

# Az endometriosis semi-invazív diagnózisa

Doktori tézisek

**Dr. Bokor Attila**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola  
KU Leuven  
Orvostudományi Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Thomas D'Hooghe PhD  
Dr. Fülöp Vilmos PhD, DSc

Hivatalos bírálók: Prof. Gócze Péter PhD, DSc  
Dr. Patócs Attila PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Vásárhelyi Barna PhD, DSc  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Siklós Pál PhD  
Dr. Valent Sándor PhD

**Budapest  
2010**

## BEVEZETÉS

Endometriosisnak nevezzük azt a kórképet, amelyre a méh üregén kívül, leggyakrabban a kismedencében elhelyezkedő, az endometriumhoz hasonló szövet jelenléte jellemző. Hazánkban körülbelül 180 000, 15 és 39 év közötti nőt érint.

Etiológiája ismeretlen, napjainkig számos elmélet született a betegség patomechanizmusának tisztázására. A legszélesebb körben elfogadott magyarázat, a Sampson által már 1924-ben leírt transzplantációs elmélet, mely szerint az endometriális sejtek/ szövetfragmentumok retrográd menstruáció során - a petevezetéseken át - jutnak a hasüregbe. Nincs azonban bizonyíték arra, hogy a peritoneális folyadékban található endometriális sejtek koncentrációja, vörös- és fehérvérsejt, valamint hemoglobintartalma menstruáció során magasabb lenne, mint a menstruációs ciklus többi fázisában.

Az endometriosis diagnózisának „gold standard” eljárása a kismedence laparoscopos áttekintése. Non-invazív diagnosztikai módszer hiányában, a tünetek kezdete és a definitív diagnózis között átlagosan 8 év telik el, a diagnosztikus késés, amennyiben a betegség kezelés nélkül marad, éveken át tartó szenvedéshez, illetve meddőséghez vezethet.

A perifériás vérből kimutatott biomarkereken alapuló non-invazív diagnosztikai eljárások hatékonysága, elégtelen szenzitivitásuk és specificitásuk miatt, korlátozott.

Az endometriosisban szenvedők endometriumát túlnyomórészt kis átmérőjű szenzoros (főként C-típusú),

adrenerg és kisebb számban A $\delta$  és cholinerg neuronok idegzik be. Irodalmi adatok szerint, egészséges nők endometriumában ezek az idegvégzödések hiányoznak vagy minimálisan expresszáltak.

A szenzoros idegrostok azonosíthatók neurális transzmitterek és proteinek immunhisztokémiai analízisével, mint a substance P (SP), a vasoactiv intestinalis polypeptid (VIP), a protein gene product 9.5 (PGP9.5), a neurofilamentum (NF), a neuropeptid Y (NPY), valamint a calcitonin gene-related protein (CGRP).

Vizsgálataink alapján az endometriosisban szenvedők méhnyálkahártya mintájában kimutatott szenzoros idegrostsűrűség különbség révén, lehetőség nyílik egy semi-invazív diagnosztikai módszer kifejlesztésére, ami elősegítheti endometriosis korai diagnózisát.

## CÉLKITŰZÉSEK

1. Kutatásunk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a kis átmérőjű C és A $\delta$ -típusú, szenzoros idegrostok előfordulási gyakoriságát I. és II. stádiumú endometriosisban szenvedők endometriumában, valamint egészséges kontrollokban.
2. Az idegrostsűrűség különbség alkalmasságának vizsgálata az endometriosis semi-invazív diagnosztikájában.
3. Megvizsgáljuk a retrográd menstruáció szerepét az endometriosis kialakulásában.
4. Endometrium sejtek kimutatása valamint vörös- és fehérvérsejt koncentrációk meghatározása: a női nemi ciklus menstruációs és non-menstruációs fázisában, valamint endometriosisban szenvedők és egészséges kontrollok peritoneális folyadékában (PF).

