

Ocena skuteczności szczepionki RESAN w immunoprofilaktyce i immunoterapii endometriozy – badanie eksperymentalne na modelu zwierzęcym.

Część II. Profilaktyka zrostów

The evaluation of the effectiveness of RESAN vaccine in the prophylaxis and the treatment of endometriosis – an experimental study with the animal model. Part II – prevention of the adhesions

Krzysztof Szymanowski¹, Karolina Chmaj-Wierzchowska¹, Joanna Niepsuj¹, Andrey Yanchanka², Ewa Florek³, Magdalena Barlik⁴, Tomasz Opala¹

¹Katedra i Klinika Zdrowia Matki i Dziecka, Uniwersytet Medyczny im K. Marcinkowskiego w Poznaniu; kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. med. Tomasz Opala

²Instytucja Naukowo-Badawcza RESAN w Witebsku, Białoruś

³Laboratorium Badań Środowiskowych Katedry i Zakładu Toksykologii, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu; kierownik Laboratorium: prof. dr hab. farm. Ewa Florek

⁴studentka Wydziału Lekarskiego, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Przegląd Menopauzalny 2007; 6: 323–328

Streszczenie

Wstęp: Liczne zrosty na powierzchni jajników i otrzewnej, powstałe w przebiegu endometriozy, są przyczyną nie tylko ciągłego bólu, ale i niepłodności. Szczepionka RESAN może wpłynąć na ograniczenie tworzenia się zrostów.

Cel pracy: Celem pracy było określenie skuteczności szczepionki RESAN w odniesieniu do formowania się zrostów otrzewnowych w badaniu eksperymentalnym na modelu zwierzęcym.

Materiał i metody: 58 dojrzałych szczurzyk podzielono na trzy grupy. W I etapie podano szczepionkę RESAN w grupie I (n=24). W II etapie po 3 mies. wszczepiono endometriozę w grupach I i II (n=24). Grupę III (n=10) stanowiła kontrola, w której wykonano laparotomię bez wszczepienia endometriozy. Po kolejnych 3 mies. we wszystkich grupach usunięto ogniska powstałej endometriozy. Dodatkowo w grupie II podano RESAN w celach leczniczych (etap III). Po 3 mies. ponownie oceniono ewentualne ogniska endometriozy. Pobrane fragmenty oceniano histologicznie (etap IV).

Wyniki: W grupie I w III etapie uwidoczniło się zrosty na otrzewnej u 14 z 23 szczurów. U 9 szczurzyk nie stwierdzono żadnych zmian. W 4. etapie nie stwierdzono żadnych zmian makroskopowych w otrzewnej zwierząt z grupy I. W grupie II podczas III etapu zrosty wokół endometrium ektopowego występowały u 11 zwierząt, a wokół linii cięcia u 6. W 3 przypadkach stwierdzono obecność obu postaci zrostów. Podczas IV etapu w grupie II tylko u 3 zwierząt wystąpiły liczne zrosty wokół wszczepu tkankowego. W grupie III nie stwierdzono żadnych zmian o charakterze zrostów.

Wniosek: Przedoperacyjne i pooperacyjne zastosowanie szczepionki RESAN zmniejsza liczbę tworzących się zrostów w eksperymentalnym modelu endometriozy.

Słowa kluczowe: endometrioza, szczepionka, immunoprofilaktyka, immunoterapia, szczur

Summary

Objective: The aim of our study was to evaluate the effectiveness of RESAN vaccine in prevention of adhesions formation in experimental animal study.

Material and methods: The group of 58 sexually mature female rats was divided into three smaller groups. During the first step of experiment RESAN vaccine was injected among the group I of rats (n=24). Three months later during the 2-nd step of examination endometriosis was implanted in the groups I and II (n=24). Group III (n=10) was a control group where sham operations were performed. Three months after endometrial implants were removed and examined histologically. Meantime RESAN vaccine was injected as a treatment

Adres do korespondencji:

dr hab. med. **Krzysztof Szymanowski**, ul Kasztelańska 18, 60-316 Poznań, tel. 605 54 28 83, e-mail: kp.szymanowski@wp.pl

i the group II (step 3). Three months later an excision of the suspected foci was performed with histological examination of the tissue samples (step 4).

