

# Koncentracija vaskularnoga endotelnog čimbenika rasta, neuropilina 1 i aneksina A2 u serumu bolesnica s endometriozom

---

Barberić, Monika

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:563958>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Monika Barberić

**KONCENTRACIJE VASKULARNOGA  
ENDOTELNOG ČIMBENIKA RASTA,  
NEUROFILINA 1 I ANEKSINA A2 U  
SERUMU BOLESNICA S  
ENDOMETRIOZOM**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Monika Barberić

**KONCENTRACIJE VASKULARNOGA  
ENDOTELNOG ČIMBENIKA RASTA,  
NEUROFILINA 1 I ANEKSINA A2 U  
SERUMU BOLESNICA S  
ENDOMETRIOZOM**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Prof.dr.sc Dunja Rogić

Prof.dr.sc. Dinka Pavičić Baldani

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Monika Barberić

**SERUM CONCENTRATIONS OF  
VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH  
FACTOR, NEUROPILIN-1 AND ANNEXIN  
A2 IN PATIENTS WITH ENDOMETRIOSIS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Professor Dunja Rogić, Ph.D.

Professor Dinka Pavičić Baldani, Ph.D.

Zagreb, 2021.

Zahvaljujem mentoricama prof.dr.sc. Dunji Rogić i prof.dr.sc. Dinki Pavičić Baldani na nesebičnoj pomoći stručnim savjetima i podršci prilikom pisanja rada.

Hvala mojoj obitelji na strpljenju i podršci u trenucima kada je bilo najteže.

*„Vjerujem da smo ono što jesmo postali zahvaljujući lekcijama naših očeva u trenucima kada nisu ni bili svjesni da nas zapravo uče. Oblikovani smo tim malim komadima mudrosti“*

*Umberto Eco*

***Rad posvećujem tati koji sada „od gore“ vidi sve.***

## SAŽETAK

Endometrioza je česta kronična, složena i progresivna ginekološka bolest koja najčešće zahvaća žene reproduktivne dobi. Definirana je nazočnošću i rastom ektopičnog endometrija koji ima histološke značajke normalnog endometrija. Postavljanje dijagnoze endometrioze delikatno je i složeno. Zlatni standard za postavljanje dijagnoze endometrioze danas se smatra laparoskopija uz patohistološku potvrdu. Laparoskopija je invazivni dijagnostički postupak, stoga je broj kliničkih studija usredotočen na otkrivanje neinvazivnih dijagnostičkih postupaka koji bi omogućili postavljanje dijagnoze. Glavni cilj ovog istraživanja bio je ispitati može li određivanje koncentracija vaskularnoga endotelnog čimbenika rasta (VEGF), neuropilina 1 i aneksina A2 u serumu pridonijeti dijagnostici endometrioze. U istraživanju je ispitana i dijagnostičku učinkovitost serumskih koncentracija VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 u razlikovanju zdravih od oboljelih od endometrioze.

U istraživanje je bilo uključeno 200 ženskih osoba, raspona životne dobi od 18 do 39 godina. Serumske koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 određene su u 120 bolesnica s endometriozom i 80 zdravih ispitanica. Serumske koncentracije sva tri analita određene su ELISA metodom (od engl. enzyme-linked immunosorbent assay).

Bolesnice s endometriozom imale su povišene koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2. Koncentracije VEGF-a i aneksina A2 bile su veće u bolesnica koje su imale viši stadij endometrioze i veći broj lokacija zahvaćenih endometriozom. VEGF je pozitivno korelirao s aneksinom A2. Kod bolesnica s pozitivnom obiteljskom anamnezom razdoblje od pojave simptoma do dijagnosticiranja bolesti bilo je kraće. Koncentracije VEGF-a i aneksina A2 bile su veće u bolesnica s endometriozom u kojih je prisutan simptom bola. Rezultati ROC krivulja sva tri analita upućuju na to da neuropilin 1 (AUC = 0,97 kod granične vrijednosti > 11 µg/L) i aneksin A2 (AUC = 0,99 kod granične vrijednosti > 16 µg/L) pokazuju izvrsne, dok VEGF (AUC = 0,89 kod granične vrijednosti > 0,225 µg/L) pokazuje vrlo dobre sposobnosti razlikovanja zdravih od oboljelih od endometrioze. Model koji uključuje neuropilin 1 i aneksin A2 pokazao je jako dobru dijagnostičku učinkovitost u predviđanju endometrioze (AUC 0,99 (95 % CI = 0,97 – 1,00)). Predloženim bi se modelom moglo ispravno odrediti prisutnost endometrioze u 98 % bolesnica.

Bolje razumijevanje molekularnih mehanizama endometrioze koji uključuju VEGF, neuropilin 1 i aneksin A2 moglo bi pomoći u dijagnozi i pronalaženju novih terapijskih meta za endometriozu. Dijagnostičke karakteristike predloženog modela koji kombinira serumske koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 upućuju na to da bi se on mogao koristiti kao vrijedan neinvazivan pristup u razlikovanju zdravih ispitanika od bolesnika s endometriozom.

**Ključne riječi:** endometrioza, angiogeneza, vaskularni endotelni čimbenik rasta, neuropilin 1, aneksin A2

## SUMMARY

**Background:** Endometriosis is a common chronic, complex, and progressive gynecological disease which mainly affects women of reproductive age. It is defined by the presence and growth of ectopic endometrial tissue which has the histological characteristics of the normal endometrium. Researchers agree endometriosis is likely to be polygenic and multifactorial, but the exact pathogenic mechanisms are still unclear. Each theory singularly fails to account for all forms of endometriosis, thereby indicating multifactorial mechanisms. Development can be divided into five basic processes: adhesion, invasion, recruiting, angiogenesis, and proliferation. Genetics, biomolecular aberrations in the eutopic endometrium, dysfunctional immune response, peritoneal environment may all ultimately be involved. The most common symptoms are dysmenorrhea, dyspareunia, and lower back pain that worsens during menses. Depending on the location of the implants, rectal pain and painful defecation may also occur. The diagnosis of endometriosis should be considered especially if a patient develops dysmenorrhea after years of pain-free menstrual cycles. Infertility may also be the presenting complaint. Clinically, endometriosis should be considered in any woman of reproductive age with pelvic pain or infertility. However, since symptoms are often nonspecific, the disease may be misdiagnosed as other clinical conditions characterized by chronic pelvic pain (irritable bowel syndrome, interstitial cystitis/painful bladder syndrome, recurrent cystitis/overactive bladder), thus leading to inadequate treatment and considerable diagnostic delay. The diagnosis of endometriosis is delicate and complex, the 'gold standard' for a definitive diagnosis is laparoscopy with biopsy and histological analysis. Laparoscopy is the invasive diagnostic procedure, therefore, huge number of clinical studies have been focused on detection of non-invasive diagnostic procedures that would facilitate the diagnosis.

**Aim:** The main aim of this study was to examine whether the determination of vascular endothelial growth factor (VEGF), Neuropilin 1 and Annexin A2 concentrations in serum may contribute to the diagnosis of endometriosis. The diagnostic accuracy of VEGF, Neuropilin 1 and Annexin A2 in distinguishing between healthy subjects and patients with endometriosis was also evaluated.

**Participants and methods:** A total of 200 women aged 18–39 years were included in the results of this study. Preoperative serum samples were obtained after written informed



consent from 200 candidates for laparoscopic surgery due sterilisation and suspected endometriosis based on ultrasound vaginal probe, clinical examination, infertility, medical history. Our exclusion criteria for all groups were as follows: pregnancy before surgery or 6 months after surgery, active pelvic inflammatory disease, any anti-inflammatory or hormonal or immunomodulatory medications use in the preceding 3 months, genital or any extragenital malignant disease, polycystic ovaries, cysts, adenomyosis, fibroids, other defined causes of infertility, use of oral contraceptives or gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH) analogues, chronic or acute genital disease except endometriosis, history of any medical problem (e.g., endocrine abnormalities, gastrointestinal, cardiovascular, and pulmonary system diseases), any systemic diseases (e.g., chronic or acute inflammatory disease, autoimmune disorders, hepatic or renal insufficiency). Candidates were divided into groups (endometriosis and control). Endometriosis group was comprised of 120 patients with endometriosis diagnosed by laparoscopy or laparotomy and confirmed by histopathological examination. Finally, endometriosis group comprised 120 patients divided into 3 groups; the first group (stage II endometriosis group) comprised 50 patients; while the second group (stage III endometriosis group) comprised 62 patients and the third group comprised 8 patients diagnosed with stage IV endometriosis, respectively, according to rASRM classification. Eighty healthy women who were undergoing laparoscopy because of sterilization were the control group. Serum concentrations of VEGF, Neuropilin 1 and Annexin A2 were determined in 120 patients with endometriosis and 80 healthy subjects. Blood samples were taken from all women undergoing laparoscopy half an hour before the induction of anesthesia, for the collection of serum. Five millilitres of venous blood were aseptically collected and left to coagulate, after which samples were centrifuged for 15 min at 2000 g and the serum was separated in a sterile tube. One test tube for all subjects (for VEGF and ANXA2) was centrifuged after 30 minutes, and the NRP1 tube was centrifuged two hours after were aseptically collected. Serum concentrations of all three analytes were assayed by a standardised sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

**Results:** Higher VEGF, Neuropilin 1 and Annexin A2 concentrations were found in patients with endometriosis. Significant differences were detected between control (VEGF= 0,214 (0,201 – 0,230)  $\mu\text{g/L}$ ,  $p < 0.0001$ ; NRP1 = 8.2 (7.3 – 9.4)  $\mu\text{g/L}$ ,  $p < 0.0001$ ; ANXA2 = 12,4 (10,2 – 13,4)  $\mu\text{g/L}$ ,  $p < 0.0001$ ) and endometriosis groups (VEGF= 0,254 (0,231 – 0,268)  $\mu\text{g/L}$ ,  $p < 0.0001$ ; NRP1 = 27,1 (25,6 – 28,1)  $\mu\text{g/L}$ ,  $p < 0.0001$ ; ANXA2 = 29,1 (21,3 – 35,6)  $\mu\text{g/L}$ ,  $p < 0.0001$ ) in terms of VEGF, NRP1 and ANXA2 levels. VEGF and Annexin A2

concentrations showed a statistically significant difference depending on the severity of the disease and a number of locations affected by endometriosis. There were no significant correlations between VEGF and Neuropilin 1 also between Neuropilin 1 and Annexin A2 in patients with endometriosis. Annexin A2 were positively associated with VEGF ( $r=0,73$ ;  $p<0,001$ ) in patients with endometriosis. Patients with a positive family history had a shorter time period in diagnosing the disease. VEGF and Annexin A2 concentrations were higher in patients with endometriosis in whom a symptom of pain was present. The results of the ROC curves of all three analytes indicate that Neuropilin 1 (AUC = 0.97 at the cut-off value  $> 11 \mu\text{g} / \text{L}$ ) and Annexin A2 (AUC = 0.99 at the cut-off value  $> 16 \mu\text{g} / \text{L}$ ) showed excellent, while VEGF (AUC = 0.89 at a cut-off value  $> 0.225 \mu\text{g} / \text{L}$ ) showed very good ability to distinguish between healthy and endometriosis patients. The model combining Neuropilin 1 and Annexin A2 demonstrated diagnostic performances (AUC (95%CI) = 0,96 (0,92 – 0,99)). The proposed model correctly identifies 98 % of patients with endometriosis.

**Conclusions:** In complex diseases such as endometriosis, due to the complexity of the pathophysiological background, it is unlikely that a single marker will reflect the changes and predict the outcome of the disease. A diagnostically non-invasive marker of endometriosis is needed to make a diagnosis, guide targeted treatment, and monitor activity and therapeutic response at all stages of the disease. Since it cannot yet be concluded that all pathophysiological processes in the development of endometriosis are known, markers need constant reevaluation and retrospective studies to justify their use. Improved understanding of the molecular mechanisms of endometriosis pathogenesis involving VEGF, Neuropilin 1 and Annexin A2 could help identifying novel targets for diagnosis and therapeutic interventions in endometriosis. Diagnostic characteristics of the proposed model, obtained by combining serum concentrations of VEGF, Neuropilin 1 and Annexin A2 suggested potential value as a noninvasive approach in endometriosis diagnosis.

**Key words:** endometriosis, angiogenesis, vascular endothelial growth factor, Neuropilin 1, Annexin A2

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Endometrioza .....	1
1.1.1 Etiologija i patogeneza endometrioze .....	2
1.1.2 Klinička slika i stadiji.....	5
1.1.3 Dijagnostički postupci.....	10
1.1.4 Medikamentno liječenje .....	15
1.2 Vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF).....	23
1.3 Neuropilin 1.....	25
1.4 Aneksin A2.....	28
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	30
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	32
3.1 Ispitanice .....	32
3.2 Uzorci .....	34
3.3 Metode.....	35
3.3.1 Određivanje koncentracije VEGF-a .....	36
3.3.2 Određivanje koncentracije neuropilina 1 .....	38
3.3.3 Određivanje koncentracije aneksina A2.....	39

3.4 Statistička analiza .....	40
4. REZULTATI.....	42
4.1 Opće karakteristike ispitanica .....	42
4.2 Koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 između dviju skupina ispitanica.	44
4.3 Koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 s obzirom na stadij endometrioze .....	46
4.4 Koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 u skupini s endometriozom s obzirom na broj lokacija ektopičnog endometrija.....	48
4.5 Koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 u bolesnica s endometriozom s obzirom na prisutnost bola kao simptoma.....	49
4.6 Vrijeme postavljanja dijagnoze endometrioze i pozitivne obiteljske anamneze u bolesnica s endometriozom .....	50
4.7 Koncentracija VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 u bolesnica s endometriozom ovisno o indeksu tjelesne mase (ITM) .....	51
4.8 Korelacije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 u bolesnica s endometriozom.....	52
4.9 Dijagnostička točnost VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 .....	53
4.10 Matematički modeli za predviđanje endometrioze .....	55
5. RASPRAVA.....	57
6. ZAKLJUČCI.....	67
7. LITERATURA.....	69

8.	POPIS KRATICA .....	87
9.	ŽIVOTOPIS .....	89

## 1. UVOD

### 1.1. Endometrioza

Endometrioza je kronična benigna ginekološka bolest za koju je karakteristična nazočnost i rast endometrijskog tkiva izvan maternice. Ektopično endometrijsko tkivo ponaša se kao normalni endometrij i najčešće se nalazi u zdjelištu, na površini jajnika, duboko u tkivu zdjelice, u ligamentima i mišićima zdjelice i potrbušnici (1). Zahvaćeni mogu biti i crijeva, mokraćovod, a opisani su i slučajevi endometrioze na plućima (2). Ektopično endometrijsko tkivo smješteno u miometriju naziva se adenomioza.

Učestalost endometrioze u žena reproduktivne dobi jest 10 – 15 %, a najpoznatija epidemiološka istraživanja upućuju na učestalost endometrioze od 6 – 10 % u općoj populaciji i 20 – 40% u neplodnih žena. Endometrioza se nalazi i u oko 70 % žena sa zdjeličnim bolom (3).

U dosadašnjim istraživanjima u rizične čimbenike za nastanak endometrioze ubrajaju se kraći menstrualni ciklusi, ranije menarhe, menoragija, subfertilnost i neplodnost, iznad prosječna tjelesna visina, nuliparitet, dismenoreja te pretjerano konzumiranje alkohola i kofeina (4).

Poražavajuća je činjenica višegodišnje kašnjenje s postavljanjem dijagnoze. Podaci govore kako u prosjeku prođe 6 – 7 godina od početka pojave prvih simptoma do postavljanja dijagnoze i početka liječenja (4). Iako endometrioza može biti i asimptomatska u 10 % žena, kod većine bolesnica javljaju se dismenoreja, kronični zdjelični bol, dishezija, dispaurenija, umor, iscrpljenost, bolna ovulacija, nadutost, mučnine, glavobolje i neplodnost (5). Simptomi mogu biti složeni ovisno o lokalizaciji ektopičnoga endometrijskog tkiva, a javljaju se ciklički, s pogoršanjem u vrijeme oko menstrualnog krvarenja. Svi navedeni simptomi, ovisno o težini bolesti i lokalizaciji ektopičnoga endometrijskog tkiva, dovode i do fizičkih i do psihičkih smetnji oboljelih žena, čime izravno utječu ne samo na njihovu kvalitetu života, nego i zajednice u kojoj žive (6).

Iako se endometrioza spominje u zapisima još iz daleke 1690. godine, patogenetski mehanizam ni do danas još uvijek nije u potpunosti razjašnjen te predstavlja izazov suvremenoj medicini. Endometrioza nije enigma samo po pitanju etiologije – ona je dodatno trajni izazov u dijagnostici s obzirom na to da ne postoje neinvazivni biološki biljezi koji bi s odgovarajućom dijagnostičkom točnošću upućivali na endometriozu ili omogućili praćenje tijeka bolesti.

### **1.1.1 Etiologija i patogeneza endometrioze**

Sva dosadašnja istraživanja o endometriozi pokušala su pronaći odgovor na ključna pitanja o podrijetlu i stvaranju ektopičnog tkiva endometrija. Usprkos velikom broju studija i kliničkih ispitivanja nisu pronađeni konkretni odgovori na ključna pitanja, ali su doveli do nastanka velikog broja teorija o patogenezi ove kronične bolesti. Točna etiologija endometrioze i dalje je nepoznata, a od mnoštva teorija samo je manji broj prihvaćen i na njima se temelje današnja istraživanja. Prva i najstarija prihvaćena teorija potječe od Johna Sampsona (7). Sampson je predložio implantacijsku teoriju koja pretpostavlja da tijekom menstrualnog krvarenja endometrijsko tkivo skupa s krvlju retrogradnim refluksom kroz jajovode dospijeva u trbušnu šupljinu gdje dolazi do implantacije i nastanka ektopičnog endometrija (7). Implantacijska teorija potaknula je niz pitanja, ali i istraživanja kako bi se proširila i podržala novim dokazima, no pritom je došlo i do razvoja ostalih teorija. Zanimljiva je činjenica da je u 70 do 90 % žena dokazana retrogradna menstruacija, ali sve ne obolijevaju od endometrioze. Dodatno, Sampsonova teorija donekle može objasniti ektopični endometrij na jajnicima, potrbušnici i zdjelici, ali ostaje otvoreno pitanje podrijetla endometrioze na ostalim organima kao što su crijeva, pluća, mozak ili na ožiljku carskog reza (8,9).

Mayerova teorija celomske metaplazije temelji se na rezultatima istraživanja prema kojima je endometrioza posljedica metaplazije stanica zdjelične potrbušnice (10). Ova teorija podržava embriološke studije koje se temelje na podacima koji govore o zajedničkom podrijetlu germinativnog epitela, Müllerovih kanalića i zdjeličnog epitela, pri čemu zajedničku poveznicu čini celomski epitel. Teorija celomske metaplazije mogla je na određen način objasniti nastajanje ektopičnog endometrija i na drugim mjestima, a ne samo na jajnicima, zdjelici i potrbušnici. Zbog nepotpunoga znanstvenog objašnjenja, a i zbog premalo

učinjenih istraživanja ova teorija nije u potpunosti zaživjela. Levander i Normann tvorci su indukcijske teorije endometrioze prema kojoj je sam endometrijsko tkivo koje oslobađa specifični čimbenik koji aktivira nediferencirane mezenhimne stanice i potiče njihovu diferencijaciju u tkivo endometrioze (11).

Unatoč mnogobrojnim teorijama o patogenezi endometrioze zaključak je da ni jedna teorija sama za sebe ne objašnjava na zadovoljavajući način patogenezu endometrioze. Danas je prihvaćeno mišljenje kako je za patogenezu endometrioze odgovoran niz međusobno povezanih imunoloških, hormonskih, genetičkih, okolišnih i anatomskih čimbenika (slika 1.).

Na staničnoj razini glavna promjena u endometriozi karakterizirana je međusobno povezanom staničnom proliferacijom, upalom i angiogenezom, a prouzročene su promjenama u hormonskoj signalizaciji koja ovisi o kontinuiranoj aktivaciji putova ovisnih o estradiolu te o progesteronu (12).

Poremećena homeostaza hormona u endometriozi najviše pridonosi promjenama u staničnim funkcijama kao što su proliferacija, adhezija, diferencijacija, izmijenjeni imunološki klirens, neurogeneza, angiogeneza, nastanak bola, metabolizam i upala (13).

Uzimajući u obzir teoriju retrogradne menstruacije kao potencijalnog početka endometrioze predloženo je da neoštećene stromalne stanice iz menstrualnog sadržaja dopijevaju u prostor potrbušnice i imaju sposobnost prijanjanja odnosno tzv. adhezije na potrbušnicu s pomoću staničnih receptora, integrina koji su pak u interakciji s membranskim adhezijskim molekulama izvanstaničnog matriksa poput fibronektina i laminina (14, 15).

Pokazalo se kako nakon početne adhezije stanice endometrija nastanjuju potrbušnicu, što je moguće s pomoću metaloproteinaze matriksa (MMP) koja razgrađuje bazalnu laminu u čijem se sadržaju nalaze laminin, fibronektin i kolagen koji pak omogućuju preoblikovanje okolnog tkiva (16). Istraživanja su pokazala kako estradiol potiče stanično preživljavanje onesposobljavanjem čimbenika tumorske nekroze (engl. TNF, *tumor necrosis factor*) koji inače sudjeluje u apoptozi (17), potiče staničnu proliferaciju uz sudjelovanje čimbenika rasta i poticanje epitelno-mezenhimskog prijelaza koji pridonosi stvaranju kolagena i nastajanju fibroze (18).



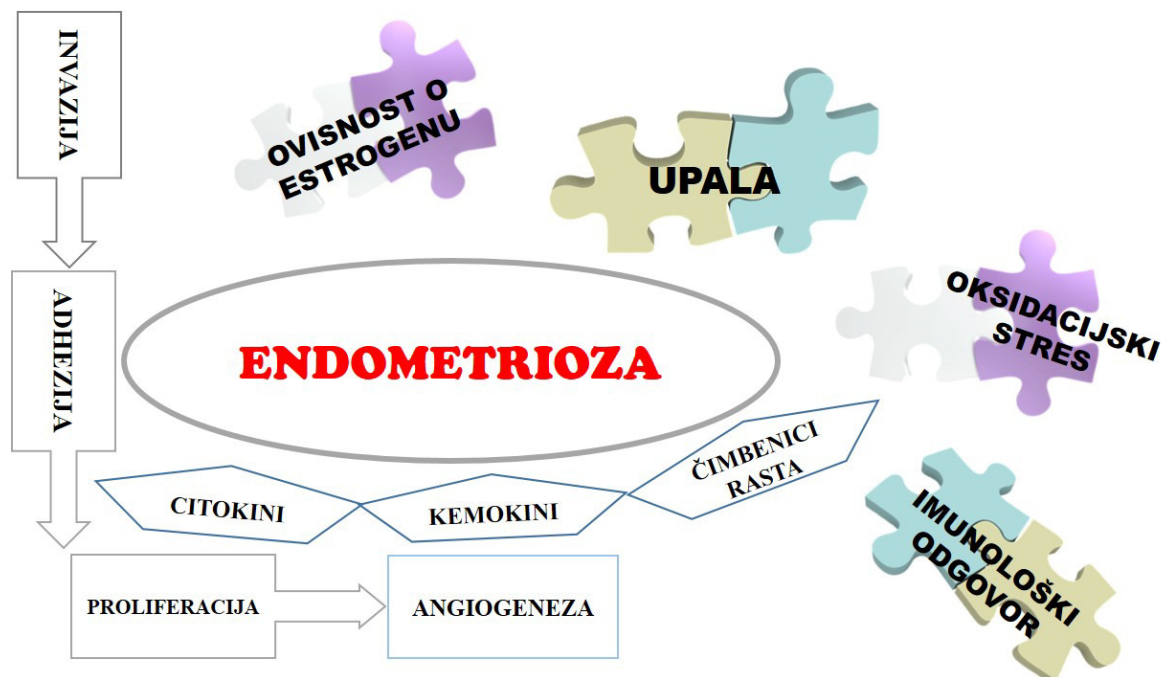
Studije su pokazale kako je pogodno imunološko okruženje potrbušnice uključeno u patogenezu endometrioze (19). Imunosni je sustav žena s endometriozom izmijenjen i nije u mogućnosti ukloniti ektopično endometrijsko tkivo zbog oštećene upalne funkciju i smanjene fagocitne aktivnosti makrofaga (20) te rezistencije ektopičnoga endometrijskog tkiva na liziranje prirodnim stanicama ubojicama (engl. NKs, *natural killer cells*) (21).

U trenutku kada se odvija invazija koordinirano se aktiviraju angiogeneza i neurogeneza. Angiogeneza omogućava održavanje lezija opskrbljujući ih funkcionalnim krvnim žilama. U tom procesu važnu ulogu igraju razni čimbenici rasta i provaskularni čimbenici poput vaskularnoga endotelnog čimbenika rasta (VEGF) koji je reguliran estradiolom i reagira na upalno okruženje potičući proliferaciju endotelnih stanica (22,23). Neurogeneza je povezana i s upalnim odgovorom i angiogenezom te zajedno s neravnotežom u osjetilnoj i simpatičkoj inervaciji pridonosi rastu živčanih vlakana, naknadnoj perifernoj neurološkoj upali i nastajanju kroničnog bola (24).

Jedna od potvrđenih posljedica aktivacije imunosnih stanica u mikrookruženju endometrioze jest proizvodnja citokina, čimbenika rasta i eikozanoida (spojeva građenih od 20 atoma ugljika: prostaglandina, leukotriena, tromboksana, lipoksina ili hidroksieikozatetraenske kiseline) koji istodobno stimuliraju sve potrebno za neoangiogenezu (25).

Za preživljavanje, implantaciju i proliferaciju ektopičnog endometrija ključni su i limfociti, a među najzahvaćenijim limfocitima u endometriozu jesu T-stanice (26). Efektorske T-stanice pokazuju sniženu aktivnost, dok su pomoćne T-stanice općenito povećane i sudjeluju u lučenju visoke razine citokina (27,28).

Promjene u mehanizmu sazrijevanja, infiltracije i funkcije imunosnih stanica na lokalnoj i sistemske razini endometrioze potpomognute su modifikacijom molekularnoga i biokemijskog okruženja koji zajednički sudjeluju u progresiji bolesti.



**Slika 1.** Prikaz složenosti patofiziologije endometrioze

### 1.1.2 Klinička slika i stadiji

Klinička slika endometrioze uključuje simptome koji se javljaju kod oboljelih žena. Kao što je ranije spomenuto, simptomi su bolna menstrualna krvarenja, neplodnost, umor, iscrpljenost, napuhnutost, mučnine, glavobolja. Bol se zna javljati ciklički par dana prije početka menstruacije, pojačava se do početka krvarenja, a nakon toga dolazi do postupnog smanjenja bola. Ektopični endometrij reagira na hormonsku stimulaciju i krvari kao i normalan endometrij za vrijeme menstruacije. Krv koja se nakuplja lokalno na mjestu i oko mjesta ektopične lezije izaziva oteklinu i upalu s pojavom citokina (29).

Sam bol mogu izazvati i priraslice koje poput ožiljaka nastaju na organima u zdjelici i izazivaju dislokaciju organa. Priraslice mogu poput mreže spojiti jajnik, jajovod, maternicu i rektum i na taj način prouzročiti bolove koji se javljaju neovisno o menstruaciji.

Žene s endometriozom potrbušnice mogu imati asimptomatsku endometriozu, dok je pak endometrioza smještena duboko u zdjelici praćena bolovima u zdjelici, dismenorejom, dispaurenijom, simptomima od strane mokraćnog sustava i neplodnošću (30). Zdjelični bol češće se javlja kronično nego ciklično.

Ključnu ulogu u hiperalgeziji i stvaranju bola ima stvorena senzorna inervacija koju stvaraju živčana vlakna nastala u području lezija endometrioze. Duboke infiltrirajuće lezije imaju veću gustoću živčanih vlakana u odnosu na lezije u potrbušnici i jajnicima. Zapravo, duboko infiltrirane lezije koje se stvaraju na crijevima imaju najgušću mrežu živčanih vlakana od svih tipova lezija koje se javljaju u endometriozu, što ujedno korelira s velikom učestalošću bola koja je zabilježena kod bolesnica s endometriozom (31).

S kliničke strane, endometriozu treba uzeti u obzir kao dijagnozu kod svake žene reproduktivne dobi kod koje su prisutni simptomi bola u zdjelici i neplodnosti. Budući da su simptomi često nespecifični, mogu dovesti do pogrešne dijagnoze i povezati se s drugim kliničkim stanjima koje karakterizira bol u zdjelici (primjerice sindrom iritabilnog crijeva, intersticijski cistitis/sindrom bolnog mjehura) što obično dovodi do neadekvatnog liječenja i znatnog kašnjenja u postavljanju dijagnoze endometrioze (32). Sama klinička očitovanja endometrioze ovise o anatomskoj lokaciji endometrioze. Tako će ektopične lezije na mokraćnom mjehuru i mokraćovodima izazvati disuriju, hematuriju, suprapubične bolove, često mokrenje, osjećaj pečenja, urinarnu inkontinenciju, smanjenje bubrežne funkcije i dismenoreju (33-35). Ektopične lezije na crijevima i rektalno izazvati će ciklični bol tijekom defekacije, disheziju, cikličnu hematoheziju, nadutost, zatvor, grčeve u crijevima, proljev, stolice poput olovke, začepljenje crijeva (36-38).

