

Aktywność monocytów krwi obwodowej po stymulacji surowicą kobiet z endometriozą

Monocyte activity after stimulation by serum of women with endometriosis

Sikora Justyna, Anasz-Kondera Zdzisława, Mielczarek-Palacz Aleksandra, Witek Andrzej

Katedra i Zakład Immunologii i Serologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice
Katedra i Klinika Położnictwa i Ginekologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

Streszczenie

W powstawaniu i rozwoju endometriozy ważną rolę odgrywają zaburzenia układu odpornościowego. Makrofagi otrzewnowe wykazują nadmierną aktywność, która przejawia się wzmożoną syntezą i wydzielaniem cytokin oraz czynników wzrostu. Prekursorami tych komórek we krwi obwodowej są monocyty.

Cel pracy: Celem pracy było zbadanie w warunkach hodowli komórkowej aktywności monocytów krwi obwodowej osoby zdrowej, po stymulacji surowicą kobiet z endometriozą. Miarą aktywności monocytów było stężenie produkowanej przez te komórki neopteryny (NPT).

Materiał i metody: Badaniami objęto 29 kobiet z endometriozą (średnia wieku: $28,7 \pm 4,5$), wśród których zdiagnozowano 18 kobiet z umiarkowaną endometriozą (I i II stopień wg AFS) oraz 11 kobiet z zaawansowaną endometriozą (III i IV stopień wg AFS). Grupę referencyjną stanowiło 15 kobiet w wieku (średnia wieku: $27,4 \pm 5,3$), u których wykluczono endometriozę i inne patologiczne zmiany w obrębie miednicy mniejszej.

Materiałem wykorzystanym do badań były monocyty wyizolowane z krwi obwodowej zdrowego mężczyzny oraz surowica kobiet z endometriozą i kobiet z grupy referencyjnej. Monocyty stymulowano 15% i 30% surowicą badanych kobiet w warunkach hodowli komórkowej. Stężenie NPT w nadsączu z hodowli monocytów oznaczano metodą immunoenzymatyczną ELISA.

Wyniki: Surowica kobiet z endometriozą wywołuje wzrost stężenia NPT w supernatancie z hodowli w porównaniu do surowicy kobiet z grupy referencyjnej ($p < 0,0001$). Najwyższy wzrost zaobserwowano po stymulacji surowicą od kobiet z zaawansowaną postacią endometriozy.

Wnioski: Surowica kobiet z endometriozą silniej pobudza aktywność monocytów krwi obwodowej, co przejawia się wzmożoną syntezą i wydzielaniem NPT.

Słowa kluczowe: **endometrioza / monocyty / płyn otrzewnowy / surowica /**

Adres do korespondencji:

Justyna Sikora
Katedra i Zakład Immunologii i Serologii, Śląski Uniwersytet Medyczny
ul. Raciborska 15, 40-074 Katowice
e-mail: jsikora@slam.katowice.pl

Otrzymano: 01.08.2007

Zaakceptowano do druku: 31.08.2007

Abstract

Objectives: Impairments of immune system play an important role in the development and pathogenesis of endometriosis. In affected women peritoneal macrophages are excessively activated, which is visible in an increased synthesis and release of macrophage-derived cytokines and growth factors. Monocytes are precursors of those cells in peripheral blood. The aim of the study was to evaluate the activity of monocyte from a healthy person, after stimulation by serum of women with endometriosis in cell culture conditions. The indicator of monocyte activity was the concentration of neopterin (NPT), produced by those cells.

Material and methods: Twenty nine women with endometriosis (mean age: 28.7 ± 4.5 years) were included into this study. Among them were 18 women with moderate endometriosis (I and II stages according to AFS) and 11 women with advanced stages of the disease (III and IV stages according to AFS). Reference group consisted of fifteen healthy women (mean age: 27.4 ± 5.3 years), with excluded endometriosis and other pathological disorders within the pelvis.

Monocytes used in the study were isolated from peripheral blood of a healthy male and serum of women with endometriosis and control group. Monocytes were cultured in attendance of 15% and 30% serum of studied women. The concentration of NPT in the supernatants of culture was measured by enzyme-linked immunosorbent ELISA assay.

