



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Α΄ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Δ. ΛΟΥΤΡΑΔΗΣ

ΜΟΝΑΔΑ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

Διπλωματική εργασία

Συσχέτιση του πολυμορφισμού TNF- α -1031T/C με την εμφάνιση ενδομητρίωσης σε έναν ευρωπαϊκό πληθυσμό

Αναστασία Γ. Δράκου

A.M.: 2014545

Ιατρός- Ειδικευόμενη Μαιευτικής - Γυναικολογίας

Επιβλέπουσα: Μαυρογιάννη Δέσποινα Ε.ΔΙ.Π.

ΑΘΗΝΑ

ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2017

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Συσχέτιση του πολυμορφισμού TNF-a -1031T/C με την εμφάνιση ενδομητρίωσης σε έναν ευρωπαϊκό πληθυσμό

Αναστασία Γ. Δράκου
Α.Μ.: 2014545

Επιβλέπουσα: Μαυρογιάννη Δέσποινα Ε.Δι.Π.

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Λουτράδης Δημήτριος

Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών
Διευθυντής Α΄ Μαιευτικής & Γυναικολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών

Πέτρος Δρακάκης

Αναπληρωτής Καθηγητής Α΄ Μαιευτικής & Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών

Αικατερίνη Ντόμαλη

Επίκουρη Καθηγήτρια Α΄ Μαιευτικής & Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών

Νοέμβριος 2017

Στους γονείς μου Γιώργο και Αθηνά

Ευχαριστώ θερμά την Κα Μαυρογιάννη Δέσποινα για την επιστημονική της συμβολή και βοήθεια για την εκπόνηση αυτής της εργασίας.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	5
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	9
A.1. ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ.....	10
A.1.1. ΟΡΙΣΜΟΣ.....	10
A.1.2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	10
A.1.3. ΤΥΠΟΙ.....	11
A.1.4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	11
A.1.5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ.....	13
A.1.6. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ.....	17
A.1.7. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ [82].....	19
A.1.8. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	21
A.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΟΓΚΩΝ Α (TNFA).....	24
A.2.1. ΟΔΟΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ.....	26
A.2.2. ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ TNF-Α ΣΤΟ ΓΥΝΑΙΚΕΙΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ [88].....	29
A.2.3. TNFA ΚΑΙ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ.....	30
A.3. ΜΟΝΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ (SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS, SNPS)..	32
A.3.1. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΟΓΚΟΥ ΑΛΦΑ.....	33
A.3.2. Ο ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ TNF-A -1031T/C.....	34
A.4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	36
B.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	38
B.1.1. ΥΛΙΚΑ.....	38
B.1.2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	38
B.1.2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ.....	38
B.1.2.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΙΣΤΟ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗΣ.....	39
B.1.2.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΙΣΤΟ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗΣ ΔΙΑΤΗΡΗΜΕΝΟ ΣΕ ΠΑΡΑΦΙΝΗ.....	41
B.1.2.4. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	44
B.1.2.5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ (Agarose gel electrophoresis).....	48
B.1.2.6. ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΗ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ.....	49
B.1.2.7. ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ.....	50
B.2. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	51

Β.2.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	53
Β.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	64
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	69

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΕΙΚΟΝΑ 1: ΑΝΑΘΕΩΡΗΜΕΝΗ ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗΣ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΜΕΡΙΚΑΝΙΚΗ ΈΝΩΣΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ [82]	20
ΕΙΚΟΝΑ 2: ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΙΚΕΣ ΒΛΑΒΕΣ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑ	21
ΕΙΚΟΝΑ 3: ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗΣ.....	22
ΕΙΚΟΝΑ 4: ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΟΓΚΩΝ ΑΛΦΑ ΣΤΟ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ 6.	24
ΕΙΚΟΝΑ 5: Η ΟΜΟΤΡΙΜΕΡΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗ TNF-Α	25
ΕΙΚΟΝΑ 6: ΟΙ ΙΔΟΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΟΥ TNF-Α.....	28
ΕΙΚΟΝΑ 7: ΟΙ ΘΕΣΕΙΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΕΚΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ TNF-Α [132].....	33
ΕΙΚΟΝΑ 8: Η ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ, HARMAP PROJECT.....	34
ΕΙΚΟΝΑ 9: ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	45
ΕΙΚΟΝΑ 10: Ο ΘΕΡΜΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΠΟΙΗΤΗΣ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ	47
ΕΙΚΟΝΑ 11: ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΣΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΕΧΟΥΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΘΕΙ ΤΑ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΑ ΤΜΗΜΑΤΑ DNA ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΕΠΩΑΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΟ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟ ΕΝΖΥΜΟ Bbs I.....	50
ΕΙΚΟΝΑ 12: ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΕΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΣΕ ΜΟΡΦΗ ΠΟΣΟΣΤΩΝ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΕΛΕΤΗ.	54
ΕΙΚΟΝΑ 13: ΟΙ ΠΟΣΟΣΤΙΑΙΕΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΕΛΕΤΗ.	54
ΕΙΚΟΝΑ 14: ΠΟΣΟΣΤΙΑΙΕΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ TT ΣΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΠΟΣΟΣΤΙΑΙΩΝ ΣΥΧΝΟΤΗΤΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ TC+CC ΣΤΙΣ ΟΜΑΔΕΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΥ.....	59

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ TNF-Α -1031T/C ΣΤΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ	55
ΠΙΝΑΚΑΣ 2: SAMPLES * GENOTYPE CROSSTABULATION.....	56
ΠΙΝΑΚΑΣ 3: CHI-SQUARE TESTS	56
ΠΙΝΑΚΑΣ 4: ALLELE * SAMPLES CROSSTABULATION.....	57
ΠΙΝΑΚΑΣ 5: CHI-SQUARE TESTS	58
ΠΙΝΑΚΑΣ 6: GENOTYPE * SAMPLES CROSSTABULATION.....	60
ΠΙΝΑΚΑΣ 7: CHI-SQUARE TESTS.....	60
ΠΙΝΑΚΑΣ 8: RISK ESTIMATE	61
ΠΙΝΑΚΑΣ 9: RISK ESTIMATE	62
ΠΙΝΑΚΑΣ 10: RISK ESTIMATE	63
ΠΙΝΑΚΑΣ 11: ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ HARDY-WEINBERG.....	63

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ιστορικό: Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-άλφα (TNF-α) είναι μια προ-φλεγμονώδης κυτοκίνη η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση πολλών ασθενειών. Η ενδομητρίωση είναι μία από τις πιο κοινές γυναικολογικές παθήσεις και υπολογίζεται ότι επηρεάζει το 7-10% των γυναικών. Υπάρχουν προηγούμενες μελέτες οι οποίες ανέφεραν ότι ο TNF-α διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της ενδομητρίωσης. Αυτή η μελέτη έχει σκοπό να εξετάσει αν υπάρχει σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού -1031T / C και της ενδομητρίωσης σε έναν ευρωπαϊκό πληθυσμό.

Υλικά και μέθοδοι: Σε αυτή τη μελέτη ασθενών-μαρτύρων, συμμετείχαν 51 ασθενείς με ενδομητρίωση και 67 υγιείς γυναίκες. Χρησιμοποιήσαμε ιστούς κύστεων ενδομητρίωσης από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε επέμβαση για ενδομητρίωση και αίμα από τις υγιείς γυναίκες για να εξαγάγουμε DNA. Η αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και το ένζυμο περιορισμού Bbs I χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση του πολυμορφισμού -1031 T/C στην περιοχή υποκινητή του γονιδίου TNF-α. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη χρησιμοποιώντας

τη στατιστική δοκιμασία Fisher's exact test (τιμή p μικρότερη από 0,05 ήταν στατιστικά σημαντική) και η ισορροπία Hardy-Weinberg.

Αποτελέσματα: Στην ομάδα των ασθενών, 34 (66,7%) γυναίκες ανιχνεύθηκαν με τον γονότυπο TT, 17 (33,3%) με τον γονότυπο TC και 0 (0%) με τον γονότυπο CC. Στην ομάδα ελέγχου, 31 (46,3%) γυναίκες ανιχνεύθηκαν με τον γονότυπο TT, 32 (47,8%) με τον γονότυπο TC και 4 (6%) με τον γονότυπο CC. Υπήρξε μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ του -1031 T / C πολυμορφισμού στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου TNF-α με ενδομητρίωση (P = 0,03). Δεν υπήρξε σημαντική απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg.

Συμπέρασμα: Ο πολυμορφισμός -1031 T / C εμφανίζεται πιο συχνά στις υγιείς γυναίκες από τις ασθενείς με ενδομητρίωση και αυτό δείχνει ότι μπορεί να έχει προστατευτικό ρόλο στην ενδομητρίωση στον ελληνικό πληθυσμό. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τον προσδιορισμό του ρόλου αυτού του πολυμορφισμού στην παθογένεση της ενδομητρίωσης και στους μηχανισμούς που προστατεύουν τους ασθενείς από τη νόσο.

ABSTRACT

Background: Tumor necrosis factor -alpha (TNF- α) is a pro-inflammatory cytokine which plays an important role in pathogenesis of many diseases. Endometriosis is one of the most common gynecological diseases and it is calculated that affects 7-10% of women. There are previous studies which have reported that TNF- α plays an important role in the pathogenesis of endometriosis. This study has purpose to examine if there is an association between the -1031T/C polymorphism and endometriosis in a European population.

Materials and Methods: In this case-control study, participated 51 endometriosis patients and 67 healthy control women. We used tissue of endometriosis cysts from the patients who underwent operation for endometriosis and blood from the healthy women to extract DNA. Polymerase chain reaction (PCR) analysis and the restriction enzyme Bbs I was used to analyze the -1031 T/C polymorphism in the *TNF- α* gene promoter region. Statistical analysis was performed using the Fisher's

exact test (p-value less than 0,05 was statistically significant) and the Hardy-Weinberg equilibrium.

Results: In the group of patients, 34 (66,7%) women were detected with the TT genotype, 17 (33,3%) with the TC genotype and 0 (0%) with the CC genotype. In the control group, 31 (46,3%) women were detected with the TT genotype, 32 (47,8%) with the TC genotype and 4 (6%) with the CC genotype. There was a significant association between the -1031 T/C polymorphism in the promoter region of the *TNF- α* gene with endometriosis (P=0.03). There was no significant deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium.

Conclusion: The -1031 T/C polymorphism appears more often in the healthy women than the endometriosis patients and this shows that it might has a protective role in endometriosis in the Greek population. Further studies are needed to specify the role of this polymorphism in pathogenesis of endometriosis and the mechanisms that protect the patients from the disease.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1. ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ

A.1.1. ΟΡΙΣΜΟΣ

Η ενδομητρίωση είναι μία χρόνια, καλοήθης, οιστρογονοεξαρτώμενη πάθηση που χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη ενδομητρίου σε θέσεις εκτός της μήτρας. Οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν συμπτώματα σε μία ή περισσότερες υποτροπές και μερικές φορές μπορεί να υπάρξει ακόμα και αυτόματη ύφεση των συμπτωμάτων [1, 2].

A.1.2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η ενδομητρίωση είναι μία πάθηση που υπήρχε πιθανόν από την αρχαιότητα. Περιστατικά με βαριά δυσμηνόρροια έχουν περιγραφεί σε αιγυπτιακούς παπύρους που χρονολογούνται το 1600 π.Χ.

Η περιτοναϊκή ενδομητρίωση περιγράφηκε για πρώτη φορά από το γερμανό Daniel Shroen το 1690 μ.Χ. Κατά το 18^ο αιώνα, περιγράφηκε επίσης σε νεκροψίες στην Αγγλία, Σκωτία, Ολλανδία και Γερμανία, ως μία γυναικολογική πάθηση που προκαλεί επαναλαμβανόμενες αποβολές, υπογονιμότητα και οδηγεί την γυναίκα σε διαρκή φόβο για τον πόνο.

Ο Τσέχος παθολογοανατόμος Rokitansky, το 1860, περιέγραψε λεπτομερώς την ασθένεια και στη συνέχεια το 1883, ο Diesterweg, περιέγραψε με τη βοήθεια μικροσκοπίου, παρασκεύασμα ενδομητρίωσης, ως κύστεις με κροσσωτό επιθήλιο, οι οποίες ήταν γεμάτες με αίμα. Δύο χρόνια αργότερα ο Recklinghausen, διαχώρισε την ενδομητρίωση σε ένδο- και εξωμητρική.

Κατά το 20^ό αιώνα, αναπτύχθηκαν οι θεωρίες της παθογένεσης της ενδομητρίωσης με κύριους εκπροσώπους τους Mayer, Sampson και Halban.

Το 1910, πραγματοποιήθηκε η πρώτη λαπαροσκόπηση από το σουηδό Jacobens, ενώ το 1933, πραγματοποιήθηκε λύση συμφύσεων λαπαροσκοπικά.

Η πρώτη φαρμακολογική θεραπεία για την ενδομητρίωση, εμφανίστηκε το 1948, με υψηλές δόσεις του οιστρογόνου Στιλβεστρόλη και είχε πολλές παρενέργειες. Τα γεσταγόνα άρχισαν να χρησιμοποιούνται κατά τη δεκαετία του 1950. Το 1971, η Δαναζόλη, ήταν το πρώτο φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε ειδικά κατά της ενδομητρίωσης, το οποίο αν και ήταν πολλά υποσχόμενο στην αρχή, διαπιστώθηκε ότι είχε επίσης πολλές παρενέργειες. Τη δεκαετία του 1980, παράχθηκε και βγήκε στην κυκλοφορία το GnRH ανάλογο. [1]

A.1.3. ΤΥΠΟΙ

Υπάρχουν οι ακόλουθοι τύποι ενδομητρίωσης: [2]

1. Περιτοναϊκή: εντοπίζεται στο περιτόναιο
2. Ενδομητρίωμα: εντοπίζεται στην ωοθήκη με τη μορφή σοκολατοειδούς κύστης
3. Εν τω βάθει: διηθητική ενδομητρίωση, κυρίως σε γειτονικά όργανα της μήτρας, όπως έντερο, ουροδόχος κύστη, κόλπος και ορθοκολπικό διάφραγμα
4. Εξωγεννητική: εντοπίζεται σε απομακρυσμένες από τη μήτρα θέσεις. Έχει εντοπιστεί σε όλα τα όργανα εκτός του σπλήνα.
5. Αδενομύωση: ανάπτυξη ενδομητρικού ιστού στον μυϊκό χιτώνα της μήτρας

A.1.4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η ενδομητρίωση είναι μία συχνή νόσος. Αν και δεν είναι δυνατόν να υπολογιστεί η αληθής συχνότητά της, λόγω του ότι απαιτείται χειρουργική επέμβαση για τη διάγνωσή της, υπολογίζεται ότι προσβάλλει το 7-10% των γυναικών παγκοσμίως, [2-5] δηλαδή 176.000.000 γυναίκες παγκοσμίως πάσχουν. [1] Αυτό σημαίνει ότι η ενδομητρίωση είναι μία νόσος που εμφανίζεται πιο συχνά από το διαβήτη [6]. Στη Γαλλία, ο επιπολασμός υπολογίζεται στο 0,9% [7], στην Ιταλία σε γυναίκες 15-50 ετών στο 2% (επίπτωση 0,14%) [4] και στον Καναδά (1999-2009) στο 10,91% καθώς παρατηρείται και μία αύξηση με το πέρασμα των ετών στα περιστατικά ενδομητρίωσης καθώς και στα περιστατικά υπογονιμότητας λόγω ενδομητρίωσης [6].

Η νόσος διαγιγνώσκεται στο 40-70% των γυναικών που παρουσιάζουν άλγος ή υπογονιμότητα και σε 50% των εφήβων με δυσμηνόρροια [8, 9]. Σε αμερικάνικη μελέτη του 1994, υπολογίστηκε ότι 0,13% των εξιτηρίων από το νοσοκομείο σε γυναίκες 15-44 ετών είχαν ως διάγνωση την ενδομητρίωση [9], ενώ σε πιο πρόσφατη μελέτη στη Γαλλία υπολογίστηκε ότι 1,5% των γυναικών (αναπαραγωγικής ηλικίας) που νοσηλεύονται πάσχουν από ενδομητρίωση [7]. Στην ίδια μελέτη μάλιστα, υπολογίζεται και ότι στο 40-50% των γυναικών με ενδομητρίωση στη Γαλλία, η εντόπιση είναι στις ωοθήκες, στο 20-30% στο περιτόναιο, στο 10-20% στο έντερο και λιγότερο από 10% στους ουρητήρες ή την κύστη. [7] Επιπλέον η ενδομητρίωση είναι η αιτία για το 10% των υστερεκτομών, το 40% των λαπαροσκοπήσεων και το 6,6% της γυναικείας υπογονιμότητας [6, 10]. Η πιθανότητα σύλληψης και απόκτησης παιδιού σε ένα μήνα ελεύθερων σεξουαλικών επαφών είναι 2-10% σε ασθενείς με

ενδομητρίωση σε αντίθεση με τις φυσιολογικές γυναίκες που έχουν πιθανότητα 15-20% [6].

Η μέση χρονική διάρκεια από την έναρξη των συμπτωμάτων της ενδομητρίωσης μέχρι τη διάγνωσή της είναι 6,7 έτη [11]. Επί παραδείγματι, μελέτες υπολογίζουν 10 χρόνια στη Γερμανία και την Αυστρία, 8 χρόνια σε Αγγλία και Ισπανία, 7-10 χρόνια σε Νορβηγία και Ιταλία και 4-5 χρόνια στην Ιρλανδία και το Βέλγιο [12]. Σύμφωνα με τη μελέτη των Kelechi et al. η ενδομητρίωση επηρεάζει την ποιότητα ζωής και την παραγωγικότητα των γυναικών που πάσχουν (χάνουν κατά μέσο όρο 10,8 ώρες εργασίας/εβδομάδα) [11], γεγονός το οποίο επιδεινώνεται με την καθυστέρηση της διάγνωσης. Επιπλέον το 25-50% των γυναικών που υποβάλλονται σε συντηρητική θεραπεία, εμφανίζουν υποτροπή της νόσου [7].

Σύμφωνα με την τελευταία βιβλιογραφική ανασκόπηση [8], οι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση ενδομητρίωσης είναι:

1. Το οικογενειακό ιστορικό: υπάρχει ισχυρή συσχέτιση και έτσι φαίνεται ότι υπάρχει γενετικό υπόβαθρο για τη νόσο. Σε συγγενείς α' βαθμού ασθενών με ενδομητρίωση υπάρχει 3-9 φορές αυξημένος κίνδυνος για προσβολή από τη νόσο [13]. Επιπλέον μελέτες έχουν υποδείξει κάποια συσχέτιση με το χρωμόσωμα 10 [14, 15].
2. Χαρακτηριστικά της έμμηνου ρύσης: μικρή ηλικία εμμηναρχής, μεγάλη διάρκεια κύκλου και αυξημένη αιμορραγία και ατεκνία [8, 16].
3. Άλλοι παράγοντες που δεν έχουν εξακριβωθεί (μη επαρκή δεδομένα):

A. Αυξημένο κοινωνικο-οικονομικό επίπεδο

B. Τρόπος ζωής (διατροφή, μειωμένη σωματική δραστηριότητα, κάπνισμα, αυξημένη λήψη αλκοόλ, μειωμένο βάρος, φωτοευαισθησία) [17-20]

Γ. Αντισυλληπτικά: φαίνεται να μειώνεται ο κίνδυνος κατά τη λήψη, όμως αυξάνεται μετά τη διακοπή [21].

Δ. Φυλή: η μαύρη φυλή έχει μικρότερο κίνδυνο προσβολής από τη λευκή, ενώ οι ανατολικές φυλές μεγαλύτερο [9].

Έχει παρατηρηθεί συσχέτιση της ενδομητρίωσης με διάφορες νόσους. Από το γαστρεντερικό σύστημα παρατηρείται σε ασθενείς με ενδομητρίωση, σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου και ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου [22, 23]. Από το ανοσοποιητικό σύστημα, με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, την ψωρίαση, διάφορες αλλεργίες και το άσθμα [24-26]. Επιπλέον γυναίκες με ενδομητρίωση έχουν 1,4- 1,6 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για προσβολή από στεφανιαία νόσο και οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου [22]. Τέλος αναφέρεται στη βιβλιογραφία αυξημένος κίνδυνος για εμφάνιση καρκίνου του μαστού ή των ωοθηκών [6, 27].

A.1.5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ

Ο παθογενετικός μηχανισμός της ενδομητρίωσης δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολυάριθμες θεωρίες οι οποίες προσπαθούν να εξηγήσουν τον τρόπο με τον οποίο το ενδομήτριο μεταφέρεται και τοποθετείται σε έκτοπες θέσεις και άλλες το πώς εμφυτεύεται και επιβιώνει ο έκτοπος ενδομητριωσικός ιστός στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Μέχρι τώρα η πάθηση φαίνεται να είναι πολυπαραγοντική. Παρακάτω αναφέρονται οι μέχρι σήμερα επικρατούσες θεωρίες για την παθογένεση της ενδομητρίωσης.

1. ΘΕΩΡΙΑ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗΣ [1, 2, 28]

Πρώτος ο Sampson το 1927, πρότεινε τη θεωρία της παλίνδρομου εμμήνου ρύσεως [29] μέσω των σαλπίνγγων προς την περιτοναϊκή κοιλότητα [28, 30]. Πράγματι, παλίνδρομη έμμηνος ρύση έχει παρατηρηθεί στο 76-90% των γυναικών, όμως δεν εμφανίζεται σε όλες τους ενδομητρίωση [2, 31], γεγονός που αποδεικνύει ότι υπάρχουν κι άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν στην εμφύτευση και διατήρηση του ιστού του ενδομητρίου εκτός της μήτρας. Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι ο όγκος του παλινδρομούντος αίματος στην περιτοναϊκή κοιλότητα είναι μεγαλύτερος στις ασθενείς με ενδομητρίωση σε σχέση με τις γυναίκες που δεν πάσχουν [32]. Τέλος, παρόλο που κατά την έμμηνο ρύση αποβάλλονται μόνο κύτταρα της λειτουργικής στιβάδας του ενδομητρίου, ανιχνεύεται στις ενδομητριωσικές βλάβες ενδομήτριο πλήρους πάχους συμπεριλαμβανομένης και της βασικής στιβάδας, από την οποία προέρχονται και διαφοροποιούνται τα κύτταρα της λειτουργικής στιβάδας [28, 33]. Φαίνεται ότι η βασική στιβάδα παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφύτευση του έκτοπου ιστού [34].

2. ΘΕΩΡΙΑ ΜΕΤΑΠΛΑΣΗΣ [2]

Σύμφωνα με τη θεωρία της μεταπλασίας, η ενδομητρίωση προέρχεται από κύτταρα εκτός της μήτρας τα οποία μεταπλάσσονται σε κύτταρα του ενδομητρίου [28]. Η μεταπλασία μπορεί να πυροδοτηθεί από ορμονικούς ή ανοσολογικούς παράγοντες [35]. Στις ωθήκες, μπορεί το ενδομητρίωμα να προέρχεται από τη μεταπλασία επιθηλιακών κυττάρων και κυττάρων στρώματος [36, 37]. Η θεωρία μετάπλασης του ενδοθηλίου υποστηρίζει τη μετατροπή του φυσιολογικού περιτοναϊκού ιστού σε πυελική ενδομητρίωση [35, 38]. Τέλος, υπάρχει η υπόθεση αναποτελεσματικής εμβρυογένεσης, σύμφωνα με την οποία η ενδομητρίωση μπορεί να προέρχεται από υπολείμματα των πόρων του Wolff και Muller υπό την επίδραση των οιστρογόνων στην ήβη [35, 39].

3. ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΛΟΗΘΟΥΣ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗΣ

Ο Halban πρώτος αναφέρθηκε στη συγκεκριμένη θεωρία, η οποία μάλιστα έχει κλινική και πειραματική απόδειξη [1]. Η υπόθεση είναι ότι τα κλάσματα του ενδομητρίου μεταφέρονται στο περιτόναιο, τους λεμφαδένες καθώς και σε απομακρυσμένους ιστούς μέσω του λεμφικού ή του αγγειακού συστήματος [30, 40].

4. ΘΕΩΡΙΑ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ [41-43]

Υπάρχει η υπόθεση ότι βλαστοκύτταρα της βασικής στιβάδας του ενδομητρίου, συμβάλλουν στην μηνιαία αναγέννηση του [44]. Οι ασθενείς με ενδομητρίωση φαίνεται να χάνουν και μέρος της βασικής στιβάδας του ενδομητρίου εκτός της λειτουργικής κατά την έμμηνο ρύση [28]. Όταν τα βλαστοκύτταρα βρεθούν εκτός της μήτρας, μέσω παλίνδρομης έμμηνο ρύσεως ή μέσω καλοήθους μετάστασης, έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν έπειτα από ερεθίσματα του περιβάλλοντος και να οδηγήσουν σε ενδομητριοειδείς βλάβες [42, 45].

5. ΘΕΩΡΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ

Η θεωρία αυτή υποστηρίζεται λόγω του ότι η παλίνδρομος έμμηνο ρύση παρατηρείται σε πολύ μεγάλο ποσοστό του γυναικείου πληθυσμού, ενώ μόνο ένα μικρό ποσοστό από αυτές αναπτύσσει τη νόσο [46]. Προσπαθεί να ερμηνεύσει τους μηχανισμούς, οι οποίοι συμβάλλουν στην επιβίωση των κυττάρων του ενδομητρίου στην περιτοναϊκή κοιλότητα.

Α. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ

Η ενδομητρίωση είναι οιστρογόνο-εξαρτώμενη νόσος. Κατά την παραγωγική φάση του έμμηνο κύκλου, υπό την επίδραση των οιστρογόνων, παρατηρείται υπερπλασία του ενδομητρίου έπειτα από μιτωτικές διαιρέσεις των κυττάρων του. Στις έκτοπες εστίες της ενδομητρίωσης, η αυξημένη έκφραση της αρωματάσης [47] οδηγεί σε τοπική αρωματοποίηση και υψηλότερη βιοδιαθεσιμότητα οιστρογόνων, ενώ παράλληλα η μειωμένη έκφραση 17-υδροξυστεροειδικών ενζύμων οδηγεί σε μειωμένη μετατροπή οιστριόλης σε οιστρόνη (λιγότερο ενεργή μορφή) [35]. Οι μιτογόνες δράσεις των οιστρογόνων φαίνεται να ασκούνται στις ενδομητριοειδείς εστίες, οι οποίες ανταποκρίνονται περισσότερο από το φυσιολογικό ενδομήτριο [48]. Επιπλέον, σε ασθενείς με ενδομητρίωση υπάρχει αντίσταση του ενδομητρίου αλλά και των έκτοπων βλαβών στην προγεστερόνη και την αντι-οιστρογονική της δράση [28], γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται σε μειωμένη έκφραση ή δυσλειτουργία των υποδοχέων προγεστερόνης στις βλάβες [49]. Παρατηρείται μάλιστα σε γυναίκες με ενδομητρίωση, πολλαπλασιασμός του ενδομητρίου ακόμα και κατά την εκκριτική φάση [50, 51]. Η αυξημένη πολλαπλασιαστική ικανότητα του στρώματος και του επιθηλίου βοηθά μάλλον στην επιβίωση των ενδομητρικών κυττάρων στην περιτοναϊκή κοιλότητα [52, 53].

B. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ

Σύμφωνα με την θεωρία της νόσου του ενδομητρίου, υπάρχουν ορισμένα χαρακτηριστικά των παθολογικών ενδομητριωσικών κυττάρων που βοηθούν στην εμφύτευσή και επιβίωσή τους σε έκτοπες θέσεις. Η καταστολή της απόπτωσης, μέσω της θετικής ρύθμισης (upregulation) αντιαποπτωτικών γονιδίων (πχ BCL-2) και της αρνητικής ρύθμισης (downregulation) γονιδίων που επάγουν την απόπτωση στα εκτοπικά κύτταρα [28, 54] είναι απαραίτητο στάδιο για την επιβίωση των ενδομητριωσικών κυττάρων. Η τελομεράση μάλιστα φαίνεται να παίζει ουσιαστικό ρόλο [55]. Τα κύτταρα του ενδομητρίου των ασθενών παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης και πρωτεολυτικών ενζύμων, που συμβάλλει στην προσκόλληση και εμφύτευση των έκτοπων βλαβών [56, 57]. Επιπλέον εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα αγγειογένεσης [46, 58]. Η αυξημένη νεύρωση των εστιών μέσω της αυξημένης έκφρασης νευροτροφινών και την ανώμαλη ανάπτυξη νευρικών ινών οδηγεί στον χαρακτηριστικό πόνο της ενδομητρίωσης [59, 60]. Τέλος υπάρχει πιθανόν αυξημένη λεμφαγγειογένεση [46].

6. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΦΛΕΓΜΟΝΗ

Το περιτοναϊκό μικροπεριβάλλον φαίνεται να επηρεάζει στην εμφάνιση της νόσου. Το περιτοναϊκό υγρό των ασθενών με ενδομητρίωση περιέχει νερό και ηλεκτρολύτες που είναι πηγή δραστικών μορφών οξυγόνου [61]. Το οξειδωτικό στρες μέσω των δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) και την υπεροξειδωση των λιπιδίων μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο DNA των κυττάρων του ενδομητρίου και να συμβάλλει στην παθογένεση της νόσου [46]. Επιπλέον η αιμοσφαιρίνη, από τις αιμορραγούσες έκτοπες βλάβες, διασπάται, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση αυξημένων ποσοτήτων σιδήρου στην περιτοναϊκή κοιλότητα καθώς και αίμης. Ο ελεύθερος σίδηρος οδηγεί σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και η αίμη δρα ως προφλεγμονώδης ουσία με αποτέλεσμα την έναρξη φλεγμονής και τη στρατολόγηση λεμφοκυττάρων και ενεργοποιημένων μακροφάγων. Τα μακροφάγα παράγουν κυτταροκίνες, όπως TNF- α , ιντερλευκίνες (IL-1,6,8,18), RANTES, TGF- β και VEGF, οι οποίες επάγουν την οξείδωση των ενζύμων και την ενδοθηλιακή ανάπτυξη [1, 62, 63]. Μελέτη με πρωτεομική στο περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση ανίχνευσε μία πρωτεΐνη, που είναι δομικά όμοια με την απποσφαιρίνη, και προσδένεται στα μακροφάγα μειώνοντας την φαγοκυτταρική τους ικανότητα και αυξάνοντας την παραγωγή IL-6 [64, 65]. Στην παθογένεση της ενδομητρίωσης σημαντικό ρόλο παίζουν οι προσταγλανδίνες, όπως επίσης και στην εμφάνιση του πόνου και της υπογονιμότητας. Η αυξημένη απελευθέρωση προσταγλανδινών οφείλεται στα αυξημένα επίπεδα κυκλο-οξυγενάσης 2 (COX-2) που εκφράζεται στα περιτοναϊκά μακροφάγα των ασθενών με ενδομητρίωση [66], αλλά και τοπικά στις βλάβες όπου ο TNF- α προάγει την παραγωγή προσταγλανδινών F2 α και E2 από τα ενδομητριωσικά κύτταρα [67].

7. ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Μία ακόμα από τις θεωρίες παθογένεσης της ενδομητρίωσης είναι η υπόθεση της δυσλειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι γυναίκες που πάσχουν από ενδομητρίωση εμφανίζουν σε αυξημένη συχνότητα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο, Ρευματοειδή Αρθρίτιδα, θυρεοειδίτιδα, Sjögren και ατοπικά νοσήματα (άσθμα, έκζεμα, αλλεργίες) [68]. Η αυξημένη δραστηριότητα των Β- λεμφοκυττάρων και τα αυξημένα αυτοαντισώματα τοπικά, μπορεί να επηρεάζουν τη γονιμότητα [1]. Αυξημένη συγκέντρωση ενεργοποιημένων μακροφάγων, μειωμένη κυτταρική ανοσοποίηση καθώς και κατεσταλμένη λειτουργία των NK- κυττάρων παρουσιάζονται σε ασθενείς με ενδομητρίωση [1, 69, 70]. Πιθανόν αυτή η μειωμένη δραστηριότητα των NK- κυττάρων να οφείλεται στο ότι κατά την παλινδρόμηση των ενδομητρικών κυττάρων στην περιτοναϊκή κοιλότητα, προκαλείται φλεγμονώδης απάντηση με συγκέντρωση ενεργοποιημένων μακροφάγων και λευκοκυττάρων, γεγονός το οποίο προκαλεί μειωμένη ανοσοπαρακολούθηση (immunosurveillance) με αποτέλεσμα τη διευκόλυνση της εμφύτευσης των βλαβών [28]. Τέλος, υπάρχει η υπόθεση ότι οι βλάβες εκκρίνουν sICAM-1 που τις βοηθά να ξεφύγουν από το ανοσοποιητικό σύστημα [33].

8. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ

Όπως προαναφέρθηκε, μελέτες έχουν αποδείξει αυξημένο ρίσκο για νόσηση από ενδομητρίωση, σε συγγενείς 1^{ου} βαθμού ασθενών καθώς και σε δίδυμα. Η ενδομητρίωση φαίνεται να είναι πολυγονιδιακή νόσος. Διάφορες επιστημονικές εργασίες έχουν προτείνει υποψήφια γονίδια [1, 71], αλλά και ύποπτες περιοχές του γονιδιώματος (10q26, 7p15) που σχετίζονται με τη νόσο [14, 72]. Τα γονίδια που εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου φαίνεται να κωδικοποιούν για ένζυμα που σχετίζονται με detoxification καθώς και να σχετίζονται με το ανοσοποιητικό [48]. Επιπλέον πολυμορφισμοί, όπως π.χ. στο γονίδιο των οιστρογονικών υποδοχέων [48], microRNAs [28] όπως και επιγενετικοί μηχανισμοί [73], όπως η μεθυλίωση του DNA σε εκκινητές γονιδίων που είναι σημαντικά για την απάντηση του ενδομητρίου στην προγεστερόνη (αντίσταση προς την προγεστερόνη) [74].

A.1.6. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Τα κύρια συμπτώματα για τα οποία οι ασθενείς που πάσχουν από ενδομητρίωση αναζητούν ιατρική βοήθεια είναι το άλγος και η υπογονιμότητα.

A. ΑΛΓΟΣ

Το άλγος λόγω της ενδομητρίωσης μπορεί να έχει διάφορους χαρακτήρες και εξαρτάται από την εντόπιση και το βάθος διήθησης των βλαβών [2, 75]. Οι ασθενείς, συνήθως, νιώθουν μία μίξη από διάχυτο και εντοπισμένο πόνο. Μάλιστα, η βαθιά διήθηση των βλαβών, ενεργοποιεί την ανάπτυξη νέων νευρώνων και οδηγεί σε υπεραλγησία [75, 76].

1. Δυσμηνόρροια

Το άλγος συνήθως έχει έναρξη λίγες μέρες πριν από την έμμηνο ρύση και γίνεται χειρότερο με την έλευσή της. Διαρκεί 2 με 3 ημέρες και αναγκάζει τις ασθενείς να απέχουν από τις καθημερινές τους δραστηριότητες. Μπορεί να είναι ετερόπλευρος ή αμφοτερόπλευρος [1] και ακτινοβολεί στη μέση, το υπογάστριο και τα πόδια [2]. Οφείλεται στην φλεγμονώδη διεργασία και στις συμφύσεις και δεν εκφράζει την εντόπιση των βλαβών. [77]

2. Βαθιά δυσπαρεύνια

Ο πόνος κατά τη σεξουαλική επαφή είναι χαρακτηριστικός σε ασθενείς με ενδομητρίωση και συνήθως οφείλεται σε εν τω βάθει βλάβες που εντοπίζονται στον ιερομητρικό σύνδεσμο και το ορθοκολπικό διάφραγμα (ερεθισμός του περιτοναίου). Το άλγος οδηγεί σε διακοπή της επαφής και μπορεί να παραμείνει για ώρες ή ακόμα και ημέρες μετά τη σεξουαλική επαφή. Οδηγεί συχνά σε κολεόσπασμο. [2]

3. Δυσχεσία και γαστρεντερικές διαταραχές

Το 70% των πασχόντων από ενδομητρίωση εμφανίζουν γαστρεντερικές διαταραχές, λόγω της φλεγμονώδους δραστηριότητας στην περιοχή της πυέλου, με τη μορφή διάρροιας ή δυσκοιλιότητας κατά την εμμηνορρυσία [78]. Η εντόπιση ενδομητριωσικών βλαβών στο τοίχωμα του ορθού ή στο ορθοκολπικό διάφραγμα είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση δυσχεσίας [2], ενώ η εντόπιση ενδομητρίωσης στον αυλό του εντέρου μπορεί να προκαλέσει αιμορραγία από τον πρωκτό κατά την έμμηνο ρύση [1]. Επιπλέον η ίνωση του εντέρου στις ασθενείς μπορεί να προκαλέσει τεινεσμό. Δεν είναι σπάνια η συνύπαρξη του συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου σε ασθενείς με ενδομητρίωση [2]. Τέλος, σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να προκληθεί ειλεός λόγω συμφύσεων στην πνευλική κοιλότητα [2].

4. Δυσουρία

Η ενδομητρίωση στην ουροδόχο κύστη μπορεί να προκαλέσει άλγος κατά την ούρηση, το οποίο μοιάζει με κυστίτιδα ή ουρηθρήτιδα. Ο πόνος είναι πιο έντονος κατά την πλήρωση της κύστης ή στο τέλος της ούρησης. [2]

5. Ενδομητρίωμα

Η ύπαρξη ενδομητριώματος από μόνη της δεν προκαλεί πόνο. Άλγος σε ασθενείς με ενδομητρίωμα μπορεί να οφείλεται σε συμφύσεις, ρήξη της ενδομητριωσικής κύστης με αποτέλεσμα τον περιτοναϊκό ερεθισμό ή τέλος σε συστροφή της ωοθήκης. [2]

B. ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Σύμφωνα με μελέτες, περίπου 40% των υπογόνιμων γυναικών πάσχουν από ενδομητρίωση [68]. Παρόλα αυτά των 47% των ασθενών επιτυγχάνουν εγκυμοσύνη με φυσιολογική σύλληψη και το 76% των ασθενών που καταφεύγουν σε εξωσωματική γονιμοποίηση αποκτούν παιδί, σύμφωνα με Νορβηγική μελέτη. [2]

Το κύριο αίτιο που επηρεάζει τη γονιμότητα φαίνεται να είναι η τοπική φλεγμονή. Το περιτοναϊκό υγρό των ασθενών βρίθεται από μακροφάγα, γεγονός που οδηγεί στην απελευθέρωση προσταγλανδινών, κυτταροκινών και παραγόντων ινωδόλυσης [1]. Επιπλέον έχει ανιχνευθεί αυξημένη συγκέντρωση ιντερλευκίνων και κυτταροκινών στο ωοθυλακικό υγρό των ασθενών [79]. Παρόλα αυτά δεν έχει διευκρινιστεί ο ακριβής μηχανισμός που η τοπική φλεγμονή οδηγεί σε υπογονιμότητα και οι υποθέσεις είναι ποικίλλες. Οι συμφύσεις, λόγω της ίνωσης που χαρακτηρίζει τη νόσο, καθώς και η μειωμένη κινητικότητα των σαλπίγγων σε ασθενείς με ενδομητρίωση φαίνεται να είναι κάποιες από αυτές [2]. Μπορεί επίσης να παρατηρηθεί φαγοκυττάρωση των σπερματοζωαρίων [80].

Όπως προαναφέρθηκε, η λειτουργία του ενδομητρίου είναι επηρεασμένη σε ασθενείς με ενδομητρίωση και έχουν παρατηρηθεί αυξημένα ποσοστά αποβολής και μη σωστής πλακουντοποίησης [2]. Η δυσλειτουργία της γονιμοποίησης, η εμβρυοτοξικότητα και η ελλιπής εμφύτευση είναι κάποιες από τις υποθέσεις που μελετώνται [81].

Τέλος, συχνές είναι και οι διαταραχές της ωοθυλακιορρηξίας στις ασθενείς που υποφέρουν από ενδομητρίωση [81] και ιδιαίτερα σε γυναίκες με ενδομητρίωμα, συναντάται μειωμένο ωοθηκικό απόθεμα. Αυξημένη συγκέντρωση ιντερλευκινών και κυτοκινών στο ωοθυλακικό υγρό παρατηρείται συχνά σε ασθενείς. Ένας ακόμη μηχανισμός που μπορεί να επηρεάσει τη γονιμότητα είναι η δυσλειτουργία του ωχρού σωματίου, μέσω της μειωμένης παραγωγής οιστρογόνων και προγεστερόνης και της μειωμένης δράσης της αρωματάσης. [79]

A.1.7. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ [82]

Η μέθοδος σταδιοποίησης της ενδομητρίωσης που χρησιμοποιείται ευρέως είναι αυτή της Αμερικάνικης ένωσης Αναπαραγωγικής Ιατρικής, η οποία αναθεωρήθηκε το 1997 και χρησιμοποιείται ως και σήμερα. Μία άλλη μέθοδος που ως σκοπό έχει να συμπληρώσει τη σταδιοποίηση rASRM είναι η ENZIAN.


Κατά τη σταδιοποίηση με τη μέθοδο rASRM, χρησιμοποιούνται πόντοι οι οποίοι κατανέμονται σε βλάβες που βρίσκονται στο περιτόναιο και τις ωθήκες, ανάλογα με το μέγεθός τους, καθώς και σε συμφύσεις που εμφανίζονται στις σάλπιγγες ή στις ωθήκες. Στη βαθμολογία περιλαμβάνεται επίσης και η μερική ή πλήρης εξάλειψη του Δουγλάσσειου. Ανάλογα με τους πόντους που αντιστοιχούν σε κάθε ασθενή, κατατάσσεται σε μία από τις ακόλουθες κατηγορίες:

Στάδιο I: ελάχιστη ενδομητρίωση (1-5 πόντοι)

Στάδιο II: ήπια ενδομητρίωση (6-15 πόντοι)

Στάδιο III: μέτρια ενδομητρίωση (16- 40 πόντοι)

Στάδιο IV: σοβαρή ενδομητρίωση (>40 πόντοι)



THE AMERICAN FERTILITY SOCIETY REVISED CLASSIFICATION OF ENDOMETRIOSIS

Patient's Name _____ Date _____
 Stage I (Minimal) - 1-5 Laparoscopy _____ Laparotomy _____ Photography _____
 Stage II (Mild) - 6-15 Recommended Treatment _____
 Stage III (Moderate) - 16-40
 Stage IV (Severe) - >40
 Total _____ Prognosis _____

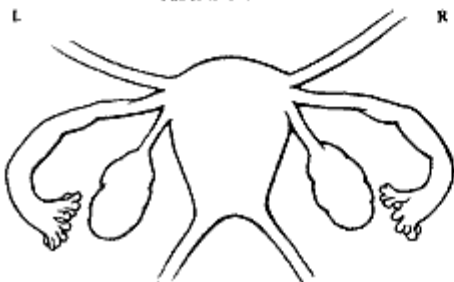
PERITONEUM	ENDOMETRIOSIS	< 1cm	1-3cm	> 3cm	
		Superficial	1	2	4
	Deep	2	4	6	
OVARY	R Superficial	1	2	4	
	Deep	4	16	20	
	L Superficial	1	2	4	
	Deep	4	16	20	
POSTERIOR CULDESAC OBLITERATION		Partial	Complete		
		4	40		
OVARY	ADHESIONS	< 1/3 Enclosure	1/3-2/3 Enclosure	> 2/3 Enclosure	
	R Filmy	1	2	4	
	Dense	4	8	16	
	L Filmy	1	2	4	
	Dense	4	8	16	
	TUBE	R Filmy	1	2	4
		Dense	4*	8*	16
		L Filmy	1	2	4
Dense		4*	8*	16	

*If the fimbriated end of the fallopian tube is completely enclosed, change the point assignment to 16.


Additional Endometriosis: _____

Associated Pathology: _____

To Be Used with Normal
Tubes and Ovaries



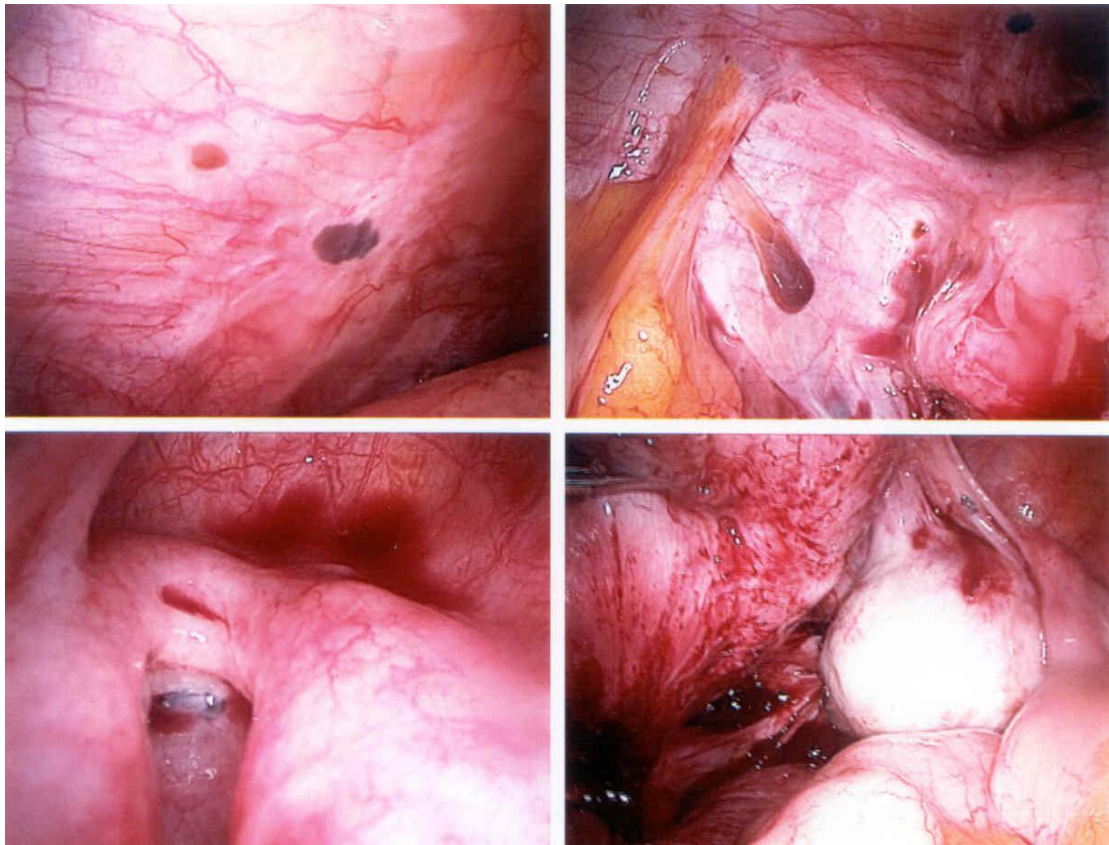
To Be Used with Abnormal
Tubes and/or Ovaries



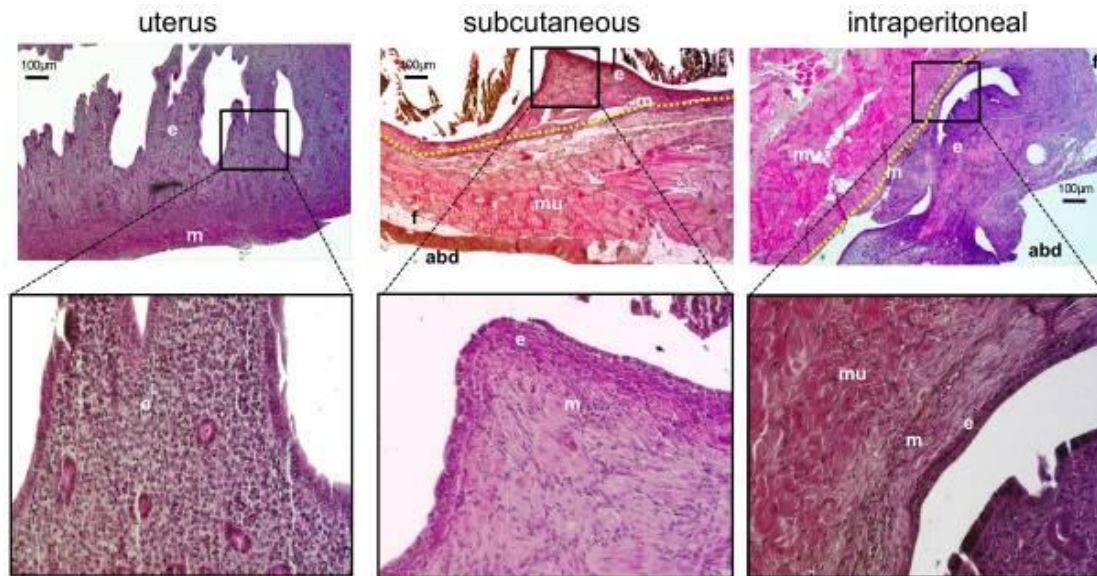
Εικόνα 1: Αναθεωρημένη σταδιοποίηση ενδομητρίωσης σύμφωνα με την Αμερικάνικη Ένωση Αναπαραγωγικής Ιατρικής [82]

Α.1.8. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η διάγνωση της ενδομητρίωσης είναι ιστολογική, μετά από εκτομή κάποιας βλάβης κατά τη διάρκεια διερευνητικής λαπαροσκόπησης. Στην ιστολογική εξέταση ανιχνεύεται ενδομητρικός ιστός, ο οποίος αποτελείται αδενοειδείς δομές με κυλινδρικό επιθήλιο, οι οποίες βρίσκονται μέσα σε στρώμα. Το στρώμα περιλαμβάνει αγγεία, νεύρα (μη μυελωμένες αισθητικές c-ίνες) και κύτταρα του ανοσοποιητικού. [2]



Εικόνα 2: Ενδομητρωσικές βλάβες στην περιτοναϊκή κοιλότητα (Endometriosis, Davila et al 2016, Medscape.com)



Εικόνα 3: Ιστολογική εικόνα ενδομητρίωσης[83]

Όπως είναι προφανές, δεν ενδείκνυται χειρουργική επέμβαση για όλες τις ασθενείς στις οποίες υπάρχει η υποψία ενδομητρίωσης στη διαφορική διάγνωση, εφόσον δεν υπάρχει ακόμα θεραπεία της νόσου. Οι διαθέσιμες θεραπείες είναι συμπτωματικές και στοχεύουν στην καταπολέμηση του άλγους.