Zdjelični bol koju bolesnice opisuju kao kroničnu, cikličku, progresivnu (s vremenom se pogoršava) povećava vjerojatnost sumnje na endometriozu kod kliničara (39-41). S kliničkog stajališta endometriozu se može definirati kao menstruacijski ovisnu, kroničnu, upalnu i sistemsku bolest koja se obično javlja u obliku zdjeličnog bola.

Kod mladih žena endometrioza je jedan od najčešćih uzroka neplodnosti. Mehanizam nastanka neplodnosti kod endometrioze još uvijek nije u potpunosti razjašnjen te postoje mnoga objašnjenja. Od mnogobrojnih objašnjenja danas prevladavaju dva od kojih se jedno povezuje s mehaničkim čimbenikom dok drugo uključuje niz nedovoljno razjašnjenih

biokemijskih mehanizama s kojima se povezuje neplodnost kod blagih oblika endometrioze (42). U uznapredovaloj endometriozici stvaraju se priraslice i fibroza što je očit i objašnjiv uzrok mehaničkog čimbenika neplodnosti koji ograničava i smanjuje motilitet fimbrija, nastaju okluzije jajovoda, a čime se onemogućava transport i fertilizacija jajne stanice nakon ovulacije. Kod bolesnica s početnom i minimalnom endometriozom uzrok neplodnosti izaziva mnoga proturječna mišljenja i uključuje niz biokemijskih čimbenika.

Prema mnogim dosadašnjim istraživanjima zaključuje se da je u endometriozici izmijenjeno peritonealno, folikularno i endometrialno okruženje, uz posljedično oštećenje folikulogeneze, ovulacije, smanjenje kvalitete oocita, receptivnosti endometrija i fertilne sposobnosti spermija (43,44).

Podaci iz literature upozoravaju kako je kod žena s endometriozom poremećen imunološki odgovor (43,45). Jedno od često postavljenih pitanja u nizu istraživanja je imaju li žene s endometriozom imunosnu disfunkciju koja sprječava uklanjanje endometrijskih implantata i dovodi do adhezije tkiva endometrija u peritonejskoj šupljini (46). Također se vjeruje da su ektopične lezije u potrbušnici odgovorne za aktivaciju makrofaga s posljedičnim povećanjem stvaranja upalnih čimbenika, reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva, citokina, čimbenika rasta i prostaglandina (47-49).

Kronična upala u endometriozici može prouzročiti neplodnost kroz nekoliko različitih putova. Povećana koncentracija interleukina ( IL-1b, IL-8, IL-10) i čimbenika  $\alpha$  tumorske nekroze (TNF- $\alpha$ , engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) u okruženju folikula povezana je sa smanjenom kvalitetom jajnih stanica (50). U peritonejskoj tekućini žena s endometriozom povišen je interleukin 6 i taj citokin prema istraživanjima inhibira pokretljivost spermija, a upalni čimbenici peritonejske tekućine pridonose oštećenju DNA spermija (51-53). Nadalje, oksidacijski stres, prostaglandini i citokini ometaju interakciju oocita i spermija, štete razvoju embrija i ometaju implantaciju (54). Disfunkcija osi hipotalamus-hipofiza-jajnik može pridonijeti neplodnosti u bolesnica sa endometriozom, prouzrokujući produljenu folikularnu fazu, nisku razinu estradiola u serumu i snižavanje vršne koncentracije luteinizirajućeg hormona (55). Poremećaj lučenja hormona hipofize u žena s endometriozom može prouzročiti poremećenu folikulogenezu, smanjenu kvalitetu oocita i/ili smanjenu receptivnost endometrija. Neke studije bavile su se navedenim abnormalnostima i dobiveni su oprečni rezultati (56,57).

Normalno lučenje progesterona i uloga endometrija u njegovu djelovanju tijekom lutealne faze važna je za prijelaz endometrija iz proliferacijskog u sekrecijski i receptivni stadij. U žena s endometriozom smanjen je izražaj progesteronskih receptora u endometriju što može dovesti do slabije receptivnosti endometrija te rezistencije na progesteron (58).

Donacija oocita poučan je klinički model za razlikovanje učinka receptivnosti endometrija i kvalitete oocita u neplodnosti prouzročenoj endometriozom. Nedavne studije pokazale su kako bolesnice kod kojih su vraćeni zamci, kreirani od donatorica oocita s endometriozom imaju nižu stopu implantacije i trudnoće u odnosu na žene koje su primile oocite od zdravih donorica (59). Spomenute studije navode na zaključak kako je smanjena fertilitet žena s endometriozom rezultat loše kvalitete oocita, a ne slabije receptivnog endometrija. U serumu žena s endometriozom pronađene su povišene razine antitijela usmjerenih na endometrij i njihovo vezanje na antigen endometrija može prouzročiti neuspjeh implantacije (60).

Predloženo je nekoliko klasifikacijskih sustava za izraženost endometrioze. Činjenica je kako trenutačno ne postoji optimalni sustav klasifikacije, a korisnost je postojećih sustava klasifikacije prijeporna. Klinička su očitovanja endometrioze raznolika, a odnos između simptoma i izraženosti bolesti dvosmislen je i još uvijek nedorečen. Do sada je uloženo mnogo truda i istraživanja kako bi se napravila što bolja i korisnija klasifikacija endometrioze. Idealna klasifikacijska sustav trebao bi moći objasniti raširenost bolesti, predvidjeti bol i plodnost, pružiti preciznu informaciju bolesnici i odražavati anatomska zahvaćenost bolešću.

Najpoznatija je revidirana klasifikacija Američkog društva za reproduktivnu medicinu (American Society for Reproductive Medicine – ASRM). Prema navedenoj klasifikaciji, predložena su četiri stadija izraženosti endometrioze, definirana su prema kumulativnom rezultatu (tablica 1.). Nedostatak je ove klasifikacije što nema korelacije između stadija bolesti i kliničkih simptoma bola i neplodnosti (61). Prednost ove klasifikacije njezina je prihvaćenost na globalnoj razini, jednostavnost upotrebe liječnicima te razumljivost i jednostavnost pri objašnjenju bolesnicima. ASRM klasifikacija ne uzima u obzir prisutnost duboko infiltrirajuće endometrioze (DIE) na različitim mjestima kao što su uterosakralni ligamenti, mokraćni mjehur, rodnica i crijevo.

**Tablica 1.** Klasifikacija endometrioze prema Američkom društvu za reproduktivnu medicinu (American Society for Reproductive Medicine – ASRM)(61).

<b>STADIJ</b> (bodovi)	<b>OBILJEŽJE</b> (izražava se u bodovima)
<b>I. stadij 0 – 5 (MINIMAL)</b>	minimalna bolest s nekoliko površinskih lezija
<b>II. stadij 6 – 15 (MILD)</b>	blaga bolest – veći broj lezija, neke i dublje
<b>III. stadij 16 – 40 (MODERATE)</b>	srednje izražena – brojne lezije, lezije na jajniku, tanke adhezije
<b>IV. stadij &gt;40 (SEVERE)</b>	izražena bolest – brojne lezije, endometriomi, guste priraslice, endometrioza u rektouterinom prostoru.

Kako bi se nadomjestilo izostavljanje duboke infiltrirajuće endometrioze u retroperitonejskim strukturama u ASRM klasifikaciji razvijena je ENZIAN klasifikacija (62,63). ENZIAN klasifikacija do sada je imala dvije revizije (64,65). Revidirana ENZIAN klasifikacija pojednostavljena je dijeljenjem retroperitonejskih struktura u tri odjeljka. Stražnji dio maternice podijeljen je na odjeljak A koji se sastoji od rektovaginalnog septuma i rodnice, odjeljak B koji se sastoji od uterosakralnog ligamenta i stijenke zdjelice te odjeljak C koji se sastoji od sigmoidnog kolona i rektuma. Izraženost lezija podijeljena je za lezije manje od 1 cm na stupanj 1, 1 – 3 cm na stupanj 2 i veće od 3 cm na stupanj 3. Kao i ASRM, ENZIAN klasifikacije imaju određene nedostatake, a na međunarodnoj razini imaju relativno malu prihvatljivost. Za razliku od ASRM klasifikacije ENZIAN klasifikaciju zbog složenosti stadija i nedovoljnog poznavanja anatomije zdjelice nije moguće kao dovoljno razumljivu objasniti bolesnicama (66).

U pokušaju da se klasifikacija endometrioze bude tako da pomogne ocjeni plodnosti, objavljen je Indeks plodnosti u endometriozu (engl. *endometriosis fertility index*, EFI) kojim se pri operaciji pokušava predvidjeti buduću plodnost (67). EFI sustav uzima u obzir i anamnestičke čimbenike kao što su dob, trajanje neplodnosti i postojanje prethodnih trudnoća. Za nastanak trudnoće potrebna je normalna funkcija jajovoda, fimbrija i jajnika. Funkcionalni zbroj upućuje na to je li embrij primjereno implantiran u maternicu, može li

maternica pružiti optimalno rano okruženje za razvoj embrija i mogu li jajovodi prihvatiti jajnu stanicu. Očito je da EFI sustav ima prednost u predviđanju ishoda trudnoće te da EFI zbroj odražava bolje predviđanje šanse zanošenja od ASRM klasifikacije (68). Nadalje, u odnosu na ASRM klasifikaciju EFI zbroj je pouzdaniji sustav u predviđanju ishoda izvantjelesne oplodnje u bolesnica s endometriozom (69). Kao i prethodne klasifikacije tako i EFI sustav ima neke nedostatke kao što su: EFI zbroj ne korelira s bolom, ocjena funkcije određuje se subjektivno i ukupni rezultat može varirati ovisno o kirurgu (66).

Američka udruga ginekoloških laparoskopičara (engl. American Association of Gynecological Laparoscopists, AAGL) pokrenula je 2007. novu klasifikaciju endometrioze (70). Od trideset eksperata za endometriozu zatraženo je da dodijele bodove na ljestvici od 0 do 10 na temelju važnosti svakoga uključenog čimbenika na ishod bola, neplodnosti i kirurške komplikacije. Iako je prošlo više od deset godina od kada je AAGL klasifikacija nastala, još uvijek nije u potpunosti potvrđena i potrebna su dodatna ispitivanja i rasprave kako bi zaživjela.

Sve prethodno navedene klasifikacije imaju svoje prednosti i nedostatke. Općeprihvaćeno je da sve žene podvrgnute operacijskom zahvatu moraju ispuniti ASRM klasifikaciju kako bi se dobilo što više podataka dok se ne pojavi bolja klasifikacija, a žene s dubokom infiltracijskom endometriozom (DIE) dodatno moraju ispuniti ENZIAN klasifikaciju.

Još uvijek se traži optimalna klasifikacija koja bi točno odražavala simptome i opseg bolesti te odredila strategiju liječenja (66).

### **1.1.3 Dijagnostički postupci**

Kao i kod dijagnostike svake bolesti, tako su i za endometriozu bitni klinički pregled i uzimanje anamneze. Nalazi kliničkog pregleda žena s endometriozom mogu biti varijabilni kao i simptomi na koje se pacijentice žale. Kod blažih stadija bolesti nerijetko se događa da se ne nalaze abnormalnosti prilikom kliničkog pregleda ili, ako se i pronađu, neki klinički znakovi najčešće nisu specifični za endometriozu (71). Najčešće otkriće prilikom kliničkog

pregleda koje stvara sumnju na endometriozu jesu palpabilne endometrijske lezije u području stražnjeg forniksa, koje mogu biti vidljive prilikom pregleda spekulom kod pacijentica s dubokom endometriozom.

Klinički pregled obavlja se tijekom menstruacije ili tijekom pojave simptoma koji upućuju na sumnju na endometriozu (72). Pozitivni su znakovi bolji kada se klinički rektovaginalno pregleda područje zdjelice. Klinički pregled zdjelice ima slabu osjetljivost i specifičnost u usporedbi s kirurškim pristupom i ako se kliničkim pregledom ne nađu znaci endometrioze, to ne isključuje dijagnozu endometrioze (73).

Danas su razvijene i dostupne mnoge vizualne („imaging“) tehnike poput transvaginalnoga i transrektalnog ultrazvuka te nuklearne magnetske rezonancije (MRI). Ultrazvuk je jeftin i jednostavan za primjenu, ali nalazi često ovise o iskustvu kliničara koji izvodi pregled ultrazvukom. Transvaginalni ultrazvuk od velike je pomoći u dijagnostici endometrioma, lezija prisutnih na mokraćnom mjehuru i dubokih čvorića u rektovaginalnom septumu. Lezije koje su vidljive ultrazvukom uključuju hipoehogena linearna zadebljanja ili čvoriće/mase s pravilnim konturama ili bez njih. Za kliničara koji ima veliko iskustvo u radu s ultrazvukom transvaginalni ultrazvuk ima visoku specifičnost i osjetljivost za dijagnostiku endometrioze jajnika. Transrektalni ultrazvuk također se može koristiti za vizualizaciju endometrioze u području rektuma, dubinu infiltracije endometriozom i otkrivanje lezija na stražnjoj stijenci mokraćnog mjehura (74), ali se do sada nije pokazao boljim u odnosu na transvaginalni ultrazvuk.

Nuklearna magnetska rezonancija puno je osjetljivija u odnosu na ultrazvuk i koristi se predoperacijski kako bi se potvrdile i lokalizirale lezije u bolesnica s dubokom zdjeličnom endometriozom rektovaginalnog septuma i sakrouterinih ligamenata te pri utvrđivanju eventualne proširenosti bolesti na druge zdjelične i abdominalne organe (75, 76).

Laparoskopsko istraživanje uz histopatološki pregled sumnjivih lezija zlatni je standard u dijagnostici endometrioze. Endometrijske implantate treba pretražiti u zdjelici, posebno na uterosakralnim ligamentima, apendiksu, jajnicima, bočnim stijenkama zdjelice, površini mjehura i crijevima. Primjena laparoskopije važnija je u odnosu na laparotomiju u slučajevima kada se pregledava trbušna šupljina zbog sumnje na male endometrijske implantate (77).



Studije su pokazale da dijagnozu endometrioze treba postaviti tek nakon histopatološke potvrde zbog raznolikosti endometrijskih implantata, iako iskustvo i stručnost kirurga mogu utjecati na odabir područja biopsije. Endometriomi se mogu prepoznati po glatkim stijenkama, tamnosmeđkastoj boji i gusto prijanjaju na okolno tkivo u vrijeme laparoskopije. Najvažniji pokazatelj koji omogućuje pouzdanu dijagnozu tijekom operacijskog zahvata gusta je, smeđa tekućina nalik čokoladi unutar endometriotičnih cista (78).

Već desetljećima vode se istraživanja koje razvijaju ideju o biomarkerima kako bi se izbjegle invazivne tehnike u dijagnostici endometrioze. Biomarker ili skup biomarkera lakše je izmjeriti, pristup je neinvazivan te može poslužiti kliničaru u dijagnostici i praćenju odgovora na liječenje. Neinvazivni biomarkeri, proteomika, genomika, miRNA budućnost su i izazov u dijagnostici endometrioze. Očekuje se da će klinički pouzdani neinvazivni test za endometriozu smanjiti kašnjenje u postavljanju dijagnoze bolesti.

Upalni kronični procesi uključeni u patogenezu endometrioze dovode do stvaranja mnogih čimbenika poput hormona, citokina, glikoproteina i čimbenika angiogeneze te se može očekivati da su neki od tih čimbenika mogući biomarkeri same bolesti (79). Tijekom godina istraživani su čimbenici apoptoze, molekule uključene u adheziju stanica i drugi proteini vezani za matriks, molekule citoskeleta, biljezi oksidacijskog stresa, tumorski biljezi i drugi peptidi/proteini ključni za patogenezu endometrioze (80,81). Tako se CA-125, CA19-9, urokortinu i interleukinu-6 posvetila puna pozornost kao obećavajućim biomarkerima endometrioze. Međutim, šteta je što su svi ovi novi biomarkeri kao pokazatelji endometrioze daleko od ispunjavanja kriterija za dobar dijagnostički biomarker endometrioze.

CA-125 je antigen na površini stanica svih tkiva koji su derivati celomskog epitela. Razna patološka stanja povezana s tkivima prekrivenim celomskim epitelom poput endocerviksa, endometrija, jajovoda, potrbušnice, pleure i perikardija mogu prouzročiti povećanu razinu CA-125 u serumu. Stoga povećane razine CA-125 nisu otkrivene samo u bolesnica s endometriozom (82,83). Osjetljivost i specifičnost CA-125 veće su kod umjerene ili teške endometrioze (III. ili IV. stadij) (84). Niska osjetljivost ograničava njegovu upotrebljivost u otkrivanju minimalne endometrioze odnosno početnog stadija bolesti. Studije su pokazale kako je kombinacijom povišenog CA-125 u serumu i pozitivnih kliničkih nalaza dokazana dijagnostička snaga testa te test stoga treba svakako procijeniti zajedno s kliničkim

nalazima (85). Iako nije točan pokazatelj zahvaćenosti endometriozom, razina CA-125 može pružiti korisne informacije o težini bolesti. Stalno poslijeoperacijsko povećanje razine CA-125 dobar je predviđatelj lošije prognoze u neplodnih žena s endometriozom (86).

U nekim od dosadašnjih istraživanja tendencija je bila povećati osjetljivost i specifičnost testova kombinirajući CA-125 s još nekim serumskim biljezima kao što su IL-6, IL-8, CA19-9.

Od citokina je najproučavaniji interleukin 6 (IL-6) u endometriozu, ali kao i s CA-125 zaključak je da se istraživanja trebaju usredotočiti na dijagnostičku učinkovitost IL-6 u kombinaciji s drugim citokinima.

Urokortin je neuropeptid koji pripada skupini hormona, a javlja se i na eutopičnom i ektopičnom endometriju. Dosadašnje studije pokazuju kako su serumske razine urokortina znatno povišene u žena s endometriozom jajnika u odnosu žene koje imaju benigne ciste jajnika. Isto tako, genski izražaj urokortina povećan je u žena s endometriozom jajnika te razina izražaja korelira s ozbiljnošću bolesti. Smatra se da je urokortin bitan u procesu decidualizacije koji označava proces preuređivanja endometrija u sekrecijskoj fazi menstrualnog ciklusa i bitan je za ranu trudnoću. Prva su istraživanja pokazala kako urokortin ima veći izražaj na ektopičnom endometriju žena s endometriozom u odnosu na eutopični endometrij. Upravo zbog korelacije sa zahvaćenosti endometriozom, istraživanja upućuju na urokortin kao dijagnostički biljeg za klasifikaciju endometrioze (87-89). Kao što je slučaj i s ostalima do sada istraživanim potencijalnim biomarkerima endometrioze, tako i za urokortin treba još dosta opsežnih istraživanja kako bi se dokazala njegova dijagnostička vrijednost.

Identifikacija stanica koje cirkuliraju u perifernoj krvi već se godinama koristi kod raznih karcinoma poput karcinoma gušterače, prostate i pluća (90,91). Iako je endometriozu benigna bolest, ima obilježja zloćudne bolesti zbog načina širenja, implantacije i metastaziranja.

Odnedavno se brzo razvijaju tehnologije molekularne biologije povezane s bioinformatikom. Te takozvane "omičke" znanosti, novonastale tehnologije koje povezuju genomiku, transkriptomiku, proteomiku i metabolomiku posljednjih nekoliko godina naširoko primjenjuju istraživači u proučavanju složenih bolesti (92,93).

Širina probira koju pružaju "omičke" znanosti omogućava generički pristup za nebrojene molekule i te se znanosti mogu smatrati obećavajućim tehnikama za otkrivanje biomarkera endometrioze.

Uzimajući u obzir usku povezanost genetičkih čimbenika i endometrioze treba spomenuti i mikroRNA kao jednu od novijih tehnologija na području dijagnostike endometrioze.

Za potpuno razumijevanje bioloških sustava koriste se genomska i transkriptomaska analiza te se neizostavno provodi i proteomska analiza koja obuhvaća identifikaciju i kvantifikaciju proteina u stanicama, tkivima i biološkim tekućinama, analizu promjene proteinskog izražaja u zdravim i bolesnim stanicama/organizmima, karakterizaciju poslijetranslacijskih modifikacija i proučavanje interakcija protein-protein.

Određivanje i analiza proteomskog profila stanica ili tkiva, tj. organizma stoga može služiti kao dijagnostički biljeg, biljeg za točno utvrđivanje razvoja/faze bolesti ili za predviđanje ishoda liječenja. Zbog dinamičke prirode proteina te složenosti i varijabilnosti proteoma proteomika mora biti selektivna i osjetljiva kako bi se istodobno moglo analizirati tisuću i više različitih proteina u pojedinom istraživanom sustavu. Studije koje su rabile proteomiku za istraživanje periferne krvi i endometrija pokazale su obećavajuće rezultate na području endometrioze. Iako je proteomika kao tehnika trenutačno skupa i dugotrajna, nastoje se razviti nove metode po načelu spektrometrije masa koje bi donijele nove promjene u bliskoj budućnosti (94). Da bi se potvrdila dijagnostička vrijednost proteomike potrebne su dodatne evaluacije korištenjem standardiziranih postupaka sa sličnim kompletom biljega i definiranim graničnim vrijednostima.

Analiza s pomoću metabolomike također je obećavajući pristup u dijagnostici endometrioze s obzirom na činjenicu da ektopično tkivo endometrija ima specifične patološke metaboličke putove. Metabolomikom se došlo do otkrića da postoje znatne razlike u endometriju između žena s endometriozom i zdravih žena (95–97) i to u razini fukoze, prolina, lizina/arginina, metabolita koji sadržavaju kolin i lipoproteina. Promjene u razini navedenih metabolita povezane su s napredovanjem i zahvaćenosti bolesti (98). Nedavno istraživani panel acilkarnitina u plazmi potencijalni je lako primjenjivi dijagnostički pristup bolesti (99).

Nekoliko je studija upozorilo na veliki broj miRNA uključenih u nastanak endometrioze i njihov različit izražaj na ektopičnom i eutopičnom tkivu endometrija. Nekolicina miRNA povezanih s endometriozom zapravo regulira gene uključene u procese koji su nužni za nastanak i progresiju bolesti, kao što su angiogeneza, upala, imunosni odgovor. Dodatna istraživanja profila izražaj miRNA dala bi uvid u nove spoznaje o patogenezi endometrioze i poboljšala bi pristup liječenju same bolesti (100). Trenutačno ne postoji ni jedna pojedinačna miRNA niti panel miRNA koja bi bila koristan dijagnostički biomarker endometrioze. Potrebne su dodatne validacije na velikom broju ispitanica, upotrebom ponovljivih i standardiziranih metoda kako bi se razjasnio dijagnostički potencijal miRNA u endometriozu (101).

Uzimajući u obzir da je endometrioza bolest prouzročena okolišnim i genetičkim čimbenicima nekoliko je današnjih tehnologija usredotočeno na istraživanje polimorfizma jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP). Dokazano je kako postoji mogućnost da je polimorfizam jednog nukleotida u šest genomskih regija uključen u patofiziologiju endometrioze (102).

Općeniti je zaključak kako će u dijagnostici tako složene bolesti kao što je endometrioza panel biomarkera koji uključuje više različitih čimbenika biti precizniji nego bilo koji pojedinačni biomarker (103).

#### **1.1.4 Medikamentno liječenje**

Raznolikost u patogenezi endometrioze nudi brojne mogućnosti liječenja. Trenutačno ne postoji definirani optimalni pristup liječenju te je temeljni pristup individualizacija liječenja bolesnica. Endometrioza se ne može izliječiti, a glavni su ciljevi liječenja ublažavanje simptoma bolesti, očuvanje plodnosti, smanjenje lezija, poboljšanje kvalitete života. Ne postoji idealno liječenje i najčešće su opcije kirurško i/ili medikamentno liječenje. Sam je terapijski pristup individualan i ovisi o tome koje su prihvatljive metode za bolesnice s obzirom na simptome koje imaju, njihovom željom za trudnoćom te posljedicama koje bolest ima na opće zdravlje bolesnika. Kirurški pristup liječenju odabire se u slučajevima kada kod bolesnice postoji endometriom veličine > 3 cm ili su simptomi bolesti toliko izraženi da unatoč medikamentnoj terapiji značajno remete kvalitetu života. Da bi se pak odabrao cilj

medikamentnog pristupa liječenju bolesti presudno je poznavati i razumjeti biokemijske abnormalnosti koje se javljaju u endometriozu. Izraziti upalni odgovor, prekomjerna proizvodnja estrogena i rezistencija na progesteron samo su neki od niza kritičnih mehanizama koji dovode do simptoma endometrioze (104). Studije pokazuju kako ektopični endometrij ima poremećene molekularne i imunološke funkcije. To sve dovodi do povećanog stvaranja estrogena, proupalnih citokina, prostaglandina i metaloproteinaza i poremećaja imunskih stanica zbog čega ne mogu zaustaviti i ukloniti upalni odgovor.

Medikamentno liječenje endometrioze ima za ciljeve kontroliranje bola i suzbijanje hormonski aktivnog tkiva endometrija. S godinama je razvijeno nekoliko terapijskih opcija i uspješno su korištene za postizanje prethodno navedenih ciljeva, ali se dosta brzo razvijaju i novi ciljevi terapije.

U prvoj liniji medikamentnog liječenja koriste se protuupalni nesteroidni lijekovi (engl. NSAID, *non-steroidal anti-inflammatory drugs*) u kontroli bola povezanog s dismenorejom. Hormonska terapija koja se temelji na supresiji endometrijskog tkiva uključuje: kombiniranu hormonsku kontracepciju, progesteronsku kontracepciju, agoniste gonadotropin- oslobađajućeg hormona (GnRH), inhibitore aromataze i danazol. Iako je hormonska terapija poprilično uspješna, neki preparati ipak imaju neželjene nuspojave na hormonsku supresiju što zahtjeva redovito praćenje bolesnica (105).

#### **1.1.4.1. Protuupalni nesteroidni lijekovi (NSAID)**

NSAID lijekovi najčešće su prva linija terapije u liječenju bola i dismenoreje povezane s endometriozom (106). Bol u endometriozu javlja se sekundarno kao posljedica povišenih prostaglandina, interleukina i citokina. NSAID djeluju tako što inhibiraju ciklooksigenazu (engl. COX, *cyclooxygenase*) koja je presudna za proizvodnju medijatora upale. Iako su prisutni i COX1 i COX2 receptori, studije pokazuju da ektopično tkivo endometrija ima veću koncentraciju COX2 receptora. Za ublažavanje bolova naveliko se koriste selektivni i neselektivni inhibitori COX. Novija su istraživanja pokazala da osim kontrole bola, selektivni inhibitori COX2 inhibiraju rast ektopičnog endometrija (107). Unatoč tomu što nema jednoznačnih dokaza o učinkovitosti terapije NSAID lijekovima u kontroli boli zbog endometrioze i njezinih negativnih gastrointestinalnih nuspojava, još uvijek

se smatraju prvom linijom liječenja kod bolesnica sa zdjelichnom boli.

#### **1.1.4.2. Kombinirana hormonska kontracepcija**

Suzbijanje aktivnosti jajnika i endometrioze osnova je za upotrebu kombinirane hormonske kontracepcije u liječenju endometrioze te ovi preparati predstavljaju najčešće korištenu prvu liniju liječenja. Kombinacija sintetskih progesterona-progestina i estrogena ili sam progestin dovode do decidualizacije tkiva endometrija i usporavanja širenja bolesti. Pojedini preparati imaju različit postotak uspješnosti kod žena s endometriozom. Stoga se najčešće koriste oni koji u svom sastavu imaju snažne progestine. Prihvatljiva cijena, jednostavna primjena i podnošljivost tijekom primjene ključni su za njihovu buduću upotrebu.

U odnosu na cikličku primjenu, pokazalo se da kontinuirana primjena kombiniranih oralnih kontraceptiva rezultira boljom kontrolom bola (108). Međutim, ograničavajući čimbenici kombinirane hormonske kontracepcije postoje i to u vidu potrebe za dugotrajnom primjenom, povećanim rizikom nastanka venske tromboembolije, visoke stope recidiva nakon prekida korištenja i nemogućnosti zanošenja za vrijeme liječenja.

#### **1.1.4.3. Agonisti gonadotropin-osobađajućeg hormona (agonisti GnRH)**

Uspješna uporaba GnRH agonista temelji se na činjenici da dovode do izrazitog hipoestrogenizma blokirajući lučenje folikulostimulirajućeg hormona (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH) u hipofizi, a time i estrogena u jajnicima, što dovodi do amenoreje i regresije ektopičnih endometriotičnih žarišta. Dobra su terapijska opcija za žene kod kojih početna terapija oralnom kontracepcijom nije dala zadovoljavajuće rezultate ili imaju kontraindikciju za korištenje iste. Iako agonisti GnRH znatno smanjuju jačinu bola u zdjelici, odobreni su za neprekidnu upotrebu samo u vremenskom periodu od šest mjeseci zbog nuspojava koje se sekundarno javljaju zbog hipoestrogenizma, a uključuju gubitak koštane mase, atrofiiju i suhoću rodnice, valove vrućine i poremećaj u lučenju lipida (109). Još jedan ograničavajući čimbenik u primjeni GnRH agonista jest supresija ovulacije zbog čega nisu primjenjivi kod žena koje žele zanijeti.

#### **1.1.4.4. Antagonisti gonadotropin-oslobađajućeg hormona (Antagonisti GnRH)**

U usporedbi s agonistima GnRH antagonisti GnRH dovode do značajno manje supresije estrogena, a time i manje simptoma hipoestrinizma, uz istovjetni učinak na poboljšanje simptoma. Upravo zbog bolje podnošljivosti i smanjenih zdravstvenih rizika koji se povezuju sa hipoestrinizmom, antagonisti GnRH nude veći potencijal u liječenju endometrioze u odnosu na agoniste GnRH (105).