Results: The serum of women with endometriosis causes an increased concentration of NPT in supernatants, when comparing with serum of healthy women ($p < 0.0001$). The highest concentration was observed after stimulation by serum of women with advanced endometriosis.

Conclusions: Serum of women with endometriosis can have an effect on monocyte activity, which is displayed in the increased synthesis and secreted of NPT.

Key words: **endometriosis / monocyte activity / peritoneal fluid / serum /**

Wstęp

Endometrioza i towarzysząca jej niepłodność stanowią jeden z poważniejszych problemów klinicznych i społecznych, zwłaszcza, że patogenezę tego schorzenia nie jest do końca wyjaśniona [1]. W ostatnich latach wielu autorów potwierdza, że jednym z głównych warunków utrzymania i rozwoju wszczepu endometrialnego, niezależnie od sposobu pojawienia się komórek *endometrium* w jamie otrzewnej, są zaburzenia mechanizmów immunologicznych [2].

Zmiany w układzie odpornościowym mają głównie charakter lokalny i zachodzą najczęściej w jamie otrzewnej. Natomiast mediatory układu odpornościowego zawarte w płynie otrzewnym, który zapewnia swoiste środowisko narządom miednicy mniejszej, mogą sprzyjać rozwojowi choroby [3].

W warunkach fizjologicznych najliczniejszą populacją komórek układu odpornościowego w płynie otrzewnym są makrofagi, stanowiące około 85%. Natomiast u kobiet z endometriozą dochodzi do zwiększenia ich liczby oraz aktywności, co jest związane ze wzmożoną syntezą oraz sekrecją cytokin i czynników wzrostu. Wydzielane przez makrofagi otrzewne czynniki nie tylko ułatwiają implantację ektopowej tkanki, ale również są odpowiedzialne za przeżycie i proliferację *endometrium* [4, 5].

Ponadto, zwiększona synteza cytokin, między innymi interleukiny (IL)-8, MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) oraz RANTES (*Regulated on Activation, Normal T-Cell Expressed and Secreted*), poprzez działanie chemotaktyczne zapewnia stały napływ komórek układu odpornościowego do jamy otrzewnej [6, 7, 8].

Jednym z markerów aktywności monocytów i makrofagów jest neopteryna (NPT) [9]. Jest to cytokina należąca do grupy pterydyn, syntetyzowana tylko przez monocyty i makrofagi stymulowane interferonem- γ (INF- γ), uwalnianym przez aktywne limfocyty T.

Synteza NPT znacznie wzrasta pod wpływem cytokin typu Th1, głównie IL-2 i IL-12. Natomiast produkty sekrecji limfocytów Th2, czyli IL-4, IL-5 i IL-10 to silne czynniki hamujące syntezę tego czynnika. Synteza NPT jest ściśle związana z aktywacją odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego a jej wydzielanie świadczy o wzmożonej aktywności sekrecyjnej komórek. Stężenie NPT wzrasta w chorobach z autoagresji oraz w chorobach nowotworowych, a jej wyższe stężenie koreluje ze stopniem zaawansowania choroby [10].

Cel pracy

Celem pracy było zbadanie w warunkach hodowli komórkowej zdolności surowicy kobiet z endometriozą do zmiany aktywności monocytów krwi obwodowej osoby zdrowej. Miarą aktywności monocytów było stężenie produkowanej przez te komórki NPT.

Materiał i metody

Badaniami objęto 44 kobiety w wieku od 20 do 42 lat (średnia wieku $27,5 \pm 5,9$ lat) poddanych laparoskopii w celu ustalenia przyczyn istniejącej niepłodności pierwotnej lub niezdiagnozowanych bólów w obrębie miednicy mniejszej. Wszystkie badane kobiety miały regularne cykle menstruacyjne, trwające 28 ± 4 dni. Żadna z kobiet nie stosowała środków hormonalnych w ciągu 3 miesięcy przed zabiegiem oraz nie była leczona lekami immunosupresyjnymi.

Do grupy badanej zakwalifikowano 29 kobiet w wieku od 23 do 42 lat (średnia wieku: $28,7 \pm 4,5$) z rozpoznaną laparoskopowo i potwierdzoną histopatologicznie endometriozą miednicy mniejszej.

Rozległość i nasilenie zmian endometrialnych w jamie otrzewnej oceniano według klasyfikacji Amerykańskiego Towarzystwa Płodności (*Revised American Fertility Society*) [11].

