

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Vida KOCBEK

PREUČEVANJE MOŽNIH BIOLOŠKIH OZNAČEVALCEV PRI
OVARIJSKI ENDOMETRIOZI

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Vida KOCBEK

**PREUČEVANJE MOŽNIH BIOLOŠKIH OZNAČEVALCEV PRI
OVARIJSKI ENDOMETRIOZI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**STUDY OF POTENTIAL BIOMARKERS IN OVARIAN
ENDOMETRIOSIS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

Doktorska disertacija je zaključek Interdisciplinarnega doktorskega študija Biomedicine, področje genetike. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani ter v Centru za endometriozo na Oddelku za porodništvo in ginekologijo, Inselspital, Univerza v Bernu.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 7. 12. 2011 je bilo potrjeno, da kandidatka izpoljuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Biomedicine, področje genetike. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Tea Lanišnik Rižner.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Radovan Komel

Univerza v Ljubljani, Medicinska Fakulteta, Inštitut za biokemijo

Članica: prof. dr. Tea Lanišnik Rižner

Univerza v Ljubljani, Medicinska Fakulteta, Inštitut za biokemijo

Članica: prof. dr. Kristina Sepčić

Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Katedra za biokemijo

Datum zagovora: 3.9.2012

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Vida Kocbek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Dd
DK UDK 577:618.14(043.3)=163.6
KG ovarijska endometriozza/imunski sistem/vnetje/citokini/biglikan/PLA2G2A/biološki označevalci/prenos Western/ELISA/
AV KOCBEK, Vida, univ. dipl. mikrobiol.
SA LANIŠNIK RIŽNER, Tea (mentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Biomedicine, področje genetike
LI 2013
IN PREUČEVANJE MOŽNIH BIOLOŠKIH OZNAČEVALCEV PRI OVARIJSKI ENDOMETRIOZI
TD Doktorska disertacija
OP XV, 85 str., 7 pregl., 38 sl., 162 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Endometriozza je pogosta ginekološka bolezen, za katero so med drugim značilni nespecifični simptomi, ki otežujejo diagnostiko. Povprečen čas od nastanka bolezni do diagnoze je kar sedem let. V zadnjem času preučujejo biološke označevalce, ki bi omogočali hitrejšo in neinvazivno diagnostiko, vendar za zdaj še niso našli primernega. Za identifikacijo novih bioloških označevalcev smo se v prvem delu doktorske naloge osredotočili na proteine imunskega sistema ter v serumu in peritonealni tekočini bolnic z ovarijsko endometriozo, bolnic z benignimi cistami in zdravih žensk izmerili koncentracije 15 citokinov oz. proteinov, ki so povezani s patogenezo bolezni. Naš drugi pristop je temeljil na predhodnih ekspresijskih študijah, ki so razkrile, da je več genov za sekretorne proteine čezmerno izraženih v ektopičnem endometriju bolnic z ovarijsko endometriozo. Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da podrobnejše preučimo proteina biglikan in fosfolipazo A2 skupine IIA (PLA2G2A), saj smo žeeli prispevati tudi k pojasnitvi njune vloge pri endometriizi. Na ravni proteinov smo biglikan zaznali v vzorcih ektopičnega endometrija bolnic z ovarijsko endometriozo in vzorcih benignih cist, šibke lise smo opazili v evtopičnem endometriju bolnic s peritonealno endometriozo in bolnic s kroničnimi bolečinami v medenici. Biglikana nismo opazili v vzorcih evtopičnega endometrija zdravih žensk. Ugotovili smo, da imajo bolnice z ovarijsko endometriozo v peritonealni tekočini povišane koncentracije glikodelina-A, RANTES, IL-6, IL-8 ter znižano koncentracijo leptina. V serumu preiskovane skupine smo zaznali statistično značilno povišano koncentracijo proteina glikodelin-A ter znižano koncentracijo proteinov leptin in IL-8. V peritonealni tekočini bolnic z ovarijsko endometriozo smo izmerili višjo koncentracijo biglikana in nižjo oz. nespremenjeno koncentracijo PLA2G2A, medtem ko v serumu nismo zaznali sprememb v koncentraciji teh proteinov. Na podlagi teh ugotovitev sklepamo, da imajo nekateri izmed izbranih citokinov in sekretorna proteina biglikan in PLA2G2A pomembno vlogo pri patogenezi bolezni. Proteini glikodelin-A, leptin, RANTES, IL-6, IL-8, MCP-1, biglikan, PLA2G2A bi v kombinaciji z drugimi molekulami lahko predstavljeni biološke označevalce ovarijske endometrioze.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Dd
DC UDC 577:618.14(043.3)=163.6
CX ovarian endometriosis/immune system/inflammation/cytokines/biglycan/PLA2G2A/biomarkers/western blotting/ELISA
AU KOCBEK, Vida
AA LANIŠNIK RIŽNER, Tea (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biomedicine, Field: Genetics
PY 2013
TI STUDY OF POTENTIAL BIOMARKERS IN OVARIAN ENDOMETRIOSIS
DT Doctoral Dissertation
NO XV, 85 p., 7 tab., 38 fig., 162 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Endometriosis is a common gynecological disease that is defined as the presence of endometrial glands and stroma outside the uterine cavity. It is characterized by non-specific symptoms, which prolongs the average time before diagnosis. Currently, it takes an average of seven years from onset of the disease to diagnosis. Therefore, many studies have been designed to identify biomarkers that will allow non-invasive and earlier diagnosis of endometriosis. The first part of this doctoral thesis focuses on proteins of the immune system. We thus measured the concentrations of 15 cytokines and other selected proteins that are involved in the pathogenesis of this disease, in the serum and peritoneal fluid of women with ovarian endometriosis and with benign cysts, and in healthy women. Our second approach was based on a previous expression analysis that identified several secretory proteins as potential biomarkers. We decided to further investigate two of these: biglycan and phospholipase A2 group IIA (PLA2G2A), the roles of which have not been studied in endometriosis. Our experimental data show significantly increased serum glycodelina-A and decreased serum leptin and interleukin (IL)-8 concentrations in patients with ovarian endometriosis. In the peritoneal fluid, in patients with ovarian endometriosis, there were increased concentrations of glycodelina-A, RANTES, IL-6 and IL-8, and decreased concentrations of leptin, *versus* the control groups. Western blotting allowed the detection of biglycan in ectopic endometrium of patients with ovarian endometriosis and with benign cysts, while we observed weak bands in samples of eutopic endometrium of patients with peritoneal endometriosis and patients with chronic pelvic pain. Biglycan was not detected in eutopic endometrium of healthy women. In peritoneal fluid of patients with ovarian endometriosis, biglycan concentrations were increased and PLA2G2A concentrations were decreased or unchanged; in serum, both of these showed no significant changes. We conclude that the selected cytokines and the two secretory proteins biglycan and PLA2G2A, have important roles in the pathogenesis of endometriosis. In combination with other molecules, the proteins glycodelin-A, leptin, IL-6, IL-8, MCP-1, RANTES, biglycan and PLA2G2A have potential as biomarkers for ovarian endometriosis.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
SEZNAM OKRAJŠAV	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 NAMEN RAZISKAVE	3
1.3 RAZISKOVALNE HIPOTEZE	4
2 PREGLED OBJAV	5
2.1 ENDOMETRIOZA	5
2.1.1 Simptomi in diagnostika endometrioze.....	5
2.1.2 Patogeneza endometrioze	6
2.1.2.1 Imunski odziv pri endometriizi	7
2.2 BIOLOŠKI OZNAČEVALCI	9
2.2.1 Definicija biološkega označevalca	9
2.2.2 Biološki označevalci endometrioze	9
2.2.2.1 Preučevani biološki označevalci endometrioze.....	9
2.2.2.1.1 Preučevani biološki označevalci, ki sodelujejo pri imunskejem odzivu	9
2.2.2.1.2 Preučevani biološki označevalci, ki sodelujejo pri procesu ožiljanja	10
2.2.2.1.3 Preučevani biološki označevalci iz skupine steroidnih hormonov	11
2.2.2.1.4 Ostali hormoni	11
2.2.2.1.5 Preučevani biološki označevalci, ki sodelujejo pri pripenjanju celic	11
2.2.2.1.6 Preučevani biološki označevalci, ki sodelujejo pri razgradnji zunajceličnega matriksa.....	12
2.2.2.1.7 Ostali preučevani biološki označevalci	12
2.2.2.2 Sekretorni proteini kot novi biološki označevalci endometrioze	13

2.2.2.2.1	Biglikan	14
2.2.2.2.2	PLA2G2A	16
3	MATERIALI IN METODE	18
3.1	MATERIALI	18
3.2	ZBIRANJE IN PRIPRAVA VZORCEV	19
3.2.1	Podatki o bolnicah preiskovane in kontrolne skupine	19
3.2.2	Vzorci tkiv	21
3.2.2.1	Izolacija proteinov	22
3.2.2.1.1	Obdelava vzorcev s hondroitinazo ABC	22
3.2.3	Vzorci krvi in peritonealne tekočine	22
3.3	UPORABLJENE METODE	22
3.3.1	Poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom, prenos Western in detekcija z ojačano kemiluminiscenco	22
3.3.2	Encimskoimunski testi.....	23
3.3.2.1	ELISA.....	23
3.3.2.2	Metoda Bio-Plex.....	24
3.4	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	25
4	REZULTATI	26
4.1	ANALIZA PRISOTNOSTI IZBRANIH CITOKINOV IN DRUGIH PROTEINOV V SERUMU IN PF PREISKOVANE IN KONTROLNE SKUPINE	26
4.1.1	Rezultati analize z metodama ELISA in Bio-Plex	26
4.1.1.1	Analiza koncentracije citokinov in drugih izbranih proteinov glede na fazo menstrualnega cikla	30
4.1.1.2	Analize povezave med koncentracijami citokinov in drugih izbranih proteinov v serumu in PF.....	35
4.1.1.3	Analiza povezave med med koncentracijami citokinov in drugih izbranih proteinov v serumu in PF in bolečinami	37
4.1.2	Glikodelin-A	39
4.2	ANALIZA IZRAŽANJA BIGLIKANA NA RAVNI PROTEINOV	43
4.2.1	Analiza prisotnosti proteina BGN v vzorcih tkiv.....	43

4.2.2 Analiza prisotnosti proteina BGN v serumu in PF	49
4.2.2.1 Analiza prisotnosti proteina BGN v serumu in PF glede na fazo menstrualnega cikla.....	51
4.2.2.2 Analiza povezave med koncentracijo proteina BGN in prisotnostjo bolečin	51
4.3 ANALIZA IZRAŽANJA PLA2G2A NA RAVNI PROTEINOV	54
4.3.1 Analiza prisotnosti PLA2G2A v serumu in PF	54
4.3.1.1 Analiza prisotnosti PLA2G2Av serumu in PF glede na fazo menstrualnega cikla....	57
4.3.1.2 Analiza povezave med koncentracijo PLA2G2A in prisotnostjo bolečin.....	58
 5 RAZPRAVA	 61
5.1 ANALIZA PRISOTNOSTI IZBRANIH CITOKINOV IN OSTALIH PROTEINOV V SERUMU IN PF	61
5.1.1 Glikodelin-A kot potencialni biološki označevalec ovarijske endometrioze	64
5.2 ANALIZA IZRAŽANJA BGN NA RAVNI PROTEINOV	65
5.3 ANALIZA IZRAŽANJA PLA2G2A NA RAVNI PROTEINOV	67
 6 SKLEPI	 69
 7 POVZETEK (SUMMARY).....	 71
7.1 POVZETEK	71
7.2 SUMMARY	72
 8 VIRI	 75

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Klinični podatki preiskovanih in kontrolnih skupin vključenih v študijo.....	20
Pregl. 2: Mediana in povprečna vrednost različnih tipov bolečin pri kontrolni skupini in bolnicah z ovarijsko endometriozo.....	21
Pregl. 3: Koncentracije citokinov in drugih izbranih proteinov v serumu preiskovane in kontrolne skupine	27
Pregl. 4: Koncentracije citokinov in drugih izbranih proteinov v PF preiskovane in kontrolne skupine.....	28
Pregl. 5: Rezultati statistične analize povezave med koncentracijo citokinov in izbranih proteinov v serumu in PF ter prisotnostjo bolečin.....	38
Pregl. 6: Rezultati analize prisotnosti proteina BGN v vzorcih tkiv in podatki posameznih bolnic	43
Pregl. 7: Rezultati predhodnih študij izbranih citokinov in drugih proteinov	63

KAZALO SLIK

Sl. 1: Pogosta mesta endometrioze (Atlas..., 2006).....	5
Sl. 2: Shematski prikaz dogodkov v medenici (Giudice in Kao, 2004)	7
Sl. 3: Vloga imunskega sistema pri nastanku endometrioze	8
Sl. 4: Shema do sedaj preučevanih bioloških označevalcev pri endometriozzi (May in sod., 2010)	13
Sl. 5: Skrajšan seznam genov, ki so bili diferenčno izraženi pri skupini bolnic z ovarijsko endometriozo (Vouk in sod., 2011).....	14
Sl. 6: Zgradba biglikana (Edwards, 2012).....	15
Sl. 7: Vloga biglikana pri razvoju vnetja (Nastase in sod., 2012)	15
Sl. 8: Shematski prikaz vloge PLA2G2A pri sintezi eikozanoidov (Ricciotti in FitzGerald, 2011)	17
Sl. 9: Potek prenosa Western in detekcije z ojačano kemiluminiscenco (Edwards, 2012)	23
Sl. 10: Shematski prikaz metode Bio-Plex (Bridges in Harris, 2011).....	25
Sl. 11: Koncentracije citokinov in drugih izbranih proteinov v serumu in PF zdravih žensk, bolnic z benignimi cistami in bolnic z ovarijsko endometriozo	29
Sl. 12: Primerjava koncentracij citokinov in drugih izbranih proteinov v serumu in PF, v proliferativni in sekretorni fazi menstrualnega cikla, med preiskovano in kontrolno skupino	31
Sl. 13: Statistično značilne povezave med koncentracijami nekaterih citokinov in izbranih proteinov v serumu in PF	36
Sl. 14: Koncentracija glikodelina-A v serumu in PF v povezavi z intenzivnostjo menstrualnih bolečin	39
Sl. 15: Koncentracija glikodelina-A v serumu in PF v povezavi s pogostostjo menstrualnih bolečin	40
Sl. 16: Koncentracija glikodelina-A v serumu in PF v povezavi s kroničnimi bolečinami v medenici	40
Sl. 17: Specifičnost in občutljivost glikodelina-A kot možnega biološkega označevalca ovarijske endometrioze v serumu v kombinaciji s starostjo in ITM	41
Sl. 18: Specifičnost in občutljivost glikodelina-A kot možnega biološkega označevalca ovarijske endometrioze v PF v kombinaciji s starostjo in ITM.....	42
Sl. 19: Prisotnost proteina BGN v vzorcih ektopičnega in evtopičnega endometrija	45
Sl. 20: Prisotnost proteina BGN v vzorcih evtopičnega endometrija bolnic s peritonealno endometriozo in bolnic s kroničnimi bolečinami v medenici	46
Sl. 21: Prisotnost BGN v vzorcih benignih cist.....	47

Sl. 22: Prisotnost BGN v vzorcih, inkubiranih s hondroitinazo ABC	48
Sl. 23: Koncentracije proteina BGN v serumu in PF bolnic z ovarijsko endometriozo in v kontrolni skupini, ki vključuje zdrave ženske in bolnice z benignimi cistami.....	49
Sl. 24: Koncentracije proteina BGN v serumu in PF bolnic z ovarijsko endometriozo, zdravih žensk in bolnic z benignimi cistami	50
Sl. 25: Koncentracije proteina BGN v serumu in PF zdravih žensk in bolnic z benignimi cistami.....	50
Sl. 26: Primerjava koncentracij proteina BGN v proliferativni in sekretorni fazi menstrualnega cikla med preiskovano in kontrolno skupino v serumu in PF	51
Sl. 27: Koncentracija BGN v serumu in PF v povezavi z intenzivnostjo menstrualnih bolečin	52
Sl. 28: Koncentracija BGN v serumu in PF v povezavi s pogostostjo menstrualnih bolečin ..	52
Sl. 29: Koncentracija BGN v serumu in PF v povezavi z bolečinami med spolnimi odnosi ..	53
Sl. 30: Koncentracije PLA2G2A v serumu in PF bolnic z ovarijsko endometriozo in kontrolni skupini, ki je sestavljena iz zdravih žensk in bolnic z benignimi cistami	55
Sl. 31: Koncentracije PLA2G2A v serumu in PF bolnic z ovarijsko endometriozo, zdravih žensk in bolnic z benignimi cistami	56
Sl. 32: Koncentracije PLA2G2A v serumu in PF zdravih žensk in bolnic z benignimi cistami.....	57
Sl. 33: Primerjava koncentracij PLA2G2A v proliferativni in sekretorni fazi menstrualnega cikla med preiskovano in kontrolno skupino v serumu in PF	57
Sl. 34: Koncentracijo PLA2G2A v serumu in PF v povezavi z intenzivnostjo menstrualnih bolečin	58
Sl. 35: Koncentracijo PLA2G2A v serumu in PF v povezavi s pogostostjo menstrualnih bolečin	59
Sl. 36: Koncentracija PLA2G2A v serumu in PF v povezavi z bolečinami med spolnimi odnosi	59
Sl. 37: Koncentracijo PLA2G2A v serumu in PF v povezavi z bolečinami med iztrebljanjem ali uriniranjem	60
Sl. 38: Koncentracija PLA2G2A v serumu in PF v povezavi s kroničnimi bolečinami v medenici	60

SEZNAM OKRAJŠAV

BGN	biglikan (ang. Biglycan)
CRP	C-reaktivni protein (ang. C-reactive protein)
ECL	detekcija z ojačano kemiluminiscenco (ang. enhanced chemiluminescence)
ELISA	encimskoimunski test (ang. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)
GAPDH	gliceralehid-3-fosfat dehidrogenaza (ang. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
GRO-α	kemokin C-X-C ligand 1, tudi CXCL1 (ang. Growth regulated oncogene-alpha)
ICAM-1	znotrajcelična adhezijska molekula-1 (ang. Intercellular adhesion molecule 1)
IL	interlevkin (ang. Interleukin)
IP-10	protein-10 inducirani z interferonom γ (ang. Interferon-gamma inducible protein 10)
ITM	indeks telesne mase
MCP-1	monocitni kemotaktični protein-1 (ang. Monocyte chemoattractant protein 1)
NE	normalni endometrij, evtopični endometrij
OE	ovarijska endometriozra
PF	peritonealna tekočina (ang. peritoneal fluid)
PLA2G2A	fosfolipaza A2 skupina IIA (ang. Phospholipase A2, group IIA)
RANTES	protein reguliran z aktivacijo, ki ga izražajo normalne celice T in se izloča (ang. Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted)
TGF-β	transformirajoči rastni dejavnik β (ang. Transforming growth factor beta)
TNF-α	dejavnik tumorske nekroze α (ang. Tumor necrosis factor alpha)
VCAM-1	adhezijska molekula žilnih celic (ang. Vascular cell adhesion molecule 1)
VEGF	žilni endotelijski rastni dejavnik (ang. Vascular endothelial growth factor)

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Endometriosa je kronična ginekološka bolezen, pri kateri se endometrijske žleze s stromo pojavljajo tudi zunaj maternične votline (Olive in Schwartz, 1993). Najpogosteje se endometriotično tkivo razraste po peritonealni votlini (jajčnik, črevo, omentum), zato razlikujemo tri vrste endometrioze: ovarijsko, peritonealno in globoko infiltrativno (Nisolle in Donnez, 1997). Bolezen je zelo pogosta, ocenjujejo, da se pojavlja pri 10–15 % žensk v rodnem obdobju. Simptomi so nespecifični; najpogostejši – bolečina, se pojavi pri 80 % bolnic. Neplodnih je 30–50 % bolnic, motnje menstruacije pa jih ima 20 % (Schindler, 2011). Z navadnim ginekološkim pregledom ne moremo postaviti diagnoze, nanjo lahko nakaže ultrazvočna preiskava, računalniška tomografija ali magnetna resonanca, vendar so te metode nezanesljive, saj so predeli endometrioze navadno premajhni. Zanesljiva je le invazivna diagnostična metoda – laparoskopija. Zaradi nespecifičnih simptomov in invazivne diagnostike od nastanka bolezni do diagnoze povprečno traja 7 let (Burney in sod., 2012).

V zadnjem času preučujejo različne biološke označevalce, ki bi omogočali neinvazivno ali semiinvazivno diagnostiko. Cilj je najti biološke označevalce, ki jih bo mogoče odkriti v krvi, urinu ali peritonealni tekočini in bodo specifični za to bolezen. Doslej so preučevali številne označevalce, med najbolj preučevanimi pa so proteini imunskega sistema, angiogeneze in pripajanja celic, vendar takšnih, primernih za diagnostiko za zdaj še niso našli (May in sod., 2010).

V prvem delu raziskave smo se osredotočili na proteine imunskega sistema in se na podlagi pregledane literature odločili, da bomo v serumu in peritonealni tekočini (PF) bolnic z ovarijsko endometriozo in oseb kontrolne skupine izmerili koncentracije dvanajstih citokinov in treh proteinov, ki jih pogosto povezujejo s patogenezo endometrioze. Čeprav so te proteine pri endometriizi že preučevali, pa si izsledki študij v večini primerov nasprotujejo. V večini študij so koncentracije teh proteinov preverjali zgolj v serumu ali PF, pogosto v slabo okarakteriziranih preiskovanih in kontrolnih skupinah. Z metodama ELISA in Bio-Plex smo tako v serumu kot PF dobro okarakterizirane preiskovane in kontrolne skupine izmerili koncentracije 12 citokinov in treh drugih proteinov. Postavili smo hipotezo, da so izbrani citokini in proteini možni biološki označevalci ovarijske endometrioze.

Naš drugi pristop je temeljal na predhodnih ekspresijskih študijah, v katerih so v vzorcih ovarijske endometrioze v primerjavi s kontrolnim endometrijem identificirali več čezmerno izraženih genov sekretornih proteinov. Odločili smo se, da podrobnejše

preučimo dva izmed njih – biglikan (BGN) in fosfolipazo A2 skupine IIA (PLA2G2A) – in tako prispevamo tudi k pojasnitvi njune vloge v patogenezi endometrioze. Postavili smo hipotezo, da sta izbrana sekretorna proteina biglikan in fosfolipaza 2A skupine IIA možna biološka označevalca. Biglikan je majhen in z levcini bogat proteoglikan. Sestavljen je iz proteinskega dela z levcinskimi ponovitvami in dveh glikozaminoglikanskih verig. Najdemo ga v zunajceličnem matriksu različnih tkiv – pogost je v kosteh, hrustancu in tetivah. Ima pomembno vlogo pri mineralizaciji in tvorbi kolagenskih fibril, domneva pa se, da z vezavo na TGF- β 1 (transformirajoči rastni dejavnik beta 1) posredno uravnava imunski sistem. Z vezavo na TGF- β se vključuje še v številne druge celične procese, kot so proliferacija, diferenciacija, apoptoza, adhezija in migracija celic, z vključitvijo v TLR2 in TLR4 signalne poti pa vpliva tudi na sintezo TNF- α (dejavnik tumorske nekroze alfa), kar kaže, da je BGN signalna molekula, ki ima pomembno vlogo v vnetnem procesu. Prav tako pri endometriizi še ni raziskana vloga fosfolipaze PLA2G2A, majhnega ekstracelularnega encima, ki katalizira cepitev esterske vezi v fosfolipidih, pri tem pa se sproščajo proste maščobne kisline in lizofosfolipidi. Če pri tej cepitvi iz fosfolipida nastane arahidonska kislina, se ta v naslednji fazi lahko pretvori v eikozanoide, med katere spadajo prostagladini in levkotrieni, ki so znani vnetni mediatorji. Po tvorbi arahidonske kisline sklepamo, da je fosfolipaza A2 skupine IIA vpletena v uravnavanje vnetnega odgovora. Protein PLA2G2A je vpletен še v druge fiziološke in patološke procese, najdemo pa ga v vseh tkivih človeškega organizma, vključno s krvnim serumom in plazmo.

1.2 NAMEN RAZISKAVE

- Namen naše študije je bil, da z encimskoimunskimi testi (ELISA in Bio-Plex) izmerimo koncentracije nekaterih citokinov in drugih proteinov. V študijo smo vključili citokine iz I. skupine: interlevkin-6 (IL-6), IL-8, IL-15, protein 10, inducirani z interferonom γ (IP-10), monocitni kemotaktični protein 1 (MCP₁), žilni endotelijski rastni dejavnik (VEGF), protein, reguliran z aktivacijo, ki ga izražajo normalne celice T in se izloča (RANTES). Vključili smo tudi citokine iz II. skupine: IL-18, kemokin c-x-c ligand 1 (CXCL1 oz. GRO- α), znotrajcelična adhezijska molekula 1 (ICAM-1) in adhezijska molekula žilnih celic (VCAM-1) ter citokin fikolin-2 pa tudi glikoprotein glikodelin-A, hormon leptin in C-reaktivni protein (CRP), ki so jih v nekaterih študijah našli v večji koncentraciji v peritonealni tekočini (PF) in serumu bolnic z endometriozo. Ker sta v naši raziskavi preiskovana in kontrolna skupina zelo dobro okarakterizirani, tovrstna študija pa še ni bila izvedena v slovenski populaciji, smo tako nameravali prispevati k pojasnitvi pomena citokinov kot možnih bioloških označevalcev.
- Na podlagi predhodne ekspresijske študije smo izbrali dva gena sekretornih proteinov *BGN* in *PLA2G2A*, njuno prisotnost v tkivu pa smo žeeli preveriti še na proteinski ravni s prenosom Western in detekcijo z ojačano kemiluminiscenco (ECL). V to študijo smo poleg vzorcev ovarijske endometrioze (OE) in normalnega endometrija (NE) vključili še vzorce peritonealne endometrioze, vzorce benignih cist in vzorce NE bolnic s kroničnimi bolečinami, vendar brez endometrioze. V naslednjem koraku smo vpeljali metodo encimskoimunskega testa (ELISA) in pri preiskovani skupini bolnic z endometriozo in dveh kontrolnih skupinah zdravih žensk in bolnic z benignimi cistami preverili prisotnost teh proteinov v serumu in PF. Namen našega drugega dela študije je bila identifikacija novih bioloških označevalcev ovarijske endometrioze.

1.3 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

Pri delu smo si postavili dve raziskovalni hipotezi:

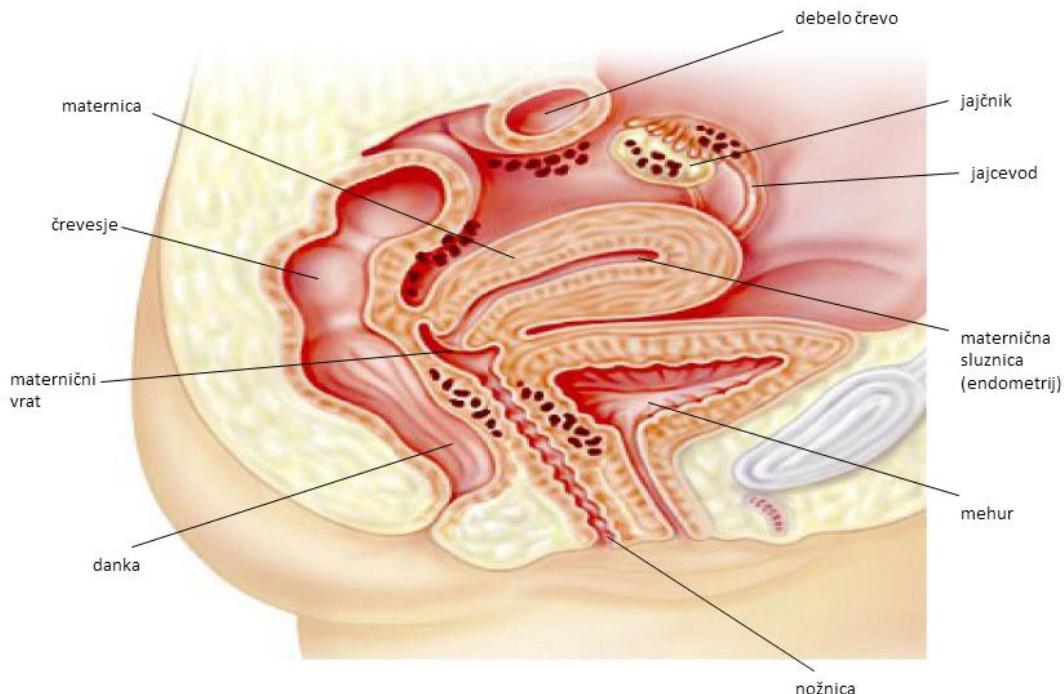
1. Pri endometriizi je moten imunski odziv, zato citokini, ki so vključeni v imunski odziv celic in se nahajajo v fizioloških tekočinah, predstavljajo možne biološke označevalce.
2. Izbrana sekretorna proteina BGN in PLA2G2A, ki sta prekomerno izražena v vzorcih ovarijske endometrioze, se v večjih koncentracijah nahajata tudi v PF oziroma serumu in tako predstavlja možna biološka označevalca.

Naš namen je torej najti tak biološki označevalec, ki bo specifičen, ga bo mogoče opaziti v začetnem obdobju bolezni, njegova koncentracija ne bo odvisna od menstrualnega cikla in ga bo mogoče najti v PF ali krvnem serumu.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ENDOMETRIOZA

Endometriosa je benigna ginekološka bolezen, za katero je značilna razrast endometrija s stromo zunaj maternične votline. Bolezen je precej pogosta, ocenjujejo, da se pojavlja pri 10–15 % žensk v rodnem obdobju (Olive in Schwartz, 1993). Morfološko in histološko razlikujemo tri različne oblike, ki predstavljajo ločene bolezni z različno etiologijo in patogenezo: ovarijska endometriosa, peritonealna endometriosa in globoka infiltrativna endometriosa (Nisolle in Donnez, 1997). Endometriotično tkivo se lahko razraste po celotni peritonealni votlini (Sl. 1), najpogostejša mesta zasevkov so na jajcevodih in jajčnikih ter uterosakralnih ligamentih v Douglasovem prostoru, redkeje tudi v prebavilih, sečilih, pljučih in živcih (Murphy, 2002). Doslej so endometriotična žarišča našli v vseh organih razen v vranici (Markham in sod., 1989).



Slika 1: Pogosta mesta endometrioze (Atlas..., 2006)

Figure 1: Common sites of endometriosis (Atlas..., 2006)

2.1.1 Simptomi in diagnostika endometrioze

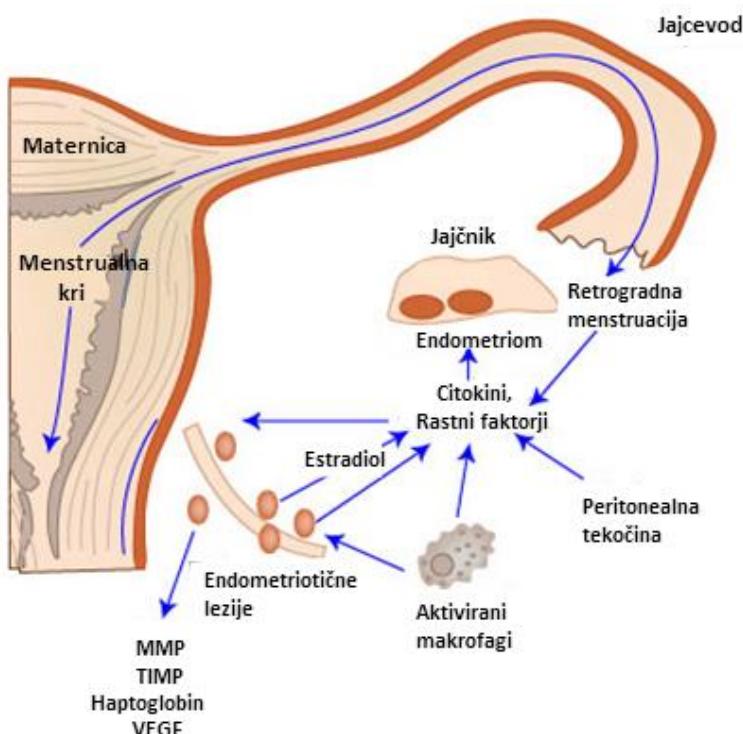
Bolnice z endometriozo imajo zelo različne simptome, odvisno od mesta, na katerem se bolezen pojavlja. Najpogostejše so bolečine v trebušnem predelu, boleče menstruacije, kronična utrujenost in neplodnost, kar močno zmanjša kakovost življenja (Schindler, 2011). V nekaterih primerih bolezen lahko poteka tudi asimptomatsko. Z navadnim ginekološkim pregledom diagnoze ne moremo postaviti, čeprav lahko endometriozo

jajčnika (endometriome) diagnosticiramo z ultrazvočnim pregledom. Za dokončno diagnozo pa je potrebna laparoskopija, ki jo navadno potrdimo še s histološko preiskavo (Olive in Schwartz, 1993; Murphy, 2002). Zaradi nespecifičnih simptomov in invazivne kirurške diagnostike od pojava simptomov do diagnoze mine zelo veliko časa, povprečno sedem let (Burney in sod., 2012).

2.1.2 Patogeneza endometrioze

Etiologija in patogeneza endometrioze še nista popolnoma pojasnjeni, vendar pa je znano, da sta vzrok in potek bolezni zelo zapletena, na nastanek pa vplivajo tako genetski kot okoljski in imunološki dejavniki (Giudice in Kao, 2004). Pri bolnicah z endometriozo so ugotovili, da so moteni različni biološki procesi, ki vključujejo angiogenezo, adhezijo, proliferacijo, razgradnjo zunajceličnega matriksa, delovanje steroidnih hormonov in imunski odziv (Olive in Schwartz, 1993; Nap in sod., 2004).

Poznamo več teorij o nastanku endometrioze, vendar nobena izmed njih ne pojasni vseh oblik bolezni (Lanišnik Rižner, 2009). Dolgo je prevladovalo mnenje, da na njen nastanek vpliva retrogradno zatekanje menstruacije, pri čemer menstrualna kri potuje skozi jajcevode nazaj v trebušno votlino, to pa omogoča celicam ektopičnega endometrija, da se ugnezdijo v trebušni votlini (Sl. 2) (Olive in Schwartz, 1993; Giudice in Kao, 2004). Ta teorija le delno razloži nastanek endometriotičnih zasevkov v peritonealni votlini (Kyama in sod., 2003), saj je retrogradna menstruacija prisotna pri večini žensk v reproduktivnem obdobju. Teorija metaplazije celomskega epitela razlaga nastanek endometrioze s preoblikovanjem celomskega epitelija pod vplivom hormonov in različnih okoljskih dejavnikov v endometriotično tkivo (Nisolle in Donnez, 1997; Nap in sod., 2004). To pojasni redke primere endometriotičnih zasevkov na oddaljenih mestih ter endometriozo pri moških in ženskah v menopavzi (Gazvani in sod., 2002). Tudi tretja teorija, ki predvideva, da endometriotične celice potujejo na oddaljena mesta po limfnih poteh ali po krvi, deloma pojasnjuje nastanek endometrioze na oddaljenih mestih (Gazvani in sod., 2002). V zadnjem času je najpogosteje sprejeta teorija o retrogradni menstruaciji v povezavi z motenim delovanjem imunskega sistema, ki neuspešno odstranjuje endometriotične celice iz trebušne votline (Giudice in Kao, 2004).