#### **1.1.4.5. Progestini i progesteronska kontracepcija**

Progesteron ima višestruke mehanizme djelovanja koji čine njegovu patofiziološku osnovu za upotrebu kod endometrioze. On potiče decidualizaciju endometrija, inhibira mitozu izazvanu estrogenom, mijenja receptore estrogena, inhibira angiogenezu i izražaj metaloproteinaze matriksa potrebne za rast endometrijskih implantata (110,111).

Dienogest, derivat 19-nortestosterona jest progestin koji je proučavan u liječenju endometrioze. Ima visoku specifičnost za progesteronske receptore i manje anti-androgenih nuspojava. Kontinuirana primjena dovodi do decidualizacije i atrofije lezija endometrija. Također ima protuupalni, antiangiogeni i antiproliferacijski učinak (112).

#### **1.1.4.6. Intrauterini sustav s levonorgesterelom (LNG-IUS)**

Iako oralni progestini imaju manji rizik nastanka venske tromboembolije u odnosu na kombinirane hormonske kontraceptive, dnevna primjena i promjenjive koncentracije u serumu neka su od ograničenja koja se povezuju s njihovom uporabom. Progestini se mogu primijeniti i lokalno, u maternicu, putem intrauterinog sustava koji sadrži spremnik koji otpušta progestin-levonorgestrel u vremenskom periodu od 5 godina. Navedeni način primjene progestina nema sistemski učinak, čime i izostaje i pojava nuspojava, što dovodi do bolje suradljivosti. Uspjeh liječenja s LNG-IUS u žena s endometriozom tumači se nastankom atrofije endometrija inducirane progesteronom, hipomenoreje s mogućom smanjenom retrogradnom menstruacijom i većom koncentracijom progesterona u

peritonejskoj šupljini što suprimira aktivnost ektopičnog endometrija protuupalnim i imunomodularnim djelovanjem (113). LNG-IUS uspješno se koristi u bolesnica s adenomiozom i dubokom rektovaginalnom endometriozi. Pokazalo se i da smanjuje postotak recidiva dismenoreje u žena nakon laparoskopskih zahvata zbog simptomatske dismenoreje.

#### **1.1.4.7. Selektivni modulatori progesteronskih receptora (SPRM)**

SPRM su relativno nova generacija medikamentnog liječenja koja djeluje na tkivo u rasponu od čistih agonista do agonist/antagonist i do antagonista. Selektivna inhibicija rasta endometrija bez nuspojave hipoestrogenizma, smanjenje menstrualnog krvarenja utjecajem na opskrbu endometrija krvlju i suzbijanje opskrbe endometrija krvlju, neki su od mehanizama koji su izazvali zanimanje za njihovu upotrebu kod endometrioze. Međutim, zbog ograničenog broja studija na ljudima, definitivne zaključke o uspoješnosti ovog oblika liječenja, nije moguće iznijeti (105, 114).

#### **1.1.4.8. Inhibitori aromataze**

Enzim aromataza pomaže u pretvaranju steroidnih prethodnika u estrogen. Iako su jajnici i masno tkivo najvažniji izvor enzima aromataze, ista se stvara i u koži, posteljici i mozgu. Studije su pokazale da aktivnost aromataze nije prisutna u normalnom endometriju, ali je prekomjerno izražena u endometriozi (115). Aromatazom inducirana sinteza estrogena dovodi do rasta endometrijskih implantata, izražaja COX-a, lučenja prostaglandina koje potom dodatno inducira aktivnost aromataze. Za razliku od GnRH agonista, inhibitori aromataze blokiraju sintezu estrogena i na periferiji i u jajnicima. Ovaj je mehanizam djelomično koristan u postmenopauzalnih žena s endometriozi s obzirom da je kod njih periferno masno tkivo najveći izvor estrogena (116).



#### **1.1.4.9. Danazol**

Danazol, derivat 17-alfa-etinil-testosterona, androgeni je agens koji inhibira LH i smanjuje steroidogenezu u jajnicima izravnom inhibicijom enzima jajnika. Iako se pokazao učinkovitim u suzbijanju bola povezanog s endometriozom, njegova je upotreba tijekom godina smanjena zbog pojave izraženih hiperandrogenih nuspojava poput akni, hirsutizma, produbljenja glasa, debljanja, poremećaja lučenja lipida, kao i grčeva u mišićima i poremećaja rada jetre. (117) .

Kao što je već više puta spomenuto, endometriozna je kronična bolest i stoga zahtijeva dugotrajno liječenje. Trenutačno dostupna medikamentna liječenja imaju dokazanu uspješnost u kontroli simptoma endometrioze, ali njihova upotreba ima određena ograničenja u vidu potrebe za dugotrajnim korištenjem, nuspojavom hipoestrogenizma i visokom stopom recidiva bolesti nakon prekida terapije. Dodatno, kod žena s endometriozom koje planiraju trudnoću, sva medikamentna terapija ima nedostatak, s obzirom da se za vrijeme njihovog korištenja onemogućava zanošenje, odnosno djeluju kontracepcijski. Zbog navedenih. Istraživanja su usmjerena na potragu za novim terapijskim pristupima koji mogu ponuditi sigurno medikamentno liječenje sa što manje nuspojava.

#### **1.1.4.10 . Lijekovi s antiangiogenim učinkom**

Ektopični endometrij okružen je mrežom kapilara, a angiogeneza je jedan od najvažnijih procesa u rastu i preživljavanju lezija. Studije su pokazale da same lezije stvaraju angiogene čimbenike poput vaskularnoga endotelnog čimbenika rasta (engl. VEGF), a i sama peritonejska tekućina bogata je angiogenim čimbenicima. Teoretski bi se zaustavljanjem rasta novih krvnih žila zaustavio i rast novih i regresija starijih lezija. Vodeći se ovom teorijom provedeno je dosta istraživanja kako bi se objasnila uloga antiangiogenih čimbenika u liječenju endometrioze. Istraživanja su još uvijek u početnoj fazi i većinom se izvode na životinjama, a istraživanja na ljudima još uvijek nisu dostupna (118).

Studije na životinjskim modelima dokazale su da primjena anti-VEGFa smanjuje veličinu endometriotičnih lezija.

Dokazano je da agonisti dopaminskog receptora 2, kabergolin i kinagolid smanjuju

angiogenezu defosforilacijom VEGF2. Već se uspješno koriste kod ljudi u liječenju hiperprolaktinemije i suzbijanju laktacije. Primjenom na miševima pokazali su učinkovitost u inhibiciji angiogeneze i smanjenju veličine endometriotičnih lezija (48). Na ljudima je provedeno istraživanje tako što su proučavane žene s endometriozom povezanom s hiperprolaktinemijom. Na ženama je prvo obavljen kirurški postupak tijekom kojeg je odrezana polovica endometriotičnih lezija, a druga je polovica označena. Nakon toga je uslijedilo 18 – 20 tjedana liječenja kinagolidom, a zatim je uslijedio drugi laparoskopski zahvat tijekom kojeg se uočilo znatno smanjenje veličina lezije i disregulacija VEGF/VEGF2, proangiogenih citokina i inhibitora plazminogen-aktivatora (PAI-1) (119).

Statini su skupina lijekova koji se inače koriste za snižavanje kolesterola u krvi i također su ispitivani *in vitro* na kulturama tkiva životinja s endometriozom. Neki su od njih, ovisno o primijenjenoj dozi, inhibirali matriks metaloproteinazu te broj i veličinu endometriotičnih lezija (119).

Monoklonsko antitijelo protiv TNF $\alpha$  koje ujedno neutralizira TNF $\alpha$  ispitivano je na životinjama s endometriozom. U pokusu na životinjama primjena anti TNF $\alpha$  dovela je do smanjenja veličine i broju endometriotičnih implantata te razine upalnih citokina (120). Nažalost, premalo je dokaza na ljudima o djelotvornosti navedenih antitijela, a i dobiveni rezultati nisu se slagali s rezultatima dobivenim na životinjskim modelima (121).

#### **1.1.4.11. Prehrana i dodatci prehrani**

S obzirom na moguće rizike i simptome nepodnošenja koje nosi primjena medikamentnog liječenja, istraživanja su se usmjerila i prema uporabi dodataka prehrani u liječenju simptoma endometrioze. Budući da su estrogeni, poremećena razina eikosanida i upalnog odgovora ključni u patofiziološkom mehanizmu nastanka endometrioze, smatralo se da promjena prehrambenih navika kao i dodaci prehrani koji utječu na smanjenje stvaranja estrogena, postizanje ravnoteže eikosanida i modulaciju imunološkog odgovora mogu imati terapijski učinak (122,123). Promjena prehrambenih navika u vidu konzumacije više povrća, prehrane bogate omega-3 masnim kiselinama, antioksidansima, vitaminima B skupine, kalcijem i vitaminom D, kao i izbjegavanje alkohola i kofeina, crvenog mesa i trans-masti kod žena s endometriozom jedan je od potencijalnih načina rješavanja simptoma endometrioze.

Navedeni način prehrane pomaže u smanjenju bola, grčeva, upale, nadutosti, tjelesne težine kao i smanjenju razine estrogena i toksina u tijelu. Osim što utječe na endometriozu, poboljšana prehrana povećava razinu energije, jača imunost i poboljšava cjelokupno zdravlje (124,125).

Promicanje učinka određene skupine hrane na endometriozu temelji se na kemijskim reakcijama u tijelu na koje se utječe specifičnim skupinama hrane. Neke su od tih kemijskih reakcija suptilne i višeznačno temeljene na utjecaju određenih enzima iz hrane i složenim kemijskim reakcijama koje se već odvijaju u tijelu (126, 127). Pokazano je da odgovarajuća prehrana pokazuje pleiotropni profil učinka sveukupnim interakcijama s više molekularnih ciljeva povezanih s endometriozom, kao što su stanična proliferacija, apoptoza, upala, oksidativni stres, angiogeneza i invazivnost. Studije su pokazale da vitamin A, C, E - zbog svojih antioksidativnih svojstava, vitamin D zbog utjecaja na imunomodulaciju i gensku regulaciju, omega-3 masne kiseline i riblje ulje - zbog smanjenja sinteze prostaglandina i citokina, crveno meso i maslac - zbog povišenja koncentracije estradiola u organizmu, trans-masti - zbog povećanja čimbenika upale, zeleni čaj - zbog anti-oksidativnih, anti-mitotskih i anti-angiogenih svojstava, kurkumin - zbog anti-oksidativnog i anti-angiogenog učinka, maslinovo ulje - zbog smanjenja oksidativnog stresa, zeleno povrće i voće - zbog utjecaja na DNA metilaciju te interakciju sa sintezom hormona, hrana bogata vlaknima – zbog povećanja proliferacije endometrialnih stanica, soja – zbog anti-estrogenskih svojstava mogu modulirati simptome i ishod liječenja endometrioze (128). Međutim, važno je napomenuti da su rezultati istraživanja koji ispituju utjecaj prehrane na endometriozu još uvijek ograničena i inkonzistentna. Stoga je prije donošenja definitivnih zaključaka i preporuka vezanih za liječenje endometrioze prehranom, potrebno učiniti dodatna istraživanja.

U posljednje vrijeme pokazuje se interes za korištenje polifenola u liječenju simptoma endometrioze. Neki od polifenola pokazuju snažan fitoestrogeni učinak koji modulira učinak estrogena, bez izazivanja ozbiljnih nuspojava suprotno uobičajenoj anti-estrogenoj terapiji endometrioze. Rezultati dostupnih studija ukazuju da prirodni bioaktivni spojevi ne utječu na plodnost, reproduktivne organe i razvoj potomstva (129,130). Dodatno, ova je alternativna terapija pristupačne cijene te je pogodna za dugotrajno i sigurno liječenje pacijentica s endometriozom. Brojna su pretklinička i klinička ispitivanja pripisali polifenolima široki spektar korisnih bioloških aktivnosti, a opisani su i brojni molekularni mehanizmi i putovi kojima mogu učinkovito utjecati na poboljšanje simptoma i sprečavanje napredovanja

endometrioze (131- 134)

Izoflavanoid Puerarin koji je glavni izoflavonoid iz *Radix puerariae*, ima slab učinak sličan estrogenu vezanjem za estrogenske receptore (135,136). U nekoliko je studija dokazano da su izraženost simptoma endometrioze i razina serumskog estrogena niže u skupini liječenoj i tretiranoj puerarinom i danazolom u odnosu na kontrolnu skupinu štakora (137). Liječenje puerarinom smanjilo je razinu MMP-9, ICAM-1 i VEGF, a povećalo razinu tkivnog inhibitora metaloproteinaze-1 (TIMP-1) u endometriotskim stromalnim stanicama (engl. ESC) (138). Dok su MMP i TIMP bitni za invaziju te rast i razgradnju tkiva endometrija, VEGF je važan u angiogenezi i omogućava rast i invaziju ektopičnog endometrija. Utječući na ova tri čimbenika puerarin suzbija invaziju ESC-a i vaskularizaciju. Iako pokazuje obećavajuće rezultate, prema današnjim preporukama, terapija endometrioze na prirodnoj osnovi ne može biti isključiva strategija liječenja. Međutim, u kombinaciji s etabliranom medikamentnom terapijom prirodni preparati mogu biti sastavni dio liječenja te predstavljati značajan smjer razvoja budućih terapijskih koncepta endometrioze (134, 139).

## **1.2 Vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF)**

Vaskularni endotelni čimbenici rasta (engl. VEGF) važni su signalni proteini uključeni u vaskulogenezu (novo stvaranje embrijskoga krvožilnog sustava) i angiogenezu (rast krvnih žila iz postojećeg krvožilja). VEGF obitelj broji sedam članova: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F i PlGF. Svi članovi imaju zajedničku VEGF homolognu domenu. VEGF je višefunkcijska porodica citokina izraženih u epitelnim i mezenhimnim stanicama u širokom spektru tkiva i u mnogim tumorima (140).

Kad se VEGF veže za svoj ciljni receptor, aktivacija VEGF receptora dovodi do brzog porasta koncentracije unutarstaničnog  $Ca^{2+}$  i koncentracije inozitol-trifosfata u endotelnim stanicama. Osnovna fiziološka funkcija VEGF-a jest inducirati angiogenezu, što omogućuje endometriju da se regenerira nakon menstruacije. Također modulira karakteristike novonastalih krvnih žila kontrolirajući mikrovaskularnu propusnost i dopuštajući stvaranje fibrinskog matriksa za migraciju i proliferaciju endotelnih stanica. Ova modulacija može biti

odgovorna za lokalni edem endometrija koji pomaže u pripremi endometrija za implantaciju embrija. U bolesnica s endometriozom VEGF je lokaliziran u epitelu endometriotičnih implantata, posebno kod hemoragičnih crvenih implantata (141).

Vežući se za svoje receptore R1, VEGF regulira razvoj kapilara; vežući R2 receptor, promiče diferencijaciju mezodermnih stanica u endotelne stanice. *In vivo* i *in vitro* pokusi pokazuju da steroidni hormoni, hipoksija i dušikov oksid potiču izražaj gena vaskularnoga endotelnog čimbenika rasta. Angiogeneza je temeljni proces kojim nastaju nove krvne žile i smatra se glavnim procesom u patogenezi endometrioze (142).

VEGF ima mitogene učinke na preživljenje i povećanje propusnosti u endotelnim stanicama koji su važni u novonastalim žilama i upali (141, 142). *In vitro* ima sposobnost spriječiti apoptozu u endotelnim stanicama (143).

VEGF se veže i aktivira VEGFR-1 i -2, s time da je aktivacija VEGFR2 na vaskularnim endotelnim stanicama primarni stimulator proliferacije endotelnih stanica (VEGFR-1 ima samo oko jedne desetine aktivnosti tirozin-kinaze VEGFR-2) (144). Uz svoju angiogenu aktivnosti, VEGF ima neke druge učinke kao što su hematopoetski učinci i poticanje kemotaksije monocita.

VEGF je mitogen endotelnih stanica i njegovi stimulatívni učinci na proliferaciju endotelnih stanica uglavnom su potpomognuti vezanjem na VEGFR-2. To poboljšava dimerizaciju receptora i inducira aktivaciju o Ras-ovisnih i neovisnih putova (145). Vezanje VEGF-a na VEGFR-2 također inducira fosfatidilinozitol-3'-kinaze (PI3K) / AKT unutarstanični transdukcijski put koji utječe na migraciju endotelnih stanica, preživljavanje, propusnost i apoptozu, bitan za oblikovanje i održavanje krvožilnih stijenki (144, 146).

Iako je VEGF nužan za fiziološku vaskularnu homeostazu u različitim stanicama i tkivima, također je važan u molekularnoj patogenezi rasta i metastaza tumora te je u retinopatijama povezan s nekoliko bolesti oka koje prouzročuju sljepoću, uključujući starosnu degeneraciju makule (AMD), dijabetičku i hipertenzivnu retinopatiju. Patološki učinci potpomognuti VEGF-om primarno su posljedica njegova učinka na vaskularnu propusnost i neoangiogenezu (neovaskularizaciju) (147, 148).

VEGF165 je fiziološki najvažnija izoforma VEGF-a (149). VEGF-A ili PlGF koji se vežu za heparin također se mogu vezati na neuropilin 1 (NRP-1) koji povećava njihov afinitet vezanja za VEGF-R2, ali ove molekule također mogu vezati NRP-1 neovisno o aktivaciji VEGF-R2. VEGF-R2 je glavni signalni receptor čija aktivacija poboljšava mitogenezu i propusnost vaskularnih endotelnih stanica. Pokazalo se da dva ostatka tirozina u VEGFR2 različito reguliraju angiogenezu u odnosu na vaskularnu propusnost (150).

Veliki VEGF signalni put VEGFR1 / R2 regulira aktivnosti nekoliko kinaza i uzročno provodi proliferaciju stanica, migraciju, preživljavanje i vaskularnu propusnost tijekom vaskulogeneze i angiogeneze. VEGF, osim što sudjeluje u angiogenezi, izaziva povećanu propusnost kapilarne mreže, što dovodi do izlaska fibrinskih produkata u izvanstanični prostor, a što pak povećava aktivaciju i nastanak makrofaga i njihovo lučenje TNF-a (151,152).

### **1.3 Neuropilin 1**

Neuropilin 1 (NRP1) je jednolančani transmembranski glikoprotein od 130 kDa koji djeluje kao sureceptor za brojne izvanstanične ligande, uključujući semaforine klase 3, određene izoforme vaskularnoga endotelnog čimbenika rasta i transformirajući faktor rasta beta (153,154,155). Ove višestruke interakcije NRP1 olakšava velika izvanstanična domena od 860 aminokiselina koja je organizirana u pet domena nazvanih a1, a2, b1, b2 i c (156,157). Dok domene a i b vežu ligande, c domena potiče oligomerizaciju. Semaforini klase 3 vežu se na domene a1 i a2 NRP1, a poremećaj u njihovoj međusobnoj interakciji dovodi do oštećenja aksona bez utjecaja na vaskularni razvoj (158,159). B1 i b2 domene potpomažu u vezivanju na polisaharid-heparin-sulfat i VEGF165 i oni dodatno promiču adheziju stanica (160,161). Mjesta vezanja VEGF165 razlikuju se od mjesta adhezije stanica (162,163). Tijekom razvoja izražaj NRP1 izrazit je u rastućim krvnim žilama na endotelnim stanicama kapilara, arterija i vena u mrežnici te kapilarama stražnjeg mozga (164-167).

Nekoliko je studija potaknulo mogućnost da takozvani neendotelni NRP1 regulira angiogenezu. Na primjer, NRP1 je izražen na više vrsta stanica u angiogenom okruženju. Dakle, NRP1 je izražen na tumorskim stanicama kao i na krvnim žilama tumora te u endotelu duž neuronskih početaka i tkivnim makrofagima tijekom angiogeneze stražnjeg mozga (168).

NRP1 je potreban samo na vaskularnom endotelu za normalnu angiogenezu usprkos iznimnom izražaju na neendotelnim stanicama. Genetički su pokusi pokazali da je NRP1 potreban u angiogenom endotelu kako bi omogućio stvaranje specijaliziranih stanica koje označavaju početak stvaranja krvnih žila (169).

Na temelju prijašnjih biokemijskih istraživanja i tkivnih kultura, vaskularna funkcija NRP1 smatrala se opće poznatom zbog njegova vezanja za VEGF165, koji je VEGF-A izoforma s najvećim afinitetom za NRP1. Heparin znatno povećava afinitet VEGF-a za NRP1 i čini se da doprinosi stvaranju kompleksa koji uključuje VEGF, NRP1 i VEGFR2. NRP1 također može funkcionirati u angiogenim endotelnim stanicama na način koji je neovisan o VEGF-u (170).

Vezanje VEGF-a na NRP1 nije bitno za embrijsku angiogenezu, pa NRP1 mora imati ulogu neovisnu o VEGF-u u angiogenezi koja je vjerojatno u sinergiji s njegovom poznatom ulogom sureceptora VEGFR2 (171).

U skladu s izvornim otkrićem NRP1 kao adhezijske molekule u živčanom sustavu, dokazano je da NRP1 potiče vezivanje endotelних stanica na izvanstanični matriks i na izravno komuniciranje s integrinima *in vitro*. Domene koje omogućuju NRP1 modulaciju adhezije na heterologne, ali neidentificirane proteine susjednih stanica nalaze se u domenama b1 i b2. Još nije poznato regulira li NRP1-om potpomognuta adhezija međustaničnog ili staničnog matriksa interakciju krvnih žila s njihovom okolinom tijekom angiogeneze *in vivo* (172-174).

Preoblikovanje izvanstaničnog matriksa s pomoću NRP1 događa se u primarnim endotelnim stanicama arterija i tumorskih stanica i čini se da je potpomognuto citoplazmatskim dijelom NRP1 bez potrebe za aktivacijom receptora VEGFR2 s pomoću VEGF (175, 176). Citoplazmatski dio NRP1 nema nikakvo katalitičko djelovanje i to upućuje na činjenicu da NRP1 prenosi signale u vaskulaturu preko sureceptora. Kandidati za signalni prijenos s pomoću NRP1 u endotelnim stanicama jesu VEGF-a receptori tirozin-kinaze VEGFR1 i VEGFR2 i, kao što je već dokazano, oboje djeluju *in vitro* s NRP1 i zato što NRP1 povećava fosforilaciju VEGFR2 (177,178). Zapravo, najviše prihvaćen model funkcije NRP1 u angiogenezi jest da NRP1 stvara o VEGF165 ovisan kompleks s VEGFR2 kako bi pojačao aktivaciju različitih unutarstaničnih prijenosnih signalnih putova (179,180).

Može se reći da je neuropilin 1 višefunkcijski jednolančani transmembranski protein koji igra važnu ulogu u razvoju, imunosti i tumorima (181-184).

Kao što je već spomenuto, potvrđeno je da se aktivacija VEGF receptora s pomoću VEGF-a može dogoditi i u odsutnosti neuropilina 1 (185), ali NRP1 potpomaže u migraciji endotelnih stanica i bitan je za angiogenezu. NRP1 također komunicira s drugim ključnim receptorima koji sudjeluju u angiogenezi. Istraživanja pokazuju da neuropilin 1 ima mnogo širi spektar liganada nego što je u početku otkriveno (186-188). NRP1 može vezati transformirajući faktor rasta  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) i njegove receptore (189), faktor rasta hepatocita (HGF) i njegov receptor (cMet), trombocitni derivirani faktor rasta (PDGF) i njegove receptore i neke čimbenike rasta fibroblasta (FGF). Neuropilin 1 općenito doprinosi staničnoj adheziji embrijskih i drugih vrsta stanica (190).

U imunom sustavu NRP1 izražavaju timociti, plazmocitoidne dendritne stanice (pDC) i regulacijske T-stanice (Tr ili Treg stanice). Postoji niz područja u kojima se čini da NRP1 doprinosi imunosti. Uključen je u razvoj imunostnog sustava i diferencijaciju timocita. Pronađeno je da doprinosi nastanku imunostnih sinapsa između T-stanica i antigen-prezentirajućih stanica (APC) (191-193).

Funkcionalno, NRP1 je često povezan s inhibicijom imunosti. Nekoliko je studija detaljno objasnilo imunoregulacijske aktivnosti semaforina koje mogu biti ili inhibicijske ili stimulatívne. Međutim, interakcije Nrp1 sa SEMA3A mogu imati imunostni učinak (194,195). U ovom slučaju SEMA3A tvori a kompleks s NRP1 (sureceptor) i pleksinom-A4 (signalni receptor) za aktiviranje imunoinhibicijskog odgovora.

Mnoge stanične linije malignih tumora izražavaju NRP1 i/ili NRP2, a čini se da to pridonosi njihovoj agresivnosti. Klinički, neuropilini su često prekomjerno izraženi kod nekoliko tipova tumora, uključujući karcinome (npr. gušterača, prostata, dojka, debelo crijevo i bubreg), melanom, glioblastom, leukemije, limfomi i drugi. Općenito, izražaj NRP1 korelira s klinički dosta agresivnim ponašanjem tumora (195).

Iako je izražaj NRP1 kod nekih vrsta karcinoma povezan s lošom prognozom bolesti, većina studija nije razlikovala je li to zbog izražaja na vaskulaturi tumora ili tumorskim stanicama. Iako je izražaj NRP1 u krvožilnom sustavu vrlo čest, u stanicama tumora prilično se razlikuje od jednoga do drugog tumora. Stoga bi se moglo tvrditi da su NRP1 uključeni



samo ili uglavnom u tumorsku angiogenezu. Precizne mehanizme djelovanja NRP1 u tumoru teško je odrediti jer su u interakciji s nizom molekula povezanih s tumorima. Tako doprinose proliferaciji, migraciji stanica tumora, invaziji, adhezivnosti i metastaziranju. Izražavaju ih i razne stromalne stanice koje mogu komunicirati sa stanicama tumora, uključujući fibroblaste, endotelne stanice i imunosne stanice (195,196).

#### **1.4 Aneksin A2**

Aneksin A2 (ANXA2) pripada široko rasprostranjenim proteinima koji komuniciraju s univerzalnim elementima staničnog okruženja kao što su kalcij i fosfor (197, 198). ANXA2 je toplivi protein pri nižoj koncentraciji kalcija, a vezivanje ANXA2 na površini stanica ovisno je o kalciju. Postoji niz različitih funkcija ANXA2 koje su opisane u literaturi pa je tako ANXA2 uključen u nekoliko bioloških funkcija uključujući mitogenu signalnu transdukciju, imunosni odgovor, fibrinolizu, proliferaciju i karcinogenezu (199,200). Njegov izniman izražaj bilježi se na epitelnim stanicama crijeva, pluća, površini vaskularnih epitelnih stanica, stanicama mijelomonocitne leukemije i stanicama iz linije monocita (201,202).

Tijekom izražaja na nezavisnim veznim mjestima za plazminogen i tkivni aktivator plazminogena aneksin A2 povezuje ta dva proteina na površini stanice i time ubrzava stvaranje plazmina i pridonosi nadzoru fibrinolize i održavanju protočnosti krvi. Poznato je da sustav plazminogen/plazmin regulira angiogenezu i ima važnu ulogu u karcinomu dojki. Plazmin ima važnu ulogu u vaskularnoj trombolizi kao i u ostalim biološkim procesima koji uključuju migraciju poput angiogeneze, upalnih reakcija, preuredbe tkiva, progresije i invazije tumora (203-205). Prema dobivenim studijama došlo se do činjenica kako je mehanizam stvaranja plazmina s pomoću ANXA2 bitan za angiogenezu, progresiju karcinoma dojke i metastaze. Čini se kako je ANXA2 svojevrsan regulator kontinuiranog stvaranja plazmina u tumorskom okruženju i to objašnjava prisutnost ANXA2 na stanicama ljudskih karcinoma. U normalnom tkivu jetre i mozga nema ANXA2. Međutim, oštećenja jetre te karcinomi jetre kao i neki oblici glioblastoma uključuju izražaj ANXA2. Glioblastomi su poznati po izrazitoj angiogenezi i jedan su od agresivnijih ljudskih karcinoma (206, 207).

Izražaj aneksina A2 na specifičnim stanicama nije povezan samo s normalnim fiziološkim funkcijama nego ima ulogu u većini ljudskih karcinoma. Na primjer, aneksin A2 je otkriven na malignom epitelu pankreasa i na karcinomima glave i vrata i zabilježeno je da regulira staničnu invaziju i metastaze. Dosadašnje studije također su otkrile ANXA2 na površini stanica karcinoma bubrega, nelimfocitnih leukemija, više oblika glioblastoma, astrocitnim malignim tumorima (208-210). S obzirom na to da je aneksin A2 povezan s karcinomima i da se nalazi na stanicama, novije tehnologije poput mikropostroja, proteomike i genetičkih metoda identificirale su ANXA2 među genima i proteinima koji diferencijalno reguliraju angiogenezu, karcinome i metastaze. Prema tim spoznajama čini se kako aneksin A2 na molekularnoj razini korelira s progresijom karcinoma, metastatskim ponašanjem i kliničkim ishodom (211).

Aneksin A2 prema nekim studijama regulira endotelnu morfogenezu preko potpomognutog puta adheriranim spojem. Također je u interakciji s karcinoembrijskom antigen-staničnom adhezijskom molekulom-1 koja je izvanstanični transmembranski glikoprotein pronađen na mjestima međustaničnih kontakata određenih vrste stanica, uključujući aktivirane endotelne stanice koje sudjeluju u angiogenezi (212-214).

