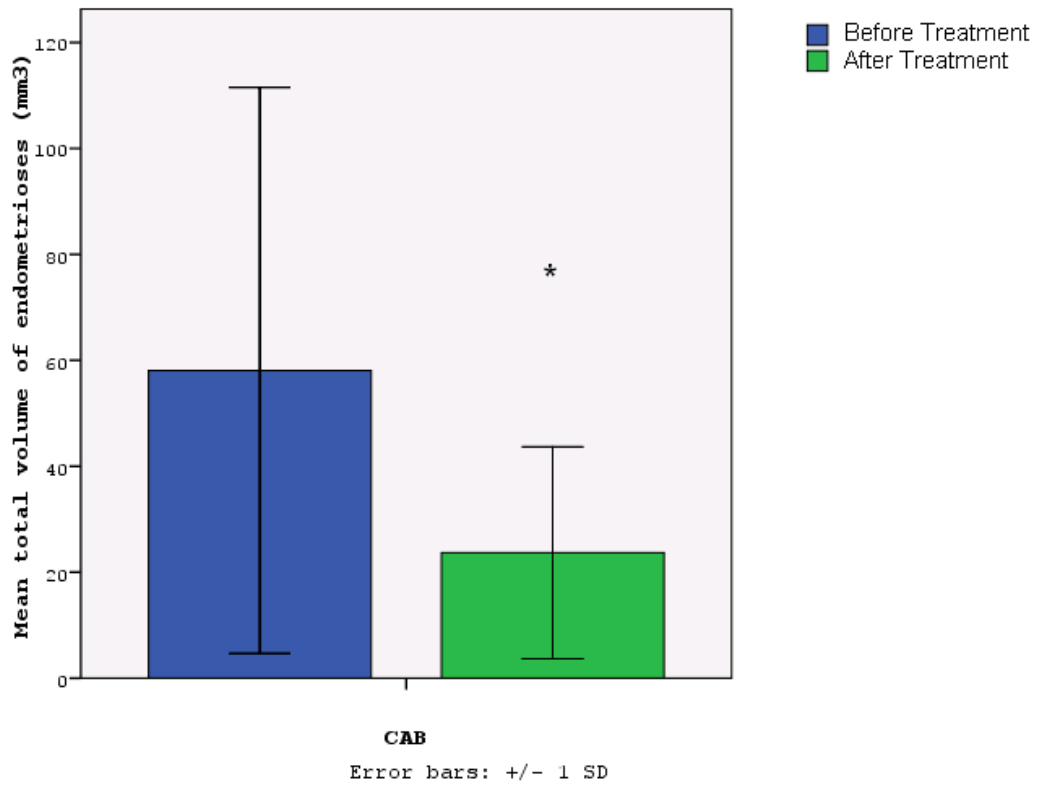
Στις *Εικόνες 12, 13, 14, 15, 16* φαίνεται διαγραμματικά η σχέση του μέσου συνολικού όγκου των ενδομητριωσικών εμφυτευμάτων ανάλογα με την ομάδα στην οποία ανήκουν πριν και μετά τη θεραπευτική παρέμβαση. Έτσι, στην *Εικόνα 3* παρουσιάζεται ο συσχετισμός του όγκου για την ομάδα ελέγχου, στην *Εικόνα 4* εμφανίζονται τα στοιχεία για την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε NAC, στην *Εικόνα 5* παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την ομάδα που έλαβε ως θεραπευτική παρέμβαση καμπεργολίδη (CAB) και στην *Εικόνα 6* τα στοιχεία της ομάδας που έλαβε το συνδυασμό NAC και CAB. Η *Εικόνα 7* παρουσιάζει μια συγκριτική απεικόνιση των αποτελεσμάτων όλων των ομάδων. Να σημειωθεί ότι με αστερίσκο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα με στατιστική σημαντικότητα.



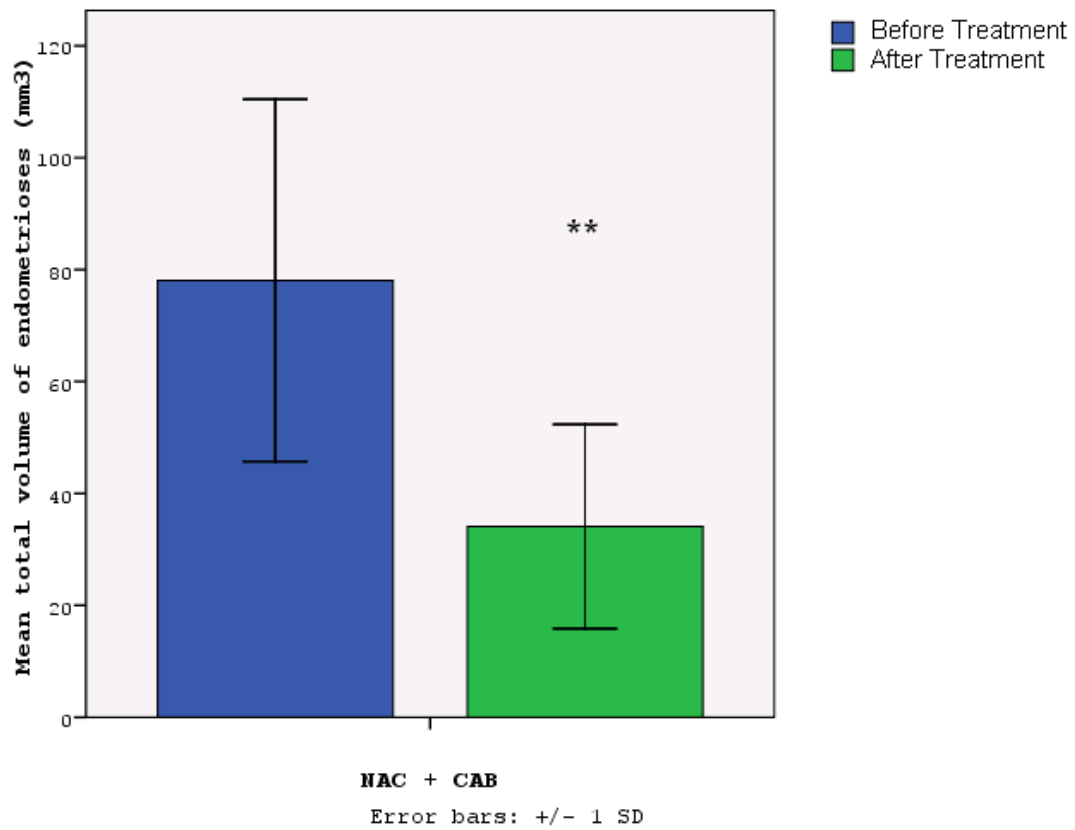
Εικόνα 12. Τα αποτελέσματα της ομάδας ελέγχου (N=9). Εδώ δεν υπάρχει θεραπευτική παρέμβαση. Ουσιαστικά πρόκειται για το μέσο συνολικό όγκο των εμφυτευμάτων κατά τη δεύτερη και τρίτη λαπαροτομία αντίστοιχα.



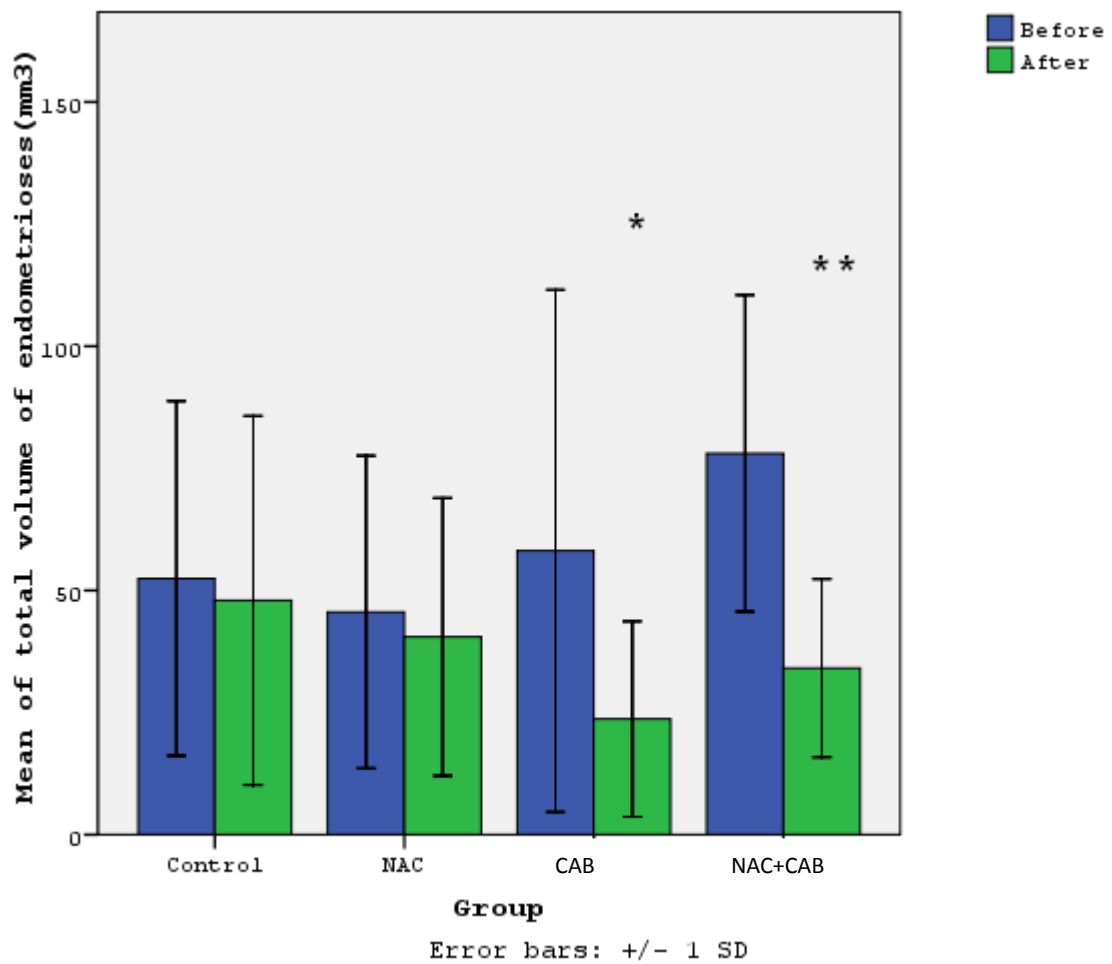
Εικόνα 13. Τα αποτελέσματα της ομάδας που έλαβε NAC (N=10). Δε φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή του μέσου συνολικού όγκου των ενδομητριωσικών εμφυτευμάτων εξαιτίας της θεραπευτικής μας παρέμβασης.