Results: During the 3rd step we found peritoneal adhesions in 14 of 23 rats. In nine animals no adhesions were found. During the 4th step of examination no macroscopic changes were found in the group I. Among the group II there were adhesions near the ectopic endometrium in 11 rats. Near the cut line there were adhesions in 6 rats. Three of the animals had the adhesions of both types. During the 4th step of experiment only 3 rats had adhesions. There were no adhesions in the control group.

Conclusion: Pre- and postoperative RESAN vaccination reduces adhesion formation in the animal model of endometriosis.

Key words: endometriosis, vaccine, immunoprophylaxis, immunotherapy, rat

Zrosty, mające przeważnie postać cienkich pasm tkanki łącznej, są to patologiczne połączenia pomiędzy powierzchniami otrzewnej trzewnej i/lub ściennej [1]. Formowanie się pooperacyjnych zrostów otrzewnowych zależy zarówno od rodzaju i rozległości przeprowadzane go zabiegu, jak i stanu ogólnego oraz układu immunologicznego pacjentki. Przyczyną ich powstawania są najczęściej urazy i niedotlenienie tkanek podczas operacji chirurgicznych i ginekologicznych, a także stosowane w trakcie zabiegów rękawice talkowane i materiały chirurgiczne. Ponadto do powstawania *de novo* zrostów otrzewnowych na powierzchni narządów miednicy mniejszej dochodzi także w przypadku przewlekłych stanów zapalnych miednicy mniejszej i w przebiegu endometriozy.

Stopień odczuwania bólu w endometriozie nie jest proporcjonalny do stopnia zaawansowania choroby i rozległości zrostów. Niestety, związek między obecnością zrostów a natężeniem bólu nie jest do końca poznany. Statystycznie częściej dolegliwości bólowe towarzyszą cienkim zrostom w przebiegu endometriozy jajnikowej oraz minimalnej i łagodnej endometriozie (głównie w I i II stopniu zaawansowania klinicznego) [2]. Być może takie zrosty, umiejscowione na powierzchni jajników i otrzewnej, poprzez ciągłe zmiany napięcia i anatomii, są przyczyną przewlekłego bólu [3]. Wydaje się także, iż obecność włókien nerwowych w obrębie zrostów może być przyczyną dolegliwości bólowych odczuwanych przez pacjentkę [1, 4, 5]. Jednakże w wytworzonej w przebiegu endometriozy tkance łącznej zrostów występują głównie komórki zapalne, rzadziej nerwowe [4].

Powstałe w przebiegu choroby liczne zrosty upośledzają prawidłowe funkcjonowanie narządów wewnętrznych. W III i IV stopniu zaawansowania klinicznego wytworzone zrosty okołojajnikowe i jajowodowe są prawdopodobnie główną przyczyną niepłodności. Zmienione strzępki lub zarośnięte ujście brzuszne jajowodu nie jest w stanie przechwycić oocyta lub też może nie dochodzić do owulacji wskutek licznych zrostów tkankowych [6].

Zalecanym sposobem postępowania terapeutycznego w endometriozie jest leczenie chirurgiczne. Jajniki i jajowody są jednak szczególnie podatne na pooperacyjne tworzenie się zrostów. Ponowne ich formowanie po zabiegach na przydatkach (po wycięciu torbieli czy zmian endometrioidalnych lub w przypadku obustron-

nej klinowej resekcji jajników) obserwuje się aż u 90% kobiet [7]. Już w 8. dniu po zabiegach laparoskopowych, odtwarzających ciągłość jajowodów, oraz po plastyce strzępków lub po rozdzielaniu zrostów okołojajowodowych w 50% przypadków stwierdza się ich powtórne wytwarzanie [8]. Makroskopowy wygląd zrostów pozwala natomiast wstępnie ocenić ryzyko ich ponownego formowania się. Zrosty grube i w konglomeratach tkankowych mają większą tendencję do ponownego tworzenia się niż cienkie i przezroczyste. Cienkie pasma tkanki łącznej częściej towarzyszą natomiast endometriozie.

