

Ekspresja receptorów dla czynnika martwicy guza- α (TNF- α) na jednojądrzastych komórkach immunokompetentnych płynu otrzewnowego u kobiet z endometriozą

Expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) on peritoneal fluid mononuclear cells in women with endometriosis

Gogacz Marek, Bogusiewicz Michał, Putowski Lechosław, Adamiak Aneta, Wertel Iwona*, Jakowicki Jerzy A., Rechberger Tomasz

II Katedra i Klinika Ginekologii Akademii Medycznej im. Prof. Feliksa Skubiszewskiego w Lublinie

* I Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii Akademii Medycznej im. Prof. Feliksa Skubiszewskiego w Lublinie

Streszczenie

Cel pracy: Czynniki martwicy guza- α (TNF- α) odgrywa kluczową rolę w regulowaniu szeregu procesów zachodzących w płynie otrzewnowym u kobiet z endometriozą. TNF- α oddziałuje na komórki efektorowe za pomocą dwóch receptorów błonowych: TNFR1(p55) i TNFR2(p75). Pobudzenie receptorów w zależności od typu komórki i jej stanu metabolicznego może uruchamiać procesy aktywacji i proliferacji komórek lub indukować apoptozę. Ekspresja receptorów dla TNF α na komórkach immunokompetentnych u pacjentek z endometriozą nie była dotychczas przedmiotem badań. Celem pracy była ocena ekspresji białka tych receptorów na jednojądrzastych komórkach immunokompetentnych płynu otrzewnowego (limfocytach T i makrofagach) u kobiet z endometriozą.

Materiał i metodyka: Grupę badaną stanowiły 22 pacjentki z endometriozą (I lub II stopień według rAFS) potwierdzoną w badaniu histopatologicznym. Do grupy referencyjnej zakwalifikowano 14 kobiet operowanych z powodu łagodnych niezapalnych guzów jajnika. Płyn otrzewnowy pobierano w trakcie laparoskopii. Komórki izolowano metodą wirowania przy użyciu medium. Ekspresję TNFR1 i TNFR2 na powierzchni komórek mierzono metodą cytometrii przepływowej używając monoklonalnych przeciwciał CD120a, CD120b, CD3 i CD14.

Wyniki: U kobiet z endometriozą stwierdzono istotnie wyższy, w porównaniu do grupy referencyjnej, odsetek makrofagów wykazujących ekspresję TNFR1 (22,6 \pm 5,3% vs 6,8 \pm 1,8%; $p=0,03$), jak również i TNFR2 (29,3 \pm 2,3% vs 8,8 \pm 1,8%; $p=0,01$). Nie wykazano różnic w ekspresji tych receptorów na powierzchni limfocytów między badanymi grupami.

Wniosek: Zwiększony odsetek makrofagów płynu otrzewnowego wykazujących ekspresję TNFR1 i TNFR2 u kobiet z endometriozą, sugeruje, że komórki te zależne są od stymulacji TNF- α .

Różnice w dystrybucji receptorów dla TNF α na makrofagach a nie limfocytach płynu otrzewnowego pacjentek z endometriozą, mogą odgrywać rolę w patogenezie endometriozy.

Słowa kluczowe: endometrioza / czynnik martwicy guza- α / płyn otrzewnowy /

Adres do korespondencji:

Marek Gogacz

II Katedra i Klinika Ginekologii Akademii Medycznej w Lublinie

ul. Jaczewskiego 8, 20-954 Lublin

gogacz@yahoo.com

Otrzymano: 30.06.2007

Zaakceptowano do druku: 15.11.2007

Gogacz M, et al.

Abstract

Objectives: Tumor necrosis factor- α (TNF- α) plays a key role in the processes underlying the development of pelvic endometriosis. TNF- α acts on target cells via two receptors: TNFR1(p55) and TNFR2(p75). Depending on cell type and its activation state, ligand binding to TNF- α may induce activation and proliferation of the cells or promote apoptosis. The aim of our study has been to evaluate the expression of TNFR1 and TNFR2 on peritoneal fluid macrophages and T lymphocytes derived from women with endometriosis.

