

Maria Szubert<sup>1</sup>, Magdalena Zięta<sup>2</sup>, Jacek Suzin<sup>1</sup>

## Czy istnieje możliwość diagnostyki endometriozy z poziomu endometrium? Is it possible to diagnose endometriosis at the level of endometrium?

Существует ли возможность диагностики эндометриоза с уровня эндометрия?

<sup>1</sup> Klinika Ginekologii Operacyjnej i Onkologicznej, I Katedra Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Wojewódzki Specjalistyczny Szpital im. M. Pirogowa w Łodzi, Łódź, Polska. Kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. n. med. Jacek Suzin

<sup>2</sup> Studenckie Koło Naukowe przy I Katedrze Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Łódź, Polska. Opiekun Koła: dr n. med. Maria Szubert  
Adres do korespondencji: Dr n. med. Maria Szubert, Klinika Ginekologii Operacyjnej i Onkologicznej, Wojewódzki Specjalistyczny Szpital im. M. Pirogowa, ul. Wileńska 37, 94-029 Łódź, tel.: +48 42 680 47 22, faks: +48 42 686 04 71, e-mail: maria.szubert@umed.lodz.pl

<sup>1</sup> Clinic of Operative and Oncologic Gynecology, 1<sup>st</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Medical University of Lodz, M. Pirogow's Teaching Hospital, Lodz, Poland. Head of the Department and Clinic: Professor Jacek Suzin, MD, PhD

<sup>2</sup> Students Scientific Society at the 1<sup>st</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Medical University of Lodz, Lodz, Poland. Tutor: Maria Szubert, MD, PhD  
Correspondence: Maria Szubert, MD, PhD, Clinic of Operative and Oncologic Gynecology, M. Pirogow's Teaching Hospital, Wileńska 37, 94-029 Lodz, Poland, tel.: +48 42 680 47 22, fax: +48 42 686 04 71, e-mail: maria.szubert@umed.lodz.pl

### Streszczenie

Endometrium pacjentek z endometriozą charakteryzuje się inną ekspresją cytokin, czynników angiogennych i hormonalnych niż u kobiet zdrowych. Endometriozą występuje głównie u kobiet w wieku reprodukcyjnym, z częstością około 7–10%. Mimo wielu badań i hipotez dotyczących patogenezы nie wykryto dotychczas swoistego markera dla endometriozy. Złotym standardem diagnostycznym, zwłaszcza w przypadku postaci otrzewnowej, której nie udaje się uwidocznic w badaniu ultrasonograficznym, pozostaje laparoscopia. Inne formy endometriozy – jajnikową (torbiele czekoladowe) i głęboko naciekającą – można rozpoznać w badaniu ultrasonograficznym. Obecnie poszukuje się markerów, które w określonej kombinacji zapewniłyby maksymalną czułość i swoistość nieinwazyjnego wykrywania endometriozy, nawet we wczesnych stadiach. Czułość oznaczeń wykonywanych z krwi nie jest niestety satysfakcjonująca w odniesieniu do otrzewnowej postaci choroby. W artykule zaprezentowano potencjalne cele diagnostyczne – wybrane czynniki wykrywane w endometrium, czyli interleukinę 8, czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego, płytkopochodny czynnik wzrostu i czynnik wzrostu nerwów. Pobranie endometrium do badań jest łatwe i może być wykonywane ambulatoryjnie. Diagnostowanie z poziomu endometrium ułatwiłoby rozpoznawanie endometriozy i znacząco zmniejszyło koszty związane z koniecznością przeprowadzania laparoskopii.

**Słowa kluczowe:** endometriozą, endometrium, IL-8, VEGF, PDGF, NGF

### Abstract

The endometrium of women with endometriosis has a different expression of cytokines, angiogenic and hormonal factors compared to healthy women. Endometriosis is a disease occurring mostly in women at a reproductive age with a frequency of 7–10%. Despite many studies and hypotheses on the pathogenesis of the disease, marker specific to endometriosis has not yet been detected. Thus, laparoscopy remains the gold standard in the diagnosis, particularly in the case of peritoneal form that cannot be visualized by means of an ultrasound test. Other forms of endometriosis – ovarian (chocolate cysts) and deep infiltrating – can be identified in an ultrasound test. Scientists are currently searching for markers that in a specific combination would ensure maximum sensitivity and specificity of the non-invasive detection of endometriosis, even at early stages. The article presents selected factors, such as interleukin 8, vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, nerve growth factor, detected in the endometrium, which can be a potential diagnostic target. Diagnoses made at the level of endometrium would facilitate the identification of endometriosis and would significantly reduce costs associated with the necessity to conduct laparoscopy.

**Key words:** endometriosis, endometrium IL-8, VEGF, PDGF, NGF

## Содержание

Эндометрий пациентов с эндометриозом характеризуется отличающейся экспрессией различных ангиогенных цитокинов и гормональных факторов от здоровых женщин. Эндометрий выступает, прежде всего у женщин в репродуктивном возрасте, с частотой примерно 7–10%. Несмотря на множество исследований и гипотез, касающихся патогенеза, до этого времени не обнаружен соответствующий маркер для эндометриоза. Золотым диагностическим стандартом, особенно в случае брюшной формы, которую не получается визуализировать с помощью ультразвукового исследования является лапароскопия. Другие формы эндометриоза – в виде очагов на поверхности яичника и в виде эндометриоидных кист – могут быть диагностированы с помощью ультразвука. В настоящее время ведется поиск маркеров, которые, в определенной комбинации обеспечивали бы максимальную чувствительность и специфичность для неинвазивного выявления эндометриоза, даже на ранних стадиях. Чувствительность определений, проводимых из крови, к сожалению, не удовлетворительна в отношении к брюшной форме заболевания. В статье представлены потенциальные диагностические цели – некоторые факторы обнаруживаемые в эндометрии, то есть интерлейкин-8, фактор роста эндотелия сосудов, тромбоцитарный фактор роста и фактор роста нервов. Отбор эндометрия для исследования легких и может проводится в амбулаторных условиях. Диагностика с уровня эндометрия облегчила бы диагностику эндометриоза и значительно сократила бы затраты, связанные с необходимостью проведения лапароскопии.