Aneksin A2 igra važnu ulogu u razvoju adenomioze koja je svojom patogeneom slična endometriozu. Istraživanja su pokazala da se prostaglandin E2 znatno povećava u tkivima maternice bolesnika s adenomiozom, posebno u bolesnika s teškom dismenorejom. Primijećeno je da ANXA2 znatno povećava izražaj ciklooksigenaze 2 u peritonejskim makrofagima. Ciklooksigenaza 2 je enzim važan u pretvaranju prostaglandina iz arahidonske kiseline. Čini se da povišene razine estrogena zbog adenomioze mogu povećati ciklooksigenazu 2 s pomoću regulacije ANXA2 (214).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Endometrioza je česta kronična upalna bolest ženske populacije i karakterizirana je rastom endometrija izvan tkiva maternice. Izvan maternice nastaje ektopično tkivo endometrija u obliku endometriotičnih lezija koje doživljavaju cikličke, fiziološke promjene kao i normalan endometrij. Najčešće su lokacije endometriotičnih lezija donji dio zdjelice, jajnici i rektovaginalni prostor. Simptomi mogu varirati ovisno o lokaciji lezija, no najčešći su zdjelični bol i smanjena mogućnost zanošenja. Patogeneza endometrioze složena je i još uvijek nedovoljno razjašnjena. U patogenezi su ključni porećaj imunskog odgovora, poremećena angiogeneza, izmijenjeni odgovori na estrogen, progesteron i prostaglandine te promijenjene funkcije stanica.

Medikamentne i kirurške metode te njihova kombinacija pružaju mogućnost lijećenja ove složene bolesti, ali ne i trajno izljećenje. U endometriozi je naglašen individualan pristup lijećenju pri čemu se svim dostupnim metodama nastoji spriječiti daljnje napredovanje bolesti.

Laparoskopija s patohistološkom analizom lezija zlatni je standard u dijagnostici endometrioze, što znači da se dijagnostika još uvijek temelji na relativno invazivnoj i radno zahtjevnoj metodi. Laboratorijska dijagnostika na području endometrioze još uvijek nije utvrdila biljeg kojim bi se uz odgovarajuću osjetljivost i specifičnost postavila dijagnoza i procjena stadija bolesti.

Upravo zbog svoje još uvijek nedovoljno razjašnjene patogeneze i nepostojanja laboratorijskog testa koji bi na neinvazivan način upozoravao na ovu dijagnozu, endometrioza predstavlja izazov kliničarima. Sa ciljem doprinosa u razjašnjenju patogeneze i uspostavljanja mogućeg neinvazivnog postavljanja dijagnoze ove bolesti postavljeni su ciljevi i hipoteze ovog istraživanja.

Glavna hipoteza ovog istraživanja jest:

serumske koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 znatno se razlikuju u pacijentica s endometriozom u odnosu na zdrave ženske osobe te stoga mogu biti kriterij neinvazivne dijagnostike ove bolesti.

Glavni cilj ovog istraživanja bio je ispitati može li određivanje koncentracija VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 u serumu pridonijeti dijagnostici endometrioze.

Specifični ciljevi jesu:

1. Odrediti koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 u serumu bolesnica s endometriozom i zdravih osoba.
2. Usporediti serumske koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 između bolesnica s endometriozom i zdravih osoba.
3. Ispitati međusobnu povezanost VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 u bolesnica s endometriozom.
4. Usporediti koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 u bolesnica s endometriozom ovisno o stadiju endometrioze prema rASRM klasifikaciji.
5. Ispitati utjecaj indeksa tjelesne mase na koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 u bolesnica s endometriozom.
6. Ispitati dijagnostičku točnost VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 u serumu kao neinvazivnih laboratorijskih biljega za otkrivanje prisutnosti endometrioze.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1 Ispitanice**

Istraživanje je uključilo ukupno 200 ženskih osoba u dobi od 18 do 39 godina. Sve ispitanice imale su redovit menstrualni ciklus (dužine 25 – 32 dana). Svim je ispitanicama usmeno i pismeno objašnjen detaljan plan i svrha istraživanja. Istraživanje je provedeno u skladu s Osnovama dobre kliničke prakse i Helsinškom deklaracijom i sve su ispitanice potpisale informirani pristanak. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkoga bolničkog centra Zagreb (broj odobrenja 02/21/JG od 25. srpnja 2014.) i Povjerenstvo za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (broj odobrenja 251-62-03 -14 -8 od 6. studenog 2014.).

Cjelokupno istraživanje provedeno je u Klinici za ženske bolesti i porode Kliničkoga bolničkog centra Zagreb.

Kriteriji isključenja iz istraživanja bili su:

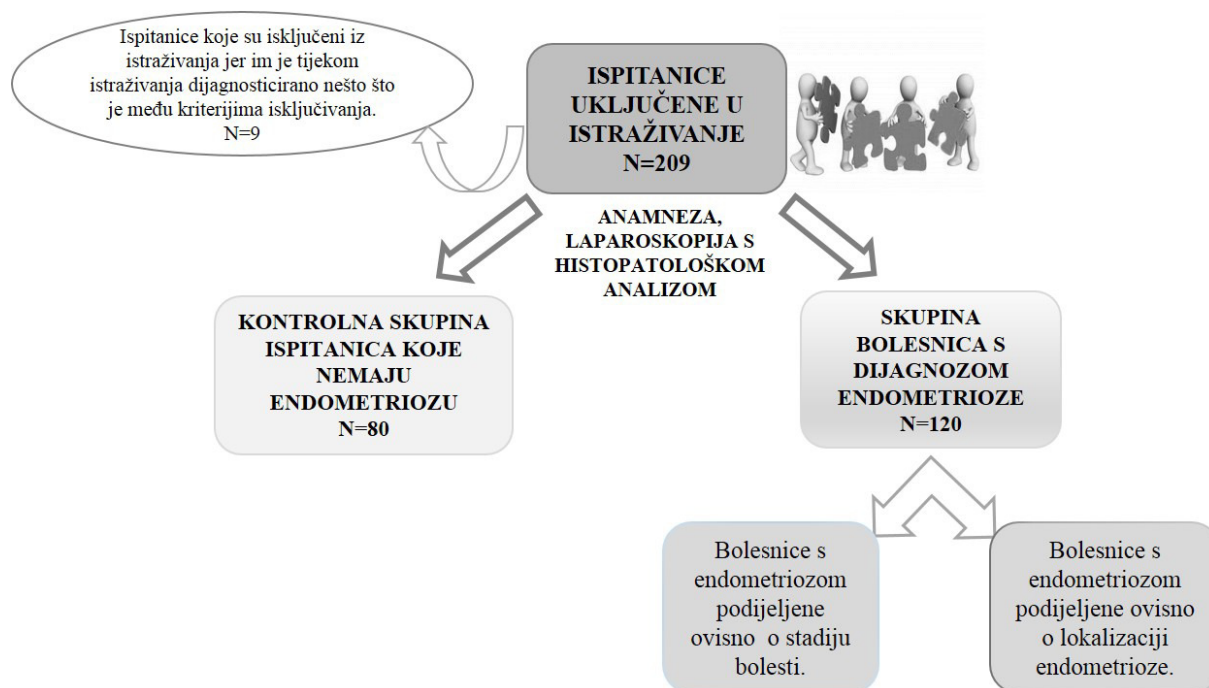
- trudnoća prije laparoskopskog zahvata ili šest mjeseci nakon zahvata
- aktivna zdjelična upala u trenutku zahvata
- genitalna ili ekstragenitalna maligna bolest
- sindrom policističnih jajnika
- prisutnost genitalnih cista
- adenomioza
- prisutnost fibroze
- uzimanje nesteroidnih protuupalnih lijekova
- dijagnoza neplodnosti nepovezana s endometriozom
- uzimanje oralnih kontraceptiva ili agonista gonadotropin-oslobađajućeg hormona

- prisutna akutna ili kronična genitalna bolest uz iznimku endometrioze.

Ispitanice uključene u istraživanje bile su žene podvrgnute laparoskopskoj operaciji zbog sumnje na endometriozu ili postupka sterilizacije. Početna dijagnoza endometrioze postavljena je na temelju anamneze, kliničkog pregleda i ultrazvučne pretrage vaginalnom sondom. Ispitanice su nakon operacijskog zahvata raspoređene u dvije skupine kako slijedi:

- skupina s endometriozom uključivala je 120 pacijentica s dijagnozom endometrioze potvrđene histološkom analizom tkiva nakon laparoskopske operacije. Daljnja podjela unutar skupine prema rASRF klasifikaciji i s obzirom na stadij bolesti bila je:
  - stadij II – 50
  - stadij III – 62
  - stadij IV – 8

Kontrolnu skupinu činilo je 80 zdravih žena podvrgnutih laparoskopskoj operaciji zbog postupka sterilizacije.



**Slika 2.** Grafički prikaz ustroja skupine ispitanika

### 3.2 Uzorci

Uzorci periferne venske krvi uzorkovani su kod svih ispitanica natašte pola sata prije primjene anestezije. Za potrebe istraživanja korištene su epruvete (Vacuette, Greiner Bio-One GmbH, Njemačka) s podtlakom i svakoj ispitanici izvađene su dvije epruvete (od 5 mL) bez antikoagulansa i aditiva. Kod svih ispitanica jedna epruveta (za VEGF i ANXA2) centrifugirana je nakon 30 minuta, a epruveta za NRP1 centrifugirana je dva sata nakon uzimanja krvi i to 15 minuta na 2000 g. Svaki uzorak nakon centrifugiranja vizualno je provjeren na prisutnost lipemije i hemolize.

Alikvoti uzoraka seruma odvojeni su nakon centrifugiranja, obilježeni i pohranjeni na temperaturi od – 80 °C do analize.

### 3.3 Metode

Serumske koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 određene su kompletom reagensa (Cloud-clone Corp., Houston, TX) ELISA metodom (od engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Nakon provedenoga analitičkog procesa rezultati su mjereni na čitaču mikrotitarskih pločica SPECTROstar Omega (BMG LABTECH GmbH; Njemačka). ELISA kombinira specifičnost reakcije antigen-antitijelo i osjetljivost jednostavne enzimске reakcije. Osnovno je načelo metode reakcija antigen-antitijelo, a koncentracija analita određuje se promjenom boje kromogena koja se mjeri spektrofotometrijski i kvantificira s pomoću standardne krivulje. Reagensi korišteni za istraživanje koriste tzv. „sendvič“ tip ELISA tehnike.

Načelo korištenih ELISA testova jest:

Mikrotitarska ploča isporučena u kompletu reagensa prethodno je presvučena antitijelom specifičnim za određivani analit. Standardi i uzorci zatim se dodaju u odgovarajuće jažice mikroploča s biotin-konjugiranim antitijelom specifičnim za određivani analit. Zatim se u svaku jažicu mikrotitarske ploče dodaje avidin konjugiran s peroksidazom hrena (HRP) i nakon toga slijedi inkubacija. Nakon dodavanja otopine supstrata 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), samo one jažice koje sadržavaju analit koji se određuje, antitijela konjugirana biotinom i enzimom konjugirani avidin pokazat će promjenu boje proporcionalnu koncentraciji analita. Reakcija enzim – supstrat završava zbog nagle promjene pH dodatkom tzv. „stop“ otopine sumporne kiseline, a promjena boje mjeri se spektrofotometrijski na valnoj duljini od 450 nm ± 10 nm. Koncentracija određivanog analita u uzorcima određuje se usporedbom optičke gustoće (engl. O.D.= *optical density*) uzorka i standardne krivulje.

Sadržaj kompleta reagensa i priprema reagensa u sklopu kompleta:

- mikrotitarska pločica s 96 jažica presvučena specifičnim antitijelima na određivani analit (VEGF, neuropilin 1 i aneksin A2) i četiri poklopca za svih 96 jažica mikrotitarske pločice
- standard: kalibrator koji se otapa diluentom standarda
- reagens za detekciju A: priprema se i otapa s diluentom A



- reagens za detekciju B: priprema se i otapa s diluentom B
- TMB supstrat: spreman je za upotrebu
- pufer za ispiranje (30 x koncentriran): koncentrat pufera za ispiranje razrjeđuje se s 580 mL deionizirane vode
- diluent standarda: za razrjeđivanje standarda (kalibratora)
- diluent A
- diluent B
- *stop*-otopina.

### 3.3.1 Određivanje koncentracije VEGF-a

Svi uzorci ispitanika odmrznuti su stajanjem na sobnoj temperaturi 30 minuta i promiješani, a zatim razrijeđeni 1 : 5 s fosfatnim puferom (PBS) te ponovo promiješani. Svi su reagensi pripremljeni prema uputama proizvođača koje su se nalazile u sklopu kompleta s reagensima.

Postupak testa:

1. Pripremljene su jažice mikrotitarskih ploča za razrijeđeni standard, slijepu probu i uzorke. Razrijeđeni uzorci i pripremljeni standardi pipetirani su u jažice. Dodano je po 100  $\mu\text{L}$  razrijeđenog standarda (1,000  $\mu\text{g/L}$ , 0,500  $\mu\text{g/L}$ , 0,250  $\mu\text{g/L}$ , 0,125  $\mu\text{g/L}$ , 0,625  $\mu\text{g/L}$ , 0,0312  $\mu\text{g/L}$ , 0,0156  $\mu\text{g/L}$ ), slijepa probe i uzoraka u odgovarajuće jažice. Prekrivena je mikrotitarska pločica i inkubirana sat vremena na 37 °C.
2. Uklonjena je tekućina iz svake jažice bez ispiranja.
3. Dodano je 100  $\mu\text{L}$  reagensa radne otopine u svaku jažicu, prekrivene su jažice i inkubirane tijekom jednog sata na 37 °C.
4. Aspirirana je radna otopina i isprana svaka jažica s 350  $\mu\text{L}$  otopine za ispiranje s pomoću automatskog uređaja za ispiranje i ostavljena da odstoji od 1 do 2 minute. Uklonjena je

preostala tekućinu iz svih jažica okretanjem mikrotitarske ploče na upijajući papir. Potpuno ispiranje provodi se tri puta. Nakon zadnjeg ispiranja uklonjen je ostatak otopine za ispiranje aspiracijom jažica mikrotitarske ploče. Nakon aspiracije okrenuta je mikrotitarska ploča na upijajući papir kako bi se u potpunosti uklonila zaostala tekućina.

5. Dodano je 100  $\mu\text{L}$  radne otopine detekcijskog reagensa B u svaku jažicu, prekrivene su jažice i inkubirane 30 minuta na 37 °C.

6. Ponovljen je postupak aspiracije i pranja ukupno pet puta kao što je provedeno pod točkom 4.

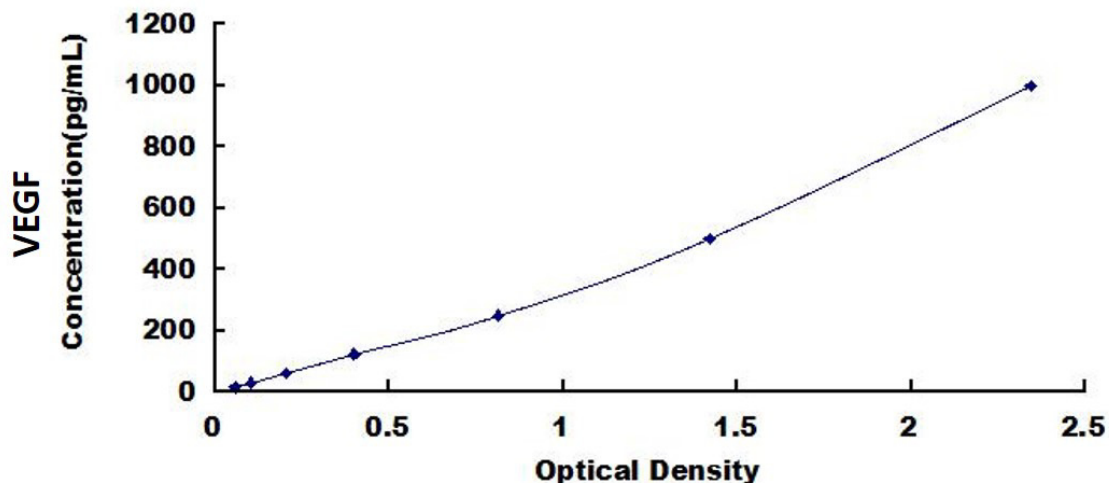
7. Dodano je 90  $\mu\text{L}$  otopine supstrata u svaku jažicu. Jažice su pokrivene, zatim inkubirane 20 minuta na 37 °C te zaštićene od svjetlosti. Dodatkom supstrata sadržaj u jažicama obojio se plavo.

8. Dodano je 50  $\mu\text{L}$  „Stop“-otopine u svaku jažicu. Dodatkom *stop*-otopine sadržaj jažica oboji se žuto. Pomiješan je sadržaj jažica tapkanjem po strani ploče kako bi se dobila jednolična žuta boja u svim jažicama.

9. Uklonjena je sva tekućina i otisci prstiju s dna ploče i provjereno je da nema mjehurića u jažicama. S pomoću čitača mikrotitarskih ploča provedeno je spektrofotometrijsko mjerenje na 450 nm.

Na temelju poznatih vrijednosti standarda i za njih dobivenih vrijednosti O.D. napravljena je kalibracijsku krivulja i očitane koncentracije VEGF-a za svaki uzorak.

Prema navođenju proizvođača preciznost unutar serije testiranja je koeficijent varijacije < 10 %, a između serije testiranja koeficijent varijacije < 12 %. Granice detekcije testa iznose od 0,006 do 1,00  $\mu\text{g/L}$ .



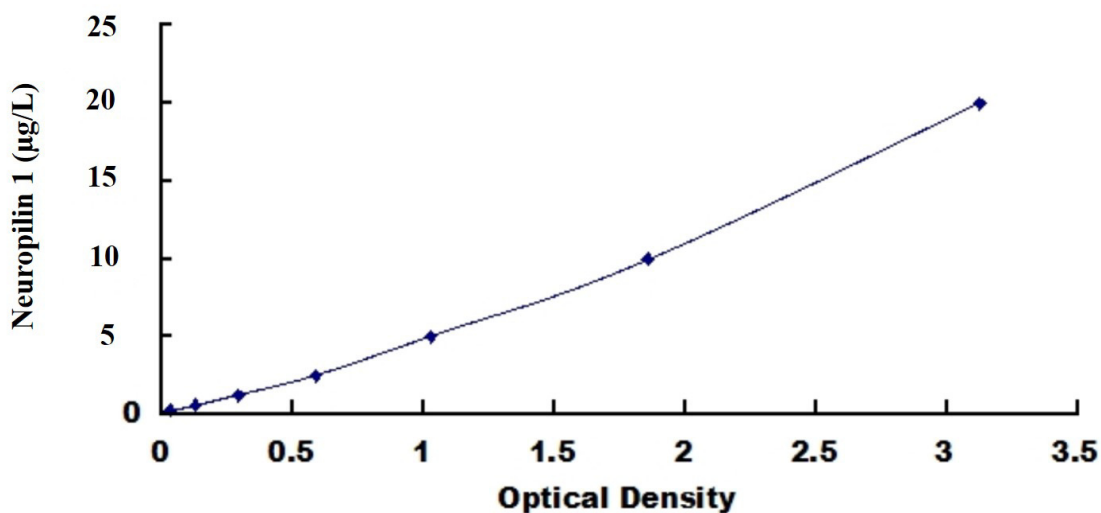
**Slika 3.** Primjer kalibracijske krivulje za VEGF.

### 3.3.2 Određivanje koncentracije neuropilina 1

Svi uzorci ispitanika odmrznuti su stajanjem na sobnoj temperaturi 30 minuta i promiješani, a zatim razrijeđeni 1 : 5 s fosfatnim puferom (PBS) te ponovo promiješani. Svi su reagensi pripremljeni prema uputama proizvođača koje su se nalazile u sklopu kompleta s reagensima.

Postupak provođenja testa za neuropilin 1 odgovara prethodno opisanom postupku testa za VEGF uz napomenu da se radilo o različitim koncentracijama standarda za izradu kalibracijske (standardne) krivulje.

Prema navođenju proizvođača preciznost unutar serije testiranja je koeficijent varijacije < 10 %, a između serije testiranja koeficijent varijacije < 12 %. Osjetljivost i najniža koncentracija detekcije je 0,124 µg/L. Granice detekcije testa jesu 0,124 – 20 µg/L.



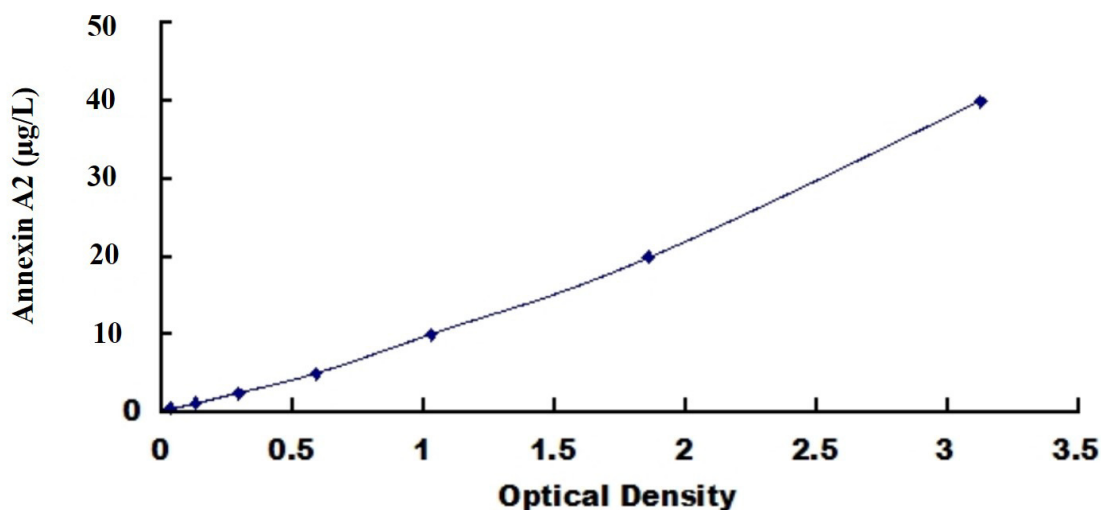
**Slika 4.** Primjer kalibracijske krivulje za neuropilin 1.

### 3.3.3 Određivanje koncentracije aneksina A2

Svi uzorci ispitanika odmrznuti su stajanjem na sobnoj temperaturi 30 minuta i promiješani, a zatim razrijeđeni 1 : 5 s fosfatnim puferom (PBS) te ponovo promiješani. Svi su reagensi pripremljeni prema uputama proizvođača koje su se nalazile u sklopu kompleta s reagensima.

Postupak provođenja testa za aneksin A2 odgovara prethodno opisanom postupku testa za VEGF uz napomenu da se radilo o različitim koncentracijama standarda za izradu kalibracijske (standardne) krivulje.

Prema navođenju proizvođača preciznost unutar serije testiranja je koeficijent varijacije < 10 %, a između serije testiranja koeficijent varijacije < 12 %. Osjetljivost i najniža koncentracija detekcije je 0,265 µg/L. Granice detekcije testa jesu od 0,265 do 40 µg/L.



**Slika 5.** Primjer kalibracijske krivulje za aneksin A2.

### 3.4 Statistička analiza

Za testiranje normalnosti raspodjele svih kvantitativnih varijabli korišten je Kolmogorov-Smirnovljev test. Varijable s normalnom raspodjelom prikazane su primjenom srednje vrijednosti i standardne devijacije (SD), dok su varijable čija je raspodjela odstupala od normalne prikazane medijanom i interkvartilnim rasponom (IQR). S obzirom na raspodjelu podaci su testirani na razliku parametarskim ili neparametarskim testovima za nezavisne uzorke. Korišten je Studentov t-test za normalnu raspodjelu podataka, a Mann-Whitneyev test za podatke koji ne slijede normalnu raspodjelu, kada se radilo o usporedbi dviju skupina.

Statistički bitna razlika između više od dvije skupine kvantitativnih varijabli ispitana je primjenom analize varijance (ANOVA, engl. *analysis of variance*) statističkog testa (kada su varijable slijedile normalnu raspodjelu), odnosno neparametarskog Kruskal-Wallis testa (kada varijable nisu slijedile normalnu raspodjelu i kada je u skupini bilo manje od 30 ispitanika).

Postojanje povezanosti (korelacije) između dobivenih rezultata varijabli ispitano je Spearmanovim korelacijskim testom. Dobiveni koeficijenti korelacije koji upućuju na statistički važnu povezanost ( $P < 0,05$ ) tumačeni su prema Coltonovu kriteriju:

- $r = 0$  do  $0,25$  ili  $0$  do  $-0,25$  (nema povezanosti)
- $r = 0,26$  do  $0,50$  ili  $-0,26$  do  $-0,50$  (slaba povezanost)
- $r = 0,51$  do  $0,75$  ili  $-0,51$  do  $-0,75$  (umjerena do dobra povezanost)
- $r = 0,76$  do  $1$  ili  $-0,76$  do  $-1$  (vrlo dobra do izvrsna povezanost).

Dijagnostička učinkovitost VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 kao biomarkera za prisutnost endometrioze testirana je ROC analizom (engl. *receiver operating characteristic curve*) uz dobivene vrijednost područja ispod krivulje kao glavnom mjerom ishoda (engl. *area under the curve*, AUC) te uz prikazane 95%-tne intervale pouzdanosti i standardnu pogrešku (engl. *standard error*, SE). Granična vrijednost (engl. *cut-off*) serumskih koncentracija VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 s najboljom dijagnostičkom izvedbom u smislu odnosa osjetljivosti i specifičnosti za detekciju endometrioze određena je Youden J indeks-algoritmom.

Razina statističke važnosti u svim navedenim analizama postavljena je na  $P < 0,05$ .

Podaci su prikupljeni i pohranjeni u bazi podataka u programu MS Excel. Statističke analize provedene su korištenjem MedCalc for Windows statističke verzije softvera 16.4.3 (MedCalc, Ostend, Belgija).

## 4. REZULTATI

### 4.1 Opće karakteristike ispitanica

Kliničke i demografske karakteristike ispitanica s endometriozom uključenih u studiju prikazane su u tablici 2a., a kontrolne skupine u tablici 2b.. Nije nađena razlika u dobi između kontrolne skupine zdravih ispitanica i ispitanica s endometriozom ( $P = 0,249$ ). Razlika u indeksu tjelesne mase (ITM) između zdrave skupine žena i skupine s endometriozom nije bila statistički značajna ( $P = 0,086$ ).

**Tablica 2a.** Kliničke i demografske karakteristike ispitanica s dijagnozom endometrioze (IQR = interkvartilni raspon; ITM = indeks tjelesne mase)

	N	%
Stadij endometrioze (rASRM)	II	41,6
	III	51,7
	IV	6,7
Lokacija endometrioze: jajnik	58	48,3
Zahvaćenost dviju lokacija	55	45,8
Zahvaćenost triju lokacija	7	7,12
Prisutnost bola kao simptom	58	48,3
ITM: median (IQR)	25 (24 – 26)	
Pozitivna obiteljska anamneza	64	53,3
Dob u godinama: median (IQR)	35,0 (33,0 – 36,0)	
Vrijeme od prvih simptoma do postavljanja dijagnoze endometrioze (godine): median (IQR)	3,4 (2,8 – 4,7)	

**Tablica 2b.** Kliničke i demografske karakteristike zdravih ispitanica (IQR = interkvartilni raspon; ITM = indeks tjelesne mase)

<b>Parametar</b>	<b>N</b>	<b>Dob u godinama: median (IQR)</b>	<b>ITM</b>
<b>Kontrolna skupina</b>	80	36 (35 - 37)	25 (24 – 27)

U istraživanje je uključeno ukupno 209 ispitanica, ali je tijekom istraživanja devet ispitanica isključeno iz studije zbog naknadnog postavljanja dijagnoze maligne bolesti (sedam ispitanica iz grupe bolesnika) i apendicitisa (dvije ispitanice iz kontrolne skupine). U konačnim podacima raspolagali smo s ukupno 200 ispitanica čije smo rezultate uključili u statističku obradu podataka.

Ispitanice iz skupine bolesnica, osim prema stadiju bolesti, podijeljene su i prema broju lokacija zahvaćenih endometriozom. Sve ispitanice u skupini s jednom lokacijom imale su endometriozu na jajniku. U skupini s dvije odnosno tri lokacije ulazile su ispitanice s kombinacijom zahvaćenih lokacija na jajniku, tankom crijevu, rektumu, debelom crijevu i mokraćnom mjehuru.

Prilikom podjele ispitanica prema postojanju simptoma bola, pojedinim ispitanicama bilo je teško definirati jačinu bola s obzirom na subjektivnost navedenog osjećaja. Pojedine ispitanice koje su imale blaži oblik bola, a koju su ga osjetile isključivo za vrijeme menstruacije smatrale su da to nije znatni bol, odnosno da je povezan s menstrualnim krvarenjem i stoga su navele da nemaju simptome bola prouzročenog endometriozom. Kako bismo izbjegli neodgovarajuću klasifikaciju podskupina ispitanica s obzirom na simptom i lokalizaciju bola, učinjena je jednostavna podjela na one kod kojih postojao simptom bola i one koje negiraju bol kao simptom.