Slika 2: Shematski prikaz dogodkov v medenici (Giudice in Kao, 2004)

Shema prikazuje retrogradno menstruacijo v povezavi s celičnimi in biokemijskimi procesi patogeneze endometrioze

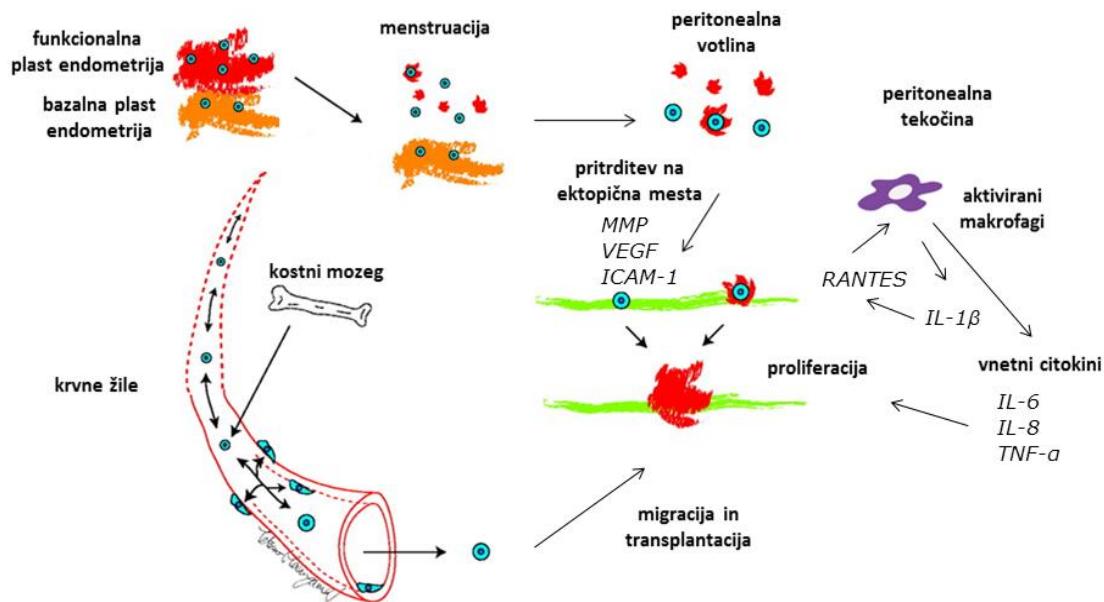
Figure 2: Schematic diagram of events in pelvis (Giudice and Kao, 2004)

Scheme represents retrograde menstruation and the cellular and biochemical processes involved in the pathogenesis of endometriosis

2.1.2.1 Imunski odziv pri endometriozzi

Moten imunski odziv pri endometriozzi je povezan z nastankom in napredovanjem bolezni (Giudice in Kao, 2004). Ko endometriotične celice vdrejo v trebušno votlino (Sl. 3), se morajo te pritrdiriti na ektopična mesta. Pri tem imajo spremembe evtopičnega endometrija zaradi različnih genetskih in okoljskih dejavnikov pomembno vlogo, saj evtopični endometrij bolnic z endometriozo vsebuje različne adhezijske molekule, matriks metaloproteinaze (MMP) ter žilni endotelijski rastni dejavnik (VEGF), kar mu omogoča boljšo adhezijo in večjo zmožnost angiogeneze (Matarese in sod., 2003). Poleg spremenjenega evtopičnega endometrija imata pomembno vlogo pri nastanku in napredovanju bolezni že prej omenjeni porušeni imunski sistem, ki neučinkovito čisti celice endometrija iz trebušne votline (Bulun in sod., 2000), in peritonealna tekočina (PF), ki vsebuje večje količine makrofagov, nevtrofilcev, limfocitov in ostalih celic imunskega sistema, ki spodbujajo proliferacijo ektopičnega endometrija in sam proces vnetja, kar še dodatno vpliva na preživetje endometriotičnih lezij na ektopičnih mestih (Matarese in sod., 2003; Kyama in sod., 2003). Pri bolnicah z endometriozo so ugotovili zmanjšano aktivnost in citotoksičnost naravnih celic ubijalk (NK celic) (Wilson in sod., 1994) ter povišano

količino in aktivacijski status makrofagov v PF (Halme in sod., 1984). Makrofagi v PF izločajo IL-1 β , kar sproži izločanje kemokina RANTES, ta pa še dodatno vzpodbudi kemotakso levkocitov (Nisolle in Donnez, 1997) in poveča število makrofagov, ki začnejo poleg IL-1 β izločati še ostale vnetne citokine (IL-6, IL-8, TNF α). Ta začarani krog ustvarja ugodno mikrookolje za implantacijo, proliferacijo, napredovanje bolezni in kroničen vnetni process (Giudice in Kao, 2004).



Slika 3: Vloga imunskega sistema pri nastanku endometrioze

Legenda: MMP – matriks metaloproteinaza; VEGF – žilni endotelijski rastni dejavnik; ICAM-1 – znotrajcelična adhezijska molekula 1; RANTES – protein reguliran z aktivacijo, ki ga izražajo normalne celice T in se izloča; IL – interlevkini; TNF- α – dejavnik tumorske nekroze α

Figure 3: The role of immune system in the development of endometriosis

Legend: MMP – Matrix metalloproteinase; VEGF – Vascular endothelial growth factor, ICAM-1 – Intracellular adhesion molecule 1; RANTES – Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted, IL-Interleukins, TNF- α – Tumor necrosis factor α

2.2 BIOLOŠKI OZNAČEVALCI

2.2.1 Definicija biološkega označevalca

Biološki označevalci je biokemijska, genetska ali molekularna lastnost; kazalnik določenega biološkega stanja ali procesa; pogosto orodje ali tehnologija, ki omogoča razumevanje vzroka, spremljanje zdravljenja, postavitev diagnoze oz. ima napovedno vrednost (Strimbu in Jorge, 2010).

2.2.2 Biološki označevalci endometrioze

Zaradi nespecifičnih simptomov endometrioze ter dolge in invazivne diagnostike v zadnjem času intenzivno preučujejo biološke označevalce. Cilj je najti takšnega, ki bo omogočal neinvazivno diagnostiko s poceni in občutljivo metodo določanja, ga bo mogoče zaznati v krvi, urinu ali PF in bo specifičen za endometriozo. Kljub številnim študijam za zdaj še niso našli primernega (May in sod., 2010).

2.2.2.1 Preučevani biološki označevalci endometrioze

Do sedaj so preučevali več kot 100 možnih bioloških označevalcev (Sl. 4), vendar nobeden izmed njih ni primeren za diagnostiko endometrioze (May in sod., 2010). Zaradi majhnega števila bolnic, vključenih v raziskave, različnih kontrolnih skupin, različnih tipov in faz endometrioze, vključitvenih kriterijev, občutljivosti testov in uporabljenih vzorcev (serum ali plazma), so si izsledki študij pogosto nasprotujejo (May in sod., 2010; Vodolazkaia in sod., 2012). Nekateri izmed preučevanih bioloških označevalcev so bolj uporabni pri drugih boleznih, kot npr. tumorski antigen 125 (CA 125), ki se uporablja v diagnostiki epitelijskega raka jajčnikov (Gadducci in sod., 2004).

2.2.2.1.1 Preučevani biološki označevalci, ki sodelujejo pri imunskejem odzivu

Pri nastanku in napredovanju endometrioze ima porušen imunski odziv pomembno vlogo, zato so citokine in druge proteine, ki sodelujejo pri imunskejem odzivu, pogosto preučevali kot možne biološke označevalce endometrioze (May in sod., 2010). Zaradi povišane koncentracije citokinov tudi pri drugih boleznih (Vodolazkaia in sod., 2012), spremenjanja koncentracij čez dan (Mihalyi in sod., 2010) so kot posamezni biološki označevalci neprimerni za diagnostiko. V zadnjem času zato preučujejo nabore več posameznih bioloških označevalcev (paneli) (Vodolazkaia in sod., 2012; Mihalyi in sod., 2010; Othman in sod., 2008; Agic in sod., 2008; Seeber in sod., 2008).

Citokini so majhne signalne proteinske molekule imunskega sistema. Doslej so najbolj preučevali citokin IL-6. To je vnetni citokin, vključen v aktivacijo T in diferenciacijo B celic (Kishimoto in sod., 1995). Številne študije so pokazale, da je koncentracija IL-6 višja

v serumu (Pellicer in sod., 1998; Martinez in sod., 2007; Othman in sod., 2008) in PF bolnic z endometriozo (Velasco in sod., 2010), medtem ko v drugih študijah niso našli povezave (Somigliana in sod., 2004; Kalu in sod., 2007). Pogosto so preučevali tudi IL-8, ki ga izločajo makrofagi in je odgovoren za aktivacijo nevtrofilcev (Bagniolini in Clark-Lewis, 1992). Nekateri avtorji poročajo o nespremenjeni koncentraciji v serumu in peritonealni tekočini bolnic (Gazvani in sod., 1998; Darai in sod., 2003), spet drugi o višji koncentraciji (Pizzo in sod., 2002; Ohata in sod., 2008; Velasco in sod., 2010). Dejavnik tumorske nekroze α (TNF- α) je citokin z vnetno in angiogeno vlogo (Yan in sod., 2006). Je domnevni biološki označevalec endometrioze, saj so v vrsti študij pokazali, da je njegova koncentracija povisana v serumu in PF bolnic (Matalliotakis in sod., 1997; Pizzo in sod., 2002; Darai in sod., 2003; Scholl in sod., 2009), čeprav nekateri avtorji poročajo tudi o nespremenjeni ravni (Kalu in sod., 2007; Othman in sod., 2008). Tudi MCP-1 so pogosto preučevali, nekateri avtorji so zaznali višjo raven v sekretorni fazi (Akoum in sod., 1996), v primeru I-II stopnje bolezni (Pizzo in sod., 2002) oz. v vseh stopnjah bolezni (Gmyrek in sod., 2005). MCP-1 so preučevali tudi v naboru bioloških označevalcev skupaj z IL-6 (Othman in sod., 2008), CA-125 in kemokinskim receptorjem tipa I (CCR I) (Agic in sod., 2008) ter z leptinom in CA-125 (Seeber in sod., 2008).

Preučevali so še številne druge citokine, kot so interferon γ , (INF- γ), IL-1 α , topni receptor tipa II za IL-1 (Kondra-Anasz in sod., 2005), IL-1 β (Kalu in sod., 2007), IL-2, -4, -10 (Hassa in sod., 2009), IL-12, -18 (Arici in sod., 2003, Fairbanks in sod., 2009), IL-13 (Bedaiwy in sod., 2002), IL-15 (Othman in sod., 2008), IL-16 (Zhang in sod., 2005) in RANTES (Markham in sod., 1997), vendar v večini študij niso našli razlik v koncentraciji.

2.2.2.1.2 Preučevani biološki označevalci, ki sodelujejo pri procesu ožiljanja

Ožiljanje v zdravem endometriju uravnavajo številni angiogeni dejavniki, med katerimi je najpomembnejši VEGF. Ta vpliva tako na prehodnost žil in na vnetni odziv (Van Langendonck in sod., 2008). V veliko študijah so tako poskušali pokazati povezavo med angiogenimi dejavniki in endometriozo, vendar v večini niso našli razlik v koncentraciji VEGF v serumu in PF bolnic v primerjavi s kontrolno skupino (Pellicer in sod., 1998; Othman in sod., 2008). Med angiogenimi dejavniki so le za angiogenin poročali, da je v serumu bolnic med proliferativno fazo cikla v višji koncentraciji (Steff in sod., 2004). Pri drugih proangiogenih dejavnikih, kot so epidermalni rastni dejavnik (EGF) (Matalliotakis in sod., 2003), rastni dejavnik iz trombocitov (PDGF) (Kalu in sod., 2007) in hepatocitni rastni dejavnik (HGF) (Khan in sod., 2006), niso našli razlik.

2.2.2.1.3 Preučevani biološki označevalci iz skupine steroidnih hormonov

Endometriosa je bolezen, odvisna od hormonov. Ektopično in evtopično tkivo je odvisno od hormonov: estradiol spodbuja rast, progesteron pa diferenciacijo celic (Olive in Schwartz, 1993). Ker je pri endometriozzi lokalni metabolizem estrogenov in progesterona moten (Šmuc in sod., 2007), so pri bolnicah z endometriozo določali tudi koncentracijo steroidnih hormonov v serumu in peritonealni tekočini. V večini študij sprememb v ravni progesterona (Fazleabas in sod., 1987; Matsuzaki in sod., 2006; Szymanovsky, 2007) ali estradiola (Adamyan in sod., 1993) niso našli.

2.2.2.1.4 Ostali hormoni

V nekaterih študijah so zaznali višjo raven prolaktina (Acien in sod., 1989), v drugih pa niso našli sprememb (Matalliotaksis in sod., 1996). Čas vzorčenja bistveno vpliva na koncentracijo prolaktina, zato ta ni ustrezan biološki označevalc (Radwanska in sod., 1987). Kot potencialni biološki označevalci so preučevali tudi hormon leptin. V dveh študijah so pokazali višjo koncentracijo v serumu (Matarese in sod., 2000; Seeber in sod., 2008), medtem ko preostale študije kažejo nespremenjeno raven (Vigano in sod., 2002; Gungor in sod., 2009). Statistično značilno višjo raven leptina so našli tudi v vzorcih PF bolnic (Alvaggi in sod., 2009; Pandey in sod., 2010).

2.2.2.1.5 Preučevani biološki označevalci, ki sodelujejo pri pripenjanju celic

Za nastanek endometrioze je pomemben proces pripenjanja celic zunaj maternične votline. Endometriotsko tkivo se pripenja na poškodovane mezotelijske membrane, celice endometrija sprožijo morfološke spremembe mezotelija in si tako pripravijo primerno okolje za pripenjanje (Nap in sod., 2004). V tem procesu imajo pomembno vlogo transmembranski proteini integrini (Klemt in sod., 2007).

Eden najbolj preučevanih proteinov celičnega pripenjanja je ICAM-1. V nekaterih študijah so našli višje koncentracije tega proteina (Wu in sod., 1998), le pri I.–II. (Matalliotaksis in sod., 2001) oz. III.–IV. stopnji bolezni (Daniel in sod., 2000), v drugih študijah pa niso zaznali sprememb (De Placido in sod., 1998). Zanimivo je, da so poročali tudi o znižanju serumskega proteina ICAM-1 pri III.–IV. stopnji bolezni (Barrier in Sharpe-Timms, 2002). Tudi E-kadherin in VCAM-1 imata pomembno vlogo pri pripenjanju celic. O statistično značilno povišani koncentraciji E-kadherina sta poročala Fu in Lang (2002), medtem ko sta povišano raven VCAM-1 v serumu opazila Barrier in Sharpe-Timms (2002).

2.2.2.1.6 Preučevani biološki označevalci, ki sodelujejo pri razgradnji zunajceličnega matriksa

Endometrij se zaradi cikličnega spremenjanja koncentracije estradiola in progesterona spreminja. Pomembno vlogo pri razgradnji zunajceličnega matriksa imajo matriks metaloproteinaze (MMP), ki so čezmerno izražene v endometriotičnem tkivu (Nap in sod., 2004; Mizumoto in sod., 2002). Delovanje MMP uravnavajo inhibitorji metaloproteinaz (TIMP) (Nagase in sod., 2006). Pričakovano so v serumu bolnic z endometriozo našli nižjo koncentracijo TIMP (Sharpe-Timms in sod., 1998).

2.2.2.1.7 Ostali preučevani biološki označevalci

Tumorski antigeni:

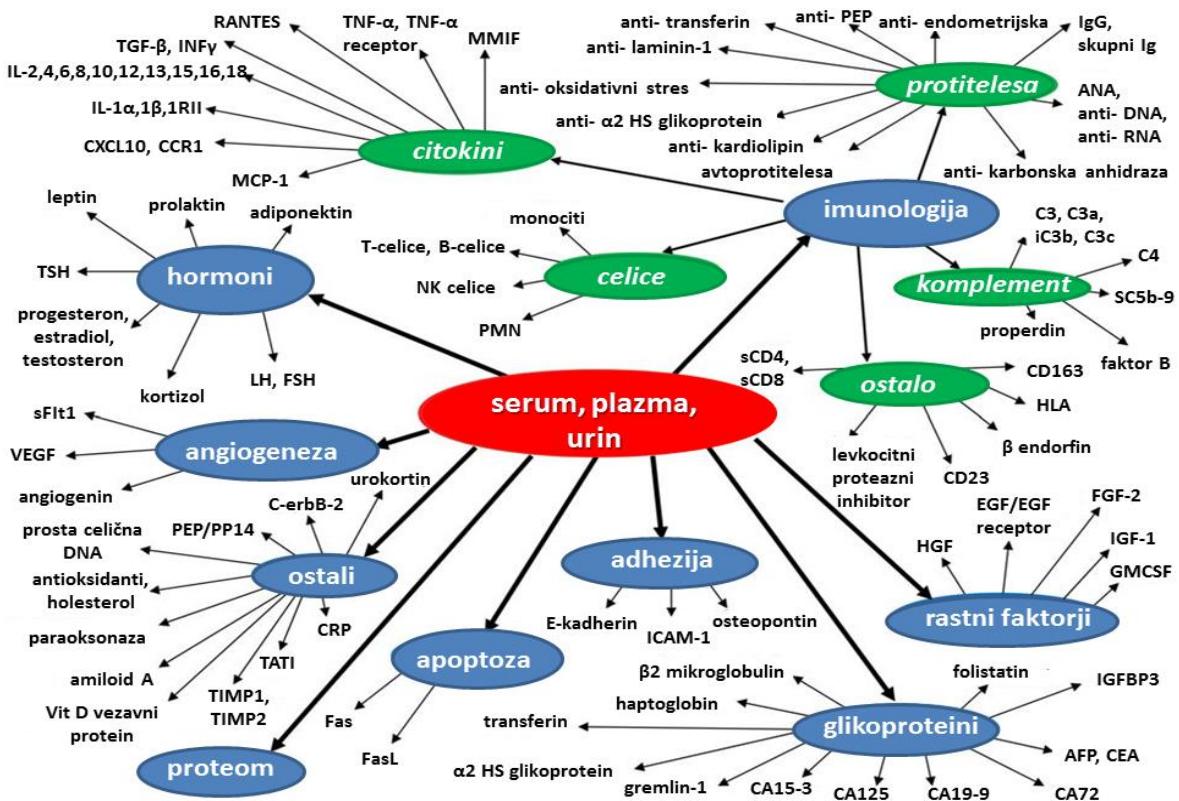
Kot potencialni biološki označevalci so najbolj preučevali glikoprotein CA 125. V več študijah so zaznali višjo koncentracijo pri bolnicah z endometriozo (Abrao in sod., 1999; Somigliana 2004; Seeber in sod., 2008), v nekaterih primerih so poročali o povezavi med koncentracijo CA 125 in stopnjo bolezni (Martinez in sod., 2007).

Tudi CA 19-9 so preučevali v povezavi z endometriozo. V nekaterih študijah so zaznali višjo koncentracijo v serumu (Matalliotakis in sod., 1998), v drugih pa ni bilo sprememb (Abrao in sod., 1999; Somigliana in sod., 2004). Med tumorskimi antigeni so preučevali še CA 15-3 (Abrao in sod., 1999) in CA-72 (Molo in sod., 1994), vendar razlik v koncentraciji niso zaznali.

Ostali glikoproteini:

Mathur in sod. (1999) so poročali o statistično značilnem znižanju serumskega transferina in višji ravni alfa2-HS-glikoproteina pri bolnicah z endometriozo. Poročali so tudi o statistično značilni višji ravni transferina in α 2-HS-glikoproteina v PF bolnic, opazili pa so še prisotnost protiteles proti temu antigenoma.

Haptoglobin β je sekretorni produkt endometriotičnih lezij (Sharpe-Timms in sod., 1998), ki so ga našli v višji koncentraciji v serumu in PF (Ferrero in sod., 2005). Tudi glikoprotein folistatin, ki inhibira aktivin (de Winter in sod., 1996), je statistično značilno povišan v serumu bolnic (Florio in sod., 2009).



Slika 4: Shema do sedaj preučevanih bioloških označevalcev pri endometriozni (May in sod., 2010)

Figure 4: Schematic diagram of putative biomarkers of endometriosis (May et al., 2010)

2.2.2.2 Sekretorni proteini kot novi biološki označevalci endometrioze

Na podlagi analize izražanja celotnega genoma v vzorcih endometrioze jajčnika in kontrolnega tkiva so v našem laboratoriju v predhodno ekspresijsko študijo na DNA-mrežah nizke gostote (Vouk in sod., 2011) vključili 152 genov, povezanih z OE, in 20 genov, ki so na podlagi literature povezani z delovanjem estrogenov. Med njimi jih je bilo 78 differenčno izraženih v vzorcih OE glede na kontrolni endometrij, 25 izmed njih pa jih je kodiralo za sekretorne proteine (Sl. 5). Koncentracije proteinov BGN in PLA2G2A v fizioloških tekočinah bolnic z endometriozo doslej še niso preučevali, zato smo se odločili, da ju podrobneje preučimo.

	<i>gen ID</i>	<i>p vrednost</i>	<i>FC</i>
<i>prekomerno izraženi</i>			
1	<i>GATA4</i>	0,005979	7066918,00
2	<i>PLA2G2A</i>	0,006078	2469,32
3	<i>CYP19A1</i>	0,010386	509,66
4	<i>ARHI</i>	0,013437	162,41
5	<i>WISP2</i>	0,011775	60,85
6	<i>COL8A1</i>	0,006105	53,11
7	<i>TCF21</i>	0,013437	51,38
8	<i>CPXM2</i>	0,001471	49,88
9	<i>PTPRZ1</i>	0,007985	45,94
10	<i>ESR2</i>	0,001977	42,30
11	<i>HOXC6</i>	0,007985	41,48
12	<i>PTGIS</i>	0,003512	41,05
13	<i>INHA</i>	0,001083	34,98
14	<i>HF1</i>	0,004643	34,26
15	<i>PRSS35</i>	0,014337	24,03
16	<i>C20orf103</i>	0,022132	22,72
17	<i>C3</i>	0,003512	18,80
18	<i>KAL1</i>	0,001089	12,26
19	<i>VCAM1</i>	0,003512	11,95
20	<i>CTHRC1</i>	0,010386	11,35
21	<i>TNFSF13B</i>	0,002642	10,09
22	<i>GATA6</i>	0,006105	10,06
23	<i>CXCL1</i>	0,044946	9,70
24	<i>FZD7</i>	0,013437	9,36
25	<i>ADAM23</i>	0,001977	9,17
26	<i>FIBL-6</i>	0,022132	9,10
27	<i>AEBP1</i>	0,004643	8,77
28	<i>SN</i>	0,001977	8,49
29	<i>BGN</i>	0,007985	8,22
30	<i>LAMA1</i>	0,013437	8,10

Slika 5: Skrajšan seznam genov, ki so bili diferenčno izraženi pri skupini bolnic z ovarijsko endometriozo (Vouk in sod., 2011)

Figure 5: Short list of genes that were differentially expressed in women with ovarian endometriosis (Vouk et al., 2011)

2.2.2.2.1 Biglikan

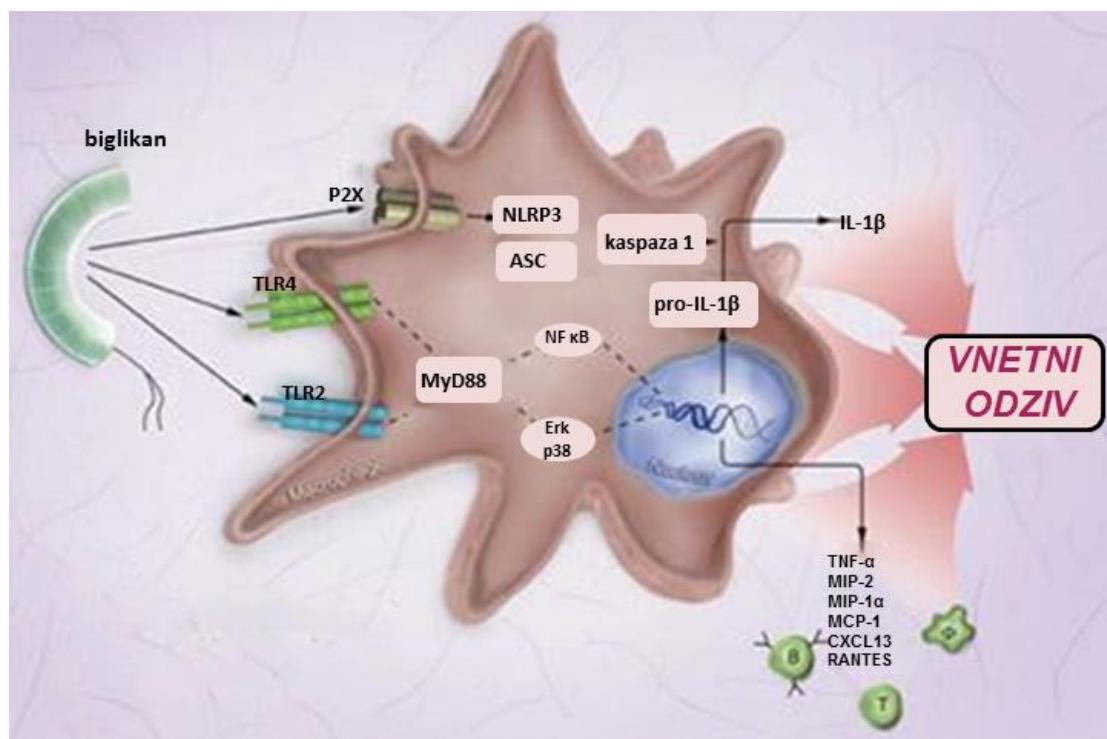
Biglikan spada v družino majhnih proteoglikanov. Sestavljen je iz 42 kDa velike proteinske sredice, ki je bogata z levcini, na to osnovo pa sta na Ser5 in Ser11 z O-glikozidno vezjo pripeti dve glikozaminoglikanski verigi (Sl. 6), sestavljeni iz dermatan in/ali hondroitin sulfata (Fisher in sod., 1989; Schaefer in sod., 2008). Je komponenta zunajceličnega matriksa, in čeprav je v večini tkiv, je zlasti pogost v sklepnom hrustancu (Neame in sod., 1989), kosteh (Fisher in sod., 1983) in koži (Scott in sod., 1997), kjer ima pomembno vlogo pri mineralizaciji in tvorbi kolagenskih fibril, nahaja pa se tudi v endotelijskih celicah endometrija (Kitaya in sod., 2009). Z imunohistokemijsko metodo so pokazali, da je protein na celični površini, kar mu omogoča, da sodeluje pri različnih bioloških funkcijah, kot so migracija, pripenjanje matriksa in apoptoza (Flannery, 2006; Iozzo in sod., 2010). Prek interakcij z rastnimi dejavniki (TGF- β) in citokini (TNF- α) se vključuje v uravnavanje imunskega sistema. Biglikan je tako signalna molekula, ki ima pomembno vlogo pri vnetnem procesu (Schaefer in sod., 2005).

Med menstrualnima ciklom se koncentracija proteina BGN spreminja; koncentracije so nizke v proliferativni in visoke v sekretorni fazi (Yamaguchi in sod., 2006; Yasuo in sod., 2008). Odvisnost od menstrualnega cikla nakazuje, da koncentracijo BGN uravnavajo ovarijski steroidni hormoni (Kitaya in sod., 2009).



Slika 6: Zgradba biglikana (Edwards, 2012)

Figure 6: Structure of biglycan (Edwards, 2012)

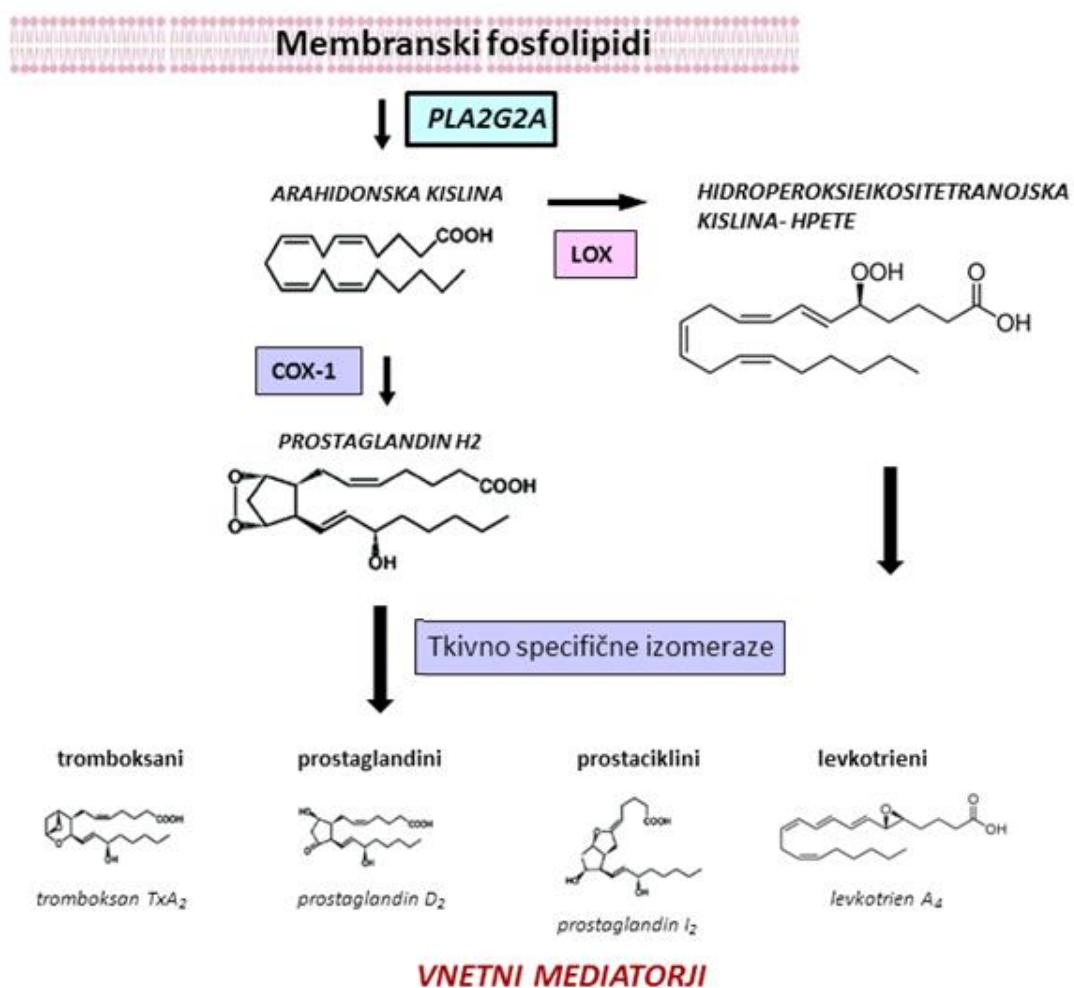


Slika 7: Vloga biglikana pri razvoju vnetja (Nastase in sod., 2012)

Figure 7: The role of biglycan in the development of inflammation (Nastase et al., 2012)

2.2.2.2.2 PLA2G2A

PLA2G2A je majhen, okoli 14 kDa velik encim, ki katalizira cepitev esterske vezi na mestu dva (*sn*-2) v glicerofosfolipidih, pri čemer se sprostita prosta maščobna kislina in lizofosfolipid (Schaloske in Dennis, 2006). Spada v skupino sekretornih fosfolipaz, ki za svoje delovanje potrebujejo ione Ca^{2+} . Pomembno vlogo imajo pri metabolizmu fosfolipidov in pri tvorbi eikozanoidov, s čimer se vključujejo v vnetne procese, sodelujejo pa tudi pri proliferaciji, migraciji, apoptozi ter pri sproščanju nekaterih hormonov in citokinov (Rizzo in sod., 2000; Granata in sod., 2006). Sekretorne fosfolipaze imajo več evolucijsko ohranjenih disulfidnih vezi, ki so potrebne za stabilnost teh encimov (Verheij in sod., 2008). Aktivno mesto encima je na dnu hidrofobnega kanala (Dijkstra in sod., 1981; Scott in sod., 1991) in je odgovorno za vezavo posameznih fosfolipidov iz celične membrane (Singer in sod., 2002). Pri tem se sprosti arahidonska kislina, ki je substrat za ciklooksigenazo (COX-1), ta pa arahidonsko kislino pretvorí v eikozanoide, ki sodelujejo pri vnetnih procesih (Sl. 8). Drug produkt encimske reakcije so lizofosfolipidi, ki imajo pomembno vlogo pri znotrajceličnem prenosu sporočil (Hanasaki in sod., 1999).