Aktywność monocytów krwi obwodowej po stymulacji surowicą kobiet z endometriozą.

Wśród badanych zdiagnozowano 18 kobiet z umiarkowaną endometriozą (I i II stopień wg AFS) oraz 11 kobiet z zaawansowaną endometriozą (III i IV stopień wg AFS). Grupę referencyjną stanowiło 15 kobiet w wieku (średnia wieku: $27,4 \pm 5,3$), u których wykluczono endometriozę i inne patologiczne zmiany w obrębie miednicy mniejszej.

Materiałem wykorzystanym do badań był pochodzący od zdrowego mężczyzny kożuszek leukocytarно-platekowany, z którego wyizolowano monocyty. Wykorzystano również surowicę otrzymaną z krwi obwodowej pobranej po rozpoznaniu endometriozy u kobiet z grupy badanej lub po jej wykluczeniu u kobiet z grupy referencyjnej.

Monocyty izolowano metodą adherentną, wykorzystując ich zdolność przylegania do powierzchni szklanych i plastikowych. W pierwszym etapie izolowano jednojądrzaste komórki surowicy poprzez wirowanie na gradiencie gęstości (LinfoSep, Biomedics, Spain) i następnie oceniono gęstość i żywotność wyizolowanych komórek. W drugim etapie wyizolowane makrofagi i limfocyty, zawieszono w medium hodowlanym (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Bio Wittaker, Belgium), które zawierało mieszaninę antybiotyków (Penicillin – Streptomycin Solution, Sigma Chemical Corporation, USA) i 10% płodową surowicę cielęcą (*Fetal Bovine Serum Premium-FBS*, Bio Wittaker, Belgium), i hodowano przez 2 godziny, w temperaturze 37°C i atmosferze z dodatkiem 5% CO_2 .

W tym czasie monocyty adherowały do powierzchni naczynia hodowlanego, a limfocyty pozostawały w nadsączu. Po zakończeniu inkubacji, komórki nieadherentne odpłukano, a wyizolowane monocyty zawieszono w medium z dodatkiem antybiotyków oraz 15% lub 30% surowicę (v/v) badanych kobiet i ponownie inkubowano w temperaturze 37°C i atmosferze z dodatkiem 5% CO_2 przez 48 godzin.

Po zakończonej inkubacji supernatant zebrano i przechowywano w temperaturze -80°C . Stężenie NPT w nadsączu z hodowli monocytów oznaczano metodą immunoenzymatyczną ELISA, wykorzystując test Neopterin ELISA kit (IBL, Germany). Czułość testu wynosiła $0,7\text{nmol/l}$ ($0,18\text{ng/ml}$).

Stężenie NPT w supernatancie z hodowli monocytów było różnicą pomiędzy stężeniem tego parametru w supernatancie i w surowicy, którą stymulowano komórki.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. Wszystkie kobiety zostały poinformowane o celu prowadzonych badań i wyraziły zgodę na pobranie i wykorzystanie próbek biologicznych.

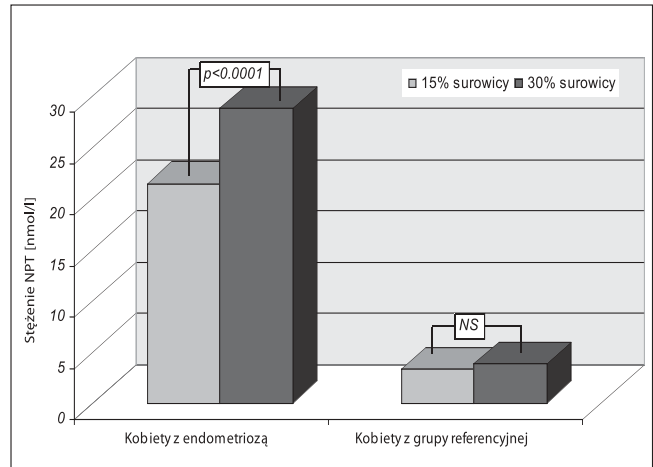
Wyniki opracowano statystycznie przy pomocy programu Statistica v. 7, wykorzystując test Shapiro-Wilka w celu weryfikacji normalności otrzymanych wyników oraz testu t-Studenta w celu oceny istotności różnic. Za istotny statystycznie przyjmowano poziom $p \leq 0,05$.