Material and methods: The study group consisted of 22 patients with endometriosis (stage I and II rAFS). 14 patients with benign, non-inflammatory ovarian tumors composed the reference group. Mononuclear cells have been isolated from peritoneal fluid, obtained during laparoscopy. The expression of TNFR1 and TNFR2 proteins has been evaluated by means of flow cytometry, using monoclonal antibodies against CD120a, CD120b, CD3 and CD14.

Results: The percentage of peritoneal fluid macrophages revealing the expression of TNFR1 and TNFR2 proteins has been higher in patients with endometriosis, in comparison with control group (22.6 \pm 5.3% vs. 6.8 \pm 1.8%; $p=0.03$ and 29.3 \pm 2.3% vs. 8.8 \pm 1.8%; $p=0.01$, respectively). The percentage of T lymphocytes with the expression of TNFR1 and TNFR2 has been similar in endometriosis and control group.

Conclusion: Higher percentage of peritoneal fluid macrophages expressing TNFR1 and TNFR2 proteins in endometriosis suggests dependence of these cells on TNF- α stimulation. Changes in TNF receptors distribution on PF macrophages, but not lymphocyte, may play its role in the pathogenesis of endometriosis.

Key words: **endometriosis / tumor necrosis factor-alpha, peritoneal fluid / association /**

Wstęp

Zgodnie ze współczesnymi poglądami u podstaw patogenetycznych endometriozy leży subkliniczny proces zapalny toczący się w miednicy mniejszej, współistniejący z zaburzoną funkcją komórek immunokompetentnych płynu otrzewnowego [1, 2, 3]. Stan taki sprzyja przetrwaniu ognisk ektopowego *endometrium* w jamie otrzewnowej i rozwojowi endometriozy [1, 2, 3].

Centralną rolę w tych procesach odgrywają makrofagi płynu otrzewnowego, które będąc źródłem cytokin i czynników wzrostu, odpowiedzialne są za proliferację, adhezję i morfogenezę komórek, a także za tkankowe procesy reparacyjne oraz angiogenezę [1, 2, 3].

W większości dotychczas opublikowanych badań, w płynie otrzewnowym u kobiet z endometriozą stwierdzano zwiększoną liczbę oraz nasiloną aktywację makrofagów przejawiającą się wzmożoną produkcją cytokin i czynników wzrostu [4, 5, 6, 7, 8, 9]. Ponadto, obserwowano osłabioną zdolność limfocytów krwi obwodowej do proliferacji i odpowiedzi cytotosycznej wobec komórek i antygenów *endometrium* [1, 2, 3].

Szereg danych wskazuje, że cytokiną odgrywającą kluczową rolę w patogenezie endometriozy jest czynnik martwicy guza- α (*tumour necrosis factor- α* - TNF- α) [1, 2, 3]. W płynie otrzewnowym u kobiet z endometriozą obserwowano podwyższone stężenia TNF- α , a także pozytywną korelację pomiędzy stężeniami tej cytokiny a stopniem zaawansowania choroby [10]. Wykazano, że TNF- α pobudza proliferację komórek ektopowego *endometrium* [11, 12], wzmacnia wydzielanie innych cytokin [13], a także zwiększa adhezję komórek ektopowego *endometrium* do otrzewnej [14, 15] oraz indukowaną przez płyn otrzewnowy angiogenezę [16]. Ponadto, zastosowanie rekombinowanego białka wiążącego TNF- α hamuje rozwój eksperymentalnej endometriozy u szczurów [17].

TNF- α oddziałuje na komórki docelowe poprzez receptory błonowe: typu 1 (TNFR1) o masie cząsteczkowej 55kD oraz typu 2 (TNFR2) o masie cząsteczkowej 75kD [1, 2, 3].

U kobiet z endometriozą obserwowano podwyższone stężenia rozpuszczalnych form obu receptorów w płynie otrzewnowym [18], jak również niższą ekspresję TNFR2 w *endometrium* [19].