Slika 8: Shematski prikaz vloge PLA2G2A pri sintezi eikozanoidov (Ricciotti in FitzGerald, 2011)
Legenda: COX-1 – ciklooksigenaza 1; LOX – lipooksigenaza

Figure 8: Schematic representation of PLA2G2A in eicosanoid biosynthesis (Ricciotti and FitzGerald, 2011)
Legend: COX-1 – cyclooxygenase 1; LOX – lipoxygenase

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Primarna protitelesa:

- proti BGN:
 - Sigma, HPA003157 (zajčja poliklonska protitelesa)
 - R&D Systems, BAF2667 (kozja poliklonska protitelesa)
- proti PLA2G2A
 - Millipore, 05-143 (mišja monoklonska protitelesa)
- proti GAPDH
 - Sigma, G8795 (mišja monoklonska protitelesa)
- proti fikolinu-2
 - R&D Systems, MAB2428 in BAF2428 (mišja monoklonska in kozja poliklonska protitelesa)
- proti CRP
 - Sigma, C3527 (zajčja poliklonska protitelesa)
 - Dako Glostrup, P227 (zajčja poliklonska protitelesa)

Sekundarna protitelesa:

- Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., 111-035-003 (sekundarna kozja protitelesa proti zajčjim protitelesom, konjugirana s hrenovo peroksidazo)
- Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., 115-035-062 (sekundarna kozja protitelesa proti mišjim protitelesom, konjugirana s hrenovo peroksidazo)

Komplet reagentov za metodi ELISA in Bio-Plex:

- PLA2G2A
 - Uscn Life Science Inc., E93827Hu
- PLA2G2A
 - Cayman Chemicals, 585000
- RANTES
 - Duo-Set method, R&D Systems, DY278
- glikodelin-A
 - Bio-Serve, Dispolab, BS-30-20
- leptin
 - Duo-Set method, R&D Systems, DY398
- progesteron
 - DPC Coat-a-Count Buhlmann Laboratories, Alschwill, IM1188
- Bio-PlexTM Cytokine Assay (IL-6, -8, -15, -18, IP-10, MCP-1, VEGF, GRO-alfa, ICAM-1 in VCAM-1)
 - Bio-Rad, 171-A1001P

Encim hondroitinaza ABC

- Sigma, C2905

Membrana

- polivinilidenfluoridna (PDVF) membrana, Millipore

RapidStep™ ECL reagent

- Calbiochem, 345818

3.2 ZBIRANJE IN PRIPRAVA VZORCEV

V raziskavo smo vključili bolnice, ki imajo potrjeno diagnozo ovarijske endometrioze, bolnice z benignimi cistami in zdrave ženske, ki so se odločile za sterilizacijo. Koščke tkiva, vzorce krvi in peritonealne tekočine smo zbirali v sodelovanju z Ginekološko klinikou Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani (doc. dr. Martina Ribič Pucelj). Študije je odobrila Komisija RS za medicinsko etiko 24. 10. 2006, 24. 5. 2008 in 16. 12. 2008 vse pacientke, ki so bile vključene v študijo, pa so podale pisno soglasje. Dodatno smo v študijo vključili še bolnice s peritonealno endometriozo in bolnice z nepojasnjenimi kroničnimi bolečinami, vendar brez endometrioze, ki nam jih je odstopil prof. Nick A. Bersinger z Univerze v Bernu.

3.2.1 Podatki o bolnicah preiskovane in kontrolne skupine

V študiju smo vključili 57 bolnic s potrjeno diagnozo ovarijske endometrioze (OE), 4 bolnice s peritonealno endometriozo (PE), 11 z benignimi cistami (BC), 4 z nepojasnjenimi kroničnimi bolečinami, vendar brez endometrioze, in 31 zdravih žensk, ki so se odločile za sterilizacijo. Klinični podatki o bolnicah so zbrani v Pregl. 1.

Preglednica 1: Klinični podatki preiskovanih in kontrolnih skupin vključenih v študijo

Table 1: Clinical characteristics of cases and control groups included in our study

Klinični podatki	Kontrole			Bolnice z endometriozo	
	zdrave ženske	bolnice s kroničnimi bolečinami	bolnice s cistami	bolnice z ovarijsko endometriozo	bolnice s peritonealno endometriozo
število (n)	31	4	11	57	4
starost (leta) območje	$39,1 \pm 3,9$ 26-45	$36,5 \pm 3,2$ 33-40	$36,2 \pm 9,0$ 26-49	$32,7 \pm 5,7$ 22-44	$39,8 \pm 5,6$ 36-48
indeks telesne mase- ITM območje	$25,7 \pm 4,3$ 19,0-33,9	$21,5 \pm 2,4$ 18,9-24,4	$22,3 \pm 3,2$ 18,3-30,4	$22,0 \pm 3,7$ 17,0-35,9	$24,9 \pm 3,3$ 20,5-28,6
menstrualni cikel- faza (n) proliferativna sekretorna	14 17	2 2	5 6	37 20	2 2
faza endometrioze (n) faza I+II faza III+IV				13 44	0 4

Vse ženske, vključene v raziskavo, smo prosili, da dan pred operacijo izpolnijo anketni vprašalnik o ginekoloških in kliničnih podatkih, stresu, uporabi kontraceptivov in zdravil ter o prisotnosti bolečin, ki so značilne za endometriozo (intenzivnost in pogostost menstrualnih bolečin, bolečine med iztrebljanjem ali uriniranjem, bolečine med spolnimi odnosi, prisotnost slabosti in bruhanja ter kronične bolečine v medenici, spodnjem delu hrbta ali abdomnu). Prosili smo jih, da bolečino opišejo na lestvici za intenzivnost od 1 (brez bolečine) do 5 (zelo močne bolečine) oziroma na lestvici za pogostost od 1 (nikoli) do 5 (zelo pogosto).

Preglednica 2: Mediana in povprečna vrednost različnih tipov bolečin pri kontrolni skupini in bolnicah z ovarijsko endometriozo

Legenda: ¹ – lestvica za intenzivnost (1 – brez bolečine, 2 – rahla bolečina, 3 – srednje močna bolečina, 4 – močna bolečina, 5 – zelo močna bolečina), ² – lestvica za pogostost (1 – nikoli, 2 – skoraj nikoli, 3 – včasih, 4 – pogosto, 5 – zelo pogosto), za primerjavo med kontrolno skupino in bolnicami smo uporabili test Mann-Whitney

Table 2: Mean and median values for different types of pain of controls and patients with OE

Legend: ¹ – scale for intensity (1 – no pain, 2 – light pain, 3 – moderate pain, 4 – strong pain, 5 – very strong pain), ² – scale for frequency (1 – never, 2 – almost never, 3 – sometimes, 4 – often, 5 – very often), for comparison between patients and controls we used Mann-Whitney test

Tip bolečine Analiza		Intenzivnost menstrualnih bolečin ¹	Pogostost menstrualnih bolečin ²	Bolečine med spočnimi odnosi ¹	Bolečine med iztrebljanjem ali uriniranjem ¹	Slabost ali bruhanje ¹	Kronične bolečine v medenici
kontrolna skupina	MEDIANA	2	3	1	1	1	Ne: 92,3 %
	POVPR. ± SD	$2,2 \pm 1,0$	$2,4 \pm 1,2$	$1,5 \pm 0,8$	$1,1 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,4$	Da: 7,7 %
bolnice z OE	MEDIANA	4	4	3	1	1	Ne: 50,0 %
	POVPR. ± SD	$3,7 \pm 1,1$	$3,8 \pm 1,2$	$2,5 \pm 1,4$	$1,8 \pm 1,1$	$1,4 \pm 0,8$	Da: 50,0 %
	p-vrednost	$p<0,0001$	$p<0,0001$	$p=0,0004$	$p=0,0001$	$p=0,0942$	/

3.2.2 Vzorci tkiv

V raziskavo smo vključili 19 vzorcev ektopičnega endometrija bolnic z OE, 19 vzorcev evtopičnega endometrija (NE) zdravih žensk in 9 vzorcev benignih cist. Dodatno smo v študijo vključili še 4 vzorce normalnega endometrija bolnic s peritonealno endometriozo (PE) in 4 vzorce NE bolnic z nepojasnjenimi kroničnimi bolečinami, vendar brez endometrioze, ki nam jih je odstopil prof. Nick A. Bersinger z Univerze v Bernu. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili tkivo placente, ki smo ga dobili z Ginekološke klinike Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, saj je lahko dostopno, hkrati pa vsebuje večino preiskovanih proteinov.

3.2.2.1 Izolacija proteinov

Proteinske frakcije smo pripravili iz vzorcev tkiv, iz katerih smo predhodno izolirali RNA. Delali smo po navodilih proizvajalca reagenta »TriReagent« (Sigma). Po odstranitvi genomske DNA smo proteine oborili z izpopropanolom, izprali z gvanidinijevim hidrokloridom in absolutnim etanolom, frakcije posušili in proteine raztopili v raztopini za lizo (7 M urea, 2 M tiourea, 4-odstotni CHAPS). Koncentracijo proteinov smo izmerili z Bradfordovo metodo. Tako pripravljene vzorce smo uporabili za spremljanje prisotnosti izbranih proteinov z metodo prenosa Western in detekcijo z ojačano kemiluminiscenco (ECL).

3.2.2.1.1 Obdelava vzorcev s hondroitinazo ABC

Izolirane proteine iz ektopičnega endometrija bolnic z OE, tkiva benignih cist in placente smo precipitirali z ledenim acetonom. Po dveurni inkubaciji pri -20°C smo proteine centrifugirali, usedlino pa resuspendirali v pufru (50 mM Trisa, pH 8,0, 60 mM natrijevega acetata, 0,02 % govejega serumskega albumina). Proteinom smo nato dodali hondroitinazo ABC (0,01 enote/20 µg proteinov) in vzorce čez noč inkubirali v vodni kopeli pri 37°C . Trideset µg tako pripravljenih proteinov smo ločili z gelsko elektroforezo, nato pa v vzorcih preverjali prisotnost glikozaminoglikanskih verig.

3.2.3 Vzorci krvi in peritonealne tekočine

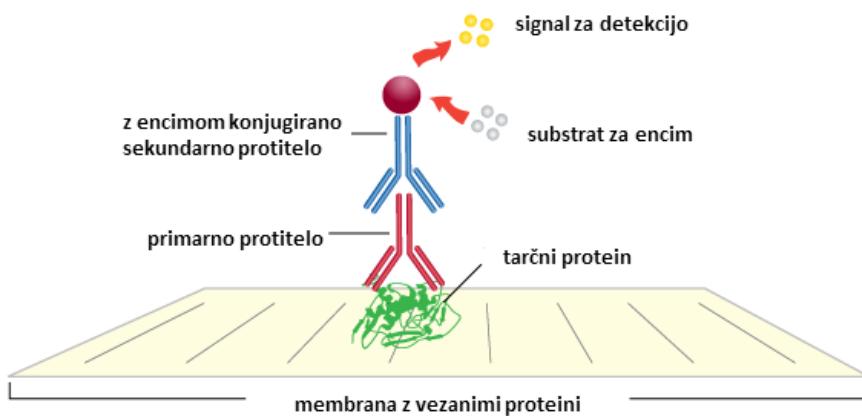
Vzorce krvi, ki smo jih prenesli z ginekološke klinike, smo centrifugirali pri 3000 g in sobni temperaturi, vzorce PF pa pri 200 g in 4°C . Vzorce serumata in PF smo nato alikvotirali in jih do analize shranili pri -80°C . V raziskavo smo vključili 99 ujemajočih se vzorcev serumata in PF. Prisotnost izbranih proteinov v vzorcih smo iskali z encimskoimunskimi testi.

3.3 UPORABLJENE METODE

3.3.1 Poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom, prenos Western in detekcija z ojačano kemiluminiscenco

Trideset µg izoliranih proteinov smo ločili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo z natrijevim dodecil sulfatom (SDS-PAGE). S to metodo proteine ločimo glede na molekulsko maso, saj večji proteini po matriksu poliakrilamidnega gela potujejo počasneje kot manjši, na potovanje pa vpliva tudi gostota gela. Za ločevanje naših proteinov smo uporabili 12% ločilni gel. Elektroforeza je potekala v elektroforeznem pufru (25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1-odstotni SDS, pH 8,3) približno 1 uro oz. dokler ni fronta barvila pripravovala do konca gelov, pri napetosti 200 V. Proteine smo nato iz gela prenesli na

PDVF membrano. Prenos proteinov je potekal 1 uro in 15 min v pufru za prenos (25 mM Tris, 192 mM glicin, 20-odstotni, pH 8,3), pri napetosti 100 V. Nespecifične vezave smo preprečili z 1-urnim blokiranjem v 5-odstotnem mleku v TBS pufru z dodanim 0,05-odstotni Tweenom. Membrano smo preko noči pri 4°C inkubirali v ustreznih primarnih protitelesih nato pa 2 uri pri sobni temperaturi v sekundarnih protitelesih. Izbrane proteine smo zaznali z ojačano kemiluminiscenco, na aparaturi »Fujifilm LAS4000 image reader« (Fujifilm, Japonska). Uporabili smo primarna protitelesa proti BGN (redčitev 1:1000) in PLA2G2A (redčitev 1:500) ter sekundarna kozja protitelesa proti mišjim ali zajčjim protitelesom, konjugirana s hrenovo peroksidazo (redčitev 1:5000). Za normalizacijo smo uporabili protitelesa proti GAPDH (redčitev 1:3000).



Slika 9: Potek prenosa Western in detekcije z ojačano kemiluminiscenco (Edwards, 2012)

Figure 9: Western blot and ECL detection (Edwards, 2012)

3.3.2 Encimskoimunski testi

Imunski testi so biokemijski testi za zaznavo ali kvantitativno določanje analitov, ki temeljijo na reakciji med antigenom in specifičnim protitelesom. Zanje je značilna izjemna specifičnost in občutljivost pa tudi preprostost izvedbe. Pri imunskeih testih spremljamo nastajanje kompleksov antigen – protitelo. Uporabljamо primarna in/ali sekundarna protitelesа, označena s fluorescenčnim barvilom, radioizotopi ali encimi. Najbolj znan encimskoimunski test je ELISA (ang. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

3.3.2.1 ELISA

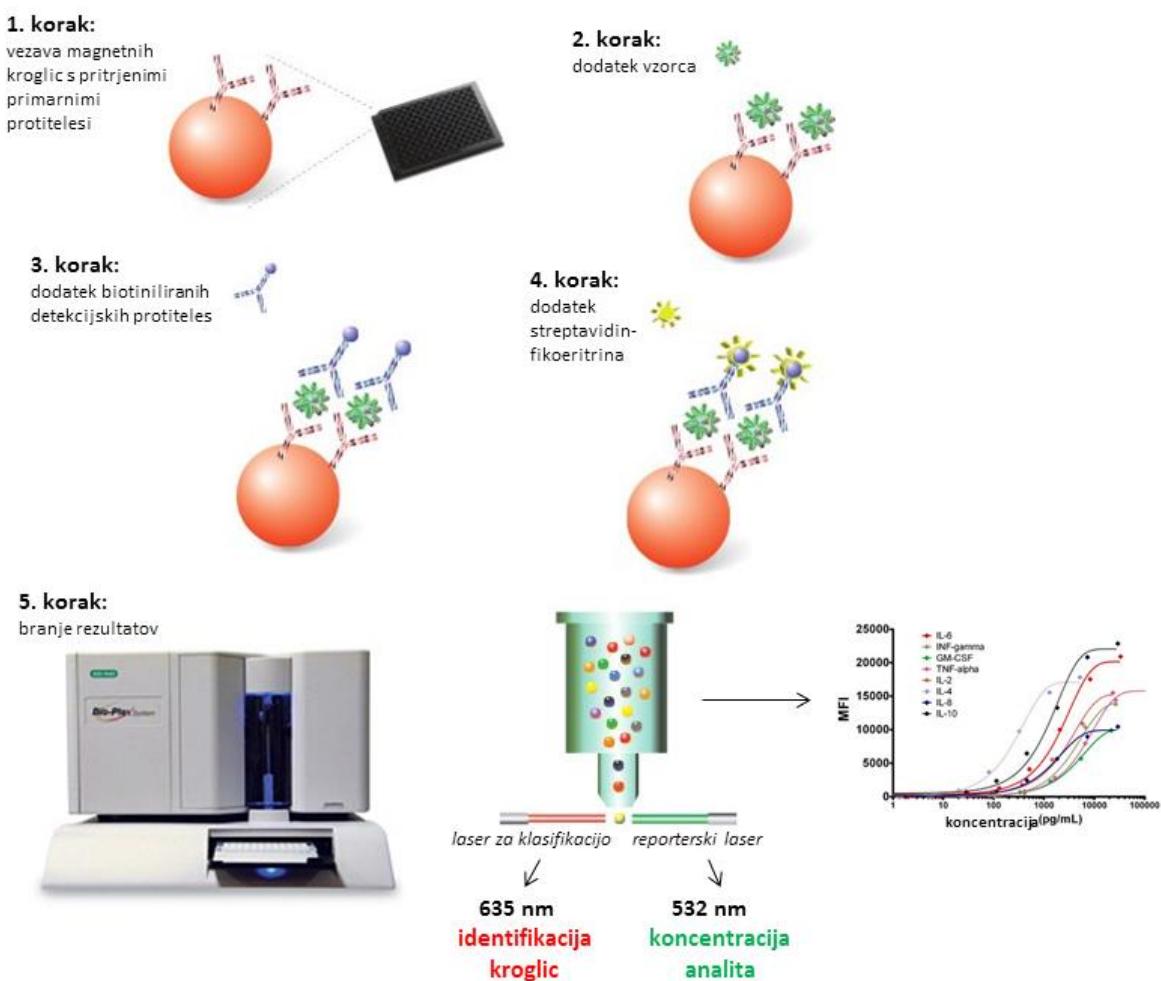
ELISA se pogosto uporablja tako v raziskavah kot v diagnostiki, saj je zelo specifična in cenovno primerena tehnika za določanje analitov. Poznamo več različnih izvedb metode ELISA, z ozirom na to, ali določamo prisotnost in koncentracijo specifičnih protiteles (posredni test ELISA) ali izbranih antigenov (sendvič ELISA). Če so specifična primarna protitelesa že konjugirana z encimom za detekcijo, uporabimo neposredni test ELISA.

Pri njem najprej na trdni nosilec vežemo znano protitelo za antigen, ki ga določamo. Sledi nanos vzorca in izpiranje nevezanih antigenov. V naslednjem koraku dodamo protitelesa, specifična za vezani antigen, ki so označena z encimom. Znova izpiramo in dodamo substrat, ki se ob prisotnosti encima pretvori vobarvan produkt. Pri posrednem testu ELISA začnemo z vezavo antiga, ki mu v naslednjem koraku dodamo vzorec s preiskovanimi protitelesi. Nato dodamo protitelesa, označena z encimom, ki se vežejo na že vezana protitelesa. Po izpiranju pa enako kot pri neposrednem testu ELISA dodamo substrat, ki se ob prisotnosti encima pretvori vobarvan produkt.

Metodo neposredne oz. sendvič ELISA smo uporabili za določevanje koncentracije izbranih bioloških označevalcev proteina BGN in PLA2G2A ter nekaterih citokinov oz. proteinov: fikolin-2, CRP (Wunder in sod., 2005), RANTES (Bersinger in sod., 2006), glikodelin-A (Kocbek in sod., 2013) in leptin (Wunder in sod., 2005), ki sodelujejo pri vnetnem procesu. Z radioimunskim testom (RIA), ki temelji na načelu tekmovanja med radioaktivno označenim in neoznačenim antigenom za omejeno količino protiteles, smo v serumu določili koncentracijo progesterona. Vzorcem s koncentracijo progesterone pod 5 ng/ml smo določili proliferativno fazo, nad 5 ng/ml pa sekretorno fazo menstrualnega cikla. Metodo smo izvedli v sodelovanju s prof. dr. Nickom A. Bersingerjem z Univerze v Bernu.

3.3.2.2 Metoda Bio-Plex

Metoda Bio-Plex omogoča kvantifikacijo več proteinskih bioloških označevalcev hkrati v kratkem času in v majhnem volumnu vzorcev. Temelji na magnetnih kroglicah, princip pa je podoben kot pri metodi sendvič ELISA. Specifična protitelesa proti izbranemu biološkemu označevalcu so kovalentno pripeta na magnetne kroglice in namenjena iskanju izbranih antigenov. Magnetne kroglice so označene fluorescenčno, vsaka ima svojo barvno kodo, kar omogoča ločevanje preko 100 različnih analitov na eni sami ploščici. Po seriji izpiranja, pri čemer odstranimo nevezane analite, dodamo biotinilirana detekcijska protitelesa proti izbranim antigenom, ki tvorijo kompleks z analitom. Na koncu dodamo streptavidin-fikoeritrin, ki je uporaben kot fluorescenčni indikator. Aparat Bio-Plex pomeri fluorescenco pri dveh različnih valovnih dolžinah: 635 in 532 nm; zaznavanje kroglic poteka pri valovni dolžini 635 nm, koncentracija analita, vezanega na magnetne kroglice, pa je proporcionalna mediani intenziteti fluorescence pri 532 nm in je podana v pg/ml. Metodo smo izvedli v sodelovanju s prof. dr. Nickom Bersingerjem, izmerili pa smo koncentracijo citokinov iz I. (IL-6, IL-8, IL-15, IP-10, MCP-1, VEGF) in II. skupine (IL-18, GRO-alfa, ICAM-1 in VCAM-1).



Slika 10: Shematski prikaz metode Bio-Plex (Bridges in Harris, 2011)
Postopek poteka v štirih korakih: 1) vezava magnetnih kroglic s kovalentno vezanimi primarnimi protitelesi, 2) dodatek vzorca, 3) dodatek biotiniliranih protiteles in streptavidin-fikoeritrin kompleksa in 4) merjenje fluorescence pri dveh različnih valovnih dolžinah

Figure 10: Schematic diagram of the Bio-Plex procedure (Bridges and Harris, 2011)
The process takes place in four steps: 1) binding of magnetic beads with covalently linked primary antibodies, 2) addition of the sample, 3) addition of biotinylated antibodies, and addition of streptavidin-phycocyanin complex and 4) measuring fluorescence at two different wavelengths

3.4 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Za obdelavo podatkov smo uporabili računalniški programa GraphPadPrism (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Rezultate smo izrazili kot povprečno vrednost \pm SEM oz. povprečno vrednost \pm SD. Za primerjavo izražanja genov in koncentracij izbranih bioloških označevalcev med bolnicami z OE in kontrolno skupino smo uporabili test Mann-Whitney, če smo med seboj primerjali tri skupine pa smo uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA), in sicer test Kruskal-Wallis. *P*-vrednosti, manjše od 0,05, smo določili kot mejo statistične značilnosti. Za primerjavo koncentracij med serumom in PF smo uporabili analizo Spearmanov korelačijski koeficient.

4 REZULTATI

4.1 ANALIZA PRISOTNOSTI IZBRANIH CITOKINOV IN DRUGIH PROTEINOV V SERUMU IN PF PREISKOVANE IN KONTROLNE SKUPINE

4.1.1 Rezultati analize z metodama ELISA in Bio-Plex

Koncentracijo izbranih citokinov in proteinov smo v serumu in PF določali z encimskoimunskimi testi. Z metodo ELISA smo v serumu in PF 99 žensk, ki smo jih vključili v raziskavo, izmerili koncentracijo 2 citokinov (fikolina-2 in RANTES) in preostalih proteinov (CRP, glikodelin-A in leptin). Preiskovana skupina je vključevala 57 bolnic s potrjeno diagnozo OE, kontrolna skupina pa 11 bolnic z benignimi cistami in 31 zdravih žensk, ki so se odločile za sterilizacijo. Z metodo Bio-Plex smo v 76 ujemajočih vzorcih seruma in PF (40 bolnic z OE, 8 bolnic z BC in 28 zdravih žensk) izmerili koncentracijo 10 citokinov (IL-6, IL-8, IL-15, IP-10, MCP-1, VEGF, IL-18, GRO- α , ICAM-1, VCAM-1).

Ugotovili smo, da imajo bolnice z OE v serumu statistično značilno povišano koncentracijo glikodelina-A v primerjavi z bolnicami z benignimi cistami in zdravimi ženskami. Koncentraciji leptina in IL-8 sta bili v preiskovani skupini statistično značilno znižani v primerjavi z zdravimi ženskami, ne pa tudi v primerjavi z bolnicami z benignimi cistami. Opazili smo, da imajo znotraj kontrolne skupine bolnice z benignimi cistami znižano koncentracijo leptina, IP-10 in ICAM-1 v primerjavi z zdravimi ženskami. Koncentracije IL-6, IL-18 in GRO- α so bile v vseh skupinah pod mejo zaznave. Pri ostalih možnih bioloških označevalcih sprememb v koncentraciji med preiskovano in kontrolno skupino nismo zaznali (Pregl. 3, Sl. 11).

V PF smo pri bolnicah z OE v primerjavi s kontrolno skupino opazili statistično značilno povišano koncentracijo glikodelina-A, IL-6 in IL-8. Koncentracija leptina je bila znižana, koncentracija MCP-1 pa povišana pri bolnicah z OE, vendar le v primerjavi s skupino zdravih žensk, ne pa tudi v primerjavi z bolnicami z benignimi cistami. Koncentracija RANTES je bila povišana pri bolnicah z OE v primerjavi z bolnicami z benignimi cistami. Opazili smo tudi, da imajo znotraj kontrolne skupine bolnice z benignimi cistami znižano koncentracijo leptina in povišano koncentracijo RANTES in ICAM-1 v primerjavi z zdravimi ženskami. Koncentracija GRO- α je bila v vseh skupinah pod mejo zaznave, pri ostalih preiskovanih proteinih pa nismo zaznali statistično značilnih sprememb (Pregl. 4, Sl. 11).

Preglednica 3: Koncentracije citokinov in drugih izbranih proteinov v serumu preiskovane in kontrolne skupine

Legenda: ZŽ – zdrave ženske, BC – bolnice z benignimi cistami, OE – bolnice z ovarijsko endometriozo, * - koncentracija v ng/ml

Table 3: Concentrations of cytokines and selected proteins in serum of case and control groups

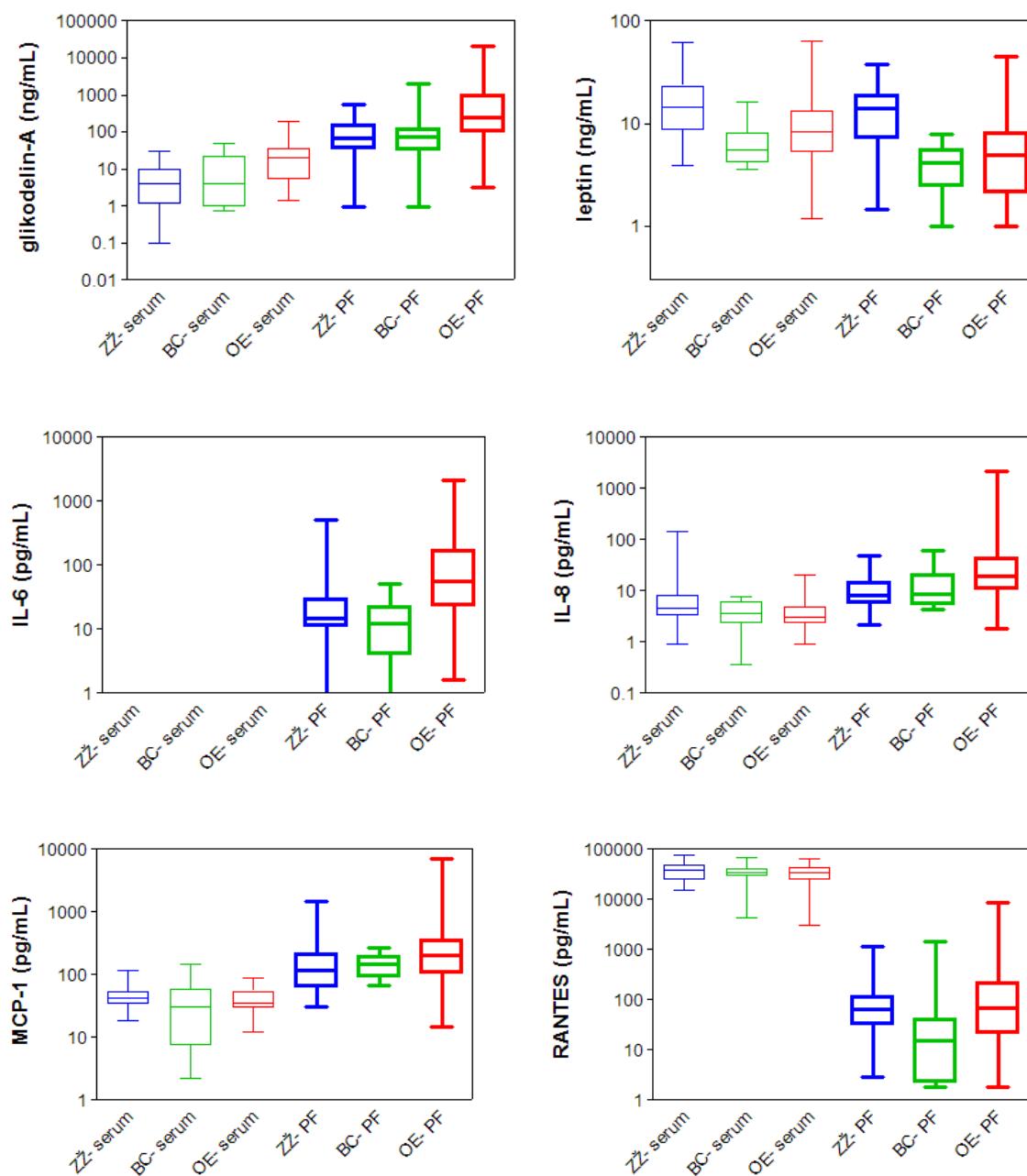
Legend: ZŽ – healthy women, BC – patients with benign cysts, OE – women with ovarian endometriosis, * - concentrations in ng/ml

	Koncentracija (pg/ml)			<i>p</i> -vrednosti			
	(povprečna vrednost ± SD)			(Mann-Whitney)		(ANOVA)	
Biološki označevalec	ZŽ	BC	OE	ZŽ vs. BC	ZŽ vs. OE	BC vs. OE	ZŽ vs. BC vs. OE
CRP*	2638 ± 3121	1712 ± 1509	4093 ± 11623	0,7669	0,3620	0,6894	0,6374
fikolin-2*	1466 ± 572,8	1341 ± 354,6	1584 ± 666,7	0,6965	0,5716	0,4145	0,6571
glikodelin-A*	6,77 ± 7,97	12,79 ± 16,16	32,96 ± 44,10	0,6621	P<0,0001	0,0242	P<0,0001
leptin	17,72 ± 13,5	6,97 ± 3,80	11,21 ± 10,96	0,0014	0,0044	0,1194	0,0014
RANTES	39494 ± 16141	34646 ± 15611	34808 ± 13795	0,4082	0,3015	0,8416	0,5277
IL-6	pod mejo detekcije	pod mejo detekcije	pod mejo detekcije	/	/	/	/
IL-8	10,57 ± 26,25	3,91 ± 2,46	4,06 ± 3,30	0,1427	0,0086	0,8900	0,0260
IL-15	pod mejo detekcije	pod mejo detekcije	pod mejo detekcije	/	/	/	/
IP-10	3125 ± 5052	1242 ± 305,8	1536 ± 591,4	0,0287	0,0625	0,1281	0,0313
MCP-1	48,81 ± 25,48	43,11 ± 46,87	42,08 ± 19,69	0,2307	0,2811	0,3986	0,3303
VEGF	104,9 ± 93,97	105,7 ± 103,0	73,59 ± 62,48	0,8385	0,2462	0,6096	0,4840
IL-18	71,5 ± 34,0	240,5 ± 531,7	66,4 ± 26,4	0,3815	0,4698	0,4468	0,5433
GRO-α	pod mejo detekcije	pod mejo detekcije	pod mejo detekcije	/	/	/	/
ICAM-1*	124,9 ± 31,5	110,1 ± 52,2	112,9 ± 26,1	0,0287	0,0855	0,2081	0,0488
VCAM-1*	134,0 ± 28,6	115,9 ± 31,5	125,3 ± 25,6	0,2617	0,2867	0,5337	0,3850

Preglednica 4: Koncentracije citokinov in drugih izbranih proteinov v PF preiskovane in kontrolne skupine
Legenda: ZŽ – zdrave ženske, BC – bolnice z benignimi cistami, OE – bolnice z ovarijsko endometriozo, * - koncentracija v ng/ml

Table 4: Concentrations of cytokines and selected proteins in PF of case and control groups
Legend: ZŽ – healthy women, BC – patients with benign cysts, OE – women with ovarian endometriosis, * - concentrations in ng/ml

	Koncentracija (pg/ml) (povprečna vrednost ± SD)			p-vrednosti			
	ZŽ	BC	OE	(Mann-Whitney)	(ANOVA)		
Biološki označevalci	ZŽ	BC	OE	ZŽ vs. BC	ZŽ vs. OE	BC vs. OE	ZŽ vs. BC vs. OE
CRP*	793,9 ± 1350	341,8 ± 2740	774,8 ± 1664	0,6066	0,3501	0,9738	0,6358
fikolin-2*	278,4 ± 138,7	303,4 ± 176,6	244,2 ± 178,6	0,6678	0,1480	0,1982	0,2105
glikodelin-A*	120,3 ± 136,5	286,3 ± 592,8	1859 ± 4173	0,7421	P<0,0001	0,0143	P<0,0001
leptin	14,23 ± 8,24	4,13 ± 1,98	6,69 ± 7,27	0,0001	P<0,0001	0,4025	P<0,0001
RANTES	131,8 ± 222,1	151,7 ± 444,5	409,7 ± 1223	0,0032	0,7995	0,0083	0,0140
IL-6	51,7 ± 113,5	18,1 ± 16,2	169,7 ± 369,7	0,4705	0,0015	0,0106	0,0011
IL-8	12,85 ± 11,46	15,87 ± 19,04	102,9 ± 356,0	0,9393	0,0005	0,0320	0,0010
IL-15	20,1 ± 16,3	40,2 ± 31,3	16,5 ± 11,1	0,0810	0,5233	0,0527	0,1118
IP-10	26536 ± 70403	9356 ± 4014	11316 ± 11193	0,3919	0,0987	0,6883	0,2321
MCP-1	239,5 ± 367,3	151,5 ± 64,5	445,1 ± 1134	0,4581	0,0222	0,1983	0,0505
VEGF	116,2 ± 65,9	127,2 ± 72,8	173,3 ± 219,7	0,6234	0,8131	0,9229	0,9196
IL-18	103,3 ± 59,1	138,9 ± 94,2	117,5 ± 69,7	0,2307	0,3069	0,5896	0,3958
GRO-α	pod mejo detekcije	pod mejo detekcije	pod mejo detekcije	/	/	/	/
ICAM-1*	48,9 ± 33,8	71,0 ± 32,6	58,1 ± 36,5	0,0347	0,2105	0,2509	0,1083
VCAM-1*	67,0 ± 40,0	79,4 ± 29,8	74,7 ± 46,1	0,1768	0,3865	0,4468	0,3747



Slika 11: Koncentracije citokinov in drugih izbranih proteinov v serumu in PF zdravih žensk, bolnic z benignimi cistami in bolnic z ovarijsko endometriozo

Legenda: ZŽ – zdrave ženske, BC – bolnice z benignimi cistami, OE – bolnice z ovarijsko endometriozo

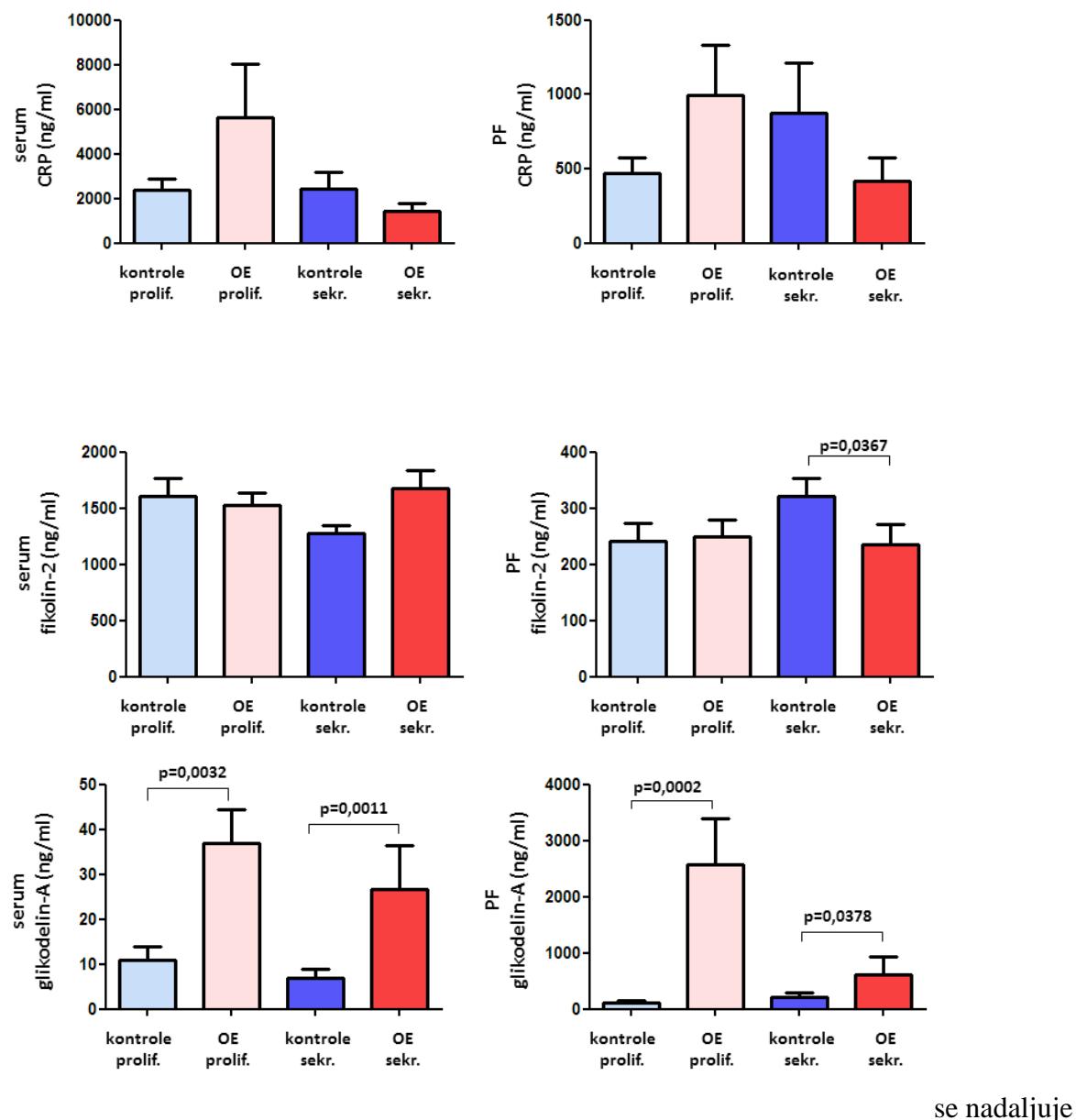
Figure 11: Concentrations of cytokines and selected proteins in serum and PF of healthy women, women with benign cysts and women with ovarian endometriosis

Legend: ZŽ – healthy women, BC – patients with benign cysts, OE – patients with ovarian endometriosis

4.1.1.1 Analiza koncentracije citokinov in drugih izbranih proteinov glede na fazo menstrualnega cikla

V naslednjem koraku nas je zanimalo, ali se koncentracija izbranih citokinov in proteinov spreminja s fazo menstrualnega cikla. Zaradi majhnega števila vzorcev smo pri tej analizi kontrolni skupini združili.