Wyniki

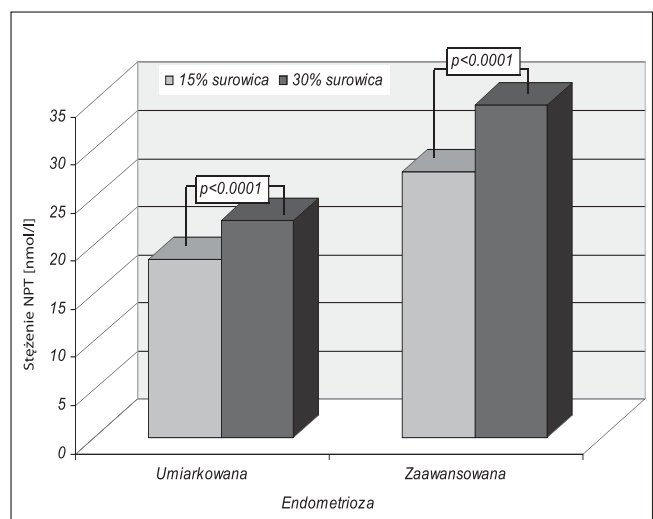
Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinie 1 i 2.

Surowica krwi obwodowej, którą stymulowano monocyty krwi obwodowej, wpływa na aktywność tych komórek, co manifestuje się produkcją NPT.

Po stymulacji 15% surowicą kobiet z endometriozą średnie stężenie NPT w supernatancie z hodowli monocytów wynosiło $21,42 \pm 4,54\text{nmol/l}$, natomiast po stymulacji 30% surowicą



Rycina 1. Stężenie NPT w supernatancie z hodowli monocytów stymulowanych 15% i 30% surowicą kobiet z endometriozą i kobiet z grupy referencyjnej.



Rycina 2. Stężenie NPT w supernatancie z hodowli monocytów stymulowanych 15% i 30% surowicą kobiet z umiarkowaną i zaawansowaną endometriozą.

badanych kobiet średnie stężenie NPT wynosiło $28,79 \pm 5,61\text{nmol/l}$. Po stymulacji większym stężeniem surowicy kobiet z endometriozą zaobserwowano istotny statystycznie wzrost stężenia NPT ($p < 0,0001$). Po stymulacji 15% surowicą kobiet z grupy referencyjnej średnie stężenie NPT w supernatancie z hodowli monocytów wynosiło $3,31 \pm 0,99\text{nmol/l}$, natomiast po stymulacji 30% surowicą badanych kobiet średnie stężenie NPT wynosiło $3,81 \pm 1,02\text{nmol/l}$.

Analiza statystyczna nie wykazała różnic istotnych statystycznie pomiędzy stężeniem badanego parametru po stymulacji monocytów 15% i 30% surowicą kobiet z grupy referencyjnej. Surowica kobiet z endometriozą powodowała zwiększone stężenie NPT w porównaniu z surowicą kobiet zdrowych ($p < 0,0001$).

Ponadto, produkcja NPT zmieniała się wraz ze stopniem zaawansowania endometriozy. Po stymulacji 15% surowicą kobiet z umiarkowaną postacią endometriozy stężenie NPT wynosiło $18,52 \pm 3,21$ nmol/l, a po zwiększeniu objętości surowicy $22,61 \pm 4,19$ nmol/l.

Z kolei po stymulacji surowicą kobiet z zaawansowaną postacią choroby, stężenie badanego parametru wynosiło $27,64 \pm 4,71$ nmol/l (15%) oraz $33,58 \pm 5,38$ nmol/l. Najwyższy wzrost zaobserwowano po stymulacji surowicą od kobiet z zaawansowaną endometriozą ($p < 0,0001$).

Dyskusja

Endometrioza jest jednym z trudniejszych do zdiagnozowania i wyleczenia schorzeń ginekologicznych. Patogeneza endometriozy jest nadal niewyjaśniona. Przypuszcza się, że ważną rolę w powstawaniu tej choroby odgrywają zaburzenia układu odpornościowego [2]. W tym celu bada się aktywność komórek tego układu i oznacza stężenie produkowanych przez te komórki rozpuszczalnych mediatorów.