**Ключевые слова:** эндометриоз, эндометриум, IL-8, VEGF, PDGF, NGF

## WSTĘP

Endometriozę definiuje się jako występowanie tkanki podobnej do gruczołowej i podścieliska endometrium poza jamą macicy – przede wszystkim w jajnikach, jajowodach, więzadłach maciczo-krzyżowych, więzadło szerokim, więzadło obłym i zatoce Douglasa. Choroba spotykana jest również w jelicie grubym, moczowodach, pęcherzu moczowym i przegrodzie odbytniczo-pochwowej<sup>(1)</sup>. Endometriozę obserwuje się u 7–10% kobiet w wieku reprodukcyjnym. Około 60% chorych zmaga się z zespołem bólowym, a około 50% – z niepłodnością<sup>(2)</sup>. Ponadto u nawet 20% kobiet z endometriozą udowodniono jednocześnie występowanie zespołu jelita drażliwego, śródmiąższowego zapalenia pęcherza moczowego, fibromialgii czy migreny<sup>(1)</sup>.

Badacze są zgodni co do tego, że endometriozę promują stany związane z hiperestrogenizmem, a ektopowe położenie endometrium indukuje miejscową reakcję immunologiczną. Do czynników ryzyka mogących mieć wpływ na rozwój i progresję choroby zalicza się m.in. rasę kaukaską, wiek między 25. a 35. rokiem życia, codzienne spożycie alkoholu około 10 g, pozytywny wywiad w kierunku występowania endometriozy u matki, wczesną *menarche* (poniżej 11. roku życia) i krótkie cykle miesięczkowe (poniżej 25 dni) z obfitymi krwawieniami<sup>(3)</sup>. Co więcej, z badań wynika, że czynniki środowiskowe – przewlekła ekspozycja na formaldehyd, nikiel czy benzen, palenie tytoniu, picie kawy, spożywanie jedzenia zawierającego hormony, ekspozycja na promieniowanie magnetyczne z kuchenek mikrofalowych, kontakt z pestycydami – również warunkują rozwój schorzenia<sup>(4–6)</sup>.

Choć endometriozę jest chorobą, której patogenezy poszukuje się już od XIX wieku i która występuje z wysoką częstością, mechanizmy jej powstawania pozostają niewyjaśnione. Co zaskakujące, coraz większa liczba badań nad

## INTRODUCTION

Endometriosis is defined as the presence of a tissue similar to a glandular one and endometrial stroma outside the uterine cavity – mostly in the ovaries, uterine tubes, uterosacral ligaments, broad ligament, round ligament and Douglas cavity. The disease is also found in the large intestine, ureters, urinary bladder and rectovaginal septum<sup>(1)</sup>. Endometriosis is observed with 7–10% of women at a reproductive age. Roughly 60% of patients struggle against a pain syndrome, and ca. 50% – infertility<sup>(2)</sup>. Moreover, as many as 20% of women with endometriosis is also diagnosed with irritable bowel syndrome, urinary bladder inflammation, fibromyalgia and migraine<sup>(1)</sup>.

Researchers are unanimous in that endometriosis is promoted by conditions associated with hyperestrogenism, and the ectopic location of the endometrium induces an immunological reaction. Risk factors that may affect the development and progression of the disease involve: e.g. Caucasian race, age of 25–35, daily alcohol consumption of ca. 10 g, positive history towards the presence of endometriosis in the patient's mother, early menarche (below 11 years of age) and short menstrual cycles (under 25 days) with heavy bleeding<sup>(3)</sup>. What is more, the studies point to the fact that environmental factors – chronic exposition to formaldehyde, nickel or benzene, tobacco smoking, coffee drinking, consumption of food containing hormones, exposition to magnetic radiation from microwave ovens, contact with pesticides – as well contribute to the development of the disease<sup>(4–6)</sup>.

Though endometriosis is a disease whose pathogenesis has already been sought after since the 19<sup>th</sup> century and which is characterized by a high frequency, the mechanisms of its genesis remain unexplained. The surprising thing is that a constantly growing number of studies on pathogenesis, epidemiology and diagnostics fail to facilitate a better

patogenezą, epidemiologią i diagnostyką nie przekłada się na lepsze poznanie endometriozy, a diagnoza, stawiana najczęściej przez sukcesywne wykluczenie innych jednostek chorobowych, pojawia się zbyt późno, już po znacznej progresji choroby<sup>(1,7)</sup>. Istnieją liczne teorie, w większości przestarzałe, które próbują tłumaczyć etiologię schorzenia, m.in. teoria wstecznej transplantacji Sampsona, teoria metaplazji nabłonka Waldeyera, teoria Halbana (szerzenia się endometriozy drogą krwiopochodną i limfopochodną) i teoria powstawania choroby z pozostałości przewodów Müllera, jednak żadna z nich nie tłumaczy dokładnie wszystkich aspektów patogenetycznych<sup>(8)</sup>. W ostatnich latach zwraca się uwagę na znaczenie zmian genetycznych<sup>(9)</sup>.

Należy podkreślić ważną rolę diagnostyki w endometriozie. Według stanowiska Zespołu Ekspertów Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego (PTG) na temat diagnostyki i leczenia endometriozy nieinwazyjnie chorobę rozpoznaje się na podstawie objawów klinicznych, palpacyjnego

understanding of endometriosis. Still, the diagnosis, most often based on successive exclusion of other disease entities, is made too late, already after a major progression of the disease<sup>(1,7)</sup>. There exist numerous theories, most of them outdated, that strive to explain the etiology of the disease, i.a. Sampson's theory of retrograde transplantation, Waldeyer's theory of epithelial metaplasia, Halban's theory (of spreading of endometriosis in a blood- and lymph-derived manner) and a theory of disease formation from the remains of Müllerian ducts. However, none of these precisely explains all aspects of the pathogenesis<sup>(8)</sup>. In recent years researchers have paid a special attention to the significance of genetic changes<sup>(9)</sup>.

