

**Evaluation of the Diagnostic Potential of
Blood neutrophil to lymphocyte Ratio,
Serum interleukin-6, and fibroblast
growth factor-2 (FGF-2) in the
Diagnosis of Endometriosis.**

Thesis

**Submitted for the partial fulfillment of Master Degree in
Obstetrics and Gynaecology**

By

Randa Mohammad Ahmad Abdel Naby

MBBCH. (Ain-Shams University)

*Assistant Specialist of Obstetrics and Gynaecology in Shebeen
Elkanater Hospital*

Supervised by

Dr. Amgad Al Said Abou-Gamrah

*Assistant Professor of Obstetrics and Gynaecology
Faculty of Medicine; Ain-Shams University*

Dr. Sherif Ahmad Ashoush

*Lecturer of Obstetrics and Gynaecology
Faculty of Medicine; Ain-Shams University*

Dr. Haitham Abdel Mohsin El-Sabaa

*Lecturer of Obstetrics and Gynaecology
Faculty of Medicine; Ain-Shams University*

***Faculty of Medicine
Ain-Shams University***

2011

تقييم قدرة نسبة عدد خلايا النيوتروفيل الى الخلايا
الليمفية في الدم ومستوي الإنترلوكن ٦ ومستوى
معدل نمو الفيبروبلاست ٢ في مصل الدم على
تشخيص مرض بطانة الرحم المهاجرة

رسالة توطئة
للحصول على درجة الماجستير فى أمراض النساء والتوليد

مقدمة من
رانيا محمد أحمد عبد النبي
مساعد أخصائي نساء وتوليد بمستشفى شيبين القناطر العام

تحت إشراف
الدكتور / أمجد السعيد أبو جمرة
أستاذ مساعد أمراض النساء والتوليد- كلية الطب جامعة عين شمس

الدكتور / شريف أحمد عشوش
مدرس أمراض النساء والتوليد- كلية الطب جامعة عين شمس

الدكتور / هيثم عبد المحسن السبع
مدرس أمراض النساء والتوليد- كلية الطب جامعة عين شمس

كلية الطب
جامعة عين شمس
٢٠١١

**Evaluation of the Diagnostic Potential of Blood
neutrophil to lymphocyte Ratio, Serum
interleukin-6, and fibroblast growth factor-2
(FGF-2) in the Diagnosis of Endometriosis.**

**Outline Protocol of Thesis
Submitted for the partial fulfillment of Master Degree in
Obstetrics and Gynaecology**

By

Randa Mohammad Ahmad Abdel Naby

MBBCH. (Ain-Shams University)

*Assistant Specialist of Obstetrics and Gynaecology in
Shebeen Elkanater Hospital*

Supervised by

Dr. Amgad Al Said Abou-Gamrah

*Assistant Professor of Obstetrics and Gynaecology
Faculty of Medicine; Ain-Shams University*

Dr. Sherif Ahmad Ashoush

*Lecturer of Obstetrics and Gynaecology
Faculty of Medicine; Ain-Shams University*

Dr. Haitham Abdel Mohsin El-Sabaa

*Lecturer of Obstetrics and Gynaecology
Faculty of Medicine; Ain-Shams University*

***Faculty of Medicine
Ain-Shams University***

2009

تقييم قدرة نسبة عدد خلايا النيوتروفيل الى الخلايا
الليمفية في الدم ومستوي الإنترلوكن ٦ ومستوى
معدل نمو الفيبروبلاست ٢ في مصل الدم على
تشخيص مرض بطانة الرحم المهاجرة

إطار رسالة توطئة
للحصول على درجة الماجستير فى أمراض النساء والتوليد

مقدمة من
راندا محمد أحمد عبد النبي
مساعد أخصائي نساء وتوليد بمستشفى شيبين القناطر العام

تحت إشراف

الدكتور / أمجد السعيد أبو جمرة
أستاذ مساعد أمراض النساء والتوليد- كلية الطب جامعة عين شمس

الدكتور / شريف أحمد عشوش
مدرس أمراض النساء والتوليد- كلية الطب جامعة عين شمس

الدكتور / هيثم عبد المحسن السبع
مدرس أمراض النساء والتوليد- كلية الطب جامعة عين شمس

كلية الطب
جامعة عين شمس
٢٠٠٩

Introduction

Endometriosis, defined as the presence of endometrial glands and stroma outside the uterine cavity (**Gao *et al.*, 2006; Olive and Schwartz, 1993**). It affects approximately 5%–15% of women within childbearing age (**Eskenazi and Warner, 1997**). It is the most common cause of pelvic pain and occurs in 13-33% of women with infertility (**D'Hooghe *et al.*, 2003**).