W tej pracy badany był *in vitro* wpływ surowicy kobiet z endometriozą i kobiet z grupy referencyjnej na aktywność sekrecyjną monocytów, poprzez oznaczenie stężenia NPT, produkowanej przez te komórki. Z przeprowadzonej analizy wynika, że surowica wpływa na aktywność monocytów, co przejawia się produkcją NPT. Stężenie NPT produkowanej przez monocyty stymulowane surowicą od kobiet z endometriozą było istotnie wyższe, niż stężenie NPT wydzielanej przez monocyty po stymulacji surowicą kobiet zdrowych. Najwyższe stężenie NPT obserwowano po stymulacji surowicą kobiet z zaawansowaną postacią endometriozy.

Na aktywność komórek układu odpornościowego, między innymi monocytów i makrofagów, mogą wpływać progesteron i 17- β -estradiol. Wpływ tych hormonów na układ odpornościowy kobiety znajduje odzwierciedlenie w ogólnoustrojowej zmianie aktywności komórek tego układu [12, 13]. Dlatego też, w zastosowanym układzie badawczym monocyty izolowano z krwi obwodowej tylko mężczyzn, w celu eliminacji endogennego wpływu hormonów na komórki układu odpornościowego.

Z danych literaturowych wynika, że zaburzenia w układzie odpornościowym u kobiet z endometriozą dotyczą przede wszystkim mikrośrodowiska jamy otrzewnowej, a najwięcej zmian obserwuje się w płynie otrzewnowym [3]. Jednak również we krwi obwodowej może dochodzić do istotnych zmian w funkcjonowaniu układu odpornościowego, które mogą odzwierciedlać zmiany toczące się lokalnie. Natomiast, zwiększona produkcja cytokin prozapalnych we krwi obwodowej, między innymi IL-1 [14, 15], IL-6 [16] i czynnika martwicy nowotworu TNF (*tumour necrosis factor*) [17] może sprzyjać rozwojowi procesu zapalnego u tych kobiet. Znacznie większe stężenie tych cytokin obserwuje się w płynie otrzewnowym, co potwierdza nasilenie zapalenia w miejscu występowania ognisk ektopowej tkanki endometrialnej. Ponadto, nasze wcześniejsze badania [18] wykazały, że również płyn otrzewnowy kobiet z endometriozą wpływał na zwiększenie aktywności monocytów krwi obwodowej, co wiązało się ze wzmożoną produkcją NPT. Jednak uzyskane stężenia NPT po stymulacji płynem otrzewnowym było znacząco wyższe w porównaniu do wyników otrzymanych w tej pracy.

Wyniki te sugerują, że już we krwi obwodowej kobiet z endometriozą dochodzi do wstępnej rekrutacji monocytów, które migrując do płynu otrzewnowego, przekształcają się w makrofagi i powiększają pulę hiperaktywnych makrofagów otrzewnowych. Może to potwierdzić fakt, że im większym stężeniem surowicy kobiet badanych, stymulowano monocyty, tym obserwowano większą produkcję NPT. Takiej zależności nie stwierdzono po stymulacji surowicą kobiet zdrowych.

Obserwacje te mogą potwierdzić badania Cao i wsp. [19]. Wykazali oni, że jednym z głównych czynników, który przyczyniał się do zwiększenia liczby makrofagów w płynie otrzewnowym są ogniska endometriozy. Ich eksperyment przeprowadzony na modelu zwierzęcym, wykazał, że już w 24 godziny po dootrzewnowym podaniu homogenizatu ekotopowej tkanki endometrialnej liczba makrofagów otrzewnowych zwiększała się jednokrotnie. Wydzielane przez komórki płynu oraz tkankę endometrialną cytokiny i czynniki wzrostu, powodowały wytworzenie lokalnego stanu zapalnego i przyciąganie komórek układu odpornościowego z krwi obwodowej [19].

Ze względu na lokalny charakter choroby wielu autorów badało wpływ przede wszystkim płynu otrzewnowego kobiet z endometriozą na aktywność komórek układu odpornościowego oraz produkcję cytokin. Weil i wsp. [20] badali właściwości chemotaktyczne płynu otrzewnowego w testach *in vitro*. Wykazali oni, że płyn pochodzący od kobiet z endometriozą istotnie zwiększał chemotaksję komórek fagocytarnych.