We wstępnych badaniach klinicznych dotyczących leczenia endometriozy zespół dr. Ovsienko zastosował szczepionkę RESAN. Wśród 24 kobiet z rozpoznaną endometriozą miednicy mniejszej po zakończeniu doświadczenia zaobserwowano zmniejszenie się wymiarów torbieli endometrialnych oraz mięśniaków macicy, a poziomy osoczowych markerów nowotworowych uległy istotnemu statystycznie obniżeniu [10]. Niestety, doświadczenie to nie zostało szczegółowo udokumentowane, a badana grupa była nieliczna i niejednorodna. Ponadto nie zwrócono uwagi na obecność zrostów otrzewnowych towarzyszących endometriozie. Należy zatem uznać, iż wyciąganie wniosków z cytowanego badania klinicznego nie jest możliwe.

Cel pracy

Celem pracy było określenie skuteczności szczepionki RESAN, zastosowanej w profilaktyce i leczeniu endometriozy miednicy mniejszej, w badaniu eksperymentalnym na modelu zwierzęcym, w odniesieniu do formowania się zrostów otrzewnowych.

Materiał i metody

Materiał do badań doświadczalnych stanowiło 58 dojrzałych szczyrzc szczepu Wistar. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu. Osoby biorące udział w eksperymencie miały zezwolenia indywidualne.

Ekspierymnt przeprowadzono zgodnie z zaleceniami Ministerstwa Edukacji i Szkolnictwa Wyższego z 1959 r., jak i Światowej Deklaracji UNESCO odnośnie praw zwierząt z Paryża z 1978 r.

Zwierzęta przebywały w Katedrze i Zakładzie Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Szczury trzymane w plastikowych klatkach, w pomieszczeniu o stałej temperaturze (21°C) i wilgotności, z ciągłym dostępem do paszy i wody pitnej. Znormalizowana dieta szczurów zawierała 24% białka i była taka sama dla wszystkich zwierząt.

Szczepionka RESAN ma w składzie kompleksy molekuł więcej niż 40 różnych substancji. Szczegółowy skład szczepionki chroniony jest patentem RB nr 542883. Występuje pod postacią krystalicznego proszku (200 mg), który należy uzupełnić 0,9% solą fizjologiczną do objętości 1 ml.

Metodyka badania została szczegółowo opisana w części I pracy. Zwierzęta, w wieku ok. 4 mies. i o wadze 200–300 g, zostały podzielone na III grupy. Grupa I obejmowała 24 szczurzyce, którym na 3 mies. przed przystąpieniem do wszczepienia endometriozy, podano profilaktycznie szczepionkę. Grupie II (n=24) po usunięciu ognisk endometriozy z otrzewnej ściennej jamy brzusznej podano RESAN w celach leczniczych. Grupę III stanowiła grupa kontrolna (n=10), w której pominięto podanie szczepionki oraz wszczepienie endometriozy. Po przecięciu rogu macicy i założeniu szwów hemostatycznych, wolne końce pozostawiono w jamie otrzewnowej (*sham operation*). Na otrzewną założono szwy nylonowe, takie jak w grupach I i II podczas wszczepienia endometriozy. Podczas wszystkich operacji zwierzęta znieczulano pentobarbitalem.

