

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

Część III – czy konieczne jest histologiczne potwierdzenie endometriozy?

The evaluation of the effectiveness of RESAN vaccine in the prophylaxis and the treatment of endometriosis – an experimental study with an animal model. Part III – Is the histological confirmation of diagnosis necessary?

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, Witebsk, Republika Białoruś

³Laboratorium Badań Środowiskowych, Katedra i Zakład 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 2008; 1: 23–28

Streszczenie

Wstęp: Zgodnie z rekomendacją ESHRE (*European Society of Human Reproduction and Embryology*) endometriozę głęboką i naciekającą oraz w postaci zmian torbielowatych należy potwierdzić histopatologicznie.

Cel pracy: Celem pracy było porównanie wstępnego i ostatecznego rozpoznania endometriozy w badaniu eksperymentalnym na modelu zwierzęcym.

Materiał i metody: Grupę 58 dojrzałych szczuryc podzielono na 3 mniejsze 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). Zwierzętom z grupy kontrolnej – III (n=10), wykonano laparotomię bez wszczepienia endometriozy w otrzewną. Po kolejnych 3 mies. we wszystkich grupach usunięto i oceniono histologicznie ogniska powstałej endometriozy. Dodatkowo w grupie II podano RESAN w celach leczniczych (etap III). Po 3 mies. ponownie dokonano oceny makroskopowej i mikroskopowej ewentualnych ognisk endometriozy (etap IV). Za kryterium rozpoznania endometriozy w ocenie makroskopowej przyjęto występowanie jednej i więcej z wymienionych cech – obecność pęcherzyków i/lub zrostów wokół wszczepu, i/lub ognisko przekrwienia na otrzewnej ściennej jamy brzusznej.

Wyniki: W grupie I makroskopowo endometriozę rozpoznano u 5 z 23 zwierząt. Po weryfikacji histologicznej potwierdzono ją tylko u 1 szczura. W IV etapie doświadczenia u żadnego ze zwierząt z grupy I nie rozpoznano cech endometriozy. W grupie II na III etapie badań endometriozę podejrzewano u 21 szczurów. W ocenie mikroskopowej diagnozę potwierdzono u 16 zwierząt. W IV etapie badań u 12 spośród 16 zwierząt ze zdiagnozowaną wcześniej endometriozą nie stwierdzono zmian w ocenie makroskopowej i mikroskopowej.

Wnioski: Makroskopowe rozpoznanie ognisk endometriozy zawsze powinno być potwierdzone badaniem histopatologicznym.

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

Summary

Introduction: According to ESHRE guidelines each case of deep and infiltrating endometriosis or endometriosis with endometrial cysts needs to be histopathologically diagnosed.

Objective: The aim of this study was to compare preliminary and conclusive diagnoses of endometriosis during experimental study with an animal model.

Material and methods: A group of 58 sexually mature female rats was divided into three smaller groups. During the first step of the experiment RESAN vaccine was injected among rats of group I (n=24). Three months

Adres do korespondencji:

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

later during the 2nd step of examination endometriosis was implanted in groups I and II (n=24). Group III (n=10) was a control group where sham operations were performed. Three months later, endometrial implants were removed and examined histologically. Meanwhile RESAN vaccine was injected as a treatment in group II (step 3). Three months later an excision of the suspected foci was performed with histological examination of the tissue samples (step 4). Cysts and/or adhesions surrounding the implant and/or congestion foci were treated as endometriosis markers.

Results: In group I endometriosis was macroscopically diagnosed in 5 cases, but histologically confirmed just in 1 rat. During the 4th step there were no endometriosis markers in group I. During the 2nd step of the experiment endometriosis was suspected in 21 rats and confirmed in 16 cases. Three months later, 12 among 16 rats with endometriosis did not have any signs of that disease in preliminary and conclusive examination.

Conclusions: Every macroscopic diagnosis of endometriosis needs to be confirmed with histological examination.