Z kolei, Gogacz i wsp. [21] zaobserwowali, że płyn otrzewnowy znacznie zmniejsza zdolność makrofagów do fagocytozy pałeczek *Escherichia Coli*. Oosterlync i wsp. [22] wykazali, że płyn otrzewnowy kobiet z endometriozą wykazuje immunosupresyjne właściwości w stosunku do komórek NK (*Natural Killer*).

Podobne wyniki otrzymali Takeshita i wsp. [23], którzy badali wpływ płynu otrzewnowego na syntezę i sekrecję TNF przez monocyty. Zaobserwowali oni hamujący wpływ płynu otrzewnowego od kobiet z endometriozą na wydzielanie przez tę cytokinę. Wykazali także, że synteza TNF zmniejszała się wraz ze wzrostem stężenia płynu otrzewnowego w podłożu hodowlanym. Takeshita nie zaobserwował istotnego związku pomiędzy zmniejszeniem syntezy TNF, a stopniem zaawansowania endometriozy kobiet, od których pochodził płyn otrzewnowy użyty do badań.

Ze tego względu że, u kobiet z endometriozą dochodzi do zaburzeń w eliminacji ektopowych komórek endometrialnych na drodze apoptozy [24], badano również wpływ płynu otrzewnowego na apoptozę granulocytów obojętnochłonnych. Kwak i wsp. [25] zaobserwowali, że po stymulacji płynem kobiet z endometriozą mniejsza liczba neutrofilów ulega apoptozie niż po stymulacji płynem kobiet zdrowych. Wyniki tych badań sugerują, że podobne działanie wywiera płyn otrzewnowy na ektopowe implanty, które wraz ze wstecznym prądem krwi menstruacyjnej dostają się do jamy otrzewnowej. Z kolei, badania Brauna i wsp. [26] wykazały, że płyn otrzewnowy kobiet z endometriozą indukuje proliferację *in vitro* zarówno eutopowych, jak i ektopowych komórek endometrialnych. Zatem składniki płynu otrzewnowego u tych chorych, nie tylko nie pomagają w usuwaniu ektopowych ognisk *endometrium*, ale wręcz sprzyjają ich rozwojowi.

Aktywność monocytów krwi obwodowej po stymulacji surowicą kobiet z endometriozą.

Płyn otrzewnowy poprzez bezpośredni kontakt z ektopowymi ogniskami endometriozy odzwierciedla toczący się proces chorobowy. Jednak, pomimo wielu lat badań, patogenezą endometriozy oraz mechanizmy toczące się w jamie otrzewnowej nie są dokładnie poznane. Być może część z nich ma odzwierciedlenie również we krwi obwodowej. Dlatego też, badanie właściwości surowicy kobiet z endometriozą oraz jej wpływu na funkcjonowanie komórek układu odpornościowego może uzupełnić wiedzę o roli układu odpornościowego w powstawaniu i rozwoju endometriozy. Ponadto, poznanie mechanizmów zachodzących ogólnoustrojowo może pozwolić na znalezienie nowych markerów, które uzupełnią nieinwazyjną diagnostykę endometriozy.

Wnioski

1. Surowica krwi kobiet z endometriozą silniej pobudza aktywność monocytów niż surowica kobiet z grupy referencyjnej, co sugeruje zmiany w funkcjonowaniu układu odpornościowego we krwi obwodowej badanych kobiet.
2. Najwyższy wzrost aktywności monocytów zaobserwowano po stymulacji surowicą kobiet z zaawansowaną endometriozą.

Praca zgłoszona na Konferencję Naukowo-Szkoleniową nt. „Immunoterapia w ginekologii i położnictwie” w Lublinie 12-13.10.2007