Pierwszy etap badań polegał na podaniu szczepionki 24 szczurom, na 3 mies. przed planowanym wszczepieniem endometriozy (grupa I). Etap II eksperymentu to wszczepienie fragmentów endometrium do otrzewnej 48 szczurów (24 uprzednio zaszczepionym z grupy I i 24 zwierzętom z grupy II, którym wcześniej nie podano immunoprofilaktyki). W grupie III przecięto róg macicy i założono szwy hemostatyczne oraz szew na otrzewną. W etapie III usunięto fragmenty otrzewnej ściennej i materiału tkankowego z miejsca, gdzie 3 mies. wcześniej zostały wszczepione implanty endometrium. Równocześnie zwierzętom, które wcześniej nie zostały zaszczepione, podano RESAN (grupa II). Etap IV – po kolejnych 3 mies. – to ocena skuteczności leczenia endometriozy.

Utrwalone tkanki skrojono na mikrotomie, a następnie w sposób typowy przeprowadzono barwienie hematoxyliną i eozyną. W mikroskopie świetlnym dokonano oceny histologicznej wybarwionych preparatów w sposób ślepy, poszukując wykładników endometriozy. Wszystkie dodatnie preparaty zostały skonsultowane z drugim histopatologiem.

W ocenie makroskopowej za kryterium rozpoznania endometriozy przyjęto występowanie pęcherzyków (torbielek) wypełnionych przezroczystą treścią płynną i/lub cienkich zrostów wokół wszczepu, i/lub ognisk przekrwienia na otrzewnej ściennej jamy brzusznej.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu testu Fishera. Za poziom istotności statystycznej przyjęto wartość $p < 0,05$.

Wyniki

Z powodu powikłań okołoperacyjnych zwierzęta nr 12 i 30 oddano do utylizacji.

W grupie I na 3 mies. przed wszczepieniem endometriozy podano immunoprofilaktykę preparatem RESAN (w I etapie eksperymentu). Podczas laparotomii kontrolnej (w III etapie badania doświadczalnego), po 3 mies. od wszczepienia endometrium ektopowego (II etap badania) i po 6 mies. od podania szczepionki (I etap doświadczenia) rozwój implantów w ocenie mikroskopowej potwierdzono u jednego z zaszczepionych zwierząt. W barwionych preparatach od pozostałych 22 szczurzyce nie stwierdzono wykładników histologicznych endometriozy.

Zrosty na otrzewnej uwidoczniono u 14 z grupy 23 szczurów (poza zrostami wokół wszczepu ektopowego endometrium dostrzeżonymi u 1 z nich, stwierdzono zrosty w linii cięcia u 11 zwierząt oraz zrosty wokół implantu łącznie ze zrostami w linii cięcia w 2 przypadkach). Zrosty wokół wszczepu były cienkie i przezroczyste, a w linii cięcia grube i tworzące konglomeraty tkankowe. Otrzewną bez zrostów stwierdzono u 9 z 23 szczurzyce.

Podczas ponownego otwarcia jamy brzusznej, po 3 mies. od wycięcia zmian z otrzewnej ściennej jamy brzusznej (w IV etapie pracy), nie stwierdzono żadnych zmian makroskopowych na otrzewnej.

Grupę II stanowiły 23 szczury, którym po usunięciu uprzednio wszczepionych implantów z otrzewnej ściennej jamy brzusznej podano preparat RESAN w celach leczniczych. Podczas laparotomii (III etapu badania), po 3 mies. od wszczepienia endometriozy (II etap doświadczenia), rozwój implantów w ocenie mikroskopowej uzyskano u 16 zwierząt. U pozostałych 7 szczurzyce nie stwierdzono wykładników morfologicznych endometriozy.

