

# ULOGA SEKRETORNIH PROTEINA U RAZVOJU IZVANMATERIČNE MIGRACIJE ENDOMETRIJA

---

Višnić, Alenka

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:012534>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

ALENKA VIŠNIĆ

**ULOGA SEKRETORNIH PROTEINA U  
RAZVOJU IZVANMATERIČNE  
MIGRACIJE ENDOMETRIJA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

ALENKA VIŠNIĆ

**SECRETORY PROTEINS OF  
EXTRAUTERINE MIGRATION OF  
ENDOMETRIUM**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2022.

Ovaj doktorski rad izrađen je u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, Kliničkom bolničkom centru Rijeka, Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci pod vodstvom prof.dr.sc. Dubravka Barišić, dr.med. spec. ginekologije i porodništva i prof.dr.sc Nede Smiljan Severinski, dr.med. spec.ginekologije i porodništva, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

**Mentor: prof. dr. sc. Dubravko Barišić, dr.med.**

Prof.dr.sc. Dubravko Barišić, dr. med. specijalist je ginekologije i porodništva, subspecijalist ginekološke onkologije. Obrazovanje doktora medicine stekao je na studiju medicine gdje je diplomirao 1982. g. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Specijalistički staž započinje u Kliničkom bolničkom centru Zagreb na Klinici za ženske bolesti i porode te 1991.g nakon položenog specijalističkog ispita postaje specijalist ginekologije i porodništva. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2012.g stječe status profesora.

Prof.dr.sc. Dubravko Barišić djelatnik je Klinike za ženske bolesti i porode KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Obnašao je niz zapaženih profesionalnih funkcija kao što su voditelj Odjela za endoskopsku ginekološku kirurgiju Zavoda za ginekološku kirurgiju i urologiju, Kliničkog bolničkog centra Zagreb, predsjednik Hrvatskog društva za ginekologiju i opstetriciju i niz drugih profesionalnih funkcija.

U svojstvu profesora sudjeluje u nastavnoj, znanstvenoj i stručnoj aktivnosti na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu / KBC Zagreb. Aktivni je sudionik mnogih stručnih tečajeva, simpozija i kongresa. Autor je mnogobrojnih znanstvenih članaka i poglavlja u knjigama.

**Komentor: prof. dr. sc. Neda Smiljan Severinski, dr.med.**

Prof dr.sc. Neda Smiljan Severinski, dr. med. specijalista je ginekologije i porodništva. Obrazovanje doktora medicine stekla je na studiju medicine gdje je diplomirala 1990. g na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Na istom fakultetu 1991. g upisuje poslijediplomski studij iz Opće kliničke patofiziologije koji završava 1994. g te stječe zvanje magistra znanosti. Specijalistički staž započinje 1994. g u Kliničkom bolničkom centru Rijeka na Klinici za ginekologiju i porodništvo te 1999. g nakon položenog specijalističkog ispita postaje specijalista ginekologije i porodništva. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci 2001.g stječe zvanje doktora znanosti, a 2021. g i status redovnog profesora.

Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci i Kliničkom bolničkom centru Rijeka 2001. g zasniva radni odnos na poslovima doktora medicine, a u svojstvu specijaliste ginekologije i porodništva 1999. g započinje raditi u Klinici za ginekologiju i porodništvo. Subspecijalistički ispit iz humane reprodukcije, ginekološke endokrinologije i menopauze polaže 2010. g.

Prof.dr.sc. Neda Smiljan Severinski djelatnik je Klinike za ginekologiju i porodništvo i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci od 1994. g, a sve do danas obnaša niz zapaženih profesionalnih funkcija. Pročelnica je Zavoda za humanu reprodukciju KBC Rijeka i Katedre za ginekologiju i porodništvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, predsjednica Etičkog povjerenstva KBC-a Rijeka i član Etičkog povjerenstva za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Rijeci.

U svojstvu profesora sudjeluje u nastavnoj, znanstvenoj i stručnoj aktivnosti na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci/KBC Rijeka na integralnom dodiplomskom i poslijediplomskom studiju doktora medicine. Aktivni je sudionik mnogih stručnih tečajeva, simpozija i kongresa.

Autor je mnogobrojnih znanstvenih članaka i poglavlja u knjigama te sudjeluje na više Sveučilišnih projekata biomedicinskih i biotehničkih znanosti.

## Zahvala

Upisom u doktorski studij nisam bila potpuno svjesna na koliko dalek i težak put krećem. No, taj isti put bio je drugačiji po mnogočemu od svih onih do sada. Moja izrada doktorskog rada proživjela je niz uspona i padova, ali na koncu svega mogu sa sigurnošću reći da je ovo jedan od težih, ali i radosnijih puteva koje sam prešla. Unatoč preprekama na koje sam putom nailazila cijeli taj proces promatram kao jednu dobru crticu mogega življenja koja me je naučila mnogim stvarima. Svaki dobar rezultat istraživanja budio je radost i euforiju, dok su oni rezultati koji nisu odgovarali zadanim postavkama vodili me u manje dobro raspoloženje i strah od neuspjeha. Sreća, tuga, ravnodušnost i euforija emocije su koje su se međusobno ispreplitale i jedna drugu pokušale nadjačati. Na koncu je iznjedrio ovaj doktorski rad na koji sam iznimno ponosna, a vjerujem i svi koji su na bilo koji način sudjelovali u njegovoj izradi.

Željela bih se posebno zahvaliti mojim mentorima prof.dr.sc Dubravku Barišić i prof.dr.sc Nedi Smiljan Severinski koji su uložili svoje veliko znanje i neupitnu stručnost, te mi pružili nesebičnu pomoć za vrijeme izrade doktorske disertacije usmjeravajući me i stvarajući poticajnu atmosferu. Posebnu zahvalu želim uputiti izv.prof.dr.sc Petri Korać koja je bila moj korektivni faktor i vrlo stručno i brižno me vodila kroz ostvarivanje ovog cilja. Zahvaljujem se prof.dr.sc. Robertu Domitroviću, prof.dr.sc Gordani Čanadi Jurešić i drugim suradnicima na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci bez čijeg znanja, volje i suradnje nikada ovaj radi ne bi ugledao svijetlost dana. Jednako veliku zahvalu želim uputiti svim djelatnicima Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Kliničkog bolničkog centra Rijeka koji su učestvovali u izradi ovog rada i omogućili mi prikupljanje i obradu uzoraka potrebnih za izradu doktorske disertacije.

Mnogi su ljudi u mojem privatnom okruženju pružali mi nevjerojatno veliku podršku i strpljenje tijekom izrade doktorske disertacije i hvala im velika na tome. No posebnu zahvalu upućujem majci Mirjani i prerano preminulom suprugu Davoru i znam da je moj uspjeh ujedno i vaš.