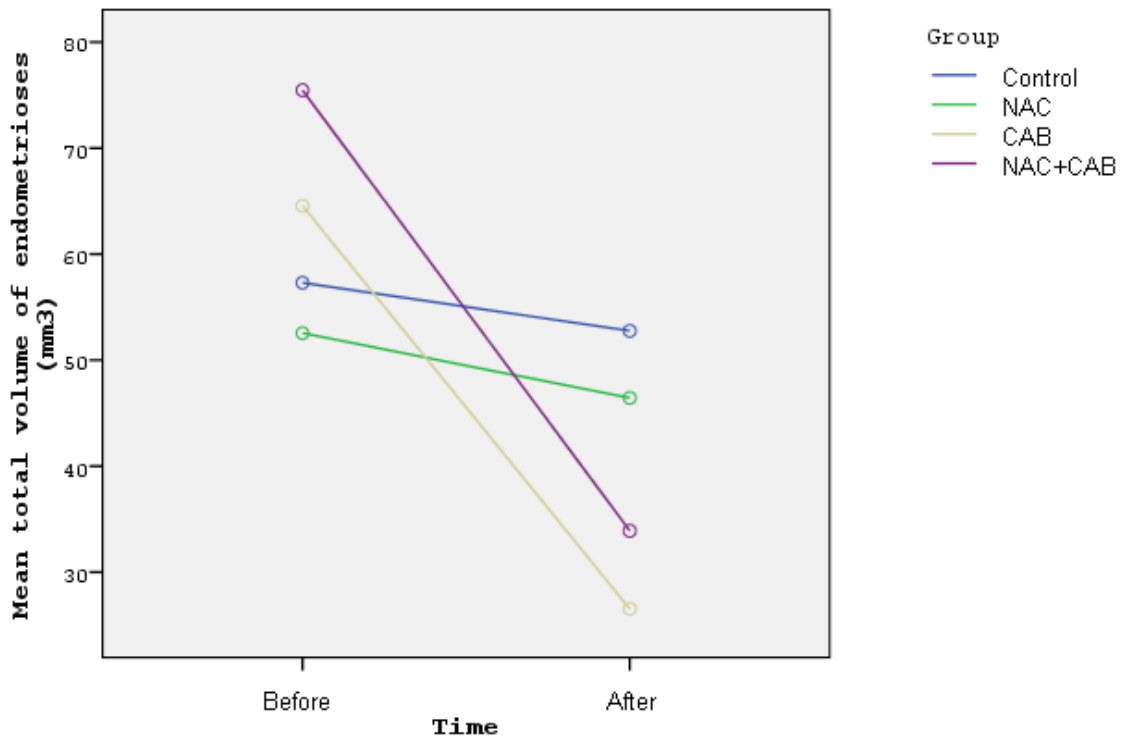
Εικόνα 14. Τα αποτελέσματα της ομάδας που έλαβε ως θεραπευτικό μέσο την CAB (N=9). Φαίνεται εντυπωσιακά η μείωση του μέσου συνολικού όγκου των ενδομητριωσικών εμφυτευμάτων πριν και μετά τη θεραπεία. Στατιστικά σημαντική η μεταβολή με (* $p < 0,05$)



Εικόνα 15. Τα αποτελέσματα της θεραπείας με το συνδυασμό NAC και CAB(N=10). Φαίνεται ότι ο μέσος συνολικός όγκος των ενδομητριωσικών εμφυτευμάτων έχει μειωθεί στατιστικά σημαντικά. (** $p < 0.005$)



Εικόνα 16. Διαγραμματική αναπαράσταση του μέσου συνολικού όγκου των ενδομητριωσικών εμφυτευμάτων πριν και μετά τις θεραπευτικές μας παρεμβάσεις. (* $p < 0,05$ και ** $p < 0.005$)



Εικόνα 17

Εικόνα 17. Παρουσιάζεται η διερεύνηση της πιθανής συνέργειας των χορηγούμενων φαρμάκων. Αν υπήρχε στατιστική σημαντικότητα και συνέργεια τότε οι ευθείες που αντιπροσωπεύουν τις αντίστοιχες θεραπείες θα έπρεπε να τέμνονται. Εδώ παρατηρούμε ότι η ευθεία της CAB με την αντίστοιχη του συνδυασμού NAC+CAB δεν είναι απολύτως παράλληλες. Έτσι θεωρητικά, θα μπορούσαν σε μεγαλύτερο χρονικό ορίζοντα να συμπίπτουν ή αν χρησιμοποιούνταν μεγαλύτερη δόση NAC. Όλα αυτά τα πιθανά ενδεχόμενα θα πρέπει να διευκρινιστούν σε μελλοντικές μελέτες.

6. Συζήτηση:

Τα τελευταία χρόνια η χρήση των αντι-VEGF παραγόντων αποτελεί αντικείμενο έρευνας για την αντιμετώπιση πολλών νοσημάτων όπως οφθαλμολογικά νοσήματα (ηλικιακή εκφύλιση ωχράς κηλίδος, διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια), του καρκίνου (νεοπλάσματα του νευρικού συστήματος και του πεπτικού συστήματος, νευροενδοκρινείς όγκοι, καρκίνος μαστού, μεταστατικό μελάνωμα), το σύνδρομο Denys-Drash (γοναδική δυσγενεσία, όγκος του Wilms, νεφροπάθεια), την προεκλαμψία και προσφάτως την ενδομητρίωση. Η ικανότητα του Avastin, ενός αντι-VEGF παράγοντα να αναστέλλει την αγγειογένεση σε ασθενείς με ογκολογικά νοσήματα αναφέρεται αρχικά το 2002 από τους Ferrara και συν (152), με περιορισμένη όμως επιτυχία. Το βασικό πρόβλημα αυτών των φαρμάκων είναι οι ανεπιθύμητες ενέργειες που προκαλεί η συστηματική χορήγησή τους, όπως φλεβίτιδα και ανορεξία, καταστάσεις αποδεκτές σε έναν ασθενή που πάσχει από καρκίνο, αλλά οπωσδήποτε μη αποδεκτές σε μια γυναίκα που πάσχει από ενδομητρίωση. Η επιλογή της καμπεργολίδης ως ντοπαμινεργικού αγωνιστή ήταν αποτέλεσμα της ευρείας χρήσης της, των ελάχιστων ανεπιθύμητων ενεργειών που συνεπάγεται η χρήση της ασφάλειάς της, αλλά και της οικονομικής τιμής της.

Η δράση της καμπεργολίδης στις πειραματικές βλάβες ήταν αποτέλεσμα της αναστολής της αγγειογενετικής διαδικασίας. Κατά πρώτο λόγο, παρατηρήθηκε μακροσκοπικά ένα πλούσιο αγγειακό δίκτυο στην ομάδα ελέγχου. Στα ζώα που χορηγήθηκε η καμπεργολίδα οι βλάβες ήταν περισσότερο λευκωπές και είχαν λιγότερο ανεπτυγμένο αγγειακό δίκτυο. Παρομοίως, τα ευρήματα της μικροσκόπησης περιελάμβαναν περιοχές με ενεργείς νεκρωτικές διαδικασίες, εξαιτίας της αναστολής της νεοαγγείωσης. Σε ότι αφορά την αγγειογένεση σε μοριακό επίπεδο, φαίνεται ότι τα πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε η καμπεργολίδα είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα του παράγοντα VEGF και του υποδοχέα του VEGFR-2 συγκριτικά με τα πειραματόζωα της ομάδας ελέγχου. Η μελέτη του αντι-αγγειογενετικού δείκτη Ang-1 έδειξε πως τα πειραματόζωα που έλαβαν καμπεργολίδα είχαν αυξημένα επίπεδα αυτού του δείκτη. Επίσης, προκειμένου να μελετηθεί ο ακριβής μηχανισμός δράσης της καμπεργολίδης, η προσοχή των ερευνητών στράφηκε προς το μονοπάτι του VEGF/VEGFR-2. Τα στοιχεία συγκλείνουν στο ότι οι αγωνιστές της ντοπαμίνης όπως η καμπεργολίδα προσδένονται στον υποδοχέα τύπου II του VEGF και τον απενεργοποιούν, αποτρέποντας τη φωσφορυλίωσή του. Πράγματι, η φωσφορυλίωση του VEGFR-2 ήταν σημαντικά μικρότερη στα πειραματόζωα που έλαβαν καμπεργολίδα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Όλα τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η καμπεργολίδα αποτρέπει την ανάπτυξη νεοαγγείωσης στον έκτοπο ενδομητρικό ιστό.