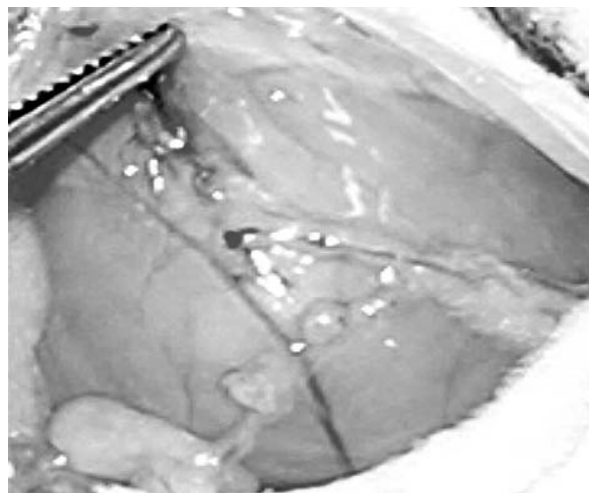
Zrosty wokół ektopowego endometrium dostrzeżono u 11 z 23, a w linii cięcia u 6 zwierząt. Zrosty wokół implantu łącznie ze zrostami w linii cięcia występowały w 3 przypadkach. Otrzewną bez widocznych zrostów, ale z ogniskami wzmożonego rysunku naczyńniowego stwierdzono u 3 szczurzyce.

Podczas kolejnej laparotomii, w 3. mies. od wycięcia zmian z otrzewnej i podaniu pojedynczej dawki terapeutycznej RESAN (w 4. etapie pracy doświadczalnej) u 3 z 16 zwierząt, u których uprzednio na podstawie oceny mikroskopowej rozpoznano endometriozę, stwierdzono liczne i grube zrosty występujące w konglomeracie łącznotkankowym wokół wszczepu tkankowego. U 1 z 16 zwierząt uwidoczniono zrosty w linii cięcia. U pozostałych 12 szczurzyce żadnych zmian makroskopowych i mikroskopowych na otrzewnej oraz w jamie brzusznej nie stwierdzono. Histologiczna ocena pobranych wycinków pozwoliła wykluczyć obecność endometriozy.

W kontrolnej grupie III (n=10) u żadnego zwierzęcia nie stwierdzono zmian makroskopowych i mikroskopowych na otrzewnej ściennej, w miejscu założenia szwu

Tab. I. Procentowe porównanie obecności zrostów tkankowych w I i II grupie, III i IV etapu doświadczenia

Cecha	Odsetek			
	Grupa I (n=23) etap III	Grupa II (n=23) etap III	Grupa I (n=23) etap IV	Grupa II (n=23) etap IV
zrosty				
• wokół wszczepu	4,4%	47,8%	0%	13%
• w linii cięcia	47,8%	26,2%	0%	13%
• wokół wszczepu i w linii cięcia	8,7%	13%	0%	0%
• nie stwierdzono	39,1%	13%	0%	74%

**Ryc. 1.** Cienkie zrosty wokół wszczepu tkankowego z cechami endometriozy w badaniu histologicznym

nylonowego. Grupa ta nie była poddana ani immunoprofilaktyce, ani immunoterapii preparatem RESAN.