Alenka Višnić

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

## **ULOGA SEKRETORNIH PROTEINA U RAZVOJU IZVANMATERIČNE MIGRACIJE ENDOMETRIJA**

ALENKA VIŠNIĆ

Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, KBC Zagreb, KBC Rijeka

Izvanmaterična migracija endometrija je kronična upalna bolest karakterizirana pojavom i rastom endometrija izvan maternice. Etiopatogeneza nije u potpunosti razjašnjena. Patološki procesi koji se pri tome događaju su invazija, adhezija, proliferacija, angiogeneza i poremećena imunost. Moguće je da procesi invazije i proliferacije uzrokuju povećanu produkciju određenih proteina, a izlučuju se urinom. Ovim istraživanjem željelo se proteomskim tehnikama (metoda Bradford, jednodimenzionalna elektroforeza, dvodimenzionalna elektroforeza, ELISA, *western blot* i masena spektrometrija) odrediti proteine u urinu koji se izlučuju u povećanoj koncentraciji kod ektrauterine migracije endometrija. Utvrđena je povišena koncentracija proteina koji sudjeluju u apoptozi, imunosnim, vaskularnim, antioksidativnim, proliferacijskim i adhezijskim reakcijama kao i korelacija koncentracije proteina CYFRA 21-1 i stupnja ektrauterine migracije endometrija. Protein CYFRA 21-1 i drugi proteini u urinu pojačano se izlučuju u ektrauterinoj migraciji endometrija.

(Stranica 142, slika 14, tablica 14, literarnih navoda 439, jezik izvornika Hrvatski)

Ključne riječi: ektrauterina migracija endometrija, citokeratin 19-9, CYFRA 21-1, proteini, urin

Mentori : Prof.dr.sc. Dubravko Barišić

Prof.dr.sc. Neda Smiljan Severinski

Ocjenjivači : Prof.dr.sc. Vesna Benković

Izv.prof.dr.sc. Petra Korać

Prof.dr.sc. Dinka Pavičić Baldani



University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Doctoral thesis

## **THE ROLE OF SECRETORY PROTEINS OF EXTRAUTERINE MIGRATION OF ENDOMETRIUM**

ALENKA VIŠNIĆ

Faculty of Science-Department of Biology University of Zagreb, Faculty of medicine  
University of Zagreb, Faculty of medicine University of Rijeka, Clinical Hospital centre  
Zagreb, Clinical Hospital centre Rijeka

Extrauterine migration of endometrium is a chronic gynecological inflammatory disease characterized with appearing and flourishing of endometrium outside the uterine cavity. Etiopathogenesis is not clearly understood. Ongoing pathological processes are invasion, adhesion, proliferation, angiogenesis and immune disorders. There is a possibility for increased production of proteins caused by proliferation and invasion. It's excreted in urine. The purpose of the study is to determine increased levels of proteins in urine during extrauterine migration of endometrium using proteomic techniques (Bradford method, one-dimensional electrophoresis, two-dimensional electrophoresis, ELISA, *western blot* and mass spectrometry). Increased production of involved in apoptosis, immune, vascular, antioxidant, proliferative and adhesive reactions protein as well as the correlation between CYFRA 21-1 protein increased the concentration and degree of extrauterine migration of endometrium. Protein CYFRA 21-1 and other proteins in urine are enhanced production in the state of extrauterine migration of endometrium.

(Page 142, figures 14, tables 14, references 439, original in Croatian)

Keywords: extrauterine migration of endometrium, cytokeratin 19-9, cyphra 21-1, proteins, urine

Supervisor: Prof. Dubravko Barišić, PhD

Prof. Neda Smiljan Severinski, PhD

Reviewers: Prof. Vesna Benković, PhD

Assoc. Prof. Petra Korać, PhD

Prof. Dinka Pavičić Baldani, PhD

## SADRŽAJ:

1. Uvod.....	1
2. Literaturni pregled.....	5
2.1. Ekstrauterina migracija endometrija.....	5
2.2. Teorije nastanka ekstrauterine migracije endometrija .....	6
2.3. Hormonski status kod ekstrauterine migracije endometrija.....	8
2.4. Imunološki aspekt ekstrauterine migracije endometrija.....	9
2.5. Neurološke promjene kod ekstrauterine migracije endometrija.....	9
2.6. Maligni potencijal ekstrauterine migracije endometrija.....	10
2.7. Klasifikacija ekstrauterine migracije endometrija.....	12
2.8. Potencijalni biomarkeri ekstrauterine migracije endometrija.....	13
2.9. Protein CYFRA 21-1.....	13
2.10. Antigen CA 125.....	15
2.11. Proteini u urinu.....	16
3. Uzorci i metode.....	34
3.1. Uzorci.....	34
3.1.1. Urin.....	34
3.1.2. Krv.....	35
3.1.3. Predanalitička priprema urina i krvi.....	35
3.2. Metode.....	36
3.2.1. Određivanje koncentracije proteina u urinu metodom Bradford.....	36
3.2.2. Izoelektrično fokusiranje proteina u urinu.....	37
3.2.3. Zonska elektroforeza proteina u urinu.....	38
3.2.4. Coomassie Brilliant blue G-250 metododa bojenja gelova.....	39
3.2.5. Jednodimenzionalna gel - elektroforeza proteina u urinu.....	40
3.2.6. Masena spektrometrija proteina u urinu.....	40
3.2.7. Sendvič ELISA proteina u urinu.....	41
3.2.8. Metoda <i>western blot</i> proteina u urinu.....	42
3.2.9. Elektrokemiluminiscentna metoda.....	44
3.2.10. Statističke metode.....	45
4. Rezultati.....	46
4.1. Kvalitativna analiza proteina u proteinskim talozima urina.....	46
4.2. Koncentracija ukupnih proteina u urinu – određena metodom Bradford.....	46

4.3. Koncentracija proteina CYFRA 21-1 u urinu – određena metodom ELISA.....	48
4.4. Koncentracija proteina CYFRA 21-1 u urinu - određena metodom <i>western blot</i> .....	50
4.5. Koncentracija proteina CYFRA 21-1 u serumu - određena elektrokemiluminiscentnom metodom.....	52
4.6. Koncentracija antigena CA 125 u serumu - određena elektrokemiluminiscentnom metodom.....	54
4.7. Usporedba koncentracije proteina CYFRA 21-1 u urinu – određene metodama ELISA i <i>western blot</i> .....	55
4.8. Usporedba koncentracije proteina CYFRA 21-1 u urinu i CA 125 u serumu - određene metodom ELISA i elektrokemiluminiscentnom metodom.....	57
4.9. Proteini u urinu – određeni masenom spektrometrijom.....	59
5. Rasprava.....	68
5.1. Protein CYFRA 21-1.....	68
5.2. Antigen CA 125.....	71
5.3. Imunosni faktori i upalni citokini.....	73
5.4. Proteini s proteolitičkom aktivnosti i inhibitori proteaza.....	77
5.5. Proteini koji sudjeluju u staničnoj migraciji i proliferaciji.....	80
5.6. Proteini koji sudjeluju u stvaranju adhezija.....	82
5.7. Proteini koji sudjeluju u apoptozi.....	85
5.8. Proteini s učinkom na krvožilni sustav.....	87
5.9. Proteini s antioksidacijskom aktivnosti u oksidacijskom stresu.....	89
5.10. Ostali proteini koji imaju potencijalnu ulogu u etiopatogenezi EME.....	91
6. Zaključci.....	94
7. Prilog – popis proteina.....	95
8. Citirana literatura.....	99
9. Životopis.....	142