Meyer, in 1919, suggested that peritoneal mesothelial cells have the ability to differentiate into Mullerian-type epithelium under the influence of infectious, hormonal, or other inductive stimuli (**Meyer, 1919; Meyer 1927**) coated from **Seli *et al.*, (2003)**. In the 1920s, Halban (**Halban, 1924**) and Sampson suggested that endometriosis also could result from lymphatic and hematogenous dissemination of endometrial cells.

Sampson's theory involving transplantation of endometrial tissue into the pelvic peritoneum and organs through retrograde menstruation (**Sampson, 1927**) is the most widely accepted.

However, retrograde menstruation occurs during most of cycles suggesting that the onset of endometriosis involves

inefficient clearance of menstrual efflux from the pelvis, a defect that may involve the immune system (**Vinatier *et al.*, 1996**). Other theories for pathogenesis of endometriosis include the induction theory (**Levander and Normann, 1955**) and embryonic rest theory (**Recklinghausen, 1896**) coined from **Laschke and Menger, (2007)**.

There is ample evidence to suggest that the immune system may be responsible, in fact it is considered by some that altered immune responsiveness explains why some women develop endometriosis, whereas others do not (**Ramy and Archer, 1993**). Recent studies have presented evidence that alterations in an individual's humoral or cell mediated immunity may make some women more susceptible to developing endometriosis (**Maeda *et al.*, 2002; Gagne *et al.*, 2003**).

Although laparoscopy is a minimally invasive procedure for the diagnosis of endometriosis, it requires general anaesthesia and surgical skills when carried out, and there are also potential complications and procedural costs. Thus, a non surgical diagnostic approach would be of great benefit to both physicians and women alike.

In an effort to find a less invasive method for diagnosing endometriosis, and based on the fact that endometriosis induces a local, and likely also a systemic inflammatory process, numerous studies have focused on markers of inflammation in the peritoneal fluid and/or serum of women who have the disease (**Cheong *et al.*, 2002; Somigliana *et al.*, 2004**).

Glycoprotein CA-125, a cancer marker, might serve as a marker for endometriosis, although levels are usually elevated only in advanced stages and are therefore not suitable for routine screening (**Abrao *et al.*, 1999; Krasnicki, 2001**). Monitoring the level of cancer antigen 125(CA-125) in peritoneal fluid rather than serum seemed to present higher specificity for endometriosis (**Harada *et al.*, 2002**).

Anti-endometrial antibodies have been proposed as a diagnostic test for endometriosis along with CA-125 (**Ulcova-Gallova *et al.*, 2002**). However, neither test provides sufficient disease and stage specificity to be used for screening. Gonadotrophic releasing hormone (GnRH) analogues have a suppressive effect on the levels of auto-antibodies associated with endometriosis (**Kennedy *et al.*, 2005**).

Because the endometrium, in endometriosis, behaves like tumorous tissue, growth factors involved in tumour proliferation, angiogenesis and invasiveness have been investigated for their expression in endometriosis, such as: scatter factor, hepatocyte growth factor (SF/HGF) (**Zong *et al.*, 2003**), fibroblast growth factor (FGF) (**Ferriani *et al.*, 1993**), epidermal growth factor (EGF) (**Huang *et al.*, 1996**), transforming growth factor-alpha (TGF- α), transforming growth factor-beta (TGF- β), vascular endothelial growth factor (VEGF), and insulin-like Growth factors (IGFs) (**Gurgan *et al.*, 1999; Matalliotakis *et al.*, 2003**).

Serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) produced contradictory results in different studies (**Gagne *et al.*, 2003; Bedaiwy and Falcone, 2004**). Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) showed significant differences in the serum concentration between women with and without endometriosis (**Bourlev *et al.*, 2006**).

Cytokines, soluble cellular mediators, direct a variety of biologic activities, including modulation of growth, activation, and chemotaxis. Cytokines such as tumour necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, monocyte chemo attractant protein (MCP)-1 and interferon (INF)-gamma are elevated in the peritoneal fluid

of women with endometriosis, suggesting that they are involved in the progression of the disease (**Arici *et al.*, 1997**).

Serum levels of IL-6 were significantly higher in women with endometriosis than in controls, the highest levels were found in women with chocolate cysts (**Iwabe *et al.*, 2003**). Serum IL-6 showed a high sensitivity, specificity and predictive value in patients with endometriosis (**Martínez *et al.*, 2007**).