Dotychczas nie przeprowadzono badań dotyczących ekspresji receptorów dla TNF- α na komórkach immunokompetentnych płynu otrzewnowego u kobiet z endometriozą.

Cel pracy

Celem pracy była ocena ekspresji białka receptorów dla TNF- α na błonach komórkowych makrofagów oraz limfocytów płynu otrzewnowego u kobiet z minimalną i lekką endometriozą (stopień I i II wg rAFS).

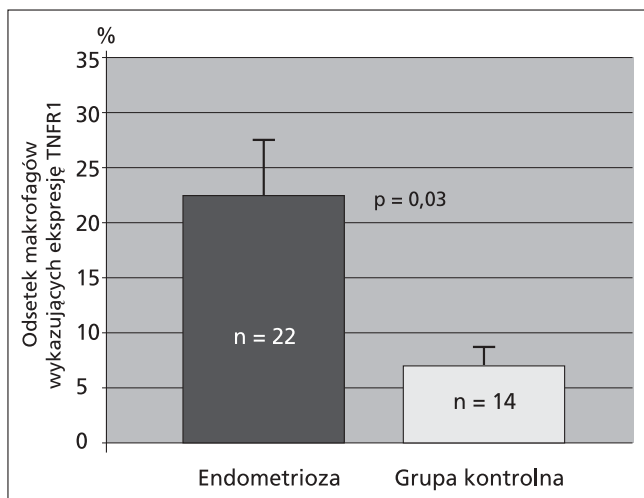
Materiał i metodyka

Materiał badany pochodził od pacjentek operowanych z powodu endometriozy w II Katedrze i Klinice Ginekologii Akademii Medycznej w Lublinie. Ze względu na zakaz sterylizacji ludzi w Polsce materiał kontrolny pobrano od kobiet operowanych z powodu łagodnych niezapalnych guzów jajnika.

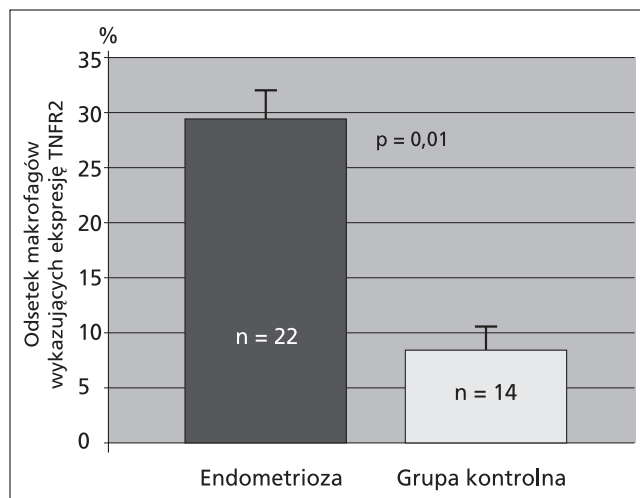
Do badania włączono pacjentki regularnie miesiączkujące, z cyklami menstruacyjnymi trwającymi od 25 do 34 dni. Żadna z pacjentek nie przyjmowała leków hormonalnych przynajmniej przez okres 3 miesięcy przed zabiegiem, jak również nie stosowała wkładki antykoncepcyjnej.

Wszystkie kobiety operowane były między 7 a 9 dniem cyklu. Stopień zaawansowania endometriozy oceniono zgodnie z terminologią ustaloną przez ACOG (*American College of Obstetricians and Gynecologists*) – rAFS. Płyn otrzewnowy (PO) pobierany był podczas laparoskopii. Po wprowadzeniu teleskopu oraz dodatkowych trokarów do jamy brzusznej, pod kontrolą wzroku, aspirowano płyn otrzewnowy z jamy Douglasa oraz zachyłka pęcherzowo-macicznego i przenoszono do sterylnych heparynizowanych probówek (Greiner bio-one, Austria). W każdym przypadku starano się zaaspirować całą widoczną ilość płynu otrzewnowego.