## MÓDSZEREK

A KULeuven kísérleti nőgyógyászati laboratóriumában tárolt, szekréciós fázisnak megfelelő, transcervicálisan nyert endometrium mintákat (n=40) hasonlítottunk össze: laparoscopia során és szövettani vizsgálattal is igazolt endometriosisban szenvedő (n=20) valamint egészséges nők (n=20) mintáit.

Immunhisztokémiai módszerek segítségével megjelöltük a funkcionális réteg C, A $\delta$ , szenzoros, valamint adrenerg és cholinerg idegrostjait, melyek kimutatásához antihuman protein gene product 9.5-t, anti-neurofilament proteint, anti-substance P-t, anti-vasoactiv intestinalis peptidet, anti-neuropeptid Y-t, és anti-calcitonine gene-related polipeptidet használtunk. Pozitív kontrollként humán bőrt, negatív kontrollként nyúl és egér immunoglobulin frakciókat használtunk, melyek koncentrációját az alkalmazott antitestek koncentrációjához igazítottuk.

Az idegrostok előfordulási gyakoriságát Zeiss Axioskop 50 mikroszkóppal vizsgáltuk. Minden látóteret lefényképeztünk a hozzá kapcsolt Zeiss színes Axiocam MRc5 kamerával és a fotókat KS400 3.0 képanalizáló szoftver segítségével értékeltük.

Következő vizsgálsorozatunkban egészséges (n=48) és endometriosisban (n=59) szenvedő páciensek kismedencéjéből, laparoscopia során nyert PF összetevőit hasonlítottuk össze a menstruációs ciklus luteális (n=46), folliculáris (n=38) és menstruációs (n=23) fázisaiban.

Az endometriosisban szenvedők stádiumbeosztása az American Society for Reproductive Medicine (rAFS) irányelveit követve minimális (n=25), mérsékelt (n=20), közepes (n=6) és súlyos (n=8) fokozatoknak felelt meg.

A sejtszámokat (leukociták, erithrociták, thrombociták) sejtszámláló segítségével határoztuk meg. 32 páciens peritoneális folyadékmintáját vizsgálva (13 kontroll és 19 endometriózisban szenvedő), a PF-t CytoRich-módszerrel fixáltuk, majd ThinPrep alkalmazásával vékonyrétegeket készítettünk, amelyeket Papanicolau-szerint és immuncitokémiai módszerekkel festettünk meg.

Kísérletünkben citokeratin 7 (CK), CK 8/18, Ber-Ep4, vimentin, kalretinin és CD68-ellenes monoklonális antitesteket használtunk. A Ber-EP4 az epitheliális (bizonyos esetekben mesotheliális) eredetű sejtek markere. A CD68 specifikus a monocita/makrofág sejtvonalra; a CK7 és a CK8/18 mind az epitheliális, mind a mesotheliális sejtek markere, míg a kalretinin és a vimentin az endometriális stroma- és a mesotheliális sejtek markere.

A statisztikai analízis során Kolomogorov-Smirnov/Lilliefors, Shapiro-Wilks, Fisher exact, Mann-Whitney U próbát, Receiver Operator Characteristic (ROC) analízist, logisztikus regresszió analízist, Least Squares Support Vector Machine és Live One Out Cross Validation módszert (LS-SVM+LOOCV) alkalmaztunk.

## **EREDMÉNYEK**

### **Szenzoros C és A $\delta$ -típusú idegrostok vizsgálata az endometrium functionális rétegében**

Az endometriosisban szenvedő nők esetében a méhnyálkahártya minták 90%-ában (18/20) találtunk szenzoros C és A $\delta$ -típusú idegrostokat. Ebben a csoportban immunhisztokémiai módszerek segítségével emelkedett PGP 9.5, SP, CGRP, VIP és NPY expressziót mutattunk ki. A neurális elemek eloszlása nem volt egyenletes az endometrium functionális rétegében, sűrűségük 0-30/mm<sup>2</sup>- között változott.