Koncentracija fikolina-2 v PF je bila pri bolnicah z OE v primerjavi s kontrolno skupino v sekretorni fazi znižana. Pri glikodelinu-A smo opazili statistično značilno povišano koncentracijo pri bolnicah z OE v serumu in PF v obeh fazah menstrualnega cikla, prav tako pri IL-6, vendar le v PF. Koncentracija leptina je bila pri preiskovani skupini znižana v serumu in PF, vendar le v proliferativni fazi. Pri preiskovani skupini bolnic z OE smo opazili statistično značilno povišanje koncentracije leptina v serumu v sekretorni fazi v primerjavi s proliferativno. Koncentracija IL-8 v serumu je bila pri bolnicah z OE v sekretorni fazi znižana, v nasprotju s tem pa je bila v PF pri preiskovani skupini povišana v proliferativni fazi. V PF pa smo opazili višjo koncentracijo IP-10 v proliferativni in nižjo v sekretorni fazi. Pri preiskovani skupini smo izmerili nižjo koncentracijo IL-15 v proliferativni fazi. Pri proteinih CRP, RANTES, MCP-1, VEGF, IL-18, ICAM-1, VCAM-1 nismo opazili statistično značilnih sprememb v koncentracijah med proliferativno in sekretorno fazo menstrualnega cikla niti v serumu niti v PF (Sl. 12).

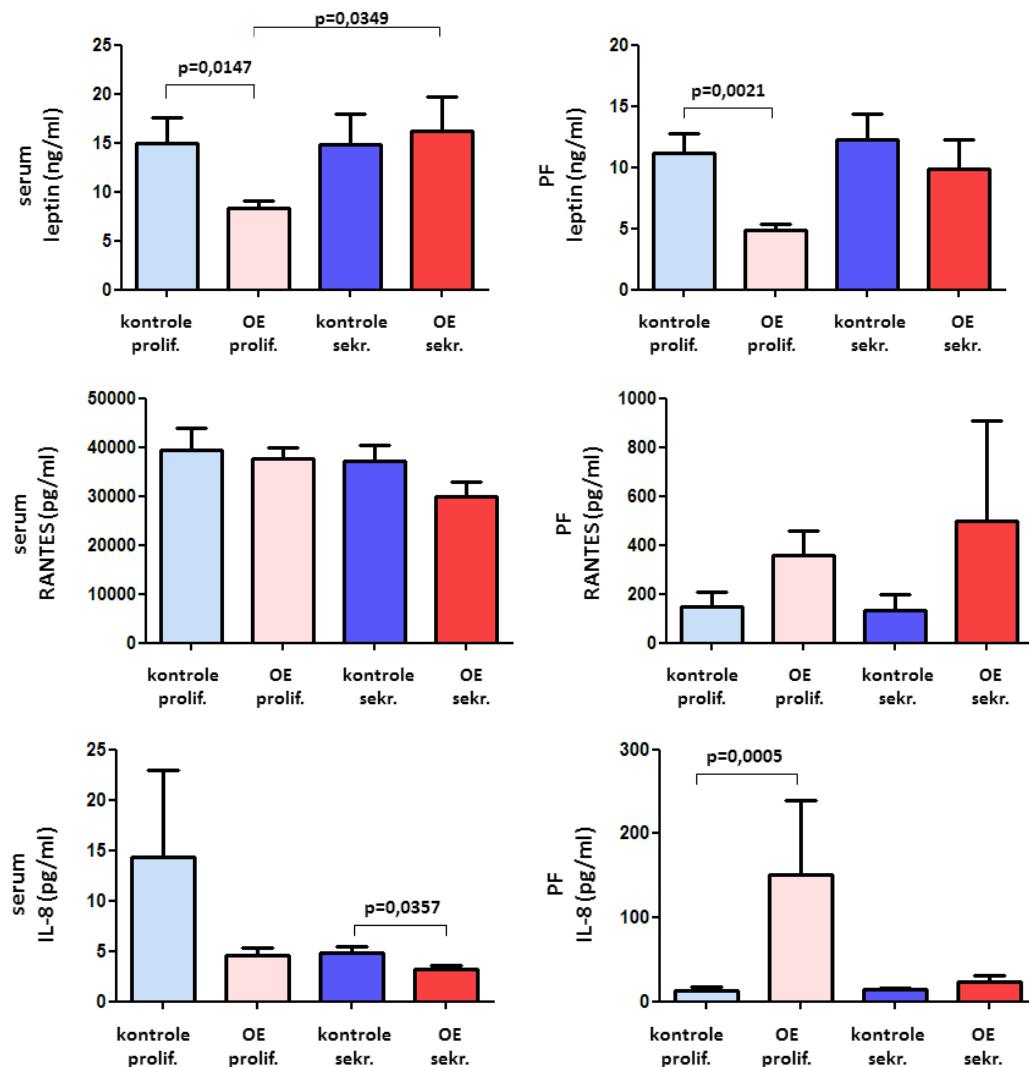


se nadaljuje

Slika 12: Primerjava koncentracij citokinov in drugih izbranih proteinov v serumu in PF, v proliferativni in sekretorni fazi menstrualnega cikla, med preiskovano in kontrolno skupino
Legenda: prolif. – proliferativna faza; sekr. – sekretorna faza; OE – bolnice z ovarijsko endometriozo

Figure 12: Comparison of concentration of selected cytokines and other proteins in serum and PF of case and control groups in the proliferative and secretory phase of the menstrual cycle
Legend: prolif. – proliferative phase; sekr. – secretory phase; OE – patients with ovarian endometriosis

nadaljevanje

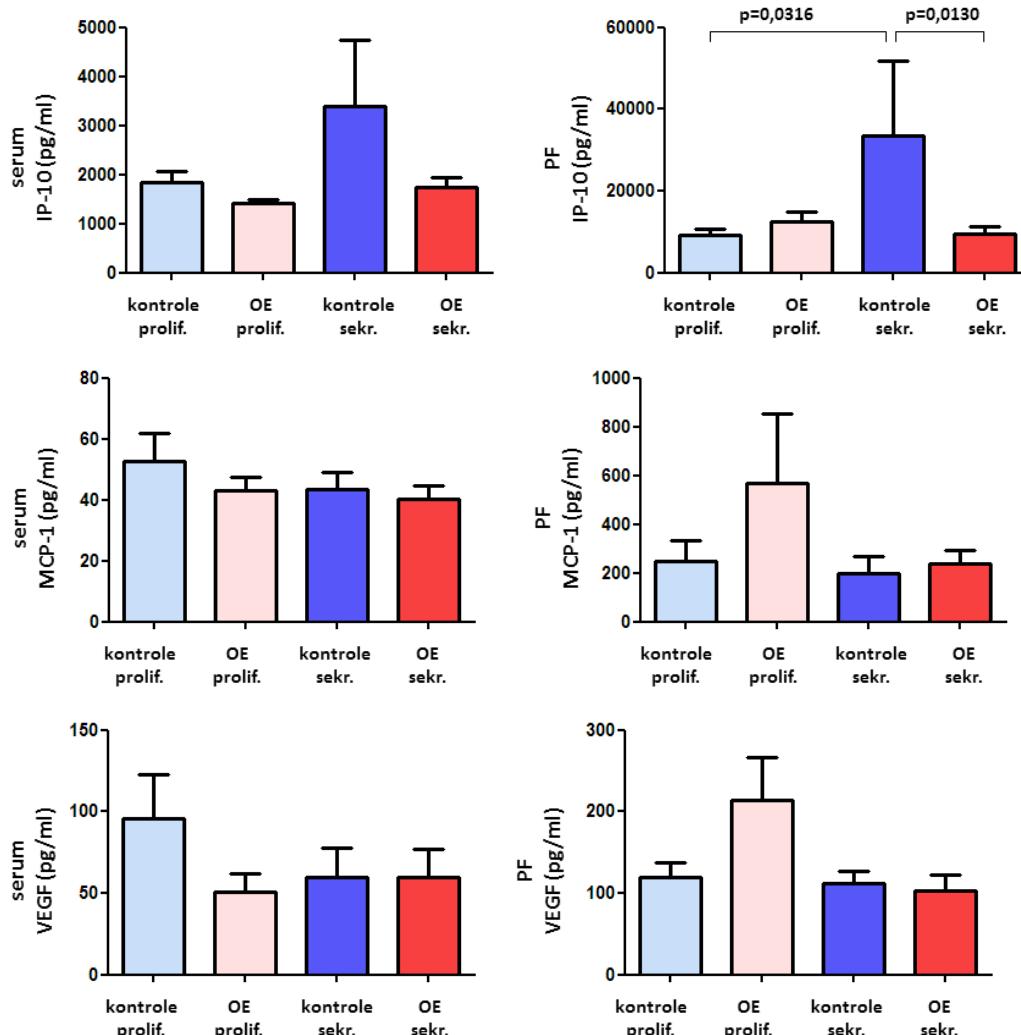


se nadaljuje

Slika 12: Primerjava koncentracij citokinov in drugih izbranih proteinov v serumu in PF, v proliferativni in sekretorni fazi menstrualnega cikla, med preiskovano in kontrolno skupino
Legenda: prolif. – proliferativna faza, sekr. – sekretorna faza, OE – bolnice z ovarijsko endometriozo

Figure 12: Comparison of concentration of selected cytokines and other proteins in serum and PF of case and control groups in the proliferative and secretory phase of the menstrual cycle
Legend: prolif. – proliferative phase, sekr. – secretory phase, OE – patients with ovarian endometriosis

nadaljevanje



se nadaljuje

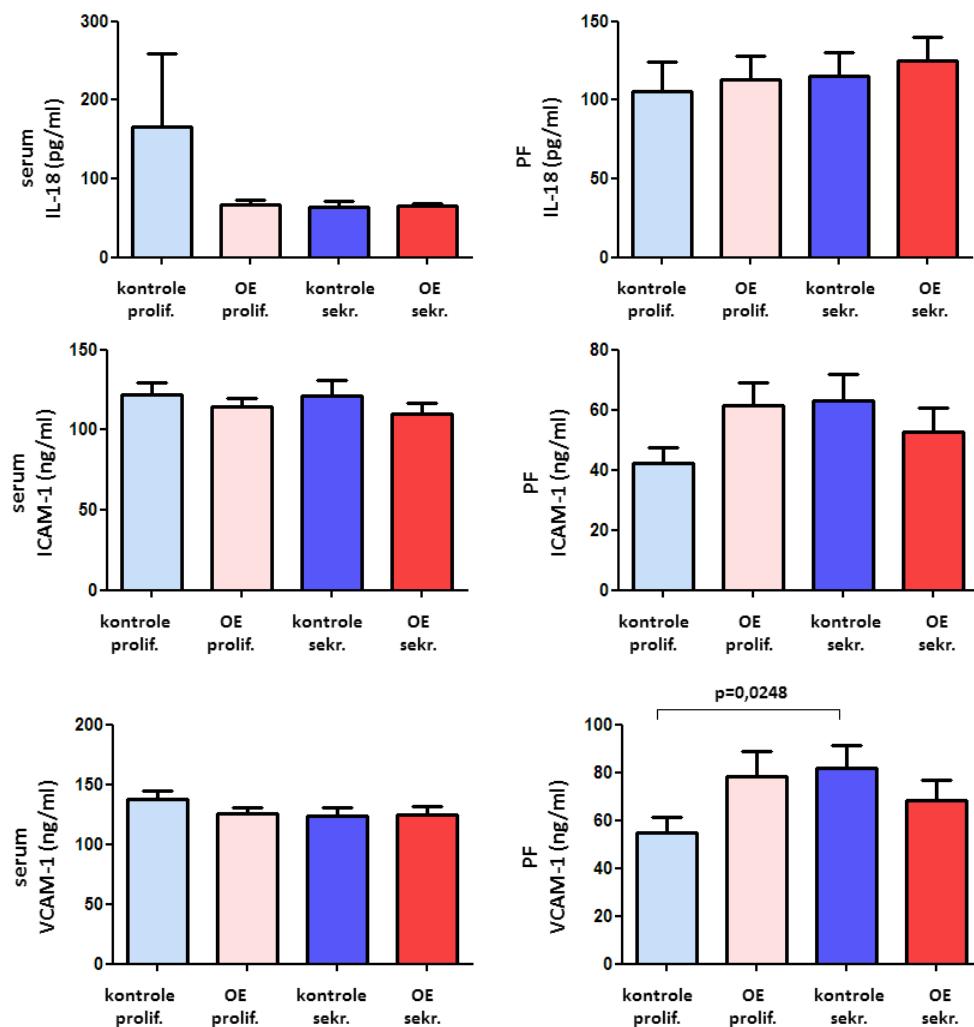
Slika 12: Primerjava koncentracij citokinov in drugih izbranih proteinov v serumu in PF, v proliferativni in sekretorni fazi menstrualnega cikla, med preiskovano in kontrolno skupino

Legenda: prolif. – proliferativna faza, sekr. – sekretorna faza, OE – bolnice z ovarijsko endometriozo

Figure 12: Comparison of concentration of selected cytokines and other proteins in serum and PF of case and control groups in the proliferative and secretory phase of the menstrual cycle

Legend: prolif. – proliferative phase, sekr. – secretory phase, OE – patients with ovarian endometriosis

nadaljevanje

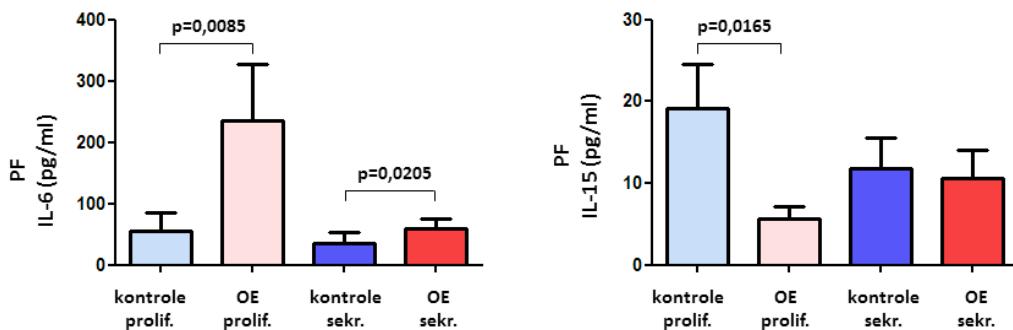


se nadaljuje

Slika 12: Primerjava koncentracij citokinov in drugih izbranih proteinov v serumu in PF, v proliferativni in sekretorni fazi menstrualnega cikla, med preiskovano in kontrolno skupino
Legenda: prolif. – proliferativna faza, sekr. – sekretorna faza, OE – bolnice z ovarijsko endometriozo

Figure 12: Comparison of concentration of selected cytokines and other proteins in serum and PF of case and control groups in the proliferative and secretory phase of the menstrual cycle
Legend: prolif. – proliferative phase, sekr. – secretory phase, OE – patients with ovarian endometriosis

nadaljevanje

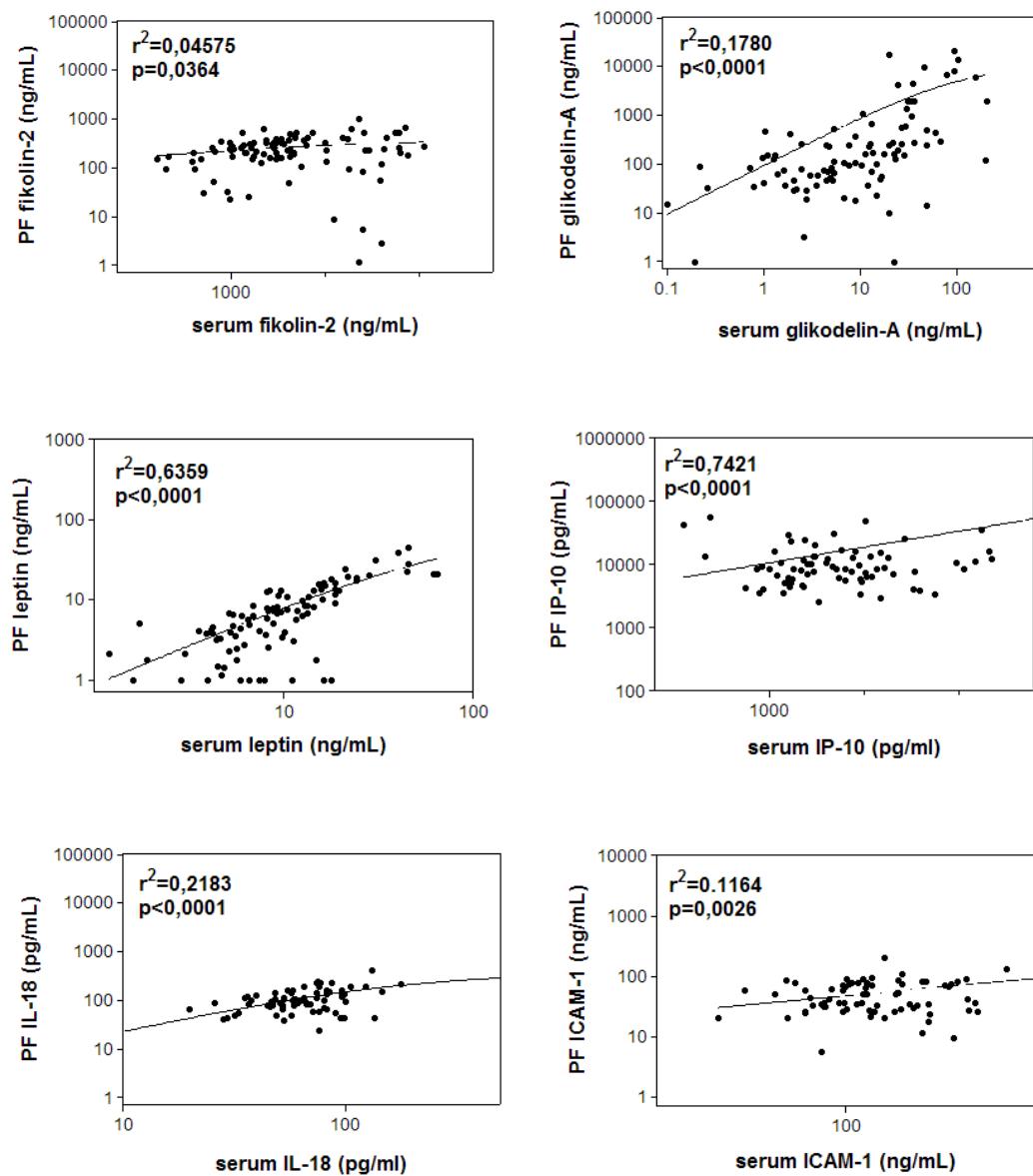


Slika 12: Primerjava koncentracij citokinov in drugih izbranih proteinov v serumu in PF, v proliferativni in sekretorni fazi menstrualnega cikla, med preiskovano in kontrolno skupino
Legenda: prolif. – proliferativna faza, sekr. – sekretorna faza, OE – bolnice z ovarijsko endometriozo

Figure 12: Comparison of concentration of selected cytokines and other proteins in serum and PF of case and control groups in the proliferative and secretory phase of the menstrual cycle
Legend: prolif. – proliferative phase, sekr. – secretory phase, OE – patients with ovarian endometriosis

4.1.1.2 Analize povezave med koncentracijami citokinov in drugih izbranih proteinov v serumu in PF

Analiza povezave citokinov in drugih proteinov je razkrila, da koncentracije fikolina-2, glikodelina-A, leptina, IP-10, IL-10, IL-18 in ICAM-1 v serumu statistično značilno korelirajo s koncentracijami v PF (Sl. 13).



Slika 13: Statistično značilne povezave med koncentracijami nekaterih citokinov in izbranih proteinov v serumu in PF

Figure 13: Statistically significant association between serum and PF concentrations of some cytokines and other selected proteins

4.1.1.3 Analiza povezave med koncentracijami citokinov in drugih izbranih proteinov v serumu in PF in bolečinami

Preverili smo, ali je koncentracija izbranih citokinov in proteinov v serumu in PF povezana s prisotnostjo bolečin. Preiskovane osebe smo razdelili glede na odgovore v anketnih vprašalnikih. Pri analizi intenzivnosti in pogostosti menstrualnih bolečin ter bolečinah med spolnimi odnosi smo jih razdelili (poglavje 3.1.1) v tri skupine (skupina 1: 1; skupina 2: 2+3; skupina 3: 4+5). Izsledke smo analizirali z metodo ANOVA. Pri analizi bolečin med iztrebljanjem ali uriniranjem ter slabostjo ali bruhanjem smo preiskovane osebe združili v dve skupini (skupina 1: 1; skupina 2: 2+3+4+5), prav tako pri kroničnih bolečinah v medenici (skupina 1: ne; skupina 2: da). Za analizo smo uporabili test Mann-Whitney. Rezultati izračunov vseh šestih tipov bolečin so zbrani v Pregl. 5.

Ugotovili smo, da je intenzivnost menstrualnih bolečin povezana s koncentracijo glikodelina-A tako v serumu kot v PF, s koncentracijo VEGF v serumu ter s koncentracijo IL-6, MCP-1 in IL-18 v PF. Pogostost menstrualnih bolečin je povezana s koncentracijami proteinov CRP, glikodelin-A, leptin, IL-6, IL-8 ter MCP-1 v PF in VEGF v serumu. Znižana koncentracija leptina in povišana koncentracija VCAM-1 v PF sta v povezani z bolečinami med spolnimi odnosi, povišana koncentracija VEGF v PF pa z bolečinami med iztrebljanjem ali uriniranjem. Kronične bolečine v medenici so povezane s povišanimi koncentracijami glikodelina A, IL-6, IL-8, ICAM-1 in VCAM-1 v PF. Slabost ali bruhanje ni povezano s koncentracijo nobenega izmed preiskovanih proteinov.

Preglednica 5: Rezultati statistične analize povezave med koncentracijo citokinov in izbranih proteinov v serumu in PF ter prisotnostjo bolečin
Podane so *p*-vrednosti

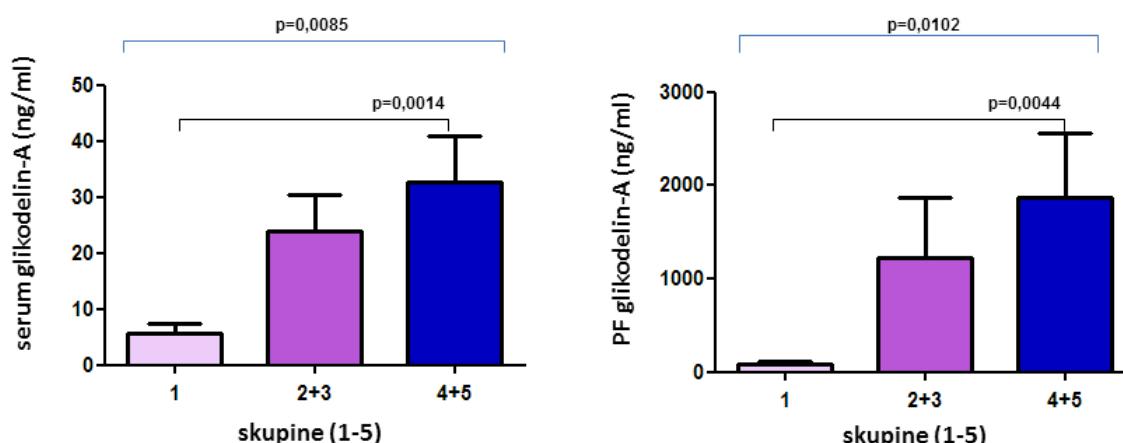
Table 5: The results of the statistical analysis of associations between concentrations of cytokines and selected proteins in serum and PF and the presence of pain
The *p*-values are represented

Biološki označevalec		<i>Intenz. menstr. bolečin</i>	<i>Pogostost menstr. bolečin</i>	<i>Bolečine med spolnimi odnosi</i>	<i>Bolečine med iztrebljanjem ali uriniranjem</i>	<i>Slabost ali bruhanje</i>	<i>Kronične bolečine v medenici</i>
CRP	<i>Serum</i>	0,4977	0,2433	0,3404	0,8239	0,2874	0,7911
	<i>PF</i>	0,2621	0,0415	0,6261	0,5842	0,5696	0,2497
fikolin-2	<i>Serum</i>	0,5882	0,1628	0,1419	0,2945	0,7596	0,3281
	<i>PF</i>	0,3105	0,8906	0,2894	0,0654	0,7014	0,2626
glikodelin-A	<i>Serum</i>	0,0085	0,0660	0,4495	0,2753	0,2599	0,0786
	<i>PF</i>	0,0102	0,0020	0,0578	0,1579	0,7577	0,0075
leptin	<i>Serum</i>	0,5410	<i>0,0867</i>	0,1116	0,5928	0,7884	0,8995
	<i>PF</i>	0,1915	0,0224	0,0145	<i>0,0948</i>	0,7744	0,1544
RANTES	<i>Serum</i>	0,8146	0,3052	0,4613	0,6197	0,5468	0,7848
	<i>PF</i>	0,2760	0,1238	0,3422	0,4398	0,8325	0,3734
IL-6	<i>Serum</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>PF</i>	0,0320	0,0213	0,4073	0,4923	0,3753	0,0027
IL-8	<i>Serum</i>	0,7801	0,6476	0,8623	<i>0,0843</i>	0,9590	0,1162
	<i>PF</i>	0,0868	0,0212	0,3125	0,8402	0,5164	0,0003
IL-15	<i>Serum</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>PF</i>	0,6666	<i>0,0639</i>	0,2382	<i>0,0705</i>	0,9275	<i>0,0807</i>
IP-10	<i>Serum</i>	0,5499	<i>0,0979</i>	0,1180	0,8011	0,9232	0,6742
	<i>PF</i>	0,9194	0,9086	0,5495	0,5580	0,8775	0,4339
MCP-1	<i>Serum</i>	0,2797	<i>0,0604</i>	0,1531	0,3511	0,5938	0,1008
	<i>PF</i>	0,0187	0,0141	0,2459	0,7290	0,4561	0,1718
VEGF	<i>Serum</i>	0,0031	0,0233	0,8539	0,2716	0,6817	0,7005
	<i>PF</i>	0,8584	0,5859	0,3180	0,0307	0,3753	0,7972
IL-18	<i>Serum</i>	0,3712	0,6776	0,8479	0,9297	<i>0,0961</i>	0,8609
	<i>PF</i>	0,0221	0,1492	0,7003	0,3075	0,2271	0,2245
GRO-α	<i>Serum</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>PF</i>	/	/	/	/	/	/
ICAM-1	<i>Serum</i>	0,7578	0,4564	0,8248	0,9147	0,5459	0,7748
	<i>PF</i>	0,9652	0,8342	0,2669	0,4164	0,5983	0,0023
VCAM-1	<i>Serum</i>	0,4878	0,1837	0,1300	0,1527	0,1027	0,4408
	<i>PF</i>	0,3678	0,4639	0,0421	0,2542	0,7432	0,0058

4.1.2 Glikodelin-A

Med izbranimi citokini in drugimi proteini se je kot obetajoči biološki označevalcev izkazal glikodelin-A, zato smo se odločili, da ga podrobnejše preučimo (Kocbek in sod., 2013). Opazili smo, da imajo bolnice z OE v primerjavi s kontrolno skupino povišano koncentracijo glikodelina-A tako v serumu kot PF, razlik v koncentraciji glikodelina-A v kontrolni skupini pa nismo zaznali (Pregl. 3, Sl. 11). Čeprav je znano, da se koncentracija glikodelina-A močno spreminja z menstrualnim ciklom, pa naši izsledki raziskave kažejo, da je pri bolnicah z OE v serumu in PF povišan tako v proliferativni kot sekretorni fazi menstrualnega cikla (Sl. 12). Opazili smo tudi povezavo med koncentracijama glikodelina-A v serumu in PF, koncentracije glikodelina-A v PF pa so bile več kot 10-krat višje kot serumu (Sl. 13).

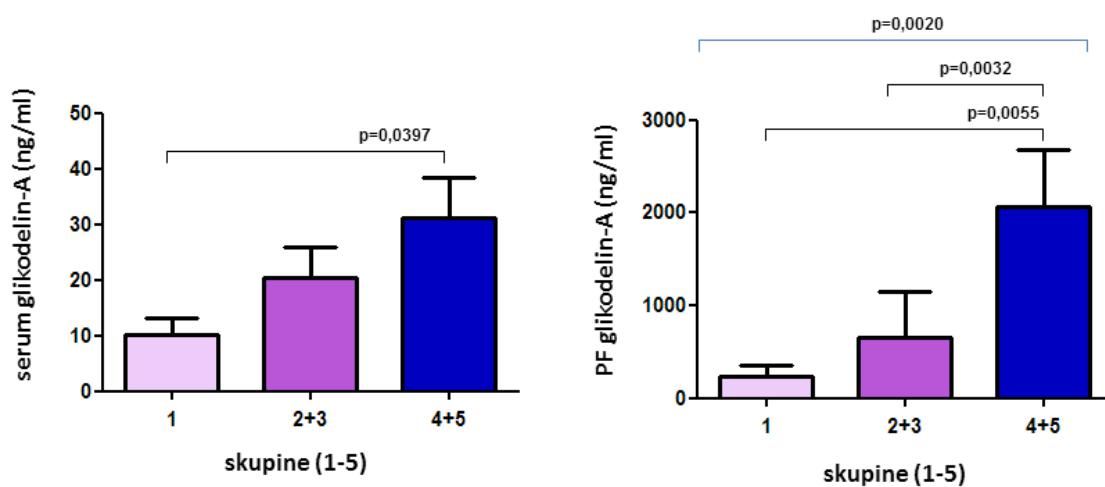
Primerjava koncentracije glikodelina-A v povezavi s prisotnostjo bolečin (Pregl. 5) je razkrila, da je povišana koncentracija tega proteina v serumu in PF v povezavi z intenzivnostjo (Sl. 14) in pogostostjo menstrualnih bolečin (Sl. 15) ter s kroničnimi bolečinami v medenici, vendar je bila pri slednji statistično značilna povezava le v PF (Sl. 16).