Αν και οι αγωνιστές της ντοπαμίνης έχουν επίδραση στο σύστημα του VEGF/VEGFR-2, δε θα πρέπει να αγνοηθεί το γεγονός ότι οι ουσίες αυτές μπορεί να δρουν και μέσω της αναστολής της έκκρισης της προλακτίνης. Η προλακτίνη είναι ένας ισχυρός αγγειογενετικός παράγοντας και ρυθμίζει τη φθαρτοποίηση και την ανάπτυξη του μαστού κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Σε άλλες πειραματικές μελέτες όπως για παράδειγμα

στο μυικό ιστό, η προλακτίνη προάγει την αγγειογένεση. Η προλακτίνη παρουσιάζει την προ-αγγειογενετική της δράση μέσω υποδοχέων στα αιμοφόρα αγγεία. Συνεπώς η χορήγηση αγωνιστών της ντοπαμίνης και η μείωση των επιπέδων της κυκλοφορούσας προλακτίνης μπορεί να αποτελέσει ένα παράλληλο μηχανισμό δράσης της καμπεργολίδης σε αυτό το μοντέλο. Αξίζει να σημειωθεί πως αρκετοί ερευνητές έχουν παρατηρήσει πως η υπερπρολακτιναιμία συσχετίζεται με την παρουσία ενδομητρίωσης (153, 154). Οι ερευνητές υποστηρίζουν πως αυτή η κατάσταση της υπερπρολακτιναιμίας μπορεί να εξηγήσει την υπογονιμότητα που παρουσιάζουν οι γυναίκες με ήπια έως μέτριας βαρύτητας ενδομητρίωση, καθώς η υπερπρολακτιναιμία αυξάνει την αγγειογένεση και προάγει ή διατηρεί την ανάπτυξη των ενδομητριοσικών βλαβών.

Στη μελέτη μας διερευνήθηκε επίσης η δράση της NAC ως αντιοξειδωτικός παράγοντας που αναστέλλει τη φλεγμονώδη αντίδραση που προκαλεί η ενδομητρίωση. Η NAC είναι μια φαρμακευτική ουσία χαμηλού μοριακού βάρους, η οποία φέρει ένα διακετυλιωμένο μόριο κυστεΐνης με μια θειική ομάδα που την καθιστά ιδιαίτερα δραστική. Η NAC θεωρείται πρόδρομος της γλουταθειόνης και δραστηριοποιείται στα περισσότερα βιοχημικά μονοπάτια που συμμετέχει και η γλουταθειόνη. Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο που περιέχει τα αμινοξέα L-κυστεΐνη, L-γλουταμινικό οξύ και γλυκίνη. Η θειική ομάδα της κυστεΐνης είναι υπεύθυνη για τη βιολογική της δραστηριότητα καθώς λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων. Πρακτικά λοιπόν, σε όποια αντίδραση συμμετέχει η γλουταθειόνη, μπορεί να συμμετέχει και η NAC. Η NAC διαχέεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς και όλα τα κύτταρα του οργανισμού, έχει σύντομο χρόνο ημίσειας ζωής (3 ώρες) και καθαίρεται σε διάστημα 12-18 ωρών. Σε βιοχημικό επίπεδο η NAC δρα σπάζοντας τον ασταθή δισουλφιδικό δεσμό της κυστεΐνης των βλεννοπρωτεϊνών, ως αντιοξειδωτικός παράγοντας και απενεργοποιητής των δραστικών ριζών του οξυγόνου. Στις ιδιότητες της NAC συμπεριλαμβάνονται επίσης η αύξηση των διακυτταρικών και κυτταροστρωματικών συνδέσεων (στροφή από τον πολλαπλασιασμό στη διαφοροποίηση), η μείωση της έκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνών του στρώματος (μείωση της κυτταρικής μετανάστευσης) και η μείωση της έκφρασης της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2) (μείωση της φλεγμονώδους αντίδρασης) (150). Αν προσπαθήσουμε να ανάγουμε τις παραπάνω ιδιότητες στη θεραπεία της ενδομητρίωσης με NAC, τότε θα περιμέναμε η NAC να προκαλέσει μείωση στον πολλαπλασιασμό των ενδομητριοσικών κυττάρων, μείωση της τοπικής χρόνιας φλεγμονής, μείωση των ιστικών μεταλλοπρωτεϊνών και αύξηση των διακυτταρικών και κυτταροστρωματικών συνδέσεων, άρα μείωση του αριθμού των έκτοπων ενδομητριοσικών κυττάρων.

Η υπόθεση του πειραματικού μας πρωτοκόλλου ήταν ότι με την χρήση δύο θεραπευτικών παραγόντων που έχουν χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν για την πειραματική αναστολή της ανάπτυξης της ενδομητρίωσης (150, 151) θα ήταν δυνατή η συνεργική τους δράση με αποτέλεσμα τη χρήση μικρότερων δόσεων των παραγόντων αυτών και την αποφυγή ανεπιθύμητων ενεργειών. Για τους σκοπούς του πειραματικού μας πρωτοκόλλου προσδιορίστηκαν ο αριθμός και ο όγκος των ενδομητριοσικών εμφυτεύσεων σε κάθε πειραματόζωο. Οι δείκτες αυτοί επιλέχθηκαν καθώς αποτελούν παραμέτρους που έχουν

χρησιμοποιηθεί και από άλλους ερευνητές για την μελέτη της αποτελεσματικότητας κατά της ενδομητρίωσης (91, 150, 151) .

Στη μελέτη μας δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στον αριθμό και στο μέσο όγκο των εστιών στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα που χορηγήθηκε NAC. Παρά το γεγονός ότι στην ομάδα ελέγχου δεν αναμενόταν διαφορά στον όγκο, καθώς δεν χορηγήθηκε κάποια θεραπεία, η έλλειψη δραστηριότητας της NAC στην μείωση του μέσου όγκου των εστιών δεν ήταν αναμενόμενη. Τα ευρήματα αυτά μπορούν να εξηγηθούν από την σχετικά μικρή δόση NAC η οποία χορηγήθηκε στα πειραματόζωα. Η δόση που επιλέχθηκε ήταν αυτή που χρησιμοποίησαν οι Pittaluga και συνεργάτες σε μελέτη μικρότερων πειραματοζώων ως μονοθεραπεία και δεν προτιμήθηκε μεγαλύτερη δόση, καθώς ο σκοπός της μελέτης μας δεν ήταν η τεκμηρίωση της δράσης της NAC στην ενδομητρίωση, αλλά η διερεύνηση της πιθανής συνεργικής δράσης με την καμπεργολίδη. Το πλεονέκτημα της συνεργικής δράσης και χορήγησης είναι η μείωση της εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών. Μια σημαντική και σχετικά συχνή αλληλεπίδραση που παρουσιάζουν οι ασθενείς που λαμβάνουν σε χρόνια βάση τις δύο αυτές ουσίες είναι η σοβαρή υπόταση. Έτσι, η δόση που τελικώς αναζητούμε είναι η χαμηλότερη δυνατή για την οποία τα αποτελέσματα θα είναι ενθαρρυντικά, με τις λιγότερες δυνατές παρενέργειες. Αξίζει να σημειωθεί πως στη διεθνή βιβλιογραφία περιγράφονται μελέτες που υποστηρίζουν ότι οι χαμηλές δόσεις NAC έχουν αντιοξειδωτική δράση και ευεργετικά αποτελέσματα, ενώ οι υψηλές δόσεις προκαλούν αυξημένο οξειδωτικό φορτίο με αντίθετα αποτελέσματα και υψηλότερη θνητότητα (155, 156). Θα πρέπει ωστόσο να μελετηθεί μελλοντικά η χορήγηση υψηλότερων δόσεων σε αντίστοιχα πρωτόκολλα.