A kontrollcsoportba tartozó páciensek 40%-ában (8/20) mutattunk ki igen kisszámú PGP9.5-pozitív idegrostot, melyek NF kivételével SP, CGRP, VIP, és NPY pozitivitást is mutattak.

Az endometriosisban szenvedők endometriális érző idegrostsűrűsége 14-szerese az egészséges kontrollokénak (1,96 $\pm$ 2,73 vs. 0,14 $\pm$ 0,46; p < 0,0001).

Az idegrostok előfordulási gyakorisága nem mutatott szignifikáns különbséget minimális (2,1 $\pm$ 2,87) és enyhe (1,84 $\pm$ 2,59, p=0,46) endometriosis esetén.

### **Minimális és enyhe stádiumú endometriosis semi-invazív diagnózisa**

LOO–CV analízis és LS–SVM matematikai modell alkalmazásával a legjobb eredmény, a p-értékek alapján kiválasztott, három legjobban teljesítő (Mann–Whitney

U–teszt) neurális marker (VIP, PGP9.5, SP) kombinációjával volt elérhető.

Modellünk így AUC 0,99 értéket ért el (SE 0,01), míg a szenzitivitás 95%-os, a specificitás 100%-os, a diagnosztikus pontosság 97,5%-os, a PPÉ 100%-os és a NPÉ 95%-nak bizonyult.

### **A peritoneális folyadék celluláris elemeinek vizsgálata a menstruációs ciklus különböző fázisaiban**

A női nemi ciklus nem menstruációs fázisaival összehasonlítva, a menses alatt nyert PF analízise során emelkedett koncentrációban voltak kimutathatók leukociták ( $3,3 \times 10^9/L$  vs.  $0,8 \times 10^9/L$ ,  $P=0,03$ ), eritrociták ( $0,3 \times 10^{12}/L$  vs.  $0,02 \times 10^{12}/L$ ,  $P=0,006$ ), hematokrit ( $0,03 L/L$  vs.  $0,003 L/L$ ,  $P=0,01$ ) és hemoglobin ( $0,8 g/dL$  vs.  $0,1 g/dL$ ,  $P=0,01$ ) esetében.

A PF-ban kimutatott celluláris elemek többsége, morfológiai analízis során, hisztiocitának, illetve a monocita/makrofág sejtvonalba tartozónak bizonyult.

A mesothelialis sejtek pozitívan festődtek CK7-tel, CK8/18-cal, vimentinnel és kalretininnel.

Ber-Ep4-pozitív sejtek nem voltak megfigyelhetőek, két, menstruáció közben vizsgált, endometriosisban szenvedő páciens kivételével. A PF sejtei az összes páciens 50-98%-ában erősen pozitív festődést mutattak mind vimentinnel, mind CD68-cal.



## KÖVETKEZTETÉSEK

1. Az minimális és enyhe stádiumú endometriosisban szenvedő nők endometriumban kimutatott C és A $\delta$ -típusú szenzoros idegrostok előfordulási gyakorisága magasabb, mint az egészséges kontrollokban.
2. A neurális markerek (PGP9.5, VIP, SP) kombinált immunhisztokémiai analízisével 95%-os szenzitivitással, 100% specificitással és 97,5%-os diagnosztikus pontossággal kórismézhető az I. és II. stádiumú endometriosis.
3. Elsőként mutattuk ki, hogy a női menstruáció során a peritoneális folyadék leukocita, eritrocita és hemoglobin koncentrációja magasabb a menstruációs ciklus többi fázisával összevetve. Megfigyelésünk alátámasztja a retrográd menstruáció elméletét.
4. A peritoneális folyadék endometriális eredetű sejt koncentrációjában nem volt megfigyelhető emelkedés a ciklus menstruációs fázisában. Ez aktív immunológiai folyamatok jelenlétét igazolja.

## SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### Az értekezés témájában megjelent közlemények

Bokor A, Kyama CM, Vercruyse L, Fassbender A, Gevaert O, Vodolazkaia A, De Moor B, Fülöp V, D'Hooghe T. (2009)

Density of small diameter sensory nerve fibres in endometrium: a semi-invasive diagnostic test for minimal to mild endometriosis.