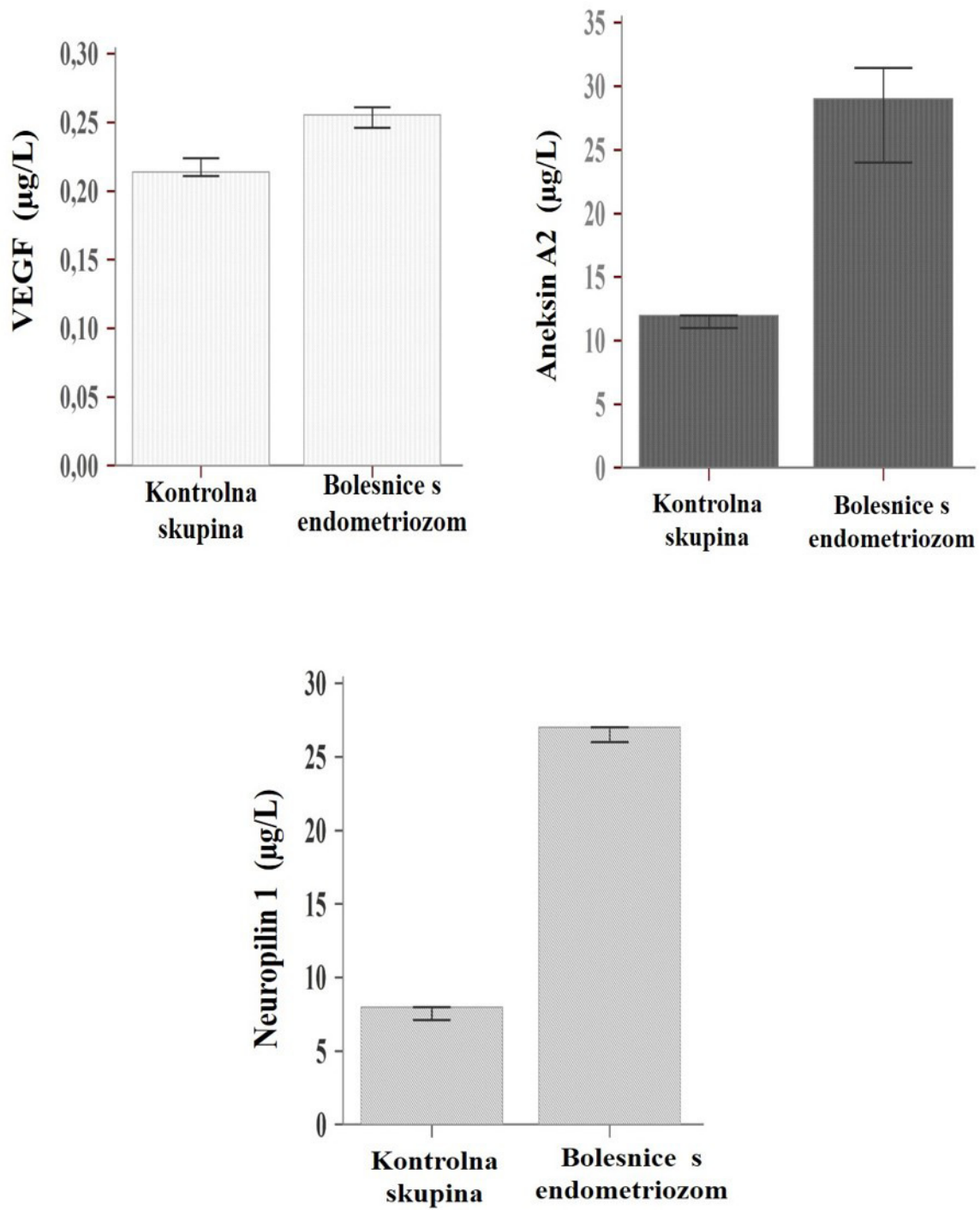
## 4.2 Koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 između dviju skupina ispitanica

Koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 izmjerene su u serumu svih ispitanica. Izmjerene serumske koncentracije za sva tri parametra statistički su se bitno razlikovale između zdravih ispitanica i ispitanica s dijagnozom endometrioze. Koncentracije sva tri parametra bile su statistički znatno povišene u serumu ispitanica s endometriozom u odnosu na zdrave ispitanice bez endometrioze (tablica 3., slika 6.).

**Tablica 3.** Koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 u ispitanica s endometriozom i u kontrolnoj skupini ispitanica

Parametar	Kontrolna skupina	Bolesnice s endometriozom	P vrijednost
<b>VEGF (µg/L)</b>	0,214 (0,201 – 0,230)	0,254 (0,231 – 0,268)	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>Neuropilin 1 (µg/L)</b>	8,2 (7,3 – 9,4)	27,1 (25,6 – 28,1)	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>Aneksin A2 (µg/L)</b>	12,4 (10,2 – 13,4)	29,1 (21,3 – 35,6)	<b>&lt; 0,0001</b>

*Rezultati su prikazani sa medijanom i interkvartilnim rasponom jer ne slijede normalnu razdiobu (testirano Kolmogorov-Smirnovim testom); P vrijednost izračunana je Mann-Whitneyevim testom za nezavisne uzorke koji slijede nenormalnu razdiobu podataka. Statistički bitna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti  $P < 0,05$ , a jačim tiskom otisnute su statistički bitne razlike između kontrolne skupine i skupine s endometriozom.*



**Slika 6.** Grafički prikaz razlike serumskih koncentracija VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 između kontrolne skupine i bolesnica s endometriozom

### 4.3 Koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 s obzirom na stadij endometrioze

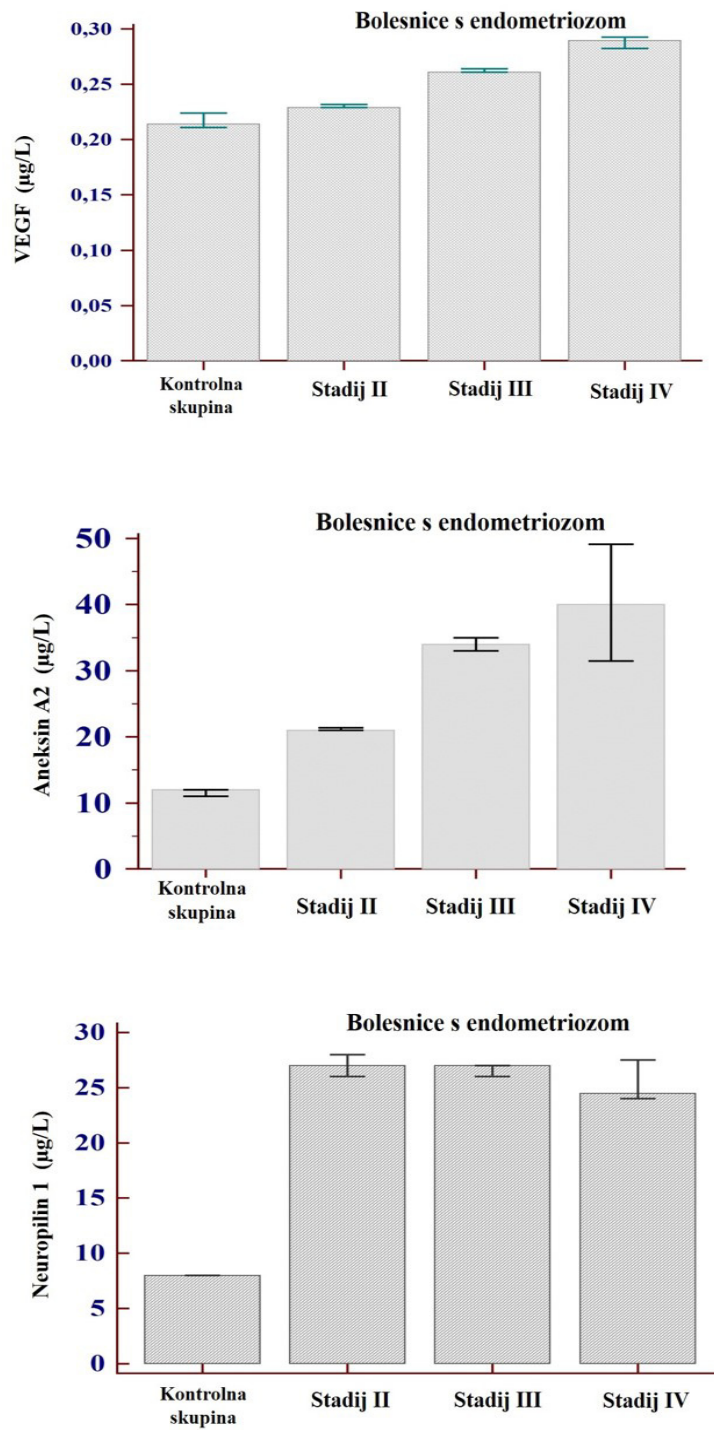
Ispitanice s endometriozom podijeljene su prema težini bolesti odnosno stadijima sukladno rASRM klasifikaciji (61) u tri skupine. Naše ispitanice s endometriozom imale su II., III. i IV. stadij endometrioze i prema tome su podijeljene u skupine te su izračunane pripadajuće serumske koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 (tablica 4.).

Koncentracije neuropilina 1 u serumu nisu se razlikovale s obzirom na stadij endometrioze ispitanica. Za razliku od neuropilina 1, koncentracije VEGF-a i aneksina A2 u serumu ispitanica s endometriozom statistički su se bitno razlikovale s obzirom na stadij endometrioze i to s tendencijom povišenih koncentracija što je stadij bolesti bio veći.

**Tablica 4.** Koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 s obzirom na stadij endometrioze prema rASRM klasifikaciji (61)

Parametar	II	III	IV	P vrijednost
<b>VEGF (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	0,229 (0,227 – 0,234)	0,261 (0,253 – 0,271)	0,289 (0,284 – 0,291)	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>Neuropilin 1 (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	27,2 (25,7 – 28,1)	27,1 (25,6 – 28,2)	24,5 (24,4 – 27,2)	0,1558
<b>Aneksin A2 (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	21,4 (19,2 – 22,3)	34,1 (31,0 – 39,2)	40,2 (32,1 – 47,5)	<b>&lt; 0,0001</b>

*Kvantitativni podaci prikazani su kao medijan (interkvartilni raspon). Statistički bitna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti  $P < 0,05$ . Jačim tiskom otisnute su bitne razlike s obzirom na stadije endometrioze prema rASRM klasifikaciji.*



**Slika 7.** Grafički prikaz razlike serumskih koncentracija VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 između kontrolne skupine ispitanica i bolesnica s endometrioziem s obzirom na stadij bolesti.

#### 4.4 Koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 u skupini s endometriozom s obzirom na broj lokacija ektopičnog endometrija

Usporedbom VEGF-a, aneksina A2 i neuropilina 1 u skupini s endometriozom s obzirom na broj lokacija zahvaćenih endometriozom dobivene su statistički bitne razlike u koncentraciji VEGF-a i aneksina A2. Serumske koncentracije VEGF-a i aneksina A2 bile su statistički znatno povišene što je veći bio broj lokacija zahvaćen endometriozom (tablica 5.).

**Tablica 5.** Koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 s obzirom na broj lokacija endometrioze

<b>Parametar</b>	<b>1 lokacija (jajnik)</b>	<b>2 lokacije</b>	<b>3 lokacije</b>	<b>P vrijednost</b>
<b>VEGF (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	0,236 (0,229 – 0,2610)	0,261 (0,234 – 0,271)	0,262 (0,261 – 0,282)	<b>0,0010</b>
<b>Neuropilin 1 (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	27,2 (25,3 – 28,6)	27,4 (25,1 – 28,1)	26,2 (24,8 – 27,5)	0,6691
<b>Aneksin A2 (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	23,4 (21,1 – 33,6)	30,5 (21,2 – 35,6)	31,5 (31,1 – 36,5)	<b>0,0084</b>

*Kvantitativni podaci prikazani su kao medijan (interkvartilni raspon). Statistički bitna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti  $P < 0,05$ . Jačim tiskom otisnute su statistički bitne razlike s obzirom na broj lokacija endometrioze.*

#### 4.5 Koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 u bolesnica s endometriozom s obzirom na prisutnost bola kao simptoma

Uspoređene su koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 u skupini ispitanica s endometriozom tako da su podijeljene u dvije skupine. Jednu su skupinu činile bolesnice s endometriozom koje su imale prisutnost bola kao simptom, a u drugoj skupini bile su ispitanice s endometriozom koje nisu imale prisutnost bola kao simptom. Ispitanice s endometriozom kod kojih je bio prisutan bol imale su statistički značajno više koncentracije VEGF i aneksina A2 u odnosu na ispitanice s endometriozom kod kojih nije bila prisutan bol kao simptom (tablica 6.). Prilikom uzimanja anamneze ispitanicima je bilo teško definirati osjećaju li bol i koja je težina bola. Na početku kod definiranja bola bilo je planirano uvesti ljestvicu bola 1 – 5, ali s obzirom da su mnoge ispitanice dvojile o izraženosti jačine boli, uvedena je jednostavna podjela na one koje su imale simptom bola neovisno o tomu kada i gdje se javljao i one koje nisu imale simptom bola.

**Tablica 6.** Koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 u skupini s endometriozom s obzirom na prisutnost bola kao simptoma

Parametar	Bol = DA	Bol = NE	P vrijednost
<b>VEGF (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	0,261 (0,234 – 0,271)	0,247 (0,229 – 0,261)	<b>0,0088</b>
<b>Neuropilin 1 (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	27,6 (24,1 – 28,2)	27,2 (25,1 – 28,6)	0,5893
<b>Aneksin A2 (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	31,1 (23,2 – 38,7)	25,5 (21,1 – 34,5)	<b>0,0461</b>

*Kvantitativni podaci prikazani su kao medijan (interkvartilni raspon). Statistički bitna razlika utvrđena je temeljem vrijednosti  $P < 0,05$ . Jačim tiskom otisnute su statistički važne razlike između dviju skupina unutar grupe s endometriozom ovisno o prisutnosti bola kao simptoma endometrioze.*

#### 4.6 Vrijeme postavljanja dijagnoze endometrioze i pozitivne obiteljske anamneze u bolesnica s endometriozom

Usporedbom vremena od prvih simptoma endometrioze do postavljanja dijagnoze bolesti između ispitanica s pozitivnom obiteljskom anamnezom i ispitanica s negativnom obiteljskom anamnezom u bolesnica s endometriozom dobiveni su rezultati koji upućuju na statistički bitnu razliku u vremenu postavljanja dijagnoze između dviju skupina ispitanica (tablica 7.). Kod bolesnica s endometriozom i pozitivnom obiteljskom anamnezom vrijeme do postavljanja dijagnoze bolesti bilo je kraće u odnosu na bolesnice s endometriozom i negativnom obiteljskom anamnezom.

Tablica 7. Povezanost vremena otkrivanja dijagnoze endometrioze i pozitivne obiteljske anamneze u bolesnica s endometriozom

Parametar	Vrijeme od prvih simptoma do postavljanja dijagnoze (godine)	P vrijednost
<b>Pozitivna obiteljska anamneza = DA (N = 64)</b>	3,5 ± 1,2	<b>0,0125</b>
<b>Pozitivna obiteljska anamneza = NE (N = 56)</b>	4,1 ± 1,5	

*Rezultati su prikazani sa srednjom vrijednošću i standardnom devijacijom. Statistički važna razlika utvrđena je na temelju vrijednosti  $P < 0,05$ . Jačim tiskom otisnuta je statistički bitna razlika utvrđena usporedbom skupina podijeljenih prema obiteljskoj anamnezi.*

#### 4.7 Koncentracija VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 u bolesnica s endometriozom ovisno o indeksu tjelesne mase (ITM)

Bolesnice s endometriozom podijeljene su u dvije skupine ovisno o indeksu tjelesne mase (ITM); one kod kojih je ITM bio 20-25 kg/m<sup>2</sup> i one kod kojih je ITM bio > 25 kg/m<sup>2</sup>. Usporedbom koncentracije VEGF-a, neuropilina i aneksina A2 u bolesnica s endometriozom ovisno o vrijednostima ITM rezultati su pokazali kako serumske koncentracije svih triju parametara nisu statistički značajno različite među ispitanicama različitog indeksa tjelesne mase.

Tablica 8. Koncentracija VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 u bolesnica s endometriozom ovisno o indeksu tjelesne mase (ITM)

Parametar	ITM 20-25 kg/m <sup>2</sup> N=67	ITM > 25 kg/m <sup>2</sup> N=53	P vrijednost
VEGF (µg/L)	0,251 (0,238 – 0,261)	0,253 (0,240 – 0,262)	0,876
Neuropilin 1 (µg/L)	26,4 (24,1 – 27,3)	27,1 (25,3 – 28,5)	0,951
Aneksin A2 (µg/L)	3,21 (21,2 – 34,4)	29,1 (21,1 – 35,2)	0,814

Rezultati su prikazani s medijanom i interkvartilnim rasponom jer ne slijede normalnu razdiobu (testirano Kolmogorov-Smirnovim testom); P vrijednost je izračunana Mann-Whitney testom za nezavisne uzorke zbog nenormalne razdiobe podataka.



#### 4.8 Korelacije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 u bolesnica s endometriozom

VEGF, neuropilin 1 i aneksin A2 sudjeluju u patogenezi endometrioze. Rezultati dobiveni ispitivanjem povezanosti svih triju parametara u bolesnica s endometriozom prikazani su u tablici 9. Aneksin A2 pokazuje umjerenu do dobru povezanost s VEGF-om. Povezanost između VEGF-a i neuropilina 1 te između aneksina A2 i neuropilina 1 nije bila statistički značajna.

Tablica 9. Međusobna korelacija VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 u bolesnica s endometriozom

	Aneksin A2		Neuropilin 1	
	r	P	r	P
<b>VEGF</b>	<b>0,73</b>	<b>&lt; 0,001</b>	-0,10	0,230
<b>Neuropilin 1</b>	-0,11	0,197		

*r – koeficijent korelacije. Statistička važnost utvrđena je na temelju vrijednosti  $P < 0,05$ . Jačim tiskom otisnuti su statistički bitni koeficijenti korelacije.*

#### 4.9 Dijagnostička točnost VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2

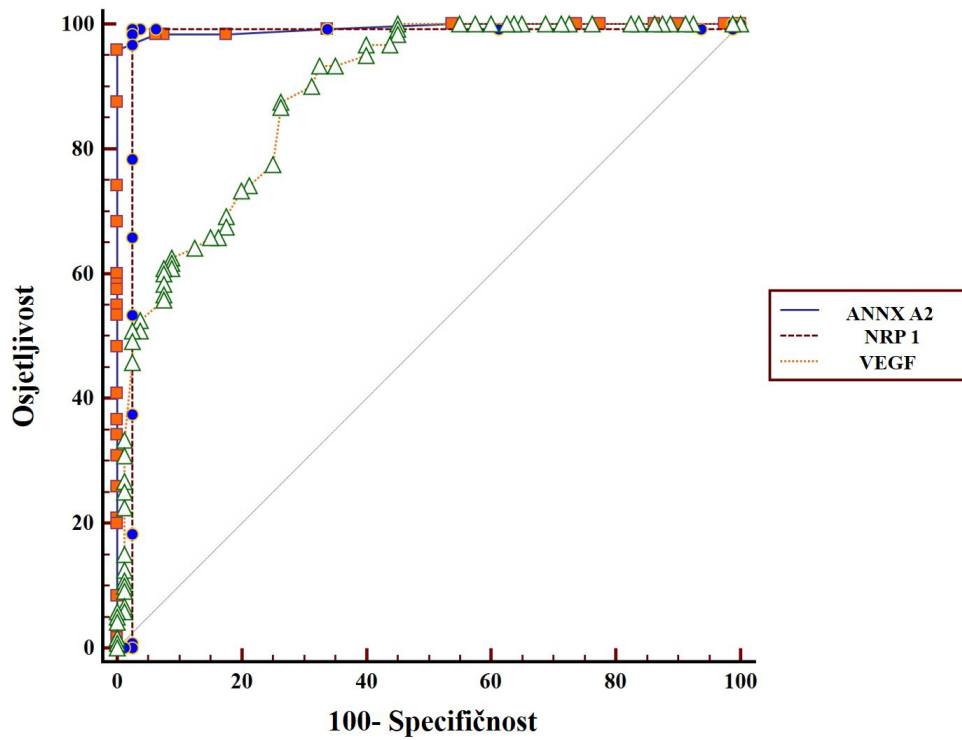
Dijagnostičke točnosti VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 u razlikovanju zdravih od oboljelih od endometrioze prikazane su u tablici 9., a ROC krivulje na slici 8. One su opisane korištenjem specifičnosti i osjetljivosti testa kod određene granične vrijednosti te vrijednosti za AUC. Dijagnostička je osjetljivost sposobnost pretrage da osobe s endometrizom razvrsta kao pozitivne, dok je dijagnostička specifičnost sposobnost testa (pretrage) da zdrave osobe razvrsta kao negativne. ROC krivulja služi za odabir optimalne granične vrijednosti koja označava vrijednost kod koje će udio lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata biti najmanji. Optimalna kombinacija osjetljivosti i specifičnosti na ROC krivulji za pojedini test obilježena je točkom najbližom gornjemu lijevom kutu krivulje, a određena je najvećim AUC-om. Veće vrijednosti AUC-a označavaju bolje diskriminacijske sposobnosti testa.

Neuropilin 1 i aneksin A2 pokazuju izvrsne sposobnosti razlikovanja zdravih od oboljelih od endometrioze. VEGF pokazuje vrlo dobre sposobnosti razlikovanja zdravih od oboljelih od endometrioze.

Tablica 10. Dijagnostička točnost VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2

	<b>AUC</b> <b>(95 % CI)</b>	<b>OSJETLJIVOST</b> <b>(95 % CI)</b>	<b>SPECIFIČNOST</b> <b>(95 % CI)</b>	<b>GRANIČNA</b> <b>VRIJEDNOST</b>	<b>P</b>
<b>VEGF</b> <b>(µg/L)</b>	0,89 (0,85 – 0,93)	92,7 (87,0 – 96,4)	71,7 (61,4 – 80,6)	> 0,225	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>Neuropilin 1</b> <b>(µg/L)</b>	0,97 (0,94 – 0,99)	99,3 (97,3 – 100,0)	97,8 (96,1 – 100,0)	> 11	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>Aneksin A2</b> <b>(µg/L)</b>	0,99 (0,97 – 1,00)	96,35 (91,7 – 98,8)	100,0 (96,1 – 100,0)	> 16	<b>&lt; 0,0001</b>

*AUC = površina ispod krivulje. 95% CI = 95%-tni interval pouzdanosti. Granične vrijednosti određene su prema Youdenovoj metodi za definiranje optimalne vrijednosti proizašle iz ROC analize. Statistička važnost utvrđena je na temelju vrijednosti  $P < 0,05$ . Jačim tiskom otisnuti su statistički bitni biljezi dijagnostičke točnosti.*



Slika 8. Usporedba ROC krivulja u predviđanju endometrioze. ROC – engl. receiver operating characteristic, statistička metoda za određivanje dijagnostičke točnosti; ANN X A2= aneksin A2; NRP1=neuropilin 1; VEGF= vaskularni endotelni čimbenik rasta.

#### 4.10 Matematički modeli za predviđanje endometrioze

Logističkom regresijskom analizom ispitana je povezanost VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 kao potencijalnih biljega endometrioze i prisutnosti endometrioze. Na taj način ispitana je sposobnost kombinacije pojedinačnih potencijalnih biljega endometrioze da predvide prisutnost endometrioze.

U prvom koraku logističke regresije univarijatnom analizom izračunani su pripadajući omjeri izgleda za svaki parametar. U univarijatnu logističku regresiju uključena su sva tri ispitivana parametra. Univarijatnom analizom dobiveno je da su neuropilin 1 i aneksin A2 statistički važni predviđatelji za izradu modela za predviđanje endometrioze. Rezultati upućuju na to da je aneksin A2 najbolji pojedinačni predviđatelj endometrioze (OR = 2,81;  $P < 0,001$ ) što znači da su bolesnice s povišenim koncentracijama aneksina A2 imale povećani omjer izgleda za prisutnost endometrioze.

S obzirom na to da su i aneksin A2 i neuropilin 1 nakon univarijatne analize bili statistički važni, oba su parametra uključena u multivarijatnu analizu (tablica 10.). Multivarijatni model s uključenim neuropilinom 1 i aneksinom A2 postigao je AUC 0,99 (95 % CI = 0,97 – 1,00) i udio ispravno klasificiranih bolesnika od 98 %.

Tablica 11. Univarijatna i multivarijatna logistička regresija: sposobnost neuropilina 1, aneksina A2 i VEGF-a u predviđanju endometrioze

	Univarijatna regresijska analiza		Multivarijatna regresijska analiza	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
<b>Aneksin A2</b> ( $\mu\text{g/L}$ )	2,81 (1,82 – 4,33)	< 0,0001	2,69 (1,64 – 4,40)	0,0001
<b>Neuropilin 1</b> ( $\mu\text{g/L}$ )	1,31 (1,24 – 1,38)	< 0,0001	1,08 (1,02 – 1,16)	0,0130
<b>VEGF</b> ( $\mu\text{g/L}$ )	0,00 (0,00 – 0, 00)	< 0,0001	-	-

OR – omjer izgleda. 95 % CI – 95%-tni interval pouzdanosti.

## 5. RASPRAVA

Endometrijoza je bolest ženske populacije i često prođe duže razdoblje od prvih simptoma do postavljanja dijagnoze. Zbog simptoma koji su najčešće povezani s bolom koji se pojavljuje ciklički za vrijeme menstruacije ili neovisno o menstruaciji, a koji pak ovisi i o težini bolesti, endometrijoza može dovesti do psihičkih smetnji i tako utjecati na kvalitetu života pojedinca i zajednice.

Višegodišnje kašnjenje u dijagnostici karakteristično je za endometriozu. Od pojave prvih simptoma do postavljanja dijagnoze često prođe i sedam godina. Bolesnice često zanemaruju pojedine simptome ili pak simptomi koji se javljaju ovisno o tkivu zahvaćenom endometriozom označavaju simptome koji na svojevrsan način prikivaju prisutnost endometrijoze. Pozitivna obiteljska anamneza endometrijoze povećava sklonost bolesti. Našim istraživanjem ispitana je povezanost pozitivne obiteljske anamneze bolesnica s endometriozom i vremena postavljanja dijagnoze bolesti. Rezultati upozoravaju na statistički bitnu razliku u vremenu postavljanja dijagnoze kod bolesnica s pozitivnom obiteljskom anamnezom ( $3,5 \pm 1,2$  godina) u odnosu na bolesnice s endometriozom i negativnom obiteljskom anamnezom ( $4,1 \pm 1,5$  godina).

Unatoč nastojanju da se shvati patogeneza endometrijoze, još uvijek su enigma pojedini procesi uključeni u nastanak bolesti. Po svojim karakteristikama nastanka i progresije, endometrijoza patogenezom slični malignim bolestima. Upala, oksidacijski stres, angiogeneza i apoptoza samo su neki od procesa uključenih u patogenezu endometrijoze

U ovome se radu iznose rezultati ispitivanja triju parametara uključenih u patogenezu endometrijoze (VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2), njihovu povezanost i dijagnostičku učinkovitost.

Angiogeneza je jedan od ključnih procesa u endometrijozi koji omogućava nastanak endometrioma i njegovu proliferaciju na ektopičnoj lokaciji ili lokacijama. VEGF je ključni čimbenik angiogeneze i stoga je korišten u ovome radu kao jedan od triju analita uz neuropilin 1 i aneksin A2. Za VEGF se može zaključiti da je jedan od najviše proučavanih čimbenika rasta u endometrijozi te da su dosadašnji rezultati poprilično oprečni kada se

uspoređuju koncentracije VEGF-a između zdravih ispitanica i ispitanica s endometriozom. S obzirom na uzorke u kojima su ispitivani sadržaji VEGF-a radilo se o peritonejskoj tekućini, tkivu ektopijskih lezija endometrioma, serumu, plazmi, a uspoređivali su se genski izražaj i koncentracija VEGF-a između zdravih i ispitanica s endometriozom. Naše istraživanje temeljeno je na činjenici da se ispituju potencijalni laboratorijski testovi kao neinvazivna dijagnostika endometrioze, pa je ispitanicama izvađena venska krv i izmjerena koncentracija svih triju parametara u serumu.

Nekoliko je autora unazad dvadesetak godina predstavilo rezultate kojima uspoređuju koncentraciju VEGF-a u peritonejskoj tekućini ispitanica s endometriozom u odnosu na ispitanice bez endometrioze, a dobiveni rezultati bili su oprečni. Neka su ispitivanja pokazala da je koncentracija VEGF-a povišena u peritonejskoj tekućini pacijentica s umjerenom do izraženom endometriozom u odnosu na ispitanice bez endometrioze (215-218).

Manji broj istraživanja ispitivao je genskog izražaja VEGF-a u ektopičnom endometrialnom tkivu, sa dobivenim oprečnim zaključcima. Čini se da je izražaj VEGF-a u ektopičnom tkivu ograničen te se samo u tkivnim makrofagima koji se nalaze na mjestu lezija javlja genski izražaj VEGF-a (217). Kako se istraživanjima pokušala povezati složena patogeneza endometrioze, neki su otišli korak dalje i uspoređivali sadržaj VEGF-a u eutopičnom endometriju i crvenim i crnim lezijama ektopičnog endometrija u području potrbušnice. Usporedbom ektopičnog endometrija s tumorskim tkivom koje ima sposobnost stvaranja VEGF-a i aktivira makrofage koji su dodatni izvor VEGF-a došlo se do teorije koja je vrlo vjerojatno prisutna u patogenezi endometrioze. Teorija se zasniva na činjenici da samo ektopično tkivo nakon implantacije stvara VEGF koji sudjeluje u lokalnoj angiogenezi odnosno stvaranju vaskularne mreže oko implantiranog tkiva i omogućuje njegovo održavanje i proliferaciju. Osim lokalne angiogeneze povećan izražaj i prisutnost samog VEGF-a utječe na povećanu kapilarnu propusnost novostvorenih krvnih žila tako da povećava propusnost i time omogućava izlazak fibrinskih molekula u izvanstanični prostor što potiče aktivaciju makrofaga čija je angiogena aktivnost povećana izlučivanjem TNF-a za koji je poznato kako ga izlučuju makrofagi aktivirani fibrinskim molekulama (218).