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

Wstęp

Ektopowa błona śluzowa macicy w endometriozie jest zlokalizowana głównie na otrzewnej, powierzchni jajników i więzadle szerokim, jak również na więzadle krzyżowo-macicznym i w zatoce Douglasa. Zmiany powierzchniowe na przydatkach i torbiele endometrialne występują nieco częściej (ok. 40–60%) po stronie lewej, co prawdopodobnie wynika z warunków anatomicznych [1]. Endometrioza rzadziej jest obserwowana na powierzchni jelit i pęcherza moczowego, bardzo rzadko dotyczy moczowodu i nerki [2]. Opisywane są kazuistyczne przypadki endometriozy w gruczole Bartholina i w pępku [3, 4]. Endometrioza w pępku dotyczy ok. 0,5–1% zewnątrznarządowej lokalizacji choroby. W ok. 30% przypadków powstaje w wyniku operacji laparoskopowych [4]. Stosunkowo często dochodzi natomiast do rozwoju endometriozy powierzchniowej na szyjce macicy po zabiegach usunięcia nadżerki. Endometrioza występuje także w powłokach brzusznych u kobiet po cięciach cesarskich i w bliźnie po nacięciu krocza (po porodach fizjologicznych).

Ponadto ogniska endometriozy różnią się nie tylko umiejscowieniem, ale także stopniem zabarwienia, wynikającym z obecności złogów hemosyderyny oraz wyglądem zmian [5, 6]. Typowymi postaciami są żółtobrązowe ogniska lub wyraźnie widoczne pęcherzyki wypełnione przezroczystą treścią płynną [5]. Zmiany mogą także przyjmować postać białych nalotów lub czerwonych plam, ognisk rozszerzonych naczyń krwionośnych lub punktowych wybroczyn oraz kulistych i nieregularnych ubytków otrzewnej. Wygląd ognisk pozwala przypuszczać, czy jest to postać aktywna endometriozy (endometrioza czerwona), czy też stare, nieaktywne lub o niskiej aktywności zmiany (endometrioza brunatna i czarna bądź biała odpowiadająca złogom hemosyderyny lub zrostom).

Wstępne rozpoznanie endometriozy jest ustalane na podstawie wywiadu, badania ginekologicznego i ultrasonograficznego oraz oznaczeń laboratoryjnych. Ostatecznie potwierdzenie choroby następuje po uwidocznieniu ognisk endometriozy w ocenie mikroskopo-

wej. W barwionym hematoksyliną i eozyną (H+E) preparacie endometriozę rozpoznaje się w przypadku występowania gruczołów endometrialnych, elementów nabłonka endometrialnego bądź charakterystycznego podścieliska z makrofagami obładowanymi hemosyderyną.

Rekomendacje ESHRE (*European Society of Human Reproduction and Embryology*) z 2005 r. określają dość jednoznacznie diagnostykę i sposób terapii endometriozy w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego i oczekiwań pacjentki. W przypadku zmian torbielowatych w przydatkach o echogenności typowej dla endometriozy (o średnicy większej niż 3 cm) oraz w głębokiej i naciekającej formie konieczne jest wykonanie badania histologicznego. Podczas oceny mikroskopowej należy dążyć do potwierdzenia wstępnego rozpoznania endometriozy oraz wykluczyć ewentualne zmiany nowotworowe. Jednakże u pacjentek z objawami bólowymi, sugerującymi endometriozę nie jest konieczne histopatologiczne potwierdzenie choroby [7].

Celem pracy było porównanie wstępnego i ostatecznego rozpoznania endometriozy w badaniu eksperymentalnym na modelu zwierzęcym.

Materiał i metody

Badanie doświadczalne przeprowadzono zgodnie z zaleceniami Ministerstwa Edukacji i Szkolnictwa Wyższego z 1959 r. oraz Światowej Deklaracji UNESCO z 1978 r. odnośnie do praw zwierząt, po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu, na 58 dojrzałych szczurzych szczepu Wistar. Wszystkie uczestniczące w eksperymencie osoby miały indywidualne zezwolenia na prowadzenie doświadczeń na zwierzętach.

Szczury przebywały w pomieszczeniu o stałej wilgotności i temperaturze (21°C), w plastikowych klatkach, z ciągłym i nieograniczonym dostępem do paszy i wody pitnej. Znormalizowana dieta zawierała 24% białka i była taka sama dla wszystkich zwierząt.