## **1. UVOD**

Izvanmaterična migracija endometrija (endometrioza, EME, od eng. *extrauterine migration of endometrium*) je bolest u kojoj se endometrij koji prekriva šupljinu maternice nalazi na organima izvan maternice. Lokalizacije na kojima nalazimo žarišta EME su različite i mogu se prema učestalosti pojaviti na sljedećim mjestima: jajnik (Audebert i sur., 2018.), uterini ligamenti, zdjelični peritoneum, rektovaginalni prostor (Martínez i sur., 2017.; Gustofson i sur., 2006.; Jenkins, 1986.). Rjeđe lokalizacije EME su: rodnicica, mokraćni mjehur, crvuljak, potrbušnica, pupak i stidnica. EME nalazimo i na udaljenim mjestima kao što su pluća, želudac, tanko crijevo, skeletna muskulatura i gušterača (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2012.; Sonavane i sur., 2011.; Victory i sur., 2007.; Jaime i sur., 2013.; Lee i sur., 2015.). S obzirom na sve navedene lokalizacije nastanka EME jasno je da više faktora sudjeluje u etiologiji, međutim niti jedan od do sada poznatih faktora u cijelosti ne objašnjava njen nastanak. Veliki broj žena koje boluju od EME imaju prve simptome već u vrijeme adolescencije. Postavljanje dijagnoze i liječenje takvih pacijentica je nerijetko odgođeno i zakašnjelo. Od pojave simptoma pa do postavljanja dijagnoze prođe u prosjeku oko 7 - 8 godina (Engemise i sur., 2010.).

Jedan od razloga je nemogućnost neinvazivnog načina dijagnostike (Dovey i sur., 2010.) ili nepostojanje specifičnih simptoma EME (Berlanda i sur., 2009.). Postavljanje dijagnoze EME iziskuje operacijski zahvat, laparoskopiju i biopsiju, vizualizaciju zdjelišta te patohistološku dijagnozu (Kennedy i sur., 2005.). Operativni zahvat laparaskopija je trenutno standard u dijagnostici EME. Zato su u fazi istraživanja biomarkera koji se izlučuju u povećanoj koncentraciji u urinu kod EME i mogli bi predstavljati napredak u dijagnostici (Zhao i sur., 2020.).

Protein CYFRA 21-1 kao i drugi proteini koji se izlučuju u urinu do sada nisu opsežno istraživani u patogenezi EME. Postoji nekoliko znanstvenih radova u kojima pojedini autori potvrđuju ulogu CYFRE 21-1 u etiopatogenezi EME (Tokushige i sur., 2011.), dok drugi autori ne nalaze takvu poveznicu (Tempfer i sur., 1988.; Liu i sur., 2015.; Nisenblat i sur., 2016.). U serumu žena oboljelih od EME često nalazimo povišene razine CA 125 (Harada i sur., 2002.; Fiala i sur., 2018.; Kurdoglu i sur., 2009.).

EME je u većem broju slučajeva idiopatska bolest, a na njen nastanak mogu utjecati različiti faktori: genetsko naslijeđe (Wenzl i sur., 2003.; Overton i sur., 2007.), hormonski dizbalans



(Metzger i sur., 1991.; Bulun i sur., 2010.), promjene imunološkog sustava (Ahn i sur., 2015.; Vinatier i sur., 1996.), jatrogene implantancije (Vercellini i sur., 2014.; Gidwaney i sur., 2012.), ostaci embrijskog tkiva (Burney i sur., 2012.; Longo 1979.), krvožilni i limfogeni put širenja bolesti (Javert i sur., 1952.), metaplazija celomskog epitela (Gruenwald, 1942.) i peritonejski defekt (Signorile i sur., 2009.). Međutim, niti jedan od navedenih faktora ne mogu u potpunosti objasniti zašto se EME najčešće javlja na jajniku (Overton i sur., 2007.), na koji način nastaje kod žena koje nemaju maternicu (Mowers i sur., 2016.) i zašto muškarci koji su duže vrijeme liječeni estrogenskim preparatima mogu razviti EME (Rei i sur., 2018.). Uzevši u obzir takve i slične slučajeve teorija metaplazije najcjelovitije objašnjava nastanak bolesti, a podrazumijeva da celomski epitel ima sposobnost metaplazije (Suginami i sur., 1991.).

Sve češće se bilježi porast incidencije EME kod žena koje boluju i od nekih autoimunih bolesti. Posebno se ističe autoimuna bolest štitnjače udružena s EME (Porpora i sur., 2020.). Pojam EME se odnosi na prisustvo endometrijskog tkiva izvan maternice uključujući pri tome endometriju i miometriju (Overton i sur., 2007., Giudice, 2010.). Endometrijsko tkivo koje se nalazi na mjestima izvan maternice dovodi do raznih patoloških procesa koji za posljedicu imaju kroničnu upalnu reakciju te nastaje kronična upalna bolest koja ima tendenciju metastaziranja, ali u velikoj većini slučajeva bez malignih komponenti bolesti (Yang i sur., 2021.). Nastanak EME nije potpuno razjašnjen i tumači se različitim teorijama, a to su: teorije retrogradne menstruacije (Sampson i sur., 1927.), celomske metaplazije (Matsuura i sur., 1999.), embrionalnog Müllerovog kanala (Marsh i sur., 2005.), matičnih stanica (Burney i sur., 2012.) i benignih metastaza (Jubanyik i sur., 1997.).

Razvojem endometrijskog tkiva na ektopičnim lokalizacijama započinju patološki procesi, a to su invazija u okolno tkivo (Liu i sur., 2009.), adhezija, proliferacija endometrija, angiogeneza i promijenjeni imunološki sustav (Rana i sur., 1996.; Sundqvist i sur., 2012.). Kao što se u maternici može razviti hiperplazija endometrija identičan proces mogu stvoriti i endometriotična žarišta na drugim lokalizacijama. Ektopične endometrijske stanice kod EME mogu pokazivati atipičnu hiperplaziju stanica i tada imaju obilježja prekanceroze, a nazivaju se atipična EME (Clement, 2007.). Postoje implantati EME koji su prediktori za duboku infiltrirajuću EME (Anglesio i sur., 2017.). Uzevši u obzir sve teorije nastanka EME metaplastična teorija je potkrepljena činjenicom da se u germinativni epitel ubraja i epitel mezotela, a jajnik je prekriven upravo s njime. Promatrajući aktivnost mezotela najaktivniji je u smislu proliferacije upravo germinativni epitel. Epitel jajnika kod svake ovulacije proliferira i pokazuje pojačanu epitelnu aktivnost te na tom mjestu najčešće nastaje EME. Na drugim

mjestima gdje također nastaje EME epitel nema takve karakteristike te su lokalizacije EME rjeđe. Kada dođe do metaplazije celomskog epitela uz nastanak EME mogu nastati i cistične tvorbe koje na svojoj površini imaju epitel nalik na epitel koji je porijeklom od Müllerovih kanala, kao što je na primjer epitel koji pokriva unutrašnju stjenku jajovoda. Kod menstruacije postoji ljuštenje endometrija, međutim epitel jajovoda tijekom cijelog menstrualnog ciklusa nema tu značajku te je nemoguća njegova implantacija na druga mjesta. S obzirom da opisane cistične promjene imaju na svojoj površini upravo epitel koji odgovara epitelu porijeklom iz Müllerovih kanala najvjerojatnija je metaplastična teorija nastanka EME (Signorile i sur., 2009.; Matsuura i sur., 1999.).