Osim u fiziološkoj angiogenezi, VEGF ima glavnu ulogu i u patološkoj angiogenezi povezanom s rastom i metastaziranjem različitih vrsta tumora, makularnoj degeneraciji, dijabetičkoj retinopatiji, upalnim procesima povezanim s bolestima kao što je reumatoidni

artritis, zatim u ishemijskim procesima kao što je ishemija miokarda te preeklampsiji (219-226).

Ovim istraživanjem uzeta je u obzir teorija retrogradne menstruacije (7) u patogenezi endometrioze koja omogućava migraciju tkiva endometrija na vanjsku površinu različitih organa. Retrogradna menstruacija kao proces povećava upalni proces na mjestu gdje se ektopično tkivo endometrija nastani i nastaju lezije. Rast lezije na ektopičnoj lokaciji omogućen je greškom imunskih stanica, promijenjenom funkcijom stanica, angiogenezom te promijenjenim odgovorom na progesteron, estrogen i prostaglandine. Za rast lezije potrebna je angiogeneza, ali i rastom lezije oslobađa se niz citokina, prostaglandina, upalnih produkata i čimbenika angiogeneze (13). Osim navedenih procesa koji se odvijaju lokalno na mjestu nastanka lezija uzeli smo u obzir da se i u perifernoj cirkulaciji odražava proces koji se odvija u sklopu ektopičnog endometrija i da dio produkata angiogeneze, upale te proliferacije dospijeva i u perifernu cirkulaciju. Za VEGF je poznata činjenica da ga stvara niz stanica u normalnim fiziološkim okolnostima i da postoji niz VEGF izoformi te da se stvara u alfa-granulama trombocita. Činjenica da se stvara u alfa-granulama trombocita utječe na odabir vrste uzorka u kojem se određuje koncentracija VEGF-a u perifernoj krvi. Plazma ima prednost kao uzorak u određivanju VEGF-a u odnosu na serum koji se dobiva koagulacijom stanica u koju su uključeni i trombociti (227). U ovom istraživanju korišteni su uzorci seruma, ali prilikom pripreme seruma skraćeno je vrijeme koagulacije na pola sata umjesto dva sata kako je i preporuka i nisu uzeti u obzir hemolizirani uzorci seruma (228). Svi su uzorci nakon pola sata centrifugirani i serum je odvojen odmah nakon centrifugiranja. Korišteni komplet reagensa propisan je za određivanje VEGF165 u ljudskim uzorcima. Razlike u koncentracijama VEGF-a između različitih istraživanja prisutne su iz nekoliko razloga. Jedan je razlog što različite metodologije određivanja istog analita mogu prouzročiti različite rezultate, a ELISA testovi od različitih proizvođača također su neusporedivi i nisu standardizirani postupci u odnosu na primarni standard odnosno kalibrator. Drugi razlog može biti ustroj samih ispitanica u kojem se ili koristi premali broj ispitanica ili nisu dobro definirani kriteriji uključivanja i isključivanja ispitanica te njihova podjela u podskupine. Unutar ovog istraživanja dobiveni su rezultati koji upozoravaju na razliku u koncentraciji VEGF-a između ispitanica s endometriozom (0,2540 (0,231 – 0,2689)  $\mu\text{g/L}$ ) u odnosu na zdrave ispitanice (0,214 (0,201 – 0,230)  $\mu\text{g/L}$ ), a isto tako prisutna je značajna statistička



razlika u vrijednostima VEGF-a s obzirom na stadij endometrioze (stadij II 0,229 (0,227 – 0,234)  $\mu\text{g/L}$ ; stadij III 0,261 (0,253 – 0,271)  $\mu\text{g/L}$ ; stadij IV 0,289 (0,284 – 0,291)  $\mu\text{g/L}$ ).

Aneksin A2 je korišten unutar ovog istraživanja zbog sličnosti u patogenezi između adenomioze i endometrioze. Aneksin A2 je do sada bio više istraživana na području adenomioze. Aneksin A2, kao i neuropilin 1, ima više funkcija zbog kojih je zanimljiv za istraživanje iz područja endometrioze.

Studije su pokazale da je aneksin A2 glavni medijator stanične pokretljivosti i proliferacije u tumorskim i normalnim stanicama (229).

Na području adenomioze istraživanja su dokazala veći izražaj aneksina A2 na ektopičnim lezijama u odnosu na endometriju prisutan u šupljini maternice. Nadalje, izražaj aneksina A2 bio je znatno veći u ispitanica s adenomiozom koje su imale izraženu dismenoreju u odnosu na ispitanice koje nisu imale dismenoreju ili je bila prisutna u blagom obliku (214).

U sklopu našeg istraživanja dobivene su statistički bitne razlike u koncentraciji aneksina A2 u skupini ispitanica s endometriozom koje su kao simptom navele bol u odnosu na ispitanice s endometriozom kod kojih nije bio prisutan bol kao simptom (bol (DA) aneksin A2 =31,1 (23,2 – 38,7)  $\mu\text{g/L}$ ; bol (NE) aneksin A2= 25,5 (21,1 – 34,5)  $\mu\text{g/L}$ ).

Dosadašnjim istraživanjima dokazano je da se aneksin A2 nalazi na površini staničnih membrana i ima ulogu u interakciji između stanica ili s izvanstaničnim proteinima kao što su plazminogen i tkivni aktivator plazminogena koji se veže za plazminogen i konvertira ga u plazmin. Nekontrolirano stvaranje plazmina dovodi do razgradnje izvanstaničnog matriksa i bazalnih membrana krvnih žila (230,231). Pojačano stvaranje plazmina zbog djelovanja aneksina A2 potiče neoangiogenezu i progresiju tumorskih stanica. U studiji o adenomiozi dokazano je kako povećan izražaj aneksina A2 korelira s metastatskim potencijalom i proangiogenezom ektopičnog endometrija preko poticanja fenotipa epitelno-mezenhimne tranzicije i aktivacijom VEGF signalnih putova (232). U našem istraživanju dobivena je vrlo dobra i značajna ( $r = 0,76$ ;  $p < 0,0001$ ) povezanost VEGF-a i aneksina A2 što govori u prilog proangiogenom djelovanju aneksina A2.

Epitelno-mezenhimna tranzicija (EMT) biološki je proces kojim epitelne stanice višestrukim biokemijskim promjenama stječu mezenhimni stanični fenotip. Epitelno-mezenhimna tranzicija klasificira se u tri podtipa. Tip 1 EMT-a povezan je s implantacijom, embriogenezom i razvojem organa, a tip 2 EMT-a nalazimo u procesima cijeljenja rana, obnove tkiva i fibroze organa. Tip 3 EMT-a odvija se u neoplastičnim stanicama koje na taj način stječu invazivnu i metastatsku sposobnost. Tip 2 i tip 3 EMT smatraju se prisutnima u endometriozu. Epitelne stanice jesu apikalno-bazalno polarizirane stanice međusobno vezane tijesnim spojevima, adherentnim spojevima i dezmosomima. Suprotno tomu, mezenhimne stanice vretenastog su izgleda i međusobno slabo vezane što im daje sposobnost migracije. E-kadherin, koji je prisutan u adherentnim spojevima, veže se za beta-katenin i stvara kompleks povezan s aktinskim citoskeletom. Na taj način onemogućava invaziju i metastaziranje epitelnih stanica te održava njihovu polarnost. Gubitak izražaja E-kadherina te pojačan izražaj mezenhimnoga intermedijarnog filamena vimentina smatraju se molekularnim obilježjima epitelno-mezenhimne tranzicije (232-235). Istraživanja epitelnih i mezenhimnih biljega u endometriozu pokazala su kako su biljezi epitelnih stanica sniženi, a biljezi mezenhimnih stanica povišeni (235,236). Za endometriozu su istraživanja pokazala kako se EMT odvija samo djelomično nakon implantacije stanica endometrija na ektopičnoj lokaciji i epitelne stanice ne gube svoj fenotip. EMT je povezan i s anoikis-rezistencijom što omogućava širenje ektopičnih lezija u endometriozu (237). Anoikis je programirana smrt stanice u trenutku kada se ona odvoji od izvanstaničnog matriksa i ne može se vezati na nepoznatu površinu. Upravo je anoikis-rezistencija ono što omogućava epitelnim stanicama endometrija širenje na ektopičnom mjestu. EMT i anoikis-rezistencija zajednički su patogenezi adenomioze i endometrioze, a u tom dijelu aneksin A2 ima svoju ulogu (237).

Jedno od najnovijih istraživanja uključilo je karakteristike eksosoma u peritonejskoj tekućini oboljelih od endometrioze (238). Eksosomi su „mjehurići“ (30 – 150 nm u promjeru) obavijeni lipidnom dvoslojnom membranom koje proizvode stanice gotovo svih organizama. U njih su upakirane različite biološke molekule koje na ovaj način izlaze izvan stanice u izvanstanični prostor te se prenose kroz organizam, ali često i izvan njega (239). Eksosomi omogućavaju komunikaciju između stanica. Istraživanje eksosoma dokazalo je kako eksosomi u oboljelih od endometrioze sadržavaju pet proteina, a jedan od njih je i aneksin A2 (238). To je također jedan od dokaza kako aneksin A2 sudjeluje u patogenezi endometrioze.

Unutar našeg istraživanja dobiveni su rezultati koji upozoravaju na statistički značajno veće koncentracije aneksina A2 u serumu oboljelih od endometrioze (29,1 (21,3 – 35,6)  $\mu\text{g/L}$ ) u odnosu na zdrave ispitanice (12,4 (10,2 – 13,4)  $\mu\text{g/L}$ ), a isto tako koncentracije aneksina A2 u serumu rastu s povećanjem stadija endometrioze (stadij II 21,4 (19,2 – 22,3)  $\mu\text{g/L}$ ; stadij III 34,1 (31,4 – 39,2)  $\mu\text{g/L}$ ; stadij IV 40,2 (32,1 – 47,5)  $\mu\text{g/L}$ ). Rezultati aneksina A2 unutar ovog istraživanja slažu se s istraživanjem koje je također ispitalo koncentraciju aneksina A2 u serumu oboljelih od endometrioze (240). U naše je istraživanje uključen veći broj ispitanica i za razliku od istraživanja Kaya i suradnika (240) iz kontrolne skupine isključene su ispitanice koje su imale bilo kakve ciste, miome ili druge upalne procese u zdjelici u trenutku istraživanja. Temeljem sadašnjih spoznaja svega su dva istraživanja povezana s endometriozom u sklopu kojih je istraživan i aneksin A2 (238,240).

Neuropilini su skupina jednolančanih proteina koji su bitni u procesima angiogeneze, limfogeneze i stvaranja živčanih vlakana, a sudjeluju u imunosnom odgovoru (177, 241-245). To su sve procesi koji su povezani s patogeneza endometrioze. Našim istraživanjem usmjerena je pažnja na serumske koncentracije neuropilina 1 s obzirom na to da se do sada nitko nije bavio serumskim koncentracijama neuropilina 1 u endometriozu. Istraživanja na neuropilinu 1 na području endometrioze povezana su s izražajem neuropilina 1 u fiziološkom endometriju i ektopičnom endometriju. Poznate činjenice o neuropilinu 1 jesu da na endotelnim stanicama veže VEGF regulirajući stvaranje krvnih žila, veže semaforine klase 3 potičući na taj način rast neurona te potiče interakciju između dendritnih stanica i T-stanica i na taj način sudjeluje u imunosnoj funkciji (189,191).

Unazad deset godina provedena su svega dva istraživanja o neuropilinu 1 u bolesnica s endometriozom i oba se odnose na izražaj u normalnom endometriju i ektopičnom endometriju (246,247).

Prema dostupnim spoznajama može se zaključiti kako je neuropilin 1 premalo istraživan na području endometrioze iako svojim sudjelovanjem u nizu patoloških i fizioloških procesa, od kojih su neki dio patogeneze endometrioze, može biti zanimljiv predmet istraživanja. Naše istraživanje neuropilina 1 temelji se na serumskim koncentracijama kao i VEGF-u s ciljem ispitivanja njegovih dijagnostičkih značajki kao neinvazivnoga dijagnostičkog serumskog biljega. Ovo je istraživanje jedino koje je do sada ispitalo serumske koncentracije neuropilina 1 u bolesnica s endometriozom.

Gustoća živčanih vlakana koja je izražena oko ektopičnog endometrija u odnosu na bazalni endometrij gotovo sigurno igra važnu ulogu u nastanku bola povezanog s endometriozaom (248-250). U sklopu našeg istraživanja s obzirom na prisutnost bola u skupini bolesnica s endometriozaom za neuropilin 1 nije dobivena statistički značajna razlika serumskih koncentracija između bolesnica s endometriozaom koje imaju simptom bola i onih koje nemaju simptom bola. Uspoređujući pak serumske koncentracije VEGF-a između skupine bolesnika s endometriozaom kod kojih je prisutan bol i onih kod kojih nije prisutan bol dobivena je statistički značajna razlika između dviju podskupina bolesnica (bol (DA) VEGF = 0,261 (0,234 – 0,271) µg/L; bol (NE) VEGF = 0,247 (0,229 – 0,261) µg/L).

Neuropilin 1 na T-regulacijskim stanicama (Treg) produžuje njihovu interakciju s nezrelim dendritnim stanicama povećavajući tako osjetljivost prepoznavanja antigena od Treg stanica. Prema istraživanjima izražaj NRP1 snižen je u fiziološkom endometriju žena s endometriozaom i stoga je izmijenjena i medijatorska funkcija između T-reg i dendritnih stanica i smanjena imunosna uloga NRP1 kod oboljelih od endometrioze. Za vrijeme menstrualnog krvarenja normalni imunosni odgovor kod zdravih žena sprječava daljnje širenje menstrualne tekućine na okolna tkiva. U bolesnica s endometriozaom nalazi se smanjeni imunosni odgovor u fiziološkom endometriju koji se može povezati i sa smanjenom aktivnošću NRP1, čime je omogućeno ektopično širenje menstrualne krvi koja sadržava stanice endometrija (251).

Neuropilin 1 pokazuje genski izražaj u ektopičnim lezijama bolesnica s endometriozaom (247). Soker i suradnici (177) predložili su hipotezu s da je NRP 1 receptor za VEGF koji pojačava vezanje VEGF-a na njegov receptor VEGFR2 i potiče aktivnost VEGF-a, pa se može zaključiti kako regulira VEGF-om induciranu angiogenezu. Ovoj hipotezi koja pokazuje izniman izražaj VEGFR2 i NRP1 u ektopičnim lezijama endometrija u prilog ide ova naša studija. Naše istraživanje također potvrđuje rezultate prethodnih studija jer su vrijednosti serumskih koncentracija NRP1 povišene u bolesnica s endometriozaom (27,1 (25,6 – 28,1) µg/L) u odnosu na kontrolnu zdravu skupinu (8,2 (7,3 – 9,4)) ispitanica bez endometrioze. Unutar ovog istraživanja nije utvrđena korelacija između serumskih koncentracija VEGF-a i NRP1, što je u skladu s istraživanjem Yerlikaya i suradnika (247) koji su ispitivali izražaj VEGF-a i NRP1 na ektopičnom endometriju.

Kao ni Yerlikaya i suradnici u svojoj studiji (247), ni mi nismo u sklopu ovog istraživanja utvrdili korelaciju između serumskih koncentracija VEGF i NRP1 pa možemo zaključiti kako NRP1 vjerojatno ima ulogu u angiogenezi endometrioze koja nije isključivo povezana s VEGF-om i njegovim receptorom VEGFR2, već NRP 1 ima proširenu ulogu u angiogenezi. Do sličnog istraživanja i zaključka došli su i Murga i suradnici (171) navodeći kako neuropilin 1 ima ulogu kao ključni regulator adhezije endotelnih stanica za proteine izvanstaničnog matriksa. Inače je adhezija endotelnih stanica na izvanstanični matriks ključna za održivost endotelnih stanica, rast, pokretljivost i angiogenezu (171).

Dijagnoza i klasifikacija endometrioze temelji se na invazivnoj laparoskopskoj tehnici, biopsiji i histološkoj analizi lezije (77). Osjetljivost pregleda ultrazvukom dosta ovisi o iskustvu liječnika koji obavlja dijagnostički pregled. Smatra se da ova dijagnostička metoda nije dovoljno osjetljiva, te da njome nisu vidljiva sva sjela endometrioze u tijelu oboljelih (74). Do sada ni jedan laboratorijski test nije zadovoljio dijagnostičke kriterije kvalitetnog biljega endometrioze. Biljeg može biti bilo koja molekula ili materijal (stanica, tkivo) koja odražava patobiokemijski poremećaj prisutan u organizmu zahvaćenom endometriozom. Prepoznavanje učinkovitih, specifičnih i neinvazivnih biljega može omogućiti sveobuhvatniji pristup dijagnostici i liječenju endometrioze (252). U sklopu našeg istraživanja odabrana su tri prethodno navedena parametra za koje je dokazana prisutnost u patogenezi endometrioze. Određivanje potencijalnih biljega bolesti u perifernoj krvi neinvazivni je pristup dijagnosticiranju bolesti, a ujedno omogućuje produljenu stabilnost analita koji se određuju. U našem je istraživanju uzeta u obzir činjenica da se u perifernoj krvi pojavljuju potencijalni biljezi endometrioze koji pak oslikavaju patološke procese na mjestu lezija koje se stvaraju zbog endometrioze.

Kako je jedan od ciljeva našeg istraživanja bila procjena dijagnostičke učinkovitosti ispitivanih parametara u procjeni prisutnosti endometrioze, poslužili smo se ROC analizom istraživanih parametara. ROC analizom utvrđeno je da koncentracije neuropilina 1  $> 11 \mu\text{g/l}$  i aneksina A2  $> 16 \mu\text{g/l}$  imaju izvrsnu dijagnostičku učinkovitost, s AUC = 0,99 za aneksin A2 i AUC = 0,97 za neuropilin 1. VEGF je postigao AUC od 0,89 kod koncentracija  $> 0,225 \mu\text{g/l}$  što upućuje na njegovu vrlo dobru dijagnostičku učinkovitost. Navedeni rezultati pokazuju vrlo dobre diskriminacijske karakteristike svih triju parametara kod prepoznavanja endometrioze i mogli bi se koristiti kao parametri u neinvazivnoj dijagnostici endometrioze.

Već je prethodno više puta naglašena složenost nastanka endometrioze te stoga nije prikladno upotrijebiti samo jedan parametar koji bi mogao biti potencijalni biljeg bolesti. Zbog te činjenice jedan od ciljeva našeg istraživanja bio je proučiti regresijski model kojim bi se mogla predvidjeti prisutnost endometrioze korištenjem koncentracija svih ispitanih parametara kao potencijalnih biljega endometrioze. U univarijatni model uključena su sva tri ispitivana parametra. Povećane koncentracije neuropilina 1 i aneksina A2 pokazale su se dobrim predviđateljima prisutnosti endometrioze. Nakon uključivanja ovih dvaju prethodno spomenutih parametara u multivarijatni model pokazano je kako koncentracije obaju parametara ostaju prediktivne za prisutnost endometrioze i to s udjelom ispravno klasificiranih bolesnica od 98 %. Ovi rezultati govore u prilog tomu da bi se višeparametarski model s aneksinom A2 i neuropilinom 1 mogao koristiti kao vrijedan neinvazivni dijagnostički alat u razlikovanju zdravih žena od bolesnica s endometriozom.

Endometriozna je bolest koju nerijetko nije lako uočiti ni razlikovati, a zbog nepredvidljivoga tijeka često ju nazivaju „bolest s mnogo lica“. Potrebno je puno strpljenja i znanja te suradnje ginekologa, obiteljskog liječnika i ponekad gastroenterologa i urologa da se utvrdi točna dijagnoza. Već je više puta naglašena složenost nastanka i ponašanja endometrioze kao i različitost kliničke slike koja se javlja kod oboljelih od endometrioze. Upravo je iz svih prethodno navedenih činjenica teško napraviti ustroj istraživanja koje bi obuhvatilo skupinu bolesnica sa svim do sada poznatim klinički bitnim karakteristikama endometrioze. Mjere dijagnostičke točnosti dobivene za sva tri istraživana parametra treba promatrati s određenim ograničenjima koja su prisutna unutar istraživanja. Naše bolesnice s endometriozom podijeljene su u tri stadija endometrioze, a ne četiri. Naše istraživanje nije imalo bolesnice s I. stadijem u kojem je prisutna minimalna bolest. Razlog je tomu to što nismo imali bolesnice s I. stadijem koje bi bile kandidati za invazivnu laparoskopsku operaciju s biopsijom koju smo postavili kao kriterij kojim će se ispitanice razdijeliti na kontrolnu skupinu i bolesnice s endometriozom. Nadalje, mali je broj bolesnica (N=8) s IV. stadijem u kojem je prisutna izražena bolest. Bolesnice s endometriozom većinom su imale endometriome jajnika ili kombinaciju prisutnosti endometrioma i endometrioze tankoga i debelog crijeva, rektuma i mokraćnog mjehura. Koristeći biostatistički riječnik može se reći da je u istraživanju prisutan svojevrsni „spectrum bias“ koji se odnosi na pojavu da se izvedba dijagnostičkog testa može razlikovati u različitim kliničkim slikama bolesti jer svaka različitost u kliničkoj slici utječe i na različitu kombinaciju bolesnica uključenih u istraživanje

(253). Kod formiranja skupine zdravih ispitanica određeni problem je bilo i pitanje zašto zdravu osobu podvrgnuti laparoskopiji. Sterilizacija je bilo jedino rješenje te su stoga u kontrolnoj skupini ispitanice koje su podvrgnute laparoskopiji zbog sterilizacije. Pojedina istraživanja o endometriozu u kontrolne skupine uključuju žene koje su bile na rutinskom ginekološkom pregledu. U istraživanju nismo uzimali u obzir fazu menstrualnog ciklusa ispitanica jer literatura pokazuje da na vrijednosti ispitivanih parametara ne utječe navedeni parametar (230,247).

Kod složenih bolesti poput endometrioze zbog kompleksnosti patofiziološke podloge nije izgledno da će jedan biljeg odražavati promjene i predvidjeti ishod bolesti. Dijagnostički neinvazivan biljeg endometrioze potreban je kako bi se postavila dijagnoza, vodilo ciljano liječenje te pratila aktivnost i terapijski odgovor u svim fazama bolesti. Budući da se još uvijek ne može zaključiti da su poznati svi patofiziološki procesi u nastanku endometrioze, biljezi trebaju stalnu reevaluaciju i retrospektivne studije koje bi opravdale njihovo korištenje. U sklopu našeg istraživanja istraživani su VEGF kao jedan do sada u literaturi poznat i već ispitivan biljeg endometrioze. Neuropilin 1 i aneksin A2 su noviji biljezi čije se potencijalne kliničke vrijednosti u dijagnostici, a možda i terapiji bolesnica s endometriozom moraju validirati u istraživanjima s dobro definiranim ustrojem i većim brojem ispitanica koji imaju sve stadije endometrioze kao i uključivanjem ispitanica sa raznolikim kliničkim slikama kojima se očituje ova složena bolest.

## **6. ZAKLJUČCI**

Rezultati ovog istraživanja pokazuju sljedeće:

1. Koncentracije VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 znatno su povišene u serumu bolesnica s endometriozom u odnosu na zdrave ispitanice.
2. Koncentracije VEGF-a i aneksina A2 znatno se razlikuju prema kliničkoj težini oboljenja, tj. prema stadiju endometrioze sukladno revidiranoj rASRM klasifikaciji iz 2012.
3. Koncentracije VEGF i aneksina A2 znatno su više u bolesnica s endometriozom kod kojih je više lokacija zahvaćeno ektopičnim endometrijem.
4. Koncentracije VEGF-a, aneksina A2 i neuropilina 1 u bolesnica s endometriozom nisu se razlikovale usporedbom skupina bolesnica s endometriozom podijeljenih ovisno o indeksu tjelesne mase (ITM).
5. Koncentracije VEGF-a i aneksina A2 znatno su više u bolesnica s endometriozom kod kojih je prisutan bol kao simptom.
6. Vrijeme do postavljanja dijagnoze kraće je u bolesnica s endometriozom koje imaju pozitivnu obiteljsku anamnezu u odnosu na bolesnice s negativnom obiteljskom anamnezom.
7. VEGF pozitivno korelira s aneksinom A2, dok ne korelira s neuropilinom 1. Aneksin A2 ne korelira s neuropilinom 1.
8. Određivanje serumskih koncentracija VEGF-a, neuropilina 1 i aneksina A2 može pridonijeti u odluci o postavljanju dijagnoze endometrioze. Vrijednost VEGF-a > 0,225 µg /L sa specifičnošću od 71,7 % i osjetljivošću 92,7 %. Vrijednost aneksina A2 > 16 µg /L sa specifičnošću od 100,0 % i osjetljivošću 96,3 %. Neuropilin 1 > 11 sa specifičnošću od 97,5 % i osjetljivošću 99,3 %.



9. Mjerenje aneksina A2, VEGF-a i neuropilina 1 u serumu može na neinvazivan način i u kratkom roku doprinijeti pravodobnom prepoznavanju bolesnica kod kojih postoji visoka vjerojatnost za prisutnost endometrioze.

## 7. LITERATURA

1. Ishimura T, Masuzaki H. Peritoneal endometriosis: endometrial tissue implantation as its primary etiologic mechanism. *Am J Obstet Gynecol.* 1991 Jul;165(1):210-4.
2. Foster DC, Stern JL, Buscema J, Rock JA, Woodruff JD. Pleural and parenchymal pulmonary endometriosis. *Obstet Gynecol.* 1981 Nov;58(5):552-6.
3. Ferrero S, Arena E, Morando A, Remorgida V. Prevalence of newly diagnosed endometriosis in women attending the general practitioner. *Int J Gynaecol Obstet.* 2010 Sep;110(3):203-7.
4. Garcia-Velasco JA, Rizk BR. *Endometriosis Current Management and Future trends*, Jaypee Broth. Med. Pub., St. Louis, 2010.
5. Sinaii N, Plumb K, Cotton L, Lambert A, Kennedy S, Zondervan K, Stratton P. Differences in characteristics among 1,000 women with endometriosis based on extent of disease. *Fertil Steril.* 2008 Mar;89(3):538-45.
6. Nnoaham KE, Hummelshoj L, Webster P, d'Hooghe T, de Cicco Nardone F, de Cicco Nardone C, Jenkinson C, Kennedy SH, Zondervan KT. World Endometriosis Research Foundation Global Study of Women's Health consortium. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. *Fertil Steril.* 2011 Aug;96(2):366-373.
7. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol.* 1927;14:442-69.
8. Halban H: Hysteroadenosis metastatica. Die Lyphogene Genese der sogenannte Adenofirbomatosis heterotopica. *Arch Gynecol.* 1925;124:457.
9. Ranney B. The prevention, inhibition, palliation, and treatment of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1975 Dec 15;123(8):778-85.
10. Meyer R. Uber endometrium in der Tube, sowie uber die herausentstehenden wirklichen und vermantlichen Folgen; *Zentralbl Gynecol.* 1927; 51:1482.
11. Levander G, Normann P. The pathogenesis of endometriosis: an experimental study. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1955;34(4):366-98.
12. Marquardt RM, Kim TH, Shin JH, Jeong JW. Progesterone and Estrogen Signaling in the Endometrium: What Goes Wrong in Endometriosis? *Int J Mol Sci.* 2019 Aug 5;20(15):3822.
13. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril.* 2012 Sep;98(3):511-9.
14. Rai V, Hopkisson J, Kennedy S, Bergqvist A, Barlow DH, Mardon HJ. Integrins alpha 3 and alpha 6 are differentially expressed in endometrium and endometriosis. *J Pathol.* 1996 Oct;180(2):181-7.
15. Klemmt PA, Carver JG, Koninckx P, McVeigh EJ, Mardon HJ. 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. *Hum Reprod.* 2007 Dec;22(12):3139-47.