Skład podawanej szczepionki chroniony jest patentem RB nr 542883. Szczepionkę pod postacią krystalicznego proszku (200 mg) należy uzupełnić 0,9-procentową solą fizjologiczną do objętości 1 ml.

Zwierzęta podzielono na trzy grupy. Szczurom (n=24) z grupy I 3 mies. przed przystąpieniem do wszczepienia endometriozы podano profilaktycznie pojedynczą dawkę szczepionki. W grupie II (n=24) zwierzętom, którym usunięto fragmenty otrzewnej ściennej jamy brzusznej, podano RESAN w celach leczniczych. W grupie III (kontrolnej) (n=10) pominięto podanie szczepionki oraz wszczepienie endometriozы, ale przecięto róg macicy i założono szwy hemostatyczne, a wolne końce pozostawiono w jamie otrzewnowej (ang. *sham operation*). Na otrzewną założono szwy nylonowe, takie jak w grupach I i II podczas wszczepienia endometriozы. Zwierzęta znieczulano pentobarbitem.

W I etapie badania podano szczepionkę 24 szczurom 3 mies. przed planowanym wszczepieniem endometriozы (grupa I). W etapie II eksperymentu wszczepiono fragment endometrium do otrzewnej 48 szczurów (24 uprzednio zaszczepionym z grupy I i 24 zwierzętom z grupy II, u których wcześniej nie zastosowano immunoprofilaktyki). W grupie III szczurzycom 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). W IV etapie badania po kolejnych 3 mies. oceniano skuteczność leczenia endometriozы.

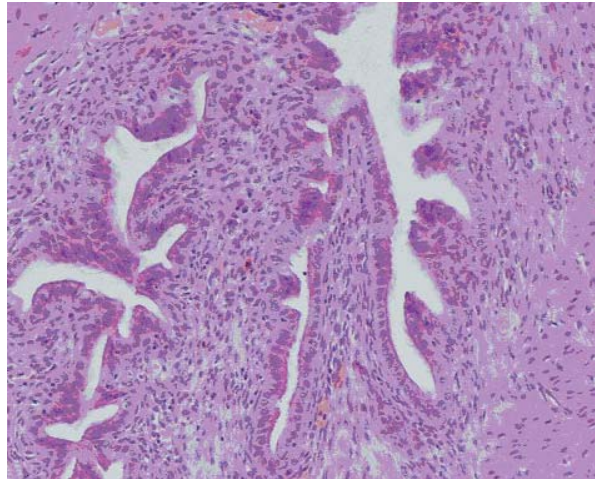
Szczegółowo metodyka doświadczenia została opisana w I części pracy.

Usunięte ogniska utrwalono w 4-procentowej zbuforowanej formalinie, a następnie skrojono na mikrotomie i w sposób typowy wybarwiono preparaty hematoksyliną i eozyną. Ocenę histologiczną w mikroskopie świetlnym wykonano w *sposób ślepy* (tzn. osoba oceniająca preparaty nie znała wyniku oceny makroskopowej), poszukując obecności gruczołów endometrialnych (ryc. 1), elementów nabłonka endometrialnego bądź elementów podścieliska endometrium z makrofagami obładowanymi hemosyderyną (ryc. 2.). Wszystkie dodatnie preparaty skonsultowano z drugim histopatologiem.

