

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

## *Evaluation of the effectiveness of RESAN vaccine in the prophylaxis and treatment of endometriosis – an experimental study in an animal model. Part I*

Krzysztof Szymanowski<sup>1</sup>, Karolina Chmaj-Wierzchowska<sup>1</sup>, Joanna Niepsuj<sup>1</sup>,  
Andrey Yanchanka<sup>2</sup>, Ewa Florek<sup>3</sup>, Magdalena Barlik<sup>4</sup>, Tomasz Opala<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Zdrowia Matki i Dziecka, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu;

kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. med. Tomasz Opala

<sup>2</sup>Instytucja Naukowo-Badawcza RESAN w Witebsku, Białoruś

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

<sup>4</sup>Studentka Wydziału Lekarskiego, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Przeгляд Menopauzalny 2007; 5: 283–288

### Streszczenie

Endometrioza stanowi poważny problem społeczny. Dotychczas nie opracowano w pełni skutecznych form jej leczenia. Szansą może okazać się immunomodulacja.

**Cel pracy:** Określenie skuteczności szczepionki RESAN w profilaktyce i leczeniu endometriozy miednicy mniejszej w badaniu eksperymentalnym na modelu zwierzęcym.

**Materiał i metody:** Grupę 58 dojrzałych szczurzyk podzielono na 3 mniejsze. 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, kontrolną, stanowiło 10 szczurzyk, u których wykonano laparotomię bez wszczepienia endometriozy. Po kolejnych 3 mies. we wszystkich grupach usunięto i przebadano histologicznie ogniska powstałej endometriozy. Dodatkowo w grupie II podano RESAN w celach leczniczych (etap III). Po 3 mies. ponownie dokonano oceny ewentualnych ognisk endometriozy. Pobrane fragmenty oceniano histologicznie (etap IV).

**Wyniki:** W III etapie doświadczenia endometriozę potwierdzono histologicznie u 1 samicy z grupy I i 16 samic z grupy II. Zrosty wokół implantu endometrium występowały u 3 i 14 zwierząt, odpowiednio w grupach I i II. Podczas IV etapu doświadczenia nie stwierdzono wykładników endometriozy w żadnej z badanych grup. Zrosty w okolicy miejsca, z którego usunięto endometriozę, występowały u 3 zwierząt z grupy II. W grupie kontrolnej nie stwierdzono żadnej z wymienionych zmian.

**Wnioski:** 1. Badana szczepionka jest skuteczną formą immunoprofilaktyki endometriozy na modelu zwierzęcym. 2. Immunoterapia skojarzona z leczeniem chirurgicznym jest skuteczną formą leczenia w modelu eksperymentalnym endometriozy u szczura.

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

### Summary

Endometriosis is a serious social problem. There is no fully effective form of treatment of endometriosis. Immunomodulation might be a chance to improve the results.

**Objectives:** The aim of our study was to evaluate the effectiveness of the RESAN vaccine in the prevention and treatment of endometriosis in an experimental animal study.

**Materials 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 in group I of rats (n=24). Three months later during the 2nd step of the 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

Adres do korespondencji:

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

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).

**Results:** During step 3, the endometriosis was histologically diagnosed in 1 rat from group I and in 16 from group II. Adhesions near the endometrial implant were found in 3 and 14 rats from groups I and II, respectively. There were no endometriotic foci in all groups during the 4th step of the examination.

**Conclusions:** 1. RESAN vaccine is an effective form of endometriosis prevention in a rat model. 2. Immunotherapy connected with surgical treatment is an effective form of treatment in an animal model of endometriosis.

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

## Wstęp

Endometrioza jest przewlekłą, zapalną i estrogeno-zależną chorobą, która polega na implantacji oraz rozroście gruczołów i podścieliska błony śluzowej macicy poza jamę macicy. W przebiegu choroby dochodzi również do wzrostu wydzielania cytokin prozapalnych, które zmieniają właściwości płynu otrzewnowego oraz do obniżenia apoptozy w endometrium ektopowym [1–3].