Slika 14: Koncentracija glikodelina-A v serumu in PF v povezavi z intenzivnostjo menstrualnih bolečin
Zgornja *p*-vrednost predstavlja primerjavo med 3 skupinami (analiza ANOVA), ostale *p*-vrednosti predstavljajo primerjavo med dvema skupinama (test Man-Whitney)

Figure 14: Glycodelin-A concentrations in serum and peritoneal fluid in relation to intensity of menstrual pain

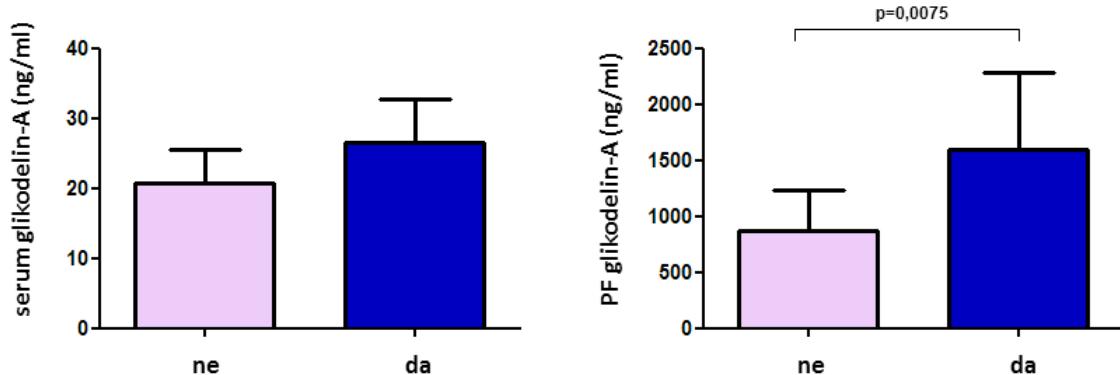
The *p*-values in the top line represent the comparison between all 3 groups (ANOVA), the others represent comparison between two individual groups (Mann-Whitney test)



Slika 15: Koncentracija glikodelina-A v serumu in PF v povezavi s pogostostjo menstrualnih bolečin
Zgornja p -vrednost predstavlja primerjavo med 3 skupinami (analiza ANOVA), med tem ko ostale p -vrednosti predstavljajo primerjavo med dvema skupinama (test Man-Whitney)

Figure 15: Glycodelin-A concentrations in serum and peritoneal fluid in relation to frequency of menstrual pain

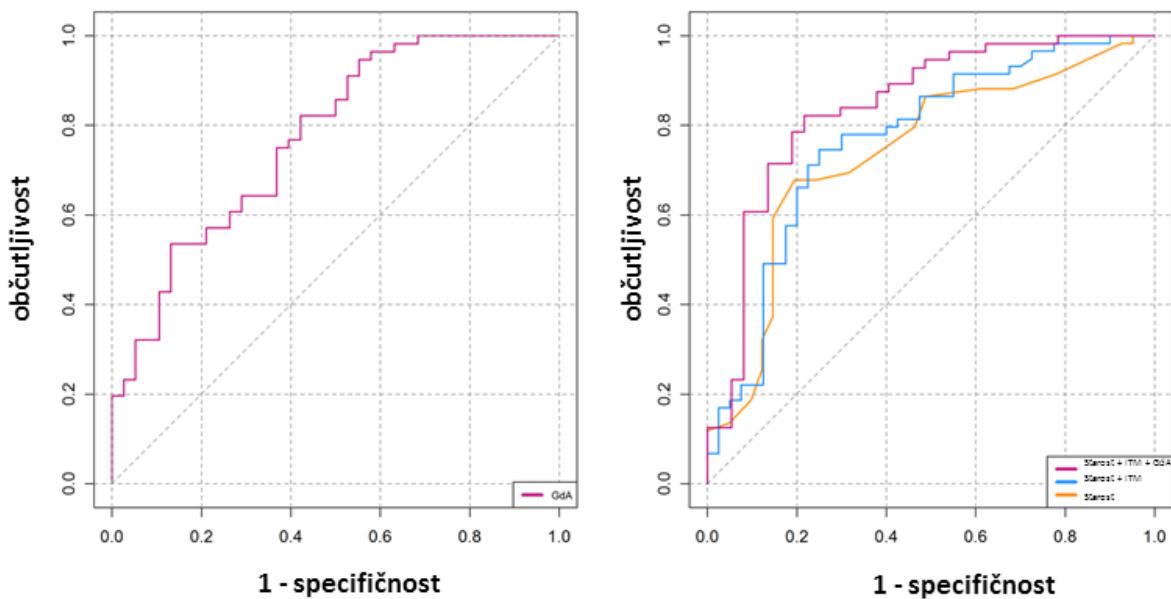
The p -values in the top line represent the comparison between all 3 groups (ANOVA), the others represent comparison between two individual groups (Mann-Whitney test)



Slika 16: Koncentracija glikodelina-A v serumu in PF v povezavi s kroničnimi bolečinami v medenici
Primerjava med dvema skupinama je bila narejena s testom Man-Whitney

Figure 16: Glycodelin-A concentrations in serum and PF in relation to chronic pelvic pain
The comparison between two groups was analysed by Man-Whitney test

Izračunali smo tudi specifičnost in občutljivost proteina glikodelin-A kot možnega biološkega označevalca OE. Kot mejno vrednost v serumu smo izbrali koncentracijo glikodelina-A 5,28 ng/ml in izračunali občutljivost 82,1 % in specifičnost 78,4 % (Sl. 17), v PF smo izbrali koncentracijo 204,68 ng/ml in izračunali občutljivost 79,7 % in specifičnost 77,5 % (Sl. 18).



Slika 17: Specifičnost in občutljivost glikodelina-A kot možnega biološkega označevalca ovarijske endometrioze v serumu v kombinaciji s starostjo in ITM

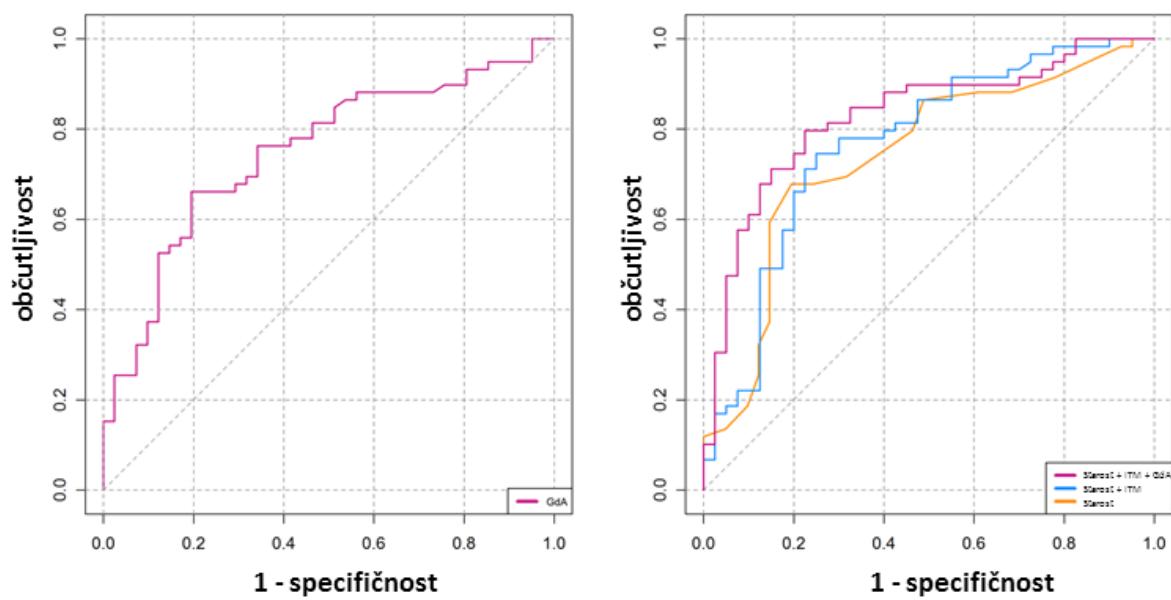
Legenda:

- starost + ITM + glikodelin-A
- starost + ITM
- starost

Figure 17: Specificity and sensitivity of glycodelin-A as potential biomarker for ovarian endometriosis in serum in combination with age and BMI

Legend:

- Age + BMI + glycodelin-A
- Age + BMI
- Age



Slika 18: Specifičnost in občutljivost glikodelina-A kot možnega biološkega označevalca ovarijske endometrioze v PF v kombinaciji s starostjo in ITM
Legenda:

— starost + ITM + glikodelin-A
— starost + ITM
— starost

Figure 18: Specificity and sensitivity of glycodelin-A as potential biomarker for ovarian endometriosis in PF in combination with age and BMI

Legend:

— Age + BMI + glycodelin-A
— Age + BMI
— Age

4.2 ANALIZA IZRAŽANJA BIGLIKANA NA RAVNI PROTEINOV

4.2.1 Analiza prisotnosti proteina BGN v vzorcih tkiv

Z metodo prenosa Western in detekcijo z ojačano kemiluminiscenco smo v 18 vzorcih ektopičnega endometrija bolnic z OE zaznali BGN z molekulsko maso okoli 42 kDa, v enem vzorcu pa je bila količina BGN pod mejo zaznave. V nasprotju s tem proteina BGN nismo zaznali v 18 od 19 vzorcev NE zdravih žensk, le v enem smo zaznali šibko liso (Pregl. 6, Sl. 19). V večini vzorcev ektopičnega endometrija smo opazili tudi lise z večjo molekulsko maso (med 100 in 250 kDa), ki so najverjetneje glikozilirana oblika proteina BGN. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili rekombinantni protein BGN in proteine iz tkiva placente.

Preglednica 6: Rezultati analize prisotnosti proteina BGN v vzorcih tkiv in podatki posameznih bolnic
Legenda: E – vzorci ektopičnega endometrija bolnic z OE; NE – vzorci evtopičnega endometrija zdravih žensk; C – vzorci benignih cist; PE – vzorci evtopičnega endometrija bolnic s PE; NED – vzorci evtopičnega endometrija bolnic s kroničnimi bolečinami v medenici; SI – intenzivnost signala pri zaznavanju proteina BGN; RAFS – faze endometrioze; P – proliferativna faza; S – sekretorna faza; OE – ovarijska endometriozis; PE – peritonealna endometriozis; DIE – globoka infiltrativna endometriozis; - ni signala; + šibek signal; ++ močan signal; +++ zelo močan signal

Table 6: Results of the analysis of the BGN protein presence in tissue samples together with characteristics of individual patients

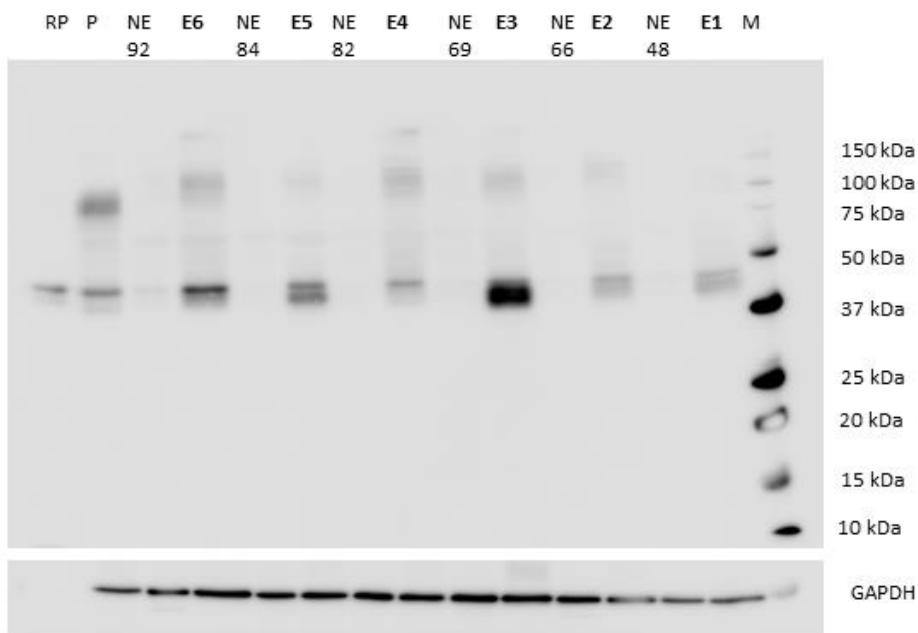
Legend: E – ectopic endometrium of ovarian endometriosis patients; NE – eutopic endometrium of healthy controls; C – samples of benign cysts; PE – eutopic endometrium of peritoneal endometriosis patients; NED – ectopic endometrium of patients with chronic pelvic pain; SI – Signal Intensity; RAFS – disease phases; P – proliferative phase; S – secretory phase; OE – ovarian endometriosis; PE – peritoneal endometriosis; DIE – deep infiltrating endometriosis; - no signal; + weak signal; ++ strong signal; +++ very strong signal

Ektopični endometrij bolnic z OE										
vzorec	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E16	E18	E19	E21
SI	++	++	+++	++	++	+++	+++	+++	+	++
starost (leta)	33	43	38	40	44	29	30	44	27	34
faza cikla	S	P	S	P	S	P	P	P	P	P
tip endo.	OE PE	OE PE DIE	OE PE	OE DIE	OE PE	OE PE	OE	OE	OE	OE
RAFS (faza)	III	III	III	IV	III	III	IV	III	II	III

se nadaljuje

nadaljevanje Pregl. 6: Rezultati analize prisotnosti proteina BGN v vzorcih tkiv in podatki posameznih bolnic

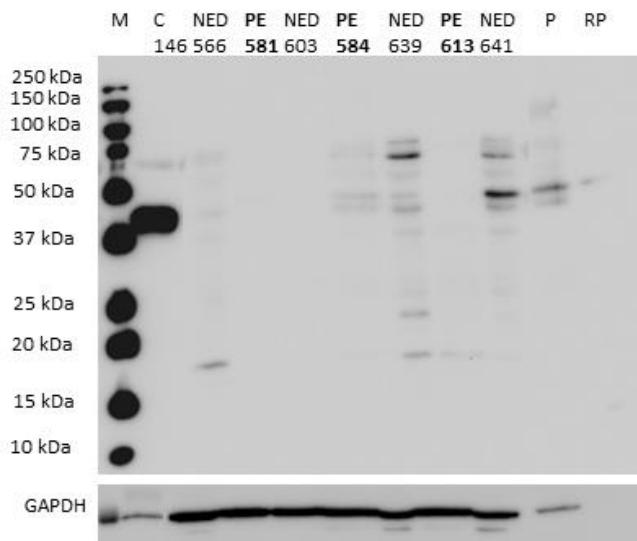
Ektopični endometrij bolnic z OE										
vzorec	E22	E23	E24	E25	E26	E29	E45	E54	E68	/
SI	++	+	++	+	++	-	++	+++	+++	
starost (leta)	32	27	36	33	28	39	25	31	28	
faza cikla	S	S	P	P	P	P	P	P	P	
tip endo.	OE	OE	OE	OE	OE	OE	OE	OE	OE	
RAFS (faza)	III	III	III	IV	III	IV	IV	I	IV	
Evtopični endometrij zdravih žensk										
vzorec	NE 41	NE 42	NE 45	NE 46	NE 47	NE 48	NE 49	NE 51	NE 55	NE 56
SI	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
starost (leta)	44	45	36	37	36	37	42	39	42	44
faza cikla	P	P	P	P	P	P	P	S	P	S
vzorec	NE 60	NE 66	NE 69	NE 81	NE 82	NE 84	NE 89	NE 92	NE 95	/
SI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
starost (leta)	40	45	41	45	44	42	37	39	40	
faza cikla	P	S	S	S	S	S	P	P	P	
Vzorci benignih cist										
vzorec	C104	C106	C120	C145	C146	C149	C153	C173	C179	
SI	+++	/	++	+++	+++	+	+	+	++	
starost (leta)	49	42	28	26	46	27	49	34	43	
faza cikla	P	S	S	P	P	P	P	S	S	
Evtopični endometrij bolnic s PE										
vzorec	PE 578	PE 581	PE 584	PE 613	NED 566	NED 603	NED 639	NED 641		
SI	-	-	-/+	-	-	-	+	+		
starost (leta)	36	48	37	38	38	35	33	40		
faza cikla	S	P	P	S	S	P	S	P		



Slika 19: Prisotnost proteina BGN v vzorcih ektočnega in evtočnega endometrija
Detekcija proteina BGN z metodo prenosa Western in ECL detekcije v proteinskih vzorcih iz ektočnega endometrija bolnic z OE (E) in vzorcih normalnega endometrija zdravih žensk (NE); kot pozitivno kontrolo smo uporabili rekombinantni protein BGN (RP) in proteine iz tkiva placentre (P); normalizacija glede na protein gliceraldehyd 3-fosfat dehidrogenazo (GAPDH); M, proteinski standardi; prikazani so reprezentativni vzorci

Figure 19: Detection of BGN in samples of ectopic and eutopic endometrium
WB and ECL detection of BGN in protein samples from ectopic endometrium of ovarian endometriosis patients (E) and samples of normal endometrium (NE); as positive controls we used recombinant protein BGN (RP) and proteins isolated from placenta tissue (P); for normalization glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) protein was used; M, protein standards; the representative samples are shown in the figure

Za primerjavo smo uporabili tudi vzorce tkiv evtočnega endometrija bolnic s peritonealno endometriozo (PE) in vzorce tkiv evtočnega endometrija bolnic z nepojasnjениmi kroničnimi bolečinami v medenici. Zaznali smo dve šibki lisi v enem vzorcu evtočnega endometrija bolnice s PE in v dveh vzorcih evtočnega endometrija bolnic z nepojasnjeniimi kroničnimi bolečinami v medenici. Tudi v teh vzorcih smo zaznali lise z molekulsko maso 42 kDa, ki predstavljajo proteinsko sredico, in lise z višjo molekulsko maso, ki predstavljajo glikozilirano obliko proteina (Pregl. 6, Sl. 20).



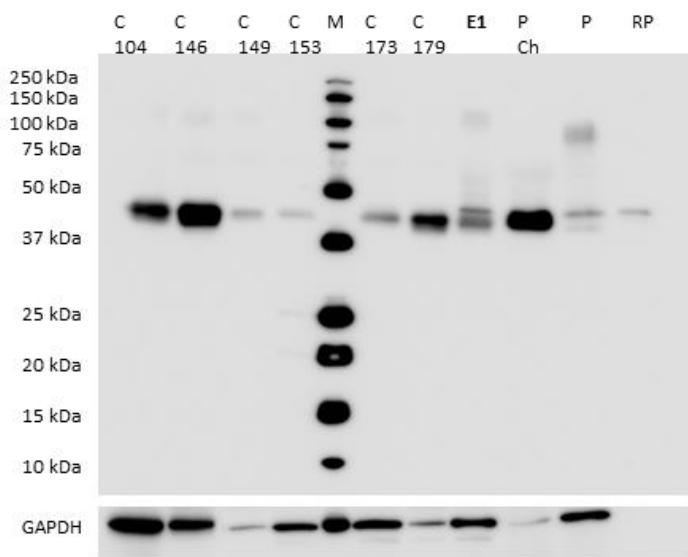
Slika 20: Prisotnost proteina BGN v vzorcih evtopičnega endometrija bolnic s peritonealno endometriozo in bolnic s kroničnimi bolečinami v medenici

Detekcija proteina BGN z metodo prenos Western in ECL v proteinskih vzorcih evtopičnega endometrija bolnic s PE (PE) in vzorcih evtopičnega endometrija bolnic s kroničnimi bolečinami v medenici (NED); kot pozitivno kontrolo smo uporabili rekombinantni protein BGN (RP) in proteine iz tkiva placente (P); normalizacija glede na protein GAPDH; M, proteinski standardi; prikazani so reprezentativni vzorci

Figure 20: Detection of BGN in samples of eutopic ednometrium from patients with peritoneal endometriosis and of patients with chronic pelvic pain

WB and ECL detection of BGN in protein samples from eutopic endometrium of women with peritoneal endometriosis (PE), and women with pelvic pain but no evidence of endometriosis (NED); as positive controls we used recombinant protein BGN (RP) and proteins isolated from placenta tissue (P); for normalisation GAPDH protein was used; M, protein standards; the representative samples are shown in the figure

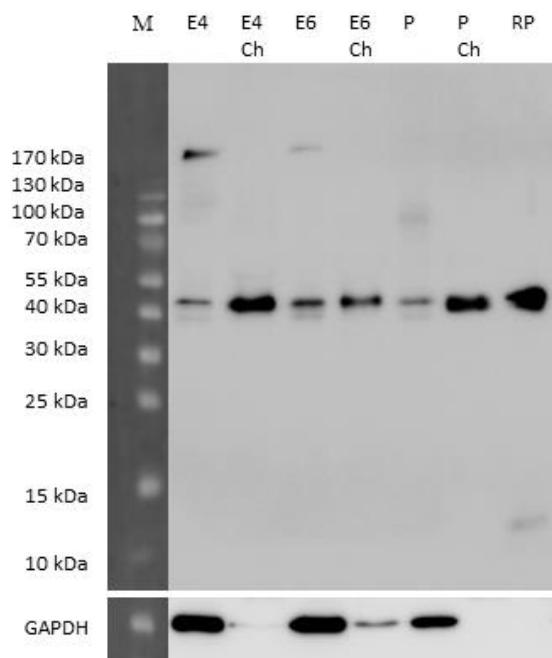
Prisotnost proteina BGN smo preverili tudi v 9 vzorcih benignih cist. V vseh vzorcih razen v enem smo odkrili lise z molekulsko maso 42 kDa, v nasprotju z vzorci ektopičnega endometrija bolnic z OE pa pri cistah nismo zaznali lis z večjo molekulsko maso. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili rekombinantni protein BGN, vzorec ektopičnega endometrija bolnice z OE (E1) in proteine, izolirane iz tkiva placente (Pregl. 6, Sl. 21).



Slika 21: Prisotnost BGN v vzorcih benignih cist
Detekcija proteina BGN z metodo prenos Western in ECL v proteinskih vzorcih iz benignih cist (C); kot pozitivno kontrolo smo uporabili rekombinantni protein BGN (RP); proteine iz ektočnega endometrija bolnice z OE (E1); proteine iz tkiva placenti (P) pred in po odcepu glikozidne verige s hondroitinazo ABC (Ch); normalizacija glede na protein GAPDH; M, proteinski standardi; prikazani so reprezentativni vzorci

Figure 21: Detection of BGN in samples of benign cysts
WB and ECL detection of biglycan in protein samples from benign cysts (C); as positive controls we used recombinant protein BGN (RP) and proteins isolated from ectopic endometrium of ovarian endometriosis patients (E1); proteins isolated from placenta tissue (P) before and after digestion of glycoside chain with chondroitinase ABC (Ch); for normalisation GAPDH protein was used; M, protein standards; the representative samples are shown in the figure

V vzorcih ektočnega endometrija bolnic z OE smo poleg lis pri velikosti 42 kDa, ki predstavljajo proteinsko sredico, zaznali tudi lise z večjo molekulsko maso, zato smo se odločili, da pri teh vzorcih glikozidne verige odcepimo z uporabo encima hondroitinaza ABC. Po pričakovanjih smo v vzorcih, ki jih nismo inkubirali z encimom hondroitinaza ABC, poleg lise pri 42 kDa zaznali tudi lise z večjo molekulsko maso, pri vzorcih, inkubiranih z encimom, pa smo zaznali le liso, ki predstavlja proteinsko sredico. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili rekombinantni protein BGN (Sl. 22).



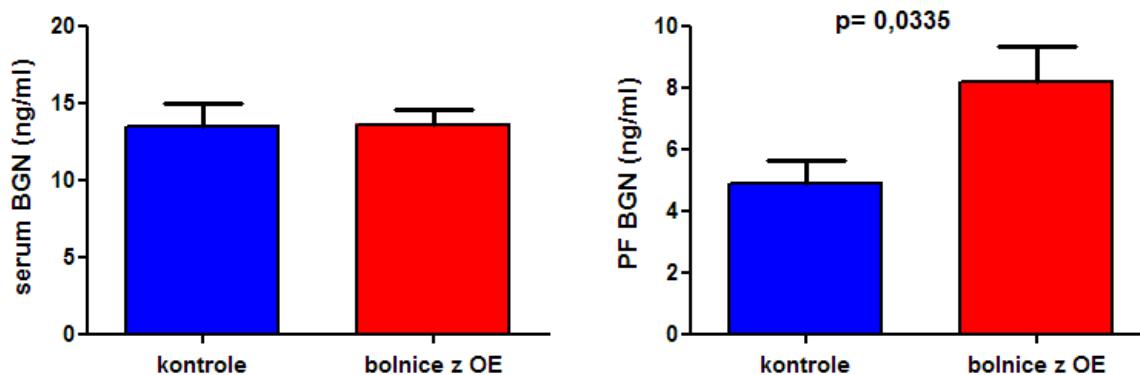
Slika 22: Prisotnost BGN v vzorcih, inkubiranih s hondroitinazo ABC
Detekcija proteina BGN z metodo prenosa Western in ECL v proteinskih vzorcih iz ektopičnega endometrija bolnic z OE (E); iz tkiva placente (P) ter vzorcev, ki so inkubirani s hondroitinazo ABC (Ch); kot pozitivno kontrolo smo uporabili rekombinantni BGN protein (RP); normalizacija glede na protein GAPDH; M, proteinski standardi

Figure 22: Detection of BGN in samples treated with chondroitinase ABC
WB and ECL detection of biglycan in protein samples from ectopic endometrium of women with OE (E1); proteins isolated from placenta tissue (P) and samples treated with chondroitinase ABC (Ch); benign cysts (C); as positive controls we used recombinant protein BGN (RP); for normalisation GAPDH protein was used; M, protein standards

4.2.2 Analiza prisotnosti proteina BGN v serumu in PF

Z metodo ELISA smo določili koncentracijo proteina BGN v serumu in PF 55 bolnic z OE, 27 zdravih žensk in 10 bolnic z benignimi cistami. Koncentracija BGN je bila statistično značilno povišana v PF bolnic z OE (povp. vrednost \pm SEM: 8.2 ± 1.1 ng/ml) v primerjavi s kontrolno skupino (4.9 ± 0.8 ng/ml) (Sl. 23).

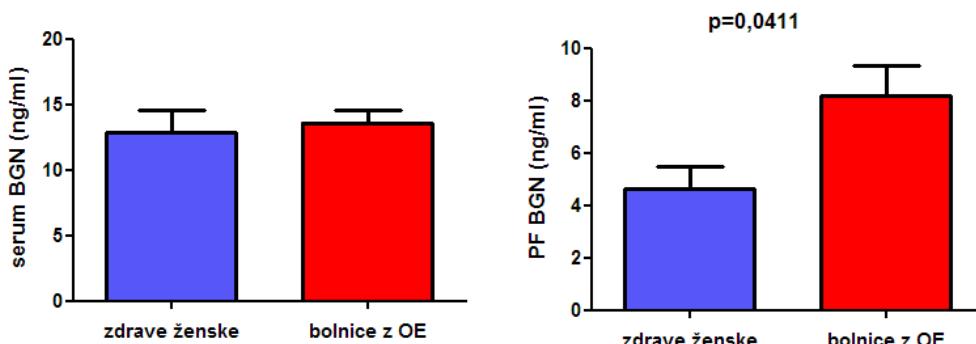
Ko smo primerjali koncentracijo BGN bolnic z OE s koncentracijami BGN bolnic z benignimi cistami in zdravih žensk, smo zaznali statistično značilno spremembo le v primerjavi z zdravimi ženskami (8.2 ± 1.1 ng/ml; 4.6 ± 4.4 ng/ml), ne pa tudi z bolnicami z benignimi cistami (8.2 ± 1.1 ng/ml; 5.5 ± 5.4 ng/ml) (Sl. 24). Med zdravimi ženskami in bolnicami z benignimi cistami ni bilo sprememb v koncentraciji (Sl. 25). V serumu nismo zaznali statistično značilnih sprememb v koncentraciji BGN (13.6 ± 1.0 ng/ml; 13.4 ± 1.6 ng/ml).



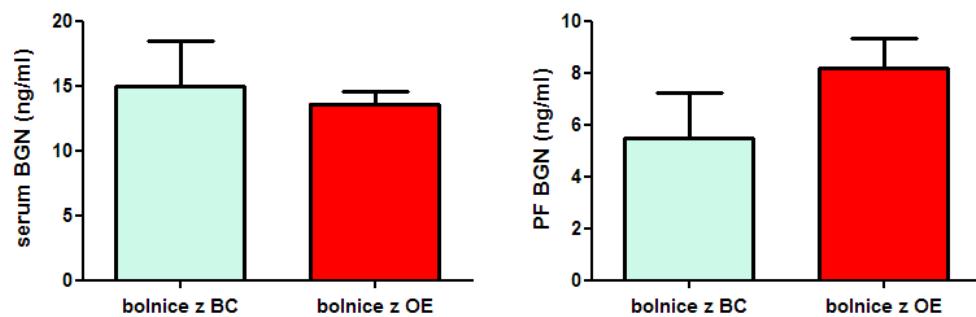
Slika 23: Koncentracije proteina BGN v serumu in PF bolnic z ovarijsko endometriozo in v kontrolni skupini, ki vključuje zdrave ženske in bolnice z benignimi cistami

Figure 23: BGN concentrations in serum and PF in women with OE and in the control group comprising healthy women and women with BC

a)

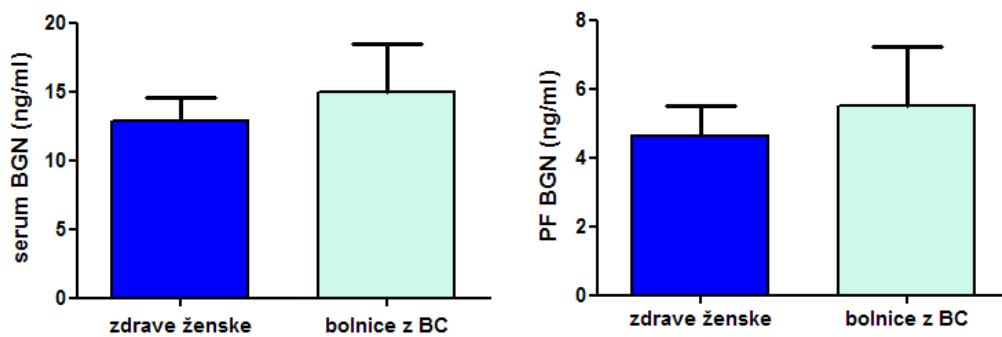


b)



Slika 24: Koncentracije proteina BGN v serumu in PF bolnic z ovarijsko endometriozo, zdravih žensk in bolnic z benignimi cistami
a) bolnice z OE in zdrave ženske; b) bolnice z OE in bolnice z BC

Figure 24: BGN concentrations in serum and PF in women with ovarian endometriosis, healthy women and women with benign cysts
a) in women with OE and healthy women; b) in women with OE and women with BC

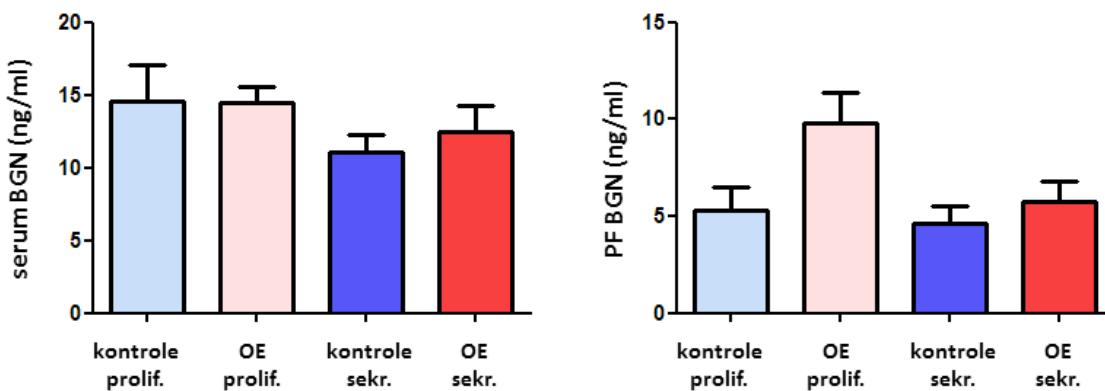


Slika 25: Koncentracije proteina BGN v serumu in PF zdravih žensk in bolnic z benignimi cistami

Figure 25: BGN concentrations in serum and PF in healthy women and women with benign cysts

4.2.2.1 Analiza prisotnosti proteina BGN v serumu in PF glede na fazo menstrualnega cikla

Pri analizi glede na fazo menstrualnega cikla nismo zaznali statistično značilnih sprememb med bolnicami z OE in kontrolami niti v proliferativni niti v sekretorni fazi menstrualnega cikla.



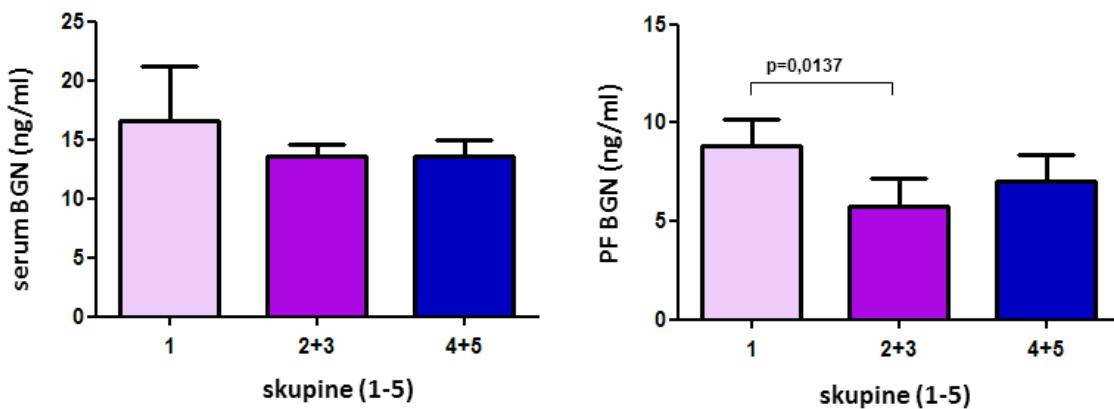
Slika 26: Primerjava koncentracij proteina BGN v proliferativni in sekretorni fazi menstrualnega cikla med preiskovano in kontrolno skupino v serumu in PF
Legenda: prolif. – proliferativna faza; sekr. – sekretorja faza; OE – bolnice z ovarijsko endometriozo

Figure 26: Comparison of BGN concentrations in the proliferative and secretory phase of the menstrual cycle in case and control groups in serum and PF

Legend: prolif. – proliferative phase; sekr. – secretory phase; OE – patients with ovarian endometriosis

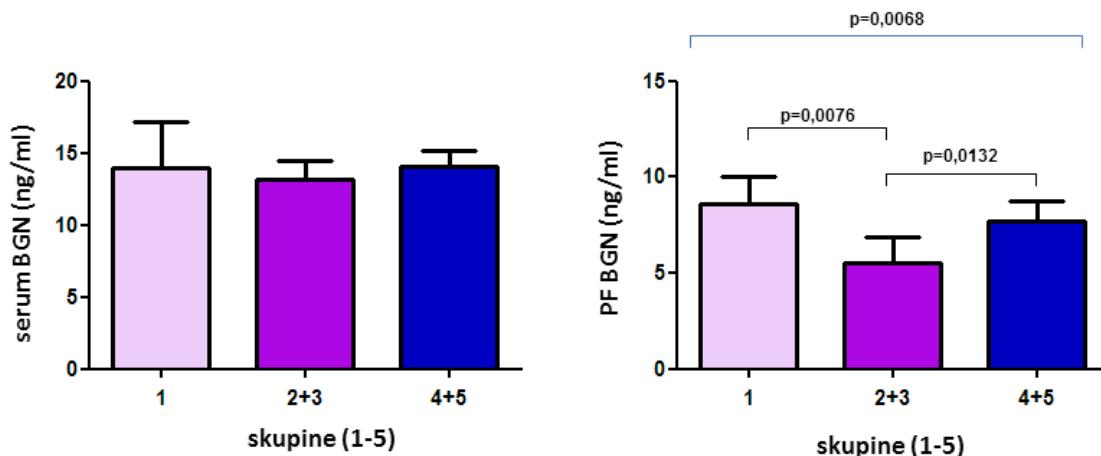
4.2.2.2 Analiza povezave med koncentracijo proteina BGN in prisotnostjo bolečin

Nadaljnja analiza povezave je razkrila, da je znižana koncentracija proteina BGN v PF povezana z intenzivnostjo (Sl. 27) in pogostostjo menstrualnih bolečin (Sl. 28). V serumu smo opazili statistično značilno povezavo z znižano koncentracijo proteina BGN le pri bolečinah med spolnimi odnosi (Sl. 29).