Piśmiennictwo

1. Nap A, Groothuis, Demir A, [et al.]. Pathogenesis of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynecol.* 2004, 18, 233-244.
2. Dmowski W, Braun D. Immunology of endometriosis. *Clin Obstet Gyn.* 2004, 18, 245-263.
3. Bedaiwy M, Falcone T. Peritoneal fluid environment in endometriosis. Clinicopathological implications. *Minerva Ginecol.* 2003, 55, 333-345.
4. Lebovic D, Mueller M, Taylor R. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril.* 2001, 75, 1-10.
5. Bedaiwy M, Falcone T, Sharma R, [et al.]. Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. *Hum Reprod.* 2002, 17, 426-431.
6. Arici A. Local cytokines in endometrial tissue: the role of interleukin-8 in the pathogenesis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2002, 955, 101-109.
7. Akoum A, Kong J, Metz C, [et al.]. Spontaneous and stimulated secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage migration inhibitory factor by peritoneal macrophages in women with and without endometriosis. *Fertil Steril.* 2002, 77, 989-994.
8. Lebovic D, Chao V, Taylor R. Peritoneal macrophages induce RANTES (regulated on activation, normal T cells expressed and secreted) chemokine gene transcription in endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004, 89, 1397-1401.
9. Widner B, Wirleitner B, Baier-Bitterlich G, [et al.]. Cellular immune activation, neopterin production, tryptophan degradation and the development of immunodeficiency. *Arch Immunol Ther Exp.* 2000, 48, 251-258.
10. Murr C, Widner B, Wirleitner B, [et al.]. Neopterin as a marker for immune system activation. *Curr Drug Metab.* 2002, 3, 175-187.
11. Revised American Society for Reproductive Medicine Classification of Endometriosis: 1996. *Fertil Steril.* 1997, 67, 817-821.
12. Chao T, Chao H, Chen M, [et al.]. Female sex hormones modulate the function of LPS-treated macrophages. *Am J Reprod Immunol.* 2000, 44, 310-318.
13. Verthelyi D, Klinman D. Sex hormone levels correlate with the activity of cytokine-secreting cells in vivo. *Immunology.* 2000, 100, 384-390.
14. Keenan J, Chen T, Chadwell N, [et al.]. IL-1beta, TNF-alpha and IL-2 in peritoneal fluid and macrophage-conditioned media of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 1995, 34, 381-385.
15. Kharfi A, Akoum A. Soluble interleukin-1 receptor type II blocks monocyte chemoattractant protein-1 secretion by U937 cells in response to peripheral blood serum of women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2002, 78, 836-842.

16. Punnonen J, Teisala K, Ranta H, [et al.]. Increased levels of interleukin-6 and interleukin-10 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1996, 174, 1522-1526.
17. Calhaz-Jorge C, Costa A, Barata M, [et al.]. Tumour necrosis factor alpha concentrations in the peritoneal fluid of infertile women with minimal or mild endometriosis are lower in patients with red lesions only than in patients without red lesions. *Hum Reprod.* 2000, 15, 1256-1260.
18. Kondera-Anasz Z, Sikora J, Mielczarek-Palacz A, [et al.]. Modulation of monocyte activity by peritoneal fluid of women with and without endometriosis. *Pol J Environ Study.* 2005, 14, 216-219.
19. Cao X, Yang D, Song M, [et al.]. The presence of endometrial cells in the peritoneal cavity enhances monocyte recruitment and induces inflammatory cytokines in mice: implications for endometriosis. *Fertil Steril.* 2004, 82, 999-1007.
20. Weil S, Wang S, Perez M, [et al.]. Chemotaxis of macrophages by a peritoneal fluid protein in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 1997, 67, 865.
21. Gogacz M, Polak G, Koziol-Montewka M, [et al.]. Suppressive effect of peritoneal fluid from women with endometriosis on the phagocytic activity of peritoneal macrophages – preliminary study. *Pol J Gynecol Invest.* 1999, 2, 9-12.
22. Oosterlynck D, Meuleman C, Waer M, [et al.]. Immunosuppressive activity of peritoneal fluid in women with endometriosis. *Obstet Gynecol.* 1993, 82, 206-212.
23. Takeshita S, Dobashi K, Abe S, [et al.]. Suppression of macrophage activation by peritoneal fluid from patients with endometriosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1998, 20, 243-248.
24. Harada T, Taniguchi F, Izawa M, [et al.]. Apoptosis and endometriosis. *Front Biosci.* 2007, 12, 3140-3151.
25. Kwak J, Park S, Kim K, [et al.]. Modulation of neutrophil apoptosis by plasma and peritoneal fluid from patients with advanced endometriosis. *Hum Reprod.* 2002, 17, 595-600.
26. 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, 4, 727-732.