Osim atipične EME u nekim slučajevima su nađene maligne komponente bolesti. Iako se neznačajna učestalost nastanka maligne EME smatra se da se javlja u oko 0,3-0,8% slučajeva, a u 75% od njih to je na jajniku, potom po učestalosti slijede rektovaginalni prostor i debelo crijevo. Kod maligno promijenjene EME histološki najčešće nalazimo endometrioidni karcinom i to u gotovo 70% slučajeva, potom po učestalosti slijedi klarocelularni karcinom koji zauzima 14% malignih EME. No, iako iznimno rijetko mogu se naći i karcinom pločastih stanica, mucinozni karcinom, ali i maligni Müllerov tumor miješanog tipa kao i stromalni sarkom. Spoznaja da kod žena s EME postoji opravdana šansa od nastanka malignih tumora potrebno je dugoročno nadziranje tih žena (Saavalainen i sur., 2018.; Grandi i sur., 2015.).

EME je bolest spolnog sustava. Spolni sustav se započinje razvijati iz iste embrijske osnove kao mokraćni sustav, a potom se od Wolfvog kanala odvaja ureteralni pupoljak koji će tvoriti kanalni sustav bubrega. U kasnijem tijeku razvoja u ženskog spola dolazi do regresije Wolfvog kanala i razvoja Müllerovih cijevi (Sadler i sur., 2012.). EME se javlja i na mokraćnom mjehuru te može maligno alterirati. Kod malignih bolesti urinarnog trakta nalazimo povišene vrijednosti proteina CYFRA 21-1 (Maggiore i sur., 2015.).

Citokeratini se mogu grupirati u tip I citokeratina 9-20 (molekularne težine od 40-56 kDa) i tip II citokeratina 1-8 (molekularne težine od 53-67 kDa). Citokeratin-19 je stanični strukturni protein i pripadnik tipa I keratina proteinskog gena i od svih citokeratina ima najnižu molekularnu masu od 40 kDa i sastoji se od 400 aminokiselina (Pernick i sur., 2013.; Barak i sur., 2004.). Citokeratine izlučuju sve stanice epitelnog porijekla. Razina citokeratina je promijenjiva tijekom diferencijacije epitelnih stanica i jedan je od važnijih faktora koji imaju ulogu u migraciji tumorskih stanica, regulaciji staničnog ciklusa, kao i programiranoj staničnoj smrti (Mujiyambere i sur., 2018.). Razina proteina CYFRA 21-1 kod karcinoma mokraćnog

mjehura je iznad graničnih vrijednosti (Andreadis i sur., 2005.; Washino i sur., 2011.). Podtipovi estrogenskih receptora, (ERalfa i ERbeta) nalaze se u urotelijalnim stanicama i u njima posreduju proliferaciju stanica induciranu estrogenom, a postoji mogućnost i njihovog uključivanja u regulaciju staničnog ciklusa. Postoje istraživanja u kojima je pokazana viša razina ERalfa na temelju usporedbe biopsije mokraćnog mjehura s prijelaznim karcinomom u odnosu na uzorak iz mokraćnog mjehura koji nije promijenjen tumorom (Goto i sur., 2021.; Miyamoto i sur., 2012.).

Hipoteza ovog istraživanja je da u patogenezi ekstrauterine migracije endometrija sudjeluju fragment citokeratina 19-9 (keratin, type I cytoskeletal 19, CYFRA 21-1) i drugi proteini čije vrijednosti nalazimo povišene u urinu. Ciljevi su:

1. Identificirati proteine koje nalazimo u povećanoj koncentraciji u urinu kod EME.
2. Odrediti razine fragmenta citokeratina 19-9 i drugih proteina koji su u urinu u povećanoj koncentraciji kod EME.
3. Odrediti potencijalnu povezanost razine fragmenta citokeratina 19-9 i drugih proteina ovisno o stupnju invazije i proliferacije.



## **1. LITERATURNI PREGLED**

### **2.1. Ekstrauterina migracija endometrija**

Endometrij je sluznica koja prekriva šupljinu maternice, ali ako se ta sluznica nalazi na drugim organima izvan maternice tada takvu bolest nazivamo EME. EME je kronična bolest upalnog tijeka koja najčešće pogađa žene reproduktivne dobi i ovisna je o hormonalnoj aktivnosti posebno estrogena. Jednom nastala bolest napreduje i može imati vrlo opsežnu kliničku sliku. EME kod oboljele žene umanjuje njeno psihičko, fizičko i socijalno blagostanje (Dovey i sur., 2010.).

Kod nekih žena EME se pojavljuje bez evidentnih faktora koji bi mogli biti uzrok bolesti, ali poznato je da postoje rizici koji mogu doprinijeti nastanku EME kao što su prva menstruacija u ranoj životnoj dobi (manja od 10 godina starosti), kraći menstrualni ciklusi (manje od 24 dana) i pojačano uterino krvarenje (Matorras i sur., 2010.; Burney i sur., 2012.; Treloar i sur., 2010.; Nnoaham i sur., 2012.), kasna dob nastupa menopauze, nerotkinje (Ballard i sur., 2008.; Sinaii i sur., 2008.) ili one s manjim brojem trudnoća (Shafir i sur., 2018., Giudice, 2010.) imaju povećan rizik nastanka EME. Smatra se da prehrana bogata transmastima (Missmer i sur., 2010.), konzumiranje alkohola i pušenje cigareta pogoduje nastanku EME (Missmer i sur., 2004.). Povećan rizik je također zabilježen kod žena koje u svojoj povijesti imaju rano seksualno i fizičko zlostavljanje (Harris i sur., 2018). Suprotno tome veći broj trudnoća, tjelesna aktivnost, umjerena prehrana i dojenje te niži indeks tjelesne mase (BMI), vitkija građa tijekom cijelog djetinjstva i adolescencije i u vrijeme kada je postavljena dijagnoza protektivni su faktori u nastanku EME (Hediger i sur., 2005.). Starija dob je za sada jedini sociodemografski faktor koji ima dosljedan učinak na nastanak EME (Eskenazi i sur., 1997.; Chatman i sur., 1982.). Trudnoća kod pacijentica s minimalno izraženom EME maskira kliničku sliku i EME se često dijagnosticira nakon porođaja (Missmer i sur., 2004.; Viganò i sur., 2004.).