Για τη διάγνωση της ενδομητρίωσης είναι πολύ σημαντική η λήψη λεπτομερούς ιστορικού με έμφαση στο χαρακτήρα του άλγους. Η κλινική εξέταση θα πρέπει να περιλαμβάνει την ψηλάφηση της κοιλίας και προσεκτική γυναικολογική εξέταση με επισκόπηση του κόλπου και του τραχήλου της μήτρας καθώς και με αμφίχειρη ψηλάφηση, η οποία μπορεί να μας δώσει ενδείξεις για την εντόπιση της νόσου ή ακόμα και για μια κατάσταση που ονομάζεται παγωμένη πύελος και είναι αποτέλεσμα εκτεταμένης ίνωσης. Με τη βοήθεια διακοπτικού υπερήχου μπορούμε να διαγνώσουμε την ύπαρξη ενδομητριώματος, την ενδομητρίωση της ουροδόχου κύστης και την αδеноμύωση. Η μαγνητική τομογραφία μπορεί να είναι διαγνωστική σε περιπτώσεις εν τω βάθει ενδομητρίωσης, για την ανίχνευση της ίνωσης, αλλά και για την εξωγεννητική ενδομητρίωση. Αν και μελετώνται πολλοί βιοδείκτες που θα χρησίμευαν για την μη επεμβατική διάγνωση της ενδομητρίωσης, δυστυχώς δεν έχει βρεθεί ακόμα κάποιος που να χρησιμοποιείται στην καθημερινή κλινική πράξη. [2]

Η θεραπεία της ενδομητρίωσης είναι κυρίως φαρμακευτική και έχει ως στόχο την καταπολέμηση του πόνου και την πρόκληση αμηνόρροιας και ανοωθυλακιόρρηξιας, εφόσον η ενδομητρίωση είναι οιστρογονοεξαρτώμενη νόσος. Ως αναλγητικά χρησιμοποιούνται η παρακεταμόλη και τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη και σε πιο προχωρημένες περιπτώσεις μπορεί να χορηγηθούν αντικαταθλιπτικά (πχ τρικυκλικά). [1, 2]

Στην φαρέτρα της ορμονικής θεραπείας περιλαμβάνονται τα γεσταγόνα και τα GnRH ανάλογα. Ως θεραπεία πρώτης γραμμής μπορεί να χρησιμοποιηθεί μονοφασικό αντισυλληπτικό χάπι με επικρατούν γεσταγόνο ή σπιράλ λεβονοργεστρέλης. Η διενογέστη είναι μία νεότερη εναλλακτική. Σε

περιπτώσεις ασθενών που δεν παρατηρείται βελτίωση ή που έχουν διαγνωστεί με ενδομητρίωση, μπορεί να χορηγηθεί εξαμήνη θεραπεία με GnRH ανάλογο. [1, 2]

Χειρουργική θεραπεία με λαπαροσκόπηση ή ρομποτική με σκοπό τη διάγνωση και τον καυτηριασμό των εστιών της ενδομητρίωσης ενδείκνυται στην περίπτωση αποτυχίας των φαρμακευτικών επιλογών για την αντιμετώπιση του άλγους ή σε επεκτατική ή διηθητική νόσο. Η αφαίρεση ενδομητριωμάτων μπορεί να επηρεάσει τη γονιμότητα λόγω καταστροφής τμήματος της ωθήκης και για αυτό το λόγο θα πρέπει να αφαιρείται σε συγκεκριμένες περιπτώσεις. Ενδείξεις για την αφαίρεση ενδομητριώματος είναι όταν προκαλεί σημαντικό άλγος, όταν υπάρχει υποψία κακοήθειας ή πριν από κύκλο εξωσωματικής γονιμοποίησης σε περίπτωση που εμποδίζει την ωοληψία. [1, 2]

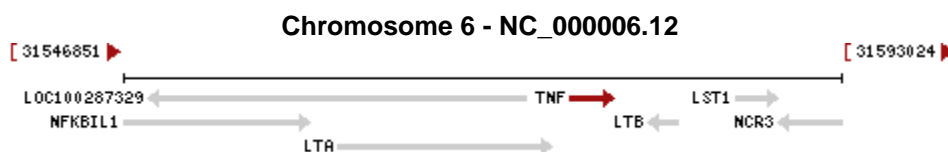
Σε περιπτώσεις υπογονιμότητας, η σπερματέγχυση δεν προτείνεται. Μέθοδος πρώτης επιλογής είναι η εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF). Η εξωσωματική γονιμοποίηση φαίνεται να έχει καλύτερα αποτελέσματα έπειτα από 3-6 μήνες θεραπείας με GnRH ανάλογο [84]. Η χειρουργική θεραπεία για αντιμετώπιση της υπογονιμότητας ενδείκνυται σε περιπτώσεις ελάχιστης ή ήπιας ενδομητρίωσης με σκοπό την αφαίρεση των βλαβών και τη λύση των υπάρχουσων συμφύσεων. Σε περίπτωση ενδομητριώματος, σύμφωνα με νέες μελέτες [85-87], είναι αβέβαιο αν με την χειρουργική εκτομή του βελτιώνεται η γονιμότητα, εκτός από τις περιπτώσεις που το ενδομητρίωμα εμποδίζει την ωοληψία ή η ασθενής έχει έντονο άλγος λόγω του ενδομητριώματος.

A.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΟΓΚΩΝ Α (TNFA)

Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων είναι μία προ- φλεγμονώδης κυτταροκίνη, η οποία έχει πλειοτροπική δράση σε πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων και ανήκει στην υπεροικογένεια των TNFs [88-91]. Ονομάζεται και καχεξίνη λόγω του ότι είναι πυρετογόνος, και προκαλεί ανορεξία και καχεξία όταν υπάρχει μακροχρόνια έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις της, όπως παραδείγματος χάριν σε καρκινοπαθείς [92, 93].

Ανακαλύφθηκε το 1975 από τον Carswell et al. και πήρε το όνομά του λόγω του ότι εμφάνιζε ισχυρή κυτταροτοξική δράση έναντι όγκων σε ποντίκια. [88, 93] Μέχρι το 1984 όταν μελετήθηκε το γονίδιο του, ο TNF-α και η καχεξίνη θεωρούνταν 2 διαφορετικοί παράγοντες. Επιπλέον με την μελέτη του γονιδίου του διαπιστώθηκε η ομολογία του με τη λεμφοτοξίνη η οποία μετονομάστηκε σε TNF-β [94, 95].

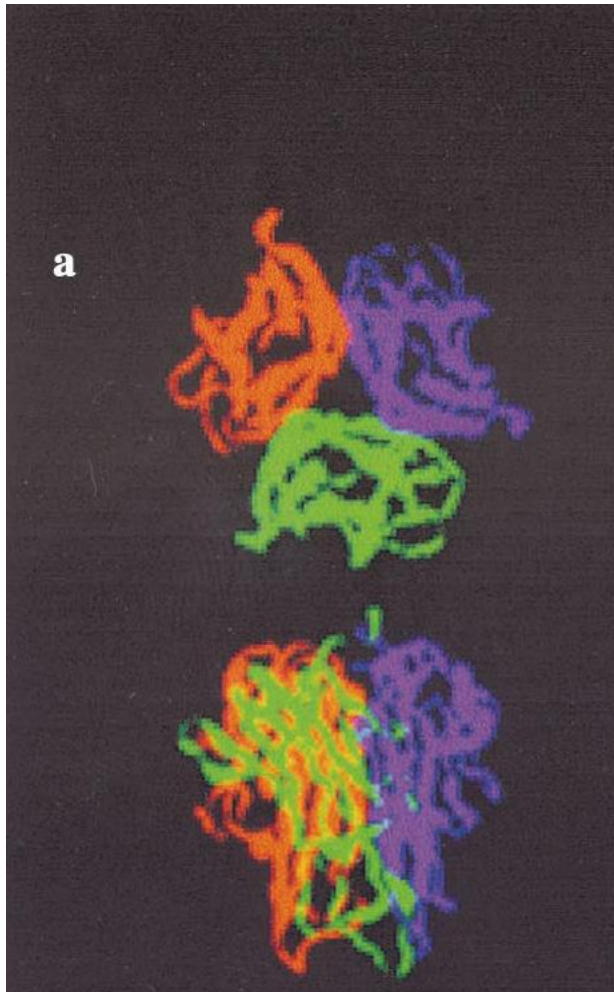
Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον TNF-α εδράζεται στο χρωμόσωμα 6q21.3, αποτελείται από περίπου 3000 βάσεις. Εμφανίζει 4 εξώνια από τα οποία το τελευταίο κωδικοποιεί περισσότερο από το 80% της πρωτεΐνης [88, 96].



Εικόνα 4: Το γονίδιο του παράγοντα νέκρωσης όγκων άλφα στο χρωμόσωμα 6. (Gene, NCBI)

Ο TNF-α εκφράζεται κυρίως στα διεγερμένα μακροφάγα και μονοκύτταρα, αλλά και σε ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες και νευρώνες. [88]

Το μόριο του TNF-α είναι μία ομοτριμερής πρωτεΐνη, η οποία περιέχει ένα δισουλφιδικό δεσμό, ιδιαίτερα σημαντικό για τη λειτουργία του. Η αρχική του μορφή είναι ως διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II [93], η οποία έχει σχήμα καμπάνας και αποτελείται από 212 αμινοξέα [88]. Έχει διπλή δράση, όχι μόνο ως συνδέτης (ligand), αλλά και ως υποδοχέας [89]. Ο δεύτερος τύπος του TNF-α είναι η διαλυτή μορφή του (sTNF), η οποία προκύπτει από το κόψιμο (cleavage) της διαμεμβρανικής μορφής από το ένζυμο μεταλλοπρωτεϊνάση TACE (ADAM17) [88] και αποτελείται από 157 αμινοξέα. Και οι 2 μορφές του TNF-α συμμετέχουν στη φλεγμονή [89].



Εικόνα 5: Η ομοτριμερής πρωτεΐνη TNF-α [92]

Ο TNF-α δρα μέσω 2 μεμβρανικών υποδοχέων, του TNFR1 (TNFRS1A) και του TNFR2 (TNFRS1B), οι οποίοι είναι τριμερείς πρωτεΐνες [88] και περιέχουν στην εξωκυττάρια περιοχή τους 4 επαναλήψεις περιοχών πλούσιων σε κυστεΐνη, που είναι απαραίτητες για τη σύνδεση του TNF [93]. Όπως και ο TNF-α, μπορούν να κοπούν από τη μεμβράνη των κυττάρων και να μετατραπούν σε διαλυτούς υποδοχείς. Ο TNFR1 εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς του οργανισμού [88], ενώ ο TNFR2 κυρίως στα κύτταρα του ανοσοποιητικού, τα T-λεμφοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και σε κάποιους υπότυπους νευρώνων [97].

Οι δράσεις του TNF-α στον ανθρώπινο οργανισμό είναι πολλαπλές και σχετίζονται με την ιστική αναγέννηση αλλά και καταστροφή. Φυσιολογικά ο TNF-α συμμετέχει στην κυτταρική ομοίωση, τη ρύθμιση του ανοσολογικού συστήματος και της άμυνας του οργανισμού, και την προστασία από προσβολή του νευρικού συστήματος. Επιπλέον ελέγχει την επιβίωση των κυττάρων, μέσω της συμμετοχής του στον έλεγχο της απόπτωσης, καθώς και τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. [88] Σημαντικός είναι ο ρόλος του στη φλεγμονή, προάγοντας της παραγωγή

άλλων κυτταροκινών και χημοκινών [98], και συμμετέχοντας στη σηπτική καταπληξία [93]. Επιπλέον συμμετέχει στην παθοφυσιολογία αρκετών νοσημάτων όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ιδιοπαθής φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (Νόσος Chron, Ελκώδης κολίτιδα) και ο καρκίνος [88, 97]. Φαίνεται από μελέτες πως η φυσιολογική ή η παθολογική του δράση, σχετίζεται με τη συγκέντρωσή του [88], και μάλιστα έχει παρατηρηθεί υπερέκφρασή του σε παθολογικές καταστάσεις [97].

A.2.1. ΟΔΟΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ

Ο TNF-α ασκεί τη δράση του συνδεδεμένος στους υποδοχείς του μέσω κάποιων κύριων σηματοδοτικών μονοπατιών.

ΜΕΣΩ ΤΟΥ TNFR1

Τρία κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω του υποδοχέα TNFR1 αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Μέσω των μορίων TRADD και FADD είτε οδηγεί το κύτταρο προς την απόπτωση, είτε ενεργοποιεί την μεταγραφή παραγόντων που συμμετέχουν στη φλεγμονή. [88, 97].

A. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ Nuclear Factor kappa B (NFκB)

Με την πρόσδεση του TNF-α στον TNFR1, αποσπάται ο silencer of death domain (SODD) από την ενδοκυττάρια περιοχή (death domain) του υποδοχέα και ακολουθεί η πρόσδεση του TNFR- associated death domain protein (TRADD). Στη συνέχεια επιστρατεύονται οι παράγοντες serine/threonine kinase kinase receptor interacting protein-1(RIP1), TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) και cellular inhibitors of apoptosis (cIAP1/2) και σχηματίζεται το σύμπλεγμα I (complex I). Μέσω της ενεργοποίησης της mitogen activated protein (MAP) κινάσης κινάσης κινάσης 3 (MEKK-3), φωσφορυλιώνεται ο inhibitor of κB kinase (IKK), ο οποίος φωσφορυλιώνει τον inhibitor of κB (IκB) με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NFκB (μονοπάτι του NFκB). [88, 93, 99]

Ο NFκB είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου και ρυθμίζει πολλαπλές διαδικασίες. Κάποιες από αυτές είναι η φλεγμονή, η ανάπτυξη, η αγγειογένεση και το κυτταρικό stress, ασκώντας έλεγχο στην έκφραση γονιδίων κυτταροκινών, χημοκινών, ρυθμιστές της απόπτωσης, ανοσολογικούς υποδοχείς, μόρια προσκόλλησης και πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου. [88, 93, 99]

B. ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΜΕΣΩ ΤΩΝ ΚΑΣΠΑΣΩΝ

Ένα διαφορετικό σηματοδοτικό μονοπάτι οδηγεί στην απόπτωση μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης-3. Αντί της δημιουργίας του συμπλέγματος I,

παρατηρείται απελευθέρωση του συμπλέγματος TRADD, RIP-1 και TRAF-2, το οποίο συνδέεται με τους παράγοντες Fasn-associated DD protein (FADD) και προκασπάση-8. Το σύμπλεγμα αυτό ονομάζεται σύμπλεγμα II (complex II) και ενεργοποιεί την κασπάση-8, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την κασπάση-3, οδηγώντας το κύτταρο σε απόπτωση. [88, 93, 100, 101]

Γ. ΑΠΟΠΤΩΣΗ/ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ-1 (activator protein-1, AP-1)

Η τελευταία οδός ενδοκυττάριας σηματοδότησης συμβαίνει όταν το σύμπλεγμα των TRADD, RIP-1 και TRAF-2, στρατολογεί την apoptosis signaling kinase-1 (ASK-1), η οποία ενεργοποιεί τις MAP κινάσης κινάσες, MEK-4/6, που στη συνέχεια ενεργοποιούν μέσω φωσφορυλίωσης τις c-Jun N-terminal kinases (JNKs) καθώς και τις p38 MAP κινάσες. Οι JNKs είναι αυτές που θα ενεργοποιήσουν την AP-1, φωσφορυλιώνοντας την περιοχή του cJun. Ο AP-1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος εισέρχεται στον πυρήνα και μπορεί να πυροδοτήσει τη φλεγμονή ή την απόπτωση. [102, 103]

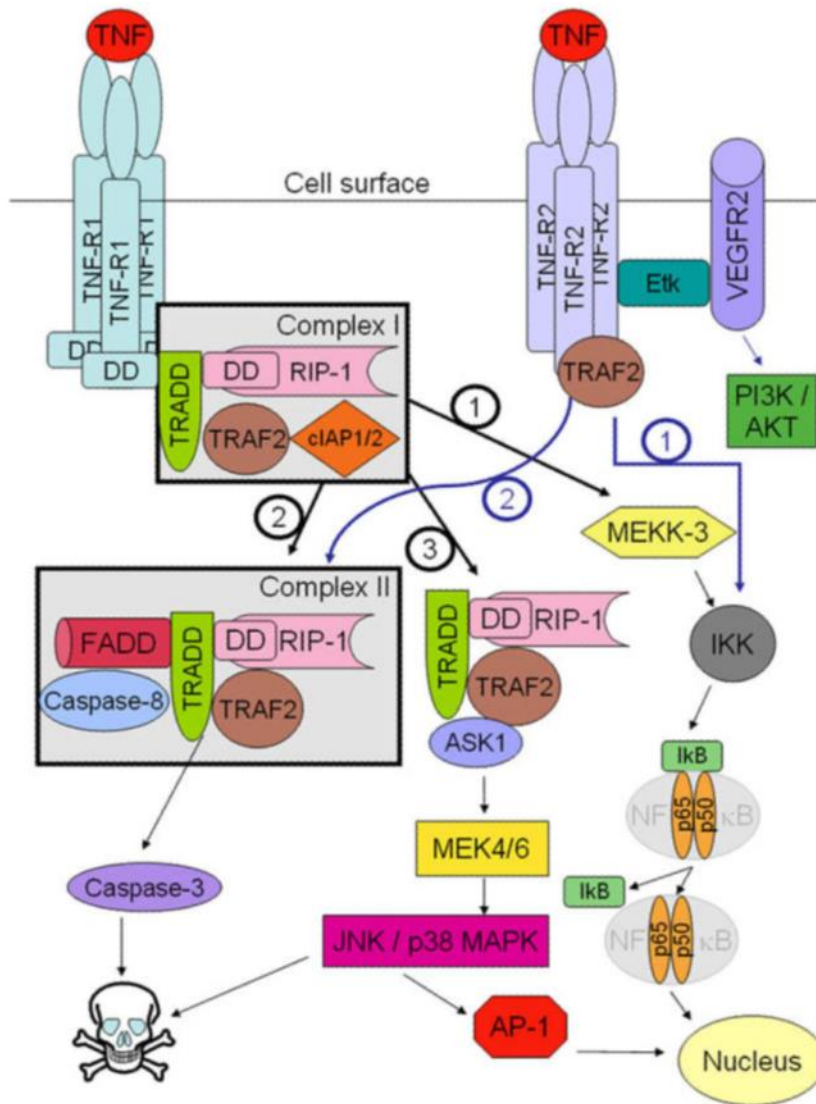
Δ. ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑ ΔΡΑΣΗ

Ο TNF-α μέσω του υποδοχέα του TNFR-1 προάγει την κυτταρική ανάπτυξη, ασκώντας εξωκυττάρια δράσεις μέσω της ενεργοποίησης των εξωκυττάρια ρυθμιστικών κινασών (ERK) και της πρωτεϊνικής κινάσης B (Akt). [104]

ΜΕΣΩ ΤΟΥ TNFR2

Η μοριακή σηματοδότηση μέσω του δεύτερου υποδοχέα του TNF-α δεν έχει μελετηθεί ακόμη με λεπτομέρεια. Η πρόσδεση του TRAF-2 γίνεται απευθείας πάνω στον υποδοχέα, ο οποίος δεν φέρει death domain και οι δράσεις του ασκούνται μέσω των μονοπατιών του TNFR1. Η δράση του TNF-α μέσω του TNFR2 μπορεί να οδηγήσει είτε σε φλεγμονή είτε σε απόπτωση, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί, ότι μέσω του TNFR2 ρυθμίζεται το μοριακό μονοπάτι στο οποίο συμμετέχει ο vascular endothelial growth factor (VEGF), και έτσι ο TNF-α ρυθμίζει την κυτταρική προσκόλληση, τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την κυτταρική επιβίωση. Συγκεκριμένα, ενεργοποιείται η ενδοθηλιακή/επιθηλιακή κινάση της τυροσίνης (Etk), η οποία μέσω του VEGF, ενεργοποιεί το μονοπάτι των phosphoinositide-3-kinase (PI3K) – Akt. [105]



Εικόνα 6: Οι ιδιο σηματοδότησης του TNF-α. [88]

A.2.2. ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ TNF-a ΣΤΟ ΓΥΝΑΙΚΕΙΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ [88]

Ο παράγοντας νέκρωσης όγκου άλφα (TNF-a) φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία αλλά και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα.

Στις ωοθήκες ο παράγοντας νέκρωσης όγκων άλφα συμβάλλει στην ομοιόσταση τους. Ο TNF-a και οι υποδοχείς του εκφράζονται στα ωκύτταρα, τα κοκκώδη καθώς και τα διάμεσα κύτταρα και ίσως έχει αυτοκρινείς και παρακρινείς δράσεις. Μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση του TNF-a εμποδίζει την στεροειδογένεση σε μη διαφοροποιημένες ωοθήκες, αλλά διεγείρει την σύνθεση προγεστερόνης στις διαφοροποιημένες ωοθήκες. Επιπλέον φαίνεται να συμμετέχει στην υποχώρηση του ωχρού σωματίου.

Η συγκέντρωση του TNF-a φαίνεται να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου. Στην αρχή της παραγωγικής φάσης, η έκφραση του TNF-a είναι μειωμένη στα αδένια του ενδομητρίου. Σταδιακά αυξάνεται, φτάνει στη μέγιστη συγκέντρωσή του στο τέλος της παραγωγικής φάσης και μένει αυξημένη σε όλη τη διάρκεια της εκκριτικής φάσης. Η έκφραση του παράγοντα νέκρωσης όγκου άλφα ελέγχεται από τις στεροειδείς ορμόνες και σχετίζεται με την απόπτωση των κυττάρων του ενδομητρίου κατά της έμμηνο ρύση. Επιπλέον συμβάλλει στην αναγέννηση του ενδομητρίου επάγοντας μιτογόνους παράγοντες στα κύτταρα στρώματος.

Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων άλφα (TNF-a) διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια της εγκυμοσύνης, αφού έχει ρυθμιστικό ρόλο κατά τη φθαρτοποίηση και φαίνεται να συμβάλλει στη λεμφαγγειογένεση στην πλακουντιακή κοίτη. Επίσης, εμπλέκεται στη διατήρηση της φυσιολογικής ισορροπίας στην πλακουντιακή τροφοβλάστη ελέγχοντας την απόπτωση. Μία ακόμη σημαντική δράση του TNF-a στην πρώιμη εγκυμοσύνη είναι η συμβολή του στην απόπτωση των λείων μυικών κυττάρων που περιβάλλουν τις σπειροειδείς αρτηρίες του φθαρτού με σκοπό την αύξηση της διαμέτρου τους ώστε να παρέχεται μεγαλύτερη αιματική ροή με την πρόοδο της εγκυμοσύνης.

Τέλος, ο παράγοντας νέκρωσης όγκων άλφα (TNF-a) συμμετέχει στην παθοφυσιολογία διαφόρων γυναικολογικών και μαιευτικών νόσων. Έχει συσχετιστεί με διάφορες καταστάσεις που σχετίζονται με υπογονιμότητα όπως την ενδομητρίωση, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών καθώς και με απόφραξη σαλπίγγων. Επιπλέον μελετάται ο ρόλος του TNF-a στην παθοφυσιολογία των επαναλαμβανόμενων αποβολών, του πρόωρου τοκετού, της προεκλαμψίας και με την υπολειπόμενη ανάπτυξη του εμβρύου.

A.2.3. TNFA ΚΑΙ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ

Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων άλφα (TNF-α) έχει συσχετιστεί σε διάφορες μελέτες με την ενδομητρίωση και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της νόσου, η οποία χαρακτηρίζεται από φλεγμονή στην πύελο, καθώς και με τις τοπικές και συστηματικές εκδηλώσεις της νόσου [106, 107]. Ο φυσιολογικός έμμηνος κύκλος προσομοιάζει αρκετά με φλεγμονώδη διαδικασία και ο TNF-α έχει φυσιολογικό ρόλο στον κύκλο. Παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσής του στην παραγωγική και μείωση στην ωχρινική φάση [108]. Φαίνεται μάλιστα να διευκολύνει την ωορρηξία και τη γονιμοποίηση [108, 109].