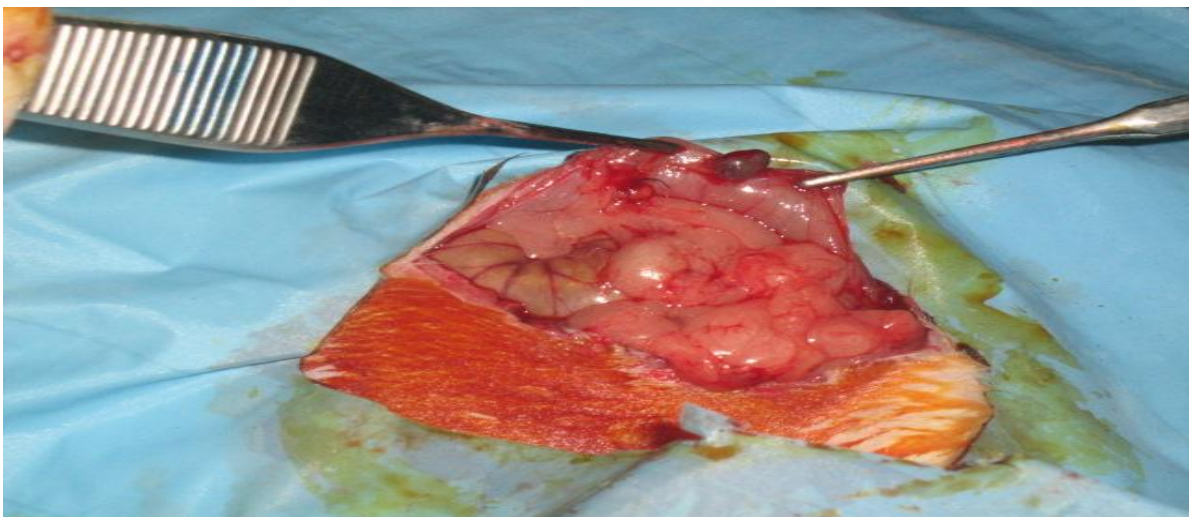
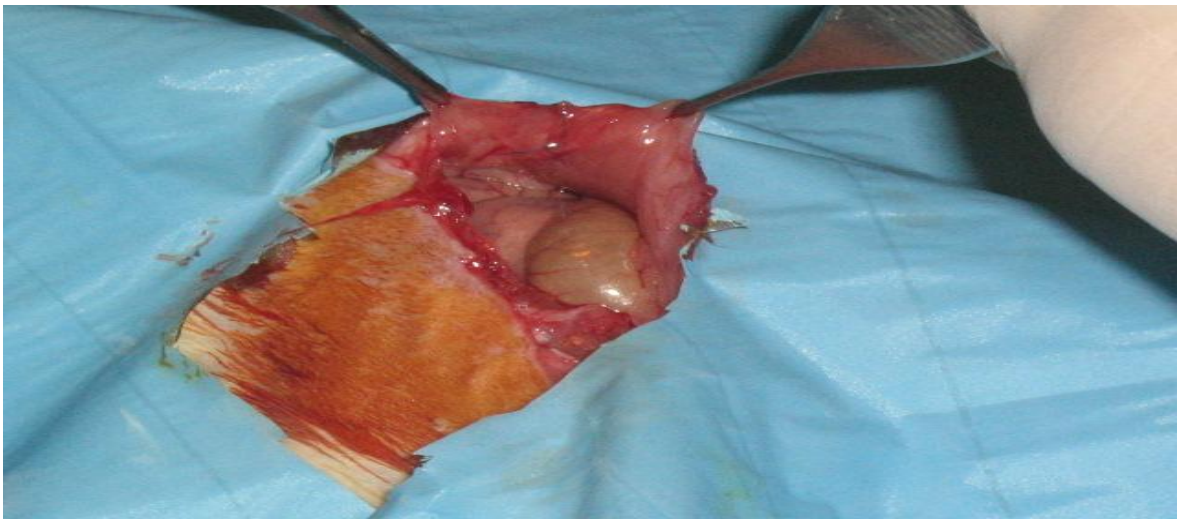
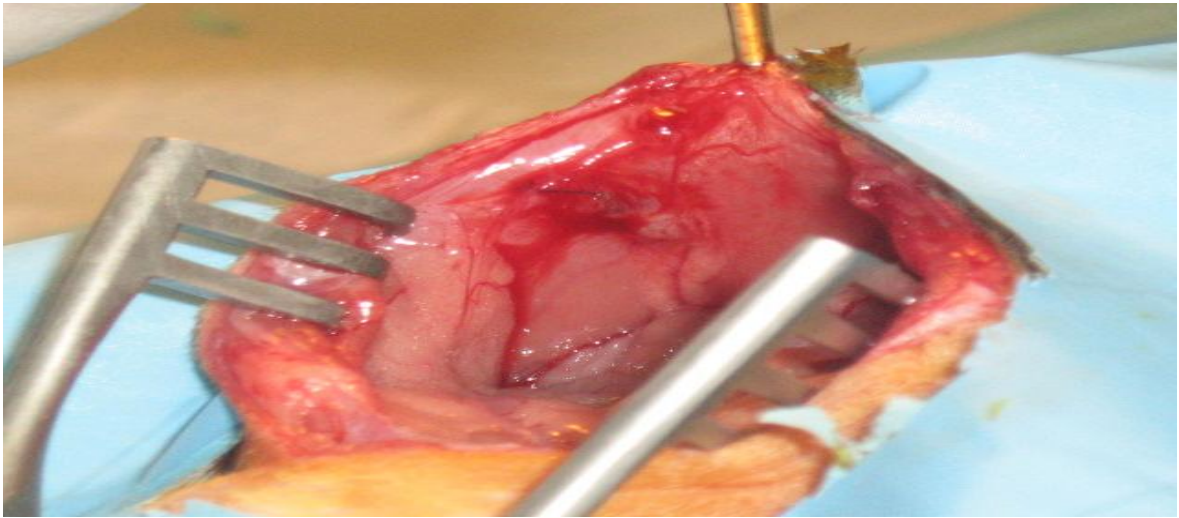
Αντιθέτως, στη μελέτη μας η θεραπεία με καμπεργολίδη είχε πολύ ευεργετικά αποτελέσματα. Ο μέσος όγκος των ενδομητριοειδών εμφυτεύσεων μειώθηκε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό στην ομάδα της CAB. Ωστόσο δεν βρέθηκαν διαφορές ούτε με αυτή τη θεραπευτική παρέμβαση στον αριθμό των ενδομητριοειδών εμφυτεύσεων. Στα πειραματόζωα χρησιμοποιήθηκαν 0,1 mg/kg CAB. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μελέτη των Novella-Maestre και συνεργατών χρησιμοποίησε δύο διαφορετικές δόσεις καμπεργολίδης (0,05 και 0,1 mg/kg) (151). Η μελέτη που πραγματοποίησαν περιελάμβανε nude μύες στους οποίους εμφυτεύθηκε ανθρώπινος ενδομητρικός ιστός. Τα πειραματόζωα ανέπτυξαν ενδομητρίωση, καθώς τα μοσχεύματα εμφυτεύθηκαν και τους χορηγήθηκαν δύο διαφορετικές δόσεις καμπεργολίδης. Δύο εβδομάδες μετά την έναρξη της θεραπείας παρατηρήθηκε μείωση στο ποσοστό των ενδομητριοειδών βλαβών, ιδιαίτερα μετά τη χορήγηση της μεγαλύτερης δόσης. Επιπλέον, ο λόγος αδένες/στρώμα ήταν σημαντικά μικρότερος μετά τη χορήγηση της καμπεργολίδης και το στρώμα στερούνταν κυτταρικών πληθυσμών και οργάνωσης, γεγονός που αποδεικνύει πως ο ιστός μετετρέπονταν σε ατροφικός ή εκφυλισμένος. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μελέτη των ενδομητριοειδών βλαβών με τη βοήθεια της χρώσης Ki-67 ήταν ενδεικτική μειωμένης μιτογόνου δραστηριότητας (151). Στη μελέτη τους βρέθηκε μείωση του αριθμού των ενεργών ενδομητριοειδών εμφυτεύσεων μετά από την θεραπεία, ενώ δεν βρέθηκαν διαφορές στο μέγεθος των εμφυτεύσεων. Ωστόσο σε σύγκριση με τη δική μας μελέτη δεν μελετήσαν τον μέσο όγκο των εμφυτεύσεων, αλλά την επιφάνεια τους που δεν είναι

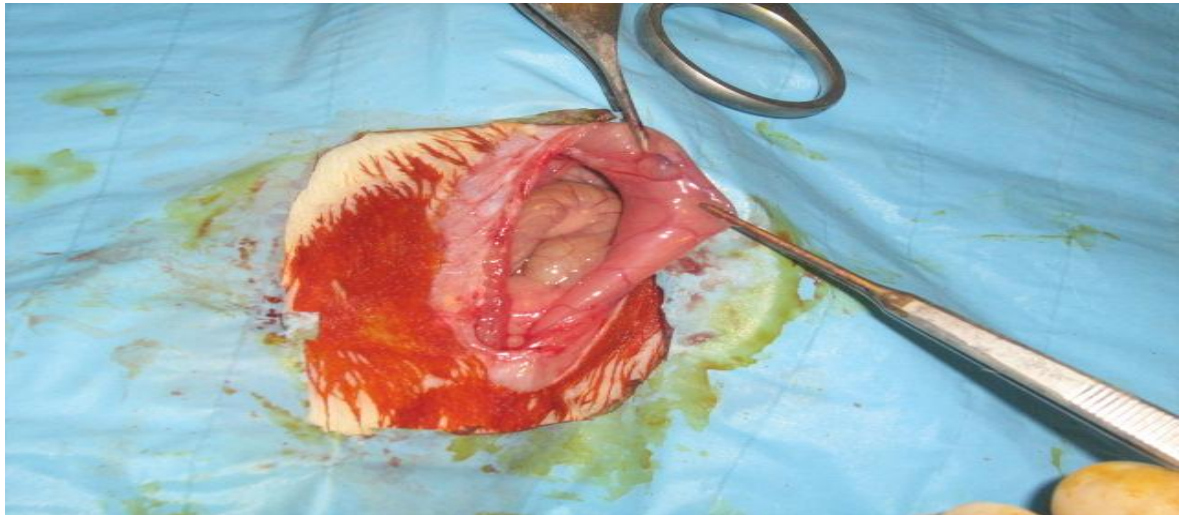
ακριβής προσδιορισμός του μεγέθους των εμφυτεύσεων. Επίσης ο χρόνος θεραπείας στην δική τους μελέτη ήταν περιορισμένος (δύο εβδομάδες), και πιθανώς να μην ήταν αρκετός για την μείωση του μεγέθους των εστιών. Οσον αφορά στον αριθμό των βλαβών στην μελέτη τους προσδιορίστηκαν οι ενεργείς μόνο βλάβες με ανοσοιστοχημικά και ιστολογικά κριτήρια, κάτι που δεν έγινε στη δική μας μελέτη.