EME se dijagnosticira u oko 10% žena generativne dobi (Shafir i sur., 2018.), međutim kod onih kod kojih je učinjena dijagnostička laparoskopija zbog kronične zdjelične boli u manje od 25% slučajeva je dijagnosticirana EME kao uzrok boli (Mowers i sur., 2016.). Najčešći simptomi su dismenoreja, perzistentna ili ciklička bol u zdjelištu, dispareunija, neregularna menstrualna krvarenja i neplodnost. EME je kronična, iscrpljujuća bolest koja umanjuje kvalitetu života oboljele žene (Parasar i sur., 2017.). Može imati različite stadije od

mikroskopskih endometriotičnih implantata na površini zdjeličnih organa ili peritoneuma do cističnih čokoladnih tvorbi jajnika. Simptomatologija ne odgovara uvijek stupnju bolesti i varira od asimptomatskih pacijentica do onih koje iskazuju jaku zdjeličnu bol. Neplodnost je prisutna u oko 30% pacijentica s EME. EME je vrlo učestali ginekološki problem, a od pojave prvih simptoma pa do postavljanja dijagnoze prosječno prođe 7 godina. Jedan od razloga koji pridonosi toj činjenici jest da trenutno nema načina neinvazivne dijagnostike EME u obliku biomarkera (Ferrero i sur., 2019.; Woodward i sur., 2001.).

## 2.2. Teorije nastanka ekstrauterine migracije endometrija

Postoji više teorija nastanka EME, ali niti jedna nije u cijelosti razjašnjena i ne može u cijelosti objasniti EME na udaljenim mjestima. Faktori koji sudjeluju u patogenezi bolesti najvjerojatnije je da EME nastaje kao posljedica sljedećih mehanizama (Jansen i sur., 1986.; Rahmioglu i sur., 2014.).

1. prilikom metastaziranja endometrijskog tkiva na lokalizacije izvan maternice mogući mehanizmi tog procesa mogu biti: retrogradna menstruacija i implantacija endometrija na okolna tkiva, jatrogen rasap bolesti prilikom operacijskih zahvata i diseminacija bolesti na udaljena mjesta krvožilnim i limfnim sustavom (Sampson i sur., 1927.).
2. metaplastična teorija nastanka objašnjava pojavnost i daljnji razvoj endometrijskog tkiva te napredovanje bolesti na lokalizacijama koje su udaljene od maternice (Gruenwald i sur., 1942.; Matsuura i sur., 1999.).

Najuvjerljivije dokaze o patogenezi EME ima teorija o retrogradnom kretanju menstruacijske krvi (Halme i sur., 1984.). Ova teorija tumači se na način da endometrijske stanice retrogradnim vraćanjem menstruacijske krvi kroz jajovode dospijevaju u trbušnu šupljinu izvan maternice gdje prijanjaju na organe u trbušnoj šupljini. Opseg EME te stvaranje kronične upale i proliferacije endometrijskog tkiva ovisi o jačini menstruacijskog krvarenja kao i o genetskim te okolišnim faktorima. Slučajevi nastanka EME prije menarhe, a bez anomalija maternice povezanih s opstrukcijom otjecanja menstruacijske krvi opovrgavaju teoriju nastanka EME retrogradnom menstruacijom (Vercellini i sur., 2014.). Sve teorije nastanka EME mogu se podijeliti u dvije glavne grupe. Na one koje se zalažu da su endometralni implantati porijeklom iz endometrija maternice i one koje tvrde da su endometralni implantati drugog porijekla. U prilog teorijama koje zagovaraju drugo porijeklo endometrijskih stanica (izvan maternice), tzv ne-endometrijski implantati potvrđuju slučajevi EME kod osoba koje imaju Mayer- Rokitansky

- Küster - Hauserov sindrom (Rosenfeld i sur., 1981.) i muškaraca koji su liječeni s visokim dozama estrogenskih preparata (Schrodt i sur., 1980.).

1. Teorija celomske metaplazije: transformacija normalnih peritonealnih stanica u ektopične endometrijske stanice (Matsuura i sur., 1999.).
2. Teorija embrionalnog Müllerovog kanala: pod djelovanjem estrogena embrionalne stanice Müllerovih kanala zadržavaju sposobnost transformacije i razvoja u endometrijske žlijezde (Marsh i sur., 2005.).
3. Teorija matičnih stanica: matične stanice porijeklom iz koštane srži diferenciraju se u endometrijske stanice (Burney i sur., 2012.; Sasson i sur., 2008.; Du i sur., 2007.).
4. Teorija benignih metastaza: hematogenom i limfnom diseminacijom stanica eutopičnog endometrija na udaljena mjesta gdje nastaju implantati EME (Sampson i sur., 1927.). U prilog toj teoriji je nastanak ektopičnih implantata endometrija u plućima, mozgu i kostima (Jubanyik i sur., 1997.).
5. Teorija retrogradne menstruacije: vraćanje krvi iz maternice za vrijeme menstruacije kroz jajovode i implantacija stanica endometrija u okolne organe potvrđuje anatomska raspodjela EME u zdjelištu (Sampson i sur., 1927.).

Torakalna EME je stanje kada unutar prsne šupljine nalazimo stanice ektopičnog endometrija. Postoji više teorija o nastanku torakalne EME, no s obzirom da se do devet puta češće javlja na lijevoj strani prsnog koša zagovara se teorija razvoja stečenih ili kongenitalnih šupljina na dijafragmi te je na taj način omogućena transperitonealno-transdijafragmalna migracija endometrijskih stanica u prsnu šupljinu (Nezhat i sur., 2019.; Alifano, 2004.). S obzirom da takva teorija nije u cijelosti prihvaćena zagovaraju se i druge teorije koje obuhvaćaju celomsku metaplaziju stanica na pleuri i dijafragmi. Ova lokalizacija bolesti objašnjava se još limfo-hematogenim rasapom endometrijskih stanica i mogućom ulogom prostaglandina F<sub>2α</sub> važnog vazokonstriktora kojeg u vrijeme menstruacijskog krvarenja nalazimo u plazmi (Javert, 1951.; Ueki, 1991.).

Mezenhimske matične stanice koje sudjeluju u etiopatogenezi EME mogu biti razlog nastanka EME na ekstrapelvičnim mjestima (Oliveira i sur., 2012.; Figueira i sur., 2011.). Genetska predispozicija u nastanku EME nije beznačajna, žene koje imaju među krvnim srođnicima osobe s teškim oblikom EME imaju do šest puta veći rizik od obolijevanja (Simpson i sur., 1980.). Otkrivene su i regije na kromosomima 10q26 i 7p15 koje imaju važnu ulogu u naslijeđu

EME (Treloar i sur., 2005.). Kako je i naglašeno niti jedna teorija ne može samostalno objasniti različite oblike EME (Dastur i sur., 2010.).

Jajnici su svojom građom specifični, jer mezotelni epitel koji ih prekriva je vrlo aktivan i zbog toga najčešće mjesto nastanka EME je upravo na tom mjestu. EME na jajnicima često stvara ciste čiji je sadržaj „čokoladnog“ izgleda“. Cistične promjene EME jajnika nastaju tako što se kora jajnika invaginira (Brosens i sur., 1994.), a najaktivniji implantati endometrija nalaze se upravo u području invaginacije. Ako se biopsija za patohistološku analizu ne uzme s mjesta invaginacije korteksa jajnika već s drugog mjesta na stjenci ciste moguće je da se neće naći endometrijskih stanica što može dovesti do pogreške u postavljanju dijagnoze. Zato je vrlo važno mjesto uzimanja uzoraka za patohistološku dijagnozu u cilju postavljanja prave dijagnoze (Muzii i sur., 2007.).