Częstość występowania endometriozy w populacji kobiet bez objawów klinicznych wynosi ok. 15–20% [4]. Odsetek ten jest wyższy wśród pacjentek leczonych z powodu niepłodności (30–50%) i u kobiet z dolegliwościami bólowymi w miednicy mniejszej (40–60%) [4, 5]. Jednak na przestrzeni ostatnich 30 lat współczynnik zachorowań nie uległ znacznemu wzrostowi i waha się 2,37–2,49 na 1000 kobiet na rok [6].

Endometrioza stanowi poważny problem społeczny. W ciągu roku 41% chorych na endometriozę zmuszonych jest do zmiany miejsca zatrudnienia. Na zwolnieniu lekarskim, średnio 5 dni w miesiącu, przebywa aż 78% kobiet, głównie z powodu silnych dolegliwości bólowych. Ponadto endometrioza jest przyczyną rozpadu 10% związków partnerskich [6].

Kliniczne objawy endometriozy są bardzo niespecyficzne. Najczęściej zgłaszanymi problemami ginekologicznymi są przewlekłe dolegliwości bólowe, zlokalizowane głównie w miednicy mniejszej (30–50% kobiet), ból związany z cyklem miesiączkowym (60–80%) oraz bolesne współżycie płciowe (25–50%) [7]. Zaburzenia cykliczności miesiączkowania (11–30%), jak również niepłodność (30–50%) należą do częstych objawów związanych z endometriozą [7].

Kierując się doбором sposobu terapii, należy brać pod uwagę 3 zasadnicze założenia:

- leczenie powinno redukować dolegliwości bólowe,
- wydłużać czas nawrotu choroby tak długo, jak to jest tylko możliwe,
- umożliwić zajście w ciążę [6].

Powszechnie uznanymi metodami leczenia endometriozy jest leczenie operacyjne oraz farmakoterapia. Jednak efektywność terapii oraz odsetek nawrotów zmusza do poszukiwania nowych form leczenia [7, 8]. Zespół dr. Ovsienko przeprowadził wstępne badania kliniczne

z zastosowaniem szczepionki RESAN w leczeniu endometriozy. Wśród uczestniczących 24 kobiet z rozpozną endometriozą miednicy mniejszej, zdiagnozowano dodatkowo u 10 z nich mięśniaki macicy, u 2 zmiany torbielowe w przydatkach o echogenności typowej dla endometriozy. Po zakończeniu doświadczenia zaobserwowano zmniejszenie się wymiarów torbieli endometrialnych oraz mięśniaków macicy. Ponadto poziomy markerów nowotworowych w surowicy krwi – CA-125, CA-19-9, CA-15-3 i CEA uległy istotnemu statystycznie obniżeniu ( $p < 0,05$ ) [9]. Niestety, badania te nie zostały szczegółowo udokumentowane, zaś grupa badana była nieliczna i niejednorodna. Należy zatem uznać, iż wyciąganie poważniejszych wniosków z cytowanych badań nie jest możliwe.

## Cel pracy

Celem pracy jest określenie skuteczności szczepionki RESAN, zastosowanej w profilaktyce i leczeniu endometriozy miednicy mniejszej, w badaniu eksperymentalnym na modelu zwierzęcym.

## Materiał i metody

Materiał do badań doświadczalnych stanowiło 58 dojrzałych szczurzyk szczepu Wistar. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu. Biorący udział w eksperymencie mieli zezwolenia indywidualne. Eksperyment przeprowadzono zgodnie z zaleceniami Ministerstwa Edukacji i Szkolnictwa Wyższego z 1959 r., a także Światowej deklaracji UNESCO odnośnie praw zwierząt z Paryża, z roku 1978.