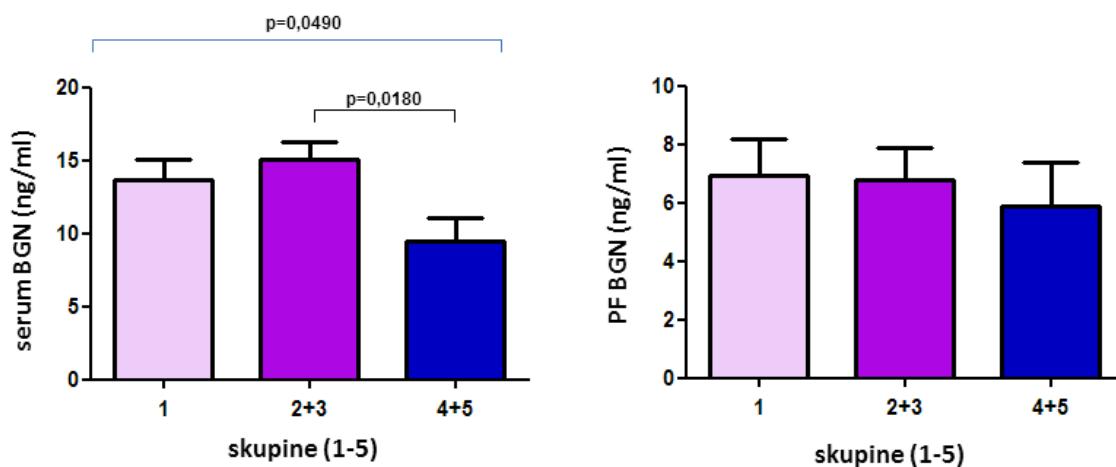
Slika 27: Koncentracija BGN v serumu in PF v povezavi z intenzivnostjo menstrualnih bolečin
p-vrednost predstavlja primerjavo med dvema skupinama (test Man-Whitney)

Figure 27: BGN concentrations in serum and peritoneal fluid in relation to intensity of menstrual pain
p-value represents comparison between two individual groups (test Mann-Whitney test)



Slika 28: Koncentracija BGN v serumu in PF v povezavi s pogostostjo menstrualnih bolečin
Zgornja *p*-vrednost predstavlja primerjavo med 3 skupinami (analiza ANOVA), medtem ko ostale *p*-vrednosti predstavljajo primerjavo med dvema skupinama (test Man-Whitney)

Figure 28: BGN concentrations in serum and peritoneal fluid in relation to frequency of menstrual pain
The *p*-values in the top line represent the comparison between all 3 groups (ANOVA), the others represent the comparison between two individual groups (Mann-Whitney test)



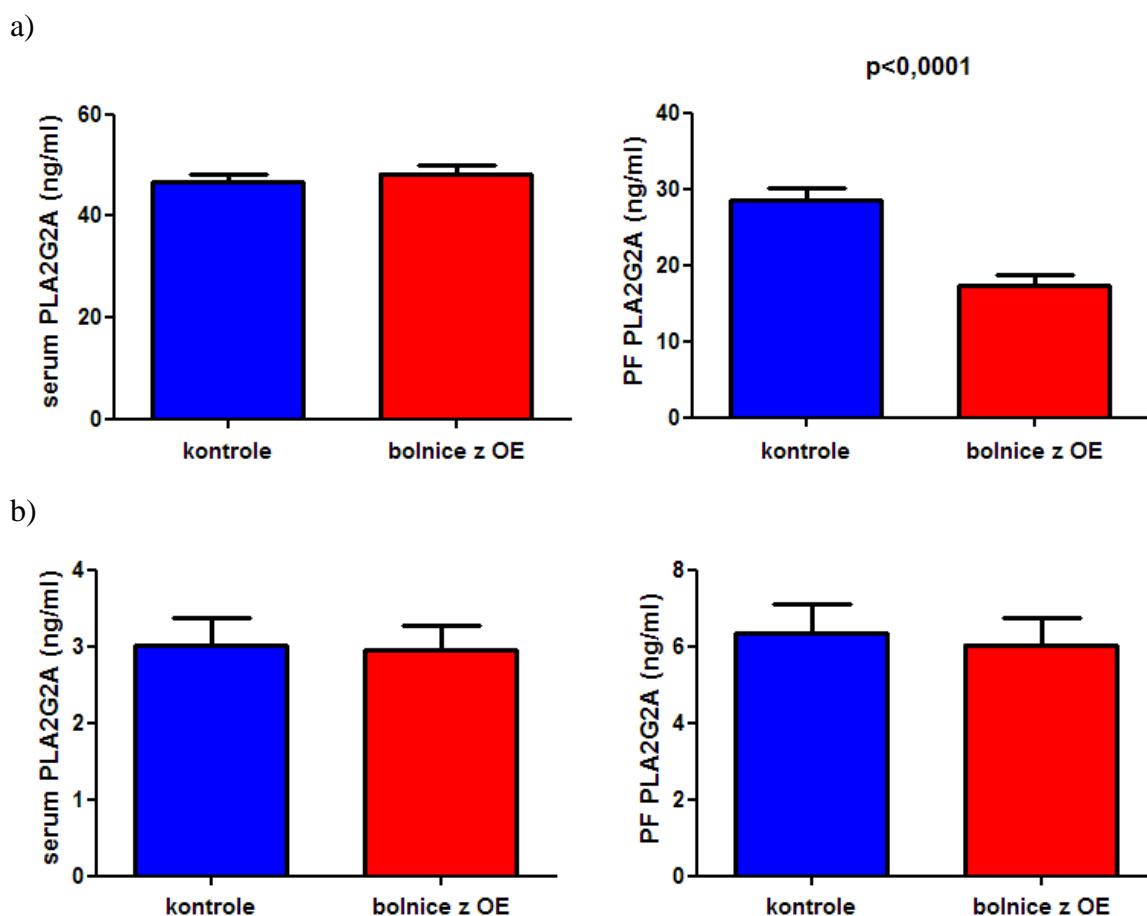
Slika 29: Koncentracija BGN v serumu in PF v povezavi z bolečinami med spolnimi odnosi
Zgornja p -vrednost predstavlja primerjavo med 3 skupinami (analiza ANOVA), medtem ko ostale p -vrednosti predstavljajo primerjavo med dvema skupinama (Mann-Whitney test)

Figure 29: BGN concentrations in serum and peritoneal fluid in relation to pain during sexual intercourse
The p -values in the top line represent the comparison between all 3 groups (ANOVA), the others represent the comparison between two individual groups (Mann-Whitney test)

4.3 ANALIZA IZRAŽANJA PLA2G2A NA RAVNI PROTEINOV

4.3.1 Analiza prisotnosti PLA2G2A v serumu in PF

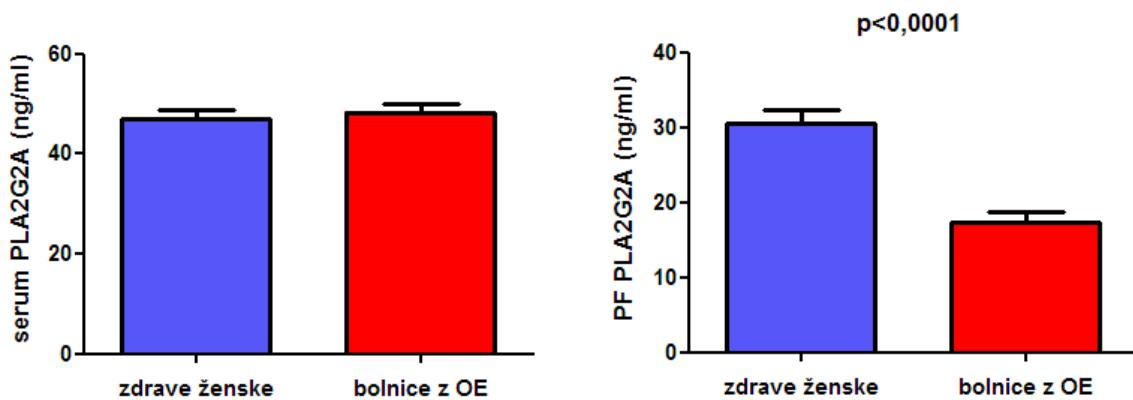
V serumu in PF smo z metodo ELISA določili koncentracijo PLA2G2A v 58 vzorcih bolnic z OE, 28 vzorcih zdravih žensk in 11 vzorcih bolnic z benignimi cistami (komplet reagentov Uscn Life Science Inc.) ter 38 vzorcih bolnic z OE, 23 vzorcih zdravih žensk in 9 vzorcih benignih cist (komplet reagentov Cayman Chemicals). S prvim kompletom reagentov je bila koncentracija PLA2G2A statistično značilno znižana v PF bolnic z OE (povp. vrednost \pm SEM: $17,28 \pm 11,03$ ng/ml) v primerjavi s kontrolno skupino ($28,49 \pm 9,77$ ng/ml; $p<0,0001$) (Sl. 30a). Ko smo primerjali koncentracijo PLA2G2A bolnic OE ločeno z zdravimi osebami in bolnicami z benignimi cistami, smo zaznali statistično značilno spremembo le v primerjavi z zdravimi ženskami ($17,28 \pm 11,03$ ng/ml; $30,52 \pm 9,34$ ng/ml; $p<0,0001$), ne pa tudi z bolnicami z benignimi cistami ($17,28 \pm 11,03$ ng/ml; $21,40 \pm 4,76$ ng/ml; $p=0,2780$) (Sl. 31). Tudi med kontrolnima skupinama smo opazili statistično značilno razliko: pri bolnicah z benignimi cistami je bila koncentracijo PLA2G2A v PF nižja kot pri zdravih ženskah ($30,52 \pm 9,94$ ng/ml; $21,40 \pm 4,76$ ng/ml; $p=0,0046$) (Sl. 32). V serumu med bolnicami z OE in kontrolno skupino nismo zaznali statistično značilnih sprememb v koncentraciji PLA2G2A ($48,30 \pm 11,97$ ng/ml; $46,7 \pm 9,98$ ng/ml; $p=0,5844$). Z drugim kompletom reagentov nismo zaznali statistično značilnih sprememb niti v PF ($6,05 \pm 4,44$ ng/ml; $6,34 \pm 4,20$; $p=0,6739$) niti v serumu ($2,95 \pm 2,18$ ng/ml; $3,02 \pm 2,17$ ng/ml; $p=0,9888$) (Sl. 30b).



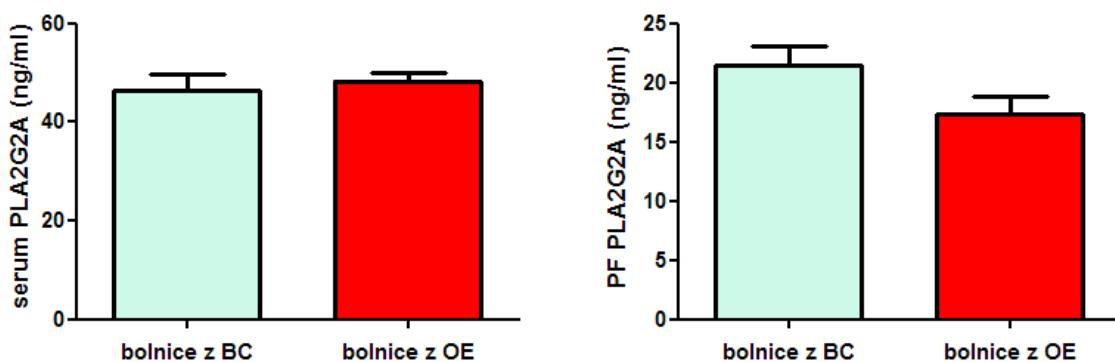
Slika 30: Koncentracije PLA2G2A v serumu in PF bolnic z ovarijsko endometriozo in kontrolni skupini, ki je sestavljena iz zdravih žensk in bolnic z benignimi cistami
Zgornja grafa prikazujeta koncentracije PLA2G2A pomerjene s kompletom reagentov Uscn Life Science Inc., spodnja pa koncentracije PLA2G2A pomerjene s kompletom reagentov Cayman Chemicals

Figure 30: PLA2G2A concentrations in serum and PF in women with ovarian endometriosis and in the control group composed of healthy women and women with benign cysts
The graphs above show the concentration of PLA2G2A measured with complete of reagents from Uscn Life Science Inc., the graphs below show the concentration of PLA2G2A measured with complete of reagent from Cayman Chemicals

a)



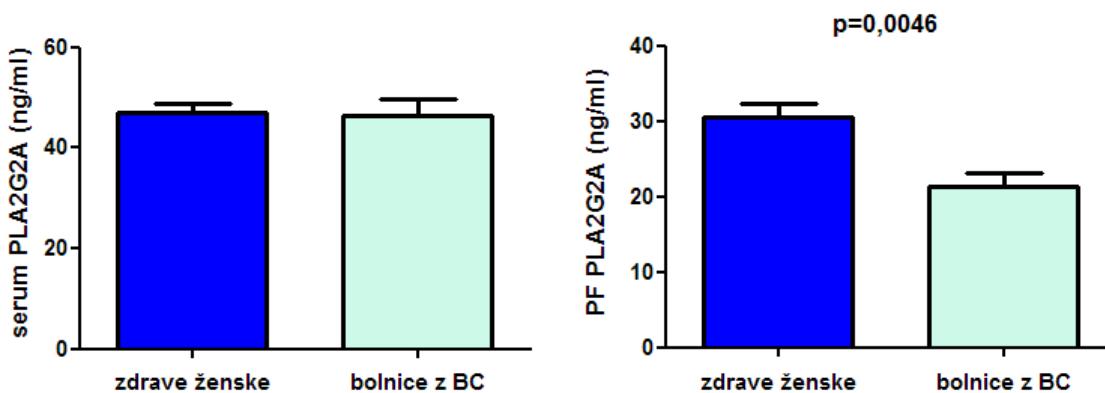
b)



Slika 31: Koncentracije PLA2G2A v serumu in PF bolnic z ovarijsko endometriozo, zdravih žensk in bolnic z benignimi cistami

a) bolnice z OE in zdrave ženske; b) bolnice z OE in bolnice z BC

Figure 31: PLA2G2A concentrations in serum and PF in women with ovarian endometriosis, healthy women and women with benign cysts
a) in women with OE and healthy women; b) in women with OE and women with BC

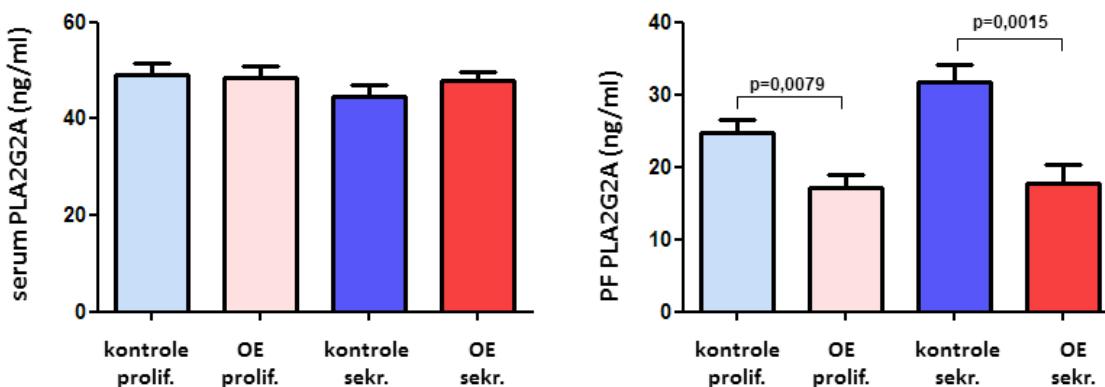


Slika 32: Koncentracije PLA2G2A v serumu in PF zdravih žensk in bolnic z benignimi cistami

Figure 32: PLA2G2A concentrations in serum and PF in healthy women and women with benign cysts

4.3.1.1 Analiza prisotnosti PLA2G2A v serumu in PF glede na fazo menstrualnega cikla

Pri analizi glede na fazo menstrualnega cikla smo zaznali statistično značilno spremembo v koncentraciji PLA2G2A med bolnicami z OE in kontrolami tako v proliferativni kot v sekretorni fazi (Sl. 33). Statistično značilno spremembo smo zaznali le v PF ne pa tudi v serumu.



Slika 33: Primerjava koncentracij PLA2G2A v proliferativni in sekretorni fazi menstrualnega cikla med preiskovano in kontrolno skupino v serumu in PF

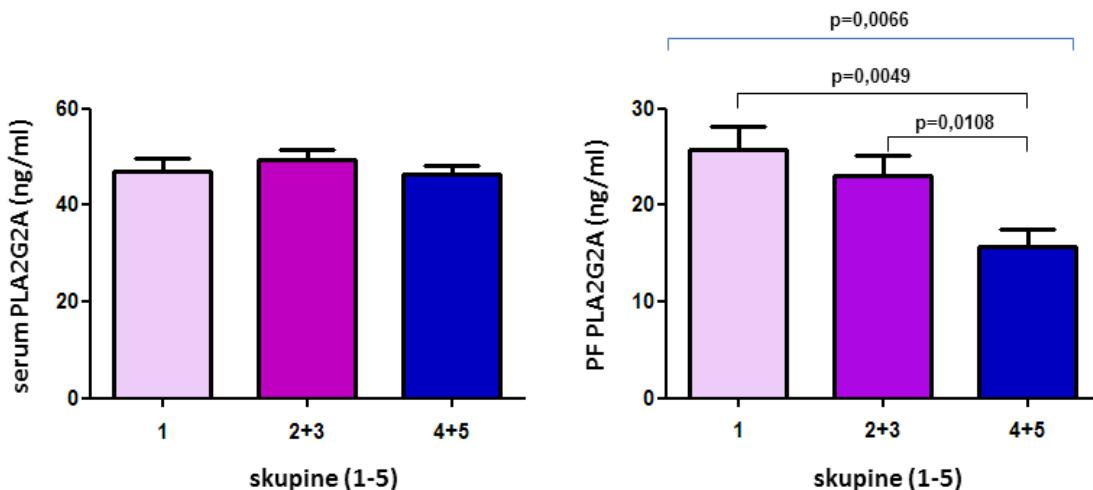
Legenda: prolif. – proliferativna faza; sekr. – sekretorna faza; OE – bolnice z ovarijsko endometriozo

Figure 33: Comparison of PLA2G2A concentrations in the proliferative and secretory phase of the menstrual cycle in cases and control group in serum and PF

Legend: prolif. – proliferative phase; sekr. – secretory phase; OE – patients with ovarian endometriosis

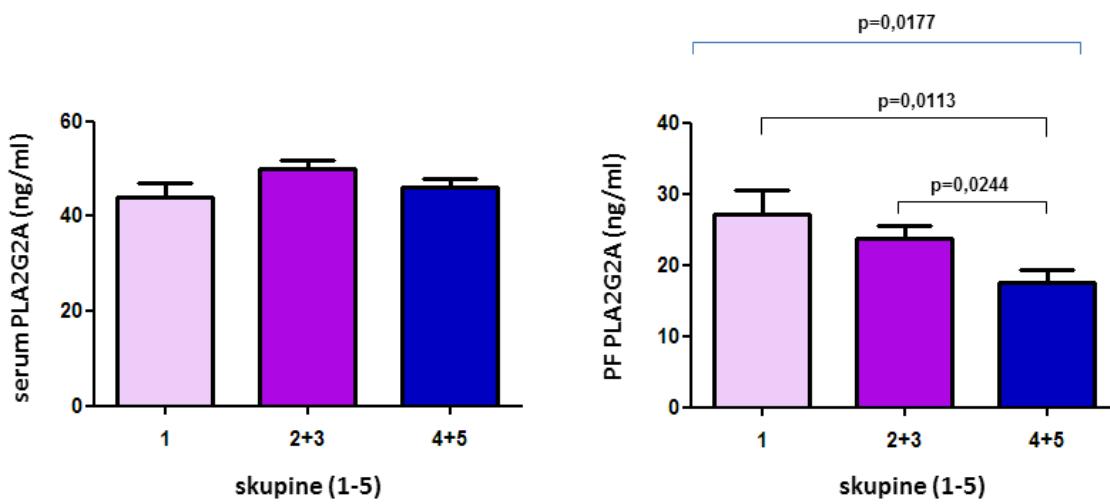
4.3.1.2 Analiza povezave med koncentracijo PLA2G2A in prisotnostjo bolečin

Preučili smo tudi, kako je znižana koncentracija PLA2G2A povezana z različnimi tipi bolečin, ki so značilne za endometriozo. Ugotovili smo, da je v PF povezana z vsemi tipi bolečin: intenzivnostjo (Sl. 34) in pogostostjo menstrualnih bolečin (Sl. 35), bolečinami med spolnimi odnosi (Sl. 36), bolečinami med iztrebljanjem ali uriniranjem (Sl. 37), kroničnimi bolečinami v medenici (Sl. 38), razen s slabostjo in bruhanjem. V serumu povezave med koncentracijo PLA2G2A in prisotnostjo bolečin nismo zaznali.



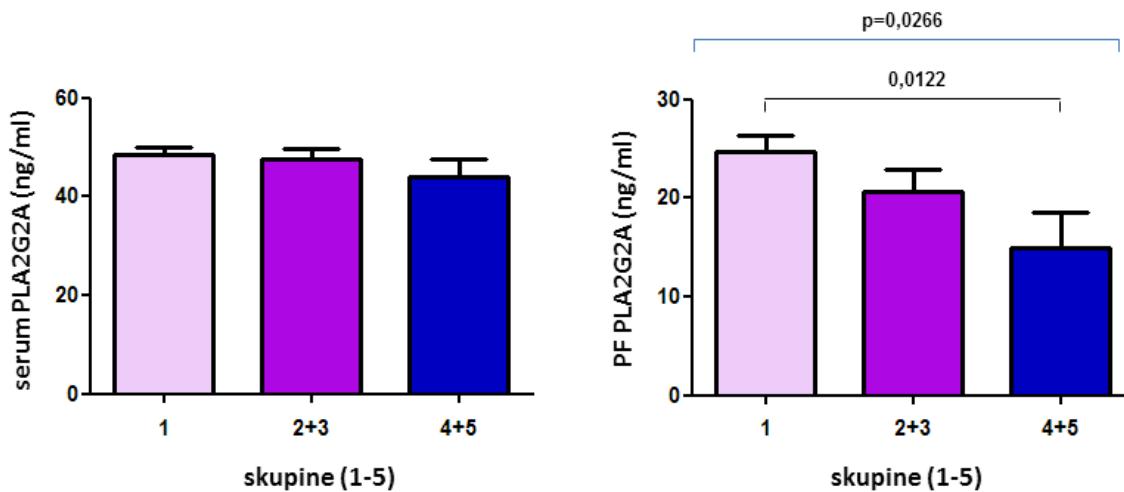
Slika 34: Koncentracijo PLA2G2A v serumu in PF v povezavi z intenzivnostjo menstrualnih bolečin
Zgornja p -vrednost predstavlja primerjavo med 3 skupinami (analiza ANOVA), medtem ko ostale p -vrednosti predstavljajo primerjavo med dvema skupinama (test Man-Whitney)

Figure 34: PLA2G2A concentrations in serum and peritoneal fluid in relation to intensity of menstrual pain
The p -values in the top line represent the comparison between all 3 groups (ANOVA), the others represent the comparison between two individual groups (Mann-Whitney test)



Slika 35: Koncentracijo PLA2G2A v serumu in PF v povezavi s pogostostjo menstrualnih bolečin
Zgornja p -vrednost predstavlja primerjavo med 3 skupinami (analiza ANOVA), medtem ko ostale p -vrednosti predstavljajo primerjavo med dvema skupinama (test Man-Whitney)

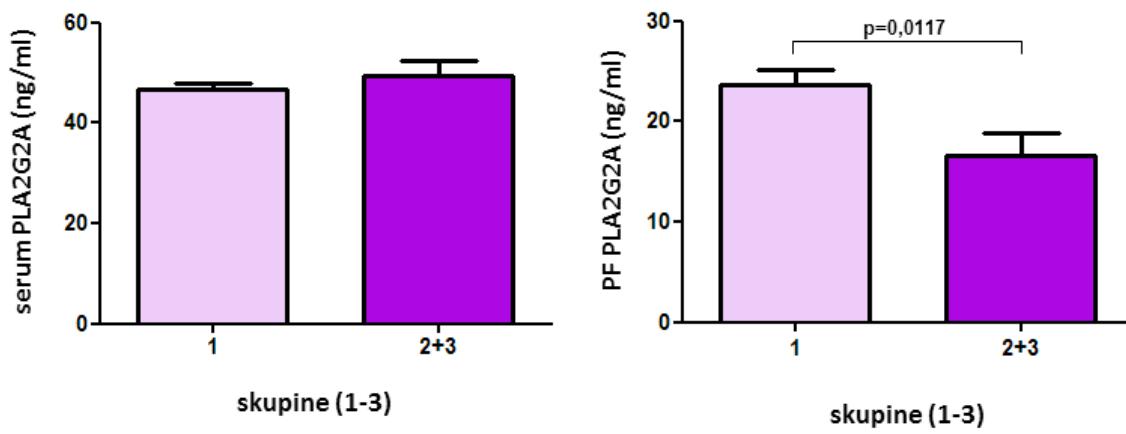
Figure 35: PLA2G2A concentrations in serum and peritoneal fluid in relation to frequency of menstrual pain
The p -values in the top line represent the comparison between all 3 groups (ANOVA), the others represent the comparison between two individual groups (Mann-Whitney test)



Slika 36: Koncentracija PLA2G2A v serumu in PF v povezavi z bolečinami med spolnimi odnosi
Zgornja p -vrednost predstavlja primerjavo med 3 skupinami (analiza ANOVA), medtem ko ostale p -vrednosti predstavljajo primerjavo med dvema skupinama (test Man-Whitney)

Figure 36: PLA2G2A concentrations in serum and peritoneal fluid in relation to pain during sexual intercourse

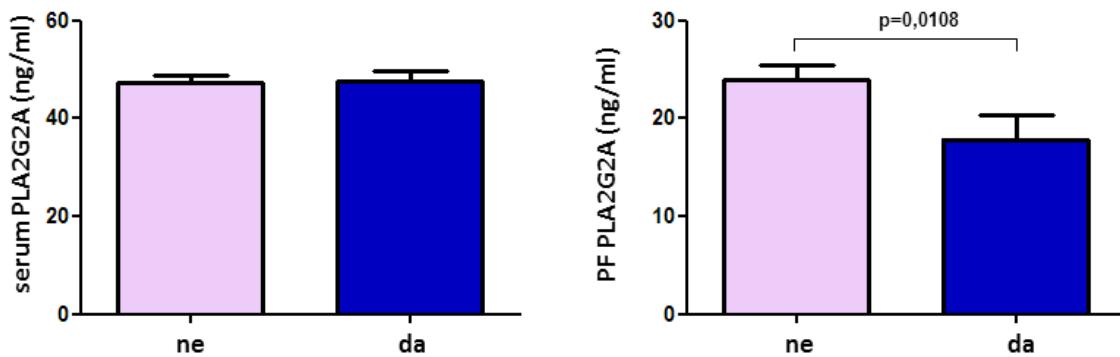
The p -values in the top line represent the comparison between all 3 groups (ANOVA), the others represent the comparison between two individual groups (Mann-Whitney test)



Slika 37: Koncentracijo PLA2G2A v serumu in PF v povezavi z bolečinami med iztrebljanjem ali uriniranjem

Primerjava med dvema skupinama je bila narejena s testom Man-Whitney

Figure 37: PLA2G2A concentrations in serum and PF in relation to pain during urination or supplant
The comparison between two groups was obtained by Man-Whitney test



Slika 38: Koncentracija PLA2G2A v serumu in PF v povezavi s kroničnimi bolečinami v medenici
Primerjava med dvema skupinama je bila narejena s testom Man-Whitney

Figure 38: PLA2G2A concentrations in serum and PF in relation to chronic pelvic pain
The comparison between two groups was obtained by Man-Whitney test

5 RAZPRAVA

5.1 ANALIZA PRISOTNOSTI IZBRANIH CITOKINOV IN OSTALIH PROTEINOV V SERUMU IN PF

Naša študija pomembno prispeva k razumevanju pomena citokinov kot možnih bioloških označevalcev. Njena prednost je predvsem dobro okarakterizirana preiskovana skupina, ki vključuje bolnice z ovarijsko endometriozo, in kontrolna skupina, sestavljena iz bolnic z benignimi cistami in zdravih žensk.

Znano je, da so citokini povišani pri več različnih boleznih (Vodolazkaia in sod., 2012; May in sod., 2010) in zato kot posamezni niso primerni za biološke označevalce. Vodolazkaia in sod. (2012) so v študiji ugotovili, da so bili nekateri izmed vnetnih citokinov v kontrolni skupini v primerjavi s preiskovano skupino rahlo povišani, kar kaže, da je lahko že v kontrolni skupini imunski sistem čezmerno aktiviran, saj je njihova kontrolna skupina vključevala bolnice s kroničnimi bolečinami v medenici. V okviru naše študije je kontrolna skupina vključevala tudi zdrave ženske, zato laže ocenimo, koliko k nastanku bolezni prispevajo citokini.

Večina objavljenih študij, ki vključuje preučevanje citokinov kot možnih bioloških označevalcev, ne upošteva sprememb v koncentraciji glede na fazo menstrualnega cikla, čeprav je znano, da ta niha (Angstwurm in sod., 1997; May in sod., 2010). V naši študiji smo koncentracije vseh citokinov in drugih izbranih proteinov analizirali v odvisnosti od faze menstrualnega cikla.

Naslednji problem pri preučevanju citokinov kot možnih bioloških označevalcev je tudi, da študije, narejene na vzorcih seruma, niso primerljive s študijami, narejenimi na vzorcih plazme, saj so Skogstrand in sod. (2008) ugotovili, da so izmerjene koncentracije vnetnih citokinov v serumu višje kot v plazmi. Tudi stresni faktorji pred operacijo vplivajo na koncentracijo izmerjenih citokinov (Mihalyi in sod., 2010), čeprav doslej tega ni preučevala še nobena skupina. Prav tako je bistvenega pomena čas vzorčenja, saj se koncentracija citokinov spreminja tudi čez dan (Ardivson in sod., 1994). V naši študiji smo čas odvzema poenotili, saj smo vzorce krvi zbirali med 9. in 10. uro zjutraj en dan pred operacijo, bolnice pa so pred tem izpolnile tudi vprašalnik o počutju, s katerim smo lahko ocenili njihovo stopnjo stresa.

Ugotovili smo, da imajo bolnice z OE v serumu povišano koncentracijo proteina glikodelin-A in znižano koncentracijo hormona leptin in citokina IL-8 v primerjavi z zdravimi ženskami in bolnicami z benignimi cistami. Pri proteinu glikodelin-A naši rezultati potrjujejo predhodne študije (Pregl. 6), medtem ko se pri leptinu in IL-8 ne ujemajo s predhodnimi študijami. V večini objavljenih študij ni jasno, za katero vrsto

endometrioze gre, v naši pa smo v preiskovano skupino vključili bolnice z ovarijsko endometriozo (16) in bolnice z ovarijsko endometriozo in dodatno peritonealno endometriozo (28), bolnice z ovarijsko endometriozo in dodatno globoko infiltrativno endometriozo (6) ter bolnice z vsemi tremi oblikami endometrioze (6). V večini študij so v kontrolno skupino vključene bolnice s kroničnimi bolečinami v medenici, v našo pa tako bolnice z benignimi cistami kot zdrave ženske, ki so se odločile za sterilizacijo.

Ugotovili smo, da sta se naša preiskovana in kontrolna skupina bistveno razlikovali v indeksu telesne mase (ITM) (Pregl. 1). Za bolnice z endometriozo in bolnice z benignimi cistami je namreč značilen nizek ITM, medtem ko je v naši kontrolni skupini zdravih žensk ITM višji. Ta razlika se ujema tudi z znižano vrednostjo proteina leptin tako v preiskovani skupini kot v skupini bolnic z benignimi cistami. Ko smo primerjali koncentracijo leptina v preiskovani skupini in skupini bolnic z benignimi cistami, podobno kot v drugih študijah nismo opazili sprememb. Pri primerjavi koncentracije leptina v preiskovani skupini in skupini zdravih žensk pa smo opazili više vrednosti v zadnji skupini.

Študija na vzorcih PF je pokazala, da imajo bolnice z OE povišano koncentracijo proteinov glikodelin-A, IL-6 in IL-8 v primerjavi z zdravimi ženskami in z bolnicami z benignimi cistami, proteina MCP-1 le v primerjavi z zdravimi ženskami in proteina RANTES v primerjavi z bolnicami z benignimi cistami. Naši izsledki raziskave so tako primerljivi s predhodnimi študijami, v katerih so pokazali povišane koncentracije teh proteinov. Koncentracija leptina je bila tako kot v serumu zaradi nižje vrednosti ITM znižana pri preiskovani skupini, vendar podobno kot v serumu le v primerjavi z zdravimi ženskami ne pa tudi z bolnicami z benignimi cistami.

Če na kratko povzamemo, je tudi naša študija pokazala, da so citokini povišani pri bolnicah z OE. Zaradi povišanih koncentracij tudi pri drugih boleznih morda niso primerni kot posamezni biološki označevalci, vendar pa v kombinaciji še z drugimi proteini, ki sodelujejo v procesih patogeneze, lahko pripomorejo k večji specifičnosti in občutljivosti nabora bioloških označevalcev.