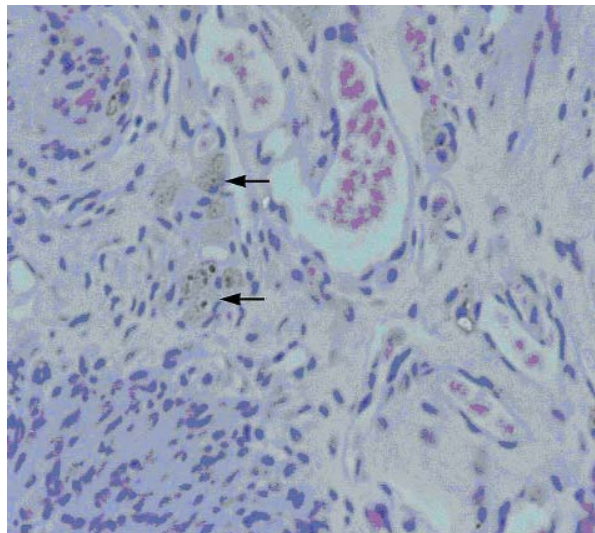
Za kryterium rozpoznania endometriozы w ocenie makroskopowej przyjęto występowanie jednej i więcej z wymienionych cech: obecność pęcherzyków (torbielek) wypełnionych przezroczystą treścią płynną i/lub obecność cienkich zrostów wokół wszczepu, i/lub wyraźnie wzmożony rysunek naczyniowy w postaci ogniska przekrwienia na otrzewnej ściennej jamy brzusznej.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej z użyciem jednostronnego testu Fishera, dla zdarzeń losowych za pomocą programu Statistica 7.1.

Za poziom istotności statystycznej przyjęto wartość $p < 0,05$.



Ryc. 1. Widoczne gruczoły endometrialne w ogniskach endometriozы



Ryc. 2. Podścielisko endometrium z makrofagami obładowanymi hemosyderyną (H+E)

Wyniki

W grupie I rozwój implantów w ocenie mikroskopowej potwierdzono u jednego z zaszczepionych zwierząt. W barwionych preparatach pochodzących od pozostałych 22 szczurzy nie stwierdzono wykładników histologicznych endometriozы.

Wstępne rozpoznanie endometriozы w ocenie makroskopowej ustalono u 5 z 23 zwierząt. Rozwój endometriozы podejrzewano po uwidocznieniu na otrzewnej ściennej jamy brzusznej:

- pęcherzyków wypełnionych przezroczystą treścią płynną u 4 z 5 szczurzy (licznych drobnych torbielek bądź większych o średnicy 4 i 6 mm),
- wzmożonego rysunku naczyniowego, tj. ogniska przekrwienia u 1 z 5 zwierząt i licznych zrostów wokół wszczepu u 3 z 5 zwierząt.

Po weryfikacji preparatów histopatologicznych potwierdzono endometriozę tylko u 1 szczura. Ponadto u 1 zwierzęcia rozpoznano torbiel prostą z odczynem zapalnym i u 1 ognisko resorpcji wokół szwu.

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 ani też żadnych zmian mikroskopowych.

W grupie II rozwój implantów w ocenie mikroskopowej uzyskano u 16 zwierząt. U pozostałych 7 szczuryc nie stwierdzono wykładników morfologicznych endometriozy.

Rozwój endometriozy w ocenie makroskopowej podejrzewano u 21 z 23 szczurów. Wstępne rozpoznanie endometriozy postawiono na podstawie uwidocznienia pęcherzyków endometrialnych u 11 z 21 (liczne drobne torbiele oraz o średnicy 2–6 mm), ognisk wzmożonego rysunku naczyniowego u 9 i licznych zrostów wokół implantu u 14 z 21 zwierząt. Po weryfikacji histopatologicznej preparatów potwierdzono endometriozę u 16 z 21, podczas gdy u pozostałych 5 zwierząt nie stwierdzono wykładników histologicznych endometriozy.

Podczas kolejnej laparotomii w 3 mies. od wycięcia zmian z otrzewnej i podaniu pojedynczej dawki terapeutycznej RESAN (w IV 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 szczuryc żadnych zmian makroskopowych i mikroskopowych na otrzewnej i w jamie brzusznej nie stwierdzano. Ocena histologiczna pobranych wycinków pozwoliła wykluczyć obecność endometriozy.

W grupie kontrolnej – III (n=10), u żadnego zwierzęcia nie stwierdzono zmian makroskopowych i mikroskopowych na otrzewnej ściennej w miejscu założenia szwu nylonowego. Grupa ta nie była poddana ani immunoprophylaktyce, ani immunoterapii pojedynczą dawką preparatu RESAN.