Στην ομάδα που συγχρηγήθηκε NAC και CAB βρέθηκε μείωση του μέσου όγκου των ενδομητριωσικών εμφυτεύσεων, χωρίς μεταβολή στον αριθμό των εμφυτευμάτων. Παρόλο που η μείωση ήταν στατιστικά σημαντική σε επιπεδο στατιστικής σημαντικότητας μεγαλύτερο από αυτό της ομάδας μονοθεραπείας με CAB ($p=0,002$ vs $p= 0,038$) δεν αποδεικνύεται συνεργική δράση μεταξύ των παραγόντων NAC και CAB, παρα μόνο αθροιστική. Μετά από επεργασία και στατιστική ανάλυση με τη μέθοδο repeated measures two way ANOVA, φάνηκε ότι οι δύο θεραπευτικοί παράγοντες δεν παρουσίασαν συνεργική δράση. Ωστόσο δεν μπορεί να αποκλειστεί μια τέτοια συσχέτιση χωρίς να γίνουν περαιτέρω μελέτες με υψηλότερη δόση NAC και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Αξίζει να σημειωθεί πως η μελέτη μας υπόκειται σε περιορισμούς. Ο πρώτος περιορισμός αφορά στο γεγονός ότι οι επίμυες πιθανώς να βρίσκονταν σε διαφορετική οιστρική φάση. Κατά τη διάρκεια της συστέγασής τους οι επίμυες συνήθως συγχρονίζονται σε μεγάλο ποσοστό, όμως κάτι τέτοιο θα έπρεπε να τεκμηριωθεί με τη λήψη κολπικού επιχρίσματος και την ιστολογική εξέτασή του. Ο δεύτερος περιορισμός της μελέτης μας είναι ότι παρόλο που δε σημειώθηκε κανένας θάνατος πειραματοζώου μετά τη χειρουργική επαγωγή της νόσου, δεν είναι δυνατό να εντοπίσουμε αν τα πειραματόζωα ανέπτυξαν κάποιες ανεπιθύμητες ενέργειες μετά τη λήψη των φαρμάκων. Αν και τα πειραματόζωα μετά τη φαρμακευτική αγωγή είχαν βάρος που δε διέφερε στατιστικά σημαντικά από το αρχικό τους βάρος, δε μπορεί να εκτιμηθεί περαιτέρω η εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών. Τέλος, τα αποτελέσματά μας περιορίζονται στη μέτρηση του μεγέθους του έκτοπου ενδομητρικού ιστού πριν και μετά τη θεραπευτική μας προσέγγιση. Η μελλοντική μέτρηση οξειδωτικών δεικτών του αίματος και των ενδομητριωσικών εμφυτεύσεων καθώς και δεικτών αγγειογένεσης θα μας βοηθήσουν να εξαγάγουμε ασφαλέστερα συμπεράσματα.

Η παρούσα μελέτη δεν επιβεβαιώνει την υπόθεσή μας σύμφωνα με την οποία η χρήση της καμπεργολίδης και της NAC αναστέλλει συνεργικά την αύξηση του μεγέθους της πειραματικά επαγόμενης ενδομητρίωσης. Τα πειραματόζωά μας είχαν την ίδια ηλικία, βάρος που δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές μεταβολές κατά τη διάρκεια της μελέτης και σταθερό αριθμό βιώσιμων ενδομητριωσικών εμφυτευμάτων πριν και μετά τη χορήγηση θεραπείας. Τα αποτελέσματά μας σε ότι αφορά στην καμπεργολίδα συνάδουν με τα αντίστοιχα αποτελέσματα της διεθνούς βιβλιογραφίας, ωστόσο η θεραπευτική δόση του NAC που χρησιμοποιήθηκε δε φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση στο μετρούμενο όγκο των εμφυτευμάτων. Εγείρεται λοιπόν η ανάγκη για περαιτέρω μελέτες γύρω από τη χορήγηση υψηλότερων δόσεων NAC με αντίστοιχα πρωτόκολλα.





Εικόνες από τα πειράματά μας που παρουσιάζουν ενδομητριωσικές εμφυτεύσεις στο κοιλιακό τοίχωμα. Οι ενδομητριώσεις έχουν τη μορφή κύστεων με ορώδες υγρό, σοκολατοειδών κύστεων ή απλών κυτταρικών αθροίσεων. Αξίζει να παρατηρήσει κανείς την εμφάνιση νεοαγγείωσης και της υπεραιμίας του ενδομητριωσικού ιστού.

7. Βιβλιογραφία:

1. De Nardi P, Ferrrari S, Denny ECON. Deep Pelvic Endometriosis: A Multidisciplinary Approach: Springer Verlag; 2010.
2. Overton C, Davis C, McMillan L, Shaw RW. An atlas of endometriosis: Informa Healthcare; 2007.
3. Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, Barbieri RL, Malspeis S, Willett WC, et al. Reproductive history and endometriosis among premenopausal women. *Obstetrics & Gynecology*2004;104(5, Part 1):965.
4. Hediger ML, Hartnett HJ, Buck Louis GM. Association of endometriosis with body size and figure. *Fertility and sterility*2005;84(5):1366-74.
5. Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, Barbieri RL, Marshall LM, Hunter DJ. Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors. *American journal of epidemiology*2004;160(8):784.
6. Olive DL, Schwartz LB. Endometriosis. *N Engl J Med*1993 Jun 17;328(24):1759-69.
7. Laufer M. Premenarcheal endometriosis without an associated obstructive anomaly: Presentation, diagnosis, and treatment. *FERTILITY AND STERILITY-INTERNATIONAL EDITION-2000*;74:15-.
8. Yamamoto K, Mitsunashi Y, Takaike T, Takase K, Hoshiai H, Noda K. Tubal endometriosis diagnosed within one month after menarche: a case report. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*1997;181(3):385-7.
9. Sutton C. Modern management of endometriosis: Informa HealthCare; 2005.
10. Olive DL. Endometriosis in clinical practice: Informa HealthCare; 2005.
11. Χρυσικόπουλος Α. Ενδομητρίωση. In: Α Χ, editor. Υπογονιμότητα, στέρωση, προβλήματα αναπαραγωγής1992.
12. Wiegerinck M, Van Dop P, Brosens I. The staging of peritoneal endometriosis by the type of active lesion in addition to the revised American Fertility Society classification. *Fertility and sterility*1993;60(3):461-4.
13. Maxwell C, Kilpatrick D, Hajning R, Smith S. No HLAβ€²DR specificity is associated with endometriosis. *Tissue antigens*1989;34(2):145-7.
14. Kennedy S, Mardon H, Barlow D. Familial endometriosis. *Journal of assisted reproduction and genetics*1995;12(1):32-4.
15. Hadfield RM, Mardon HJ, Barlow DH, Kennedy SH. Endometriosis in monozygotic twins. *Fertility and sterility*1997;68(5):941-2.
16. Hays SM, Aylward LL. Dioxin risks in perspective: past, present, and future. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*2003;37(2):202-17.
17. Rier SE. The potential role of exposure to environmental toxicants in the pathophysiology of endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*2002;955(1):201-12.
18. Zhao D, Pritts EA, Chao VA, Savouret JF, Taylor RN. Dioxin stimulates RANTES expression in an in-vitro model of endometriosis. *Molecular human reproduction*2002;8(9):849.
19. Eskenazi B, Mocarelli P, Warner M, Samuels S, Vercellini P, Olive D, et al. Serum dioxin concentrations and endometriosis: a cohort study in Seveso, Italy. *Environmental health perspectives*2002;110(7):629.
20. Imlay JA. Pathways of oxidative damage. *Annual Reviews in Microbiology*2003;57(1):395-418.
21. Van Langendonck A, Casanas-Roux F, Donnez J. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertility and sterility*2002;77(5):861-70.
22. Murphy AA, Palinski W, Rankin S, Morales AJ, Parthasarathy S. Macrophage scavenger receptor (s) and oxidatively modified proteins in endometriosis. *Fertility and sterility*1998;69(6):1085-91.
23. Murphy AA, Santanam N, Morales AJ, Parthasarathy S. Lysophosphatidyl choline, a chemotactic factor for monocytes/T-lymphocytes is elevated in endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*1998;83(6):2110.
24. Agarwal A, Allamaneni SSR. Oxidants and antioxidants in human fertility. 2004.