Preglednica 7: Rezultati predhodnih študij izbranih citokinov in drugih proteinov

Table 7: Results of previous studies of selected cytokines and other proteins

biološki označevalec	študija	študija
	serum/plazma	PF
glikodelin-A	<p>povišan: Koninckx in sod., 1992; Vodolazkaia in sod., 2012; Kocbek in sod., 2013</p> <p>nespremenjen: Drosdzol-Cop in Skrzypulec-Plinta, 2012</p>	<p>povišan: Drosdzol-Cop in Skrzypulec-Plinta, 2012; Kocbek in sod., 2013</p> <p>nespremenjen: Koninckx in sod., 1992; Bersinger in sod., 2006</p>
leptin	<p>povišan: Matarese in sod., 2000; Seeber in sod., 2008; Nacul in sod., 2013</p> <p>nespremenjen: Metalliotakis in sod., 2000; Gogacz in sod., 2001; Vigano in sod., 2002; Wu in sod., 2003; Gungor in sod., 2009; Shoh in sod., 2013</p>	<p>povišan: Matarese in sod., 2000; Gogacz in sod., 2001; Mahutte in sod., 2003; Bedaiwy in sod., 2006; Gungor in sod., 2009; Alvigi in sod., 2009; Padney in sod., 2010; Malhotra in sod., 2012</p> <p>nespremenjen: Tao in sod., 2011; Nacul in sod., 2013</p>
IL-6	<p>povišan: Koumantakis in sod., 1994; Pellicier in sod., 1998; Bedaiwy in sod., 2002; Iwabe in sod., 2003; Darai in sod., 2003; Martinez in sod., 2007; Othman in sod., 2008; Mihalyi in sod., 2010; Kinugasa in sod., 2011; Carmona in sod., 2012</p> <p>nespremenjen: Somigliana in sod., 2004; Kalu in sod., 2007; Jee in sod., 2008; Seeber in sod., 2008; Drosdzol-Cop in Skrzypulec-Plinta, 2012</p>	<p>povišan: Koyama in sod., 1993; Kalu in sod., 2007; Velasco in sod., 2010; Barcz in sod., 2012; Bersinger in sod., 2012; Drosdzol-Cop and Skrzypulec-Plinta, 2012; Podgaec in sod., 2012;</p> <p>nespremenjen: Bedaiwy in sod., 2002; Bedaiwy in sod., 2007</p>
IL-8	<p>povišan: Pizzo in sod., 2002; Barcz in sod., 2002; Ohata in sod., 2008; Mihalyi in sod., 2010; Carmona in sod., 2012</p> <p>nespremenjen: Gazvani in sod., 1998; Darai in sod., 2003; Markowska in sod., 2004; Kalu in sod., 2007</p>	<p>povišan: Ryan in sod., 1995; Gazvani in sod., 1998; Bedaiwy in sod., 2002; Pizzo in sod., 2002; Barcz in sod., 2002; Bersinger in sod., 2005; Kalu in sod., 2007; Malhotra in sod., 2012</p>
MCP-1	<p>povišan: Akoum in sod., 1996; Pizzo in sod., 2002; Gmyrek in sod., 2005; Agic in sod., 2008; Othman in sod., 2008; Seeber in sod., 2008;</p>	<p>povišan: Akoum in sod., 1996; Arici in sod., 1997; Pizzo in sod., 2002; Kalu in sod., 2007; Tao in sod., 2011; Bersinger in sod., 2012</p>

5.1.1 Glikodelin-A kot potencialni biološki označevalec ovarijske endometrioze

Našli smo le nekaj študij, v katerih so izmerili koncentracijo proteina glikodelin-A v krvi in PF bolnic z endometriozo (Koninckx in sod., 1992; Bersinger in sod., 2006; Drosdzol-Cop in Skrzypulec-Plinta, 2012; Vodolazkaia in sod., 2012). Koninckx in sod. (1992) so pokazali statistično značilno povišano koncentracijo glikodelina-A v plazmi bolnic z globoko infiltrativno endometriozo ter pri bolnicah z globoko infiltrativno endometriozo, ki imajo dodatno tudi ovarijsko in/ali peritonealno endometriozo, vendar le v sekretorni fazi menstrualnega cikla. Bolnice so imele višjo koncentracijo glikodelina-A tudi v PF, vendar razlika ni bila statistično značilna (Koninckx in sod., 1992). Podobno so ugotovili tudi Bersinger in sod. (2006), vendar je bila njihova študija omejena le na PF. V nasprotju s temo študijama pa Drosdzol-Cop in Skrzypulec-Plinta (2012) poročata o statistično značilnem povišanju koncentracije glikodelina-A v PF, ne pa tudi v serumu najstnic z endometriozo, vendar njuna študija vključuje le bolnice v proliferativni fazi menstrualnega cikla. Vodolazkaia in sod. (2012) poročajo o povisani koncentraciji glikodelina-A v plazmi bolnic z endometriozo v menstrualni in proliferativni fazi cikla. Prednost njihove študije v primerjavi s prejšnjimi so velika in dobro okarakterizirana skupina bolnic in kontrol, večje število plazemskih bioloških označevalcev, vključenih v raziskavo, ter napreden multivariabilni statistični pristop in korekcije za fazo menstrualnega cikla. Izračunali so, da dva nabora, ki vključujeta štiri biološke označevalce (aneksin V, VEGF, CA 125, glikodelin-A ter aneksin V, VEGF, CA 125, ICAM-1), lahko napovesta endometriozo z veliko občutljivostjo (81–90 %) in sprejemljivo specifičnostjo (63–81%). V naši študiji smo potrdili statistično značilno povišanje koncentracije glikodelina-A tako v serumu kot v PF bolnic z OE, preverili pa smo tudi povezavo med koncentracijo glikodelina-A in prisotnostjo bolečin.

Scholl in sod. (2009) so pokazali, da je koncentracija glikodelina-A v PF povezana z intenzivnostjo menstrualnih bolečin. V naši študiji smo potrdili povezavo med koncentracijo glikodelina-A v PF in prisotnostjo menstrualnih bolečin, prvi pa smo potrdili povezavo tudi v serumu. To si razlagamo tako, da glikodelin-A spodbudi in poviša produkcijo IL-6 (Laird in sod., 1994), ta vnetni citokin pa povzroči še dodatno izločanje drugih citokinov in s tem pomaga pri ustvarjanju vnetnega odgovora v peritonealni votlini. Citokini posredno povzročijo tudi sintezo levkotrienov, ki jih povezujemo z bolečinami (Abu in Konje, 2000).

Znano je, da se koncentracija glikodelina-A spreminja med menstrualnim ciklom (Julkunen in sod., 1986; Baumann in sod., 1998; Bersinger in sod., 2009). Najnižje koncentracije v serumu so izmerili med ovulacijo, koncentracija nato v sekretorni fazi narašča, najvišjo vrednost pa doseže na koncu sekretorne oz. na začetku proliferativne faze menstrualnega cikla, ko začne znova padati. Tudi v naši študiji smo pokazali, da se koncentracija glikodelina-A spreminja z menstrualnim ciklom, pokazali pa smo še, da je

koncentracija glikodelina-A pri bolnicah z ovarijsko endometriozo povišana tako v proliferativni kot v sekretorni fazi. Domnevajo, da je povišana koncentracija glikodelina-A pri bolnicah z endometriozo povezana z zmanjšano možnostjo zanositve, saj je znano, da glikodelin-A inhibira vezavo spermijev na jajčne celice (Seppala in sod., 1998).

Izračunali smo tudi občutljivost in specifičnost glikodelina-A kot možnega biološkega označevalca. Koncentracija glikodelina-A v kombinaciji s starostjo in ITM omogoča dobro razlikovanje med bolnicami in zdravimi ženskami, tako v serumu kot v PF. Občutljivost in specifičnost glikodelina-A bi se lahko povečala še tako, da bi koncentracije določali le v proliferativni fazi menstrualnega cikla, kjer je bila razlika v koncentraciji glikodelina-A med bolnicami in kontrolami najvišja.

Naši izsledki raziskave so pokazali statistično značilno povišano koncentracijo glikodelina-A v serumu in PF bolnic z OE. Pokazali smo tudi, da je koncentracija glikodelina-A povezana z intenzivnostjo in pogostostjo menstrualnih bolečin, kar kaže na nevrostimulativno vlogo tega proteina, vendar bi bile potrebne nadaljnje raziskave, da bi se pojasnil mehanizem delovanja. Precej visoka občutljivost in specifičnost glikodelina-A nakazujeta, da bi se v kombinaciji z drugimi proteini lahko uporabljal kot biološki označevalci OE.

5.2 ANALIZA IZRAŽANJA BGN NA RAVNI PROTEINOV

Pred kratkim so v nekaterih študijah izražanja celotnega genoma pokazali povišano izražanje gena *BGN* pri bolnicah z endometriozo. V dveh študijah so ektopični endometrij bolnic primerjali z evtopičnim endometrijem zdravih žensk (Burney in sod., 2007; Hawkins in sod., 2011), v drugih študijah pa so primerjali vzorce ektopičnega in evtopičnega endometrija posameznih bolnic (Eyster in sod., 2007, Hever in sod., 2007; Hull in sod., 2008) ter ugotovili, da je *BGN* prekomerno izražen v vzorcih ektopičnega endometrija. Tudi predhodna študija naše skupine (Vouk in sod., 2011) je potrdila, da je *BGN* prekomerno izražen v vzorcih ektopičnega endometrija bolnic z OE v primerjavi z evtopičnim endometrijem zdravih žensk. Kjub obetavnim rezultatom na mRNA ravni pa koncentracije BGN v serumu in peritonealni tekočini bolnic z endometriozo še nikoli niso določali.

Biglikan je komponenta zunajceličnega matriksa, vendar nima vloge samo pri pripenjanju celic, temveč je vključen tudi v neposredno uravnavanje vnetnega odgovora (Okamura in sod., 2001; Park in sod., 2001; Schaefer in Iozzo, 2008). Med poškodbo tkiva se BGN sprosti iz zunajceličnega matriksa (Schaefer in sod., 2005) in se veže na Tollu- podobne receptorje (TLR2 in TLR4) ki so na površini aktiviranih makrofagov in tako aktivirajo inflamasom. Poleg uravnavanja imunskega odgovora je BGN vključen tudi v celično

proliferacijo in pripenjanje celic, vsi ti biološki procesi pa so povezani s patogenezo endometrioze.

Biglikan smo našli v vseh vzorcih ektopičnega endometrija bolnic z OE in vzorcih benignih ovarijskih cist. Nasprotno proteina BGN nismo zaznali v vzorcih evtopičnega endometrija zdravih žensk, šibke lise proteina BGN pa smo opazili v vzorcih evtopičnega endometrija bolnic s PE in vzorcih evtopičnega endometrija bolnic z nepojasnjениmi kroničnimi bolečinami v medenici. Ti rezultati kažejo, da BGN ni povezan le z OE, temveč ima pomembno vlogo tudi pri nekaterih drugih patoloških procesih ovarijev.

Ker spada BGN med sekretorne proteine, smo koncentracijo tega proteina izmerili tudi v vzorcih seruma in PF. Koncentracija BGN je bila statistično značilno povišana v PF bolnic z OE v primerjavi s kontrolno skupino, v serumu pa nismo opazili razlik med skupinama. Povišana koncentracija proteina BGN le v PF potrjuje dejstvo, da gre v primeru endometrioze za lokalno vnetje in da je kjub semiinvazivnemu odvzemenu PF primernejša za študijo patoloških procesov, vključenih v razvoj bolezni.

Analiza, ki je temeljila na primerjavi različnih faz menstrualnega cikla, ni pokazala sprememb v koncentraciji proteina BGN med bolnicami in kontrolami niti v proliferativni niti v sekretorni fazi. Med različnimi tipi bolečin, značilnimi za endometriozo, sta le pogostost menstrualnih bolečin in bolečine med spolnimi odnosi povezani s koncentracijo proteina BGN v serumu in PF. Nižja koncentracija BGN v PF se je ujemala s povprečno pogostostjo menstrualnih bolečin, nižja koncentracija v serumu pa z večjo bolečino pri spolnih odnosih. Mehanizem povezave proteina BGN s temo oblikama bolečin za zdaj še ni znan in ga bo treba še preučiti.

Čeprav je odkrivanje proteina BGN v vzorcih ektopičnega endometrija bolnic z OE in v vzorcih benignih cist pokazalo, da BGN ni specifičen le za OE, se ti rezultati ne ujemajo s koncentracijami v PF, kjer je bila koncentracija proteina BGN povišana le pri bolnicah z OE, ne pa tudi pri bolnicah z benignimi cistami. Domnevamo, da do tega razkoraka pride zaradi razlik v izločanju proteina BGN in se le v primeru endometrioze BGN pospešeno izloča v PF, vendar pa so za potrditev te domneve potrebne še nadaljnje študije.

Babelova in sod. (2009) so poročali, da je le glikozilirana oblika BGN sposobna sprožiti vnetni odziv, proteinska sredica in glikozaminoglikanske verige pa same po sebi ne kažejo nobene aktivnosti. Na podlagi teh izsledkov raziskav sklepamo, da neglikozilirana oblika proteina BGN, ki smo jo odkrili v vzorcih cist, nima ključne vloge pri vnetnem odzivu, medtem ko je glikozilirana oblika proteina BGN, ki smo jo zaznali v vzorcih tkiv z OE, povezana s kroničnim vnetjem, značilnim za endometriozo.

Čeprav so za potrditev te hipoteze potrebne še nadaljnje študije, na podlagi dosedanjih ugotovitev sklepamo, da ima BGN pomembno vlogo pri patogenezi endometrioze in bi v kombinaciji z drugimi molekulami lahko služil kot biološki označevalec ovarijske endometrioze.

5.3 ANALIZA IZRAŽANJA PLA2G2A NA RAVNI PROTEINOV

V obširni analizi z mikromrežami so Eyster in sod. (2007) ugotovili, da je med vsemi geni ravno *PLA2G2A* najbolj diferenčno izražen v ektopičnem glede na evtopični endometrij istih oseb. Tudi predhodna študija naše skupine (Vouk in sod., 2011) je pokazala, da je *PLA2G2A* prekomerno izražen v vzorcih ektopičnega endometrija bolnic z ovarijsko endometriozo v primerjavi z evtopičnim endometrijem zdravih žensk. V nasprotju s tema študijama pa Lousse in sod. (2010) niso opazili razlik v izražanju *PLA2G2A* v evtopičnem endometriju bolnic z endometriozo v primerjavi z evtopičnim endometrijem žensk, ki so se odločile za sterilizacijo ali so bile neplodne, poročali pa so o statistično značilno povišanem izražanju *PLA2G2A* v peritonealnih makrofagih bolnic z endometriozo v primerjavi s peritonealnimi makrofagi, izoliranimi iz PF kontrol. Izražanje *PLA2G2A* je bilo povisano tudi v peritonealnih lezijah v primerjavi z evtopičnim endometrijem istih bolnic (Lousse in sod., 2010). Imunohistokemijsko barvanje je pokazalo, da se *PLA2G2A* nahaja predvsem v endometriotičnih žlezah (Lousse in sod., 2010).

V PF bolnic z endometriozo so poročali o povišani koncentraciji prostaglandinov (De Leon in sod., 1986; Wu in sod., 2002) in levkotrienov (Yamaguchi in Mori, 1990), Sano in sod. (1994) pa so pokazali tudi povišano aktivnost encima *PLA2G2A* v PF bolnic z endometriozo. Domnevajo, da so prostaglandini neposredno povezani s patogenezo endometrioze (Wu in sod., 2007), saj pospešijo proliferacijo in inhibirajo apoptozo, to pa vpliva na povečano ožiljanje in imunosupresijo (Sales in Jabbour, 2003). Ključni regulator sinteze prostaglandinov je *PLA2G2A* (Murakami in Kudo, 2004), ki lahko aktivira vnetne celice tudi preko mehanizma, ki ni povezan z encimsko aktivnostjo (Triggiani in sod., 2006). Omenjena fosfolipaza sama uravnava izražanje gena *PLA2G2A* (Beck in sod., 2003), še dodatno pa gen inducirajo vnetni citokini (Lindstron in Bennet, 2004). Zaradi izredno kratke življenjske dobe prostaglandinov sklepajo, da ti nastajajo lokalno v peritonealnih makrofagih (Wu in sod., 2002) in ektopičnem endometriju (Ota in sod., 2001; Chishima in sod., 2007), ravno tako pa je lokalno njihovo delovanje, kar ponovno potrjuje dejstvo, da je za študijo patogeneze endometrioze primernejša PF.

V naši študiji smo ugotovili, da je bila koncentracija *PLA2G2A*, izmerjena s kompletom reagentov Usen Life Science Inc., v PF bolnic z OE statistično značilno znižana v primerjavi s kontrolno skupino, v serumu pa nismo zaznali sprememb v koncentraciji *PLA2G2A* med preiskovano in kontrolno skupino. Tudi znotraj kontrolne skupine smo opazili statistično značilno znižano koncentracijo *PLA2G2A* pri bolnicah z benignimi

cistami v primerjavi z zdravimi ženskami, vendar le v PF. Natančne razlage, zakaj je koncentracija PLA2G2A pri bolnicah z OE v PF znižana, kar je v nasprotju z dosedaj objavljenimi študijami, zaenkrat še nimamo. Prav zaradi prese netljivih rezultatov pa smo se odločili, da koncentracijo PLA2G2A pomerimo še z drugim kompletom reagentov (Cayman Chemicals). V tem primeru tako v serumu kot v PF nismo opazili sprememb v koncentraciji PLA2G2A med preiskovanjo in kontrolno skupino. Da bi lahko pojasnili nasprotuječe si rezultate, so potrebne še nadaljnje študije. V prihodnje nameravamo s prenosom Western preučiti ali je gen *PLA2G2A* v vzorcih tkiv ektopičnega endometrija prekomerno izražen tudi na ravni proteinov.

V naši študiji smo zasledili, da je koncentracija PLA2G2A, ki smo jo izmerili s prvim kompletom reagentov, v PF bolnic z OE v primerjavi s kontrolami znižana tako v proliferativni kot v sekretorni fazi menstrualnega cikla, opazili pa smo tudi, da je koncentracija PLA2G2A v kontrolni skupini višja v sekretorni kot v proliferativni fazi.

Eikozanoidi so znani vnetni mediatorji, najverjetneje pa imajo pomembno vlogo tudi pri bolečinah in neplodnosti. V več študijah so pokazali povezavo med eikozanoidi in bolečinami (Koike in sod., 1992; Wu in sod., 2007), v naši študiji pa smo pokazali tudi povezavo med bolečinami in koncentracijo PLA2G2A. Med različnimi vrstami bolečin smo našli statistično značilno povezavo s koncentracijo PLA2G2A v PF kar pri 5 od 6 tipov bolečin, ki so značilne za endometriozo, medtem ko v serumu povezave med koncentracijo PLA2G2A in prisotnostjo bolečin nismo zaznali.

Na osnovi dosedanjih rezultatov sklepamo, da ima PLA2G2A pomembno vlogo v patogenezi endometrioze in pri razvoju bolečin, značilnih za endometriozo, v kombinaciji z drugimi molekulami pa lahko služi tudi kot biološki označevalci ovarijske endometrioze.

6 SKLEPI

- Pri analizi prisotnosti izbranih citokinov in drugih proteinov smo ugotovili:
 - bolnice z OE imajo v serumu statistično značilno povišano koncentracijo glikodelina A in znižano koncentracijo leptina in IL-8 v primerjavi s kontrolno skupino;
 - bolnice z OE imajo v PF povišano koncentracijo glikodelina-A, IL-6, IL-8, MCP-1 in RANTES ter znižano koncentracijo leptina;
 - analiza glede na fazo cikla je razkrila, da je v serumu koncentracija glikodelina-A pri bolnicah z OE povišana tako v proliferativni kot sekretorni fazi, koncentracija leptina znižana v proliferativni, koncentracija IL-8 pa v sekretorni fazi;
 - bolnice z OE imajo v PF povišano koncentracijo glikodelin-A in IL-6 tako v proliferativni kot v sekretorni fazi ter IL-8 v proliferativni fazi in znižano koncentracijo leptina in IL-15 v proliferativni ter fikolina-2 in IP-10 v sekretorni fazi cikla;
 - povezava koncentracij v serumu in PF je bila statistično značilna pri fikolinu-2, glikodelinu-A, leptinu, IP-10, IL-18 in ICAM-1;
 - našli smo povezavo med koncentracijami izbranih citokinov in drugih proteinov s prisotnostjo bolečin, značilnih za endometriozo;
 - izmed vseh citokinov in drugih proteinov se je za najprimernejšega izkazal glikodelin-A

S temi rezultati lahko potrdimo hipotezo: »*Pri endometriizi je moten imunski odziv, zato citokini, ki so vključeni v imunski odziv celic in se nahajajo v fizioloških tekočinah, predstavljajo možne biološke označevalce.*«

- Pri analizi izražanja BGN na ravni proteinov smo ugotovili:
 - BGN smo zaznali v vzorcih tkiv ektopičnega endometrija bolnic z OE in benignih cist, šibke lise smo zaznali v polovici vzorcev evtopičnega endometrija bolnic s PE in bolnic s kroničnimi bolečinami v medenici, vendar brez endometrioze, proteina BGN pa nismo zaznali v evtopičnem endometriju zdravih žensk;
 - koncentracija BGN je bila povišana v PF, ne pa tudi v serumu bolnic z OE v primerjavi s kontrolno skupino, vendar le v primerjavi z zdravimi ženskami;
 - pri analizi glede na fazo cikla nismo zaznali sprememb med bolnicami z OE in kontrolami niti v serumu niti v PF;
 - znižana koncentracija BGN v PF je povezana s prisotnostjo bolečin, ki so značilne za endometriozo

- Pri analizi izražanja PLA2G2A na ravni proteinov smo ugotovili:
 - s prvim kompletom reagentov je bila koncentracija PLA2G2A znižana v PF bolnic z OE v primerjavi s kontrolno skupino, v serumu nismo opazili sprememb v koncentraciji;
 - z drugim kompletom reagentov je bila koncentracija PLA2G2A med preiskovano in kontrolno skupino nespremenjena tako v serumu kot v PF
 - analiza glede na fazo cikla je v PF pokazala spremembo med bolnicami z OE in kontrolno skupino tako v sekretorni kot v proliferativni fazi;
 - znižana koncentracija PLA2G2A v PF je povezana s prisotnostjo bolečin

Na osnovi naših rezultatov hipoteze »*Izbrana sekretorna proteina BGN in PLA2G2A, ki sta prekomerno izražena v vzorcih ovarijske endometrioze, se v večjih koncentracijah nahajata tudi v PF, oziroma serumu in tako predstavlja možna biološka označevalca*« nismo potrdili v celoti, saj nobeden izmed izbranih sekretornih proteinov ni bil povišan v serumu bolnic z OE, se je pa v PF koncentracija obeh izbranih proteinov razlikovala med bolnicami in kontrolami, kar kaže, da sta vključena v patogenezo endometrioze. Tudi s stališča bioloških označevalcev bi bila izbrana proteina primerna, saj je bistvo biološkega označevalca, da razlikuje med preiskovano in kontrolno skupino in tako je koncentracija izbranega biološkega označevalca lahko povišana ali znižana, kot se je to zgodilo v primeru PLA2G2A.

Citokini IL-6, IL-8, MCP-1, RANTES, hormon leptin ter proteini glikodelin-A, BGN in PLA2G2A so primerni kot biološki označevalci ovarijske endometrioze, saj so povišani ali znižani v serumu in PF bolnic z OE v primerjavi s kontrolno skupino, razen leptina in IL-8 pa se njihova koncentracija ne spreminja s fazo cikla. Izbrani proteini so tako primerni za neinvazivno oz. semiinvazivno diagnostiko ovarijske endometrioze.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Endometriosa je pogosta kronična ginekološka bolezen, ki se pojavlja pri 10-15 % žensk v rodnem obdobju. Za bolezen so med drugim značilni nespecifični simptomi, ki otežujejo diagnostiko in tako je povprečen čas od nastanka bolezni do diagnoze kar 7 let. V zadnjem času preučujejo različne biološke označevalce, ki bi lahko omogočali zgodnejšo in neinvazivno diagnostiko endometrioze. Cilj je najti biološke označevalce, ki bi jih bilo mogoče zaznati v krvi ali peritonealni tekočini in bi bili specifični za to bolezen. Do sedaj so preučevali številne označevalce, vendar primernega zaenkrat še niso našli.

V prvem delu raziskave smo se osredotočili na proteine imunskega sistema in se na podlagi pregledane literature odločili, da bomo v serumu in PF bolnic z OE in oseb kontrolne skupine izmerili koncentracijo dvanajstih citokinov in treh proteinov, ki jih pogosto povezujejo s patogenezo endometrioze. Čeprav so te proteine pri endometriizi že preučevali, pa si rezultati študij v večini primerov nasprotujejo. Z metodama ELISA in Bio-Plex smo tako v serumu kot PF dobro okarakterizirane preiskovane in kontrolne skupine izmerili koncentracijo dvanajstih citokinov in treh izbranih proteinov.

Naš drugi pristop je temeljal na predhodnih ekspresijskih študijah naše skupine, v katerih so v vzorcih ovarijske endometrioze v primerjavi s kontrolnim endometrijem identificirali več prekomerno izraženih genov sekretornih proteinov. Odločili smo se, da na proteinski ravni z metodama prenosa Western in ELISA podrobnejše preučimo dva izmed njih - *BGN* in *PLA2G2A*, in tako prispevamo tudi k razjasnitvi njune vloge v patogenezi endometrioze.

Pri analizi prisotnosti izbranih citokinov in ostalih proteinov smo ugotovili, da imajo bolnice z OE v serumu povišano koncentracijo glikodelina-A ter znižano koncentracijo leptina in IL-8, medtem ko imajo v PF povišano koncentracijo glikodelina-A, IL-6, IL-8, MCP-1 in RANTES ter znižano koncentracijo leptina v primerjavi s kontrolno skupino.

Za najboljšega izmed vseh citokinov se je izkazal glikodelin-A, ki je bil povišan tako v serumu kot v PF bolnic z OE v primerjavi s kontrolno skupino. Opazili smo, da je koncentracija povišana tako v proliferativni kot sekretorni fazni menstrualnega cikla, povišana koncentracija glikodelina-A pa je povezana z različnimi tipi bolečin značilnih, za endometriozo.

V drugem delu doktorske naloge smo BGN zaznali v vzorcih ektopičnega endometrija bolnic z OE in vzorcih benignih cist. V obeh primerih smo opazili lise velikosti okoli 42 kDa, ki predstavlja proteinsko sredico, v primeru ektopičnega endometrija bolnic z OE pa smo opazili tudi lise z višjo molekulsko maso (100 – 250 kDa), ki predstavlja glikozilirano

obliko proteina. Proteina BGN nismo opazili v vzorcih evtopičnega endometrija zdravih žensk. Ti rezultati nakazujejo, da BGN ni specifičen za ovarijsko enometriozo, temveč je najverjetneje povezan še z ostalimi patologijami na jajčnikih. Nadaljnja analiza je pokazala, da je koncentracija BGN povišana v PF bolnic z OE v primerjavi s kontrolno skupino. Ko smo primerjali koncentracijo BGN bolnic z OE, smo zaznali statistično značilno spremembo le v primerjavi z zdravimi ženskami, ne pa tudi z bolnicami z benignimi cistami. V serumu nismo zaznali statistično značilnih sprememb v koncentraciji BGN, prav tako nismo zaznali sprememb v koncentraciji BGN glede na fazo menstrualnega cikla. Analiza povezave je še razkrila, da znižana koncentracija BGN sovpada z intenzivnostjo in pogostostjo menstrualnih bolečin ter z bolečinami med spolnimi odnosi.

Z metodo ELISA smo v serumu in PF bolnic z OE in kontrolne skupine z dvema kompletoma reagentov določili tudi koncentracijo encima PLA2G2A. Koncentracija PLA2G2A, izmerjena s prvim kompletom reagentov, je bila pri bolnicah z OE v PF znižana v primerjavi s kontrolno skupino. Ko smo primerjali koncentracijo PLA2G2A bolnic z OE, smo zaznali statistično značilno spremembo le v primerjavi z zdravimi ženskami, ne pa tudi z bolnicami z benignimi cistami. V serumu med bolnicami z OE in kontrolno skupino nismo zaznali statistično značilnih sprememb v koncentraciji PLA2G2A. Analiza glede na fazo menstrualnega cikla je pokazala spremembo v koncentraciji PLA2G2A v PF med bolnicami z OE in kontrolno skupino tako v proliferativni kot v sekretorni fazi. V serumu nismo zaznali sprememb v koncentraciji PLA2G2A. Ugotovili smo tudi, da je znižana koncentracija PLA2G2A povezana z različnimi tipi bolečin, ki so značilne za endometriozo. Z drugim kompletom reagentov nismo zaznali sprememb v koncentraciji PLA2G2A med preiskovano in kontrolno skupino niti v serumu niti v PF.

Na podlagi teh rezultatov sklepamo, da imajo citokini IL-6, IL-8, MCP-1, RANTES, hormon leptin ter proteini glikodelin-A, BGN in PLA2G2A pomembno vlogo pri patogenezi bolezni. Izbrani proteini so primerni kot biološki označevalci ovarijske endometrioze, saj so povišani ali znižani v serumu in PF bolnic z OE v primerjavi s kontrolno skupino, razen leptina in IL-8 pa se njihova koncentracija ne spreminja s fazo cikla. Ti proteini bi lahko bili primerni za neinvazivno oz. semiinvazivno diagnostiko ovarijske endometrioze.

7.2 SUMMARY

Endometriosis is a common chronic gynecological disease that occurs in 10% to 15% of women of reproductive age. It is characterized by non-specific symptoms, which prolongs the time for diagnosis. Currently, it takes an average of seven years from onset of the disease to diagnosis. Many studies have focused on the identification of biomarkers for

non-invasive and earlier diagnosis of this disease. So far, a number of markers have been studied, although no suitable biomarker has yet been found. The aim of our study was thus to contribute to the identification of endometriosis through specific biomarkers in blood or PF.

The first part of this doctoral thesis focuses on the proteins of the immune system. From the literature, 12 cytokines and three other proteins were selected, with these often associated with the pathogenesis of endometriosis. Although these proteins have already been studied in endometriosis, the published data are in most cases contradictory. We thus used ELISA and Bio-Plex methods to measure the concentrations of these 12 selected cytokines and three other proteins in the serum and PF of a well-characterized group of patients with ovarian endometriosis, as also for the control groups of women with benign cysts and healthy women.

The second approach was based on a previous expression analysis that identified a panel of genes that were over-expressed in the samples of ectopic endometrium from women with ovarian endometriosis, as compared to eutopic endometrium from healthy women. We decided to further investigate two of these: *BGN* and *PLA2G2A*, the roles of which have never been studied in endometriosis.

Our experimental data show that patients with ovarian endometriosis have increased serum glycodeitin-A concentrations, compared to patients with benign cysts and healthy women. The serum concentrations of leptin and IL-8 were decreased in the investigational group, although only when compared to the healthy women. In PF, we found statistically significant increases in glycodeitin-A, IL-6 and IL-8, and decreases in leptin concentrations in patients with ovarian endometriosis compared to the control groups. The concentrations of MCP-1 were increased in the investigated group, although only in comparison with the healthy women. Glycodeitin-A was significantly increased in the serum and PF of women with ovarian endometriosis, compared to the control groups, with these concentrations increased in both the proliferative and secretory phases of the menstrual cycle. Elevated levels of glycodeitin-A were associated with various types of pain that are typical of endometriosis.

In the second part of the thesis, the BGN was detected in samples of ectopic endometrium from patients with ovarian endometriosis and in samples of benign cysts. Bands with the approximate molecular mass for biglycan of 42 kDa were seen in most of the samples of ectopic endometrium. Proteins with higher molecular masses (from 100 kDa to 250 kDa) were also seen, which represent forms with additional glycosaminoglycan chains. BGN was not detected in samples of eutopic endometrium from healthy women. Our data suggest that BGN is not associated only with ovarian endometriosis, but also with other ovarian pathologies. The BGN concentrations were statistically increased in PF of patients

with ovarian endometriosis, compared to the control groups. When we compared BGN concentrations between ovarian endometriosis patients, patients with benign cysts and healthy women, we detected a statistically significant increase only compared to the healthy women. In the serum samples, we did not detect any statistically significant changes, and the concentrations of BGN were also not associated with the menstrual cycle. Further analysis revealed that decreased BGN concentrations were positively associated with the intensity and frequency of menstrual pain and pain during sexual intercourse.

With the first reagent kit we found decreased PF PLA2G2A concentrations in patients with ovarian endometriosis, compared to the control groups. When we separately compared PLA2G2A concentrations in ovarian endometriosis patients and in patients with benign cysts and in healthy women, there was significant decrease only compared to the healthy women. In serum samples, we did not observe any statistically significant changes in the concentrations of PLA2G2A. Analysis according to the phase of the menstrual cycle showed statistically significantly decreased PF PLA2G2A concentrations in cases compared to controls in the proliferative and secretory phases of the menstrual cycle. Further analysis also revealed that reduced concentrations of PLA2G2A can be associated with different types of pain that are typical of endometriosis. Additional assay performed with the second reagent kit did not show statistical differences between cases and controls neither in serum neither in PF.

We conclude that these selected cytokines, IL-6, IL-8, MCP-1, RANTES, and hormone leptin, and the proteins glycodelin-A, biglycan and PLA2G2A, have important roles in the pathogenesis of endometriosis. These selected proteins are suitable as biomarkers for ovarian endometriosis, as their concentrations are increased or decreased in serum and PF, and their concentrations do not vary with the menstrual cycle, except for those of leptin and IL-8. These proteins might be useful for non-invasive or semi-invasive diagnostics of ovarian endometriosis.