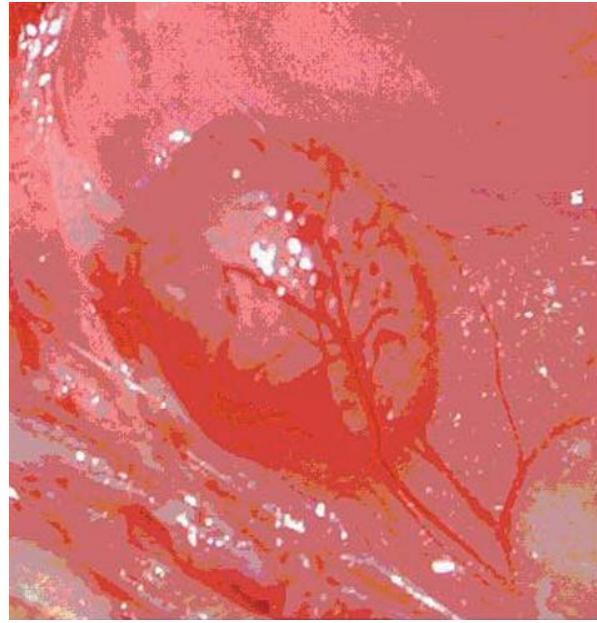
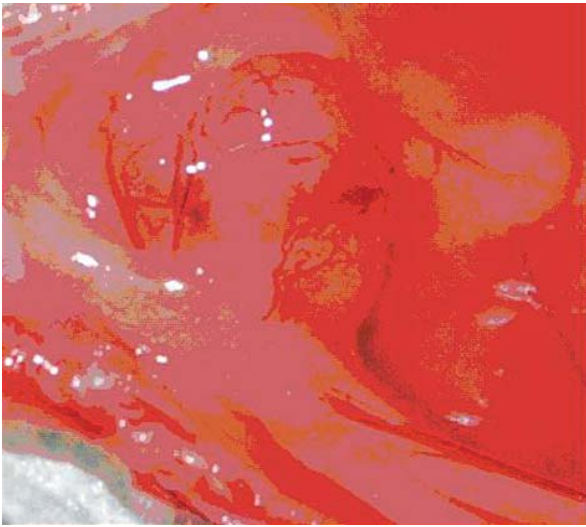
Dyskusja

Różnorodność zmian endometrialnych w miednicy mniejszej zależy od aktywności i lokalizacji toczącego się procesu chorobowego. W statych warunkach, po wszczepieniu fragmentów endometrium w otrzewną szczura rozwoju endometriozy można spodziewać się u ok. 75–100% zwierząt [8–10]. W doświadczalnym badaniu na modelu endometriozy u 36 szczurów uzyskano pozytywny rozrost wszczepionych implantów u wszystkich zwierząt, a powstałe ogniska endometriozy występowały w postaci brunatnych torbielek wypełnionych płynem. Różnice dotyczyły jedynie wielkości ognisk w 3. i 6. tyg. od operacji (po 3 tyg. średnica torbielek wy-

nosiła ok. 2–3 mm, podczas gdy po 6 tyg. obserwowane zmiany były wielkości 5–6 mm). Ponadto z grupy 12 zwierząt ocenianych po 3 i 6 tyg. stwierdzono pojawienie się zrostów odpowiednio u 3 i 4 szczuryc. Zrosty wytworzone wokół miejsc wszczepienia były cienkie i przezroczyste [8]. W innym badaniu eksperymentalnym przeprowadzonym na 28 szczurach szczepu Wistar wzrost endometriozy uzyskano u 21 zwierząt (75%) w postaci torbielek 2–5 mm (n=8) oraz drobnych ognisk przekrwienia (czerwonych i brunatnych wybroczyn) otoczonych zmienioną otrzewną (n=13). Ponadto u 17 z nich stwierdzono obecność zrostów. Faza cyklu płciowego nie wpływała na liczbę pozytywnych wszczepów (rozrost endometriozy uzyskano u 10 z 13 operowanych w pierwszej fazie cyklu oraz u 11 z 15 zwierząt poddanych zabiegowi w drugiej fazie cyklu płciowego) [9–11].