25. Agarwal A, Gupta S, Sharma R. Oxidative stress and its implications in female infertility—a clinician's perspective. *Reproductive biomedicine online*2005;11(5):641-50.
26. Gupta S, Agarwal A, Krajcir N, Alvarez JG. Role of oxidative stress in endometriosis. *Reproductive biomedicine online*2006;13(1):126-34.
27. M Szczepańska JK, J Skrzypczak, M Mikołajczyk. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertility and sterility*2003;79(6):1288-93.
28. Ota H, Igarashi S, Hatazawa J, Tanaka T. Endothelial nitric oxide synthase in the endometrium during the menstrual cycle in patients with endometriosis and adenomyosis. *Fertility and sterility*1998;69(2):303-8.
29. Ota H, Igarashi S, Hatazawa J, Tanaka T. Endometriosis and free radicals. *Gynecologic and obstetric investigation*1999;48(1):29-35.
30. Ota H, Igarashi S, Sato N, Tanaka H, Tanaka T. Involvement of catalase in the endometrium of patients with endometriosis and adenomyosis. *Fertility and sterility*2002;78(4):804-9.
31. Zhou HE, Nothnick WB. The relevancy of the matrix metalloproteinase system to the pathophysiology of endometriosis. *Front Biosci*2005;10:569-75.
32. Paul S, Sharma AV, Mahapatra PD, Bhattacharya P, Reiter RJ, Swarnakar S. Role of melatonin in regulating matrix metalloproteinase-9 via tissue inhibitors of metalloproteinase-1 during protection against endometriosis. *Journal of pineal research*2008;44(4):439-49.
33. Collette T, Maheux R, Mailloux J, Akoum A. Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in the eutopic endometrial tissue of women with endometriosis. *Human Reproduction*2006;21(12):3059-67.
34. Collette T, Bellehumeur C, Kats R, Maheux R, Mailloux J, Villeneuve M, et al. Evidence for an increased release of proteolytic activity by the eutopic endometrial tissue in women with endometriosis and for involvement of matrix metalloproteinase-9. *Human Reproduction*2004;19(6):1257-64.
35. Szamatowicz J, LaudaE,ski P, Tomaszewska I. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1: a possible role in the pathogenesis of endometriosis. *Human Reproduction*2002;17(2):284-8.
36. Gaetje R, Holtrich U, Engels K, Kourtis K, Cikrit E, Kissler S, et al. Expression of membrane-type 5 matrix metalloproteinase in human endometrium and endometriosis. *Gynecological endocrinology*2007;23(10):567-73.
37. Gilabert-Estellés J, Ramón L, España F, Gilabert J, Vila V, Réganon E, et al. Expression of angiogenic factors in endometriosis: relationship to fibrinolytic and metalloproteinase systems. *Human Reproduction*2007;22(8):2120-7.
38. Ramón L JG-E, Castelló R, Gilabert J, España F, Romeu A, Chirivella M, Aznar J, Estellés A. mRNA analysis of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis using a real-time quantitative RT-PCR assay. *Human Reproduction*2005;20(1):272-8.
39. J Gilabert-Estellés AE, Gilabert J, Castelló R, España F, Falcó C, Romeu A, Chirivella M, Zorio E, Aznar J. . Expression of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis. *Human Reproduction*2003;18(7):1516-22.
40. Chung HW, Wen Y, Chun SH, Nezhat C, Woo BH, Lake Polan M. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 mRNA expression in ectopic and eutopic endometrium in women with endometriosis: a rationale for endometriotic invasiveness. *Fertility and sterility*2001;75(1):152-9.
41. Kim H, Yang KM, Kang I, Koong M, Kim H, Zhang X, et al. Expression of CD44s, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-2 and Ki-67 in peritoneal, rectovaginal and ovarian endometriosis. *The Journal of reproductive medicine*2007;52(3):207.
42. Lu XE, Ning WX, Dong MY, Liu AX, Jin F, Huang HF. Vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 expedite formation of endometriosis in the early stage ICR mouse model. *Fertility and sterility*2006;86(4):1175-81.

43. Hudelist G, Lass H, Keckstein J, Walter I, Wieser F, Wenzl R, et al. Interleukin 1 α and tissue-lytic matrix metalloproteinase-1 are elevated in ectopic endometrium of patients with endometriosis. *Human Reproduction*2005;20(6):1695-701.
44. Κ. Κοτρώνης ΜΖ, Γ. Γκριμπίζης, Δ. Μηλιαράς, Β. Ταρλατζής. Παθογένεια της ενδομητρίωσης: Ποιο ρόλο παίζουν τα ένζυμα της εξωκυττάριας ουσίας; . *Ελληνική Μαιευτική και Γυναικολογία* 2008;20(4):351-5.
45. Chryssicopoulos A, Mantzavinos T, Kontoravdis A, Toumbanakis N, Zourlas P. Peritoneal fluid volume parameters in infertile patients. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology*1991;18(3):175.
46. Jones R, Bulmer J, Searle R. Immunohistochemical characterization of stromal leukocytes in ovarian endometriosis: comparison of eutopic and ectopic endometrium with normal endometrium. *Fertility and sterility*1996;66(1):81.
47. Klein NA, ΡΓ@rgola GM, Tekmal RR, Montoya IA, Dey TD, Schenken RS. Cytokine regulation of cellular proliferation in endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*1994;734(1):322-32.
48. Oosterlynck D, Cornillie F, Waer M, Koninckx P. Immunohistochemical characterization of leucocyte subpopulations in endometriotic lesions. *Archives of gynecology and obstetrics*1993;253(4):197-206.
49. Witz CA, Montoya IA, Dey TD, Schenken RS. Characterization of lymphocyte subpopulations and T cell activation in endometriosis. *American journal of reproductive immunology (New York, NY: 1989)*1994;32(3):173.
50. Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertility and sterility*1997;68(4):585-96.
51. Neal G.Mahutte UKaAA. Endometriosis is an Inflammatory Disease. In: Olive D, editor. *Endometriosis in clinical practise*2005.
52. Χρυσικόπουλος Α. Ο μικρόκοσμος της αναπαραγωγικής διαδικασίας. Κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες (1ο και 2ο μέρος). *Εφηβ Γυναικ Αναπ Εμμην*2000;12(35-33):101-9.
53. Hill JA. Immunology and endometriosis: Fact, artifact, or epiphenomenon? *Obstetrics and gynecology clinics of North America*1997;24(2):291-306.
54. Hsu CC, Yang BC, Wu MH, Huang KE. Enhanced interleukin-4 expression in patients with endometriosis. *Fertility and sterility*1997;67(6):1059-64.
55. McLaren J, Dealtry G, Prentice A, Charnock-Jones D, Smith S. Decreased levels of the potent regulator of monocyte/macrophage activation, interleukin-13, in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Human Reproduction*1997;12(6):1307.
56. Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Koninckx PR. Transforming Growth Factor-[beta] Activity is Increased in Peritoneal Fluid From Women With Endometriosis. *Obstetrics & Gynecology*1994;83(2):287.
57. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and molecular immunology*: Saunders Philadelphia; 1991.
58. Oosterlynck D, Meuleman C, Sobis H, Vandeputte M, Koninckx P. Angiogenic activity of peritoneal fluid from women with endometriosis. *Fertility and sterility*1993;59(4):778.
59. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones D, Smith S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Human Reproduction*1996;11(1):220.
60. Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N, et al. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*1996;81(8):3112.
61. Hill J. Immunology and endometriosis. *Fertility and sterility*1992;58(2):262.
62. Witz CA. Current concepts in the pathogenesis of endometriosis. *Clinical obstetrics and gynecology*1999;42(3):566.
63. Hill J, Faris H, Schiff I, Anderson D. Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertility and sterility*1988;50(2):216.