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

W składzie szczepionki RESAN znajdują się kompleksy molekuł uzyskanych z ksenogenicznych tkanek zwierzę-

cych, m.in. glikoproteiny, peptydy i fragmenty węglowodanów z więcej niż 40 różnych substancji. Dokładny skład szczepionki jest chroniony patentem RB numer 542883. Szczepionka ta występuje pod postacią krystalicznego proszku (200 mg), który należy uzupełnić 0,9-procentową solą fizjologiczną do objętości 1 ml [9].

Zwierzęta w wieku ok. 4 mies. i o wadze 200–300 g zostały podzielone na 3 grupy. W grupie I (n=24), na 3 mies. przed przystąpieniem do wszczęcia endometriozy, podano profilaktycznie szczepionkę. W grupie II (n=24), po usunięciu ognisk endometriozy z otrzewnej ściennej jamy brzusznej, podano RESAN w celach leczniczych. Grupę III stanowiła grupa kontrolna, której nie podano szczepionki, a po przecięciu rogu macicy i założeniu szwów hemostatycznych, wolne końce pozostawiono w jamie otrzewnowej (ang. *sham operation*). Podczas wszystkich operacji zwierzęta znieczulano pentobarbitem dootrzewnowo, w dawce 60 mg/kg masy ciała.

Pierwszy etap badań polegał na podaniu szczepionki 24 szczurom, na 3 mies. przed planowanym wszczęciem endometriozy (grupa I). W drugim etapie eksperymentu wszczęto fragmenty endometrium do otrzewnej 48 szczurów (24 uprzednio zaszczerpionym z grupy I i 24 z grupy II, którym wcześniej nie podano immunoprofilaktyki). Zabiegi przeprowadzono w warunkach czystych, ale nie ściśle sterylnych. Sierść na brzuchu szczuryc ogolono. Po przemyciu pola operacyjnego roztworem hibitanu, otwierano jamę brzuszną w linii pośredniej przedniej na długości ok. 4 cm. W czasie pierwszego otwarcia jamy brzusznej, po uwidocznieniu prawego rogu macicy i podwiązaniu naczyń macicznych, wycięto segment prawego rogu macicy o długości 4 cm. Następnie zaopatrzone hemostatycznie pozostałe brzegi macicy. Po umieszczeniu uzyskanego wycinka w roztworze soli fizjologicznej, błonę śluzową oddzielono od mięśnia macicy. Uzyskano fragment endometrium o wymiarach 4 × 4 mm, który naszyto na otrzewną ścienną po stronie prawej powłoki brzusznej za pomocą szwów nylonowych 6-0. Wszczęcia dokonano u pierwszych 24 zaszczerpionych szczurów i u 24 zwierząt, którym szczepionki RESAN wcześniej nie podano. W grupie III, u pozostałych 10 szczurów, po podwiązaniu naczyń, prawy róg macicy został przecięty, a wolne końce pozostawiono po zaopatrzeniu szwami hemostatycznymi. Na otrzewną założono szew nylonowy, tak jak w przypadku wszczęcia endometrium. Jama brzuszna została zamknięta szwem ciągłym 1-0 (Dexon). Do oddzielania błony śluzowej od błony mięśniowej macicy i podczas wszczęcia ektopowego endometrium użyto techniki mikrochirurgicznej.

Etap trzeci polegał na usunięciu wszczętych implantów endometrium. W pierwszej kolejności oceniano, czy doszło do rozwoju endometriozy. Po wykonaniu dokumentacji fotograficznej i uwolnieniu ewentualnych zrostów, pobrano materiał do badania histologicznego

z okolicy otrzewnej ściennej strony prawej powłoki brzusznej z miejsca, gdzie uprzednio wszczęto endometrium ektopowe. Następnie uwidoczniono i wycięto lewy róg macicy, po wcześniejszym podwiązaniu naczyń macicznych. Jama brzuszna została zamknięta szwem ciągłym 1-0 (Dexon). Równocześnie zwierzętom, które wcześniej nie zostały zaszczerpione, podano RESAN (grupa II). Ostatni, IV etap badań przeprowadzono po kolejnych 3 mies. Po otwarciu jamy brzusznej oceniano, czy nie ma ognisk przetrwałej endometriozy i po wykonaniu dokumentacji fotograficznej pobrano materiał do badania histologicznego.