The role of diagnostics in endometriosis should not be underestimated. In terms of diagnostics and non-invasive treatment of endometriosis, the Team of Experts at the Polish Gynaecological Society (*Polskie Towarzystwo Ginekologiczne*, PTG) claims that the disease is

#### A: Ból w miednicy

A: Pelvic pain

Brak	0
None	0
Łagodny	1 = okazjonalny dyskomfort w miednicy
Mild	1 = occasional pelvic discomfort
Umiarkowany	2 = zauważalny dyskomfort podczas większości cykli menstruacyjnych
Moderate	2 = noticeable discomfort for most of the cycle
Ciężki	3 = ból wymaga silnych leków przeciwbólowych, trwa podczas cyklu menstruacyjnego, kiedy nie ma krwawienia
Severe	3 = requires strong analgesics, persists during cycle when not menstruating

#### B: Bóle miesiączkowe

B: Dysmenorrhea

Brak	0
None	0
Łagodne	1 = powodujące straty w wydajności podczas pracy
Mild	1 = some loss in work efficiency
Umiarkowane	2 = występujące w porze nocnej, okazjonalnie powodujące straty w wydajności podczas pracy
Moderate	2 = in bed part of the day, occasional loss in work efficiency
Ciężkie	3 = występujące w nocy przez kilka dni, powodujące ubezwłasnowolnienie
Severe	3 = in bed one or more days of incapacitation

#### C: Ból podczas współżycia

C: Dyspareunia

Brak	0
None	0
Łagodny	1 = dyskomfort tolerowany
Mild	1 = tolerated discomfort
Umiarkowany	2 = bolesność stosunku płciowego prowadząca do jego przerwania
Moderate	2 = intercourse painful to the point of causing interdiction
Ciężki	3 = unikanie stosunków płciowych z powodu dolegliwości bólowych
Severe	3 = avoids intercourse because of pain

#### Wynik łączny uzyskany za ból miednicowy (A + B + C)

Total pelvic pain score (A + B + C)

Brak	0
None	0
Łagodny	1–3
Mild	1–3
Umiarkowany	4–6
Moderate	4–6
Ciężki	7–9
Severe	7–9

Tab. 1. Skala Biberoglu–Behrmana<sup>(11)</sup> (tłumaczenie własne)

Tab. 1. Biberoglu-Behrman Score<sup>(11)</sup>

badania ginekologicznego i badań obrazowych: ultrasonografii przezpochwowej i przezodbytniczej, a niekiedy rezonansu magnetycznego miednicy mniejszej<sup>(10)</sup>. Oceny narządu rodnego w badaniu dwuręcznym zestawionym można dokonać opisowo lub za pomocą skali Biberoglu–Behrmana, używanej jako narzędzie obiektywizacji w większości badań i prób klinicznych (tab. 1)<sup>(11)</sup>.

Zgodnie z wytycznymi European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) z 2005 roku, zmodyfikowanymi i opublikowanymi w roku 2014, badanie ultrasonograficzne miednicy mniejszej nie ma wartości diagnostycznej w odniesieniu do endometriozy otrzewnowej (poziom wiarygodności danych: A). Na podstawie systematycznego przeglądu literatury eksperci stwierdzili, że badanie ultrasonograficzne wykonywane głowicą przezpochwową lub przezodbytniczą może być narzędziem pomocnym w rozpoznawaniu torbieli endometrialnych

recognized on the basis of clinic symptoms, palpable gynecologic tests and imaging tests: transvaginal and transrectal ultrasound, and sometimes magnetic resonance of the pelvis minor<sup>(10)</sup>. The evaluation of the reproductive organ in a bimanual examination can be made in a descriptive manner or by means of Biberoglu–Behrman score, used as a tool of objectification in most clinical tests and trials (Tab. 1)<sup>(11)</sup>.

According to the guidelines of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) of 2005, modified and published in 2014, the ultrasound test of the pelvis minor has no diagnostic value with reference to peritoneal endometriosis (level of data credibility: A). On the basis of a systematic literature review, the experts have observed that an ultrasound examination – transvaginal or transrectal – may complement the recognition of endometrial cysts and – in specific cases – diagnosing

<b>D. Tkliwość miednicy</b>	
<i>D. Pelvic tenderness</i>	
Brak	0
<i>None</i>	0
Łagodna	1 = minimalna tkliwość przy palpacji
<i>Mild</i>	1 = minimal tenderness on palpitation
Umiarkowana	2 = rozległa tkliwość przy palpacji
<i>Moderate</i>	2 = extensive tenderness on palpitation
Ciężka	3 = niemożliwość wykonania palpacji z powodu tkliwości miednicy
<i>Severe</i>	3 = unable to palpate because of tenderness
<b>E. Twardość (zmiany guzkowe)</b>	
<i>E. Induration</i>	
Brak	0
<i>None</i>	0
Łagodna	1 = macica swobodnie ruchoma, twardość w zatoce Douglasa
<i>Mild</i>	1 = uterus freely mobile, induration in the cul-de-sac
Umiarkowana	2 = zgrubienie i twardość przydatków oraz zatoki Douglasa, ograniczona ruchomość macicy
<i>Moderate</i>	2 = thickened and indurated adnexa and cul-de-sac, restricted uterine mobility
Ciężka	3 = guzkowate przydatki i zatoka Douglasa, brak ruchomości macicy
<i>Severe</i>	3 = adnexa and cul-de-sac, uterus frequently frozen
<b>Wynik łączny uzyskany za objawy w badaniu fizykalnym (D + E)</b>	
<i>Total physical sign pain score (D + E)</i>	
Brak	0
<i>None</i>	0
Łagodne	1–2
<i>Mild</i>	1–2
Umiarkowane	3–4
<i>Moderate</i>	3–4
Ciężkie	5–6
<i>Severe</i>	5–6
<b>Wynik łączny objawów i nasilenia choroby (A + B + C + D + E)</b>	
<i>Total symptom and sign severity score (A + B + C + D + E)</i>	
Brak	0
<i>None</i>	0
Łagodne	1–2
<i>Mild</i>	1–2
Umiarkowane	3–5
<i>Moderate</i>	3–5
Ciężkie	6–10
<i>Severe</i>	6–10
Bardzo ciężkie	11–15
<i>Very severe</i>	11–15

Tab. 1. Skala Biberoglu–Behrmana<sup>(11)</sup> (tłumaczenie własne) (cd.)