64. Homm RJ, Mathur S, editors. Autoimmune factors in endometriosis: cause or effect 1988.
65. Oosterlynck D, Cornillie F, Waer M, Vandeputte M, Koninckx P. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertility and sterility* 1991;56(1):45.
66. Oosterlynck D, Meuleman C, Waer M, Vandeputte M, Koninckx P. The natural killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis. *Fertility and sterility* 1992;58(2):290.
67. Di Stefano G, Provinciali M, Muzzioli M, Garzetti G, Ciavattini A, Fabris N. Correlation between estradiol serum levels and NK cell activity in endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1994;741:197.
68. Gioele Garzetti G, Ciavattini A, Provinciali M, Muzzioli M, Stefano GDI, Fabris N. Natural cytotoxicity and GnRH agonist administration in advanced endometriosis: positive modulation on natural killer activity. *Obstetrics & Gynecology* 1996;88(2):234-40.
69. Garzetti GG, Ciavattini A, Provinciali M, Amati M, Muzzioli M, Governa M. Decrease in peripheral blood polymorphonuclear leukocyte chemotactic index in endometriosis: role of prostaglandin E2 release. *Obstetrics and gynecology* 1998;91(1):25.
70. Arici A, Oral E, Attar E, Tazuke SI, Olive DL. Monocyte chemotactic protein-1 concentration in peritoneal fluid of women with endometriosis and its modulation of expression in mesothelial cells. *Fertility and sterility* 1997;67(6):1065-72.
71. Oral E, Seli E, O Bahtiyar M, L Olive D, Arici A. Growth-regulated Ξ expression in the peritoneal environment with endometriosis. *Obstetrics & Gynecology* 1996;88(6):1050-6.
72. Rana N, Braun DP, House R, Gebel H, Rotman C, Dmowski W. Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis. *Fertility and sterility* 1996;65(5):925.
73. Overton C, Fernandez-Shaw S, Hicks B, Barlow D, Starkey P. Peritoneal fluid cytokines and the relationship with endometriosis and pain. *Human Reproduction* 1996;11(2):380-6.
74. Van der Linden PJQ, De Goeij A, Dunselman GAJ, Van der Linden EPM, Ramaekers F, Evers J. Expression of integrins and E-cadherin in cells from menstrual effluent, endometrium, peritoneal fluid, peritoneum, and endometriosis. *FERTILITY AND STERILITY-INTERNATIONAL EDITION-1994*;61:85-.
75. Khorram O, Taylor RN, Ryan IP, Schall TJ, Landers DV. Peritoneal fluid concentrations of the cytokine RANTES correlate with the severity of endometriosis. *American journal of obstetrics and gynecology* 1993;169(6):1545.
76. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones D, Sharkey A, Smith S. Immunolocalization of the apoptosis regulating proteins Bcl-2 and Bax in human endometrium and isolated peritoneal fluid macrophages in endometriosis. *Human Reproduction* 1997;12(1):146.
77. Bruner KL, Matrisian LM, Rodgers WH, Gorstein F, Osteen KG. Suppression of matrix metalloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human endometrium in nude mice. *Journal of Clinical Investigation* 1997;99(12):2851.
78. Osteen KG, Bruner KL, SHARPE-TIMMS L, editors. Steroid and growth factor regulation of matrix metalloproteinase expression and endometriosis 1996: Thieme.
79. Bulun S, Mahendroo M, Simpson E. Polymerase chain reaction amplification fails to detect aromatase cytochrome P450 transcripts in normal human endometrium or decidua. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1993;76(6):1458.
80. Noble L, Simpson E, Johns A, Bulun S. Aromatase expression in endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1996;81(1):174.
81. Noble LS, Takayama K, Zeitoun KM, Putman JM, Johns DA, Hinshelwood MM, et al. Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1997;82(2):600.
82. Zeitoun KM, Bulun SE. Aromatase: a key molecule in the pathophysiology of endometriosis and a therapeutic target. *Fertility and sterility* 1999;72(6):961-9.
83. Zeitoun K, Takayama K, Michael MD, Bulun SE. Stimulation of aromatase P450 promoter (II) activity in endometriosis and its inhibition in endometrium are regulated by competitive

- binding of steroidogenic factor-1 and chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor to the same cis-acting element. *Molecular Endocrinology*1999;13(2):239-53.
84. Zeitoun K, Takayama K, Sasano H, Suzuki T, Moghrabi N, Andersson S, et al. Deficient 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17 β -estradiol. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*1998;83(12):4474.
 85. Grummer R. Animal models in endometriosis research. *Human reproduction update*2006;12(5):641-9.
 86. Golan A, Winston R, Dargenio R. Experimental endometriosis: a microsurgical animal model in rats. *Israel journal of medical sciences*1984;20(11):1094.
 87. Jones RC. The effect of a luteinizing hormone releasing hormone (LRH) agonist (Wy-40,972), levonorgestrel, danazol and ovariectomy on experimental endometriosis in the rat. *Acta endocrinologica*1984;106(2):282-8.
 88. Rajkumar K, Schott P, Simpson C. The rat as an animal model for endometriosis to examine recurrence of ectopic endometrial tissue after regression. *Fertility and sterility*1990;53(5):921-5.
 89. Sharpe K, Bertero M, Muse K, Vernon M. Spontaneous and steroid-induced recurrence of endometriosis after suppression by a gonadotropin-releasing hormone antagonist in the rat. *American journal of obstetrics and gynecology*1991;164(1):187-94.
 90. Vernon MW, Wilson E. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. *Fertility and sterility*1985;44(5):684.
 91. Vlahos NF, Gregoriou O, Deliveliotou A, Perrea D, Vlachos A, Zhao Y, et al. Effect of pentoxifylline on vascular endothelial growth factor C and flk-1 expression on endometrial implants in the rat endometriosis model. *Fertility and sterility*2010;93(4):1316-23.
 92. Cummings AM, Metcalf JL. Induction of endometriosis in mice: a new model sensitive to estrogen. *Reproductive Toxicology*1995;9(3):233-8.
 93. Rossi G, Somigliana E, Moschetta M, Santorsola R, Cozzolino S, Filardo P, et al. Dynamic aspects of endometriosis in a mouse model through analysis of implantation and progression. *Archives of gynecology and obstetrics*2000;263(3):102-7.
 94. Somigliana E, Vigano P, Rossi G, Carinelli S, Vignali M, Panina-Bordignon P. Endometrial ability to implant in ectopic sites can be prevented by interleukin-12 in a murine model of endometriosis. *Human Reproduction*1999;14(12):2944-50.
 95. Dunselman G, Willebrand D, Land J, Bouckaert P, Evers J. A rabbit model of endometriosis. *Gynecologic and obstetric investigation*1989;27(1):29-33.
 96. Homm R, Garza D, Mathur S, Austin M, Baggett B, OLIVER WILLIAMSON H. Immunological aspects of surgically induced experimental endometriosis: variation in response to therapy. *Fertility and sterility*1989;52(1):132-9.
 97. Rock J, Prendergast R, Bobbie D, Green W, Parmley T, Dubin N. Intraocular endometrium in the rabbit as a model for endometriosis. *Fertility and sterility*1993;59(1):232.
 98. Schenken R, Asch R. Surgical induction of endometriosis in the rabbit: effects on fertility and concentrations of peritoneal fluid prostaglandins. *Fertility and sterility*1980;34(6):581.
 99. Steinleitner A, Lambert H, Suarez M, Serpa N, Robin B, Cantor B. Periovarian calcium channel blockade enhances reproductive performance in an animal model for endometriosis-associated subfertility. *American journal of obstetrics and gynecology*1991;164(4):949.
 100. Hirata T, Osuga Y, Yoshino O, Hirota Y, Harada M, Takemura Y, et al. Development of an experimental model of endometriosis using mice that ubiquitously express green fluorescent protein. *Human Reproduction*2005;20(8):2092-6.
 101. Yao Z, Shen X, Capodanno I, Donnelly M, Fenyk-Melody J, Hausamann J, et al. Validation of rat endometriosis model by using raloxifene as a positive control for the evaluation of novel SERM compounds. *Investigative Surgery*2005;18(4):177-83.
 102. Katsuki Y, Takano Y, Futamura Y, Shibutani Y, Aoki D, Udagawa Y, et al. Effects of dienogest, a synthetic steroid, on experimental endometriosis in rats. *European journal of endocrinology*1998;138(2):216-26.
 103. Nisolle M, Casanas-Roux F, Donnez J. Early-stage endometriosis: adhesion and growth of human menstrual endometrium in nude mice. *Fertility and sterility*2000;74(2):306-12.