Usunięte podczas kolejnych etapów eksperymentu, ogniska endometriozy utrwalono w 4-procentowej zbuforowanej formalinie, skrojono na mikrotomie, a następnie w sposób typowy przeprowadzono barwienie hematoksyliną i eozyną. Ocenę histologiczną w mikroskopie świetlnym wykonano w sposób ślepy (osoba oceniająca nie wiedziała, z której grupy pochodzi materiał), poszukując gruczołów endometrialnych oraz elementów podścieliska endometrium z makrofagami obciążonymi hemosyderyną. Wszystkie preparaty dodatnie skonsultowano z drugim histopatologiem.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu jednostronnego testu Fishera dla zdarzeń losowych za pomocą programu Statistica 7.1. Za poziom istotności statystycznej przyjęto wartość  $p < 0,05$ .

## Wyniki

Nie wszystkie zwierzęta pomyślnie zniósły operację i okres pooperacyjny. Z powodu powikłań okołoperacyjnych zwierzęta nr 12. i 30. oddano do utylizacji.

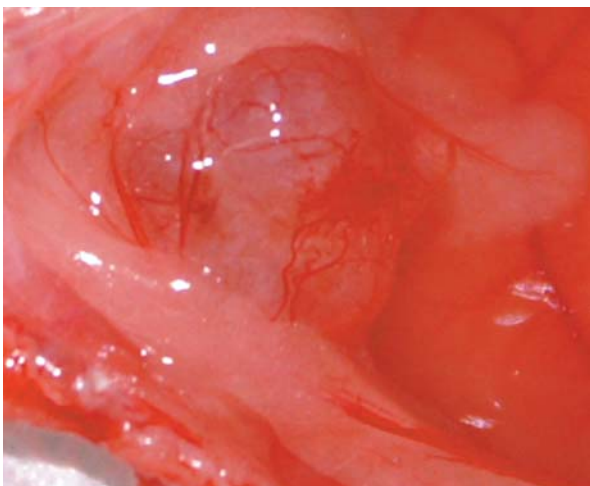
Rozpoznanie endometriozy przedstawiono na ryc. 1–4.

Podczas III etapu doświadczenia, w ocenie mikroskopowej fragmentów otrzewnej uzyskanych z miejsca, gdzie uprzednio wszczęto implanty, potwierdzono endometriozę w jednym przypadku w grupie I i u 16 zwierząt w grupie II. W grupie III nie stwierdzono wykładników endometriozy w ocenie histopatologicznej. Podczas ostatniego otwarcia jamy brzusznej (w IV etapie eksperymentu), 3 mies. po uprzednim wycięciu ognisk ektopowych, nie stwierdzono cech o charakterze endometriozy zarówno w badaniu makroskopowym, jak i mikroskopowym u żadnego ze zwierząt.

### Obecność zrostów

W III etapie doświadczenia uwidocznione zrosty wokół implantu (występujące samodzielnie i w łącznie z zrostami w linii cięcia) występowały u 3 i 14 zwierząt, odpowiednio w grupie I i II. Nie stwierdzono ich u żadnego szczura w grupie kontrolnej. W IV etapie doświadczenia zrosty w miejscu, gdzie uprzednio usunięto endometriozę występowały tylko u 3 zwierząt w grupie II.