### 2.3. Hormonski status kod ektrauterine migracije endometrija

Ektopični endometrijski implantati pokazuju ovisnost o estrogenu uz značajno sniženu razinu progesteronskih receptora. Ekspresija progesteronskog receptora B (PRB) kod žena oboljelih od EME značajno je smanjena u endometriju maternice i odsutna u endometrijskim žarištima. Posljedično na manjak receptora PRB u endometrijskim stanicama maternice kod žena koje boluju od EME u sekrecijskoj fazi menstrualnog ciklusa nalazimo povišene vrijednosti hidrokortisonne 17-beta dehidrogenaze 2 (17 beta HSD2) koje ne nalazimo u folikularnoj fazi ciklusa ili kod zdravih žena. Epitelne stanice ektopičnog i ektopičnog endometrija žena oboljelih od EME jednako tako bilježe povećanu ekspresiju aromataze glasnike ribonukleinske kiseline (mRNA), ali ne i povećanu razinu estrogena u odnosu na stromalne stanice kod žena koje nisu oboljele od EME (Chantalat i sur., 2020.; Matsuzaki i sur., 2006.; Zeitoun i sur., 1998.).

Uz EME postoji hormonska neravnoteža u smislu povišenih vrijednosti estrogena i smanjenih razina progesterona. Zbog promijenjenog hormonskog statusa dolazi do promjene imunskog odgovora. Višak estrogena uz smanjene razine progesterona u djelovanju s promijenjenom funkcijom imunskog odgovora mogu stvoriti pozitivnu povratnu spregu koja potiče rast i invazivnost EME kao i moguću malignu transformaciju (Bulun i sur., 2012.; Ness , 2003.). Medikamentozno liječenje EME progesteronskim preparatima u trajanju od 6 mjeseci ima utjecaj na smanjenu razinu boli oboljelih pacijentica, te općenito bolju kvalitetu života (Vercellini i sur., 2016.; As-Sanie i sur., 2012.). Žene s peritonealnim implantatima, a koje su

liječene s oralnom hormonskom kontracepcijom imale su manju stopu razvoja endometrioma jajnika (Kavoussi i sur., 2017.).

#### 2.4. Imunološki aspekt ektrauterine migracije endometrija

EME dovodi do promjena u imunološkom sustavu. Imunosni odgovor u zdjelničnom peritonealnom prostoru važan je u procesu proliferacije ektopičnih endometrijskih stanica, jer te stanice izbjegavaju uobičajenu imunosnu kontrolu i manje podliježu apoptozi. Smanjena reaktivnost T limfocita, ali i aktivacija poliklonalnih B limfocita udruženi s netoksičnošću NK stanica i pojačanom aktivnosti makrofaga pogoduju razvoju EME. Invazijom i proliferacijom EME imunološki sustav regrutira povećanu količinu proupalnih citokina i faktora rasta koji zajedno sa stvaranjem novih krvnih žila dovode do upalnog stanja u zdjelistu. U peritonealnoj tekućini i peritonealnim lezijama nalazimo značajno veću koncentraciju makrofaga i promijenjenu funkciju NK stanica koje u međusobnom djelovanju dovode do promijenjenog imunosnog djelovanja u stanicama ektopičnog endometrija. Upalna reakcija zdjelice djeluje na peritonealne endometriotične lezije i često dovodi do peritonealnih defekata koji nazivamo Allen-Mastersov prozor (Da Gama Coelho i sur., 2018.; Riccio i sur., 2018.; Haas i sur., 2013.).

Pacijentice koje boluju od EME imaju povećan rizik za razvoj kroničnih autoimunih bolesti. Češće obolijevaju od Sjögrenova sindroma (SS), autoimunog tireoiditisa (Xue i sur., 2021.), sistemskog eritematoznog lupusa (SLE) (Fan i sur., 2021.), skleroderme, reumatoidnog artritisa (RA) i multiple skleroze (MS) (Alviggi i sur., 2006.). Autoimuna bolest štitnjače ima snažnu korelaciju s EME i neplodnošću (Shigesu i sur., 2019.). U EME postoji drugačiji imunosni odgovor u odnosu na zdrave pacijentice. Promjene imunološkog sustava dovode do pojačane upalne reakcije što bi mogao biti odgovor i za razvoj autoimunih bolesti. U prilog tome je i činjenica da žene koje boluju od EME češće obolijevaju od alergijskih bolesti kao što su atopijski dermatitis, ekcemi i astma. U tim reakcijama sudjeluju upalni imunosni faktori poput CRP-a, IL1 i IL 6, TNF- $\alpha$ , VEGF i ICAM-1 koji su kod žena s EME povišeni u krvi i peritonealnoj tekućini (Nothnick i sur., 2001.).

#### 2.5. Neurološke promjene kod ektrauterine migracije endometrija

Bol je najčešći simptom koji iskazuju pacijentice oboljele od EME bilo da se radi o dubokoj zdjeličnoj boli ili povremenim blagim simptomima (Bajaj i sur., 2003.). U endometriotičnim lezijama postoji drugačija inervacija tog područja što izaziva osjećanje boli čak i kod minimalno izražene EME. Živci koji se nalaze u endometriotičnim žarištima pokazuju perineuralnu i

interneuronalnu snažnu invaziju. Priraslice i fibroza su česta pojava kod EME pogotovo u rektovaginalnom području gdje i minimalne promjene dovode do bolnih podražaja. Razlog tome je što živčana vlakna prodiru u područja endometriotičnih lezija, ali i u fibrotična područja koja su blisko povezana s tim lezijama (Anaf i sur., 2000.; Wang i sur., 2009.; Matsuzaki i sur., 2013.). Osim toga cijeli taj proces i međusobno djelovanje endometriotičnih lezija, fibroze i živčanih vlakana uvijek je posredovan i upalnim procesom što doprinosi jače izraženoj simptomatologiji (Mc Kinnon i sur., 2015.).

Bol i dismenoreja su simptomi koji se gotovo uvijek javljaju uz EME (Liang i sur., 2018.; Mechsner i sur., 2009.). Ovaj proces je multipliciran postojanjem neravnoteže između osjetnih i simpatičkih živčanih vlakana uz EME u peritonealnoj šupljini (Arnold i sur., 2013.). Razina hormona estrogena dovodi do takve neravnoteže između živčanih vlakana (Liang i sur., 2016.; Wheeler i sur., 2014.).