104. Beliard A, Noÿl A, Goffin F, Franken F, Foidart JM. Role of endocrine status and cell type in adhesion of human endometrial cells to the peritoneum in nude mice. *Fertility and sterility*2002;78(5):973-8.
105. Bergqvist A, Jeppsson S, Kullander S, Ljungberg O. Human endometrium transplanted into nude mice. Histologic effects of various steroid hormones. *The American journal of pathology*1985;119(2):336.
106. Grummer R, Schwarzer F, Balczyk K, Hess-Stumpp H, Regidor PA, Schindler AE, et al. Peritoneal endometriosis: validation of an in-vivo model. *Human Reproduction*2001;16(8):1736-43.
107. Zaino RJ, Satyaswaroop PG, Mortel R. Histologic response of normal human endometrium to steroid hormones in athymic mice. *Human pathology*1985;16(9):867-72.
108. Zamah N, Dodson M, Stephens L, Buttram Jr V, Besch P, Kaufman R. Transplantation of normal and ectopic human endometrial tissue into athymic nude mice. *American journal of obstetrics and gynecology*1984;149(6):591.
109. Eggermont J, Donnez J, Casanas-Roux F, Scholtes H, Van Langendonck A. Time course of pelvic endometriotic lesion revascularization in a nude mouse model. *Fertility and sterility*2005;84(2):492-9.
110. Van Langendonck A, Casanas-Roux F, Eggermont J, Donnez J. Characterization of iron deposition in endometriotic lesions induced in the nude mouse model. *Human Reproduction*2004;19(6):1265-71.
111. Aoki D, Katsuki Y, Shimizu A, Kakinuma C, Nozawa S. Successful heterotransplantation of human endometrium in SCID mice. *Obstetrics & Gynecology*1994;83(2):220.
112. Awwad J, Sayegh R, Tao X, Hassan T, Awwad S, Isaacson K. The SCID mouse: an experimental model for endometriosis. *Human Reproduction*1999;14(12):3107-11.
113. Kaufmann R, Rudolphi A, Boxberger H, Hainzl A, Rosenthal H, Reimann J. Stable engraftment of human female genital mucous membrane xenografts on SCID mice. *Gynecologic and obstetric investigation*1995;40(2):97-100.
114. Story L, Kennedy S. Animal studies in endometriosis: a review. *ILAR JOURNAL*2004;45(2):132-8.
115. Te Linde R, Scott R. Experimental endometriosis. *American journal of obstetrics and gynecology*1950;60(5):1147.
116. D'Hooghe T, Bambra C, Suleman M, Dunselman G, Evers H, Koninckx P. Development of a model of retrograde menstruation in baboons (*Papio anubis*). *Fertility and sterility*1994;62(3):635.
117. D'Hooghe TM, Bambra CS, Raeymaekers BM, De Jonge I, Lauweryns JM, Koninckx P. Intrapelvic injection of menstrual endometrium causes endometriosis in baboons (*Papio cynocephalus* and *Papio anubis*). *American journal of obstetrics and gynecology*1995;173(1):125-34.
118. Fazleabas AT, Brudney A, Gurates B, Chai D, Bulun S. A modified baboon model for endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*2002;955(1):308-17.
119. Yang JZ, Agarwal SK, Foster WG. Subchronic exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin modulates the pathophysiology of endometriosis in the cynomolgus monkey. *Toxicological sciences*2000;56(2):374-81.
120. Fazleabas AT, Brudney A, Chai D, Langoi D, Bulun SE. Steroid receptor and aromatase expression in baboon endometriotic lesions. *Fertility and sterility*2003;80:820-7.
121. Scher CD, Haudenschild C, Klagsbrun M. The chick chorioallantoic membrane as a model system for the study of tissue invasion by viral transformed cells. *Cell*1976;8(3):373-82.
122. Maas JWM, Groothuis PG, Dunselman GAJ, de Goeij AFPM, Struijker-Boudier HAJ, Evers JLH. Development of endometriosis-like lesions after transplantation of human endometrial fragments onto the chick embryo chorioallantoic membrane. *Human Reproduction*2001;16(4):627-31.
123. Malik E, Meyer-Malik A, Berg C, Bihl W, Kunzi-Rapp K, Diedrich K, et al. Fluorescence diagnosis of endometriosis on the chorioallantoic membrane using 5-aminolaevulinic acid. *Human Reproduction*2000;15(3):584-8.

124. Nap AW, Dunselman GAJ, Griffioen AW, Mayo KH, Evers JLH, Groothuis PG. Angiostatic agents prevent the development of endometriosis-like lesions in the chicken chorioallantoic membrane. *Fertility and sterility*2005;83(3):793-5.
125. Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL. *The laboratory rat*: Academic Press; 2006.
126. Bartos L. Vaginal impedance measurement used for mating in the rat. *Laboratory animals*1977;11(1):53-5.
127. Koto M, Miwa M, Togashi M, Tsuji K, Okamoto M, Adachi J. A method for detecting the optimum day for mating during the 4-day estrous cycle in the rat; measuring the value of electrical impedance of the vagina]. *Jikken dobutsu Experimental animals*1987;36(2):195.
128. Koto M, Miwa M, Tsuji K, Okamoto M, Adachi J. Change in the electrical impedance caused by cornification of the epithelial cell layer of the vaginal mucosa in the rat]. *Jikken dobutsu Experimental animals*1987;36(2):151.
129. Ramos S, Lee J, Peuler J. An inexpensive meter to measure differences in electrical resistance in the rat vagina during the ovarian cycle. *Journal of Applied Physiology*2001;91(2):667-70.
130. Available from: <http://oslovet.norecopa.no/teaching/rat/oestrus/>
131. Harris M, Kesel M. An improved method for accurately timed mating in rats. *Laboratory animal science*1990;40(4):424-5.
132. SHIRLEY B. Partial synchrony of the oestrous cycles of rats introduced to a new environment. *Journal of Endocrinology*1978;77(2):195-202.
133. Olive DL, Lindheim SR, Pritts EA. New medical treatments for endometriosis. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*2004;18(2):319-28.
134. Maas JWM, Groothuis PG, Dunselman GAJ, de Goeij AFPM, Boudier HAJ, Evers JLH. Endometrial angiogenesis throughout the human menstrual cycle. *Human Reproduction*2001;16(8):1557-61.
135. Nisolle M, Casanas-Roux F, Anaf V, Mine JM, Donnez J. Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertility and sterility*1993;59(3):681.
136. Nap AW, Griffioen AW, Dunselman GAJ, Bouma-Ter Steege JCA, Thijssen VLJ, Evers JLH, et al. Antiangiogenesis therapy for endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*2004;89(3):1089-95.
137. Laschke MW, Menger MD. In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Human reproduction update*2007;13(4):331-42.
138. Gargett C, Weston G, Rogers P. Mechanisms and regulations of endometrial angiogenesis. *Reproductive Medicine Review*2002;10(01):45-61.
139. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones D, Millican S, McOller K, Sharkey A, et al. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *Journal of Clinical Investigation*1996;98(2):482.
140. Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N, et al. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*1996;81(8):3112-8.
141. Hull ML, Charnock-Jones DS, Chan CLK, Bruner-Tran KL, Osteen KG, Tom BDM, et al. Antiangiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*2003;88(6):2889-99.
142. Basu S, Sarkar C, Chakroborty D, Nagy J, Mitra RB, Dasgupta PS, et al. Ablation of peripheral dopaminergic nerves stimulates malignant tumor growth by inducing vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Cancer research*2004;64(16):5551.
143. Basu S, Nagy JA, Pal S, Vasile E, Eckelhoefer IA, Bliss VS, et al. The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nature medicine*2001;7(5):569-74.
144. Portz D, Elkins T, White R, Warren J, Adadevoh S, Randolph J. Oxygen free radicals and pelvic adhesion formation: I. Blocking oxygen free radical toxicity to prevent adhesion formation in an endometriosis model. *International journal of fertility*1991;36(1):39.

145. Arumugam K, Yip Y. De novo formation of adhesions in endometriosis: the role of iron and free radical reactions. *Fertility and sterility*1995;64(1):62.
146. Edlundh-Rose E, Kupersmidt I, Gustafsson AC, Parasassi T, Serafino A, Bracci-Laudiero L, et al. Gene Expression Analysis of Human Epidermal Keratinocytes after N-Acetyl-L-Cysteine Treatment Demonstrates Cell Cycle Arrest and Increased Differentiation. *Pathobiology*2005;72(4):203-12.
147. Gustafsson A, Kupersmidt I, Edlundh-Rose E, Greco G, Serafino A, Krasnowska E, et al. Global gene expression analysis in time series following N-acetyl L-cysteine induced epithelial differentiation of human normal and cancer cells in vitro. *BMC cancer*2005;5(1):75.
148. Krasnowska EK, Pittaluga E, Brunati AM, Brunelli R, Costa G, De Spirito M, et al. N-acetyl-L-cysteine fosters inactivation and transfer to endolysosomes of c-Src. *Free Radical Biology and Medicine*2008;45(11):1566-72.
149. Parasassi T, Brunelli R, Bracci-Laudiero L, Greco G, Gustafsson A, Krasnowska E, et al. Differentiation of normal and cancer cells induced by sulfhydryl reduction: biochemical and molecular mechanisms. *Cell Death & Differentiation*2005;12(10):1285-96.
150. Pittaluga E, Costa G, Krasnowska E, Brunelli R, Lundeborg T, Porpora MG, et al. More than antioxidant: N-acetyl-L-cysteine in a murine model of endometriosis. *Fertility and sterility*2010;94(7):2905-8.
151. Novella-Maestre E, Carda C, Noguera I, Ruiz-Saurí A, García-Velasco JA, Simón C, et al. Dopamine agonist administration causes a reduction in endometrial implants through modulation of angiogenesis in experimentally induced endometriosis. *Human Reproduction*2009;24(5):1025.
152. Ferrara N, editor. *Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications*2002: Elsevier.
153. Cunha-Filho J, Gross JL, Lemos NA, Dias EC, Vettori D, Souza CA, et al. Prolactin and growth hormone secretion after thyrotrophin-releasing hormone infusion and dopaminergic (DA2) blockade in infertile patients with minimal/mild endometriosis. *Human Reproduction*2002;17(4):960-5.
154. Gregoriou G, Bakas P, Vitoratos N, Papadias K, Goumas K, Chryssicopoulos A, et al. Evaluation of Serum Prolactin Levels in Patients with Endometriosis and Infertility. *Gynecologic and obstetric investigation*1999;48(1):48-51.
155. S Eskiocak AS, S Bayır, E Çakır. The effect of NAC on brain tissue of rats fed with high cholesterol diet. *Turkish Journal of Biochemistry*2008;33(2):58-63.
156. Sprong RC, Winkelhuyzen-Janssen AML, Aarsman CJM, van OIRSCHOT JFLM, van der BRUGGEN T, van ASBECK BS. Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. *American journal of respiratory and critical care medicine*1998;157(4):1283-93.