16. Pitsos M, Kanakas N. The role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of endometriosis. *Reprod Sci.* 2009 Aug;16(8):717-26.
17. Han SJ, Jung SY, Wu SP, Hawkins SM, Park MJ, Kyo S, Qin J, Lydon JP, Tsai SY, Tsai MJ, DeMayo FJ, O'Malley BW. Estrogen Receptor  $\beta$  Modulates Apoptosis Complexes and the Inflammasome to Drive the Pathogenesis of Endometriosis. *Cell.* 2015 Nov 5;163(4):960-74.
18. Zondervan KT, Becker CM, Koga K, Missmer SA, Taylor RN, Viganò P. Endometriosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2018 Jul 19;4(1):9.
19. Klemmt PAB, Starzinski-Powitz A. Molecular and Cellular Pathogenesis of Endometriosis. *Curr Womens Health Rev.* 2018 Jun;14(2):106-116.
20. Capobianco A, Rovere-Querini P. Endometriosis, a disease of the macrophage. *Front Immunol.* 2013 Jan 28;4:9.
21. Somigliana E, Viganò P, Gaffuri B, Candiani M, Busacca M, Di Blasio AM, Vignali M. Modulation of NK cell lytic function by endometrial secretory factors: potential role in endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 1996 Nov;36(5):295-300.
22. Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N, Jaffe RB, Taylor RN. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Aug;81(8):3112-8.
23. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Millican SA, Müller KH, Sharkey AM, Smith SK. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest.* 1996 Jul 15;98(2):482-9.
24. Wu J, Xie H, Yao S, Liang Y. Macrophage and nerve interaction in endometriosis. *J Neuroinflammation.* 2017 Mar 14;14(1):53.
25. Yu J, Francisco AMC, Patel BG, Cline JM, Zou E, Berga SL, Taylor RN. IL-1 $\beta$  Stimulates Brain-Derived Neurotrophic Factor Production in Eutopic Endometriosis Stromal Cell Cultures: A Model for Cytokine Regulation of Neuroangiogenesis. *Am J Pathol.* 2018 Oct;188(10):2281-2292.
26. de Barros IBL, Malvezzi H, Gueuvoghlian-Silva BY, Piccinato CA, Rizzo LV, Podgaec S. "What do we know about regulatory T cells and endometriosis? A systematic review". *J Reprod Immunol.* 2017 Apr;120:48-55. doi: 10.1016/j.jri.2017.04.003. Epub 2017 Apr 10. Erratum in: *J Reprod Immunol.* 2017 Jun;121:34.
27. Králíčková M, Fiala L, Losan P, Tomes P, Vetricka V. Altered Immunity in Endometriosis: What Came First? *Immunol Invest.* 2018 Aug;47(6):569-582.
28. Slabe N, Meden-Vrtovec H, Verdenik I, Kosir-Pogacnik R, Ihan A. Cytotoxic T-Cells in Peripheral Blood in Women with Endometriosis. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2013 Oct;73(10):1042-1048.
29. Koprowski H, Herlyn M, Steplewski Z, Sears HF. Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma. *Science.* 1981 Apr 3;212(4490):53-5.

30. Del Frate C, Girometti R, Pittino M, Del Frate G, Bazzocchi M, Zuiani C. Deep retroperitoneal pelvic endometriosis: MR imaging appearance with laparoscopic correlation. *Radiographics*. 2006 Nov-Dec;26(6):1705-18.
31. Miller EJ, Fraser IS. The importance of pelvic nerve fibers in endometriosis. *Womens Health (Lond)*. 2015 Aug;11(5):611-8.
32. Cosma S, Salgarello M, Ceccaroni M, Gorgoni G, Riboni F, La Paglia E, Danese S, Benedetto C. Accuracy of a new diagnostic tool in deep infiltrating endometriosis: Positron emission tomography-computed tomography with 16 $\alpha$ -[18F]fluoro-17 $\beta$ -estradiol. *J Obstet Gynaecol Res*. 2016 Dec;42(12):1724-1733.
33. Coutinho A Jr, Bittencourt LK, Pires CE, Junqueira F, Lima CM, Coutinho E, Domingues MA, Domingues RC, Marchiori E. MR imaging in deep pelvic endometriosis: a pictorial essay. *Radiographics*. 2011 Mar-Apr;31(2):549-67.
34. Chamié LP, Blasbalg R, Pereira RM, Warmbrand G, Serafini PC. Findings of pelvic endometriosis at transvaginal US, MR imaging, and laparoscopy. *Radiographics*. 2011 Jul-Aug;31(4):E77-100.
35. Maccagnano C, Pellucchi F, Rocchini L, Ghezzi M, Scattoni V, Montorsi F, Rigatti P, Colombo R. Diagnosis and treatment of bladder endometriosis: state of the art. *Urol Int*. 2012;89(3):249-58.
36. Coutinho A Jr, Bittencourt LK, Pires CE, Junqueira F, Lima CM, Coutinho E, Domingues MA, Domingues RC, Marchiori E. MR imaging in deep pelvic endometriosis: a pictorial essay. *Radiographics*. 2011 Mar-Apr;31(2):549-67.
37. Agarwal N, Subramanian A. Endometriosis - morphology, clinical presentations and molecular pathology. *J Lab Physicians*. 2010 Jan;2(1):1-9.
38. Busard MP, van der Houwen LE, Bleeker MC, Pieters van den Bos IC, Cuesta MA, van Kuijk C, Mijatovic V, Hompes PG, van Waesberghe JH. Deep infiltrating endometriosis of the bowel: MR imaging as a method to predict muscular invasion. *Abdom Imaging*. 2012 Aug;37(4):549-57.
39. Fuldeore MJ, Soliman AM. Prevalence and Symptomatic Burden of Diagnosed Endometriosis in the United States: National Estimates from a Cross-Sectional Survey of 59,411 Women. *Gynecol Obstet Invest*. 2017;82(5):453-461.
40. Schliep KC, Mumford SL, Peterson CM, Chen Z, Johnstone EB, Sharp HT, Stanford JB, Hammoud AO, Sun L, Buck Louis GM. Pain typology and incident endometriosis. *Hum Reprod*. 2015 Oct;30(10):2427-38.
41. Peterson CM, Johnstone EB, Hammoud AO, Stanford JB, Varner MW, Kennedy A, Chen Z, Sun L, Fujimoto VY, Hediger ML, Buck Louis GM; ENDO Study Working Group. Risk factors associated with endometriosis: importance of study population for characterizing disease in the ENDO Study. *Am J Obstet Gynecol*. 2013 Jun;208(6):451.e1-11.
42. Tanbo T, Fedorcsak P. Endometriosis-associated infertility: aspects of pathophysiological mechanisms and treatment options. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2017 Jun;96(6):659-667.

43. Gupta S, Goldberg JM, Aziz N, Goldberg E, Krajcir N, Agarwal A. Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril*. 2008 Aug;90(2):247-57.
44. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012 Jun 29;10:49.
45. Miller JE, Ahn SH, Monsanto SP, Khalaj K, Koti M, Tayade C. Implications of immune dysfunction on endometriosis associated infertility. *Oncotarget*. 2017 Jan 24;8(4):7138-7147.
46. Ahn SH, Monsanto SP, Miller C, Singh SS, Thomas R, Tayade C. Pathophysiology and Immune Dysfunction in Endometriosis. *Biomed Res Int*. 2015;2015:795976.
47. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. 2003 Apr;79(4):829-43.
48. Gupta S, Agarwal A, Krajcir N, Alvarez JG. Role of oxidative stress in endometriosis. *Reprod Biomed Online*. 2006 Jul;13(1):126-34.
49. Ruder EH, Hartman TJ, Blumberg J, Goldman MB. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Hum Reprod Update*. 2008 Jul-Aug;14(4):345-57.
50. Opøien HK, Fedorcsak P, Polec A, Stensen MH, Åbyholm T, Tanbo T. Do endometriomas induce an inflammatory reaction in nearby follicles? *Hum Reprod*. 2013 Jul;28(7):1837-45.
51. Punnonen J, Teisala K, Ranta H, Bennett B, Punnonen R. Increased levels of interleukin-6 and interleukin-10 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1996 May;174(5):1522-6.
52. Yoshida S, Harada T, Iwabe T, Taniguchi F, Mitsunari M, Yamauchi N, Deura I, Horie S, Terakawa N. A combination of interleukin-6 and its soluble receptor impairs sperm motility: implications in infertility associated with endometriosis. *Hum Reprod*. 2004 Aug;19(8):1821-5.
53. Mansour G, Aziz N, Sharma R, Falcone T, Goldberg J, Agarwal A. The impact of peritoneal fluid from healthy women and from women with endometriosis on sperm DNA and its relationship to the sperm deformity index. *Fertil Steril*. 2009 Jul;92(1):61-7.
54. Pellicer A, Oliveira N, Ruiz A, Remohí J, Simón C. Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. *Hum Reprod*. 1995 Dec;10 Suppl 2:91-7.
55. Cahill DJ, Hull MG. Pituitary-ovarian dysfunction and endometriosis. *Hum Reprod Update*. 2000 Jan-Feb;6(1):56-66.
56. Tanbo T, Fedorcsak P. Endometriosis-associated infertility: aspects of pathophysiological mechanisms and treatment options. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2017 Jun;96(6):659-667.
57. Opøien HK, Fedorcsak P, Omland AK, Abyholm T, Bjercke S, Ertzeid G, Oldereid N, Mellembakken JR, Tanbo T. In vitro fertilization is a successful treatment in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril*. 2012 Apr;97(4):912-8.

58. Bulun SE, Cheng YH, Yin P, Imir G, Utsunomiya H, Attar E, Innes J, Julie Kim J. Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. *Mol Cell Endocrinol.* 2006 Mar 27;248(1-2):94-103.
59. Hauxman EE, Garcia-Velasco JA, Pellicer A. Oocyte donation and endometriosis: What are the lessons? *Semin Reprod Med.* 2013 Mar;31(2):173-7.
60. Sarapik A, Haller-Kikkatalo K, Utt M, Teesalu K, Salumets A, Uibo R. Serum anti-endometrial antibodies in infertile women - potential risk factor for implantation failure. *Am J Reprod Immunol.* 2010 May;63(5):349-57.
61. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril.* 1997 May;67(5):817-21.
62. Tuttlies F, Keckstein J, Ulrich U, Possover M, Schweppe KW, Wustlich M, Buchweitz O, Greb R, Kandolf O, Mangold R, Masetti W, Neis K, Rauter G, Reeka N, Richter O, Schindler AE, Sillem M, Terruhn V, Tinneberg HR. ENZIAN-Score, eine Klassifikation der tief infiltrierenden Endometriose [ENZIAN-score, a classification of deep infiltrating endometriosis]. *Zentralbl Gynakol.* 2005 Oct;127(5):275-81.
63. Haas D, Chvatal R, Habelsberger A, Wurm P, Schimetta W, Oppelt P. Comparison of revised American Fertility Society and ENZIAN staging: a critical evaluation of classifications of endometriosis on the basis of our patient population. *Fertil Steril.* 2011 Apr;95(5):1574-8.
64. Stiftung Endometriose Forschung. 6th Conference of the Stiftung Endometriose Forschung (Foundation for Endometriosis Research); 2010 Feb 19–21; Weissensee, Austria. Weissensee: Stiftung Endometriose Forschung; 2010.
65. Stiftung Endometriose Forschung. The revised Enzian classification. Consensus meeting, 7th Conference of the Stiftung Endometriose Forschung (Foundation for Endometriosis Research); 2011 Feb 25–27; Weissensee, Austria. Weissensee:Stiftung Endometriose Forschung; 2011.
66. Lee SY, Koo YJ, Lee DH. Classification of endometriosis. *Yeungnam Univ J Med.* 2021 Jan;38(1):10-18.
67. Adamson GD, Pasta DJ. Endometriosis fertility index: the new, validated endometriosis staging system. *Fertil Steril* 2010; 94:1609–15.
68. Zeng C, Xu JN, Zhou Y, Zhou YF, Zhu SN, Xue Q. Reproductive performance after surgery for endometriosis: predictive value of the revised American Fertility Society classification and the endometriosis fertility index. *Gynecol Obstet Invest.* 2014;77(3):180-5.
69. Wang W, Li R, Fang T, Huang L, Ouyang N, Wang L, Zhang Q, Yang D. Endometriosis fertility index score maybe more accurate for predicting the outcomes of in vitro fertilisation than r-AFS classification in women with endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013 Dec 11;11:112.
70. Endometriosis Classification Committee; Ad hoc committee of the AAGL. AAGL endometriosis tabulation system. California (CA): Cypress; 2007.
71. Chapron C, Dubuisson JB, Pansini V, Vieira M, Fauconnier A, Barakat H, Dousset B. Routine clinical examination is not sufficient for diagnosing and locating deeply infiltrating endometriosis. *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 2002 May;9(2):115-9.

72. Koninckx PR, Meuleman C, Oosterlynck D, Cornillie FJ. Diagnosis of deep endometriosis by clinical examination during menstruation and plasma CA-125 concentration. *Fertil Steril.* 1996 Feb;65(2):280-7.
73. Eskenazi B, Warner M, Bonsignore L, Olive D, Samuels S, Vercellini P. Validation study of nonsurgical diagnosis of endometriosis. *Fertil Steril.* 2001 Nov;76(5):929-35.
74. Bazot M, Malzy P, Cortez A, Roseau G, Amouyal P, Darai E. Accuracy of transvaginal sonography and rectal endoscopic sonography in the diagnosis of deep infiltrating endometriosis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007 Dec;30(7):994-1001.
75. Kinkel K, Frei KA, Balleyguier C, Chapron C. Diagnosis of endometriosis with imaging: a review. *Eur Radiol.* 2006 Feb;16(2):285-98.
76. Togashi K, Nishimura K, Kimura I, Tsuda Y, Yamashita K, Shibata T, Nakano Y, Konishi J, Konishi I, Mori T. Endometrial cysts: diagnosis with MR imaging. *Radiology.* 1991 Jul;180(1):73-8.
77. Martin DC, Hubert GD, Vander Zwaag R, el-Zeky FA. Laparoscopic appearances of peritoneal endometriosis. *Fertil Steril.* 1989 Jan;51(1):63-7.
78. Walter AJ, Hentz JG, Magtibay PM, Cornella JL, Magrina JF. Endometriosis: correlation between histologic and visual findings at laparoscopy. *Am J Obstet Gynecol.* 2001 Jun;184(7):1407-11; discussion 1411-3.
79. Coutinho LM, Ferreira MC, Rocha ALL, Carneiro MM, Reis FM. New biomarkers in endometriosis. *Adv Clin Chem.* 2019;89:59-77.
80. Laganà AS, Vitale SG, Salmeri FM, Triolo O, Ban Frangež H, Vrtačnik-Bokal E, Stojanovska L, Apostolopoulos V, Granese R, Sofo V. Unus pro omnibus, omnes pro uno: A novel, evidence-based, unifying theory for the pathogenesis of endometriosis. *Med Hypotheses.* 2017 Jun;103:10-20.
81. Vitale SG, Capriglione S, Peterlunger I, La Rosa VL, Vitagliano A, Noventa M, Valenti G, Sapia F, Angioli R, Lopez S, Sarpietro G, Rossetti D, Zito G. The Role of Oxidative Stress and Membrane Transport Systems during Endometriosis: A Fresh Look at a Busy Corner. *Oxid Med Cell Longev.* 2018 Mar 21;2018:7924021.
82. Cheng YM, Wang ST, Chou CY. Serum CA-125 in preoperative patients at high risk for endometriosis. *Obstet Gynecol.* 2002 Mar;99(3):375-80.
83. Mol BW, Bayram N, Lijmer JG, Wiegerinck MA, Bongers MY, van der Veen F, Bossuyt PM. The performance of CA-125 measurement in the detection of endometriosis: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 1998 Dec;70(6):1101-8.
84. Barbieri RL, Niloff JM, Bast RC Jr, Scaetzel E, Kistner RW, Knapp RC. Elevated serum concentrations of CA-125 in patients with advanced endometriosis. *Fertil Steril.* 1986 May;45(5):630-4.
85. Koninckx PR, Meuleman C, Oosterlynck D, Cornillie FJ. Diagnosis of deep endometriosis by clinical examination during menstruation and plasma CA-125 concentration. *Fertil Steril.* 1996 Feb;65(2):280-7.
86. Pittaway DE, Rondinone D, Miller KA, Barnes K. Clinical evaluation of CA-125 concentrations as a prognostic factor for pregnancy in infertile women with surgically treated endometriosis. *Fertil Steril.* 1995 Aug;64(2):321-4.

87. Carrarelli P, Luddi A, Funghi L, Arcuri F, Batteux F, Dela Cruz C, Tosti C, Reis FM, Chapron C, Petraglia F. Urocortin and corticotrophin-releasing hormone receptor type 2 mRNA are highly expressed in deep infiltrating endometriotic lesions. *Reprod Biomed Online*. 2016 Oct;33(4):476-483.
88. Novembri R, Carrarelli P, Toti P, Rocha AL, Borges LE, Reis FM, Piomboni P, Florio P, Petraglia F. Urocortin 2 and urocortin 3 in endometriosis: evidence for a possible role in inflammatory response. *Mol Hum Reprod*. 2011 Sep;17(9):587-93
89. Vergetaki A, Jeschke U, Vrekoussis T, Taliouri E, Sabatini L, Papakonstanti EA, Makrigiannakis A. Differential expression of CRH, UCN, CRHR1 and CRHR2 in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *PLoS One*. 2013 Apr 24;8(4):e62313.
90. Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N, Wechsler J, Jänne PA, Kuang Y, Yanagita M, Wang L, Berkowitz JA, Distel RJ, Cayre YE. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Res*. 2011 Feb;31(2):427-41.
91. Mascacchi M, Falchini M, Maddau C, Salvianti F, Nistri M, Bertelli E, Sali L, Zuccherelli S, Vella A, Matucci M, Voltolini L, Pegna AL, Luconi M, Pinzani P, Pazzagli M. Prevalence and number of circulating tumour cells and microemboli at diagnosis of advanced NSCLC. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016 Jan;142(1):195-200.
92. Mahajan N. Endometrial receptivity array: Clinical application. *J Hum Reprod Sci*. 2015 Jul-Sep;8(3):121-9.
93. Sung J, Wang Y, Chandrasekaran S, Witten DM, Price ND. Molecular signatures from omics data: from chaos to consensus. *Biotechnol J*. 2012 Aug;7(8):946-57.
94. Wen Y, Wang Y, Feng TT, Wei SB. Differential Proteomics Analysis of Endometriosis in Blood Stasis Syndrome. *Chin J Integr Med*. 2018 Dec;24(12):925-929.
95. Li J, Guan L, Zhang H, Gao Y, Sun J, Gong X, Li D, Chen P, Liang X, Huang M, Bi H. Endometrium metabolomic profiling reveals potential biomarkers for diagnosis of endometriosis at minimal-mild stages. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018 Apr 30;16(1):42.
96. Dutta M, Singh B, Joshi M, Das D, Subramani E, Maan M, Jana SK, Sharma U, Das S, Dasgupta S, Ray CD, Chakravarty B, Chaudhury K. Metabolomics reveals perturbations in endometrium and serum of minimal and mild endometriosis. *Sci Rep*. 2018 Apr 24;8(1):6466.
97. Li J, Gao Y, Guan L, Zhang H, Sun J, Gong X, Li D, Chen P, Ma Z, Liang X, Huang M, Bi H. Discovery of Phosphatidic Acid, Phosphatidylcholine, and Phosphatidylserine as Biomarkers for Early Diagnosis of Endometriosis. *Front Physiol*. 2018 Jan 23;9:14.
98. Vicente-Muñoz S, Morcillo I, Puchades-Carrasco L, Payá V, Pellicer A, Pineda-Lucena A. Pathophysiologic processes have an impact on the plasma metabolomic signature of endometriosis patients. *Fertil Steril*. 2016 Dec;106(7):1733-1741.e1.
99. Letsiou S, Peterse DP, Fassbender A, Hendriks MM, van den Broek NJ, Berger R, O DF, Vanhie A, Vodolazkaia A, Van Langendonck A, Donnez J, Harms AC, Vreeken RJ, Groothuis PG, Dolmans MM, Brenkman AB, D'Hooghe TM. Endometriosis is



- associated with aberrant metabolite profiles in plasma. *Fertil Steril*. 2017 Mar;107(3):699-706.e6.
100. Santamaria X, Taylor H. MicroRNA and gynecological reproductive diseases. *Fertil Steril*. 2014 Jun;101(6):1545-51.
  101. Tian Z, Chang XH, Zhao Y, Zhu HL. Current biomarkers for the detection of endometriosis. *Chin Med J (Engl)*. 2020 Oct 5;133(19):2346-2352.
  102. Pagliardini L, Gentilini D, Sanchez AM, Candiani M, Viganò P, Di Blasio AM. Replication and meta-analysis of previous genome-wide association studies confirm vezatin as the locus with the strongest evidence for association with endometriosis. *Hum Reprod*. 2015 Apr;30(4):987-93.
  103. Nisenblat V, Prentice L, Bossuyt PM, Farquhar C, Hull ML, Johnson N. Combination of the non-invasive tests for the diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 Jul 13;7(7):CD012281.
  104. Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med*. 2009 Jan 15;360(3):268-79.
  105. Rafique S, Decherney AH. Medical Management of Endometriosis. *Clin Obstet Gynecol*. 2017 Sep;60(3):485-496.
  106. Marjoribanks J, Ayeleke RO, Farquhar C, Proctor M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for dysmenorrhoea. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Jul 30;2015(7):CD001751.
  107. Dogan E, Saygili U, Posaci C, Tuna B, Caliskan S, Altunyurt S, Saatli B. Regression of endometrial explants in rats treated with the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib. *Fertil Steril*. 2004 Oct;82 Suppl 3:1115-20.
  108. Zorbas KA, Economopoulos KP, Vlahos NF. Continuous versus cyclic oral contraceptives for the treatment of endometriosis: a systematic review. *Arch Gynecol Obstet*. 2015 Jul;292(1):37-43.
  109. Prentice A, Deary AJ, Goldbeck-Wood S, Farquhar C, Smith SK. Gonadotrophin-releasing hormone analogues for pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(2):CD000346.
  110. Whitehead MI, Townsend PT, Pryse-Davies J, Ryder T, Lane G, Siddle NC, King RJ. Effects of various types and dosages of progestogens on the postmenopausal endometrium. *J Reprod Med*. 1982 Aug;27(8 Suppl):539-48.
  111. Bruner KL, Eisenberg E, Gorstein F, Osteen KG. Progesterone and transforming growth factor-beta coordinately regulate suppression of endometrial matrix metalloproteinases in a model of experimental endometriosis. *Steroids*. 1999 Sep;64(9):648-53.
  112. Schindler AE. Dienogest in long-term treatment of endometriosis. *Int J Womens Health*. 2011;3:175-84.
  113. Vercellini P, Viganò P, Somigliana E. The role of the levonorgestrel-releasing intrauterine device in the management of symptomatic endometriosis. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2005 Aug;17(4):359-65.

114. Gopalkrishnan K, Katkam RR, Sachdeva G, Kholkute SD, Padwal V, Puri CP. Effects of an antiprogestin onapristone on the endometrium of bonnet monkeys: morphometric and ultrastructural studies. *Biol Reprod.* 2003 Jun;68(6):1959-67.
115. Bulun SE, Zeitoun KM, Takayama K, Sasano H. Molecular basis for treating endometriosis with aromatase inhibitors. *Hum Reprod Update.* 2000 Sep-Oct;6(5):413-8.
116. Nawathe A, Patwardhan S, Yates D, Harrison GR, Khan KS. Systematic review of the effects of aromatase inhibitors on pain associated with endometriosis. *BJOG.* 2008 Jun;115(7):818-22.
117. Selak V, Farquhar C, Prentice A, Singla A. Danazol for pelvic pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007 Oct 17;(4):CD000068.
118. Delgado-Rosas F, Gómez R, Ferrero H, Gaytan F, Garcia-Velasco J, Simón C, Pellicer A. The effects of ergot and non-ergot-derived dopamine agonists in an experimental mouse model of endometriosis. *Reproduction.* 2011 Nov;142(5):745-55.
119. Bruner-Tran KL, Osteen KG, Duleba AJ. Simvastatin protects against the development of endometriosis in a nude mouse model. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Jul;94(7):2489-94.
120. Cayci T, Akgul EO, Kurt YG, Ceyhan TS, Aydin I, Onguru O, Yaman H, Cakir E, Yasar M, Bilgi C, Erbil KM. The levels of nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in the rat endometriosis model. *J Obstet Gynaecol Res.* 2011 Aug;37(8):1041-7.
121. Koninckx PR, Craessaerts M, Timmerman D, Cornillie F, Kennedy S. Anti-TNF-alpha treatment for deep endometriosis-associated pain: a randomized placebo-controlled trial. *Hum Reprod.* 2008 Sep;23(9):2017-23.
122. Trabert B, Peters U, De Roos AJ, Scholes D, Holt VL. Diet and risk of endometriosis in a population-based case-control study. *Br J Nutr.* 2011 Feb;105(3):459-67.
123. Vercellini P, Trespidi L, De Giorgi O, Cortesi I, Parazzini F, Crosignani PG. Endometriosis and pelvic pain: relation to disease stage and localization. *Fertil Steril.* 1996 Feb;65(2):299-304.
124. Jackson LW, Schisterman EF, Dey-Rao R, Browne R, Armstrong D. Oxidative stress and endometriosis. *Hum Reprod.* 2005 Jul;20(7):2014-20.
125. Mier-Cabrera J, Aburto-Soto T, Burrola-Méndez S, Jiménez-Zamudio L, Tolentino MC, Casanueva E, Hernández-Guerrero C. Women with endometriosis improved their peripheral antioxidant markers after the application of a high antioxidant diet. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009 May 28;7:54.
126. Ferrini RL, Barrett-Connor E. Caffeine intake and endogenous sex steroid levels in postmenopausal women. The Rancho Bernardo Study. *Am J Epidemiol.* 1996 Oct 1;144(7):642-4.
127. Shaw RW. Treatment of endometriosis. *Lancet.* 1992 Nov 21;340(8830):1267-71.
128. Soave I, Occhiali T, Wenger J-M, Pluchino N, Caserta D, Marci R. Endometriosis and food habits: Can diet make the difference? *Journal of Endometriosis and Pelvic Pain Disorders.* 2018;10(2):59-71.

129. Rudzitis-Auth J, Körbel C, Scheuer C, Menger MD, Laschke MW. Xanthohumol inhibits growth and vascularization of developing endometriotic lesions. *Hum Reprod.* 2012 Jun;27(6):1735-44.
130. Wang CC, Xu H, Man GC, Zhang T, Chu KO, Chu CY, Cheng JT, Li G, He YX, Qin L, Lau TS, Kwong J, Chan TH. Prodrug of green tea epigallocatechin-3-gallate (Pro-EGCG) as a potent anti-angiogenesis agent for endometriosis in mice. *Angiogenesis.* 2013 Jan;16(1):59-69.
131. Harlev A, Gupta S, Agarwal A. Targeting oxidative stress to treat endometriosis. *Expert Opin Ther Targets.* 2015;19(11):1447-64.
132. Sesti F, Capozzolo T, Pietropolli A, Collalti M, Bollea MR, Piccione E. Dietary therapy: a new strategy for management of chronic pelvic pain. *Nutr Res Rev.* 2011 Jun;24(1):31-8.
133. Koes R, Verweij W, Quattrocchio F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci.* 2005 May;10(5):236-42.
134. Gołębek A, Kowalska K, Olejnik A. Polyphenols as a Diet Therapy Concept for Endometriosis-Current Opinion and Future Perspectives. *Nutrients.* 2021 Apr 18;13(4):1347.
135. Galland L. Diet and inflammation. *Nutr Clin Pract.* 2010 Dec;25(6):634-40.
136. Cheng W, Chen L, Yang S, Han J, Zhai D, Ni J, Yu C, Cai Z. Puerarin suppresses proliferation of endometriotic stromal cells partly via the MAPK signaling pathway induced by 17 $\beta$ -estradiol-BSA. *PLoS One.* 2012;7(9):e45529.
137. Chen D, Wan SB, Yang H, Yuan J, Chan TH, Dou QP. EGCG, green tea polyphenols and their synthetic analogs and prodrugs for human cancer prevention and treatment. *Adv Clin Chem.* 2011;53:155-77.
138. Wang D, Liu Y, Han J, Zai D, Ji M, Cheng W, Xu L, Yang L, He M, Ni J, Cai Z, Yu C. Puerarin suppresses invasion and vascularization of endometriosis tissue stimulated by 17 $\beta$ -estradiol. *PLoS One.* 2011;6(9):e25011..
139. İlhan M, Güragaç Dereli FT, Akkol EK. Novel Drug Targets with Traditional Herbal Medicines for Overcoming Endometriosis. *Curr Drug Deliv.* 2019;16(5):386-399.
140. Smith GA, Fearnley GW, Tomlinson DC, Harrison MA, Ponnambalam S. The cellular response to vascular endothelial growth factors requires co-ordinated signal transduction, trafficking and proteolysis. *Biosci Rep.* 2015 Aug 18;35(5):e00253.
141. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983 Feb 25;219(4587):983-5.
142. Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw.* 2009 Dec;20(4):158-63.
143. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1998 May 22;273(21):13313-6.
144. Zachary I. Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 Jun;280(6):C1375-86.