Hum Reprod, 24:827–834. **(IF:3,859)**

Bokor A, Debrock S, Drijkoningen M, Goossens W, Fulop V, D'Hooghe T. (2009)

Quantity and quality of retrograde menstruation: a case control study.

Reprod Biol Endocrinol, 7:123. **(IF:2,08)**

D'Hooghe TM, Kyama CM, Chai D, Fassbender A, Vodolazkaia A, Bokor A, Mwenda JM. (2009)

Nonhuman primate models for translational research in endometriosis.

Reprod Sci, 16:152-161.**(IF:2,314)**

Sundqvist J, Falconer H, Seddighzadeh M, Vodolazkaia A, Fassbender A, Kyama C, Bokor A, Stephansson O, Padyukov L, Gemzell-Danielsson K, D'Hooghe TM. (2010)

Endometriosis and autoimmune disease: association of susceptibility to moderate/severe endometriosis with CCL21 and HLA-DRB1.

Fertil Steril, 10.1016/j.fertnstert.2010.07.1060 [doi]

**(IF:3,97)**

Berkes E, Bokor A, Rigó J Jr. (2010)  
Az endometriosis laparoscopos sebészeti kezelése.  
Orv Hetil, 151:1137-1144.

Bokor A, Kyama CM, Vercruysse L, Fassbender A,  
Gevaert O, Vodolazkaia A, Rigó J, De Moor B, Fülöp V,  
D'Hooghe T.  
Az endometriosis non-invasiv diagnózisa.  
Magy. Nőorv.Lapja (Megjelenés alatt)

### **Az értekezés témájában megjelent absztraktok**

Bokor A, Kyama CM, Fassbender A, Vodolazkaia A,  
Vercruysse L, D'Hooghe TM Endometrial multiple small  
sensory nerve fibers in minimal and mild endometriosis  
Fertil Steril 90: Suppl.1, S42

Bokor A, Debrock S, Drijkoningen M, Goossens W,  
Fassbender A, Fülöp V, D'Hooghe TM  
Quantity and quality of retrograde menstruation: red  
blood cells, inflammation, and peritoneal cells  
VIII. PAX Meeting September 18-20, 2008 (Pax Society  
Abstract Book)

Bokor A, Kyama CM, Vercruysse L, Fassbender A,  
Gevaert O,  
Vodolazkaia A, De Moor B, D'Hooghe T

Density of Small Diameter Sensory Nerve Fibers in Endometrium: a Semi-Invasive Diagnostic Test for Minimal to Mild Endometriosis  
BSRM Meeting October 3, 2008 (BSRM Book of Abstracts)

Bokor A, Kyama CM, Vercruyssen L, Fassbender A, Gevaert O, Rigó J, Vodolazkaia A, De Moor B, D'Hooghe T

Az endometriosis non-invazív diagnosisa.

MNT XXIX. Nagygyűlése 2010 Május 20-23,  
(Absztraktfűzet)

### **Az értekezés témájában megjelent könyvfejezetek**

Bokor A, Meuleman C, D'Hooghe T.

The Role of the Fallopian Tube in the Development of Endometriosis and Associated Infertility In: Allahbadia G N, Saridogan E, Djahanbakhch O, (editors) The Fallopian Tube. Anshan Ltd., Kent, 2008: 449-457.

Bokor A, D'Hooghe T.

Endometriosis and Miscarriage: Is there any Association?

In: Garcia-Velasco J A, Rizk B R M B (editors)

Endometriosis: current therapy and future trends.

Jaypee, New Delhi, 2009: 136-142.

Bokor A, Meuleman C, D'Hooghe T.

The Clinical Aspects of Endometriosis

In: Carrell D, Peterson CM, (editors) Reproductive Endocrinology and Infertility: Integrating Modern Clinical and Laboratory Practice. Springer, New York, 2010: 191-207.