Endometrij unutar šupljine maternice vrlo je dobro vaskulariziran za razliku od peritonealne šupljine koja je avaskularna. Endometralne stanice koje naseljavaju i invadiraju ekstrauterine organe za svoj opstanak iziskuju dobru prokrvljenost i zbog toga dolazi do značajne neoangiogeneze u endometriotičnim lezijama. Stvaranje novih krvnih žila istovremeno se događa sa stvaranjem novih živčanih vlakana (neuroangiogeneza). Posljedica su bol i karakteristične patohistološke i morfološke promjene u endometriotičnim žarištima (Brawn i sur., 2014.; Tran i sur., 2009.). U istraživanju As-Sanie (As-Sanie i sur., 2016.) povezana je kronična bol u zdjelištu kod EME sa smanjenom količinom sive moždane tvari na lijevoj strani mozga u okolici talamusa. Promjena volumena sive moždane tvari djeluje na periferni osjetni sustav zbog čega pacijentice s EME osjećaju jaču bol od drugih koje imaju slične morfološke promjene EME. Žene oboljele od EME pretežno imaju niži indeks tjelesne mase (BMI) i imaju manji intenzitet osjeta boli (As-Sanie i sur., 2016.).

## 2.6. Maligni potencijal ekstrauterine migracije endometrija

EME je benigna bolest, ali ipak ima neke poveznice s karcinomom jajnika i povezana je s povećanim rizikom od nastanka epitelnog karcinoma jajnika, no unatoč tome EME se ne smije smatrati prekanceroznom bolešću (Worley i sur., 2013.; Somigliana i sur., 2006.). Kod cističnih promjena EME na jajnicima često postoje abnormalnosti tkiva kao što su hiperplazija i atipija što se najvjerojatnije može povezati s malignom transformacijom EME. Međutim, navedene patohistološke promjene mogu biti posljedica reaktivnih promjena, ali u određenim slučajevima

moгу imati i maligni potencijal (Prefumo i sur., 2002.). Atipična EME je ponekad prekancerozni stadij bolesti i tada se povezuje s nastankom endometrioidnog i svijetlostaničnog karcinoma, a u 50% slučajeva povezana je s povećanjem rizika od nastanka epitelnih karcinoma jajnika (Fukunaga i sur., 1997.). Kirurškim odstranjenjem takvih atipičnih promjena značajno se i smanjuje rizik od nastanka karcinoma. Dobre i pravovremene preventivne mjere mogu spriječiti nastanak karcinoma jajnika iz EME (Rossing i sur., 2008.; Brinton i sur., 1997.).

EME može imati premaligni potencijal pogotovo u nastanku endometrioidnog karcinoma i karcinoma svijetlih stanica i vrlo je usko povezana s njihovim nastankom. Kod atipične EME atipija stanica je srednjeg stupnja i razlikuje se u odnosu na atipiju malignih promjena. Atipije stanica koje nastaju u žarištima EME vrlo su slične promjenama koje nastaju kod atipičnih hiperplazija endometrija što također predstavlja premalignu komponentu (Seidman i sur., 1996.). Kompleksna hiperplazija i atipija koje nastaju u endometriotičnim „čokoladnim“ cistama s većom vjerojatnosti se mogu povezati sa malignom transformacijom EME, za razliku od jednostavne atipične hiperplazije stanica EME gdje se takav nalaz ne smatra isključivo prekancerozom (Czernobilsky i sur., 1979.; Ogawa i sur., 2000.). Rizik za nastanak raka jajnika iz endometrioma je 1,3 do 1,9 % (La Grenade i sur., 1988.). Genetski poremećaj kod karcinoma svijetlih stanica i endometrioidnog karcinoma jajnika nisu jednaki, ali im je prekursor zajednički, a to je EME (Kuo i sur., 2009.; Yamamoto i sur., 2012. ).

U primarnih karcinoma jajnika u 46% slučajeva postoji mutacija gena ARID1A za razliku od karcinoma nastalih iz EME gdje se takva mutacija javlja u 30% slučajeva. Kada dođe do mutacije ARID1A uvijek nalazimo i gubitak funkcije proteina BAF 250A koji sudjeluje u procesu karcinogeneze. Takvu mutaciju proteina susrećemo kod primarnih karcinoma jajnika kao i kod atipične EME i karcinoma jajnika nastalih malignom alteracijom endometrioma (Wiegand i sur., 2010.). Mutaciju na ARID1A genu nalazimo osim kod karcinoma jajnika i kod karcinoma mokraćnog mjehura, ali i kod karcinoma na drugim organima. Kod karcinoma ginekoloških organa ova se mutacija pojavljuje u čak 46-57% slučajeva (Fujimoto i sur., 2012.; Koebel i sur., 2010.). Gen ARID1A nalazi se na kromosomu 1p36.11 i čini osnovu za SWI/SNF kompleks. Osim gubitka funkcije tumorskog supresijskog proteina BAF 250A kod mutacije na ARID1A genu gubi se i stabilnost kompleksa SWI/SNF koji ima važnu ulogu u karcinogenezi (Gui i sur., 2011.; Jones i sur., 2010.). Međusobno promijenjene interakcije između ARID1A i SWI/SNF kompleksa zbog mutacije gena dovode do smanjene stabilnosti SWI/SNF kompleksa. Destabilizacijom tog kompleksa gubi se i njegova glavna funkcija, a to je supresijski učinak na tumorske tvorbe koji je presudni trenutak u karcinogenezi mutacije PIK3CA (Reisman i sur.,



2009.). Kod premalignih lezija postoje mutacije ARID1A i posljedično gubitak supresije BAF250. Smatra se da bi te molekule mogle sudjelovati u napredovanju EME i njenoj transformaciji u svijetlostanični i endometrioidni karcinom jajnika (Ness i sur., 2003.). Endometrioidni karcinom jajnika u 54% slučajeva je povezan s postojanjem EME, a genetskim poremećajima i gubitkom funkcije tumorskog supresorskog proteina BAF250 u endometriomima snažno ukazuje na njezin premaligni potencijal (Samartzis i sur., 2012.). Navedeni poremećaji imaju važnu ulogu u nastajanju karcinogeneze, jer su direktna posljedica mutacije gena ARID1A i gubitka supresorske funkcije SWI/SNF koja dovodi do gubitka proteina PIK3CA i mutacije BAF250A što otvara put procesu karcinogeneze (Yamamoto i sur., 2012.). EME može se s pravom u nekim slučajevima smatrati prekanceromom, jer se mutacija ARD1A pojavljuje u prvoj fazi karcinogeneze kod karcinoma jajnika nastalih iz EME (Guan i sur., 2012.; Kim i sur., 2014.).

Iako EME ima razne oblike, lokalizacije i stupnjeve bolesti njena maligna transformacija se gotovo uvijek pojavljuje na jajnicima nastajući iz endometrioma. Osim endometrioidnog i svijetlostaničnog karcinoma jajnika iznimno rijetko može nastati serozni karcinom, ali iz endometrioma nikada ne nastaje mucinozni karcinom jajnika. Smatra se da se inhibicijom ovarijske funkcije, a time i jačinom retrogradne menstruacije smanjuje i rizik od nastanka karcinoma jajnika što potvrđuje isti patogenetski put kao i u nastanku EME (Grandi i sur., 2015.; Saavalainen i sur., 2018.; Saavalainen i sur., 2018.; Berek i sur., 2015.; Yu i sur., 2009.). Zbog povećanog rizika od nastanka maligne bolesti kod EME važno je pravodobno liječenje kako bi se taj rizik sveo na najmanju moguću mjeru (Nezhat i sur., 2008.). Kod duboke infiltrirajuće EME kada još ne postoji nikakva poveznica s malignom transformacijom ipak u toj fazi već nalazimo mutacije kromosoma koje mogu biti prediktori te transformacije (Anglesio i sur., 2017.).