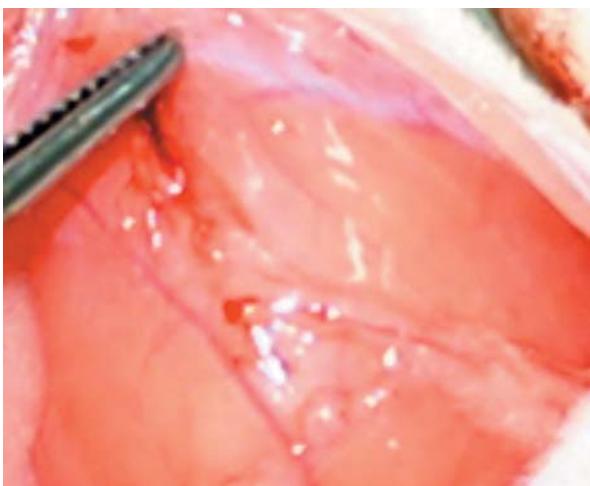
Procentowe porównanie występowania endometriozy i obecności zrostów tkankowych w badanych gru-



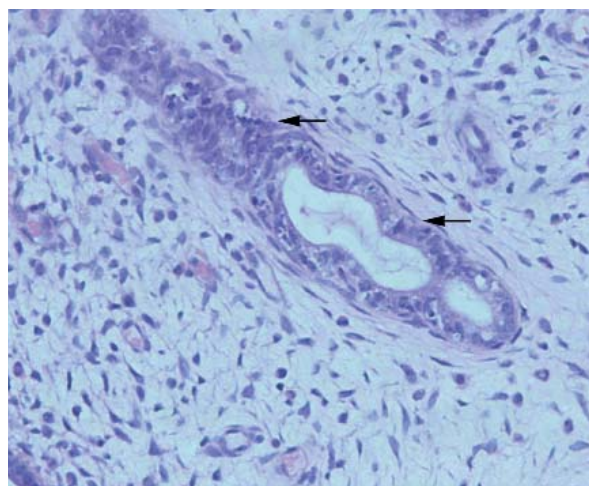
Ryc. 1. Zdjęcie torbieli endometrialnej



Ryc. 2. Ognisko endometriozy



Ryc. 3. Cienkie zrosty wokół wszczepu, z cechami endometriozy



Ryc. 4. Prawidłowo wykształcony gruczoł endometrialny (H+E)

pach, III i IV etapu doświadczenia, przedstawiono w tab. I.

## Dyskusja

Endometrioza jest przewlekłą chorobą, w przebiegu której dochodzi do rozrostu gruczołów i podścieliska błony śluzowej macicy poza jamą macicy. Dotyczy głównie kobiet w wieku rozrodczym, ograniczając ich płodność i powodując obniżenie jakości życia. Brak jednolitych poglądów na temat jej etiopatogenezy powoduje trudności terapeutyczne i wysokie odsetki nawrotów choroby. Omówione powyżej badanie kliniczne zespołu dr. Ovsienko [9] oraz brak jednoznacznych dowodów naukowych i doniesień literaturowych odnośnie preparatu RESAN było jednym z ważniejszych powodów, które skłoniły autorów do podjęcia niniejszej pracy. Zastoso-

wanie preparatu na modelu zwierzęcym może okazać się przełomowym momentem do oceny skuteczności działania tej szczepionki. Dlatego niezwykle interesująca wydaje się być zarówno ewentualna skuteczność RESAN w leczeniu endometriozy, jak i w profilaktyce choroby.

Z wcześniejszych badań na zwierzęcym modelu endometriozy wynika, że w stałych warunkach (bez podawania jakichkolwiek leków) można spodziewać się rozwoju implantów aż u 75–100% zwierząt [10, 11]. Od wielu lat trwają badania nad zastosowaniem szczepionek w profilaktyce endometriozy. W badaniu eksperymentalnym z randomizacją, z podwójnie ślepą próbą, Gul i wsp. [12] zastosowali szczepionkę przeciwko gruźlicy (BCG) w zapobieganiu implantacji i rozwoju endometriozy u szczurów rasy Wistar (185–215 g). Na 3 tyg. przed wszczepieniem endometrium w tęczówkę oka całej grupy badanej (n=40), połowie zwierząt (n=20) podano szcze-