Η συγκέντρωση του TNF-α, ειδικά της διαλυτής μορφής (sTNF-α) [110], είναι αυξημένη στο περιτοναϊκό υγρό [106, 111] καθώς και στον ορό των ασθενών με ενδομητρίωση [112]. Παράγεται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, τα NK κύτταρα και τα T1-βοηθητικά λεμφοκύτταρα καθώς και από τα ίδια τα ενδομητριωσικά κύτταρα [113, 114] και συμβάλλει στα κυτταρικά γεγονότα που λαμβάνουν χώρα για την εμφάνιση της ενδομητρίωσης [114, 115]. Οι Bertschi et al, μελέτησαν την έκφραση του στις βλάβες της ενδομητρίωσης και συμπέραναν ότι υπάρχει αυξημένη έκφραση του mRNA του TNF-α σε βλάβες που εντοπίζονται στο ορθοκολπικό διάφραγμα και το περιτόναιο σε σχέση με τον εύτοπο ενδομήτριο καθώς και σε σχέση με τις βλάβες που εντοπίζονται στην ωοθήκη. [112]

Συσχέτιση έχει διαπιστωθεί μεταξύ της συγκέντρωσης του TNF-α και του σταδίου της ενδομητρίωσης καθώς και του επιπέδου άλγους. Οι Scholl et al, διαπίστωσαν αυξημένη συγκέντρωση του παράγοντα στο περιτοναϊκό υγρό ασθενών με σοβαρή δυσμηνόρροια [116]. Επιπλέον χαρακτηριστική είναι η υπερέκφραση του TNF-α στα αρχικά στάδια της νόσου σε σχέση με πιο τα πιο προχωρημένα [110, 116]. Παράλληλα, σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της ενδομητρίωσης παίζουν και οι υποδοχείς του TNF-α, TNFR1 και TNFR2. Οι Salmeri et al, ανίχνευσαν αυξημένη συγκέντρωση διαλυτού TNF-α, TNF-α mRNA και αυξημένα ποσοστά μονοκυττάρων περιτοναϊκού υγρού (PMFC) που φέρουν τον υποδοχέα TNFR1 σε ασθενείς με ελάχιστη (minimal) και ήπια (mild) ενδομητρίωση, γεγονός που οδηγεί στην επιβίωση των μονοκυττάρων και ενίσχυση της φλεγμονώδους απάντησης στα αρχικά στάδια της νόσου. Αντιθέτως, σε προχωρημένα στάδια της νόσου παρατήρησαν αυξημένο ποσοστό μονοκυττάρων που φέρουν τον υποδοχέα TNFR2 και μειωμένη συγκέντρωση διαλυτού TNF-α. Ο TNFR2 ενεργοποιείται από το μεμβρανικό TNF-α και πυροδοτεί την απόπτωση. Ερμήνευσαν τα αποτελέσματα τους, ως την εξήγηση της συνύπαρξης φλεγμονής, αλλά και επιδιορθωτικών φαινομένων που παρατηρούνται στην ενδομητρίωση. [110] Στα ίδια συμπεράσματα κατέληξαν μάλιστα και οι Othman et al. [117]

Τοπικά, η ενδομητρίωση πιθανόν να χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργία των ανοσοποιητικών κυττάρων του περιτοναίου [106, 118]. Η φλεγμονώδης αντίδραση στο περιτόναιο ενεργοποιεί τα κύτταρα του ανοσοποιητικού με αποτέλεσμα την παραγωγή κυτοκινών, αυξητικών και αγγειογενετικών

παραγόντων [106]. Παράλληλα, στην συστηματική κυκλοφορία, η ενεργοποίηση των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος, αυξάνει περαιτέρω την έκκριση TNF-α, IL-6 και VEGF [119]. Ο TNF-α διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και την προσκόλληση των κυττάρων της ενδομητρίωσης στο περιτόναιο, ρυθμίζοντας την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών (matrix metalloproteinase, MMPs) από τον ενδομητριωσικό ιστό, οι οποίες συμβάλλουν στην διείσδυση και αναδιαμόρφωση των εστιών [117, 120]. Επιπλέον διεγείρει την αγγειογένεση [111] και προάγει την παραγωγή άλλων προφλεγμονωδών κυτταροκινών καθώς και επιπλέον TNF-α [121]. Ο κύριος ρόλος του όμως είναι η ενεργοποίηση του καταρράκτη άλλων κυτταροκινών που διεγείρουν την προφλεγμονώδη απάντηση [112].

Διάφορες μελέτες για τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιεί ο παράγοντας νέκρωσης όγκων άλφα και συμβάλλουν στην παθογένεση της ενδομητρίωσης υπάρχουν στη βιβλιογραφία. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι παίζει σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια της νόσου, κατά την εγκατάσταση των βλαβών, μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού του NFκB σε συνέργεια με την ιντερλευκίνη-1 (IL-1), γεγονός που οδηγεί σε αναστολή της απόπτωσης. [110, 122] Το 2016, έπειτα από μελέτη του συμπλέγματος της κινάσης IκB αποδείχθηκε ότι, μετά από την ενεργοποίησή του από τον TNF-α, μπορεί να επηρεάσει την επιβίωση των έκτοπων επιθηλιακών κυττάρων των ενδομητριωσικών βλαβών, αλλά όχι των εύτοπων και των κυττάρων στρώματος του ενδομητρίου [123]. Επιπλέον ο TNF-α, η IL-1 καθώς και ο MIF (macrophage migration inhibitory factor) προάγουν την έκφραση της κυκλοοξυγενάσης 2 (COX2), η οποία ρυθμίζει τη σύνθεση προσταγλανδίνης 2 (PGE2) που συμβάλλει στη φλεγμονή και το άλγος και θεωρείται από τους κύριους ρυθμιστές της ενδομητρίωσης [113, 114].

Λόγω των παραπάνω, πολλές ερευνητικές ομάδες μελέτησαν τον TNF-α και τον υποδοχέα του TNFR1 ως βιοδείκτες για την ενδομητρίωση. Ο TNF-α έχει ειδικότητα 0,72 και ο TNFR1 0,75, γεγονός που δεν τους καθιστά ιδανικούς για βιοδείκτες. [106, 117]

Τέλος, μελέτες έχουν διεξαχθεί για τη χρήση αντί- TNF-α παραγόντων για τη θεραπεία της ενδομητρίωσης. Παλαιότερες μελέτες σε ζώα, έδειξαν ότι η χρήση ανθρώπινης ανασυνδυασμένης δεσμευτικής του TNF-α πρωτεΐνης (rhTBP-1) μείωσε το μέγεθος των βλαβών. [124-126] Δυστυχώς, οι μελέτες στον άνθρωπο δεν είναι επαρκείς και η τελευταία Cochrane μετα-ανάλυση συμπεριέλαβε μόνο μία μελέτη με 21 ασθενείς που χρησιμοποίησαν ινφλιξιμάμπη ως θεραπεία και δεν υπήρξε καμία ένδειξη ότι μειώθηκε ο πνευλικός πόνος ή το στάδιο της νόσου. [121]

A.3. ΜΟΝΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ (single nucleotide polymorphisms, SNPs)

Ο πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου (SNP) είναι η αντικατάσταση μιας αζωτούχας βάσης στο γονιδίωμα που παρατηρείται τουλάχιστον στο 1% του πληθυσμού και είναι μια μορφή μετάλλαξης που συμβάλλει στην ποικιλομορφία του γονιδιώματος μεταξύ των ατόμων. Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί, ερμηνεύουν το 90% των αποκλίσεων μεταξύ των ατόμων και ανιχνεύονται ανά περίπου 300 βάσεις. [127, 128]

Οι πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου μπορούν να ανιχνευθούν σε διάφορες γενετικές θέσεις, όπως τα εξώνια, τα ιντρόνια, σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων (π.χ. εκκινήτες) και στις περιοχές μεταξύ των γονιδίων. Ανάλογα με τη θέση τους, μπορούν να επηρεάζουν ή όχι την έκφραση διαφόρων πρωτεϊνών και πολλές φορές να ευθύνονται για την παθολόγηση νοσημάτων. [129]

Ένα άτομο μπορεί να είναι ομόζυγο για το επικρατές αλληλόμορφο του πολυμορφισμού, ετερόζυγο, ή ομόζυγο για το υπολειπόμενο αλληλόμορφο. Υπολειπόμενο αλληλόμορφο θεωρείται αυτό που ανιχνεύεται σε ποσοστό μικρότερο του 50% σε έναν πληθυσμό. [130]

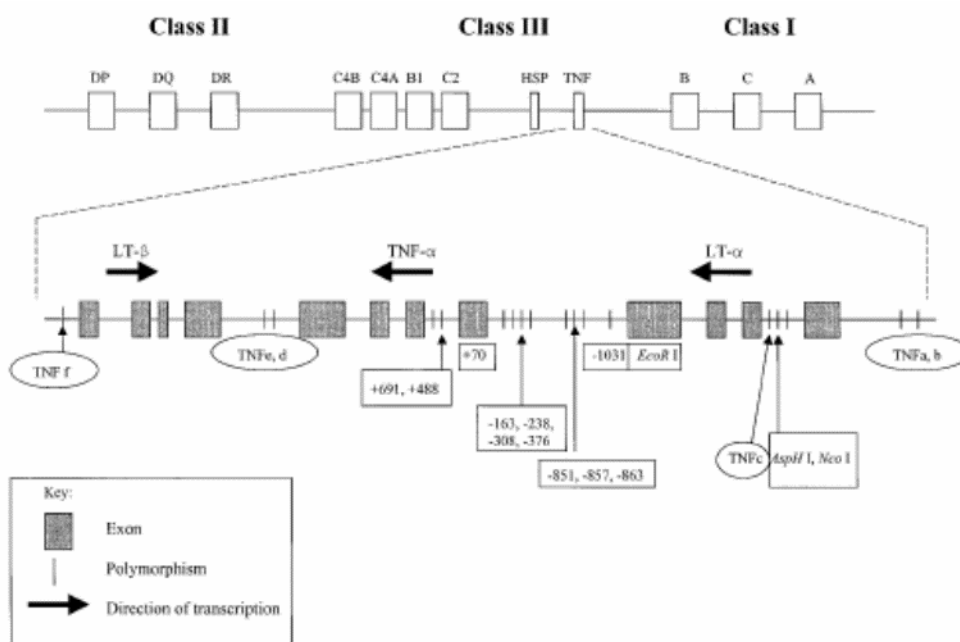
Ένας πολυμορφισμός μπορεί να προέρχεται από μία μετάπτωση (transition) ή μία μεταστροφή (transversion). Μετάπτωση είναι η αντικατάσταση μιας πουρίνης από μια άλλη πουρίνη ή μιας πυριμιδίνης από μια άλλη, ενώ μεταστροφή είναι η αντικατάσταση μια πουρίνης από μια πυριμιδίνη ή το αντίστροφο. [131]

A.3.1. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΟΓΚΟΥ ΑΛΦΑ

Το γονίδιο του TNF-α έχει μελετηθεί αρκετά στη βιβλιογραφία, αφού ο παράγοντας νέκρωσης ογκού άλφα, παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, αλλά και στην παθογένεση πολλών ασθενειών. Πολυάριθμοι πολυμορφισμοί αναφέρονται σε μελέτες και οι περισσότεροι βρίσκονται στο εκκινητή του γονιδίου. Η περιοχή του γονιδιώματος, όπου εδράζεται το γονίδιο του TNF-α, εντός της MHC περιοχής, περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό γονιδίων και θεωρείται από τις πιο πολυμορφικές περιοχές του γονιδιώματος. [132]

Κάποιοι από τους πιο μελετημένους πολυμορφισμούς στον εκκινητή του γονιδίου του παράγοντα νέκρωσης όγκων άλφα, είναι οι εξής:

- 1031T/C
- 857 C/T
- 308 G/A
- 238 A/G
- 863C/A
- 376 T/C



Εικόνα 7: Οι θέσεις των πολυμορφισμών του εκκινητή του TNF-α [132]

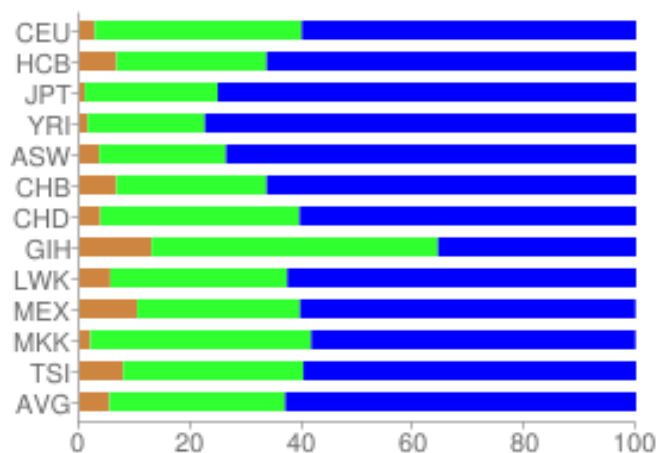
A.3.2. Ο ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ TNF-A -1031T/C

Ο πολυμορφισμός -1031T/C, είναι ένας μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός που προέρχεται από τη μετάπτωση της θυμίνης σε κυτοσίνη. Εδράζεται 1031 βάσεις πριν την μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου του παράγοντα νέκρωσης όγκων άλφα, δηλαδή εντός του εκκινήτη του γονιδίου. Σύμφωνα με μελέτες, το αλληλόμορφο T είναι το επικρατές και το αλληλόμορφο C το υπολειπόμενο, εφόσον εμφανίζεται σε πολύ μικρότερο ποσοστό των πληθυσμών που έχουν μελετηθεί. Ως αποτέλεσμα εμφανίζονται 3 γονοτυποι:

1. Ομόζυγος στο επικρατές αλληλόμορφο: TT
2. Ετερόζυγος: TC
3. Ομόζυγος στο υπολειπόμενο αλληλόμορφο: CC

Ο πολυμορφισμός αναφέρεται στη βάση δεδομένων SNP και έχει την ακόλουθη αλληλουχία:

GGAAGCAAAGGAGAAGCTGAGAAGA[C/T]GAAGGAAAAGTCAGGGTCTG
GAGGG (SNP, NCBI pubmed)



Εικόνα 8: Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται η ποικιλομορφία του πολυμορφισμού σε διάφορους πληθυσμούς σύμφωνα με το HarMap project. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται ο γονότυπος TT, με πράσινο ο γονότυπος TC και με καφέ ο γονότυπος CC. (<https://www.snpedia.com/index.php/Rs1799964>)

Ήδη από τα τέλη του 20^{ου} αιώνα διάφοροι ερευνητές μελέτησαν τη συσχέτιση του πολυμορφισμού -1031T/C στον εκκινήτη του TNF-a με διάφορες παθήσεις.

Ο πολυμορφισμός -1031T/C φαίνεται να σχετίζεται με χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους και ανάμεσα σε αυτές τις ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου. Το C αλληλίο του πολυμορφισμού -1031T/C έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει

ελαφρώς το ρίσκο για την εμφάνιση της νόσου το Crohn. [133] Μάλιστα ο πολυμορφισμός συσχετίζεται με αυξημένες εξωεντερικές εκδηλώσεις της νόσου όπως επισκληρίτιδα, οζώδες ερύθημα και αρθροπάθεια των μεγάλων αρθρώσεων. [134] Το T αλληλίο έχει αποδειχθεί ότι είναι συχνότερο σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα και φαίνεται ότι το C αλληλίο ίσως να έχει προστατευτικό ρόλο ως προς την ελκώδη κολίτιδα. [135]

Μελέτες δείχνουν ότι ο πολυμορφισμός -1031T/C στον εκκινητή του TNF-α σχετίζεται επίσης με κάποιες νόσους του συνδετικού ιστού. Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι μία χρόνια, φλεγμονώδης, αυτοάνοση νόσος, η οποία προσβάλλει κυρίως τις αρθρώσεις, αλλά και άλλα όργανα και φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση της υπάρξεως του πολυμορφισμού και της εμφάνισης της νόσου. [136, 137] Η νόσος Behçet είναι μία συστηματική αγγειίτιδα άγνωστης αιτιολογίας. Το C αλληλίο στη θέση -1031T/C του εκκινητή του TNF-α αυξάνει το κίνδυνο για την εμφάνιση της νόσου. [138] Τέλος, η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα είναι μία πάθηση που χαρακτηρίζεται από φλεγμονή των αρθρώσεων του αξονικού σκελετού και των μεγάλων περιφερικών αρθρώσεων και ανήκει στις φλεγμονώδεις ρευματικές διαταραχές. Οι Chung et al μελέτησαν τη συσχέτιση του πολυμορφισμού με τη νόσο και παρατήρησαν ότι το T αλληλίο παρατηρείται συχνότερα στους ασθενείς. [139]

Οι Sinha et al αναφέρουν συσχέτιση του πολυμορφισμού TNF-α -1031T/C με ρίσκο προσβολής από σοβαρή μαλάρια [140]. Επιπλέον, η εμφάνιση του C αλληλίου συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο νέκρωσης της κεφαλής του μηριαίου κατά τη λοίμωξη με SARS-CoV. [137]

Το C αλληλίο σχετίζεται επίσης με αυξημένο κίνδυνο για αυθόρμητη εν τω βάθει εγκεφαλική αιμορραγία καθώς και με μειωμένη μυϊκή μάζα. [141, 142]

Μελέτες του πολυμορφισμού -1031T/C έχουν γίνει επίσης και για γυναικολογικές παθήσεις. Οι Medikare et al, είχαν σαν αποτέλεσμα στην έρευνά τους ότι οι φορείς του γονοτύπου TC και ιδιαίτερα του C αλληλίου, ήταν σε αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση ινομυώματος. Τα ινομυώματα είναι καλοήθεις όγκοι, που αποτελούνται από διογκωμένες λείες μυϊκές ίνες και ινώδη συνδετικό ιστό και εντοπίζονται στο μυϊκό χιτώνα της μήτρας. Η ερευνητική ομάδα συμπέρανε ότι η αυξημένη έκφραση του TNF-α οδηγεί σε πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών. [143] Μειωμένη συχνότητα του C αλληλίου ανιχνεύθηκε σε ασθενείς με υπερανδρογονισμό. [144] Υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού -1031T/C με τον καρκίνο του μαστού. [145] Τέλος το C αλληλίο φαίνεται να προστατεύει τις ασθενείς από το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών, σύμφωνα με τους Yun et al. [146]

A.4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να εκτιμηθεί η συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού στην θέση -1031 του εκκινητή του παράγοντα νέκρωσης όγκων άλφα (TNF-α) με την εμφάνιση ενδομητρίωσης σε έναν ευρωπαϊκό πληθυσμό. Για τη μελέτη αυτή επιλέχθηκε ένας γυναικείος πληθυσμός που διαγνώστηκε με ενδομητρίωση, έγινε γονοτύπηση στην θέση του μελετώμενου πολυμορφισμού και καταγράφηκαν οι συχνότητες εμφάνισης των αλληλόμορφων. Η συχνότητες αυτές συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες της ομάδας ελέγχου που δεν είχαν ιστορικό ενδομητρίωσης προκειμένου να βρεθεί τυχόν συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ενδομητρίωση.

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1.1. ΥΛΙΚΑ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της της Α΄ Πανεπιστημιακής Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου Αλεξάνδρα. Στη μελέτη συμμετείχαν 51 γυναίκες (μέση τιμή ηλικίας 33,5 έτη, τυπική απόκλιση 6,5 έτη), οι οποίες χειρουργήθηκαν τη χρονική περίοδο 2014-2015 λόγω ενδομητριώματος, στάδιο III ή IV σύμφωνα με τη σταδιοποίηση rASRM και 67 υγιείς γυναίκες (μέση τιμή ηλικίας 43,6 έτη, τυπική απόκλιση 15,3 έτη). Για την απομόνωση του γονιδιακού υλικού, χρησιμοποιήθηκε ιστός από τις ενδομητριωσικές κύστεις των ασθενών, 32 δείγματα από φρέσκο ιστό και 19 δείγματα από ιστό διατηρημένο σε παραφίνη. Τα δείγματα της ομάδας ελέγχου αποτελούνται από περιφερικό αίμα γυναικών με τουλάχιστον μία ολοκληρωμένη εγκυμοσύνη στο ιστορικό τους, καμία αποβολή και χωρίς συμπτώματα ενδομητρίωσης.

B.1.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1.2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ

Για την απομόνωση του DNA από το αίμα των γυναικών που συμπεριλήφθηκαν στην ομάδα ελέγχου, χρησιμοποιήθηκε το PureLink Genomic DNA Kits for purification of genomic DNA της invitrogen by life technologies.

Στην παρούσα μελέτη ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο:

1. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο Eppendorf 1,5 ml τοποθετούνται 200 µl κατεψυγμένου αίματος, 20 µl πρωτεΐνάσης K, 20 µl Rnάσης A
2. Ανάδευση με αυτοματο αναδευτήρα τύπου δίνης (Vortex) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά
3. Προσθήκη 200 µl PureLink Genomic Lysis/ Binding Buffer
4. Ανάδευση με Vortex με σκοπό την ομογενοποίηση του δείγματος. Η χρήση των παραπάνω διαλυμάτων έχει ως σκοπό την απελευθέρωση του γονιδιωµατικού υλικού από τον πυρήνα των λευκών αιμοσφαιρίων, την αποικοδόµηση των πρωτεϊνών και του μονόκλωνου RNA καθώς και την αδρανοποίηση των νουκλεασών.

5. Επώαση σε υδατόλουτρο στους 55° C για 10 λεπτά με σκοπό την πέψη των πρωτεϊνών
6. Προσθήκη 200 µl 96% αιθανόλης
7. Vortex για 5 δευτερόλεπτα
8. Μεταφορά του διαλύματος σε στήλη PureLink Spin Column
9. Φυγοκέντρηση σε στις 12.500 rpm για 1 λεπτό με σκοπό τη δέσμευση του γονιδιωµατικού υλικού στην ειδική µεµβράνη της στήλης
10. Απόρριψη του σωλήνα συλλογής, ο οποίος περιέχει τις πρωτεΐνες και τα µεµβρανικά υπολείµµατα και αντικατάστασή του µε νέο
11. Προσθήκη 500 µl Wash Buffer 1, που συµβάλλει στο ξέπλυµα τυχόν υπολειµµάτων κυτταρικών δοµών και πρωτεϊνών
12. Φυγοκέντρηση της στήλης σε 12.500 rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου
13. Απόρριψη του σωλήνα συλλογής και τοποθέτηση νέου
14. Προσθήκη 500 µl Wash Buffer 2 στη στήλη και φυγοκέντρηση στη µέγιστη ταχύτητα για 3 λεπτά
15. Απόρριψη του σωλήνα συλλογής
16. Τοποθέτηση περιστρεφόμενης στήλης σε Eppendorf 1,5 ml και προσθήκη 50µl elution buffer, το οποίο είναι ειδικό διάλυµα έκπλυσης που εκκλύει το καθαρισµένο DNA από την ειδική µεµβράνη της περιστρεφόμενης στήλης.
17. Φυγοκέντρηση της στήλης στη µέγιστη ταχύτητα (14.000 rpm) για 2 λεπτά.
18. Απόρριψη της στήλης.
19. Το περιεχόµενο του Eppendorf αποτελείται από το αποµονωµένο DNA µέσα σε ρυθµιστικό διάλυµα, το οποίο αποθηκεύεται και διατηρείται στους -20° C

B.1.2.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΙΣΤΟ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗΣ

Για την απομόνωση του DNA από τους ενδομητριωσικούς ιστούς, χρησιμοποιήθηκε το PureLink Genomic DNA Kits for purification of genomic DNA της invitrogen by life technologies.

ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Το πρώτο στάδιο για την απομόνωση DNA από ιστό, περιλαμβάνει τη λύση των κυτταρικών δομών που κρατούν τα κύτταρα ενωμένα καθώς και των ίδιων των κυττάρων του ιστού.

1. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο Eppendorf 1,5ml, τοποθετούνται 20-50mm² ιστού καθώς και 180λ Digestion Buffer. Επιπλέον προστίθενται 20λ πρωτεΐνάσης K, η οποία αποικοδομεί τις πρωτεΐνες και αδρανοποιεί τις νουκλεάσες με σκοπό την προστασία του DNA που θα απελευθερωθεί από τα κύτταρα.
2. Το διάλυμα αναδεύεται για 1 λεπτό σε αυτόματο αναδευτήρα τύπου δίνης (Vortex) και στη συνέχεια επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 55° C για 1,5-2 ώρες για να δράσει το Digestion Buffer και για να προωθηθεί η πέψη των πρωτεϊνών.
3. Τα δείγματα αναδεύονται με Vortex ανά 10-15 λεπτά κατά τη διάρκεια της επώασης.
4. Στη συνέχεια προστίθενται στο διάλυμα 20λ ριβονουκλεάσης A, με σκοπό την αποικοδόμηση τυχόν μονόκλωνου RNA και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
5. 200λ Lysis Buffer προστίθενται στη συνέχεια και έπειτα γίνεται ανάδευση με Vortex για 1 λεπτό για την ομογενοποίηση του μείγματος. Σκοπός είναι η πλήρης διάρρηξη των κυτταροπλασματικών μεμβρανών και των οργανιδίων για να απελευθερωθεί το DNA στο διάλυμα.
6. Για να γίνει κατακρήμνιση του απελευθερωμένου DNA προστίθενται 200λ 96% αιθανόλης και γίνεται ανάδευση σε Vortex για 5 δεύτερα.
7. Μεταφορά του διαλύματος σε περιστρεφόμενη στήλη.

ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

1. Φυγοκέντρηση της στήλης σε 10.000g (12.500 rpm) για 2 λεπτά για έκλυση των πρωτεϊνών και των μεμβρανικών υπολειμμάτων στο σωλήνα συλλογής και δέσμευση του απελευθερωμένου DNA στην ειδική μεμβράνη της περιστρεφόμενης στήλης.
2. Απόρριψη παλαιού σωλήνα συλλογής και τοποθέτηση νέου.
3. Προσθήκη 500λ genomic wash buffer I, ρυθμιστικού διαλύματος που συμβάλει στο ξέπλυμα τυχόν μεμβρανικών ή πρωτεϊνικών υπολειμμάτων.
4. Φυγοκέντρηση της στήλης σε 10.000g (12.500 rpm) για 2 λεπτά.

5. Απόρριψη παλαιού σωλήνα συλλογής και τοποθέτηση νέου.
6. Προσθήκη 500λ genomic wash buffer II.
7. Φυγοκέντρηση της στήλης στη μέγιστη ταχύτητα (14.000 rpm) για 4 λεπτά.
8. Απόρριψη σωλήνα συλλογής

ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ DNA

1. Τοποθέτηση περιστρεφόμενης στήλης σε Eppendorf 1,5 ml και προσθήκη 50λ elution buffer, το οποίο είναι ειδικό διάλυμα έκπλυσης που εκλούει το καθαμένο DNA από την ειδική μεμβράνη της περιστρεφόμενης στήλης.
2. Φυγοκέντρηση της στήλης στη μέγιστη ταχύτητα (14.000 rpm) για 2 λεπτά.
3. Απόρριψη της στήλης.
4. Το περιεχόμενο του Eppendorf αποτελείται από το απομονωμένο DNA μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο αποθηκεύεται και διατηρείται στους -20° C.

B.1.2.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΙΣΤΟ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗΣ ΔΙΑΤΗΡΗΜΕΝΟ ΣΕ ΠΑΡΑΦΙΝΗ

Για την απομόνωση του DNA από τους ιστούς της ενδομητρίωσης που είχαν διατηρηθεί σε παραφίνη, χρησιμοποιήθηκε το PureLink Genomic DNA Kits for purification of genomic DNA της invitrogen by life technologies (invitrogen DNA mini kit).

ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ

1. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο Eppendorf 1,5ml, τοποθετούνται 50mm² ιστού καθώς και 1ml ξυλόλης με σκοπό την απομάκρυνση της παραφίνης από τον ιστό
2. Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα (14.000 rpm) για 3 λεπτά.
3. Αφαίρεση υπερκειμένου.
4. Προσθήκη 1ml 96% αιθανόλης για την απομάκρυνση υπολειμμάτων παραφίνης και ξυλόλης.

5. Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα (14.000 rpm) για 3 λεπτά.
6. Αφαίρεση υπερκλειμένου.
7. Προσθήκη 1ml 96% αιθανόλης.
8. Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα (14.000 rpm) για 3 λεπτά.
9. Αφαίρεση υπερκλειμένου.
10. Τοποθέτηση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 15 λεπτά με ανοιχτό το καπάκι του Eppendorf με σκοπό να εξατμιστεί η αιθανόλη.

Στη συνέχεια ακολουθείται το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση DNA από ιστό ενδομητρίωσης:

ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Το πρώτο στάδιο για την απομόνωση DNA από ιστό, περιλαμβάνει τη λύση των κυτταρικών δομών που κρατούν τα κύτταρα ενωμένα καθώς και των ίδιων των κυττάρων του ιστού.

1. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο Eppendorf 1,5ml, τοποθετούνται 20-50mm² ιστού καθώς και 180λ Digestion Buffer. Επιπλέον προστίθενται 20λ πρωτεΐνάσης K, η οποία αποικοδομεί τις πρωτεΐνες και αδρανοποιεί τις νουκλεάσες με σκοπό την προστασία του DNA που θα απελευθερωθεί από τα κύτταρα.
2. Το διάλυμα αναδεύεται για 1 λεπτό σε αυτόματο αναδευτήρα τύπου δίνης (Vortex) και στη συνέχεια επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 55° C για 1,5-2 ώρες για να δράσει το Digestion Buffer και για να προωθηθεί η πέψη των πρωτεϊνών.
3. Τα δείγματα αναδεύονται με Vortex ανά 10-15 λεπτά κατά τη διάρκεια της επώασης.
4. Στη συνέχεια προστίθενται στο διάλυμα 20λ ριβονουκλεάσης A, με σκοπό την αποικοδόμηση τυχόν μονόκλωνου RNA και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
5. 200λ Lysis Buffer προστίθενται στη συνέχεια και έπειτα γίνεται ανάδευση με Vortex για 1 λεπτό για την ομογενοποίηση του μείγματος. Σκοπός είναι η πλήρης διάρρηξη των κυτταροπλασματικών μεμβρανών και των οργανιδίων για να απελευθερωθεί το DNA στο διάλυμα.
6. Για να γίνει κατακρήμνιση του απελευθερωμένου DNA προστίθενται 200λ 96% αιθανόλης και γίνεται ανάδευση σε Vortex για 5 δεύτερα.
7. Μεταφορά του διαλύματος σε περιστρεφόμενη στήλη.

ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

1. Φυγοκέντρηση της στήλης σε 10.000g (12.500 rpm) για 2 λεπτά για έκλυση των πρωτεϊνών και των μεμβρανικών υπολειμμάτων στο σωλήνα συλλογής και δέσμευση του απλευθερωμένου DNA στην ειδική μεμβράνη της περιστρεφόμενης στήλης.
2. Απόρριψη παλαιού σωλήνα συλλογής και τοποθέτηση νέου.
3. Προσθήκη 500λ genomic wash buffer I, ρυθμιστικού διαλύματος που συμβάλει στο ξέπλυμα τυχόν μεμβρανικών ή πρωτεϊνικών υπολειμμάτων.
4. Φυγοκέντρηση της στήλης σε 10.000g (12.500 rpm) για 2 λεπτά.
5. Απόρριψη παλαιού σωλήνα συλλογής και τοποθέτηση νέου.
6. Προσθήκη 500λ genomic wash buffer II.
7. Φυγοκέντρηση της στήλης στη μέγιστη ταχύτητα (14.000 rpm) για 4 λεπτά.
8. Απόρριψη σωλήνα συλλογής

ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ DNA

1. Τοποθέτηση περιστρεφόμενης στήλης σε Eppendorf 1,5 ml και προσθήκη 50λ elution buffer, το οποίο είναι ειδικό διάλυμα έκπλυσης που εκλύει το καθαρισμένο DNA από την ειδική μεμβράνη της περιστρεφόμενης στήλης.
2. Φυγοκέντρηση της στήλης στη μέγιστη ταχύτητα (14.000 rpm) για 2 λεπτά.
3. Απόρριψη της στήλης.
4. Το περιεχόμενο του Eppendorf αποτελείται από το απομονωμένο DNA μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο αποθηκεύεται και διατηρείται στους -20° C.

B.1.2.4. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μία μέθοδος της βιοχημείας και της μοριακής βιολογίας η οποία χρησιμοποιείται για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA in vitro. Λειτουργεί μέσω της ενζυμικής σύνθεσης αντιγράφων ενός τμήματος DNA γνωστής αλληλουχίας. Αποτέλεσμα της μεθόδου είναι η παραγωγή μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας και μας δίνει τη δυνατότητα να τη μελετήσουμε.

Αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην PCR:

1. Ζεύγος εκκινητών (forward and reverse primer)

Οι εκκινητές είναι συμπληρωματικοί ως προς τα 5' και 3' άκρα της διπλής έλικας του τμήματος DNA και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος της PCR. Σε αυτούς προσδένεται η Taq πολυμεράση.

2. Taq DNA πολυμεράση

Έχει τη δραστικότητα της 5' → 3' πολυμεράσης και τη δραστικότητα της 5' → 3' εξωνουκλεάσης, αλλά στερείται την 3' → 5' εξωνουκλεολυτική δραστικότητα με αποτέλεσμα να μην έχει επιδιορθωτική δράση.

3. 5'- τριφωσφορικά 2'- δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)
4. Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer)

Είναι απαραίτητο γιατί διασφαλίζει τις ιδανικές συνθήκες για τη δράση της DNA πολυμεράσης.

5. Χλωριούχο Μαγνήσιο (MgCl₂)

Συμβάλλει επίσης στη δραστικότητα της Taq πολυμεράσης.

6. Μόριο DNA προς αντιγραφή

Τα στάδια της PCR είναι τα ακόλουθα:

1. Στάδιο αποδιάταξης

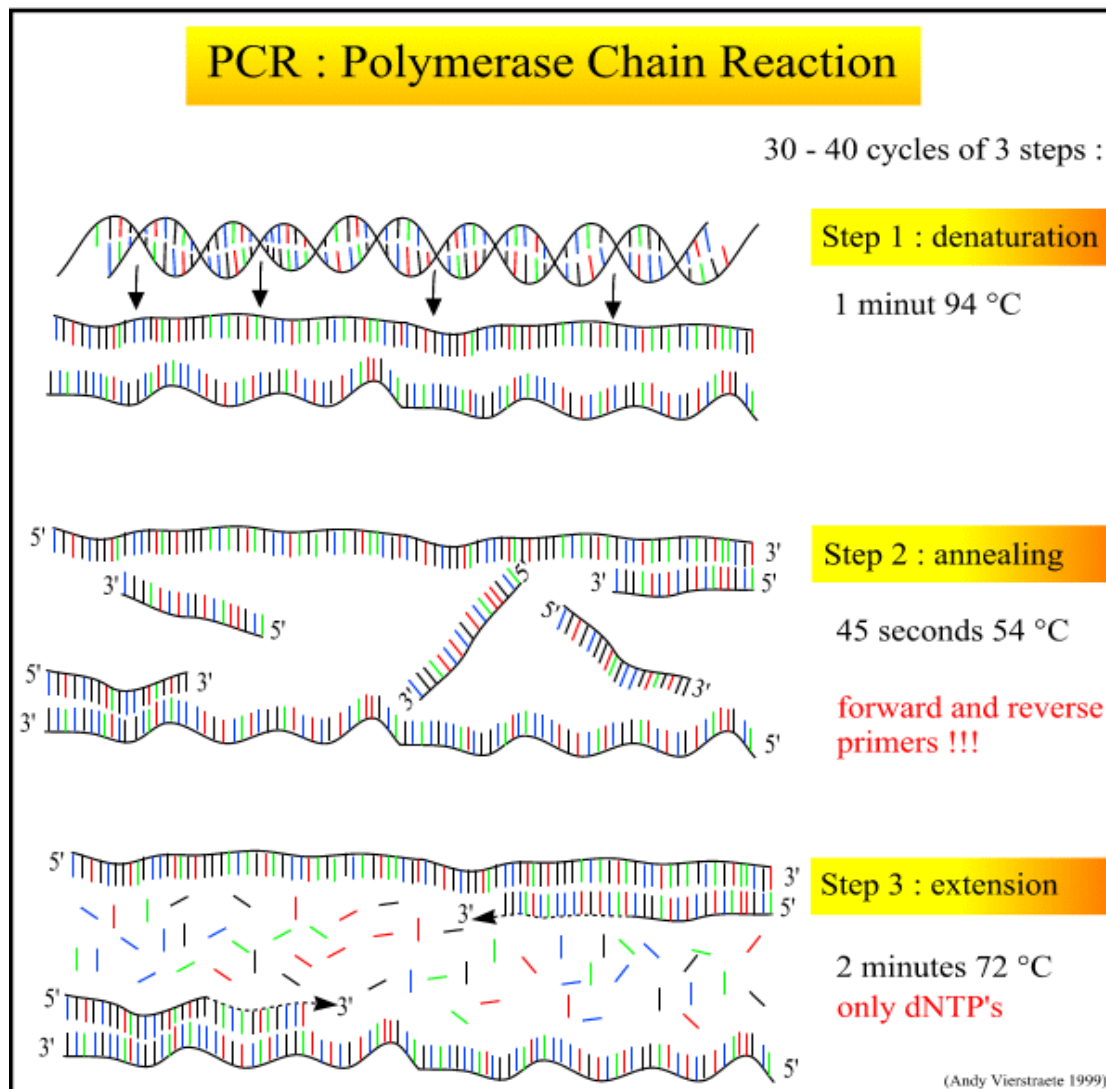
Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται με τη θέρμανση του μείγματος της PCR στους 95°C. Στη θερμοκρασία αυτή το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται.

2. Στάδιο υβριδισμού των εκκινητών

Έπειτα από το διαχωρισμό των συμπληρωματικών αλυσίδων η θερμοκρασία μειώνεται σε συγκεκριμένο επίπεδο ανάλογα με τους εκκινητές. Με αυτό τον τρόπο υβριδοποιούνται στις συμπληρωματικές αλληλουχίες των αλυσίδων του DNA, εκατέρωθεν της προς μελέτη αλληλουχίας.

3. Στάδιο επιμήκυνσης

Στους 72 °C, η Taq πολυμεράση που έχει δράση 5'-3' πολυμεράσης, χρησιμοποιεί τα dNTPs ώστε να δημιουργήσει μία νέα πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα.



Εικόνα 9: Στην παραπάνω εικόνα απεικονίζονται σχηματικά τα στάδια της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω ζεύγος εκκινητών που έχουν μήκος 20 βάσεις και παράγουν ένα προϊόν PCR 264 ζευγών βάσεων (264 bp) για την ανίχνευση του TNF- α -1031T/C πολυμορφισμού.

TNFS: 5'- TATGTGATGGACTCACCCAGG-3', Tm 57,3°C

TNFA: 5'- CCTCTACATGGCCCTGTCTT-3', Tm 59,4°C

Οι primers είχαν αρχική συγκέντρωση 100 pmol/μl και αραιώθηκαν σε τελική συγκέντρωση 10 pmol/μl. Ως θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών (Tm) χρησιμοποιήθηκαν οι 57°C, η θερμοκρασία δηλαδή του εκκινητή με τη χαμηλότερη θερμοκρασία.

Το πρωτόκολλο της συμβατικής PCR που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου του TNF- α περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

1. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρωσης των 0,5 mL προσθέτουμε:
 - A. 2,5μl 10X PCR Buffer minus Mg²⁺
 - B. 1,5 μl 50 mM MgCl₂
 - Γ. 1μl 10 mM dNTP mixture
 - Δ. 1μl Primer Sense mix και 1μl Primer Antisense mix
 - E. 2 μl Template DNA
 - Στ. 0,3 μl *Taq* DNA polymerase
 - Z. 15,7 μl απεσταγμένο νερό.

Η ενίσχυση με PCR πραγματοποιήθηκε σε όγκο 20μl για κάθε δείγμα.

2. Τοποθετούμε τα σωληνάρια στον θερμικό κυκλοποιητή, ο οποίος έχει τη δυνατότητα να εναλλάσει την θερμοκρασία στιγμιαία και να τη διατηρεί, και επωάζουμε για 10 λεπτά στους 95°C για να ενεργοποιηθεί η *Taq* πολυμεράση.
3. Στάδιο αποδιάταξης στους 95°C για 1 λεπτό
4. Στάδιο υβριδισμού των εκκινητών στους 57°C για 1 λεπτό
5. Στάδιο επιμήκυνσης στους 72°C για 1 λεπτό
6. Επανάληψη των παραπάνω σταδίων (2-5) για 35 κύκλους
7. Επώαση των σωληναρίων στους 72°C για 10 λεπτά

8. Διατήρηση στους 4° C
9. Αποθήκευση των δειγμάτων στους -20° C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.



Εικόνα 10: Ο θερμικός κυκλοποιητής του εργαστηρίου Αναπαραγωγικής Ιατρικής του Νοσοκομείου Αλεξάνδρα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη

B.1.2.5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ (Agarose gel electrophoresis)

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι μία μέθοδος της μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και την αδρή ποσοτικοποίηση ενός ενισχυμένου τμήματος DNA. Τα μόρια DNA είναι αρνητικά φορτισμένα μόρια, λόγω των φωσφορικών ομάδων που υπάρχουν στον φωσφοδιεστερικό σκελετό, επομένως αν βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο κινούνται προς το θετικά φορτισμένο πόλο. Σε αυτή την αρχή βασίζεται η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης, κατά την οποία τα μόρια DNA διαχωρίζονται ανάλογα με το ρυθμό της μετακίνησης τους μέσα σε μία πηκτή (gel) κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Ο ρυθμός μετακίνησης εξαρτάται από το μέγεθος και τη δομή των μορίων, την πυκνότητα της πηκτής και την ισχύ του ηλεκτρικού πεδίου.

Στην παρούσα μελέτη, η ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται για την οπτικοποίηση του αποτελέσματος της PCR (post-PCR analysis) αλλά και στη συνέχεια, έπειτα από τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου BbsI στο προϊόν της PCR για την ανίχνευση του προς μελέτη πολυμορφισμού (γονοτύπηση).

Η πηκτή που χρησιμοποιήθηκε κατά τη μελέτη ήταν πηκτή αγαρόζης 3%. Η αγαρόζη είναι ένας φυτικός πολυσακχαρίτης, ο οποίος ρευστοποιείται στους 100°C και στερεοποιείται στους 45°C, σχηματίζοντας το πορώδες gel που χρησιμοποιείται κατά την ηλεκτροφόρηση. Για την προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης 3%, 3gr αγαρόζης αναμιγνύονται με 100ml TBE buffer (tris-borate-EDTA) και στη συνέχεια προστίθενται 10μL βρωμιούχο αιθίδιο, συγκέντρωσης 5mg/ml.

Πριν την τοποθέτηση των δειγμάτων στις ειδικές εσοχές του gel, αναμιγνύονται με τη χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης (4μl). Από τα προϊόντα της PCR, χρησιμοποιήθηκαν 6μl και από τα δείγματα έπειτα από την επώαση με το περιοριστικό ένζυμο 10μl. Από το μάρτυρα των DNA τμημάτων γνωστού μεγέθους τοποθετούνται 2μl. Το ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζεται έχει τάση 5V/cm.

Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης διαβάζεται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας, όπου τα τμήματα DNA εμφανίζονται ως φωτεινές ζώνες με τη βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου που είναι φθορίζουσα χρωστική.

B.1.2.6. ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΗ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που έχουν την ιδιότητα να τέμνουν το DNA σε συγκεκριμένες θέσεις, οι οποίες αποτελούνται από συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων μικρού μεγέθους. Προέρχονται από βακτήρια, όπου η φυσιολογική τους λειτουργία είναι η διάσπαση του DNA παθογόνων οργανισμών, ως αμυντικός μηχανισμός. Από την ανακάλυψη τους το 1965, χρησιμοποιούνται πλέον ευρέως στη μοριακή βιολογία για τη μελέτη του DNA, αφού πλέον υπάρχει η δυνατότητα να παραχθούν μαζικά στο εργαστήριο σαν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες.

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο Bbs-I. Το όνομα του μας πληροφορεί για την προέλευση του ενζύμου. Προέρχεται από το βακτήριο *Bacillus Brevis* και είναι το πρώτο περιοριστικό ένζυμο που αναγνωρίστηκε στο συγκεκριμένο βακτήριο. Ανήκει στα περιοριστικά ένζυμα τύπου IIs, γεγονός που δείχνει ότι η θέση περιορισμού είναι εντός της αλληλουχίας αναγνώρισης και τα θραύσματα που παράγονται είναι μονόκλινα με προεξέχοντα άκρα (sticky ends).

Η θέση περιορισμού του Bbs-I φαίνεται παρακάτω:

5'-GAAGACNN -3'

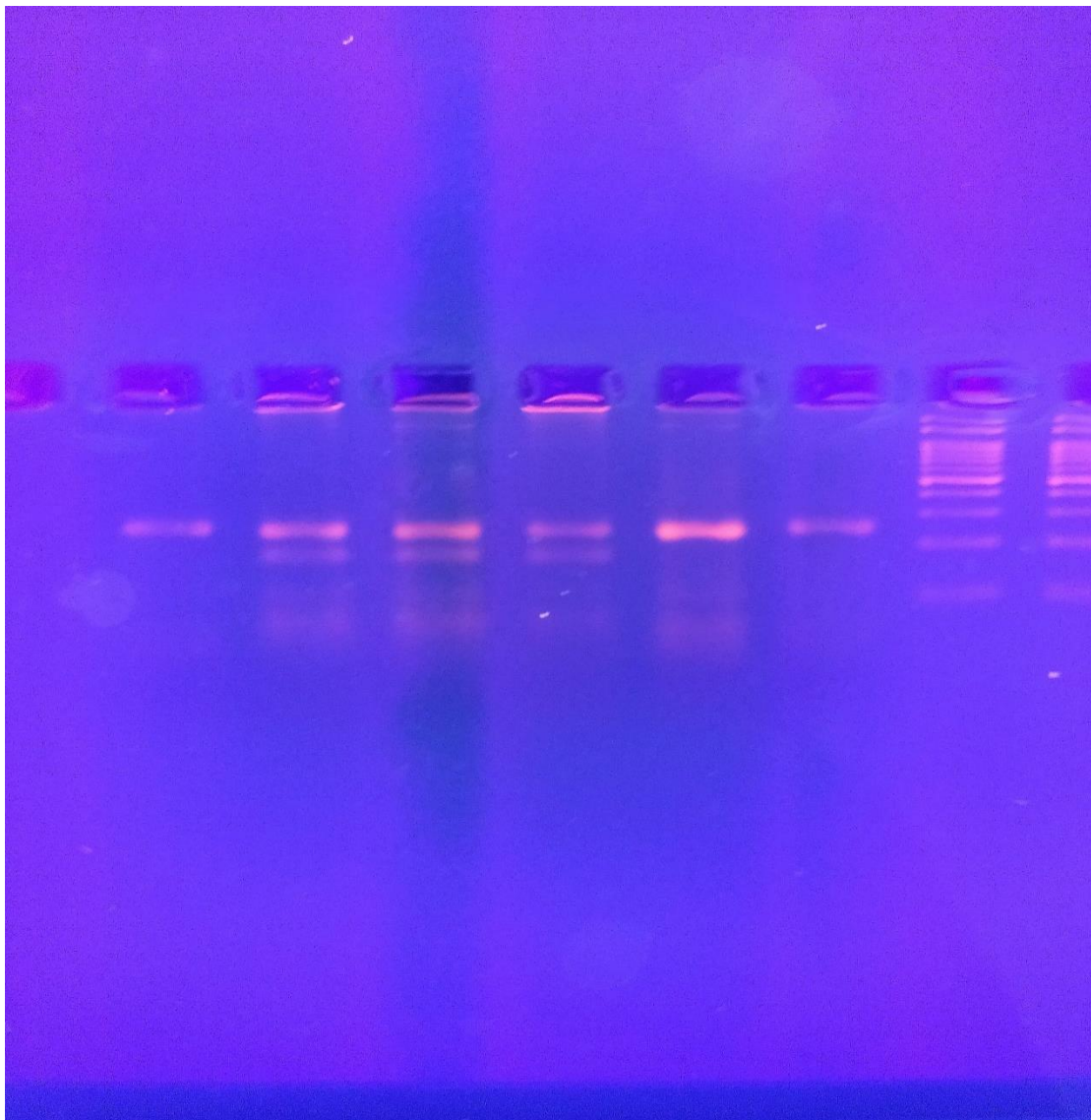
3'-CTTCTGNNNNNN-5'

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ακόλουθο:

1. Τοποθέτηση των προϊόντων της PCR στους 65°C για 20 λεπτά για απενεργοποίηση
2. Σε αποστειρωμένο σωλήνα Eppendorf, τοποθετούνται 2μl Buffer, 2μl του ενζύμου Bbs-I και 6μl αποστειρωμένο νερό
3. Στο μείγμα προστίθενται 10μl από το προϊόν της PCR, με αποτέλεσμα τελικό όγκο 20μl
4. Ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο στους 40°C για 24 ώρες
5. Ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης 3% για την ανάγνωση των αποτελεσμάτων έπειτα από τη δράση του περιοριστικού ενζύμου

B.1.2.7. ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων μετά από πέψη με το ένζυμο Bbs-I δίνει στην ηλεκτροφόρηση διαφορετικά πρότυπα για τους 3 γονότυπους, CC, TC και TT. Στο ενισχυμένο τμήμα του DNA με το αλληλόμορφο T, αναγνωρίζεται μία θέση κοπής και έτσι στην ηλεκτροφόρηση απεικονίζεται 1 θραύσμα 251 ζευγών βάσεων (251bp). Το δεύτερο θραύσμα αποτελείται από 13 ζεύγη βάσεων και δεν είναι ορατό σε γέλη αгарόζης 3%. Επί παρουσίας του αλληλόμορφου C, αναγνωρίζονται 2 θέσεις κοπής με αποτέλεσμα 3 θραύσματα, 180, 71 και 13 ζευγών βάσεων. Σε περίπτωση ετεροζυγωτίας TC αναγνωρίζονται στην ηλεκτροφόρηση 3 ζώνες, 251, 180 και 71 ζευγών βάσεων.