The systemic inflammatory response involves changes in the relative levels of circulating white blood cells (WBC); neutrophilia is accompanied by a relative lymphocytopenia (**Jilma *et al.*, 1999**). Some studies showed that the Neutrophil-to-Lymphocyte ratio (NLR) is elevated in patients with endometriosis, and it demonstrated high sensitivity in detecting endometriosis when used in combination with CA-125 (**Cho *et al.* 2008**).

Aim of the study

The purpose of this study is to test the diagnostic potential of neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR), serum IL-6 and FGF-2 as diagnostic markers of endometriosis and to evaluate whether any of these markers can, non-surgically, discriminate between patients with endometriosis and those without. The study focused efforts on blood markers only because its procurement is truly noninvasive, and a diagnostic test panel of blood markers would be the most clinically useful.

Patients and methods

Study design:

This is an observational study of 80 women undergoing laparoscopy for evaluation of infertility at Ain-Shams university maternity hospital. During the laparoscopy, evidence of endometriosis will be recorded and staged, according to the published revised American Society for Reproductive Medicine scoring system (**ASRM, 1997**) and histologic examination of peritoneal biopsy specimens collected in areas with suspected lesions.

Groups: Subjects will be allocated to groups on the basis of their post surgical diagnosis as follows:

Group (A): Forty patients with endometriosis.

Group (B): Forty patients without the disease having other causes of infertility.

Statistical consultation advised that forty patients with endometriosis and forty women without the disease need to be included in the study to detect at least a difference of 0.15 between the areas under the receiver operating characteristic (ROC) curve of each diagnostic test with significance level (α) of 0.05 and power of 0.9 ($\beta = 0.1$).

Methodology:

For all study subjects, blood samples will be collected after laparoscopy to examine the differential white blood cells count and so the neutrophil to lymphocyte ratio, serum interleukin-6 and fibroblast growth factor -2 levels. By comparing the results of each blood test in both groups, we will detect the usefulness of these blood tests in diagnosing endometriosis. Statistical consultation advised that forty patients with endometriosis and forty women without the disease need to be included in the study to detect significance level (α) of 0.05 and power of 0.9 ($\beta = 0.1$).

Patient selection:

Inclusion criteria:

Patients in the reproductive age (20-44) who are undergoing laparoscopy for evaluation of infertility.

Exclusion criteria:

1. Administration of any medication over the previous 3 months that could have influenced the progression of endometriosis as Gonadotrophin releasing hormone analogues, Danazol and combined oral contraceptive pills.
2. Processes that could increase the levels of IL-6 in blood independently of endometriosis (such as pelvic

inflammatory disease or neoplasms).

3. A suspected or ascertained diagnosis of malignancy.
4. Two or more concomitant findings at laparoscopy.
5. Presence of immunologic disorder or inflammatory disease or elevated erythrocyte sedimentation rate (ESR).
6. Refusal to participate in the study.

For examination of samples:

Differential WBC counts will be done and the neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) will be calculated as the absolute neutrophil count divided by the absolute lymphocyte count.

Serum interleukin-6 (IL-6) will be measured employing an immunoassay (Quentikine, R and D systems Inc., Minneapolis, MN, USA). The minimum predictable value of IL-6 will be 0.7pg/ml.). A commercially available enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit for Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) marker (R and D system, Minneapolis, MN) will be used in accordance with the supplier's instructions.

Statistical analysis:

The result will be statistically analysed and tabulated, using Microsoft (SPSS, Chicago IL, USA) computed package version 12.0.

المقدمة

مرض بطانة الرحم المهاجرة يعرف بأنه وجود غدد بطانة الرحم والنسيج المحيط بها خارج تجويف الرحم. وهذا المرض يصيب تقريبا حوالي (٥% - ١٥ %) من النساء خلال فترة الخصوبة. وهو سبب شائع لآلام الحوض ونسبة حدوثه في النساء التي تعاني من العقم حوالي (١٣% ٩% ٣٣%).

إقترح ماير سنة ١٩١٩ ان خلايا البريتون قد يكون لديها القدرة على التخلق الى نسيج خلايا من نوع الموليريان تحت تأثير محفزات غير محددة وفي سنة ١٩٢٠ اقترح هليان وسامسون أن مرض بطانة الرحم المهاجرة يمكن أن يحدث من خلال إنتشار خلايا بطانة الرحم عن طريق الدم أو الجهاز الليمفاوى . أما نظرية سامسون فتشمل إحتتمالية إنتقال أنسجة بطانة الرحم إلى تجويف البريتون وأعضاء الحوض من خلال إرتجاع دم الطمث إليه. وهذه هي النظرية المقبولة والمسلم بها على نطاق واسع ومع ان إرتجاع دم الطمث كثيرا ما يحدث في شهور عديدة. إلا أن بداية حدوث مرض بطانة الرحم المهاجرة يرجع إلى خلل في الجهاز المناعي يؤدي إلى خلاص غير فعال لما يرتجع من دم الطمث إلى الحوض.