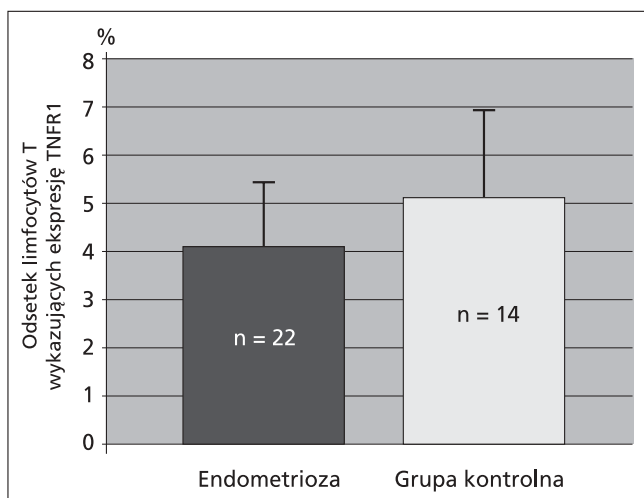
Ekspresja receptorów dla czynnika martwicy ...



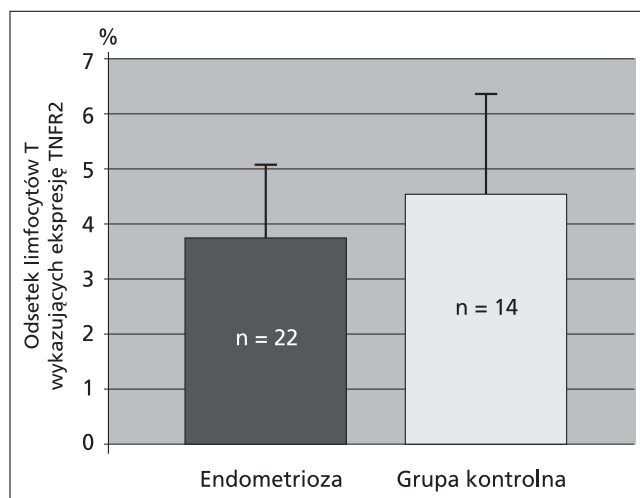
Rycina 1. Odsetek makrofagów płynu otrzewnowego wykazujących ekspresję białka receptora dla TNF- α typu 1 (TNFR1).



Rycina 2. Odsetek makrofagów płynu otrzewnowego wykazujących ekspresję białka receptora dla TNF- α typu 2 (TNFR2).



Rycina 3. Odsetek limfocytów T płynu otrzewnowego wykazujących ekspresję białka receptora dla TNF- α typu 1 (TNFR1).



Rycina 4. Odsetek limfocytów T płynu otrzewnowego wykazujących ekspresję białka receptora dla TNF- α typu 2 (TNFR2).

Od procedury odstępowano w przypadkach optycznie stwierdzonej kontaminacji płynu otrzewnowego świeżą krwią będącą następstwem uszkodzenia naczyń krwionośnych w trakcie wprowadzania trokarów do jamy brzusznej. W każdym przypadku odnotowywano objętość pobieranego płynu otrzewnowego.

Do grupy badanej zakwalifikowały się 22 pacjentki z endometriozą (I lub II stopień wg rAFS) potwierdzoną w badaniu histopatologicznym. Do grupy referencyjnej zakwalifikowano 14 kobiet.

Projekt badania został zaakceptowany przez Komisję Bioetyczną przy Akademii Medycznej w Lublinie. Przed włączeniem do badania wszystkie pacjentki podpisały formularz Świadomej Zgody na udział w badaniu.