Tab. 1. Biberoglu–Behrman Score<sup>(11)</sup> (cont.)

i – w specyficznych przypadkach – w diagnozowaniu głęboko naciekającej endometriozy pęcherza moczowego albo odbytnicy<sup>(12,13)</sup>. Według stanowiska cytowanego już Zespołu Ekspertów PTG bardzo istotnym aspektem diagnostyki jest obraz stwierdzony podczas inwazyjnej interwencji operacyjnej, potwierdzony badaniem histopatologicznym wycinków endometrium<sup>(10)</sup>. Wskazania do wykonania zabiegu diagnostycznego powinny być jednak ustalane ostrożnie, ponieważ laparoscopia, choć jest określana jako procedura minimalnie inwazyjna, niesie ze sobą ryzyko powikłań (mniejszych i większych) ocenione na 8,9%. Wskazania do laparotomii ustalane są zazwyczaj w zaawansowanej endometriozie – u pacjentek, które nie reagują na leczenie zachowawcze i u których ostateczną formę leczenia stanowi usunięcie jajników i macicy<sup>(14,15)</sup>. Niekwestionowalne jest zatem obecnie stwierdzenie, że pewną diagnozę endometriozy można postawić tylko operacyjnie. Zazwyczaj pacjentki są zmuszone czekać latami, aby przyczyna ich dyskomfortu w końcu została właściwie rozpoznana<sup>(1)</sup>. W związku z tym liczni badacze podejmują próby diagnozowania endometriozy z wykorzystaniem dostępnych nieinwazyjnie materiałów biologicznych: osocza, surowicy, biopłatów endometrium, moczu. Badania są jednak limitowane małymi grupami chorych, co przekłada się na niską jakość uzyskiwanych danych<sup>(16,17)</sup>.

### DIAGNOSTYKA ENDOMETRIOZY Z POZIOMU ENDOMETRIUM

Swoisty marker dla endometriozy nie został dotychczas zidentyfikowany. Obecnie poszukuje się grup związków, które w określonej kombinacji zapewniłyby maksymalną czułość i swoistość nieinwazyjnego wykrywania tej choroby, zwłaszcza we wczesnych stadiach<sup>(18,19)</sup>. Ponieważ ani surowica, ani osocze nie są dobrym materiałem diagnostycznym w przypadku endometriozy otrzewnej, zwrócono uwagę na tkankę endometrium eutopowego. Tkanka ta jest łatwo dostępna dzięki możliwości pobrania bez znieczulenia, przez biopsję endometrium. Udowodniono, że zmiany w ekspresji genów i białek typowe dla ognisk ektopowych choroby można znaleźć również w endometrium w jamie macicy<sup>(20,21)</sup>. Ocena tych procesów jest przedmiotem licznych ostatnio analiz i opracowań. Parafrazując badaczy Liu i Langa, można zapytać, czy ścieżka patogenetyczna nie wygląda następująco: pierwotnie zmienione komórki endometrium – przyleganie – inwazja – angiogeneza – ogniska endometriozy w jamie otrzewnej. Jeśli tak jest, to idealny, minimalnie inwazyjny test diagnostyczny powinien się opierać na oznaczeniach wykonywanych w biopłatach endometrium<sup>(22)</sup>.

W niniejszym artykule zostały przeanalizowane cztery czynniki: interleukina 8 (IL-8), czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), płytkopochodny czynnik wzrostu (*platelet-derived growth factor*, PDGF) oraz czynnik wzrostu nerwów (*nerve growth factor*, NGF), mogące być celem diagnostycznym.

deep infiltrating endometriosis of the urinary bladder or the rectum<sup>(12,13)</sup>. The above mentioned PTG claims that a significant diagnostic aspect is an image observed during an invasive operative intervention, confirmed by a histopathological test of endometrial specimens<sup>(10)</sup>. However, the indications for performing a diagnostic treatment should be carefully identified, as laparoscopy, though described as a minimally invasive procedure, involves a risk of complications (major and minor) assessed at 8.9%. The indications for laparotomy are generally made in the case of advanced endometriosis – in patients who do not react to conservative treatment and in whose case the ultimate form of treatment leads to the removal of ovaries and the uterus<sup>(14,15)</sup>. Therefore, it currently becomes unquestionable to claim that only by means of an operation it is possible to diagnose endometriosis in a reliable way. Often the patients are made to wait for years so that the cause of their discomfort can adequately be recognized<sup>(1)</sup>. Consequently, many researchers strive to diagnose endometriosis with the use of non-invasively available biological materials: plasma, serum, endometrium bioplates, and urine. However, these studies are limited in terms of small groups of patients, which translates into a low quality of obtained data<sup>(16,17)</sup>.

### DIAGNOSING ENDOMETRIOSIS AT THE LEVEL OF THE ENDOMETRIUM

A marker specific to endometriosis has not been identified yet. Scientists are currently searching for markers that in a specific combination would ensure maximum sensitivity and specificity of a non-invasive detection of endometriosis, even at early stages<sup>(18,19)</sup>. As neither serum nor plasma are a good diagnostic material in case of peritoneal endometriosis, the studies were shifted to the tissue of eutopic endometrium. This tissue is easily accessible due to its sampling without anesthesia, by means of endometrial biopsy. It was proven that changes in gene and protein expression specific to ectopic foci of the disease can also be found in the endometrium in the uterine cavity<sup>(20,21)</sup>. The assessment of these processes has recently fallen within the scope of numerous analyses and papers. Paraphrasing the researchers Liu and Lang, there arises a question if the pathogenic pathway looks as follows: initially changed endometrial cells – adhesion – invasion – angiogenesis – endometriosis foci in the peritoneal cavity. If so, such an ideal, minimally invasive diagnostic test should be based on markings made in endometrial bioplates<sup>(22)</sup>.