W niniejszym doświadczeniu uzyskano rozrost endometriozy u 1 z 23 szczurów (4,4%) w grupie I i u 16 z 23 zwierząt (70%) w grupie II, który występował pod postacią drobnych pęcherzyków i/lub ognisk przekrwienia, i/lub licznych, cienkich i przezroczystych zrostów wokół implantu. Badania histopatologiczne wykazały, że wszczepiony do jamy otrzewnowej fragment endometrium zawiera podścielisko i gruczoły endometrialne, jak również makrofagi obciążone złogami hemosyderyny. Jednak odsetek wstępnego rozpoznania endometriozy (w ocenie makroskopowej) i jego ostatecznego potwierdzenia (w ocenie mikroskopowej) różnił się znacznie w badaniu prezentowanym w niniejszej pracy. W grupie I podczas bezpośredniej wizualizacji otrzewnej ściennej jamy brzusznej endometriozę podejrzewano u 21,7%, a potwierdzono u 4,4% zwierząt. W II grupie makroskopowo stwierdzono nieprawidłowy rozrost endometrium u 91,3% szczuryc, a ostatecznie w ocenie histopatologicznej endometriozę rozpoznano w 70% przypadkach. Ponadto w obu grupach cienkie i przezroczyste zrosty występowały głównie tam, gdzie po wycięciu zmiany, potwierdzano obecność endometriozy. Grube zmiany w konglomeratach tkankowych nie miały związku z endometriozą. Dla porównania, na ryc. 3. przedstawiono zdjęcie torbieli endometrialnej oraz torbieli prostej z otrzewnej ściennej powłoki brzusznej dwóch różnych szczuryc. Na ryc. 4. przedstawiono zdjęcie ogniska endometriozy z drobnymi pęcherzykami i zrostami oraz fotografię ogniska przekrwienia u innego szczura. Wszystkie te zmiany zostały wstępnie makroskopowo rozpoznane jako endometrioza. Rozpoznanie endometriozy zweryfikowano w ocenie mikroskopowej.

Można zadać pytanie, dlaczego występują tak znaczne różnice pomiędzy podejrzeniem a ostatecznym rozpoznaniem endometriozy? W badaniu prospektywnym Waltera i wsp. [12], w którym u 44 pacjentek poddanych leczeniu laparoskopowemu z powodu przewlekłych dolegliwości bólowych miednicy mniejszej, endometriozę podejrzewano u 36%, ostateczne potwierdzenie rozpoznania uzyskano u połowy (18%). Autorzy sugerują, że



Ryc. 3. Zdjęcie torbieli endometrialnej i prostej bez cech endometriozy



Ryc. 4. Ognisko endometriozy oraz ognisko przekrwienia bez cech endometriozy

prawdopodobieństwo pozytywnego potwierdzenia histopatologicznego wynika z lokalizacji endometriozy i rodzaju zmian. Statystycznie częściej w ocenie mikroskopowej uzyskuje się potwierdzenie endometriozy, jeśli pobrany materiał pochodził z okolicy więzadeł krzyżowo-maciczkowych i lewego dołka jajnika oraz z białych i żółtych ognisk chorobowych [12]. Obserwacje te po-

twierdzą Stratton i wsp. [13], którzy w trakcie laparoskopii wykonywali biopsję z okolic makroskopowo sugerujących zmiany endometrialne u pacjentek leczonych z powodu chronicznego bólu miednicy mniejszej. Zmiany jasne lub białe o szerokości lub głębokości naciekania powyżej 5 mm oraz zrosty wokół wszczepów tkankowych były prawidłowo rozpoznane jako endometrioza.

Więcej problemów diagnostycznych nasuwały czerwone i brunatne ogniska o nierównych kształtach, których rozpoznanie wstępne w większości przypadków nie zostało potwierdzone w ocenie mikroskopowej [13]. W innym prospektywnym badaniu Marchino i wsp. [14] u 54 kobiet z przewlekłym bólem w miednicy mniejszej przeprowadzali podczas laparoskopii biopsję zmian (n=122), ocenionych makroskopowo jako endometrioza. Ostatecznie uzyskano potwierdzenie choroby w badaniu histologicznym w 54% przypadkach. Jednakże częściej potwierdzano endometriozę dla pęcherzyków wypełnionych płynem i jasnych lub białych ognisk niż zmian ze wzmożonym rysunkiem naczyniowym oraz kulistych i nieregularnych ubytków na otrzewnej (64 vs 2%; $p < 0,05$) [14].