Mononukleary PO izolowano metodą wirowania na gradientie gęstości, w czasie nie dłuższym niż 10min. od pobrania, w sterylnych probówkach stożkowych firmy Corning

(Nunc, USA), przy użyciu komercyjnie dostępnego płynu do izolacji Lymphoprep (Fresenius Kabi Norge AS, Nowary). Całą objętość płynu otrzewnowego wstrząsano (celem mobilizacji osiadłych na ściankach probówki komórek) i nanoszono na wyżej wymieniony płyn do izolacji. Objętość użytego płynu do izolacji odnoszono do ilości PO, zachowując proporcje 3:5. Następnie tak przygotowane próbki wirowano w temp. 4°C z przyspieszeniem 600xg przez 30 minut.

Wyizolowane komórki jednojądrzaste tworzyły widoczny pierścień na granicy faz, który aspirowano i przenoszono do sterylnych probówek typu Eppendorf.

Tak przygotowane komórki płukano roztworem PBS (Phosphate Saline Buffer, Biomed, Lublin) i wirowano z przyspieszeniem 300xg przez 5min w temp 4°C. Płukanie powtarzano dwukrotnie.

Wyizolowane komórki zawieszano w roztworze PBS zawierającym 2% FCS (Fetal Calf Serum, GibcoBRL, UK).

Ilość krwinek białych zawartych w 1mm³ PO liczono przy użyciu siatki Thoma (Zeiss) przygotowując 20-krotne rozcieńczenie PO w probówkach polietylenowych typu Eppendorf. Do 25μl uprzednio wstrząsanego płynu otrzewnowego dodawano 475μl hemolizującego płynu Turka o składzie: lodowaty kwas octowy 10ml, 14% wodny roztwór fioletu goryczkowego 10ml, woda destylowana 1000ml. Konieczność hemolizy poddyktowana jest powszechną obecnością w PO erytrocytów, które utrudniają liczenie leukocytów.

Po dokładnym wymieszaniu roztworu (vortex 15sek.) płyn otrzewnowy umieszczano w komorze Thoma i liczono obecne w nim komórki. Ilość wyizolowanych krwinek białych obliczano posługując się następującym wzorem:

$$x = a \times 4000 \times c/b$$

gdzie:

- x – liczba krwinek w 1mm³ badanego PO
- a – odczytana liczba krwinek na powierzchni siatek
- b – liczba małych kwadratów, na których obliczano krwinki (dla siatki Thoma b=400)
- c – użyte rozcieńczenie PO

Antygeny powierzchniowe komórek jednojądrzastych PO (TNFR1 i TNFR2) oceniane były na świeżych komórkach bezpośrednio po ich wyizolowaniu metodą podwójnej immunofluorescencji, przy użyciu kombinacji monoklonalnych przeciwciał skoniugowanych z fikoocjaniną (FITC) oraz fikoerytryną (PE).

Do analizy użyto przeciwciała monoklonalne (Becton Dickinson) w następującej kombinacji:

1. kontrola negatywna – anty-IgG1 (FITC) oraz anty-IgG2a (PE),
2. anty-CD120a (FITC) oraz anty-CD120b (PE) – przeciwciała anty-CD120a znakujące TNFR1 oraz przeciwciała anty-CD120b znakujące TNFR2,
3. anty-CD3 (FITC) oraz anty-CD14 (PE) – przeciwciała anty-CD3, znakujące wszystkie limfocyty T oraz przeciwciała anty-CD14, znakujące monocyty/makrofagi.

Do oznakowanych probówek dodawano 0,5 x 10⁶ – 1,0 x 10⁶ wyizolowanych komórek z PO, zawartych w objętości 100μl, następnie 20μl wyżej wymienionych przeciwciał monoklonalnych, po czym zawartość mieszano i inkubowano przez 30 min. w ciemności w temp. 4°C. Po zwirowaniu komórki były płukane dwukrotnie poprzez dodanie ml zimnego roztworu PBS (Phosphate Saline Buffer, Biomed, Lublin) zawierającego 1% azydek sodu i 1% FCS a następnie znów wirowane z przyspieszeniem 400 x g przez 10min. Supernatant odlewało a komórki zawieszano w 200μl PBS.