This article focuses on analyzing four factors: interleukin 8 (IL-8), vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF), and nerve growth factor (NGF) that could be the subject of diagnostic tests. Their significance in endometriosis was partly proven. In an analysis of a number of potential biomarkers for endometriosis, May *et al.*<sup>(23)</sup> distinguished the above mentioned as significant. The clinic, which the authors of this paper are

Ich znaczenie w endometriozie zostało częściowo udowodnione. May i wsp.<sup>(23)</sup> podczas analizy szeregu potencjalnych biomarkerów dla endometriozy wyróżnili te wyżej wspomniane jako istotne. W klinice, w której pracują autorzy niniejszej pracy, prowadzony jest projekt badawczy dotyczący wykorzystania wymienionych czynników w diagnostyce endometriozy.

### Interleukina 8 (IL-8)

IL-8 jest cytokiną odpowiedzialną za indukcję chemotaksji neutrofilów, ma silne działanie angiogenne i stymuluje proliferację różnego rodzaju komórek organizmu<sup>(24)</sup>. Nie ulega wątpliwości, że jest to jedna z bardziej swoistych cytokin powiązanych z patogenezą endometriozy (jako drugą tak swoistą cytokiną wymienia się interleukinę 6)<sup>(25)</sup>.

Udowodniono, iż w endometrium kobiet chorujących na endometriozę poziom mRNA i poziom białka IL-8 są znacznie podwyższone w okresie wczesnorozrostowym i w późnych fazach wydzielniczych w porównaniu z poziomami w połowie cyklu. Warto dodać, że istnieją doniesienia o wpływie IL-8 na wzrostowe czynniki autokryjne w endometrium. Ponadto zauważono tendencję do wyższej ekspresji receptora dla IL-8 w endometrium u pacjentek chorujących na endometriozę w porównaniu z grupą kobiet zdrowych<sup>(24)</sup>. Obserwacje Ulukusa i wsp. udowadniają, iż IL-8 oraz jej receptory CXCR1 i CXCR2, znajdujące się w endometrium, mają istotny wpływ na patogenezę schorzenia<sup>(26)</sup>. Jak zaobserwowano, IL-8 pobudza adhezję komórek endometrium do fibronektyny, co może wpływać na mechanizm błędnego koła adhezji komórek endometrium, wzrostu komórek i dalszego wydzielania tej cytokiny<sup>(24)</sup>.

### Czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF)

VEGF to jeden z najważniejszych czynników angiogennych. Odpowiada za przebieg angiogenezy fizjologicznej i tej zachodzącej w warunkach patologicznych. W trakcie cyklu miesięczkowego angiogeneza jest niezbędna do odnowy endometrium i formowania się ciała żółtego, a w trakcie wczesnej ciąży jest konieczna w embriogenezie<sup>(27)</sup>. Sugeruje się, że VEGF odgrywa znaczącą rolę w procesie angiogenezy w rozwoju endometriozy. Uważa się też, iż ektopowy nabłonek gruczołowy u pacjentek z endometriozą ma duży potencjał do tworzenia nowych naczyń za sprawą wysokiego poziomu VEGF w późnym okresie fazy wydzielniczej cyklu w porównaniu z endometrium kobiet zdrowych<sup>(28)</sup>.

VEGF łączy się z jednym z receptorów dla kinazy tyrozynowej – Flt (*fms-like tyrosine kinase*) i KDR (*kinase domain receptor*), które są znajdowane na komórkach endotelialnych. Ich aktywacja przez VEGF skutkuje zwiększeniem proliferacji komórek i przepuszczalności błon komórkowych oraz uwolnieniem licznych enzymów proteolitycznych zaangażowanych w proces angiogenezy. Aktywne ogniska endometriozy charakteryzują się bogatym unaczynieniem,

affiliated with, conducts a research project concerning the use of the above enumerated factors in diagnosing endometriosis.

### Interleukin 8 (IL-8)

IL-8 is a cytokine responsible for inducing neutrophil chemotaxis, it has highly angiogenic properties and stimulates the proliferation of various types of the body's cells<sup>(24)</sup>. It is beyond any doubt that it is one of the most specific cytokines connected with the pathogenesis of endometriosis (interleukin 6 is another specific cytokine of this kind)<sup>(25)</sup>. There is evidence that in the endometrium of patients with endometriosis, the levels of mRNA and protein IL-8 are significantly elevated at early stages of hyperplasia and in late secretory phases, as compared to such levels in the mid-cycle. Additionally, some reports claim that IL-8 has an impact on the growing autocrine factors in the endometrium. What is more, there exists a tendency for a higher expression of IL-8 receptor in the endometrium in patients with endometriosis in comparison with a group of healthy women<sup>(24)</sup>. The observations made by Ulukus *et al.* prove that IL-8 and its receptors CXCR1 and CXCR2, present in the endometrium, have a significant impact on the pathogenesis of the disease<sup>(26)</sup>. As observed, IL-8 excites the adhesion of endometrial cells to fibronectin. This may influence the mechanism of a vicious circle of endometrial cell adhesion, cell growth and further secretion of this cytokine<sup>(24)</sup>.

### Vascular endothelial growth factor (VEGF)

VEGF is one of the most important angiogenic factors. It is responsible for the course of physiological angiogenesis and the one that occurs in pathological conditions. During a menstrual cycle angiogenesis facilitates the regeneration of the endometrium and formation of the corpus luteum, whereas at the early stage of pregnancy it is crucial in embryogenesis<sup>(27)</sup>. Scientists suggest that VEGF plays a significant role in the process of angiogenesis in the development of endometriosis. It is also believed that the ectopic glandular endothelium in patients with endometriosis has a huge potential for forming new vessels. This is due to a high level of VEGF in a late secretory phase of the cycle in comparison with healthy women<sup>(28)</sup>.