Εικόνα 11: Γέλη αгарόζης στην οποία έχουν ηλεκτροφορηθεί τα ενισχυμένα τμήματα DNA έπειτα από επώασή τους με το περιοριστικό ένζυμο Bbs I. Στην πρώτη θέση της γέλης παρατηρείται μία ζώνη των 251 βάσεων, δηλαδή είναι ομόζυγο στο φυσιολογικό TT. Στη δεύτερη θέση παρατηρούνται 2 ζώνες των 251 και 180 βάσεων, δηλαδή ετερόζυγο στον πολυμορφισμό TC.

B.2. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για την παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με τη βοήθεια του λογισμικού SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 23). Υπολογίστηκε επιπλέον η ισορροπία Hardy-Weinberg (Hardy-Weinberg equilibrium) με τη βοήθεια του λογισμικού που διατίθεται δωρεάν από το Ινστιτούτο Ανθρώπινης Γενετικής του Μονάχου (<https://ihg.gsf.de/>).

Για τον υπολογισμό της στατιστικής σημαντικότητας της διαφοράς κατανομής των συχνοτήτων μεταξύ των ασθενών και της ομάδας ελέγχου, χρησιμοποιήθηκε, ως κριτήριο συσχέτισης ποιοτικών χαρακτηριστικών, το Fisher's exact test, επειδή ο αριθμός των δειγμάτων δεν είναι μεγάλος και εμφανίζεται συχνότητα που είναι μικρότερη από το 5. Το Fisher's exact test είναι ένα μη παραμετρικό τεστ ελέγχου υποθέσεων που υπολογίζει με ακρίβεια τη στατιστική σημαντικότητα μιας διαφοράς, σε αντίθεση με το χ^2 που την προσδιορίζει κατά προσέγγιση. Με την παραπάνω στατιστική δοκιμασία, υπολογίστηκε το p-value, το οποίο μας καθορίζει ένα αποτέλεσμα στατιστικά σημαντικό όταν είναι μικρότερο του 0,05, δηλαδή στο επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 95%.

Υπολογίστηκε επιπλέον ο σχετικός λόγος (odds ratio) μεταξύ της εξαρτημένης μεταβλητής της παρούσας έρευνας, η οποία είναι η ύπαρξη ή όχι ενδομητρίωσης, με την ανεξάρτητη μεταβλητή, η οποία είναι οι γονότυποι του πολυμορφισμού TNF- α -1031T/C. Τιμή του σχετικού λόγου μεγαλύτερη της μονάδας δηλώνει επιβαρυντικό παράγοντα, τιμή μικρότερη της μονάδας δηλώνει προστατευτικό παράγοντα και ίση με τη μονάδα, απουσία συσχέτισης.

Η ισορροπία Hardy-Weinberg (Hardy-Weinberg equilibrium) είναι το βασικό θεώρημα της στατιστικής των πληθυσμών, το οποίο χρησιμοποιείται στην στατιστική ανάλυση των γονιδιακών μελετών. Αποδεικνύει αν το δείγμα και τα αποτελέσματα της μελέτης είναι αντιπροσωπευτικά για τον γενικό πληθυσμό. Η αρχή βασίζεται στο ότι οι γονότυποι κατανέμονται ανάλογα με τις συχνότητες των ατομικών αλληλομόρφων στον πληθυσμό και παραμένουν σταθεροί ανά τις γενεές, αν οι διασταυρώσεις στον πληθυσμό είναι τυχαίες, χωρίς την επίδραση εξελικτικών παραγόντων, όπως μετάλλαξη, μετανάστευση ή επιλογή. Ο νόμος Hardy-Weinberg αναφέρει ότι σε μεγάλους και τυχαία διασταυρούμενους πληθυσμούς, οι γονοτυπικές συχνότητες θα είναι p^2 , $2pq$ και q^2 . Σύμφωνα με την ισορροπία Hardy-Weinberg, εάν p είναι η συχνότητα του ενός αλληλομόρφου και q η συχνότητα του δεύτερου το άθροισμα των γονοτυπικών συχνοτήτων θα είναι ίσο με ένα $p^2+2pq+q^2 = 1$. Δηλαδή οι γονοτυπικές και αλληλομορφικές συχνότητες είναι αμετάβλητες και αρκεί μία γενιά τυχαίων διασταυρώσεων για να επιτευχθεί η ισορροπία. Με αυτό τον τρόπο συνδέονται οι αλληλικές με τις γονοτυπικές συχνότητες. [147]

Στις μελέτες ασθενών-μαρτύρων είναι σημαντική η σύγκριση των συχνοτήτων των γονοτύπων και των αλληλίων με τις αναμενόμενες συχνότητες που υπολογίζονται με τη βοήθεια της ισορροπίας Hardy-Weinberg. Ο

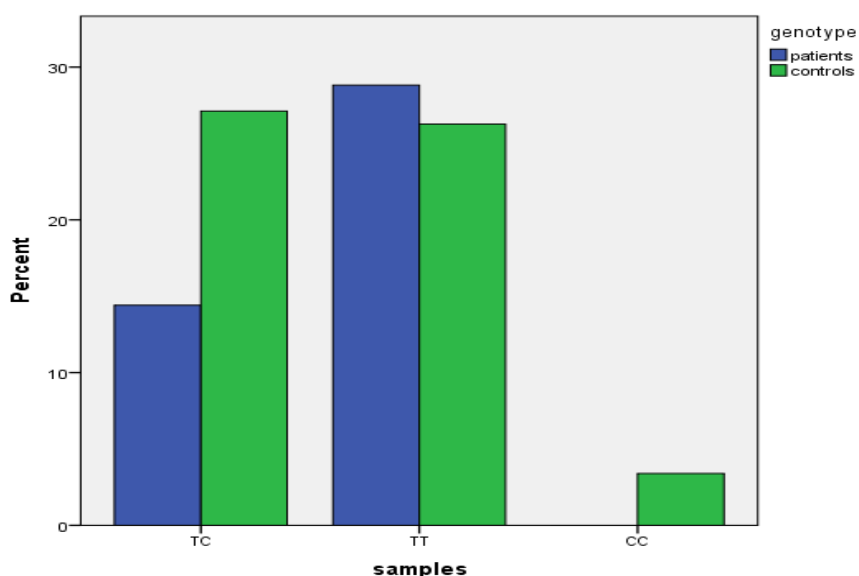
υπολογισμός της στατιστικής σημαντικότητας της διαφοράς μεταξύ των αναμενόμενων και των συχνοτήτων της μελέτης, λειτουργεί ως μέτρο απόκλισης από την ιδεατή κατάσταση του πληθυσμού. Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς υπολογίζεται με τη βοήθεια της στατιστικής δοκιμασίας chi-square (χ^2). Η μη στατιστικά σημαντική απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ομάδα ελέγχου, εφόσον πρέπει να είναι αντιπροσωπευτική του γενικού πληθυσμού.

B.2.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη συλλέχθηκαν δείγματα γενετικού υλικού, από ένα πληθυσμό γυναικών με ενδομητρίωση καθώς και από γόνιμες ασθενείς χωρίς τη διάγνωση της νόσου και μελετήθηκαν οι γονοτυπικές συχνότητες του πολυμορφισμού στον εκκινητή του παράγοντα νέκρωσης όγκων άλφα (TNF- α), -1031T/C. Χρησιμοποιήθηκε γενετικό υλικό που απομονώθηκε από ιστό ενδομητριωσικών κυστών ωοθήκης από 51 ασθενείς και από περιφερικό αίμα 67 γυναικών οι οποίες είχαν τουλάχιστον ένα παιδί μετά από φυσιολογική σύλληψη.

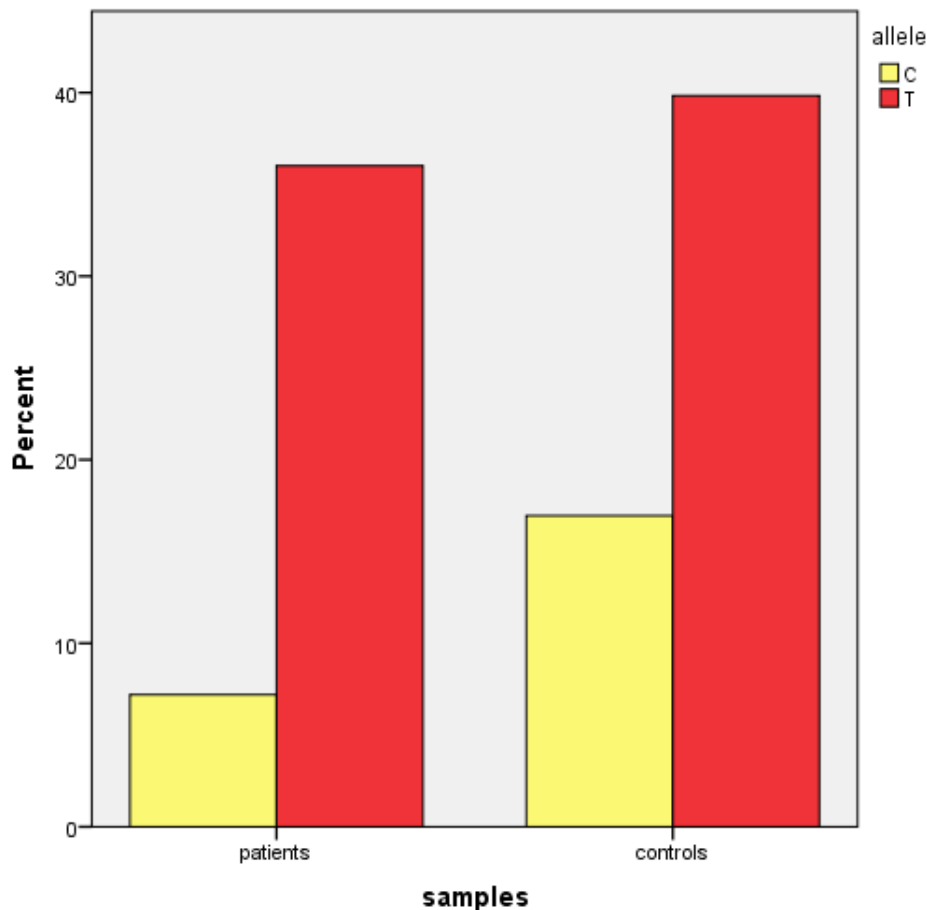
Έπειτα από τη γονοτύπηση των δειγμάτων για τον πολυμορφισμό -1031T/C καταδείχθηκαν 3 διαφορετικοί γονότυποι στον υπό μελέτη πληθυσμό. Ο γονότυπος TNF- α -1031TT, δηλαδή γυναίκες οι οποίες είναι ομόζυγες για το φυσιολογικό αλληλόμορφο (wild type allele), ο γονότυπος TNF- α -1031TC δηλαδή γυναίκες οι οποίες είναι ετερόζυγες για τον πολυμορφισμό και ο γονότυπος TNF- α -1031CC, δηλαδή γυναίκες οι οποίες είναι ομόζυγες στον πολυμορφισμό.

Από την ομάδα των ασθενών, οι οποίες διαγνώστηκαν χειρουργικά με ενδομητριωσική κύστη, παρατηρήθηκαν 34 (66,7%) γυναίκες ομόζυγες για το φυσιολογικό αλληλόμορφο TT, 17 (33,3%) γυναίκες ετερόζυγες για τον πολυμορφισμό με γονότυπο TC και 0 (0%) γυναίκες ετερόζυγες για τον πολυμορφισμό με γονότυπο CC. Στην ομάδα ελέγχου ανιχνεύθηκαν 31 (46,3%) γυναίκες ομόζυγες για το φυσιολογικό αλληλόμορφο με γονότυπο TT, 32 (47,7%) γυναίκες ετερόζυγες για τον πολυμορφισμό, με γονότυπο TC και 4 (6%) γυναίκες ομόζυγες για τον πολυμορφισμό με γονότυπο CC.



Εικόνα 12: Στο παραπάνω ραβδόγραμμα απεικονίζονται οι γονοτυπικές συχνότητες σε μορφή ποσοστών που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα μελέτη. Με μπλε χρώμα απεικονίζονται οι ασθενείς και με πράσινο η ομάδα ελέγχου.

Υπολογίστηκαν επιπλέον οι συχνότητες εμφάνισης των αλληλομόρφων T και C στις ομάδες των ασθενών και ελέγχου. Το αλληλόμορφο T εμφανίζεται με συχνότητα 83,3% στην ομάδα των ασθενών με ενδομητρίωση, ενώ το αλληλόμορφο C με συχνότητα 16,7%. Στην ομάδα ελέγχου παρατηρήθηκε με συχνότητα 70,1% το αλληλόμορφο T και με συχνότητα 29,9% το αλληλόμορφο C.



Εικόνα 13: Στο παραπάνω ραβδόγραμμα απεικονίζονται οι ποσοστιαίες συχνότητες των αλληλομόρφων που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα μελέτη. Με κίτρινο χρώμα εμφανίζεται το αλληλίο C και με κόκκινο χρώμα το αλληλίο T.

Πίνακας 1: Συγκεντρωτικός πίνακας κατανομής γονοτύπων και αλληλομόρφων του πολυμορφισμού TNF- α -1031T/C στις ασθενείς με ενδομητρίωση και στην ομάδα ελέγχου

	Controls		Patients				
Genotypes	<i>N=67</i>	%	<i>N=51</i>	%	<i>p-value</i>	<i>OR</i>	<i>95% CI</i>
<i>TT</i>	31	46.3%	34	66.7%	0.032		
<i>TC</i>	32	47.7%	17	33.3%		0.48	(0,22, 1,03)
<i>CC</i>	4	6%	0	0%		-	-
Alleles							
<i>T</i>	94	70.1%	85	83.3%	0.021		
<i>C</i>	40	29.9%	17	16.7%		0.47	(0,24, 0,89)

Σύμφωνα με τον πίνακα κατανομής συχνότητων των γονοτύπων, ο γονότυπος TNF- α -1031TT παρατηρείται συχνότερα στην ομάδα των ασθενών που έχουν διαγνωσθεί με ενδομητρίωση, ενώ ο γονότυπος TNF- α -1031TC καθώς και ο γονότυπος TNF- α -1031CC σε γυναίκες της ομάδας ελέγχου. Έπειτα από την εφαρμογή του στατιστικού κριτηρίου Fisher's exact test, διαπιστώνεται ότι η αυξημένη συχνότητα του γονότυπου TNF- α -1031TT στις γυναίκες με ενδομητρίωση και του γονότυπου TNF- α -1031TC και -1031CC στις υγιείς γόνιμες γυναίκες είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο σημαντικότητας 95%. Η τιμή *p-value* που υπολογίστηκε είναι 0.032.

Στους ακόλουθους πίνακες (2,3) από το στατιστικό λογισμικό SPSS απεικονίζονται οι συχνότητες των γονοτύπων του πολυμορφισμού καθώς και τα αποτελέσματα της στατιστικής δοκιμασίας Fisher's exact test.

Πίνακας 2: **samples * genotype Crosstabulation**

			genotype		Total
			patients	controls	
samples	TC	Count	17	32	49
		% within samples	34,7%	65,3%	100,0%
		% within genotype	33,3%	47,8%	41,5%
		% of Total	14,4%	27,1%	41,5%
	TT	Count	34	31	65
		% within samples	52,3%	47,7%	100,0%
		% within genotype	66,7%	46,3%	55,1%
		% of Total	28,8%	26,3%	55,1%
	CC	Count	0	4	4
		% within samples	0,0%	100,0%	100,0%
		% within genotype	0,0%	6,0%	3,4%
		% of Total	0,0%	3,4%	3,4%
Total	Count	51	67	118	
	% within samples	43,2%	56,8%	100,0%	
	% within genotype	100,0%	100,0%	100,0%	
	% of Total	43,2%	56,8%	100,0%	

Πίνακας 3: **Chi-Square Tests**

	Value	Df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	6,684 ^a	2	,035	,032		
Likelihood Ratio	8,174	2	,017	,023		
Fisher's Exact Test	6,306			,032		
Linear-by-Linear Association	,676 ^b	1	,411	,502	,256	,095
N of Valid Cases	118					

a. 2 cells (33,3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,73.

b. The standardized statistic is -,822.

Σύμφωνα με τον πίνακα κατανομής συχνοτήτων των αλληλομόρφων T και C, συμπεραίνεται ότι το αλληλόμορφο T παρατηρείται συχνότερα στις ασθενείς με ενδομητρίωση από ότι στην ομάδα ελέγχου (83,3% vs 70,1%). Επιπλέον το αλληλόμορφο C εμφανίζεται συχνότερα στις γυναίκες της ομάδας ελέγχου σε σχέση με τις ασθενείς με ενδομήτριομα (29,9% vs 16,7%). Εφαρμόζοντας το στατιστικό κριτήριο χ^2 , προκύπτει ότι αυτή η διαφορά μεταξύ της συχνότητας των αλληλομόρφων στην ομάδα των ασθενών και στην ομάδα ελέγχου είναι στατιστικά σημαντική. Το p-value που υπολογίστηκε είναι 0,021.

Στους παρακάτω πίνακες (4,5) από το λογισμικό στατιστικής SPSS απεικονίζεται η κατανομή συχνοτήτων των αλληλομόρφων T και C καθώς και τα αποτελέσματα της στατιστικής δοκιμασίας Fisher's exact test.

Πίνακας 4: *allele * samples Crosstabulation*

			samples		Total
			patients	controls	
Allele C	Count	17	40	57	
	% within allele	29,8%	70,2%	100,0%	
	% within samples	16,7%	29,9%	24,2%	
	% of Total	7,2%	16,9%	24,2%	
T	Count	85	94	179	
	% within allele	47,5%	52,5%	100,0%	
	% within samples	83,3%	70,1%	75,8%	
	% of Total	36,0%	39,8%	75,8%	
Total	Count	102	134	236	
	% within allele	43,2%	56,8%	100,0%	
	% within samples	100,0%	100,0%	100,0%	
	% of Total	43,2%	56,8%	100,0%	

Πίνακας 5: **Chi-Square Tests**

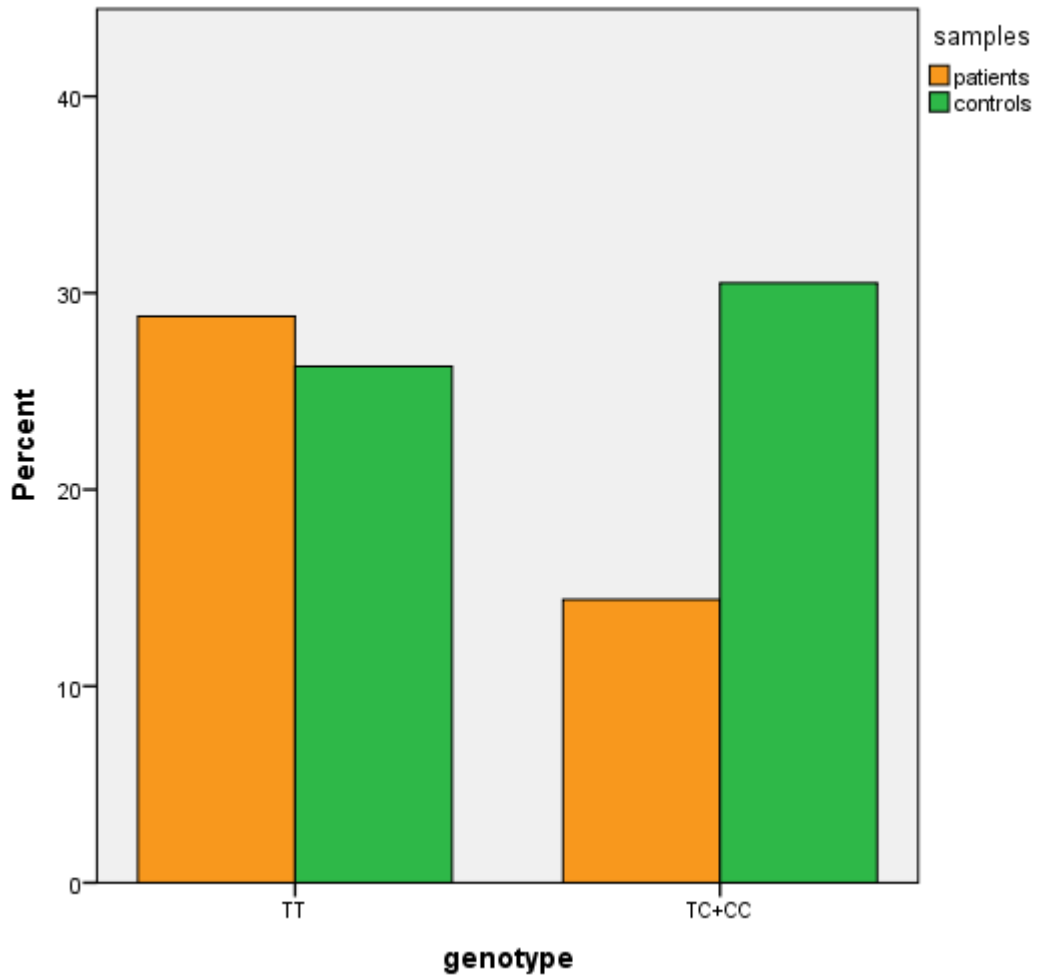
	Value	Df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	5,495 ^a	1	,019	,021	,013	
Continuity Correction ^b	4,799	1	,028			
Likelihood Ratio	5,651	1	,017	,021	,013	
Fisher's Exact Test				,021	,013	
Linear-by-Linear Association	5,472 ^c	1	,019	,021	,013	,008
N of Valid Cases	236					

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 24,64.

b. Computed only for a 2x2 table

c. The standardized statistic is -2,339.

Εφόσον φαίνεται ότι ο γονότυπος TNF-a -1031TT εμφανίζεται συχνότερα στις ασθενείς που πάσχουν από ενδομητρίωση και το αλληλόμορφο C φαίνεται να έχει προστατευτικό ρόλο ως προς την ενδομητρίωση, γίνεται περαιτέρω στατιστική ανάλυση των δεδομένων με τοποθέτηση των γονοτύπων TNF-a -1031TC+CC σε μία ενιαία κατηγορία με σκοπό να συγκρίνουμε τον κίνδυνο εμφάνισης ενδομητρίωσης σε γυναίκες που είναι ομόζυγες για το φυσιολογικό αλληλόμορφο. Παρατηρείται ότι οι υγιείς γυναίκες στην ομάδα ελέγχου φέρουν συχνότερα τους γονότυπους TNF-a -1031TC+CC (53,7%) έναντι των ασθενών με ενδομητρίωση (33,3%), σε αντίθεση με το γονότυπο TNF-a -1031TT ο οποίος εμφανίζεται συχνότερα στην ομάδα των ασθενών (66,7%) έναντι της ομάδας ελέγχου (46,3%). Έπειτα από στατιστική ανάλυση, χρησιμοποιώντας το Fisher's exact test, υπολογίζεται p-value 0,04, το οποίο αποδεικνύει ότι η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο σημαντικότητας 95% εφόσον είναι μικρότερο του 0,05.



Εικόνα 14: Στο παραπάνω ραβδόγραμμα απεικονίζονται οι ποσοστιαίες συχνότητες του γονότυπου TT στην ομάδα των ασθενών και στην ομάδα ελέγχου έναντι των ποσοστιαίων συχνοτήτων των γονοτύπων TC+CC στις ομάδες των ασθενών και ελέγχου. Με πορτοκαλί χρώμα απεικονίζονται οι ασθενείς και με πράσινο η ομάδα ελέγχου.

Στους παρακάτω πίνακες από το πρόγραμμα SPSS εμφανίζονται οι συχνότητες του γονότυπου TT έναντι του γονότυπου TC+TT στις 2 ομάδες που μελετήθηκαν καθώς και το αποτέλεσμα της στατιστικής δοκιμασίας Fisher's exact test.

Πίνακας 6: **genotype * samples Crosstabulation**

			samples		Total
			patients	controls	
genotype TT	Count		34	31	65
	% within genotype		52,3%	47,7%	100,0%
	% within samples		66,7%	46,3%	55,1%
	% of Total		28,8%	26,3%	55,1%
TC+CC	Count		17	36	53
	% within genotype		32,1%	67,9%	100,0%
	% within samples		33,3%	53,7%	44,9%
	% of Total		14,4%	30,5%	44,9%
Total	Count		51	67	118
	% within genotype		43,2%	56,8%	100,0%
	% within samples		100,0%	100,0%	100,0%
	% of Total		43,2%	56,8%	100,0%

Πίνακας 7: **Chi-Square Tests**

	Value	Df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	4,870 ^a	1	,027	,040	,021	
Continuity Correction ^b	4,080	1	,043			
Likelihood Ratio	4,928	1	,026	,040	,021	
Fisher's Exact Test				,040	,021	
Linear-by-Linear Association	4,829 ^c	1	,028	,040	,021	,013
N of Valid Cases	118					

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 22,91.

b. Computed only for a 2x2 table

c. The standardized statistic is 2,197.