145. Shibuya M. Unique signal transduction of the VEGF family members VEGF-A and VEGF-E. *Biochem Soc Trans.* 2009 Dec;37(Pt 6):1161-6.
146. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem.* 1998 Nov 13;273(46):30336-43.
147. Adamis AP, Shima DT. The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease. *Retina.* 2005 Feb-Mar;25(2):111-8.
148. Ferrara N. VEGF and Intraocular Neovascularization: From Discovery to Therapy. *Transl Vis Sci Technol.* 2016 Mar 11;5(2):10.
149. Ferrara N. Binding to the extracellular matrix and proteolytic processing: two key mechanisms regulating vascular endothelial growth factor action. *Mol Biol Cell.* 2010 Mar 1;21(5):687-90.
150. Sakurai Y, Ohgimoto K, Kataoka Y, Yoshida N, Shibuya M. Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jan 25;102(4):1076-81.
151. Hellström M, Phng LK, Gerhardt H. VEGF and Notch signaling: the yin and yang of angiogenic sprouting. *Cell Adh Migr.* 2007 Jul-Sep;1(3):133-6.
152. Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, Fujisawa H, Betsholtz C, Shima DT. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev.* 2002 Oct 15;16(20):2684-98.
153. Takagi S, Kasuya Y, Shimizu M, Matsuura T, Tsuboi M, Kawakami A, Fujisawa H. Expression of a cell adhesion molecule, neuropilin, in the developing chick nervous system. *Dev Biol.* 1995 Jul;170(1):207-22.
154. Gitay-Goren H, Cohen T, Tessler S, Soker S, Gengrinovitch S, Rockwell P, Klagsbrun M, Levi BZ, Neufeld G. Selective binding of VEGF121 to one of the three vascular endothelial growth factor receptors of vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1996 Mar 8;271(10):5519-23.
155. Kolodkin AL, Levensgood DV, Rowe EG, Tai YT, Giger RJ, Ginty DD. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell.* 1997 Aug 22;90(4):753-62.
156. Fujisawa H. From the discovery of neuropilin to the determination of its adhesion sites. *Adv Exp Med Biol.* 2002;515:1-12.
157. Schwarz Q, Ruhrberg C. Neuropilin, you gotta let me know: should I stay or should I go? *Cell Adh Migr.* 2010 Jan-Mar;4(1):61-6.
158. Gu C, Rodriguez ER, Reimert DV, Shu T, Fritsch B, Richards LJ, Kolodkin AL, Ginty DD. Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development. *Dev Cell.* 2003 Jul;5(1):45-57.
159. Vieira JM, Schwarz Q, Ruhrberg C. Selective requirements for NRP1 ligands during neurovascular patterning. *Development.* 2007 May;134(10):1833-43.
160. Gu C, Limberg BJ, Whitaker GB, Perman B, Leahy DJ, Rosenbaum JS, Ginty DD, Kolodkin AL. Characterization of neuropilin-1 structural features that confer binding

- to semaphorin 3A and vascular endothelial growth factor 165. *J Biol Chem.* 2002 May 17;277(20):18069-76.
161. Mamluk R, Gechtman Z, Kutcher ME, Gasiunas N, Gallagher J, Klagsbrun M. Neuropilin-1 binds vascular endothelial growth factor 165, placenta growth factor-2, and heparin via its b1b2 domain. *J Biol Chem.* 2002 Jul 5;277(27):24818-25.
  162. Lee CC, Kreusch A, McMullan D, Ng K, Spraggon G. Crystal structure of the human neuropilin-1 b1 domain. *Structure.* 2003 Jan;11(1):99-108.
  163. Shimizu M, Murakami Y, Suto F, Fujisawa H. Determination of cell adhesion sites of neuropilin-1. *J Cell Biol.* 2000 Mar 20;148(6):1283-93..
  164. Carrer A, Moimas S, Zacchigna S, Pattarini L, Zentilin L, Ruozi G, Mano M, Sinigaglia M, Maione F, Serini G, Giraudo E, Bussolino F, Giacca M. Neuropilin-1 identifies a subset of bone marrow Gr1- monocytes that can induce tumor vessel normalization and inhibit tumor growth. *Cancer Res.* 2012 Dec 15;72(24):6371-81.
  165. Becker PM, Waltenberger J, Yachechko R, Mirzapoiazova T, Sham JS, Lee CG, Elias JA, Verin AD. Neuropilin-1 regulates vascular endothelial growth factor-mediated endothelial permeability. *Circ Res.* 2005 Jun 24;96(12):1257-65.
  166. Fantin A, Plein A, Ruhrberg C. "Neuropilin Signalling in Vascular Development and Pathology", *Current Angiogenesis (Discontinued)* 2012; 1(2) .
  167. Fantin A, Schwarz Q, Davidson K, Normando EM, Denti L, Ruhrberg C. The cytoplasmic domain of neuropilin 1 is dispensable for angiogenesis, but promotes the spatial separation of retinal arteries and veins. *Development.* 2011 Oct;138(19):4185-91.
  168. Soker S, Miao HQ, Nomi M, Takashima S, Klagsbrun M. VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J Cell Biochem.* 2002;85(2):357-68.
  169. Fantin A, Vieira JM, Plein A, Denti L, Fruttiger M, Pollard JW, Ruhrberg C. NRP1 acts cell autonomously in endothelium to promote tip cell function during sprouting angiogenesis. *Blood.* 2013 Mar 21;121(12):2352-62.
  170. Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, Fujisawa H, Betsholtz C, Shima DT. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev.* 2002 Oct 15;16(20):2684-98.
  171. Murga M, Fernandez-Capetillo O, Tosato G. Neuropilin-1 regulates attachment in human endothelial cells independently of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Blood.* 2005 Mar 1;105(5):1992-9.
  172. Takagi S, Kasuya Y, Shimizu M, Matsuura T, Tsuboi M, Kawakami A, Fujisawa H. Expression of a cell adhesion molecule, neuropilin, in the developing chick nervous system. *Dev Biol.* 1995 Jul;170(1):207-22.
  173. Fukasawa M, Matsushita A, Korc M. Neuropilin-1 interacts with integrin beta1 and modulates pancreatic cancer cell growth, survival and invasion. *Cancer Biol Ther.* 2007 Aug;6(8):1173-80.
  174. Gao Y, Li M, Chen W, Simons M. Synectin, syndecan-4 cytoplasmic domain binding PDZ protein, inhibits cell migration. *J Cell Physiol.* 2000;184: 373-379.

175. Valdembri D, Caswell PT, Anderson KI, Schwarz JP, König I, Astanina E, Caccavari F, Norman JC, Humphries MJ, Bussolino F, Serini G. Neuropilin-1/GIPC1 signaling regulates  $\alpha 5 \beta 1$  integrin traffic and function in endothelial cells. *PLoS Biol.* 2009 Jan 27;7(1):e25.
176. Yaqoob U, Cao S, Shergill U, Jagavelu K, Geng Z, Yin M, de Assuncao TM, Cao Y, Szabolcs A, Thorgeirsson S, Schwartz M, Yang JD, Ehman R, Roberts L, Mukhopadhyay D, Shah VH. Neuropilin-1 stimulates tumor growth by increasing fibronectin fibril assembly in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2012 Aug 15;72(16):4047-59.
177. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell.* 1998 Mar 20;92(6):735-45.
178. Whitaker GB, Limberg BJ, Rosenbaum JS. Vascular endothelial growth factor receptor-2 and neuropilin-1 form a receptor complex that is responsible for the differential signaling potency of VEGF(165) and VEGF(121). *J Biol Chem.* 2001 Jul 6;276(27):25520-31.
179. Evans IM, Yamaji M, Britton G, Pellet-Many C, Lockie C, Zachary IC, Frankel P. Neuropilin-1 signaling through p130Cas tyrosine phosphorylation is essential for growth factor-dependent migration of glioma and endothelial cells. *Mol Cell Biol.* 2011 Mar;31(6):1174-85.
180. Bielenberg DR, Pettaway CA, Takashima S, Klagsbrun M. Neuropilins in neoplasms: expression, regulation, and function. *Exp Cell Res.* 2006 Mar 10;312(5):584-93.
181. Pellet-Many C, Frankel P, Jia H, Zachary I. Neuropilins: structure, function and role in disease. *Biochem J.* 2008 Apr 15;411(2):211-26.
182. Romeo PH, Lemarchandel V, Tordjman R. Neuropilin-1 in the immune system. *Adv Exp Med Biol.* 2002;515:49-54.
183. Ellis LM. The role of neuropilins in cancer. *Mol Cancer Ther.* 2006 May;5(5):1099-107.
184. Zachary IC. How neuropilin-1 regulates receptor tyrosine kinase signalling: the knowns and known unknowns. *Biochem Soc Trans.* 2011 Dec;39(6):1583-91.
185. Glinka Y, Stoilova S, Mohammed N, Prud'homme GJ. Neuropilin-1 exerts co-receptor function for TGF-beta-1 on the membrane of cancer cells and enhances responses to both latent and active TGF-beta. *Carcinogenesis.* 2011 Apr;32(4):613-21.
186. Cao Y, Szabolcs A, Dutta SK, Yaqoob U, Jagavelu K, Wang L, Leof EB, Urrutia RA, Shah VH, Mukhopadhyay D. Neuropilin-1 mediates divergent R-Smad signaling and the myofibroblast phenotype. *J Biol Chem.* 2010 Oct 8;285(41):31840-8.
187. Grandclement C, Pallandre JR, Valmary Degano S, Viel E, Bouard A, Balland J, Rémy-Martin JP, Simon B, Rouleau A, Boireau W, Klagsbrun M, Ferrand C, Borg C. Neuropilin-2 expression promotes TGF- $\beta$ 1-mediated epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *PLoS One.* 2011;6(7):e20444.
188. West DC, Rees CG, Duchesne L, Patey SJ, Terry CJ, Turnbull JE, Delehedde M, Heegaard CW, Allain F, Vanpouille C, Ron D, Fernig DG. Interactions of multiple

- heparin binding growth factors with neuropilin-1 and potentiation of the activity of fibroblast growth factor-2. *J Biol Chem*. 2005 Apr 8;280(14):13457-64.
189. Shimizu M, Murakami Y, Suto F, Fujisawa H. Determination of cell adhesion sites of neuropilin-1. *J Cell Biol*. 2000 Mar 20;148(6):1283-93.
  190. Battaglia A, Buzzonetti A, Monego G, Peri L, Ferrandina G, Fanfani F, Scambia G, Fattorossi A. Neuropilin-1 expression identifies a subset of regulatory T cells in human lymph nodes that is modulated by preoperative chemoradiation therapy in cervical cancer. *Immunology*. 2008 Jan;123(1):129-38.
  191. Sarris M, Andersen KG, Randow F, Mayr L, Betz AG. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity*. 2008 Mar;28(3):402-13.
  192. Solomon BD, Mueller C, Chae WJ, Alabanza LM, Bynoe MS. Neuropilin-1 attenuates autoreactivity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Feb 1;108(5):2040-5.
  193. Vadasz Z, Attias D, Kessel A, Toubi E. Neuropilins and semaphorins - from angiogenesis to autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2010 Oct;9(12):825-9.
  194. Catalano A. The neuroimmune semaphorin-3A reduces inflammation and progression of experimental autoimmune arthritis. *J Immunol*. 2010; 185: 6373-83.
  195. Jubb AM, Strickland LA, Liu SD, Mak J, Schmidt M, Koeppen H. Neuropilin-1 expression in cancer and development. *J Pathol*. 2012 Jan;226(1):50-60.
  196. Jubb AM, Sa SM, Ratti N, Strickland LA, Schmidt M, Callahan CA, Koeppen H. Neuropilin-2 expression in cancer. *Histopathology*. 2012 Sep;61(3):340-9.
  197. Hajjar KA, Krishnan S. Annexin II: a mediator of the plasmin/plasminogen activator system. *Trends Cardiovasc Med*. 1999 Jul;9(5):128-38.
  198. Kang HM, Choi KS, Kassam G, Fitzpatrick SL, Kwon M, Waisman DM. Role of annexin II tetramer in plasminogen activation. *Trends Cardiovasc Med*. 1999 Apr-May;9(3-4):92-102.
  199. Hajjar KA, Guevara CA, Lev E, Dowling K, Chacko J. Interaction of the fibrinolytic receptor, annexin II, with the endothelial cell surface. Essential role of endonexin repeat 2. *J Biol Chem*. 1996;271(35):21652-9.
  200. Masaki T, Tokuda M, Fujimura T, Ohnishi M, Tai Y, Miyamoto K, Itano T, Matsui H, Watanabe S, Sogawa K, et al. Involvement of annexin I and annexin II in hepatocyte proliferation: can annexins I and II be markers for proliferative hepatocytes? *Hepatology*. 1994;20(2):425-35.
  201. Zimmermann U, Woenckhaus C, Pietschmann S, Junker H, Maile S, Schultz K, Protzel C, Giebel J. Expression of annexin II in conventional renal cell carcinoma is correlated with Fuhrman grade and clinical outcome. *Virchows Arch*. 2004;445(4):368-74
  202. Menell JS, Cesarman GM, Jacovina AT, McLaughlin MA, Lev EA, Hajjar KA. Annexin II and bleeding in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1999;340(13):994-1004.

203. Falcone DJ, Borth W, Khan KM, Hajjar KA. Plasminogen-mediated matrix invasion and degradation by macrophages is dependent on surface expression of annexin II. *Blood*. 2001 Feb 1;97(3):777-84.
204. Collen D, Lijnen HR. Molecular basis of fibrinolysis, as relevant for thrombolytic therapy. *Thromb Haemost*. 1995;74(1):167-71..
205. DeClerck YA, Imren S, Montgomery AM, Mueller BM, Reisfeld RA, Laug WE. Proteases and protease inhibitors in tumor progression. *Adv Exp Med Biol*. 1997;425:89-97.
206. Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest*. 1983 Dec;49(6):636-49.
207. Aguilar S, Corominas JM, Malats N, Pereira JA, Dufresne M, Real FX, Navarro P. Tissue plasminogen activator in murine exocrine pancreas cancer: selective expression in ductal tumors and contribution to cancer progression. *Am J Pathol*. 2004;165(4):1129-39.
208. Sharma MC, Sharma M. The role of annexin II in angiogenesis and tumor progression: a potential therapeutic target. *Curr Pharm Des*. 2007;13(35):3568-75.
209. Brichory FM, Misek DE, Yim AM, Krause MC, Giordano TJ, Beer DG, Hanash SM. An immune response manifested by the common occurrence of annexins I and II autoantibodies and high circulating levels of IL-6 in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;14;98(17):9824-9.
210. Wu W, Tang X, Hu W, Lotan R, Hong WK, Mao L. Identification and validation of metastasis-associated proteins in head and neck cancer cell lines by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Clin Exp Metastasis*. 2002;19(4):319-26.
211. Su SC, Maxwell SA, Bayless KJ. Annexin 2 regulates endothelial morphogenesis by controlling AKT activation and junctional integrity. *J Biol Chem*. 2010 Dec 24;285(52):40624-34.
212. Kirshner J, Schumann D, Shively JE. CEACAM1, a cell-cell adhesion molecule, directly associates with annexin II in a three-dimensional model of mammary morphogenesis. *J Biol Chem*. 2003 Dec 12;278(50):50338-45.
213. Ergün S, Kilik N, Ziegeler G, Hansen A, Nollau P, Götze J, Wurmbach JH, Horst A, Weil J, Fernando M, Wagener C. CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol Cell*. 2000 Feb;5(2):311-20.
214. Liu F, Liu L, Zheng J. Expression of annexin A2 in adenomyosis and dysmenorrhea. *Arch Gynecol Obstet*. 2019;300(3):711-716.
215. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Millican SA, Müller KH, Sharkey AM, Smith SK. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest*. 1996 Jul 15;98(2):482-9.
216. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Smith SK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod*. 1996 Jan;11(1):220-3.



217. Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N, Jaffe RB, Taylor RN. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Aug;81(8):3112-8.
218. Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod.* 1998 Jun;13(6):1686-
219. Yamazaki Y, Morita T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Mol Divers*, 2006, 10(4):515–527.
220. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling – in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(5):359–371.
221. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004 Aug;25(4):581-611.
222. Ucuzian AA, Gassman AA, East AT, Greisler HP. Molecular mediators of angiogenesis. *J Burn Care Res.* 2010 Jan-Feb;31(1):158-75.
223. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997 Apr 17;386(6626):671-4.
224. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995 Jan;1(1):27-31.
225. Brzović-Šarić V, Landeka I, Šarić B, Barberić M, Andrijašević L, Cerovski B, Oršolić N, Đikić D. Levels of selected oxidative stress markers in the vitreous and serum of diabetic retinopathy patients. *Mol Vis.* 2015 Jun 12;21:649-64.
226. Arcondéguy T, Lacazette E, Millevoi S, Prats H, Touriol C. VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level. *Nucleic Acids Res.* 2013 Sep;41(17):7997-8010
227. Hormbrey E, Gillespie P, Turner K, Han C, Roberts A, McGrouther D, Harris AL. A critical review of vascular endothelial growth factor (VEGF) analysis in peripheral blood: is the current literature meaningful? *Clin Exp Metastasis.* 2002;19(8):651-63.
228. Leone Roberti Maggiore U, Ferrero S. Methodological concerns regarding levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in serum of women with endometriosis. *Int J Fertil Steril.* 2015 Jan-Mar;8(4):485-6.
229. Won KJ, Lee P, Jung SH, Jiang X, Lee CK, Lin HY, Kang H, Lee HM, Kim J, Toyokuni S, Kim B. 3-morpholinopyridone participates in the attenuation of neointima formation via inhibition of annexin A2-mediated vascular smooth muscle cell migration. *Proteomics.* 2011 Jan;11(2):193-201.
230. Zhou S, Yi T, Liu R, Bian C, Qi X, He X, Wang K, Li J, Zhao X, Huang C, Wei Y. Proteomics identification of annexin A2 as a key mediator in the metastasis and proangiogenesis of endometrial cells in human adenomyosis. *Mol Cell Proteomics.* 2012 Jul;11(7):M112.017988.
231. Valapala M, Thamake SI, Vishwanatha JK. A competitive hexapeptide inhibitor of annexin A2 prevents hypoxia-induced angiogenic events. *J Cell Sci.* 2011 May 1;124(Pt 9):1453-64.

232. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009 Jun;119(6):1420-8.
233. Lee MY, Shen MR. Epithelial-mesenchymal transition in cervical carcinoma. *Am J Transl Res.* 2012;4(1):1-13.
234. Stewart CJ, McCluggage WG. Epithelial-mesenchymal transition in carcinomas of the female genital tract. *Histopathology.* 2013 Jan;62(1):31-43.
235. Proestling K, Birner P, Gamperl S, Nirtl N, Marton E, Yerlikaya G, Wenzl R, Streubel B, Husslein H. Enhanced epithelial to mesenchymal transition (EMT) and upregulated MYC in ectopic lesions contribute independently to endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015 Jul 22;13:75.
236. Bartley J, Jülicher A, Hotz B, Mechsner S, Hotz H. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) seems to be regulated differently in endometriosis and the endometrium. *Arch Gynecol Obstet.* 2014 Apr;289(4):871-81.
237. Jia J, Zhang W, Liu JY, Chen G, Liu H, Zhong HY, Liu B, Cai Y, Zhang JL, Zhao YF. Epithelial mesenchymal transition is required for acquisition of anoikis resistance and metastatic potential in adenoid cystic carcinoma. *PLoS One.* 2012;7(12):e51549.
238. Nazri HM, Imran M, Fischer R, Heilig R, Manek S, Dragovic RA, Kessler BM, Zondervan KT, Tapmeier TT, Becker CM. Characterization of exosomes in peritoneal fluid of endometriosis patients. *Fertil Steril.* 2020 Feb;113(2):364-373.e2.
239. Edgar JR. Q&A: What are exosomes, exactly? *BMC Biol.* 2016 Jun 13;14:46.
240. Kaya C, Alay I, Guraslan H, Gedikbasi A, Ekin M, Ertaş Kaya S, Oral E, Yasar L. The Role of Serum Caspase 3 Levels in Prediction of Endometriosis Severity. *Gynecol Obstet Invest.* 2018;83(6):576-585.
241. Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod.* 1998 Jun;13(6):1686-90.
242. Bourlev V, Volkov N, Pavlovitch S, Lets N, Larsson A, Olovsson M. The relationship between microvessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions. *Reproduction.* 2006 Sep;132(3):501-9.
243. Hey-Cunningham AJ, Ng FW, Busard MPH, et al. Uterine lymphatic and blood microvessels in women with endometriosis through the menstrual cycle. *J Endo.* 2010;2(4):197-204.
244. Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS. High density of small nerve fibres in the functional layer of the endometrium in women with endometriosis. *Hum Reprod.* 2006 Mar;21(3):782-7.
245. Al-Jefout M, Dezarnaulds G, Cooper M, Tokushige N, Luscombe GM, Markham R, Fraser IS. Diagnosis of endometriosis by detection of nerve fibres in an endometrial biopsy: a double blind study. *Hum Reprod.* 2009 Dec;24(12):3019-24.
246. Hey-Cunningham AJ, Markham R, Fraser IS, et al. Dysregulation of vascular endothelial growth factors and their neuropilin receptors in the eutopic endometrium of women with endometriosis. *Reprod Sci.* 2013;20(11):1382–1389.

247. Yerlikaya G, Balendran S, Pröstling K, Reischer T, Birner P, Wenzl R, Kuessel L, Streubel B, Husslein H. Comprehensive study of angiogenic factors in women with endometriosis compared to women without endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016 Sep;204:88-98
248. Mathias SD, Kuppermann M, Liberman RF, Lipschutz RC, Steege JF. Chronic pelvic pain: prevalence, health-related quality of life, and economic correlates. *Obstet Gynecol.* 1996 Mar;87(3):321-7.
249. Fauconnier A, Chapron C. Endometriosis and pelvic pain: epidemiological evidence of the relationship and implications. *Hum Reprod Update.* 2005 Nov-Dec;11(6):595-606.
250. Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev.* 2010 Mar;234(1):45-54.
251. Berbic M, Hey-Cunningham AJ, Ng C, Tokushige N, Ganewatta S, Markham R, Russell P, Fraser IS. The role of Foxp3+ regulatory T-cells in endometriosis: a potential controlling mechanism for a complex, chronic immunological condition. *Hum Reprod.* 2010 Apr;25(4):900-7.
252. Nisenblat V, Bossuyt PM, Shaikh R, Farquhar C, Jordan V, Scheffers CS, Mol BW, Johnson N, Hull ML. Blood biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016 May 1;2016(5):CD012179.
253. Goehring C, Perrier A, Morabia A. Spectrum bias: a quantitative and graphical analysis of the variability of medical diagnostic test performance. *Stat Med.* 2004 Jan 15;23(1):125-35.

## 8. POPIS KRATICA

<b>Kratika:</b>	<b>Značenje:</b>
<b>APC</b>	antigen prezentirajuće stanice
<b>AAGL</b>	Američka udruga ginekoloških laparoskopista (engl. <i>American Association of Gynecological Laparoscopists</i> )
<b>AMD</b>	starosna degenracija makule
<b>ANXA2</b>	aneksin A2
<b>AUC</b>	površina ispod ROC-krivulje (AUC, engl. <i>area under curve</i> )
<b>ASRM</b>	Američko društvo za reprodukciju medicinu (engl. <i>American Society for Reproductive Medicine</i> )
<b>BMI</b>	indeks tjelesne mase (BMI, engl. <i>body mass index</i> )
<b>CA-125</b>	karcinomski antigen 125
<b>CA19-9</b>	karcinomski antigen 19-9
<b>CI</b>	interval pouzdanosti (CI, engl. <i>confidence interval</i> )
<b>COX-2</b>	ciklooksigenaza 2 (COX-2, engl. <i>cyclooxygenase 2</i> )
<b>CRP</b>	C-reaktivni protein
<b>DIE</b>	duboko infiltrirajuća endometrioza
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kiselina (DNA, engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>ECM</b>	izvanstanični matriks (ECM, engl. <i>extracellular matrix</i> )
<b>EFI</b>	indeks plodnosti u endometriozu (engl. <i>endometriosis fertility index</i> )
<b>ELISA</b>	imunoenzimski test (ELISA, engl. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> )
<b>ESC</b>	endometrijske stromalne stanice
<b>GnRH</b>	gonadotropin otpuštajući hormon
<b>HGF</b>	čimbenik rasta hepatocita
<b>IL</b>	interleukin (IL, engl. interleukin)
<b>IL-1</b>	interleukin-1
<b>IL-6</b>	interleukin-6
<b>IL-8</b>	interleukin-8
<b>LH</b>	luteinizirajući hormon

<b>LNG-IUS</b>	intrauterini sustav s levonorgestrelom
<b>MAPK</b>	protein-kinaze aktivirane mitogenima (MAPK, engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
<b>miRNA</b>	mala (mikro) ribonukleinska kiselina (engl. <i>micro Ribonucleid Acid</i> )
<b>MMP</b>	metaloproteinaza matriksa (MMP, engl. <i>matrix metalloproteinase</i> )
<b>MRI</b>	nuklearne magnetske rezonancije
<b>NK cells</b>	prirodne stanice ubojice (engl. <i>Natural killer cells</i> )
<b>NRP1</b>	neuropilin 1
<b>NSAID</b>	protuupalni nesteroidni lijekovi (engl. <i>non-steroidal anti-inflammatory drugs</i> )
<b>PAI-1</b>	inhibitor plazminogen-aktivatora
<b>PIGF</b>	čimbenik rasta placente (posteljice)
<b>PDGF</b>	trombocitni derivirani faktor rasta
<b>SEMA3A</b>	semaforin 3A protein
<b>SPRM</b>	selektivni modulatori progesteronskih receptora
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	transformirajući faktor rasta $\beta$ (TGF- $\beta$ , engl. <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> )
<b>TIMP</b>	tkivni inhibitor metaloproteinaze matriksa (TIMP, engl. <i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i> )
<b>Th</b>	T-pomagačke stanice (Th, engl. <i>T-helper cells</i> )
<b>TNF</b>	čimbenika tumorske nekroze
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	čimbenika tumorske nekroze $\alpha$ (TNF- $\alpha$ , engl. <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
<b>VEGF</b>	vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF, engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> )
<b>VEGFR-2</b>	receptor vaskularnog endotelnog faktora rasta 2 (VEGFR-2, engl. <i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i> )

## 9. ŽIVOTOPIS

Monika Barberić rođena je 1977. u Kutini. Osnovnu i srednju školu pohađala u Ivanić Gradu. 1996. upisala Farmaceutsko-biokemijski fakultet smjer medicinska biokemija. Diplomirala 2002. i stekla zvanje diplomirani inženjer medicinske biokemije. Za vrijeme fakulteta boravila mjesec dana u Ljubljani u sklopu studentske razmjene. Također za vrijeme fakulteta provela mjesec dana u SAD-u u Iowi na Graceland Collegu.

Od 2004. do 2006. godine kao vanjski suradnik, sudjeluje u nastavi u Medicinskoj školi Rijeka. Specijalistički staž je odradila u Kliničkoj bolnici Sveti Duh i Kliničkom bolničkom centru Zagreb i 2013. položila je specijalistički ispit iz medicinske biokemije i laboratorijske medicine. Poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti upisala je 2013. godine.

Za vrijeme dugogodišnjeg radnog staža sve vrijeme je u medicini i zdravstvu. Od 2002. do 2006. radila u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Rijeka.

Od 2006 do 2011 radi kao stručni suradnik u sklopu medicinske firme koja posluje na području Hrvatske, Slovenije, Srbije te Bosne i Hercegovine. Od 2011. do 2016. je u Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Sveti Duh u sklopu jedinice za imunologiju. Od 2016 do danas radi u Domu zdravlja Zagrebačke županije kao voditeljica medicinsko biokemijskog laboratorija Ivanić Grad te kao koordinator za sve medicinsko biokemijske laboratorije u sklopu Doma zdravlja Zagrebačke županije.

Sudjelovala je u nastavi stranih studenata medicine Medicinskog fakulteta u Zagrebu u sklopu seminara i vježbi iz alergije i astme.

Član je Hrvatske komore medicinskih biokemičara (HKMB). Sudjelovala je kao pozvani predavač na tečaju trajne edukacije u organizaciji Hrvatske komore medicinskih biokemičara.

Popis znanstvenih i stručnih članaka i aktivnosti:

Web of Science Core Collection:

1. Barberic M, Pavicic Baldani D, Rogic D, Kralik S. Serum concentrations of neuropilin-1 in women with endometriosis. *Scand J Clin Lab Invest.* 2020 Jul;80(4):271-276. doi: 10.1080/00365513.2020.1728785. Epub 2020 Feb 18. PMID: 32069143.

2. Šarić B, Brzović Šarić V, Barberić M, Predović J, Rumenjak V, Cerovski B. Oxidative stress impact on growth hormone secretion in the eye. *Croat Med J.* 2015 Aug;56(4):326-33. doi: 10.3325/cmj.2015.56.326. PMID: 26321025; PMCID: PMC4576746.
3. Brzović-Šarić V, Landeka I, Šarić B, Barberić M, Andrijašević L, Cerovski B, Oršolić N, Đikić D. Levels of selected oxidative stress markers in the vitreous and serum of diabetic retinopathy patients. *Mol Vis.* 2015 Jun 12;21:649-64. PMID: 26120270; PMCID: PMC4462954.

Scopus:

1. Stipić Marković, A., Ivković-Jureković, I., Dodig, S., Batišta, I., Barberić, Monika, Topalušić, Iva, Bukovec Megla, Ž. & Žižić, V. (2015) Hrvatske smjernice za in vitro dijagnostiku preosjetljivosti posredovane IgE protutijelima. *Acta medica Croatica*, 69, 75-96.

Predavanja na domaćim skupovima i simpozijima:

1. Simpozij Alergijske reakcije na lijekove s tečajem zbrinjavanja anafilaksije (Zagreb, 24. listopada, 2015.); predavanje: In vitro dijagnostika i medikamentozne alergije; Monika Barberić, Irena Batišta.
2. 2.Kongres Hrvatskog društva za alergologiju i kliničku imunologiju, HLZ, s međunarodnim sudjelovanjem (21-23. svibnja 2015.); predavanje: Indikacije za komponentnu alergološku dijagnostiku / Indication for component resolved diagnosis; Monika Barberić.
3. Tečaj trajne edukacije Hrvatske komore medicinskih biokemičara Laboratorij i klinika – sučelje o kojem se premalo razgovara (Zagreb, 7. studenoga 2009.); predavanje: Biokemičar u kirurškoj sali , Monika Barberić.
4. 5. Hrvatski kongres medicinskih biokemičara (Poreč, listopad 2006):  
Predavanje: Novi analitički sustavi u koagulaciji, Monika Barberić  
  
Poster: Tromboelastografija i globalni koagulacijski testovi; Monika Barberić, N. Vukelić Damijani, S. Balen