VEGF binds with one of the receptors for tyrosine kinase – Flt (*fms-like tyrosine kinase*) and KDR (*kinase domain receptor*) that are found in endothelial cells. Their VEGF-induced activation leads to growing cell proliferation, cell membrane permeability and the release of proteolytic enzymes engaged in the process of angiogenesis. Active endometriosis foci are characterized by rich vascularization, through which the ectopic endometrial tissue is provided with growth factors and nutritional substances<sup>(29)</sup>. Li *et al.*, scientifically striving to prove

przez które ectopowa tkanka endometrialna zaopatrywana jest w czynniki wzrostu i substancje odżywcze<sup>(29)</sup>. Li i wsp., chcący udowodnić znaczną ekspresję mRNA dla VEGF w komórkach eutopowego endometrium, potwierdzili w swoich badaniach, że w grupie kobiet z endometriozą ekspresja ta jest istotnie wyższa<sup>(30)</sup>. Cho i wsp.<sup>(31)</sup> wykazali zaś, iż w płynie otrzewnowym ekspresja VEGF i jego rozpuszczalnego receptora (sFlt-1) jest znacząco wyższa u pacjentek z endometriozą w porównaniu z grupą kontrolną. Ekspresja VEGF i rozpuszczalnego receptora sFlt-1 w tkance otrzewnowej także była podwyższona, z kolei w tkance endometrium ekspresja sFlt-1 okazała się znacząco niższa u pacjentek z endometriozą.

Jak dowodzą powyższe badania, w patogenezie endometriozy bierze udział nie tylko nieprawidłowa ekspresja czynników angiogennych – w rozwój choroby może być zaangażowana również zaburzona ekspresja czynników antiangiogennych w płynie otrzewnowym i w endometrium.

### **Płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF)**

PDGF to dobrze znany czynnik odpowiedzialny za indukcję proliferacji wielu rodzajów komórek<sup>(32)</sup>. Syntetyzowany jest nie tylko przez płytki krwi, lecz także przez komórki endotelialne, fibroblasty czy komórki mięśni gładkich.

PDGF, którego ekspresja zachodzi w prawidłowym endometrium, jest czynnikiem mitogennym dla komórek endometrium, dzięki czemu są one pobudzane do proliferacji<sup>(28)</sup>. Badania immunohistochemiczne potwierdzają, że PDGF znajduje się w śluzówce macicy, a intensywność barwienia jego receptora PDGFR- $\beta$  rośnie w fazie wydzielniczej cyklu. Ponadto badania *in vitro* wykazały, iż w endometriozie PDGF odgrywa ważną rolę w proliferacji komórek zrębu. Stało się to podstawą do sformułowania hipotezy, że proces angiogenezy w endometriozie nie zależy wyłącznie od VEGF – może zależeć też od wzajemnego oddziaływania wszystkich trzech czynników wzrostowych (jako trzeci wymienia się czynnik wzrostu fibroblastów: *fibroblast growth factor*, FGF)<sup>(33)</sup>. Ponadto PDGF jest opisywany jako czynnik ważny w patogenezie endometriozy jako produkt wydzielania makrofagów w fazie proliferacji komórek endometrium<sup>(34)</sup>. Zagadnienie ekspresji PDGF w endometrium u kobiet z endometriozą będących w pierwszej fazie cyklu zostało po raz pierwszy przedstawione przez autorów niniejszej pracy. Warto dodać, że w endometrium eutopowym chorych PDGF jest praktycznie niewykrywalny<sup>(35)</sup>.

### **Czynnik wzrostu nerwów (NGF)**

NGF to główny biomarker odpowiedzialny za promowanie wzrostu włókien nerwowych, a zarazem czynnik inicjujący i podtrzymujący ból w różnych chorobach<sup>(36)</sup>. Niewątpliwie ma też znaczący wpływ na żeński układ rozrodczy. Udowodniono, że czynnik wzrostu nerwów wpływa na wiele procesów zachodzących w jajniku: dojrzewanie pęcherzyka, sekrecję steroidów, owulację i utrzymanie ciąży przez

a significant expression of mRNA for VEGF in the cells of eutopic endometrium, confirm that in a group of women with endometriosis, this expression is significantly higher<sup>(30)</sup>. Still, Cho *et al.*<sup>(31)</sup> prove that in the peritoneal fluid the expression of VEGF and its soluble receptor (sFlt-1) is significantly higher in patients with endometriosis, as compared to the control group. The expression of VEGF and a soluble receptor sFlt-1 in the peritoneal tissue was elevated as well, whereas in the endometrial tissue sFlt-1 expression appeared to be significantly lower in patients with endometriosis.

As the above studies prove, the pathogenesis of endometriosis is affected not only by an abnormal expression of angiogenic factors. The development of the disease may also involve a disturbed expression of anti-angiogenic factors in the peritoneal fluid and in the endometrium.

### **Platelet-derived growth factor (PDGF)**

PDGF is a well-known factor responsible for inducing proliferation of many types of cells<sup>(32)</sup>. It is synthesized not only by blood platelets but also by endothelial cells, fibroblasts and smooth muscle cells.

PDGF, whose expression takes place in the normal endometrium, is a mitogenic factor for endometrial cells. Thanks to this, these cells are activated for proliferation<sup>(28)</sup>. Immunohistochemical studies confirm that PDGF is present in the uterine mucous membrane, whereas the staining intensity of its receptor, PDGFR- $\beta$ , grows in the secretory phase of the cycle. Moreover, *in vitro* studies prove that in endometriosis PDGF plays a significant role in the stromal cells proliferation. It led to the hypothesis that the process of angiogenesis in endometriosis does not solely depend on VEGF. It may also be triggered by a mutual interaction between all three growth factors (the third being the fibroblast growth factor – FGF)<sup>(33)</sup>. Moreover, PDGF is described as a key factor for the pathogenesis of endometriosis, being a product of secreting macrophages in the phase of endometrial cell proliferation<sup>(34)</sup>. The concept of PDGF expression in the endometrium of women with endometriosis in the first phase of the cycle was for the first time presented by the authors of this paper. It is worth mentioning that in the eutopic endometrium of the patients, PDGF is practically untraceable<sup>(35)</sup>.

### **Nerve growth factor (NGF)**

NGF is the major biomarker responsible for promoting nerve fiber growth and thus becomes an initiating factor that as well sustains pain in many diseases<sup>(36)</sup>. Beyond doubt, it significantly affects a woman's reproductive organ. It is proven that the nerve growth factor influences many processes taking place in the ovary: alveolar maturation, steroid secretion, ovulation and sustaining pregnancy by inducing the FSH receptor (sensitizing ovular alveoli to gonadotropin effect). The right level of

indukowanie receptora dla FSH (uwrażliwianie pęcherzyków jajnikowych na działanie gonadotropin). Prawidłowy poziom tego czynnika w macicy jest warunkowany przez progesteron. NGF bierze udział w patogenezie raka piersi i nabłonkowego raka jajnika. Ponadto istnieją przypuszczenia, że wpływa na rozwój zespołu policystycznych jajników i endometriozy<sup>(37)</sup>.