8 VIRI

- Abrao M. S., Podgaec S., Pinotti J. A., de Oliveira R. M. 1999. Tumor markers in endometriosis. International Journal of Gynaecology & Obstetrics, 66: 19–22
- Abu J. I., Konje J. G. 2000. Leukotrienes in gynaecology: the hypothetical value of anti-leucotriene therapy in dysmenorrhoea and endometriosis. Human Reproduction Update, 6: 200-205
- Acien P., Lloret M., Graells M. 1989. Prolactin and its response to the luteinizing hormone-releasing hormone thyrotropin-releasing hormone test in patients with endometriosis before, during, and after treatment with danazol. Fertility and Sterility, 51: 774–780
- Adamyan L. V., Fanchenko N. D., Alexeyeva M. L., Andreyeva Y. N., Novikov Y. A., Jahan I. 1993. Hormonal and immunologic methods in the diagnosis and treatment of patients with benign ovarian tumors and endometriotic cysts. International Journal of Fertility and Menopausal Studies, 38: 92–98
- Agic A., Djalali S., Wolfner M. M., Halis G., Diedrich K., Hornung D. 2008. Combination of CCR1 mRNA, MCP1, and CA125 measurements in peripheral blood as a diagnostic test for endometriosis. Reproductive Science, 15: 906–911
- Akoum A., Lemay A., McColl S. R., Paradis I., Maheux R. 1996. Increased monocyte chemotactic protein-1 level and activity in the peripheral blood of women with endometriosis. Le Groupe d'Investigation en Gynécologie. American Journal of Obstetrics & Gynecology, 175: 1620–1625
- Alviggi C., Clarizia R., Castaldo G., Matarese G., Colucci C. C., Conforti S., Pagano T., Revelli A., De Placido G. 2009. Leptin concentrations in the peritoneal fluid of women with ovarian endometriosis are different according to the presence of a ‘deep’ or ‘superficial’ ovarian disease. Gynecological Endocrinology, 25, 9 : 610-615
- Angstwurm M., Gartner R., Ziegler-Heitbrock H. 1997. Cyclic plasma IL-6 levels during normal menstrual cycle. Cytokine, 9: 370–374
- Arici A., Metalliotakis I., Goumenou A., Koumantakis G., Vassiliadis S., Mahutte N. 2003. Altered expression of interleukin-18 in the peritoneal fluid of women with endometriosis. Fertility and Sterility, 80: 889–894
- Arvidson N. G., Gudbjörnsson B., Elfman L., Ryde'n A. C., Toberman T. H., Hällgren R. 1994. Circadian rhythm of serum interleukin-6 in rheumatoid arthritis. Annals of Rheumatic Diseases, 53: 521–524
- Atlas of Pathophysiology. 2006. 2nd ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 448 str.
- Babelova A., Moreth K., Tsalastra-Greul W., Zeng-Brouwers J., Eickelberg O., Young M. F. 2009. Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. The Journal of Biological Chemistry, 284: 24035-24048
- Baggiolini M., Clark-Lewis I. 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. FEBS Letters, 307: 97–101
- Barcz E., Różewska E. S., Kaminski P., Demkow U., Bobrowska K., Marianowski L. 2002. Angiogenic activity and IL-8 concentrations in peritoneal fluid and sera in endometriosis. International Journal of Gynaecology & Obstetrics, 79, 3: 229-235
- Barcz E., Milewski Ł., Dziunycz P., Kamiński P., Płoski R., Malejczyk J. 2012. Peritoneal cytokines and adhesion formation in endometriosis: an inverse association with

- vascular endothelial growth factor concentration. *Fertility and Sterility*, 97, 6: 1380-1386
- Barrier B. F., Sharpe-Timms K. L. 2002. Expression of soluble adhesion molecules in sera of women with stage III and IV endometriosis. *Journal of the Society Gynecologic Investigation*, 9: 98-101
- Baumann C. K., Bersinger N. A., Birkhauser M. H. 1998. Placental protein 14 and pregnancy-specific beta 1-glycoprotein in women with suppressed, normal and stimulated follicular maturation. *Gynecological Endocrinology*, 12: 231-241
- Beck S., Lambeau G., Scholz-Pedretti K., Gelb M. H., Janssen M. J., Edwards S. H., Wilton D. C., Pfeilschifter J., Kaszkin M. 2003. Potential of tumor necrosis factor alpha-induced secreted phospholipase A2 (sPLA2)-IIA expression in mesangial cells by an autocrine loop involving sPLA2 and peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 29799-29812
- Bedaiwy M. A., Falcone T., Sharma R. K., Goldberg J. M., Attaran M., Nelson D. R., Agarwal A. 2002. Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: A prospective controlled trial. *Human Reproduction*, 17: 426-431
- Bedaiwy M. A., Falcone T., Goldberg J. M., Sharma R. K., Nelson D. R., Agarwal A. 2006. Peritoneal fluid leptin is associated with chronic pelvic pain but not infertility in endometriosis patients. *Human Reproduction*, 21, 3: 788-791
- Bersinger N. A., von Roten S., Wunder D. M., Raio L., Dreher E., Mueller M. D. 2006. PAPP-A and osteoprotegerin, together with interleukin-8 and RANTES, are elevated in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 195, 1: 103-108
- Bersinger N. A., Birkhäuser M. H., Yared M., Wunder D. M. 2009. Serum glycodeolin pattern during the menstrual cycle in healthy young women. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 88, 11: 1215-1221
- Bersinger N. A., Dechaud H., McKinnon B., Mueller M. D. 2012. Analysis of cytokines in the peritoneal fluid of endometriosis patients as a function of the menstrual cycle stage using the Bio-Plex® platform. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 118, 4: 210-218
- Bridges E.M., Harris A.L. 2011. The angiogenic process as a therapeutic target in cancer. *Biochemical Pharmacology*, 81: 1183-1191
- Bulun S. E., Zeitoun K. M., Takayama K., Sasano H. 2000. Estrogen biosynthesis in endometriosis: molecular basis and clinical relevance. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25: 35-42
- Burney R. O., Talbi S., Hamilton A. E., Vo K. C., Nyegaard M., Nezhat C.R. 2007. Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. *Endocrinology*, 148: 3814-3826
- Burney R. O., Giudice L. C. 2012. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertility and Sterility*, 98: 511-519
- Carmona F., Chapron C., Martínez-Zamora M. Á., Santulli P., Rabanal A., Martínez-Florensa M., Lozano F., Balasch J. 2012. Ovarian endometrioma but not deep infiltrating endometriosis is associated with increased serum levels of interleukin-8 and interleukin-6. *Journal of Reproductive Immunology*, 95, 1-2: 80-86
- Chishima F., Hayakawa S., Sugita K., Kinukawa N., Aleemuzzaman S., Nemoto N., Yamamoto T., Honda M. 2002. Increased expression of cyclooxygenase-2 in local

- lesions of endometriosis patients. *American Journal of Reproductive Immunology*, 48: 50–56
- Daniel Y., Geva E., Amit A., Eshed-Englander T., Baram A., Fait G., Lessing J. 2000. Do soluble cell adhesion molecules play a role in endometriosis? *American Journal of Reproductive Immunology*, 43: 160–166
- Darai E., Detchev R., Hugol D., Quang N. T. 2003. Serum and cyst fluid levels of interleukin (IL) -6, IL-8 and tumour necrosis factor-alpha in women with endometriomas and benign and malignant cystic ovarian tumours. *Human Reproduction*, 18: 1681–1685
- De Leon F. D., Vijayakumar R., Brown M., Rao C. V., Yussman M. A., Schultz G. 1986. Peritoneal fluid volume, estrogen, progesterone, prostaglandin, and epidermal growth factor concentrations in patients with and without endometriosis. *Obstetrics & Gynecology*, 68: 189–194
- De Placido G., Alviggi C., Di Palma G., Caravetta C., Matarese G., Landino G., Racioppi L. 1998. Serum concentrations of soluble human leukocyte class I antigens and of the soluble intercellular adhesion molecule-1 in endometriosis: relationship with stage and non-pigmented peritoneal lesions. *Human Reproduction*, 13: 3206–3210
- de Winter J. P., ten Dijke P., de Vries C. J. M., van Achterberg T. A. E., Sugino H., de Waele P., Huylebroeck D., Verschueren K., van den Eijnden-van Raaij A. J. M. 1996. Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 116: 105–114
- Dijkstra B. W., Drenth J., Kalk K. H. 1981. Active site and catalytic mechanism of phospholipase A2. *Nature*, 289: 604–606
- Drosdzol-Cop A., Skrzypulec-Plinta V. 2012. Selected cytokines and glycodelin A levels in serum and peritoneal fluid in girls with endometriosis. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 38, 10: 1245–1253
- Edwards I.J. 2012. Proteoglycans in prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 9: 196–206
- Eyster K. M., Klinkova O., Kennedy V., Hansen K. A. 2007. Whole genome deoxyribonucleic acid microarray analysis of gene expression in ectopic versus eutopic endometrium. *Fertility and Sterility*, 88: 1505–1533
- Fairbanks F., Abrao M. S., Podgaec S., Dias J. A. J., de Oliveira R. M., Rizzo L. V. 2009. Interleukin-12 but not interleukin-18 is associated with severe endometriosis. *Fertility and Sterility*, 91: 320–324
- Fazleabas A. T., Khan-Dawood F. S., Dawood M. Y. 1987. Protein, progesterone, and protease inhibitors in uterine and peritoneal fluids of women with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 47: 218–224
- Ferrero S., Gillott D. J., Remorgida V., Anserini P., Price K., Ragni N., Grudzinskas J. G. 2005. Haptoglobin beta chain isoforms in the plasma and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 83: 1536–1543
- Fisher L. W., Termine J. D., DeJter S. W., Whitson S. W., Yanagishita M., Kimura J. H. 1983. Proteoglycans of developing bone. *The Journal of Biological Chemistry*, 258: 6588–6594
- Fisher L. W., Termine J. D., Young M. F. 1989. Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *The Journal of Biological Chemistry*, 264: 4571–4576

- Flannery C. R. 2006. Usurped SLRPs: novel arthritis biomarkers exposed by catabolism of small leucine-rich proteoglycans? *Arthritis Research & Therapy*, 8: 106-106
- Florio P., Reis F. M., Torres P. B., Calonaci F., Abrao M. S., Nascimento L. L., Franchini M., Cianferoni L., Petraglia F. 2009. High serum follistatin levels in women with ovarian endometriosis. *Human Reproduction*, 24: 2600–2606
- Fu C., Lang J. 2002. Serum soluble E-cadherin level in patients with endometriosis. *Chinese Medical Sciences Journal*, 17: 121–123
- Gadducci A., Cosio S., Carpi A., Nicolini A., Genazzani A. 2004. Serum tumor markers in the management of ovarian, endometrial and cervical cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58: 24–38
- Gazvani M., Christmas S., Quenby S., Kirwan K., Johnson P., Kingsland C. 1998. Peritoneal fluid concentrations of interleukin-8 in women with endometriosis: relationship to stage of disease. *Human Reproduction*, 13: 1957–1961
- Gazvani R., Templeton A. 2002. New considerations for the pathogenesis of endometriosis. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 76: 117-126
- Giudice L. C., Kao L. C. 2004. Endometriosis. *The Lancet*, 364: 1789-1799
- Gmyrek G. B., Sozan'ski R., Jerzak M., Chrobak A., Wickiewicz D., Skupnik A., Sieradzka U., Fortuna W., Gabrys M., Chelmon'ska-Soyta A. 2005. Evaluation of monocyte chemotactic protein-1 levels in peripheral blood of infertile women with endometriosis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 122: 199–205
- Gogacz M., Polak G., Jakowicki J., Kotarski J. 2001. Peritoneal fluid leptin concentration in infertile patients. *Journal of Reproductive Immunology*, 51, 2: 159-165
- Granata F., Petraroli A., Boilard E., Bezzine S., Bollinger J., Del Vecchio L., Gelb M. H., Lambeau G., Marone G., Triggiani M. 2005. Activation of cytokine production by secreted phospholipase A2 in human lung macrophages expressing the M-type receptor. *The Journal of Immunology*, 174: 464–474
- Gungor T., Kanat-Pektaş M., Karayalcin R., Mollamahmutoglu L. 2009. Peritoneal fluid and serum leptin concentrations in women with primary infertility. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 279: 361–364
- Halme J. A., Hammond M. G., Hulka J. F., Raj S., Talbert L. M. 1984. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstetrics & Gynecology*, 64: 333-337
- Hanasaki K., Ono T., Saiga A., Morioka Y., Ikeda M., Kawamoto K., Higashino K., Nakano K., Yamada K., Ishizaki J., Arita H. 1999. Purified group X secretory phospholipase A2 induced prominent release of arachidonic acid from human myeloid leukemia cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 34203–34211
- Hassa H., Tanir H. M., Tekin B., Kirilmaz S. D., Sahin Mutlu F. 2009. Cytokine and immune cell levels in peritoneal fluid and peripheral blood of women with early- and late-staged endometriosis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 279: 891–895
- Hawkins S. M., Creighton C. J., Han D. Y., Zariff A., Anderson M. L., Gunaratne P. H. 2011. Functional microRNA involved in endometriosis. *Molecular Endocrinology*, 25: 821-832
- Hever A., Roth R. B., Hevezi P., Marin M. E., Acosta J. A., Acosta H. 2007. Human endometriosis is associated with plasma cells and overexpression of B lymphocyte stimulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 12451-12456

- Hull M. L., Escareno C. R., Godsland J. M., Doig J. R., Johnson C. M., Phillips S. C. 2008. Endometrial-peritoneal interactions during endometriotic lesion establishment. *The American journal of Pathology*, 173: 700-715
- Iozzo R. V., Schaefer L. 2010. Proteoglycans in health and disease: novel regulatory signaling mechanisms evoked by the small leucine-rich proteoglycans. *FEBS Journal*, 277: 3864-3875
- Iwabe T., Harada T., Sakamoto Y., Iba Y., Horie S., Mitsunari M., Terakawa N. 2003. Gonadotropin-releasing hormone agonist treatment reduced serum interleukin-6 concentrations in patients with ovarian endometriomas. *Fertility and Sterility*, 80, 2: 300-304
- Jee B. C., Suh C. S., Kim S. H., Moon S. Y. 2008. Serum soluble CD163 and interleukin-6 levels in women with ovarian endometriomas. *Gynecologic and Obstetrics Investigation*, 66, 1: 47-52
- Julkunen M., Apter D., Seppala M., Stenman U. H., Bohn H. 1986. Serum levels of placental protein 14 reflect ovulation in nonconceptional menstrual cycles. *Fertility and Sterility*, 45: 47-50
- Kalu E., Sumar N., Giannopoulos T., Patel P., Croucher C., Sherriff E., Bansal A. 2007. Cytokine profiles in serum and peritoneal fluid from infertile women with and without endometriosis. *Journal of Obstetrics & Gynaecology Research*, 33: 490–495
- Khan K. N., Masuzaki H., Fujishita A., Kitajima M., Hiraki K., Miura S., Sekine I., Ishimaru T. 2006. Peritoneal fluid and serum levels of hepatocyte growth factor may predict the activity of endometriosis. *Acta Obstetricia Gynecologica Scandinavica*, 85: 458–466
- Kinugasa S., Shinohara K., Wakatsuki A. 2011. Increased asymmetric dimethylarginine and enhanced inflammation are associated with impaired vascular reactivity in women with endometriosis. *Atherosclerosis*, 219, 2: 784-768
- Kishimoto T., Akira S., Narazaki M., Taga T. 1995. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*, 86: 1243–1254
- Kitaya K., Yasuo T. 2009. Dermatan sulfate proteoglycan biglycan as a potential selectin L/CD44 ligand involved in selective recruitment of peripheral blood CD16(-) natural killer cells into human endometrium. *Journal of Leukocyte Biology*, 85: 391-400
- Klemt P. A. B., Carver J. G., Koninckx P., McVeigh E. J., Ardon H. J. 2007. Endometrial cells from women with endometriosis have increased adhesion and proliferative capacity in response to extracellular matrix components: towards a mechanistic model for endometriosis progression. *Human Reproduction*, 22: 3139–3147
- Kocbek V., Vouk K., Mueller M. D., Rižner T. L., Bersinger N. A. 2013. Elevated glycodelin-A concentrations in serum and peritoneal fluid of women with ovarian endometriosis. *Gynecological Endocrinology*, 29, 5: 455-459
- Koike H., Egawa H., Ohtsuka T., Yamaguchi M., Ikenoue T., Mori N. 1992. Correlation between dysmenorrheic severity and prostaglandin production in women with endometriosis. *Prostaglandins. Leukotriens and Essential Fatty Acids*, 46: 133–137
- Kondera-Anasz Z., Sikora J., Mielczarek-Palacz A., Jonca M. 2005. Concentrations of interleukin (IL)-1alpha, IL-1 soluble receptor type II (IL-1 sRII) and IL-1 receptor antagonist (IL-1 Ra) in the peritoneal fluid and serum of infertile women with endometriosis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 123: 198–203

- Koninckx P. R., Riittinen L., Seppala M., Cornillie F. J. 1992. CA-125 and placental protein 14 concentrations in plasma and peritoneal fluid of women with deeply infiltrating pelvic endometriosis. *Fertility and Sterility*, 57: 523-530
- Koumantakis E., Matalliotakis I., Neonaki M., Froudarakis G., Georgoulias V. 1994. Soluble serum interleukin-2 receptor, interleukin-6 and interleukin-1a in patients with endometriosis and in controls. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 255, 3: 107-112
- Koyama N., Matsuura K., Okamura H. 1993. Cytokines in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *International Journal of Gynaecology & Obstetrics*, 43, 1: 45-50
- Kyama M. C., Debrock S., Mwenda J. M., D'Hooghe T. M. 2003. Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1: 123-131
- Laird S. M., Tuckerman E., Li T. C., Bolton A. E. 1994. Stimulation of human endometrial epithelial cell interleukin 6 production by interleukin 1 and placental protein 14. *Human Reproduction*, 9:1339-1343
- Lanišnik Rižner T. 2009. Estrogen metabolism and action in endometriosis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 307: 8-18
- Lindstrom T., Bennett P. 2004. Transcriptional regulation of genes for enzymes of the prostaglandin biosynthetic pathway. *Prostaglandins, Leukotriens ad Essential Fatty Acids*, 70: 115–135
- Lousse C. J., Defrere S., Colette S., Van Langendonck A., Donnez J. 2010. Expression of eicosanoid biosynthetic and catabolic enzymes in peritoneal endometriosis. *Human Reproduction*, 25, 3: 734-741
- Mahutte N. G., Matalliotakis I. M., Goumenou A. G., Vassiliadis S., Koumantakis G. E., Arici A. 2003. Inverse correlation between peritoneal fluid leptin concentrations and the extent of endometriosis. *Human Reproduction*, 18, 6: 1205-1209
- Malhotra N., Karmakar D., Tripathi V., Luthra K., Kumar S. 2012. Correlation of angiogenic cytokines-leptin and IL-8 in stage, type and presentation of endometriosis. *Gynecological Endocrinology*, 28, 3: 224-227
- Markham S. M., Carpenter S.E., Rock J.A. 1989. Extrapelvic endometriosis. *Obstetrics & Gynecology Clinics of North America*, 16: 193-219
- Markham R., Fraser I. S., Song J. Y., Young L., Chullapram T. 1997. Blood and peritoneal fluid concentrations of TNFalpha and RANTES in patients with and without endometriosis. *Australian Journal of Medical Science*, 18: 116–118
- Markowska J., Kowalska M., Gogacz M., Lubin J., Markowski M., Kamińska J. 2004. Cytokines and endometriosis. *Clinical & Experimental Obstetrics & Gynecology*, 31, 4: 269-270
- Martinez S., Garrido N., Coperias J. L., Pardo F., Desco J., Garcia-Velasco J. A., Simon C., Pellicer A. 2007. Serum interleukin-6 levels are elevated in women with minimal-mild endometriosis. *Human Reproduction*, 22: 836–842
- Matalliotakis I., Panidis D., Vlassis G., Vavilis D., Neonaki M., Koumantakis E. 1996. PRL, TSH and their response to the TRH test in patients with endometriosis before, during, and after treatment with danazol. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 42: 183–186
- Matalliotakis I., Neonaki M., Zolindaki A., Hassan E., Georgoulias V., Koumantakis E. 1997. Changes in immunologic variables (TNF-a, sCD8 and sCD4) during danazol

- treatment in patients with endometriosis. *International Journal of Fertility and Women's Medicine*, 42: 211–214
- Matalliotakis I., Panidis D., Vlassis G., Neonaki M., Goumenou A., Koumantakis E. 1998. Unexpected increase of the CA 19-9 tumour marker in patients with endometriosis. *European Journal Gynaecological Oncology*, 19: 498–500
- Matalliotakis I. M., Koumantaki Y. G., Neonaki M. A., Goumenou A. G., Koumantakis G. E., Kyriakou D. S., Koumantakis E. E. 2000. Increase in serum leptin concentrations among women with endometriosis during danazol and leuprorelin depot treatments. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 183, 1: 58-62
- Matalliotakis I. M., Vassiliadis S., Goumenou A. G., Athanassakis I., Koumantakis G. E., Neonaki M. A., Koumantakis E. E. 2001. Soluble ICAM-1 levels in the serum of endometriotic patients appear to be independent of medical treatment. *Journal of Reproductive Immunology*, 51: 9–19
- Matalliotakis I. M., Goumenou A. G., Koumantakis G. E., Athanassakis I., Dionyssopoulou E., Neonaki M. A., Vassiliadis S. 2003. Expression of serum human leukocyte antigen and growth factor levels in a Greek family with familial endometriosis. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 10: 118–121
- Matarese G., Alviggi C., Sanna V., Howard J. K., Lord G. M., Caravetta C., Fontana S., Lechler R. I., Bloom S. R., De Placido G. 2000. Increased leptin levels in serum and peritoneal fluid of patients with pelvic endometriosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85: 2483–2487
- Matarese G., De Placido G., Nikas Y., Alviggi C. 2003. Pathogenesis of endometriosis: natural immunity dysfunction or autoimmune disease? *Trends in Molecular Medicine*, 9: 223-228
- Mathur S. P., Lee J. H., Jiang H., Arnaud P., Rust P. F. 1999. Levels of transferrin and alpha 2-HS glycoprotein in women with and without endometriosis. *Autoimmunity*, 29: 121–127
- Matsuzaki S., Canis M., Darcha C., Dechelotte P., Pouly J., Mage G. 2006. Expression of WT1 is down-regulated in eutopic endometrium obtained during the midsecretory phase from patients with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 86: 554–558
- May K. E., Conduit-Hulbert S. A., Villar J., Kirtley S., Kennedy S. H., Becker C. M. 2010. Peripheral biomarkers of endometriosis: a systematic review. *Human Reproduction Update*, 6, 6: 651-674
- Mihalyi A., Gevaert O., Kyama C. M., Sims P., Pochet N., De Smet F., De Moor B., Meuleman C., Billen J., Blanckaert N., Vodolazkaia A., Fulop V., D'Hooghe T. M. 2010. Non-invasive diagnosis of endometriosis based on a combined analysis of six plasma biomarkers. *Human Reproduction*, 25, 3: 654-664
- Mizumoto H., Saito T., Ashihara K., Nishimura M., Takehara M., Tanaka R. 2002. Expression of metalloproteinases in ovarian endometriomas: immunohistochemical study and enzyme immunoassay. *Life Sciences*, 71: 259–273
- Molo M. W., Kelly M., Radwanska E., Binor Z. 1994. Preoperative serum CA-125 and CA-72 in predicting endometriosis in infertility patients. *The Journal of Reproductive Medicine*, 39: 964–966
- Murakami M. in Kudo I. 2004. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. *Progress in Lipid Research*, 43: 3–35
- Murphy A. A. 2002. Clinical aspects of endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 955: 1-9

- Nagase H., Visse R., Murphy G. 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMP. *Cardiovascular Research*, 69: 562–573
- Nácul A. P., Lecke S. B., Edelweiss M. I., Morsch D. M., Spritzer P. M. 2013. Gene expression of leptin and long leptin receptor isoform in endometriosis: a case-control study. *Obstetrics and Gynecology International*, 2013: 879618-879618
- Nap A. W., Groothuis P. G., Demir A. Y., Evers J. L., Dunselman G. A. 2004. Pathogenesis of endometriosis. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 18: 233-244
- Nastase M. V., Young M. F., Scaefer L. 2012. Biglycan: A Multivalent Proteoglycan Providing Structure and Signals. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 60: 963-975
- Neame P. J., Choi H. U., Rosenberg L. C. 1989. The isolation and primary structure of a 22-kDa extracellular matrix protein from bovine skin. *The Journal of Biological Chemistry*, 264: 5474-5479
- Nisolle M., Donnez J. 1997. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertility and Sterility*, 68: 585–596
- Ohata Y., Harada T., Miyakoda H., Taniguchi F., Iwabe T., Terakawa N. 2008. Serum interleukin-8 levels are elevated in patients with ovarian endometrioma. *Fertility and Sterility*, 90: 994–999
- Okamura Y., Watari M., Jerud E. S., Young D. W., Ishizaka S. T., Rose J. 2001. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 10229-10233
- Olive D. L., Barrie Schwartz L. 1993. Endometriosis. *New England Journal of Medicine*, 328: 1759–1769
- Ota H., Igarashi S., Sasaki M., Tanaka T. 2001. Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Human Reproduction*, 16: 561–566
- Othman E. E. D., Hornung D., Salem H. T., Khalifa E. A., El-Metwally T. H., Al-Hendy A. 2008. Serum cytokines as biomarkers for nonsurgical prediction of endometriosis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 137: 240–246
- Pandey N., Kriplani A., Yadav R. K., Lyngdoh B. T., Mahapatra S. C. 2010. Peritoneal fluid leptin levels are increased but adiponectin levels are not changed in infertile patients with pelvic endometriosis. *Gynecological Endocrinology*, 26, 11: 843-849
- Park P. W., Pier G. B., Hinkes M. T., Bernfield M. 2001. Exploitation of syndecan-1 shedding by *Pseudomonas aeruginosa* enhances virulence. *Nature*, 411: 98-102
- Pellicer A., Albert C., Mercader A., Bonilla-Musoles F., Remohl J., Simon C. 1998. The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. *Fertility and Sterility*, 70: 425–431
- Pizzo A., Salmeri F. M., Arditia F. V., Sofo V., Tripepi M., Marsico S. 2002. Behaviour of cytokine levels in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 54: 82–87
- Podgaec S., Rizzo L. V., Fernandes L. F., Baracat E. C., Abrao M. S. 2012. CD4(+) CD25(high) Foxp3(+) cells increased in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *American Journal of Reproductive Immunology*, 68, 4: 301-308

- Radwanska E., Henig I., Dmowski W. 1987. Nocturnal prolactin levels in infertile women with endometriosis. *The Journal of Reproductive Medicine*, 32: 605–608
- Ricciotti E., FitzGerald G. 2011. Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31: 986-1000
- Rizzo M. T., Nguyen E., Aldo-Benson M., Lambeau G. 2000. Secreted phospholipase A2 induces vascular endothelial cell migration. *Blood*, 96: 3809–3815
- Ryan I. P., Tseng J. F., Schriock E. D., Khorram O., Landers D. V., Taylor R. N. 1995. Interleukin-8 concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 63, 4: 929-932
- Sales K., Jabbour H. 2003. Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in pathology of the endometrium. *Reproduction*, 126: 559–567
- Sano M., Morishita T., Nozaki M., Yokoyama M., Watanabe Y., Nakano H. 1994. Elevation of the phospholipase A2 activity in peritoneal fluid cells from women with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 61: 657–662
- Schaefer L., Iozzo R. V. 2008. Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry*, 283: 21305-21309
- Schaefer L., Babelova A., Kiss E., Hausser H. J., Baliova M., Krzyzankova M. 2005. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *The Journal of Clinical Investigation*, 115: 2223-2233
- Schaloske R. H., Dennis E. A. 2006. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1761: 1246–1259
- Schindler A. E. 2011. Dienogest in long-term treatment of endometriosis. *International Journal of Women's Health*, 3, 175-184
- Scholl B., Bersinger N. A., Kuhn A., Mueller M. D. 2009. Correlation between symptoms of pain and peritoneal fluid inflammatory cytokine concentrations in endometriosis. *Gynecological Endocrinology*, 25: 701-706
- Scott D. L., White S. P., Browning J. L., Rosa J. J., Gelb M. H., Sigler P. B. 1991. Structures of free and inhibited human secretory phospholipase A2 from inflammatory exudate. *Science*, 254: 1007–1010
- Scott P. G., Nakano T., Dodd C. M. 1997. Isolation and characterization of small proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1336: 254-262
- Seeber B., Sammel M. D., Fan X., Gerton G. L., Shaunik A., Chittams J., Barnhart K. T. 2008. Panel of markers can accurately predict endometriosis in a subset of patients. *Fertility and Sterility*, 89: 1073–1081
- Seppala M., Bohn H., Tatarinov Y. 1998. Glycodelins. *Tumour Biology*, 19: 213-220
- Shah D. K., Correia K. F., Harris H. R., Missmer S. A. 2013. Plasma adipokines and endometriosis risk: a prospective nested case-control investigation from the Nurses' Health Study II. *Human Reproduction*, 28, 2: 315-321
- Sharpe-Timms K. L., Keisler L. W., McIntush E. W., Keisler D. H. 1998. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 concentrations are attenuated in peritoneal fluid and sera of women with endometriosis and restored in sera by gonadotropin-releasing hormone agonist therapy. *Fertility and Sterility*, 69: 1128–1134
- Singer A. G., Ghomashchi F., Le Calvez C., Bollinger J., Bezzine S., Rouault M., Sadilek M., Nguyen E., Lazdunski M., Lambeau G., Gelb M. H. 2002. Interfacial kinetic and

- binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 48535–48549
- Skogstrand K., Ekelund C. K., Thorsen P., Vogel I., Jacobsson B., Norgaard-Pedersen B., Hougaard D. M. 2008. Effects of blood sample handling procedures on measurable inflammatory markers in plasma, serum and dried blood spot samples. *Journal of Immunological Methods*, 336: 78–84
- Somigliana E., Vigano P., Tirelli A. S., Felicetta I., Torresani E., Vignali M., Di Blasio A. M. 2004. Use of the concomitant serum dosage of CA 125, CA 19-9 and interleukin-6 to detect the presence of endometriosis. Results from a series of reproductive age women undergoing laparoscopic surgery for benign gynaecological conditions. *Human Reproduction*, 19: 1871–1876
- Steff A. M., Gagne D., Page M., Rioux A., Hugo P., Gosselin D. 2004. Serum concentrations of insulin-like growth factor-1, soluble tumor necrosis factor receptor-1 and angiogenin in endometriosis patients. *American Journal of Reproductive Immunology*, 51: 166–173
- Strimbu K., Jorge T. 2010. “What are Biomarkers?”. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5, 6: 463–466
- Szymanowski K. 2007. Apoptosis pattern in human endometrium in women with pelvic endometriosis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 132: 107–110
- Šmuc T., Pucelj M. R., Šinkovec J., Husen B., Thole H., Lanišnik Rižner T. 2007. Expression analysis of the genes involved in estradiol and progesterone action in human ovarian endometriosis. *Gynecological Endocrinology*, 23, 2: 105–111
- Tao Y., Zhang Q., Huang W., Zhu H., Zhang D., Luo W. 2011. The peritoneal leptin, MCP-1 and TNF- α in the pathogenesis of endometriosis-associated infertility. *American Journal of Reproductive Immunology*, 65, 4: 403–406
- Triggiani M., Granata F., Frattini A., Marone G. 2006. Activation of human inflammatory cells by secreted phospholipases A2. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1761: 1289–1300
- Van Langendonck A., Punyadeera C., Kamps R., Dunselman G., Klein-Hitpass L., Schurgers L. J. 2007. Identification of novel antigens in blood vessels in rectovaginal endometriosis. *Molecular Human Reproduction*, 13: 875–886
- Velasco I., Acien P., Campos A., Acien M. I., Ruiz-Macia E. 2010. Interleukin-6 and other soluble factors in peritoneal fluid and endometriomas and their relation to pain and aromatase expression. *Journal of Reproductive Immunology*, 84, 2: 199–205
- Verheij H. M., Volwerk J. J., Jansen E. H. J. M., Puyk W. C., Dijkstra B. W., Drenth J., de Haas G. H. 1980. Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A2. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. *Biochemistry*, 19: 743–750
- Vigano P., Somigliana E., Matrone R., Dubini A., Barron C., Vignali M., di Blasio A. M. 2002. Serum leptin concentrations in endometriosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87: 1085–1087

- Vodolazkaia A., El-Aalamat Y., Popovic D., Mihalyi A., Bossuyt X., Kyama C. M., Fassbender A., Bokor A., Schols D., Huskens D., Meuleman C., Peeraer K., Tomassetti C., Gevaert O., Waelkens E., Kasran A., De Moor B., D'Hooghe T. M. 2012. Evaluation of a panel of 28 biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Human Reproduction*, 27, 9: 2698-2711
- Vouk K., Smuc T., Guggenberger C., Ribič-Pucelj M., Sinkovec J., Husen B., Thole H., Houba P., Thaete C., Adamski J., Rižner T. L. 2011. Novel estrogen-related genes and potential biomarkers of ovarian endometriosis identified by differential expression analysis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 125, 3-5: 231-242
- Wilson T. J., Hertzog P. J., Angus D., Munnery L., Wood E. C., Kola I. 1994. Decreased natural killer cell activity in endometriosis patients: relationship to disease pathogenesis. *Fertility and Sterility*, 62, 5: 1086-1088
- Wu M. H., Yang B. C., Hsu C. C., Lee Y. C., Huang K. E. 1998. The expression of soluble intercellular adhesion molecule-1 in endometriosis. *Fertility and Sterility*, 70: 113-1142
- Wu M. H., Sun H. S., Lin C. C., Hsiao K. Y., Chuang P. C., Pan H. A., Tsai S. J. 2002. Distinct mechanisms regulate cyclooxygenase-1 and -2 in peritoneal macrophages of women with and without endometriosis. *Molecular Human Reproduction*, 8: 1103–1110
- Wu M. H., Tsai S. J., Pan H. A., Hsiao K. Y., Chang F. M. 2003. Three-dimensional power Doppler imaging of ovarian stromal blood flow in women with endometriosis undergoing in vitro fertilization. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 21, 5: 480-485
- Wu M., Shoji Y., Chuang P., Tsai S. 2007. Endometriosis: disease pathophysiology and the role of prostaglandins. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 9: 1-20
- Wunder M. D., Kretschmer R., Bersinger N. A. 2005. Concentrations of leptin and C-reactive protein in serum and follicular fluid during assisted reproductive cycles. *Human Reproduction*, 20, 5: 1266-1271
- Yamaguchi M., Mori N. 1990. Prostaglandin and leukotriene concentration of the peritoneal fluid of endometriosis and other gynecologic disorders in the secretory phase. *Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids*, 39: 43–45
- Yamaguchi T., Kitaya K., Daikoku N., Yasuo T., Fushiki S., Honjo H. 2006. Potential selectin L ligands involved in selective recruitment of peripheral blood CD16(-) natural killer cells into human endometrium. *Biology of Reproduction*, 74: 35-40
- Yan L., Anderson G., DeWitte M., Nakada M. 2006. Therapeutic potential of cytokine and chemokine antagonists in cancer therapy. *Eurorean Journal of Cancer*, 42: 793–802
- Yasuo T., Kitaya K., Yamaguchi T., Fushiki S., Honjo H. 2008. Possible role of hematopoietic CD44/chondroitin sulfate interaction in extravasation of peripheral blood CD16(-) natural killer cells into human endometrium. *Journal of Reproductive Immunology*, 78: 1-10
- Zhang X., Lin J., Deng L., Chen Z., Chen L. 2005. Peritoneal fluid and serum concentration of interleukin-16 in women with endometriosis. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 84: 297–298

ZAHVALA