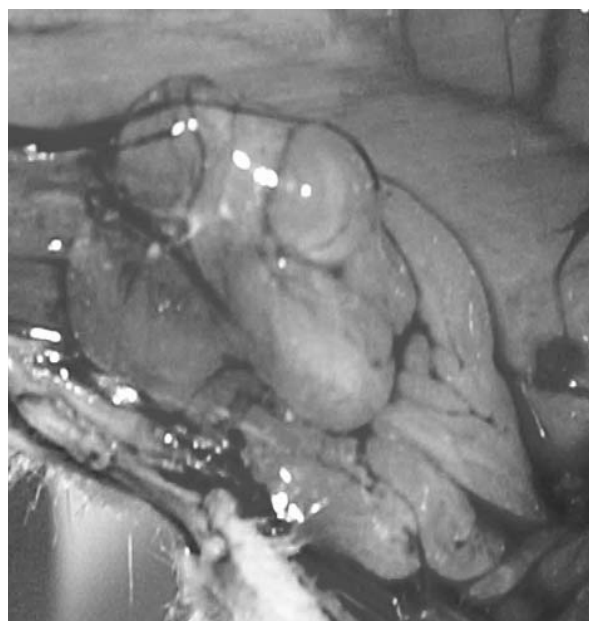
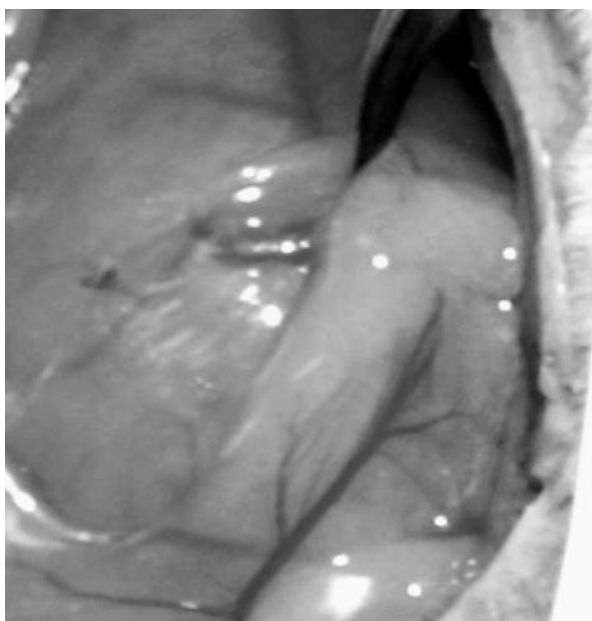
Procentowe zestawienie występowania zrostów tkankowych w I i II grupie, III i IV etapu doświadczenia, przedstawiono w tab. I.

Dyskusja

Wytworzone w badaniu eksperymentalnym zrosty otrzewnowe u szczurów różniły się wyglądem oraz miejscem ich wytworzenia. Cienkie i przezroczyste (ryc. 1) występowały głównie tam, gdzie po wycięciu zmiany, potwierdzano obecność endometriozy. Grube i w kon-

glomeratach tkankowych (ryc. 2.) nie miały związku z endometriozą, niezależnie od tego, czy zastosowano immunoprofilaktykę czy immunoterapię. Można sądzić, iż powodem ich tworzenia był odczyn zapalny, który łączył się z założeniem ciągłego szwu wchłanialnego na ranę powłoki. W miejscu wszczepienia ogniska endometriozy widoczne były szwy nylonowe niewchłanialne, niepowodujące dodatkowych odczynów (w ocenie mikroskopowej).

W III etapie badania, po podaniu pojedynczej dawki preparatu RESAN (w grupie I), zrosty wokół wszczepu tkanki endometrialnej występowały tylko u 4,4% zwierząt. W grupie II uwidoczniono zrosty u 47,8% szczurów.

**Ryc. 2.** Masywne konglomeraty łącznotkankowe i ognisko resorpcji wokół szwu, bez cech endometriozy w badaniu mikroskopowym

Po usunięciu implantu wraz z otaczającymi go zrostami, podano wszystkim zwierzętom z grupy II RESAN w pojedynczej dawce terapeutycznej. Po 3 mies. i ponownym otwarciu, grube zrosty i w konglomeratach łącznotkankowych, w okolicy pierwotnej zmiany wytworzyły się tylko u 3 zwierząt. Proporcja występowania zrostów wokół wszczepu tkankowego wynosiła odpowiednio w I i II grupie: 0,0435 i 0,6957 i była to różnica istotna statystycznie ($p=0,0009$). W prospektywnym badaniu z randomizacją Luciano i wsp. [11] zaobserwowali ponowne formowanie się i powstawanie *de novo* zrostów u wszystkich królików, 3 tyg. po ich uprzednim wycięciu w trakcie laparotomii [11]. Natomiast w badaniach doświadczalnych nad rozwojem endometriozy u szczurów laboratoryjnych zaobserwowano pojawienie się zrostów po 3 i 6 tyg. od wszczepienia endometriozy, odpowiednio u 3 i 4 szczurzy (z poddanej ocenie grupy 12 zwierząt). Zrosty wytworzone wokół miejsc wszczepienia ektopowego endometrium były cienkie i przezroczyste [12]. W innym badaniu eksperymentalnym, po 90 dniach od pierwszego otwarcia jamy brzusznej i ektopowej implantacji błony śluzowej macicy, obecność zrostów otrzewnowych stwierdzono u 17 z 28 szczurów szczepu Wistar [13–15].