Ekspresję receptorów TNFR1 i TNFR2 oceniano w cytometrze przepływowym (Ortho Diagnostic System), wyposażonym w laser argonowy. W każdym przypadku analizowano 10000 komórek przy użyciu programu komputerowego Immunocount II (Ortho Diagnostic Systems). Wyniki przedstawiono jako procent komórek znakujących się pozytywnie.

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu Statistica wersja 6.0. Przy porównywaniu grup zastosowano test Mann'a-Whitney'a.

Wartość p<0,05 uznano za istotną.

Wyniki badań

Liczba komórek jednojądrzastych (makrofagów i limfocytów) była istotnie statystycznie wyższa w płynie otrzewnowym uzyskanym od pacjentek z endometriozą w porównaniu do grupy kontrolnej (6,12±0,69 wobec 3,56±1,81 x 10⁶/ml; p<0,05). Odsetek makrofagów wykazujących ekspresję białka TNFR1 był trzykrotnie wyższy w przypadku endometriozy w porównaniu do grupy kontrolnej. (Rycina 1).

Podobnie ekspresję białka TNFR2 na błonach komórkowych makrofagów znacząco częściej obserwowano w endometriozie. (Rycina 2).

Nie stwierdzono natomiast istotnych statystycznie różnic w ekspresji tych receptorów na powierzchni limfocytów T płynu otrzewnowego między badanymi grupami. (Rycina 3 i 4).

Dyskusja

TNF-α oddziałuje na komórki docelowe poprzez receptory błonowe – TNFR1 i TNFR2, które podlegają koekspresji w niemal wszystkich komórkach organizmu [1, 2, 3].

Tartaglia i wsp. [20] wykazali, że TNFR1 i TNFR2 wykorzystują różne ścieżki przekazywania sygnału wewnątrz komórki, rekrutując inne białka cytoplazmatyczne (tzw. białka adaptorowe). Istnieją dwie podstawowe grupy białek adaptorowych dla receptora TNF-α: TRAF (TNF – receptor-associated factors) oraz DD (death domain molecules). Selekcja białek adaptorowych uzależniona jest od obecności na cytoplazmatycznej części receptora wiążących je domen [21]. TNFR1 zawiera domenę śmierci (death domain – DD), poprzez którą indukuje apoptozę, ale również wywiera działanie prozapalne, aktywując czynnik transkrypcyjny NF-κB [22]. Pobudzenie TNFR1 może mieć działanie proapoptotyczne lub antyapoptotyczne, w zależności, które z białek sygnałowych, takich jak TRAF2, TRADD (TNFR associated DD) i FADD (Fas-associated DD), wiąże się z receptorem [21, 23].

Z drugiej strony pobudzenie TNFR2 powoduje przede wszystkim aktywację NF-κB, a w konsekwencji działanie antyapoptotyczne i prozapalne [20, 21, 23]. Jednakże wykazano, że w niektórych sytuacjach TNFR2 wzmacnia proapoptotyczne działanie TNFR1 [21, 23]. Wydaje się więc, że rodzaj efektu wywieranego przez TNF-α nie zależy wyłącznie od dystrybucji receptorów, ale w dużej mierze od typu komórki docelowej oraz jej stanu metabolicznego.

Przeprowadzone przez nas badania wykazały zwiększoną ekspresję białka obu receptorów dla TNF-α na powierzchni makrofagów płynu otrzewnowego u kobiet z endometriozą. Zważywszy na różnorodność efektów będących skutkiem pobudzenia tych receptorów trudno jest jednoznacznie interpretować powyższe wyniki.