وتشير بعض الأبحاث السابقة إلى ان الجهاز المناعي يمكن أن يكون هو المسؤول عن حدوث مرض بطانة الرحم المهاجرة. كما فسرت بعض الأبحاث أن إختلاف الإستجابة المناعية من سيدة إلى أخرى من الممكن أن يكون سبب في حدوث المرض من عدمه.

والدراسات الحديثة قدمت دليل على أن الإختلاف في الإستجابة المناعية للشخص هي التي تزيد من قابلية بعض النساء لتطور الأمر لديهم إلى حدوث مرض بطانة الرحم المهاجرة.

وعلى الرغم من أن المنظار هو إجراء قليل التعدي لتشخيص مرض بطانة الرحم المهاجرة إلا أنه يحتاج إلى تخدير كلي ومهارات جراحية عند القيام به وله أيضا مضاعفاته المحتملة وتكلفته الإجرائية لذا فإن الطريقة الغير جراحية لتشخيص هذا المرض سوف تكون ذات فائدة عظيمة لكل من الطبيب والمريضة علي السواء.

وفي محاولة لإيجاد طريقة لتشخيص هذا المرض تكون أقل تعديا من المنظار

وإعتقادا على أن هذا المرض يحدث إلتهابات موضعية وعامة في الجسم كله فقد ركزت بعض الأبحاث على دراسة دلالات الإلتهابات في السائل البريتوني أو في دم النساء التي تعاني من هذا المرض. وقد وجد أن جليكوبروتين سي ايه ١٢٥ (وهو من دلالات الاورام الخبيثة) من الممكن أن يستخدم كدليل على وجود مرض بطانة الرحم المهاجرة. ولكن مستواه في الدم عادة مايكون مرتفعا فقط في المراحل المتأخرة من هذا المرض ولذلك يكون غير ملائم لتشخيص المرض في مراحله الأولى ووجد أيضا أن مراقبة مستوى جليكوبروتين سي ايه ١٢٥ في السائل البريتوني أعطت نتائج اعلى دقة عن مراقبة مستواه في مصل الدم. كما اختبر قياس نسبة الأجسام المضادة لبطانة الرحم إلى جانب مراقبة مستوى جليكوبروتين سي ايه ١٢٥ في مصل الدم كوسيلة لتشخيص مرض بطانة الرحم المهاجرة ولكن وجد أن كلا الإختبارين لم يقدر على تحديد مرحلة المرض بدرجة كافية لإستعمالهما بصورة واسعة.

ولأن بطانة الرحم في حالة مرض بطانة الرحم المهاجرة يسلك سلوك الأورام فلذلك نجد أن عوامل النمو المسؤولة عن توالد وتكاثر الأورام وزيادة التغذية الدموية لها قد تحقق من التعبير عنها في مرض بطانة الرحم المهاجرة مثل عامل إسكتر وعامل الهيپاتوسيت وعامل الفيبوروبلاست وعامل الإبيدرمال وعامل النمو المتحول ألفا وعامل النمو المتحول بيتا وعوامل النمو شبيهة الإنسولين . الدراسات المتعلقة بقياس نسبة معدل النمو المتعلق بالأوعية الدموية فى مصل الدم أثبتت نتائج متناقضة في الدراسات المختلفة بينما معدل نمو الفيبوروبلاست أظهر إختلافات ذات مغزى في نسبته فى مصل الدم بين السيدات المصابة بالمرض والسيدات المعافاة منه.

أما السيٲوكاينز وهى عبارة عن وسائط خلوية قابلة للذوبان مسؤولة عن توجيه نشاطات حيوية متعددة تشمل إنضباط النمو وإنضباط الإنجذاب الكيمايى مثل عامل تحلل الورم ألفا والإنترلوكن ٦ و٨ وبروتين الجاذب الكيمايى لخلايا المونوسايت ١ والإنترفيرون جاما, فقد وجد أنها ذات نسب عالية فى السائل البريتونى لمرضى مرض بطانة الرحم المهاجرة مما يقترح انها ضمن أحداث تقدم مراحل المرض. ونسبة الإنترلوكن ٦ فى مصل الدم قد ثبت أنها عالية بدرجة تؤخذ فى الإعتبار فى حالات المرض عنها فى الحالات السليمة وأن أعلى مستوى لهذه النسبة توجد لدى مرضى الأكياس الدموية بالمبيض الناتجة عن مرض بطانة الرحم المهاجرة .