Na podstawie powyższych obserwacji można przypuszczać, że prawdopodobnie zrosty te nie powstały tylko w wyniku samej operacji. W grupie I tak mała ich liczba mogłaby być skutkiem podania pojedynczej dawki preparatu RESAN, który wpłynął na układ immunologiczny zwierząt. Natomiast w grupie II wytworzone liczne zrosty były reakcją odczynową na rodzaj i rozległość przeprowadzanego zabiegu. Zrosty wokół ognisk endometriozy mogą świadczyć również np. o istniejącej chorobie, której nie udało się potwierdzić badaniem histologicznym. Taka różnica w ilości zrostów wokół wszczepionego implantu, w grupie I i II, może być skutkiem czasu potrzebnego na przygotowanie odpowiedzi immunologicznej organizmu. Zgodnie z danymi producenta szczepionki, pełną odpowiedź immunologiczną uzyskuje się po 8 tyg. od podania preparatu [10]. Jeśli przeprowadzamy ten sam typ operacji u szczurów, a odsetek zrostów jest w grupie uprzednio szczepionych zwierząt istotnie niższy, można przypuszczać, że operacje wykonano w zupełnie odmiennych warunkach immunologicznych. Właściwości immunostymulujące szczepionki wynikają z tego, że po wprowadzeniu do organizmu, za pośrednictwem monocytów i makrofagów, pobudzona zostaje komórkowa odpowiedź immunologiczna. Można przypuszczać, że zastosowana w doświadczeniu autorów niniejszej pracy szczepionka RESAN wpłynęła na przywrócenie pierwotnej równowagi Th1/Th2, a zatem doprowadziła do pobudzenia odpowiedzi komórkowej. Szczepienie lecznicze nie mogło wpłynąć na ograniczenie odsetka zrostów, bowiem zrosty powstają w okresie pierwszych 24–48 godz. po operacji.

Pozostaje jednak kwestia braku zrostów w grupie III. Wydaje się, że wpłynęły na to dwa elementy. Jednym może być fakt, że obecność immunogenego ciała obcego

w postaci fragmentu endometrium w grupie I i II spowodowało wydzielanie cytokin prozapalnych, ułatwiających tworzenie się zrostów. Drugim czynnikiem, prawdopodobnie odpowiedzialnym za brak zmian na otrzewnej, był obiektywnie krótszy czas operacji. W grupie III nie wykonywano procedury wszczepienia fragmentu endometrium. Należy zaznaczyć, że to właśnie przygotowanie endometrium do implantacji było najbardziej czasochłonne, a czas otwarcia jamy otrzewnowej jest niewątpliwie jednym z elementów wpływających na tworzenie zrostów. Wydaje się zatem, że profilaktyka zrostowa powinna polegać na zmniejszaniu urazu i ograniczaniu niedotlenienia tkanek podczas zabiegów, stosowaniu nici i innych materiałów chirurgicznych niepowodujących powstawania reakcji wokół ciała obcego oraz zmniejszaniu ryzyka zakażenia drobnoustrojami i rozwoju stanu zapalnego. Ważne jest również ograniczenie dostępu powietrza, co ma miejsce podczas zabiegów laparoskopowych. Jednak nie można wykluczyć, iż mniejsza liczba wytworzonych zrostów otrzewnowych w prezentowanym modelu doświadczalnym endometriozy wynikała także z przedoperacyjnego i pooperacyjnego zastosowania szczepionki RESAN.