Makrofagi pełnią kluczową rolę w procesie zapalnym obejmującym miednicę mniejszą u kobiet z endometriozą [1, 2, 3]. Są również głównym źródłem TNF-α wydzielanego do płynu otrzewnowego [24]. Obecność w płynie otrzewnowym zwiększonego odsetka makrofagów wykazujących ekspresję receptorów może odzwierciedlać stan aktywacji tych komórek. Biorąc jednak pod uwagę plejotropizm TNF-α, efekty wywierane przez tę cytokinę na makrofagi płynu otrzewnowego mogą być różnorodne. Hipotetycznie, w zależności od stanu metabolicznego poszczególnych komórek, pobudzenie receptorów dla

TNF- α może indukować proliferację czy aktywację makrofagów, lub też uruchamiać procesy apoptozy. Umożliwiłyby to autoregulację procesu zapalnego, jak również usuwanie komórek, które przestały już spełniać swoje funkcje. Założyć można istnienie analogicznej sytuacji do obserwowanej w przypadku oddziaływania TNF- α na limfocyty typu T.

Wykazano, że w limfocytach T będących w spoczynku lub w początkowych etapach aktywacji TNF- α działając przez TNFR2 pobudza proliferację, podczas gdy w komórkach będących w późnej fazie aktywacji indukuje apoptozę przy udziale tego samego typu receptora [23].

Jak już wspomniano, w płynie otrzewnowym u kobiet z endometriozą stwierdzono zwiększone stężenia rozpuszczalnych form TNFR1 i TNFR2, które powstają w wyniku enzymatycznego oddzielenia zewnątrzkomórkowych fragmentów receptorów od błon komórkowych [18]. Formy rozpuszczalne tworzą kompleksy z TNF- α blokując jego łączenie się z komórkami docelowymi, co stanowi jeden z mechanizmów regulujących działanie tej cytokiny [25].

Nasze obserwacje pozwalają przypuszczać, że zwiększone stężenia receptorów dla TNF- α w płynie otrzewnowym u kobiet z endometriozą mogą być konsekwencją zwiększonej syntezy tych receptorów przez makrofagi.

Nie stwierdziliśmy aby w endometriozie dochodziło do zmiany w nasileniu ekspresji białka receptorów dla TNF- α na powierzchni limfocytów T płynu otrzewnowego. Chociaż, jak wspomniano, pewne dane wskazują na istnienie dysfunkcji limfocytów T u kobiet z endometriozą, to rola tych komórek w procesach zachodzących w płynie otrzewnowym nie jest dokładnie ustalona [1, 2, 3]. Obserwowana przez nas obecność receptorów dla TNF- α jedynie w około 4-5% limfocytów typu T pozwala przypuszczać, że komórki te w płynie otrzewnowym zarówno w przypadku endometriozy jak i w stanie prawidłowym w niewielkim stopniu podlegają regulacji przez TNF- α .

Podsumowując, zwiększony odsetek makrofagów płynu otrzewnowego wykazujących ekspresję TNFR1 i TNFR2 u kobiet z endometriozą sugeruje, że komórki te zależne są od stymulacji TNF- α .

Wnioski

1. Jednojądrzaste komórki immunokompetentne płynu otrzewnowego wykazują ekspresję obu typów receptora dla TNF- α .
2. U kobiet z endometriozą wzrasta odsetek makrofagów płynu otrzewnowego wykazujących ekspresję receptorów dla TNF- α .
3. Odsetek limfocytów T płynu otrzewnowego wykazujących ekspresję receptorów dla TNF- α nie zmienia się w przebiegu endometriozy.
4. Płyn otrzewnowy kobiet chorujących na endometriozę zawiera większą liczbę jednojądrzastych komórek immunokompetentnych w porównaniu do stanu prawidłowego.