Στη συνέχεια της στατιστικής ανάλυσης, παρατηρείται ότι οι γυναίκες με γονότυπο TNF-a -1031TC, δηλαδή οι ετερόζυγες ως προς τον πολυμορφισμό παρουσιάζουν περίπου 0,48 φορές μικρότερη πιθανότητα να εμφανίζουν ενδομητρίωση από τις γυναίκες που φέρουν το γονότυπο TNF-a -1031TT, δηλαδή τις ομόζυγες στο φυσιολογικό αλληλόμορφο. Ο σχετικός λόγος (odds ratio) που υπολογίζεται είναι 0,48, μικρότερος της μονάδας, γεγονός το οποίο καταδεικνύει ότι ίσως η ετεροζυγωτία ως προς τον πολυμορφισμό να έχει προστατευτικό ρόλο στην νόσο της ενδομητρίωσης. Το διάστημα εμπιστοσύνης στο επίπεδο του 95% είναι (0,22, 1,03). Εφόσον το διάστημα εμπιστοσύνης περιλαμβάνει τη μονάδα, το παραπάνω συμπέρασμα δεν είναι στατιστικά σημαντικό (OR 0,48, P 0,06, 95% CI 0,23-1,03). Ο σχετικός λόγος μεταξύ των γυναικών που είναι ομόζυγες για τον πολυμορφισμό και των ομόζυγων για το φυσιολογικό αλληλόμορφο δεν μπορεί να υπολογιστεί, αφού δεν βρέθηκε καμία γυναίκα που έπασχε από ενδομητρίωση, ομόζυγη στον πολυμορφισμό.

Στον παρακάτω πίνακα (8) απεικονίζεται ο σχετικός λόγος καθώς και το διάστημα εμπιστοσύνης.

Πίνακας 8: *Risk Estimate*

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for samples (TC / TT)	,484	,226	1,039
For cohort genotype = patients	,663	,423	1,039
For cohort genotype = controls	1,369	,988	1,898
N of Valid Cases	114		

Με ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων σε 2 κατηγορίες, των φορέων του γονοτύπου TNF-a -1031TT και των φορέων των γονοτύπων TNF-a -1031TC+CC, υπολογίζεται σχετικός λόγος (odds ratio) 2,32. Εφόσον ο σχετικός λόγος είναι μεγαλύτερος της μονάδας ο γονότυπος TNF-a -1031TT φαίνεται να είναι επιβαρυντικός ως προς την ενδομητρίωση και εφόσον το διάστημα εμπιστοσύνης 95% δεν περιλαμβάνει τη μονάδα (CI 95% 1,09, 4,94), το συμπέρασμα αυτό φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντικό. Δηλαδή οι φορείς του γονοτύπου TNF-a -1031TT έχουν 2,32 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν ενδομητρίωση σε σχέση με τις φορείς των γονοτύπων TNF-a -1031TC+CC (OR 2,32, P 0,02, CI 1,09, 4,94). (πίνακας 9)

Πίνακας 9: Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for genotype (TT / TC+CC)	2,323	1,092	4,940
For cohort samples = patients	1,631	1,034	2,571
For cohort samples = controls	,702	,513	,962
N of Valid Cases	118		

Με τον υπολογισμό του σχετικού λόγου κατά τη στατιστική ανάλυση των αλληλομόρφων T και C (OR 0,47, P 0,02, 95% CI 0,24- 0.89), που εμφανίζονται στην παρούσα μελέτη, εξάγεται το συμπέρασμα ότι το αλληλόμορφο C εμφανίζεται περίπου 0,5 φορές μικρότερη πιθανότητα να εμφανιστεί σε γυναίκες που πάσχουν από ενδομητρίωση από ότι σε υγιείς γόνιμες γυναίκες. Εφόσον ο σχετικός λόγος είναι μικρότερος της μονάδας, το αλληλόμορφο C φαίνεται να έχει προστατευτικό ρόλο ως προς την ενδομητρίωση. Ο σχετικός λόγος διαφοροποιείται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό στους δύο πληθυσμούς, εφόσον το διάστημα εμπιστοσύνης στο επίπεδο σημαντικότητας 95%, δεν περιλαμβάνει τη μονάδα. (πίνακας 10)

Πίνακας 10: Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for allele (C / T)	,470	,248	,890
For cohort samples = patients	,628	,410	,963
For cohort samples = controls	1,336	1,073	1,664
N of Valid Cases	236		

Στην παρούσα μελέτη, υπολογίστηκε η διαφορά μεταξύ των συχνοτήτων των γονοτύπων που ανιχνεύθηκαν και των αναμενόμενων συχνοτήτων με βάση την ισορροπία Hardy-Weinberg. Στην ομάδα των ασθενών, υπολογίστηκε p-value 0,32 σύμφωνα με το Fisher's exact test, εφόσον ο αριθμός του δείγματος δεν είναι μεγάλος. Έτσι φαίνεται ότι δεν έχουμε στατιστικά σημαντική απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg στην ομάδα των ασθενών. Στην ομάδα ελέγχου, έπειτα από το exact test υπολογίζεται p-value 0,38 που αποδεικνύει ότι δεν υπάρχει επίσης στατιστικά σημαντική απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg. Επομένως φαίνεται ότι η ομάδα ελέγχου είναι αντιπροσωπευτική του πληθυσμού και δεν υπάρχει αμφισβήτηση της επιλογής της ομάδας αυτής.

Πίνακας 11: Ισορροπία Hardy-Weinberg

SNP	Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium	
	Controls	Cases
SNP1	n11=31 (32.97) n12=32 (28.06) n22=4 (5.97) f_a1=0.70 +/-0.037 F=-0.14043 p=0.250378 (Pearson) p=0.239129 (Llr) p=0.381646 (Exact)	n11=34 (35.42) n12=17 (14.17) n22=0 (1.42) f_a1=0.83 +/-0.033 F=-0.20000 p=0.153210 (Pearson) p=0.064293 (Llr) p=0.322131 (Exact)

B.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ενδομητρίωση είναι μία πολύ ενδιαφέρουσα νόσος για μελέτη, εφόσον η παθογένειά της δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα. Φαίνεται να επηρεάζεται από γενετικούς αλλά και περιβαλλοντικούς παράγοντες. [148] Στη βιβλιογραφία, υπάρχουν διάφορες μελέτες από ερευνητικές ομάδες που έχουν μελετήσει τη συσχέτιση της νόσου με διάφορους πολυμορφισμούς και κυρίως πολυμορφισμούς σε γονίδια που σχετίζονται με τις φλεγμονώδεις διαδικασίες.

Όπως προαναφέρθηκε, μία από τις θεωρίες παθογένεσης της ενδομητρίωσης αφορά στη φλεγμονή και την διαταραχή των μηχανισμών ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου. Ο ρόλος του TNF-a κατά την παθογένεση αλλά και εξέλιξη της νόσου έχει μελετηθεί αρκετά και φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση με τη νόσο. Η παρούσα μελέτη ασθενών- μαρτύρων, διεκπεραιώθηκε με σκοπό τη σύγκριση των συχνοτήτων εμφάνισης του πολυμορφισμού TNF-a-1031T/C σε ασθενείς οι οποίες χειρουργήθηκαν λόγω ενδομητριωσικής κύστης της ωοθήκης (στάδιο III και IV) με τη συχνότητα εμφάνισής του σε ένα πληθυσμό φυσιολογικών γόνιμων γυναικών.

Διάφοροι πολυμορφισμοί στον εκκινητή του γονιδίου του TNF-a έχουν μελετηθεί τα τελευταία χρόνια από διάφορες ερευνητικές ομάδες. [107, 149-151] Με αφορμή αυτές τις μελέτες, εξετάστηκε ο πολυμορφισμός TNF-a -1031T/C, εφόσον και άλλες ερευνητικές ομάδες έχουν αποδείξει συσχέτιση του με την ενδομητρίωση. Τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών είναι διφορούμενα, αφού κάμποιοι παρατήρησαν ότι η εμφάνιση του πολυμορφισμού προστατεύει από τη νόσο, ενώ άλλοι ότι η ύπαρξή του σχετίζεται με την ενδομητρίωση και αυτό μας ώθησε να εξετάσουμε το τι συμβαίνει στον ελληνικό πληθυσμό.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού στον εκκινητή του γονιδίου του TNF-a -1031T/C και της ενδομητρίωσης. Φαίνεται ότι ο πολυμορφισμός εμφανίζεται συχνότερα στην ομάδα ελέγχου από ό,τι στην ομάδα των ασθενών, γεγονός που μπορεί να ερμηνευτεί ως ότι η εμφάνιση του πολυμορφισμού είναι προστατευτική ως προς την εμφάνιση ενδομητρίωσης. Μάλιστα, έπειτα από την στατιστική μελέτη των αποτελεσμάτων ως προς τα αλληλόμορφα, το αλληλόμορφο T εμφανίζεται συχνότερα στην ομάδα των ασθενών ενώ το αλληλόμορφο C στην ομάδα ελέγχου. Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, εξάγεται το συμπέρασμα ότι ο πολυμορφισμός στον εκκινητή του γονιδίου του TNF-a -1031T/C, έχει προστατευτικό ρόλο ως προς την ενδομητρίωση. Ο γονότυπος TNF-a -1031 TT εμφανίζεται συχνότερα στις γυναίκες με ενδομητρίωση σε στατιστικά σημαντικό βαθμό (p 0,032). Μάλιστα δεν ανιχνεύθηκε καμία γυναίκα στην ομάδα των ασθενών που είναι ομόζυγη στον πολυμορφισμό (TNF-a -1031CC). Υπολογίζεται ότι οι γυναίκες που φέρουν το γονότυπο TNF-a -1031TC παρουσιάζουν 0,48 φορές μικρότερη πιθανότητα να πάσχουν από

ενδομητρίωση (OR 0,48, P 0,06, 95% CI 0,23-1,03). Επιπλέον το αλληλόμορφο T παρατηρείται συχνότερα στις γυναίκες με ενδομητρίωμα (p-value 0,021), ενώ το αλληλόμορφο C έχει προστατευτικό ρόλο απέναντι στην ενδομητρίωση (OR 0,47, P 0,02, 95% CI 0,24- 0.89). Έπειτα από τα παραπάνω συμπεράσματα, με περαιτέρω στατιστική ανάλυση αποδείχθηκε ότι οι υγιείς γόνιμες γυναίκες φέρουν συχνότερα το γονότυπο TNF-a -1031 TC+CC έναντι των ασθενών με ενδομητρίωμα (p-value 0,04).

Το συμπέρασμα της παρούσας μελέτης είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Saliminejad et al (2013) καθώς και των Asghar et al (2004), οι οποίοι επίσης συμπέραναν ότι το αλληλόμορφο TNF-a -1031C έχει προστατευτικό ρόλο έναντι της ενδομητρίωσης [149, 152]. Οι Asghar et al δεν βρήκαν συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ενδομητρίωση, παρά μόνο σε ασθενείς με ενδομητρίωση σταδίου IV, στις οποίες το αλληλόμορφο T εμφανιζόταν συχνότερα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου σε στατιστικά σημαντικό βαθμό [149]. Επιπλέον, οι Teramoto et al (2004), συμπέραναν ότι ο απλότυπος TNFA-U01 (-1031T, -863C, -857C) ο οποίος βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) με το HLAB*0702 φαίνεται να αυξάνει το ρίσκο για εμφάνιση ενδομητρίωσης [107]. Αντίθετα, άλλες ερευνητικές ομάδες [153, 154], κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η εμφάνιση του πολυμορφισμού και ιδιαίτερα του αλληλόμορφου TNF-a -1031C είναι συχνότερη στις γυναίκες που πάσχουν από ενδομητρίωση, επομένως ο πολυμορφισμός έχει επιβαρυντικό ρόλο για την εμφάνιση της νόσου. Δύο μετα-αναλύσεις του 2014 [155, 156] οι οποίες συμπεριέλαβαν μόνο μελέτες που διεξήχθησαν σε ασιατικούς πληθυσμούς είχαν επίσης διαφορετικά αποτελέσματα μεταξύ τους. Οι Li et al κατέληξαν στο ίδιο συμπέρασμα με την παρούσα μελέτη, ενώ οι Jiangtao et al στο αντίθετο [155, 156]. Τέλος, μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Αυστραλία δεν βρήκε καμία συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών στον εκκινητή του γονιδίου του TNF-a και της ενδομητρίωσης [150].

Οι διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων των ερευνητικών ομάδων μπορεί να οφείλονται στις παρακάτω αιτίες:

1. Διαφορές των πολυμορφισμών μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών
2. Ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) μεταξύ διαφόρων πολυμορφισμών σε γειτονικές θέσεις ή γειτονικά γονίδια.
3. Δύναμη και μεθοδολογία της εκάστοτε μελέτης

Η δύναμη της μελέτης μπορεί να επηρεάζεται από τον αριθμό των δειγμάτων καθώς και από την επιλογή των προς μελέτη ομάδων. Ο αριθμός των δειγμάτων στην παρούσα μελέτη δεν είναι μεγάλος. Επιπλέον, είναι αξιοσημείωτο ότι δεν παρατηρήσαμε σε καμία από τις γυναίκες με ενδομητρίωση από την ομάδα των ασθενών το γονότυπο TNF-a -1031 CC. Είναι γεγονός, ότι η ενδομητρίωση σταδίων I και II, σύμφωνα με τη

σταδιοποίηση ASRM, μπορεί να υπάρχει σε ασυμπτωματικές γυναίκες, επομένως κάποιες από τις γυναίκες της ομάδας ελέγχου μπορεί να πάσχουν από ενδομητρίωση χωρίς να έχουν διαγνωσθεί.

Η περιοχή του γονιδιώματος, όπου εδράζεται το γονίδιο του TNF-a, εντός της MHC περιοχής, περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό γονιδίων και θεωρείται από τις πιο πολυμορφικές περιοχές του γονιδιώματος [132]. Επιπλέον εδράζεται σε πολυ κοντινή απόσταση με τα γονίδια του συμπλέγματος HLA τάξης II [157]. Η ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) είναι ένα γενετικό φαινόμενο στο οποίο ορισμένοι φαινοτυπικοί συνδυασμοί εμφανίζονται συχνότερα από το αναμενόμενο με βάση τις συχνότητες των επιμέρους γονιδίων και οφείλεται στο ότι 2 ή περισσότεροι γενετικοί τόποι είναι συνδεδεμένοι. Τα γονίδια που μπορεί να βρίσκονται σε σύνδεση εδράζονται στο ίδιο χρωμόσωμα και έχουν την τάση να κληρονομούνται από κοινού παρόλο που δεν είναι αλληλόμοφα για το ίδιο γονίδιο. Διάφορες μελέτες [107] έχουν δείξει ότι υπάρχει σε υψηλότερο ή χαμηλότερο βαθμό ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ διάφορων πολυμορφισμών του εκκινητή του γονιδίου του TNF-a, αλλά και μεταξύ αυτών των πολυμορφισμών και πολυμορφισμών των γονιδίων του συμπλέγματος HLA. Οι συνδυασμοί αλληλομόρφων συνεχόμενων πολυμορφισμών σε ένα χρωμόσωμα, ονομάζονται απλότυποι.

Ο πολυμορφισμός TNF-a -1031T/C βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με τους πολυμορφισμούς στις θέσεις -863C/A και -857C/T [107]. Ειδικά το αλληλίο -1031T φαίνεται να έχει ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης με τον πολυμορφισμό TNF-a -863C/A [158]. Επίσης υπάρχει ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ των TNF-a -1031T/C, -238G/A και -308G/A [150]. Ίσως λοιπόν η αυξημένη συχνότητα του γονότυπου -1031TT καθώς και του αλληλομόρφου -1031T στην ομάδα των ασθενών να εξαρτάται από την ύπαρξη του πολυμορφισμού -863C/A.

Τέλος, έχει παρατηρηθεί ανισορροπία σύνδεσης με γονίδια του HLA, HLA-B*61, -B*39 και -DBR1*0901 [157]. Οι Asghar et al μελέτησαν αυτή τη σύνδεση με το HLA- DRB1*0901 και συμπέραναν ότι το γονίδιο είναι αυτόνομο όσον αφορά στην ενδομητρίωση και δεν συσχετίζεται με την ύπαρξη της νόσου. [149] Σύμφωνα με τα παραπάνω, η στατιστικά σημαντική διαφορά που ανιχνεύθηκε μεταξύ της συχνότητας εμφάνισης του πολυμορφισμού σε ασθενείς και ομάδα ελέγχου, μπορεί να οφείλεται σε κάποιο άλλο γονίδιο ή πολυμορφισμό με το οποίο είναι σε σύνδεση ο ως προς μελέτη πολυμορφισμός και έτσι ο πολυμορφισμός μπορεί να είναι δείκτης για κάποιο άλλο γονίδιο που συνδέεται με την ενδομητρίωση.

Διάφοροι πολυμορφισμοί στον εκκινητή του γονιδίου του TNF-a έχουν μελετηθεί και συσχετιστεί με διάφορες νόσους, όμως ακόμα παραμένει αβέβαιο το αν αυτοί οι πολυμορφισμοί επηρεάζουν την έκφραση και ως επακόλουθο τη συγκέντρωση του TNF-a. Μάλιστα υπάρχει η υπόθεση ότι οι πολυμορφισμοί αυτοί μπορεί να δρουν συνεργικά ώστε να επηρεάσουν την ολική δραστηριότητα του εκκινητή του TNF-a. Υπάρχουν στη βιβλιογραφία μελέτες που υποστηρίζουν ότι ο πολυμορφισμός TNF-a -1031T/C και κυρίως το

αλληλίο C αυξάνει την έκφραση του TNF-a [143, 145, 157], αλλά και μία μελέτη η οποία δείχνει μειωμένη συγκέντρωση του TNF-a στον ορό παρουσία του γονότυπου TNF-a -1031TC και CC και ότι το αλληλίο C παρουσιάζει μειωμένη δραστηριότητα λουσιφεράσης [158]. Εφόσον στο περιτοναϊκό υγρό ασθενών με ενδομητρίωση έχει βρεθεί αυξημένη συγκέντρωση του TNF-α, αν το αλληλόμορφο C σχετίζεται με μειωμένη συγκέντρωση της πρωτεΐνης, εξηγείται ο προστατευτικός ρόλος που φαίνεται να ασκεί ο πολυμορφισμός στον ελληνικό πληθυσμό που μελετήθηκε.

Οι Zhao et al, προτείνουν ότι η αυξημένη συγκέντρωση του TNF-a στο περιτοναϊκό υγρό των ασθενών με ενδομητρίωση δεν σχετίζεται με λειτουργικούς πολυμορφισμούς του γονιδίου, αλλά είναι δευτερεύον αποτέλεσμα [150]. Η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου του TNF-a φαίνεται να επηρεάζεται και από άλλους ρυθμιστικούς μηχανισμούς εκτός της ύπαρξης των πολυμορφισμών, εφόσον ερευνητικές ομάδες [110, 116] διαπίστωσαν ότι υπάρχει υπερέκφραση του TNF-a στα αρχικά στάδια της νόσου σε σχέση με τα πιο προχωρημένα, ίσως όμως η ύπαρξη καποιων συγκεκριμένων πολυμορφισμών να συμβάλλει σε αυτή την αυξημένη έκφραση του. Μάλιστα, όπως προαναφέρθηκε, η συγκέντρωση του TNF-a δεν σχετίζεται άμεσα με τις δράσεις του, αφού σημαντικό ρόλο παίζει και η ύπαρξη των υποδοχέων του στα κύτταρα-στόχους. Οι μεταβολές της συγκέντρωσης του παράγοντα νέκρωσης όγκων άλφα (TNF-a) καθώς και των υποδοχέων του φαίνεται να εξηγούν την συνύπαρξη φλεγμονής αλλά και επιδιορθωτικών φαινομένων που παρατηρούνται στην ενδομητρίωση.

Η ερευνητική ομάδα των Bertsch et al, διαπίστωσε ότι υπάρχει αυξημένη έκφραση του γονιδίου του TNF-a σε βλάβες που εντοπίζονται στο ορθοκολπικό διάφραγμα και το περιτόναιο σε σχέση με το εύτοπο ενδομήτριο και τις βλάβες που εντοπίζονται στην ωθήκη [112]. Στην παρούσα μελέτη, απομονώθηκε γενετικό υλικό από ενδομητρίωματα της ωθήκης στην ομάδα των ασθενών και θα ήταν ενδιαφέρον σε μελλοντικές έρευνες να διερευνηθεί αν υπάρχει διαφορά στην ύπαρξη πολυμορφισμών στον εκκινητή του TNF-a μεταξύ βλαβών που εντοπίζονται σε διαφορετικές ανατομικές θέσεις καθώς και μεταξύ του γενετικού υλικού από τις βλάβες και του γενετικού υλικού που απομονώνεται από το αίμα των ασθενών.

Η παρούσα έρευνα είναι η πρώτη, από όσο γνωρίζουμε, στην οποία μελετήθηκε ο πολυμορφισμός του εκκινητή του TNF-a -1031T/C σε ενδομητρωσικές κύστες της ωθήκης, όπου φαίνεται να επικρατεί ο γονότυπος -1031TT έναντι του πολυμορφισμού στον ελληνικό πληθυσμό. Μάλιστα στην ομάδα των ασθενών δεν ανιχνεύθηκε σε καμία ασθενή ομοζυγωτία στον πολυμορφισμό (TNF-a -1031CC). Μειονέκτημα της μελέτης είναι ο σχετικά μικρός αριθμός των δειγμάτων. Συνοπτικά, παρατηρήθηκε ότι ο πολυμορφισμός TNF-a -1031TC καθώς και το αλληλόμορφο TNF-a -1031C φαίνεται να έχουν προστατευτικό ρόλο έναντι της ενδομητρίωσης στον ελληνικό πληθυσμό. Επιπλέον ενισχύεται η υπόθεση της συμμετοχής του ανοσοποιητικού συστήματος και του γενετικού υπόβαθρου στην παθογένεση της ενδομητρίωσης.

Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται για να βγουν ασφαλή συμπεράσματα ως προς το ρόλο των πολυμορφισμών στον εκκινητή του TNF- α . Θα πρέπει να μελετηθεί το αν επηρεάζεται η έκφραση του TNF- α από την ύπαρξη αυτών των πολυμορφισμών καθώς και με ποιό τρόπο για να ερμηνευτεί ο μηχανισμός με τον οποίο ο πολυμορφισμός στον εκκινητή του TNF- α -1031T/C προστατεύει από την εμφάνιση ενδομητρίωσης τις γυναίκες στον ελληνικό πληθυσμό.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Endometriosis, S.A.-o.R.f., *Endometriosis*. 2016: Svensk Förening för Obstetrik och Gynekologi.
2. Olovsson, M., *Gynekologi*, ed. B.-M.L. Per Olof Janson. 2015: Studentlitteratur.
3. Eskenazi, B. and M.L. Warner, *Epidemiology of endometriosis*. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 1997. **24**(2): p. 235-58.
4. Morassutto, C., et al., *Incidence and Estimated Prevalence of Endometriosis and Adenomyosis in Northeast Italy: A Data Linkage Study*. *PLoS One*, 2016. **11**(4): p. e0154227.
5. Ballard, K.D., et al., *Can symptomatology help in the diagnosis of endometriosis? Findings from a national case-control study--Part 1*. *Bjog*, 2008. **115**(11): p. 1382-91.
6. Paris, K. and A. Aris, *Endometriosis-associated infertility: a decade's trend study of women from the Estrie region of Quebec, Canada*. *Gynecol Endocrinol*, 2010. **26**(11): p. 838-42.
7. von Theobald, P., et al., *Epidemiology of Endometriosis in France: A Large, Nation-Wide Study Based on Hospital Discharge Data*. *Biomed Res Int*, 2016. **2016**: p. 3260952.
8. Parazzini, F., et al., *Epidemiology of endometriosis and its comorbidities*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2017. **209**: p. 3-7.
9. Cramer, D.W. and S.A. Missmer, *The epidemiology of endometriosis*. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. **955**: p. 11-22; discussion 34-6, 396-406.
10. Smith, S., S.M. Pfeifer, and J.A. Collins, *Diagnosis and management of female infertility*. *Jama*, 2003. **290**(13): p. 1767-70.
11. Nnoaham, K.E., et al., *Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries*. *Fertil Steril*, 2011. **96**(2): p. 366-373 e8.
12. Dunselman, G.A., et al., *ESHRE guideline: management of women with endometriosis*. *Hum Reprod*, 2014. **29**(3): p. 400-12.
13. Moen, M.H. and P. Magnus, *The familial risk of endometriosis*. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 1993. **72**(7): p. 560-564.
14. Treloar, S.A., et al., *Genomewide linkage study in 1,176 affected sister pair families identifies a significant susceptibility locus for endometriosis on chromosome 10q26*. *Am J Hum Genet*, 2005. **77**(3): p. 365-76.
15. Rogers, P.A., et al., *Priorities for endometriosis research: recommendations from an international consensus workshop*. *Reprod Sci*, 2009. **16**(4): p. 335-46.
16. Missmer, S.A., et al., *A prospective study of dietary fat consumption and endometriosis risk*. *Hum Reprod*, 2010. **25**(6): p. 1528-35.
17. Vigano, P., et al., *Principles of phenomics in endometriosis*. *Hum Reprod Update*, 2012. **18**(3): p. 248-59.
18. Kvaskoff, M., et al., *Endometriosis risk in relation to naevi, freckles and skin sensitivity to sun exposure: the French E3N cohort*. *Int J Epidemiol*, 2009. **38**(4): p. 1143-53.
19. Goncalves, R.B., et al., *Impact of smoking on inflammation: overview of molecular mechanisms*. *Inflamm Res*, 2011. **60**(5): p. 409-24.
20. Parazzini, F., et al., *A metaanalysis on alcohol consumption and risk of endometriosis*. *Am J Obstet Gynecol*, 2013. **209**(2): p. 106.e1-10.
21. Vercellini, P., et al., *Oral contraceptives and risk of endometriosis: a systematic review and meta-analysis*. *Hum Reprod Update*, 2011. **17**(2): p. 159-70.