Główny objaw omawianego schorzenia, czyli ból, towarzyszy około 60% kobiet z endometriozą, a istotną rolę w jego powstawaniu i utrzymywaniu odgrywa właśnie NGF. Ma to szczególne znaczenie w najbardziej objawowej formie choroby – głęboko naciekającej endometriozie z zajęciem węzłów chłonnych i włókien nerwowych<sup>(38)</sup>. Warto dodać, że w porównaniu ze zmianami powierzchniowymi głębokie zmiany w endometriozie mają bardzo bogate unerwienie i silniejszą ekspresję NGF. Uwagę zwraca też fakt, iż najsilniejszym unerwieniem wśród zmian głęboko naciekających cechują się zmiany odbytnicze<sup>(39)</sup>.

## PODSUMOWANIE

Endometrioza występuje u 7–10% kobiet w wieku reprodukcyjnym. Mniej więcej połowa tych pacjentek zmaga się z dwiema głównymi dolegliwościami: zespołem bólowym i niepłodnością. W wielu przypadkach diagnoza stawiana jest zbyt późno, mimo że objawy zaczynają się już we wczesnych latach życia. Dopiero przewlekłe bóle miednicy nasilające się w okresie miesiączki, bezpłodność, *dysmenorrhea*, dyspareunia i tkliwość obszaru miednicy skłaniają kobiety do szukania pomocy u lekarza. Niewątpliwie wpływa na to brak nieinwazyjnych metod diagnostycznych, a opóźnienie w diagnostyce często ma znaczące konsekwencje w postaci progresji choroby. Poszukiwanie markera w endometrium jest trudne, ponieważ prowadzone badania nie są jednolite, jeśli chodzi o grupy pacjentek i fazy cyklu, w których różni badacze badają stężenia czynników angiogennych. Dlatego ważnym wyzwaniem jest obecnie wykrycie najbardziej odpowiedniej, minimalnie inwazyjnej metody rozpoznawania endometriozy, co będzie skutkowało wielkimi korzyściami zarówno dla lekarzy, jak i dla pacjentek. Zgodnie z aktualnymi doniesieniami taki test diagnostyczny – jako złoty standard – powinien się opierać na oznaczeniach wykonywanych z bioptatów endometrium.

### Konflikt interesów

*Autorzy nie zgłaszają finansowych ani osobistych powiązań z innymi osobami lub organizacjami, które mogłyby negatywnie wpłynąć na treść publikacji oraz rościć sobie prawo do tej publikacji.*

### Źródło finansowania

*Niniejsza praca powstała w ramach grantu dla młodych naukowców „Nowe metody diagnostyki endometriozy” nr 502-03/1-004-01/502-14-236, przyznanego dr Marii Szubert przez UM w Łodzi.*

this factor in the uterus is regulated by progesterone. NGF takes part in the pathogenesis of breast cancer and epithelial ovarian cancer. Moreover, it is assumed to affect the development of polycystic ovary syndrome and endometriosis<sup>(37)</sup>.

The main symptom of the described condition, namely pain, accompanies ca. 60% of women with endometriosis. NGF plays here an important role in the formation and sustention of the disease. This is particularly crucial in the case of the most symptomatic form of the disease – deep infiltrating endometriosis affecting lymph nodes and nerve fibers<sup>(38)</sup>. What is more, deep changes in endometriosis have very rich innervation and a stronger NGF expression, as compared to superficial changes. It should be emphasized that among deep infiltrating changes these are rectal changes that are characterized by the strongest innervation<sup>(39)</sup>.

## SUMMARY

Endometriosis is observed in 7–10% of women at a reproductive age. Roughly half of these patients struggle with two main symptoms: pain syndrome and infertility. In many cases the diagnosis is made too late, although the changes begin already in early years of life. Not until women develop chronic pelvic pains that intensify during a cycle do they turn for the doctor's help due to infertility, dysmenorrhea, dyspareunia and tenderness in the pelvic area. This is undoubtedly influenced by the lack of non-invasive diagnostic methods, whereas delays in diagnostics often lead to significant consequences, i.e. disease progression. Searching for a marker in the endometrium is difficult as the conducted studies are not uniform in the case of different groups of patients and phases of cycles, where researchers analyze the concentration of angiogenic factors. Therefore, the main challenge is currently to detect the most responsible, minimally invasive method of diagnosing endometriosis, which shall bring great benefits both to the doctors as well as patients. According to current reports, such a diagnostic test – as a gold standard – should be based on markings performed in endometrial biopsies.

### Conflict of interest

*The authors do not report any financial or personal connections with other persons or organizations, which might negatively affect the contents of this publication and/or claim authorship rights to this publication.*

### Source of financing

*This paper was financed within a grant for young scientists “New methods of endometriosis diagnostics” No. 502-03/1-004-01/502-14-236 awarded to Dr. Maria Szubert by the Medical University of Lodz.*