Piśmiennictwo

1. Wu M, Ho H. The role of cytokines in endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 2003, 49, 285-296.
2. Agic A, Xu H, Finas D, [et al.]. Is endometriosis associated with systemic subclinical inflammation? *Gynecol Obstet Invest.* 2006, 62, 139-147.
3. Berkanoglu M, Arici A. Immunology and endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 2003, 50, 48-59.
4. Halme J, Becker S, Haskill S. Altered maturation and function of peritoneal macrophages: possible role in pathogenesis of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1987, 156, 783-789.
5. Haney A, Muscato JJ, Weinberg J. Peritoneal fluid cell populations in infertility patients. *Fertil Steril.* 1981, 35, 696-698.
6. Halme J, Becker S, Hammond M, [et al.]. Pelvic macrophages in normal and infertile women: the role of patent tubes. *Am J Obstet Gynecol.* 1982, 142, 890-895.
7. Halme J, Becker S, Wing R. Accentuated cyclic activation of peritoneal macrophages in patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1984, 148, 85-90.
8. Dunselman G, Hendrix M, Bouckaert P, [et al.]. Functional aspects of peritoneal macrophages in endometriosis of women. *J Reprod Fertil.* 1988, 82, 707-710.
9. Lebovic D, Mueller M, Taylor R. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril.* 2001, 75, 1-10.
10. Eisermann J, Gast M, Pineda J, [et al.]. Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of women undergoing laparoscopic surgery. *Fertil Steril.* 1988, 50, 573-579.
11. Iwabe T, Harada T, Tsudo T, [et al.]. Tumor necrosis factor-alpha promotes proliferation of endometriotic stromal cells by inducing interleukin-8 gene and protein expression. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000, 85, 824-831.
12. Braun D, Ding J, Dmowski W. Peritoneal fluid mediated enhancement of eutopic and ectopic endometrial cell proliferation is dependent on tumor necrosis factor-alpha in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2002, 78, 727-732.
13. Akoum A, Lawson C, McColl S, [et al.]. Ectopic endometrial cells express high concentrations of interleukin (IL)-8 in vivo regardless of the menstrual cycle phase and respond to oestradiol by up-regulating IL-1-induced IL-8 expression in vitro. *Mol Hum Reprod.* 2001, 7, 859-866.
14. Sillem M, Prifti S, Monga B, [et al.]. Integrin-mediated adhesion of uterine endometrial cells from endometriosis patients to extracellular matrix proteins is enhanced by tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interleukin-1 (IL-1). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999, 87, 123-127.
15. Zhang R, Wild R, Ojago J. Effect of tumor necrosis factor-alpha on adhesion of human endometrial stromal cells to peritoneal mesothelial cells: an in vitro system. *Fertil Steril.* 1993, 59, 1196-1201.
16. Maas J, Calhaz-Jorge C, Riet G, [et al.]. Tumor necrosis factor-alpha but not interleukin-1 beta or interleukin-8 concentrations correlate with angiogenic activity of peritoneal fluid from patients with minimal to mild endometriosis. *Fertil Steril.* 2001, 75, 180-185.
17. D'Antonio M, Martelli F, Peano S, [et al.]. Ability of recombinant human TNF binding protein-1 (r-hTBP-1) to inhibit the development of experimentally-induced endometriosis in rats. *J Reprod Immunol.* 2000, 48, 81-98.
18. Koga K, Osuga Y, Tsutsumi O, [et al.]. Increased concentrations of soluble tumour necrosis factor receptor (sTNFR) I and II in peritoneal fluid from women with endometriosis. *Mol Hum Reprod.* 2000, 6, 929-33.
19. Kharfi A, Labelle Y, Mailloux J, [et al.]. Deficient expression of tumor necrosis factor receptor type 2 in the endometrium of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 2003, 50, 33-40.
20. Tartaglia L, Weber R, Figari I, [et al.]. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991, 88, 9292-9296.
21. Locksley R, Killeen N, Lenardo M. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001, 104, 487-501.
22. Liu Z, Hsu H, Goeddel D, [et al.]. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell.* 1996, 87, 564-576.
23. Pimentel-Muinos F, Seed B. Regulated commitment of TNF receptor signaling: a molecular switch for death or activation. *Immunity.* 1999, 11, 783-793.
24. Richter O, Dorn C, Rosing B, [et al.]. Tumor necrosis factor secretion by peritoneal macrophages in patients with endometriosis. *Arch Gynecol Obstet.* 2005, 271, 143-147.
25. Nophar Y, Kemper O, Brakebusch C, [et al.]. Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both cell surface and soluble form of the receptor. *EMBO J.* 1990, 9, 3269-3278.