Wiele pytań nasuwających się po podsumowaniu wyników powyższego badania eksperymentalnego na modelu zwierzęcym endometriozy pozostaje nadal bez odpowiedzi. Czy zastosowanie drugiej i trzeciej dawki nie wpłynęłoby na radykalną poprawę uzyskanych wyników leczenia? Jakie szczegóły kryją się w zmienionej odpowiedzi immunologicznej? Kiedy i u kogo można zastosować szczepionkę? Niezależnie od powyższych wątpliwości, uzyskane w pracy wyniki zachęcają do dalszych badań.

Wniosek

Przedoperacyjne i pooperacyjne zastosowanie szczepionki RESAN zmniejsza liczbę tworzących się zrostów w modelu eksperymentalnym endometriozy.

Piśmiennictwo

1. Pietrzycki B, Jóźwik M, Jóźwik M i wsp. Ocena skuteczności leczniczej preparatu Distreptaza w przewlekłym zespole bólowym miednicy mniejszej u kobiet. *Gin Prakt* 2004; 12: 17-22.
2. Parazzini F. Adhesions and pain in women with first diagnosis of endometriosis: results from a cross-sectional study. *J Minimal Invasive Gynecol* 2006; 13: 49-54.
3. Harada T, Iwabe T, Terakawa N. Role of cytokines in endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 7: 6-10.
4. Tulandi T, Chen MF, Al-Took S, Watkin K. A study of nerve fibers and histopathology of postsurgical, postinfectious, and endometriosis-related adhesions. *Obstet Gynecol* 1998; 92: 766-8.
5. Kligman I, Drachenberg C, Papadimitriou J, Katz E. Immunohistochemical demonstration of nerve fibers in pelvic adhesions. *Obstet Gynecol* 1993; 82: 566-8.
6. Kumar J, Ng SC. Treatment of infertility associated with endometriosis. *Curr Obstet Gynaecol* 1998; 8: 197-203.
7. Pittaway DE, Daniell JF, Maxson WS. Ovarian surgery in an infertility patient as an indication for a short-interval second look laparoscopy: A preliminary study. *Fertil Steril* 1985; 44: 611-4.

8. Trimbos-Kemper TCM, Trimbos JB, van Hall EV. Adhesion formation after tubal surgery: Results of the eighth-day laparoscopy in 188 patients. *Fertil Steril* 1985; 43: 395-400.
9. Parker J, Sinaii N, Segars J, et al. Adhesion formation after laparoscopic excision of endometriosis and lysis of adhesions. *Fertil Steril* 2005; 84: 1457-61.
10. www.anticancer.net/resan
11. Hammond A, Gago A, Diamond M. Adhesions in patients with chronic pelvic pain: a role for adhesiolysis? *Fertil Steril* 2004; 82: 1483-91.
12. Jędrzejczak P, Szymanowski K, Skrzypczak J i wsp. Eksperymentalny model endometriozy u szczurów. *Gin Pol* 1990; 61: 387-91.
13. Szymanowski K, Florek E, Mikołajczyk M, et al. Integrin pattern in rats endometrium after endometriosis induction. *Pol J Gynaecol Invest* 2002; 5: 293-8.
14. Szymanowski K, Mikołajczyk M, Rączyńska R, et al. Integrin pattern in rats endometrium after endometriosis excision. *Pol J Gynaecol Invest* 2002; 5: 299-302.
15. Szymanowski K. Ocena ekspresji wybranych integryn, metaloproteinaz, cytokin oraz nasilenia apoptozy w błonie śluzowej jamy macicy u kobiet z endometriozą małego stopnia. *Seminaria z Medycyny Perinatalnej*. Tom XI. Ośrodek Wydawnictw Naukowych. Poznań 2004; 7-80.