22. Kvaskoff, M., et al., *Endometriosis: a high-risk population for major chronic diseases?* Hum Reprod Update, 2015. **21**(4): p. 500-16.
23. Jess, T., et al., *Increased risk of inflammatory bowel disease in women with endometriosis: a nationwide Danish cohort study.* Gut, 2012. **61**(9): p. 1279-83.
24. Nielsen, N.M., et al., *The co-occurrence of endometriosis with multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus and Sjogren syndrome.* Hum Reprod, 2011. **26**(6): p. 1555-9.
25. Harris, H.R., et al., *Endometriosis and the risks of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in the Nurses' Health Study II.* Ann Rheum Dis, 2016. **75**(7): p. 1279-84.
26. Bungum, H.F., C. Vestergaard, and U.B. Knudsen, *Endometriosis and type 1 allergies/immediate type hypersensitivity: a systematic review.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2014. **179**: p. 209-15.
27. Bertelsen, L., et al., *Risk for breast cancer among women with endometriosis.* Int J Cancer, 2007. **120**(6): p. 1372-5.
28. Sourial, S., N. Tempest, and D.K. Hapangama, *Theories on the pathogenesis of endometriosis.* Int J Reprod Med, 2014. **2014**: p. 179515.
29. Sampson, J.A., *Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity.* American Journal of Obstetrics and Gynecology, 1927. **14**(4): p. 422-469.
30. Sampson, J.A., *Heterotopic or misplaced endometrial tissue.* American Journal of Obstetrics and Gynecology, 1925. **10**(5): p. 649-664.
31. Sasson, I.E. and H.S. Taylor, *Stem cells and the pathogenesis of endometriosis.* Ann N Y Acad Sci, 2008. **1127**: p. 106-15.
32. Koninckx, P.R., S.H. Kennedy, and D.H. Barlow, *Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid.* Hum Reprod Update, 1998. **4**(5): p. 741-51.
33. Valentijn, A.J., et al., *SSEA-1 isolates human endometrial basal glandular epithelial cells: phenotypic and functional characterization and implications in the pathogenesis of endometriosis.* Hum Reprod, 2013. **28**(10): p. 2695-708.
34. Donnez, O., et al., *Induction of endometriotic nodules in an experimental baboon model mimicking human deep nodular lesions.* Fertil Steril, 2013. **99**(3): p. 783-789.e3.
35. Burney, R.O. and L.C. Giudice, *Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis.* Fertil Steril, 2012. **98**(3): p. 511-9.
36. Nisolle, M. and J. Donnez, *Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities.* Fertil Steril, 1997. **68**(4): p. 585-96.
37. Zheng, W., et al., *Initial endometriosis showing direct morphologic evidence of metaplasia in the pathogenesis of ovarian endometriosis.* Int J Gynecol Pathol, 2005. **24**(2): p. 164-72.
38. Gruenewald, P., *Origin of endometriosis from the mesenchyme of the celomic walls.* American Journal of Obstetrics & Gynecology. **44**(3): p. 470-474.
39. Longo, L.D., *Classic pages in obstetrics and gynecology. Aberrant portions of the mullerian duct found in an ovary: William Wood Russell Johns Hopkins Hospital Bulletin, vol. 10, pp. 8--10, 1899.* Am J Obstet Gynecol, 1979. **134**(2): p. 225-6.
40. Halban, J., *Metastatic hysteroadenosis.* Wien Klin Wochenschr. , 1924. **37**: p. 1205–1206.
41. Gargett, C.E., R.W. Chan, and K.E. Schwab, *Endometrial stem cells.* Curr Opin Obstet Gynecol, 2007. **19**(4): p. 377-83.
42. Maruyama, T. and Y. Yoshimura, *Stem cell theory for the pathogenesis of endometriosis.* Front Biosci (Elite Ed), 2012. **4**: p. 2754-63.

43. Gargett, C.E., R.W. Chan, and K.E. Schwab, *Hormone and growth factor signaling in endometrial renewal: role of stem/progenitor cells*. Mol Cell Endocrinol, 2008. **288**(1-2): p. 22-9.
44. Padykula, H.A., *Regeneration in the primate uterus: the role of stem cells*. Ann N Y Acad Sci, 1991. **622**: p. 47-56.
45. Masuda, H., et al., *Stem cell-like properties of the endometrial side population: implication in endometrial regeneration*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10387.
46. Jerman, L.F. and A.J. Hey-Cunningham, *The role of the lymphatic system in endometriosis: a comprehensive review of the literature*. Biol Reprod, 2015. **92**(3): p. 64.
47. Zeitoun, K., et al., *Deficient 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17beta-estradiol*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(12): p. 4474-80.
48. Augoulea, A., et al., *Pathogenesis of endometriosis: the role of genetics, inflammation and oxidative stress*. Arch Gynecol Obstet, 2012. **286**(1): p. 99-103.
49. Attia, G.R., et al., *Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(8): p. 2897-902.
50. Noble, L.S., et al., *Aromatase expression in endometriosis*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(1): p. 174-9.
51. Bulun, S.E., et al., *Estrogen Receptor- β , Estrogen Receptor- α , and Progesterone Resistance in Endometriosis*. Semin Reprod Med, 2010. **28**(01): p. 036-043.
52. Wingfield, M., et al., *Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis*. Fertil Steril, 1995. **64**(2): p. 340-6.
53. Gebel, H.M., et al., *Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis*. Fertil Steril, 1998. **69**(6): p. 1042-7.
54. Jones, R.K., R.F. Searle, and J.N. Bulmer, *Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis*. Hum Reprod, 1998. **13**(12): p. 3496-502.
55. Hapangama, D.K., et al., *Aberrant expression of regulators of cell-fate found in eutopic endometrium is found in matched ectopic endometrium among women and in a baboon model of endometriosis*. Hum Reprod, 2010. **25**(11): p. 2840-50.
56. Delbandi, A.A., et al., *Eutopic and ectopic stromal cells from patients with endometriosis exhibit differential invasive, adhesive, and proliferative behavior*. Fertil Steril, 2013. **100**(3): p. 761-9.
57. Sundqvist, J., et al., *Expression of adhesion, attachment and invasion markers in eutopic and ectopic endometrium: a link to the aetiology of endometriosis*. Hum Reprod, 2012. **27**(9): p. 2737-46.
58. Healy, D.L., et al., *Angiogenesis: a new theory for endometriosis*. Hum Reprod Update, 1998. **4**(5): p. 736-40.
59. Al-Jefout, M., et al., *Diagnosis of endometriosis by detection of nerve fibres in an endometrial biopsy: a double blind study*. Hum Reprod, 2009. **24**(12): p. 3019-24.
60. Tokushige, N., et al., *High density of small nerve fibres in the functional layer of the endometrium in women with endometriosis*. Hum Reprod, 2006. **21**(3): p. 782-7.
61. Wang, Y., et al., *Importance of reactive oxygen species in the peritoneal fluid of women with endometriosis or idiopathic infertility*. Fertil Steril, 1997. **68**(5): p. 826-30.
62. Taylor, R.N., M.A. Kane, and N. Sidell, *Pathogenesis of Endometriosis: Roles of Retinoids and Inflammatory Pathways*. Semin Reprod Med, 2015. **33**(4): p. 246-56.
63. Lebovic, D.I., V.A. Chao, and R.N. Taylor, *Peritoneal macrophages induce RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) chemokine gene*

- transcription in endometrial stromal cells*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(3): p. 1397-401.
64. Sharpe-Timms, K.L., et al., *Endometriotic lesions synthesize and secrete a haptoglobin-like protein*. Biol Reprod, 1998. **58**(4): p. 988-94.
 65. Kats, R., et al., *Marked elevation of macrophage migration inhibitory factor in the peritoneal fluid of women with endometriosis*. Fertil Steril, 2002. **78**(1): p. 69-76.
 66. Wu, M.H., et al., *Distinct mechanisms regulate cyclooxygenase-1 and -2 in peritoneal macrophages of women with and without endometriosis*. Mol Hum Reprod, 2002. **8**(12): p. 1103-10.
 67. Chen, D.B., et al., *Stimulation of prostaglandin (PG) F2 alpha and PGE2 release by tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha in cultured human luteal phase endometrial cells*. Hum Reprod, 1995. **10**(10): p. 2773-80.
 68. Sinaii, N., et al., *High rates of autoimmune and endocrine disorders, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and atopic diseases among women with endometriosis: a survey analysis*. Hum Reprod, 2002. **17**(10): p. 2715-24.
 69. Osuga, Y., et al., *Lymphocytes in endometriosis*. Am J Reprod Immunol, 2011. **65**(1): p. 1-10.
 70. Sikora, J., A. Mielczarek-Palacz, and Z. Kondera-Anasz, *Role of natural killer cell activity in the pathogenesis of endometriosis*. Curr Med Chem, 2011. **18**(2): p. 200-8.
 71. Kennedy, S., *Genetics of endometriosis: a review of the positional cloning approaches*. Semin Reprod Med, 2003. **21**(2): p. 111-8.
 72. Painter, J.N., et al., *Genome-wide association study identifies a locus at 7p15.2 associated with endometriosis*. Nat Genet, 2011. **43**(1): p. 51-4.
 73. Baumann, C., et al., *Arginine methyltransferases mediate an epigenetic ovarian response to endometriosis*. Reproduction, 2015. **150**(4): p. 297-310.
 74. Guo, S.W., *Epigenetics of endometriosis*. Mol Hum Reprod, 2009. **15**(10): p. 587-607.
 75. Anaf, V., et al., *Hyperalgesia, nerve infiltration and nerve growth factor expression in deep adenomyotic nodules, peritoneal and ovarian endometriosis*. Hum Reprod, 2002. **17**(7): p. 1895-900.
 76. Porpora, M.G., et al., *Correlation between endometriosis and pelvic pain*. J Am Assoc Gynecol Laparosc, 1999. **6**(4): p. 429-34.
 77. Fauconnier, A., et al., *Relation between pain symptoms and the anatomic location of deep infiltrating endometriosis*. Fertil Steril, 2002. **78**(4): p. 719-26.
 78. Lebovic, D.I., M.D. Mueller, and R.N. Taylor, *Immunobiology of endometriosis*. Fertil Steril, 2001. **75**(1): p. 1-10.
 79. Chopin, N., et al., *Relation between severity of dysmenorrhea and endometrioma*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2006. **85**(11): p. 1375-80.
 80. Leyendecker, G., et al., *Uterine peristaltic activity and the development of endometriosis*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1034**: p. 338-55.
 81. Kunz, G. and G. Leyendecker, *Uterine peristaltic activity during the menstrual cycle: characterization, regulation, function and dysfunction*. Reprod Biomed Online, 2002. **4 Suppl 3**: p. 5-9.
 82. Haas, D., et al., *The rASRM score and the Enzian classification for endometriosis: their strengths and weaknesses*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2013. **92**(1): p. 3-7.
 83. Schreinemacher, M.H., et al., *Towards Endometriosis Diagnosis by Gadofosveset-Trisodium Enhanced Magnetic Resonance Imaging*. PLoS ONE, 2012. **7**(3): p. e33241.
 84. Sallam, H.N., et al., *Long-term pituitary down-regulation before in vitro fertilization (IVF) for women with endometriosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2006(1): p. Cd004635.

85. Beretta, P., et al., *Randomized clinical trial of two laparoscopic treatments of endometriomas: cystectomy versus drainage and coagulation*. Fertil Steril, 1998. **70**(6): p. 1176-80.
86. Chapron, C., et al., *Management of ovarian endometriomas*. Hum Reprod Update, 2002. **8**(6): p. 591-7.
87. Vercellini, P., et al., *Coagulation or excision of ovarian endometriomas?* Am J Obstet Gynecol, 2003. **188**(3): p. 606-10.
88. Haider, S. and M. Knofler, *Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium*. Placenta, 2009. **30**(2): p. 111-23.
89. Horiuchi, T., et al., *Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents*. Rheumatology (Oxford), 2010. **49**(7): p. 1215-28.
90. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
91. Kriegler, M., et al., *A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF*. Cell, 1988. **53**(1): p. 45-53.
92. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology*. Cell, 2001. **104**: p. 487–501.
93. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich, *Tumor necrosis factor signaling*. Cell Death and Differentiation, 2003. **10**: p. 45–65.
94. E.Nedwin, G., et al., *Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization*. Nucleic Acids Research, 1985. **13**(17): p. 6361- 6373.
95. <Endo-Facts-and-Figures pdf.pdf>.
96. CARSWELL, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975. **72**(9): p. 3666-3670.
97. Guven-Maiorov, E., et al., *Structural pathways of cytokines may illuminate their roles in regulation of cancer development and immunotherapy*. Cancers (Basel), 2014. **6**(2): p. 663-83.
98. Gori, I., et al., *Tumor necrosis factor-alpha activates estrogen signaling pathways in endometrial epithelial cells via estrogen receptor alpha*. Mol Cell Endocrinol, 2011. **345**(1-2): p. 27-37.
99. Devin, A., et al., *The alpha and beta subunits of I kappa B kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 in response to TNF*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(12): p. 3986-94.
100. Schutze, S., et al., *Inhibition of receptor internalization by monodansylcadaverine selectively blocks p55 tumor necrosis factor receptor death domain signaling*. J Biol Chem, 1999. **274**(15): p. 10203-12.
101. Wang, L., F. Du, and X. Wang, *TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways*. Cell, 2008. **133**(4): p. 693-703.
102. Ichijo, H., et al., *Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways*. Science, 1997. **275**(5296): p. 90-4.
103. Tobiume, K., et al., *ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis*. EMBO Rep, 2001. **2**(3): p. 222-8.
104. Rivas, M.A., et al., *TNF alpha acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/P44 MAPK, JNK, Akt and NF-kappa B-dependent pathways*. Exp Cell Res, 2008. **314**(3): p. 509-29.
105. Zhang, R., et al., *Etk/Bmx transactivates vascular endothelial growth factor 2 and recruits phosphatidylinositol 3-kinase to mediate the tumor necrosis factor-induced angiogenic pathway*. J Biol Chem, 2003. **278**(51): p. 51267-76.

106. Malutan, A.M., et al., *Pro-inflammatory cytokines for evaluation of inflammatory status in endometriosis*. Cent Eur J Immunol, 2015. **40**(1): p. 96-102.
107. Teramoto, M., et al., *Genetic contribution of tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene promoter (-1031, -863 and -857) and TNF receptor 2 gene polymorphisms in endometriosis susceptibility*. Am J Reprod Immunol, 2004. **51**(5): p. 352-7.
108. Younis, A., et al., *Serum tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, monocyte chemotactic protein-1 and paraoxonase-1 profiles in women with endometriosis, PCOS, or unexplained infertility*. J Assist Reprod Genet, 2014. **31**(11): p. 1445-51.
109. Zolti, M., et al., *Cytokine involvement in oocytes and early embryos*. Fertil Steril, 1991. **56**(2): p. 265-72.
110. Salmeri, F.M., et al., *Behavior of tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptor 1/tumor necrosis factor receptor 2 system in mononuclear cells recovered from peritoneal fluid of women with endometriosis at different stages*. Reprod Sci, 2015. **22**(2): p. 165-72.
111. Pizzo, A., et al., *Behaviour of cytokine levels in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis*. Gynecol Obstet Invest, 2002. **54**(2): p. 82-7.
112. Bertschi, D., et al., *Enhanced inflammatory activity of endometriotic lesions from the rectovaginal septum*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 450950.
113. Ahn, S.H., et al., *Pathophysiology and Immune Dysfunction in Endometriosis*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 795976.
114. Nothnick, W. and Z. Alali, *Recent advances in the understanding of endometriosis: the role of inflammatory mediators in disease pathogenesis and treatment*. F1000Res, 2016. **5**.
115. Grund, E.M., et al., *Tumor necrosis factor-alpha regulates inflammatory and mesenchymal responses via mitogen-activated protein kinase kinase, p38, and nuclear factor kappaB in human endometriotic epithelial cells*. Mol Pharmacol, 2008. **73**(5): p. 1394-404.
116. Scholl, B., et al., *Correlation between symptoms of pain and peritoneal fluid inflammatory cytokine concentrations in endometriosis*. Gynecol Endocrinol, 2009. **25**(11): p. 701-6.
117. Othman, E.R., et al., *Soluble tumor necrosis factor-alpha receptors in the serum of endometriosis patients*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2016. **200**: p. 1-5.
118. Bulun, S.E., *Endometriosis*. N Engl J Med, 2009. **360**(3): p. 268-79.
119. Carmona, F., et al., *Ovarian endometrioma but not deep infiltrating endometriosis is associated with increased serum levels of interleukin-8 and interleukin-6*. J Reprod Immunol, 2012. **95**(1-2): p. 80-6.
120. Kilic, S., et al., *Follicular fluid vascular endothelial growth factor and tumour necrosis factor alpha concentrations in patients with endometriosis undergoing ICSI*. Reprod Biomed Online, 2007. **15**(3): p. 316-20.
121. Lu, D., H. Song, and G. Shi, *Anti-TNF-alpha treatment for pelvic pain associated with endometriosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2013(3): p. CD008088.
122. Harada, T., et al., *Increased interleukin-6 levels in peritoneal fluid of infertile patients with active endometriosis*. Am J Obstet Gynecol, 1997. **176**(3): p. 593-7.
123. Kocbek, V., et al., *TNFalpha-induced IKKbeta complex activation influences epithelial, but not stromal cell survival in endometriosis*. Mol Hum Reprod, 2016. **22**(11): p. 768-777.
124. Kyama, C.M., et al., *Effect of recombinant human TNF-binding protein-1 and GnRH antagonist on mRNA expression of inflammatory cytokines and adhesion and growth factors in endometrium and endometriosis tissues in baboons*. Fertil Steril, 2008. **89**(5 Suppl): p. 1306-13.

125. D'Hooghe, T.M., et al., *Recombinant human TNFRSF1A (r-hTBP1) inhibits the development of endometriosis in baboons: a prospective, randomized, placebo- and drug-controlled study*. Biol Reprod, 2006. **74**(1): p. 131-6.
126. Falconer, H., et al., *Treatment with anti-TNF monoclonal antibody (c5N) reduces the extent of induced endometriosis in the baboon*. Hum Reprod, 2006. **21**(7): p. 1856-62.
127. Seng, K.C. and C.K. Seng, *The success of the genome-wide association approach: a brief story of a long struggle*. Eur J Hum Genet, 2008. **16**(5): p. 554-64.
128. Kalinderi K, F.S., *SNPs in modern biomedical research*. Hellenic medicine, 2010(76): p. 225-232.
129. Shastry, B.S., *SNP alleles in human disease and evolution*. J Hum Genet, 2002. **47**(11): p. 561-6.
130. Salisbury, B.A., et al., *SNP and haplotype variation in the human genome*. Mutat Res, 2003. **526**(1-2): p. 53-61.
131. Brookes, A.J., *The essence of SNPs*. Gene, 1999. **234**(2): p. 177-86.
132. Hajeer, A.H. and I.V. Hutchinson, *TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications*. Microsc Res Tech, 2000. **50**(3): p. 216-28.
133. Han, Z., et al., *Meta-analysis: polymorphisms in TNF-alpha gene promoter and Crohn's disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2010. **32**(2): p. 159-70.
134. Orchard, T.R., et al., *Uveitis and erythema nodosum in inflammatory bowel disease: clinical features and the role of HLA genes*. Gastroenterology, 2002. **123**(3): p. 714-8.
135. Bonyadi, M., et al., *TNF-alpha gene polymorphisms in Iranian Azari Turkish patients with inflammatory bowel diseases*. Saudi J Gastroenterol, 2014. **20**(2): p. 108-12.
136. Negoro, K., et al., *Crohn's disease is associated with novel polymorphisms in the 5'-flanking region of the tumor necrosis factor gene*. Gastroenterology. **117**(5): p. 1062-1068.
137. Qidwai, T. and F. Khan, *Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence*. Scand J Immunol, 2011. **74**(6): p. 522-47.
138. Ahmad, T., et al., *Mapping the HLA association in Behcet's disease: a role for tumor necrosis factor polymorphisms?* Arthritis Rheum, 2003. **48**(3): p. 807-13.
139. Chung, W.T., et al., *Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha promoter region for susceptibility to HLA-B27-positive ankylosing spondylitis in Korean population*. Rheumatol Int, 2011. **31**(9): p. 1167-75.
140. Sinha, S., et al., *Polymorphisms of TNF-enhancer and gene for FcgammaRIIIa correlate with the severity of falciparum malaria in the ethnically diverse Indian population*. Malar J, 2008. **7**: p. 13.
141. Rost, N.S., S.M. Greenberg, and J. Rosand, *The genetic architecture of intracerebral hemorrhage*. Stroke, 2008. **39**(7): p. 2166-73.
142. Liu, D., et al., *TNF promoter polymorphisms associated with muscle phenotypes in humans*. Journal of Applied Physiology, 2008. **105**(3): p. 859-867.
143. Medikare, V., et al., *Susceptibility Risk Alleles of -238G/A, -308G/A and -1031T/C Promoter Polymorphisms of TNF-alpha Gene to Uterine Leiomyomas*. Recent Adv DNA Gene Seq, 2015. **9**(1): p. 65-71.
144. Escobar-Morreale, H.F., et al., *TNF-alpha and hyperandrogenism: a clinical, biochemical, and molecular genetic study*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(8): p. 3761-7.
145. Sirotkovic-Skerlev, M., et al., *TNF alpha promoter polymorphisms analysis in benign and malignant breast lesions*. Exp Mol Pathol, 2007. **83**(1): p. 54-8.
146. Yun, J.H., et al., *The promoter -1031(T/C) polymorphism in tumor necrosis factor-alpha associated with polycystic ovary syndrome*. Reprod Biol Endocrinol, 2011. **9**: p. 131.

147. Salanti, G., et al., *Hardy-Weinberg equilibrium in genetic association studies: an empirical evaluation of reporting, deviations, and power*. Eur J Hum Genet, 2005. **13**(7): p. 840-8.
148. Montgomery, G.W., et al., *The search for genes contributing to endometriosis risk*. Hum Reprod Update, 2008. **14**(5): p. 447-57.
149. Asghar, T., et al., *The tumor necrosis factor-alpha promoter -1031C polymorphism is associated with decreased risk of endometriosis in a Japanese population*. Hum Reprod, 2004. **19**(11): p. 2509-14.
150. Zhao, Z.Z., et al., *Genetic variation in tumour necrosis factor and lymphotoxin is not associated with endometriosis in an Australian sample*. Hum Reprod, 2007. **22**(9): p. 2389-97.
151. Wieser, F., et al., *Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms and endometriosis*. J Soc Gynecol Investig, 2002. **9**(5): p. 313-8.
152. Saliminejad, K., et al., *Association study of the TNF-alpha -1031T/C and VEGF +450G/C polymorphisms with susceptibility to endometriosis*. Gynecol Endocrinol, 2013. **29**(11): p. 974-7.
153. Abutorabi, R., et al., *Evaluation of Tumor Necrosis Factor Alpha Polymorphism Frequencies in Endometriosis*. Int J Fertil Steril, 2015. **9**(3): p. 329-37.
154. Lee, G.H., et al., *Association of tumor necrosis factor-{alpha} gene polymorphisms with advanced stage endometriosis*. Hum Reprod, 2008. **23**(4): p. 977-81.
155. Lyu, J., et al., *Tumor necrosis factor gene polymorphisms and endometriosis in Asians: a systematic review and meta-analysis*. Chin Med J (Engl), 2014. **127**(9): p. 1761-7.
156. Li, J., et al., *Tumor necrosis factor and interleukin-6 gene polymorphisms and endometriosis risk in Asians: a systematic review and meta-analysis*. Ann Hum Genet, 2014. **78**(2): p. 104-16.
157. Higuchi, T., et al., *Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene in Japanese*. Tissue Antigens, 1998. **51**(6): p. 605-12.
158. Cui, G., et al., *Polymorphism of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene promoter, circulating TNF-alpha level, and cardiovascular risk factor for ischemic stroke*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 235.