Tab. I. Procentowe porównanie rozwoju endometriozy i obecności zrostów tkankowych w badanych grupach – III i IV etap doświadczenia

Cecha	Grupa I (n=23)	Grupa II (n=23)	Grupa I (n=23)	Grupa II (n=23)
	etap III	etap III	etap IV	etap IV
<b>endometriozia</b>				
potwierdzenie mikroskopowe	4,4%	70%	0%	0%
<b>zrosty</b>				
zrosty wokół wszczepu	4,4%	47,8%	0%	13%

pionkę BCG. Po 6 tyg. obserwacji otrzymane wyniki jednoznacznie wskazywały na skuteczność takiego sposobu profilaktyki. Endometriozia rozwinęła się tylko u 5 (25%) zaszczepionych szczurów i aż u 17 (85%) zwierząt z grupy kontrolnej. W badaniu potwierdzono obecność podścieliska i gruczołów endometrialnych, wzmożonego rysunku naczyńowego, jak również makrofagów obładowanych złogami hemosyderyny na przedniej ścianie tęczówki oka [12]. W innym badaniu z randomizacją, z podwójnie ślełą próbą, Itil i wsp. [13] podawali 0,1 ml szczepionki BCG dojrziałym płciowo szczurzyciom rasy Wistar (190–200 g). Cztery tyg. po zaszczepieniu, po usunięciu prawego rogu i wypreparowaniu błony śluzowej macicy, tkankę ektopową naszyto po obu stronach otrzewnej jamy brzusznej. Po kolejnych 8 tyg. badanie zakończono pobraniem do oceny histopatologicznej wszczepów tkankowych. Istotny statystycznie wzrost endometriozy zaobserwowano u 27,8% zaszczepionych i 67,6% szczurów z grupy kontrolnej ( $p=0,01$ ) [13]. Podsumowując przytoczone badania, można sądzić, że immunostymulacja szczepionką przeciw gruźlicy, zastosowana w zapobieganiu rozwojowi endometriozy w doświadczeniach na zwierzętach, przyczyniła się do znacznego ograniczenia wzrostów endometrium ektopowego.

W przeprowadzonym badaniu eksperymentalnym na zwierzętach zaobserwowano zahamowanie wzrostu ektopowych fragmentów na otrzewnej powłoki brzusznej u prawie wszystkich zwierząt (grupa I), u których zastosowano szczepionkę RESAN w profilaktyce endometriozy. W ocenie mikroskopowej fragmentów otrzewnej uzyskanych z miejsca, gdzie uprzednio wszczepiono implanty, potwierdzono endometriozę tylko w 1 przypadku (4,4%). W grupie II, po wszczepieniu implantu tkankowego, a przed podaniem preparatu RESAN jako środka leczniczego, rozrost endometriozy uzyskano aż u 16 zwierząt (70%). W IV etapie badania, po wcześniejszym wycięciu endometriozy i terapeutycznym podaniu szczepionki, nawrotu choroby nie uzyskano u żadnego szczura. Cienkie i przezroczyste zrosty występowały głównie tam, gdzie po wycięciu zmiany potwierdzano obecność endometriozy. Badania histopatologiczne wykazały, że wszczepiony do jamy otrzewnej fragment endometrium zawiera podścielisko i gruczoły endometrialne, jak również makrofagi obładowane złogami hemosyderyny. W niniejszym badaniu nie stosowano żadnych innych le-

ków – zarówno przed, jak i po operacji – oprócz szczepionki RESAN, które w jakikolwiek sposób wpłynęłyby na przyjmowanie się i rozwój transplantów.