**Piśmiennictwo / References**

1. Hsu AL, Khachikyan I, Stratton P: Invasive and noninvasive methods for the diagnosis of endometriosis. *Clin Obstet Gynecol* 2010; 53: 413–419.
2. Marana R, Lecca A, Biscione A *et al.*: [Endometriosis: the gynecologist's opinion]. *Urologia* 2012; 79: 160–166.
3. Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D *et al.*: Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors. *Am J Epidemiol* 2004; 160: 784–796.
4. Alexeyev VB, Balashov SY, Dugina OY: [Prevalence and risk of endometriosis in industrial territories]. *Med Tr Prom Ekol* 2015; (8): 14–18.
5. Cooney MA, Buck Louis GM, Hediger ML *et al.*: Organochlorine pesticides and endometriosis. *Reprod Toxicol* 2010; 30: 365–369.
6. Sadeu JC, Hughes CL, Agarwal S *et al.*: Alcohol, drugs, caffeine, tobacco, and environmental contaminant exposure: reproductive health consequences and clinical implications. *Crit Rev Toxicol* 2010; 40: 633–652.
7. Fassbender A, Burney RO, O DF *et al.*: Update on biomarkers for the detection of endometriosis. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 130854.
8. Jiang QY, Wu RJ: Growth mechanisms of endometriotic cells in implanted places: a review. *Gynecol Endocrinol* 2012; 28: 562–567.
9. Nyholt DR, Low SK, Anderson CA *et al.*: Genome-wide association meta-analysis identifies new endometriosis risk loci. *Nat Genet* 2012; 44: 1355–1359.
10. Basta A, Brucka A, Górski J *et al.*; Zespół Ekspertów Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego: Stanowisko Zespołu Ekspertów Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego dotyczące diagnostyki i metod leczenia endometriozy. *Ginekol Pol* 2012; 83: 871–876.
11. Biberoglu KO, Behrman SJ: Dosage aspects of danazol therapy in endometriosis: short-term and long-term effectiveness. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 139: 645–654.
12. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C *et al.*; ESHRE Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium Guideline Development Group: ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod* 2005; 20: 2698–2704.
13. Dunselman GA, Vermeulen N, Becker C *et al.*; European Society of Human Reproduction and Embryology: ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Hum Reprod* 2014; 29: 400–412.
14. Leyland N, Casper R, Laberge P *et al.*: Endometriosis: diagnosis and management. *J Obstet Gynaecol Can* 2010; 32 (Suppl 2): S1–S32.
15. Chapron C, Fauconnier A, Goffinet F *et al.*: Laparoscopic surgery is not inherently dangerous for patients presenting with benign gynaecologic pathology. Results of a meta-analysis. *Hum Reprod* 2002; 17: 1334–1342.
16. Gjavotchanoff R: CYFRA 21-1 in urine: a diagnostic marker for endometriosis? *Int J Womens Health* 2015; 7: 205–211.
17. Markowska J, Kowalska M, Gogacz M *et al.*: Cytokines and endometriosis. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2004; 31: 269–270.
18. Othman Eel-D, Hornung D, Salem HT *et al.*: Serum cytokines as biomarkers for nonsurgical prediction of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008; 137: 240–246.
19. Mihalyi A, Gevaert O, Kyama CM *et al.*: Non-invasive diagnosis of endometriosis based on a combined analysis of six plasma biomarkers. *Hum Reprod* 2010; 25: 654–664.
20. Laudanski P, Charkiewicz R, Kuzmicki M *et al.*: Profiling of selected angiogenesis-related genes in proliferative eutopic endometrium of women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014; 172: 85–92.
21. Khan MA, Sengupta J, Mittal S *et al.*: Genome-wide expressions in autologous eutopic and ectopic endometrium of fertile women with endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 2012; 10: 84.
22. Liu H, Lang JH: Is abnormal eutopic endometrium the cause of endometriosis? The role of eutopic endometrium in pathogenesis of endometriosis. *Med Sci Monit* 2011; 17: RA92–RA99.
23. May KE, Villar J, Kirtley S *et al.*: Endometrial alterations in endometriosis: a systematic review of putative biomarkers. *Hum Reprod Update* 2011; 17: 637–653.
24. 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; discussion 118, 396–406.
25. Carmona F, Chapron C, Martínez-Zamora MÁ *et al.*: Ovarian endometrioma but not deep infiltrating endometriosis is associated with increased serum levels of interleukin-8 and interleukin-6. *J Reprod Immunol* 2012; 95: 80–86.
26. Ulukus M, Ulukus EC, Seval Y *et al.*: Expression of interleukin-8 receptors in endometriosis. *Hum Reprod* 2005; 20: 794–801.
27. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS *et al.*: Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest* 1996; 98: 482–489.
28. Mueller MD, Taylor RN: Angiogenesis in endometriosis. In: Augustin HG, Iruela-Arispe ML, Rogers PAW *et al.* (eds.): *Vascular Morphogenesis in the Female Reproductive System*. Birkhäuser, Boston 2001: 245–270.
29. Barcz E, Kamiński P, Marianowski L: [VEGF concentration in peritoneal fluid of patients with endometriosis]. *Ginekol Pol* 2001; 72: 442–448.
30. Li YZ, Wang LJ, Li X *et al.*: Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms contribute to the risk of endometriosis: an updated systematic review and meta-analysis of 14 case-control studies. *Genet Mol Res* 2013; 12: 1035–1044.
31. Cho S, Choi YS, Jeon YE *et al.*: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its soluble receptor-1 in endometriosis. *Microvasc Res* 2012; 83: 237–242.
32. Wang DB, Xu YL, Chen P *et al.*: Silencing Cofilin-1 blocks PDGF-induced proliferation in eutopic endometrium of endometriosis patients. *Cell Biol Int* 2013; 37: 799–804.
33. Laschke MW, Elitzsch A, Vollmar B *et al.*: Combined inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppresses angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions. *Hum Reprod* 2006; 21: 262–268.
34. Surrey ES, Halme J: Effect of platelet-derived growth factor on endometrial stromal cell proliferation in vitro: a model for endometriosis? *Fertil Steril* 1991; 56: 672–679.
35. Szubert M, Suzin J, Duechler M *et al.*: Evaluation of selected angiogenic and inflammatory markers in endometriosis before and after danazol treatment. *Reprod Fertil Dev* 2014; 26: 414–420.
36. Kajitani T, Maruyama T, Asada H *et al.*: Possible involvement of nerve growth factor in dysmenorrhea and dyspareunia associated with endometriosis. *Endocr J* 2013; 60: 1155–1164.
37. Bose CK: Neurotrophin in obstetrics and gynaecology. *J Stem Cells* 2009; 4: 217–227.
38. Anaf V, Simon P, El Nakadi I *et al.*: Hyperalgesia, nerve infiltration and nerve growth factor expression in deep adenomyotic nodules, peritoneal and ovarian endometriosis. *Hum Reprod* 2002; 17: 1895–1900.
39. Wang G, Tokushige N, Markham R *et al.*: Rich innervation of deep infiltrating endometriosis. *Hum Reprod* 2009; 24: 827–834.