Z drugiej strony, Murphy i wsp. [15] przytaczają badanie, w którym po pobraniu biopsji z niezmienionej makroskopowo otrzewnej podczas laparoskopii ostatecznie rozpoznano endometriozę w 13% przypadków [15]. Zatem trudności diagnostyczne mogą wynikać również z powodu istnienia endometriozy mikroskopowej.

Należy ponadto mieć na względzie, że uzyskany przez autorów materiał tkankowy był bardzo mały, co już samo może spowodować popełnienie błędu diagnostycznego. Gdyby odnieść się w badaniach do wyników badania makroskopowego, odsetki te zmieniłyby się jedynie w nieznaczny sposób, co nie wpłynęłoby na ostateczne wnioski. Proporcja pozytywnych rozpoznań w ocenie mikroskopowej wynosiła w grupie I i II odpowiednio 0,0435 i 0,6957. Proporcja wstępnego rozpoznania endometriozy dla oceny makroskopowej odpowiednio w grupach wynosiła 0,2174 i 0,9130. W obu sytuacjach były to różnice istotne statystycznie ($p=0,0001$).

Podsumowując powyższe rozważania, niezwykle istotne wydaje się potwierdzenie mikroskopowe zmian podejrzewanych w ocenie makroskopowej jako rozrost endometriozy.

Wnioski

Makroskopowe rozpoznanie ognisk endometriozy zawsze powinno być potwierdzone badaniem histopatologicznym.

Piśmiennictwo

1. Oral E, Iivan S, Tustas E, et al. Prevalence of endometriosis in malignant epithelial ovary tumors. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 109: 97-101.
2. Kyama CM, Debrock S, Mwenda JM, et al. Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 123-32.
3. Gocmen A, Inaloz HS, Sari I, et al. Endometriosis in the Bartholin gland. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 114: 110-1.
4. Wan-Tinn T, Vollenhoven B, Harris P. Umbilical endometriosis a pathology that a gynecologist may encounter when inserting the Veres needle. *Fertil Steril* 2006; 86: 764.
5. Bednarowska-Flisiak A, Bińkowska M, Dębski R. Endometrioza – co nowego? *Prz Menopauz* 2004; 2: 22-9.
6. Mounsey A, Wilgus A, Slawson D. Diagnosis and Management of endometriosis. *Am Fam Physician* 2006; 74: 594-600.
7. Kennedy S, Bergqvist A, Charon C, et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod* 2005; 20: 2698-704.
8. Jędrzejczak P, Szymanowski K, Skrzypczak J, et al. Eksperymentalny model endometriozy u szczurów. *Gin Pol* 1990; 61: 387-91.
9. Szymanowski K, Florek E, Mikołajczyk M, et al. Integrin pattern in rats endometrium after endometriosis induction. *Pol J Gynaecol Invest* 2002; 5: 293-8.
10. Szymanowski K, Mikołajczyk M, Rączyńska R, et al. Integrin pattern in rats endometrium after endometriosis excision. *Pol J Gynaecol Invest* 2002; 5: 299-302.
11. 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.
12. Uygur D, Aytan H, Zergeroglu S, et al. Leflunomide – an immunomodulator – induces regression of endometrial explants in rat model of endometriosis. *J Soc Gynecol Investig* 2006; 13: 378-83.
13. Senturk LM, Arici A. Review immunology of endometriosis. *J Reprod Immunol* 1999; 43: 67-83.
14. Marchino GL, Gennarelli G, Enria R, et al. Diagnosis of pelvic endometriosis with use of macroscopic versus histologic findings. *Fertil Steril* 2005; 84: 12-5.
15. Meyer R. Über den staude der frage der adenomyosites adenomyoma in allgemeinen und adenomyonietitis sarcomastosa. *Zentralbl Gynakol* 1919; 36: 745.