Porównując odsetek pozytywnych wszczepień endometriozy pomiędzy doświadczeniami Gul i wsp. [12] vs Itil i wsp. [13] vs niniejsze badanie (25 vs 27,8 vs 4,4%), uzyskano znaczną rozbieżność w wynikach badań. Szczepionka BCG (Bacillus Calmette-Guerin) jest atenuowanym szczepem prątka bydłowego gruźlicy zaadaptowanym do celów profilaktyki pierwotnej przeciwko gruźlicy. Jej immunostymulujące właściwości wynikają z tego, że po wprowadzeniu do organizmu, za pośrednictwem monocytów i makrofagów, pobudzona zostaje komórkowa odpowiedź immunologiczna [14]. Należy jednak pamiętać, że w takim przypadku mamy do czynienia z immunoprofilaktyką preparatem bakteryjnym. W doświadczeniu autorów niniejszej pracy szczepionka RESAN składa się z mieszaniny glikoprotein, peptydów i fragmentów węglowodanów więcej niż 40 różnych substancji uzyskanych z tkanek zwierzęcych, które imitują antygeny endometrium i ognisk endometriozy. Można zatem przypuszczać, że szczepionka RESAN w korzystniejszy sposób wpłynęła na przywrócenie pierwotnej równowagi Th1/Th2, a zatem spowodowała silniejsze pobudzenie odpowiedzi komórkowej, prowadzącej do odrzucenia wszczepionych fragmentów endometrium.

Przeniesienie przedstawionych badań do działań klinicznych musi być ostrożne. Zastosowany przez autorów niniejszej pracy w doświadczeniu eksperymentalnym na modelu zwierzęcym preparat RESAN może okazać się przełomowym momentem dla rozwoju dalszych badań nad skutecznością immunoprofilaktyki endometriozy. Można również przypuszczać, że nowoczesne leczenie będzie opierało się na modulowaniu odpowiedzi immunologicznej, niezależnie od tego czy szczepionka będzie stosowana w monoterapii, czy w leczeniu skojarzonym.

## Wnioski

1. Badana szczepionka jest skuteczną formą immunoprofilaktyki endometriozy w modelu zwierzęcym.
2. Immunoterapia skojarzona z leczeniem chirurgicznym jest skuteczną formą leczenia endometriozy u zwierząt laboratoryjnych.

## Piśmiennictwo

1. Mounsey A, Wilgus A, Slawson D. Diagnosis and management of endometriosis. *Am Fam Physician* 2006; 74: 594-600.
2. Harada T, Iwabe T, Terakawa N. Role of cytokines in endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 76: 1-10.
3. 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.
4. 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.
5. Matarese G, De Placido G, Nikas Y, et al. Pathogenesis of endometriosis: natural immunity dysfunction or autoimmune disease? *Trends Mol Med* 2003; 9: 223-8.
6. Barton-Smith P, Ballard K, Kent ASH. Endometriosis: a general review and rationale for surgical therapy. *Rev Gynaecol Perinat Pract* 2006; 6: 168-76.
7. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004; 364: 1789-99.
8. Jakiel G, Robak-Chotubek D, Tkaczuk-Włach J. Endometrioza. *Prz Menopauz* 2006; 2: 126-9.
9. [www.anticancer.net/resan](http://www.anticancer.net/resan)
10. Jędrzejczak P, Szymanowski K, Skrzypczak J, et al. Eksperymentalny model endometriozy u szczurów. *Gin Pol* 1990; 61: 387-91.
11. Szymanowski K, Florek E, Mikołajczyk M, et al. Integrin pattern in rats endometrium after endometriosis induction. *Pol J Gynaecol Invest* 2002; 5: 293-8.
12. Gul A, Yasar T, Ugras S. BCG vaccination to prevent implantation of endometriosis: an experimental study in rats. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 98: 209-12.
13. Itil IM, Cirpan T, Akercan F, et al. Effect of BCG vaccine on peritoneal endometriotic implants in a rat model of endometriosis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006; 46: 38-41.
14. Lasek W. Immunomodulacja. W: *Immunologia*. Gołąb J (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006; 483.
15. 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.