## 2.7. Klasifikacija ektrauterine migracije endometrija

Postoji više klasifikacija EME ovisno o stupnju proširenosti bolesti. Međutim, najviše prihvaćena i korištena je podjela EME Američkog društva za reproduktivnu medicinu (od eng. *American Society for Reproductive Medicine, ASRM*) (Metzemaekers i sur., 2020.). Ovom klasifikacijom stupanj proširenosti EME ocjenjuje se prema kriterijima veličine i dubine implantata EME kao i prisustvu, rasprostranjenosti i karakteristikama priraslica. Navedeni kriteriji se pojedinačno boduju te se na temelju dobivenog zbroja EME klasificira u četiri stupnja bolesti: I. stadij - minimalna bolest 1-5 bodova (nekoliko površnih lezija EME),



II. stadij - blaga bolest 6-15 bodova (veći broj lezija, neke su i dublje, III. stadij – umjerena bolest 16-40 bodova (brojne lezije, lezije na jednom ili oba jajnika, tanke priraslice) i IV. stadij - izražena bolest preko 40 bodova brojne lezije, veliki endometriomi na oba jajnika, guste i čvrste priraslice, priraslice između rektuma i maternice). Nedostatak ASRM klasifikaciji je što se njenom raspodjelom proširenosti i karakteristikama bolesti ne uzima u obzir i zahvaćenost struktura retroperitonealnog prostora EME koji može biti zahvaćen kod duboke infiltrirajuće EME (Soo-Young i sur., 2021.). Kako bi navedena klasifikacija imala cjelovitiji pristup u dijagnostici proširenosti EME uz ASRM klasifikaciju koristi se i ranije opisana ENZIAN klasifikacija kao njena nadopuna i naziva se rASRM klasifikacija (Lee i sur., 2021.).

## 2.8. Potencijalni biomarkeri ekstrauterine migracije endometrija

Analizom proteoma moguće je usporediti cijeli profil različite ekspresije proteina koje nalazimo kod različitih oblika EME kao što su ovarijske „čokoladne“ cistične tvorbe, peritonealna EME ili adenomioza. Takve proteomske analize koristile su se već kod različitih oblika EME kako bi se među proteinima koji se pojačano izlučuju pronašao biomarker za tu bolest. Objavljeno je nekoliko studija koje su analizom proteoma pokušale pronaći biomarker za EME u serumu, urinu, peritonealnoj tekućini, endometriomima i menstruacijskoj krvi. Napori u istraživanju mogućeg biomarkera uloženi su zbog potrebe ranog otkrivanja EME kako bi se bolest dijagnosticirala i liječila u samom začetku (Fassbender i sur., 2015.; Marianowski i sur., 2013.; Liu i sur., 2015.; Julian i sur., i 2009.).

Do sada nađeni markeri su: nekodirajuća RNA u ektopičnom endometrijskom tkivu (Ahn i sur., 2017.; Papari i sur., 2020.). U fazi istraživanja su i neki drugi biomarkeri koji bi potencijalno mogli služiti u dijagnostici EME kao što su endometrijski proteomi, kaldesmona, 17βHSD2, IL-1R2, foliostatin, CA 125, TNFα, IL-6 i IL-8 (Tian i sur., 2020.; Gupta i sur., 2016., Nisenblat i sur.; 2016., Florio i sur., 2009.; Seeber i sur., 2008.; Pellicer i sur., 1998.; Darai i sur., 2003.), CYFRA 21-1 (FO i sur., 2018.; Gjavotchanoff, 2015).

## 2.9. Protein CYFRA 21-1

Protein CYFRA 21-1 osim u urinu i serumu može imati povišene vrijednosti i u endometrijskim stanicama u menstruacijskoj krvi i peritonealnoj tekućini (Van der Linden i sur., 1995.). Protein CYFRA 21 topljiv je u tekućini i može se pokazati kao vrlo vrijedan biomarker u urinu

(Holdenrieder i sur., 2017.). Citokeratine dijelimo u dvije glavne skupine u odnosu na biokemijska svojstva koja imaju i prema njihovoj izoelektričnoj točki. Citokeratini grupirani u skupinu I su kiseli citokeratini i imaju molekularnu težinu 40-64 kDa. U skupini II su neutralni citokeratini molekularne težine 52-68 kDa (Pavićević i sur., 1998.). Citokeratine nalazimo u svim epitelnim stanicama i oni su bazični strukturalni elementi. Osim što im je funkcija održavanje strukture epitelnih stanica imaju i funkciju regulacije staničnih migracija kao i regulaciju stanične invazije i proliferacije. Diferencijaciju stanica određujemo i prema količini citokeratina, što su stanice više diferencirane imaju veću ekspresiju citokeratina na svojoj površini. Kod stanica koje imaju snažnu proliferativnu aktivnost ili maligna obilježja količina citokeratina je promijenjena u smislu smanjene ekspresije (Pavićević i sur., 1998.). Keratin 19-9 je citoskeletni keratin podgrupe 19, ima molekularnu težinu 49 kDa. Protein CYFRA 21-1 je kiseli citokeratin iz skupine I keratina, stanični strukturalni protein, a kodiran je genom pod nazivom KRT 19 (Schweizer i sur., 2006.; Moll, 1993.).

Promatrajući razinu proteina CYFRA 21-1 u žena koje boluju od EME pokazane su povećane vrijednosti proteina CYFRA 21-1 koje su i do 12 puta veće kod žena prve skupine u odnosu na zdrave žene. Međutim radilo se o različitoj, ali vrlo sličnoj izoformi proteina CYFRA 21-1 što bi moglo značiti da se kod EME pojavljuje nova izoforma tog proteina. Također, tijekom cijelog menstrualnog ciklusa bilježila se ista tendencija porasta proteina CYFRA 21-1 kod žena oboljelih od EME za razliku od hormonskih promjena koje imaju ciklički porast (Tokushige i sur., 2011.).

Tumorski marker CYFRA 21-1 je kod karcinoma mokraćnog mjehura važan biljeg u dijagnostici i praćenju stadija bolesti kao i kontroli odgovora na primijenjenu terapiju (Huang i sur.; 2015.; Washino i sur., 2011.). Visoke vrijednosti markera CYFRA 21-1 ukazuju na uznapredovani karcinom mokraćnog mjehura sa vjerojatnim udaljenim metastazama (Andreadis i sur., 2005.). Smatra se da bi protein CYFRA 21-1 mogao imati slične karakteristike u dijagnostici i praćenju EME. Istražuju se i drugi biomarkeri koji bi mogli služiti u dijagnozi EME. Zamijećen je porast vrijednosti proteina CYFRA 21-1 u ranoj folikularnoj fazi menstrualnog ciklusa kod EME u usporedbi s razinom tih proteina kod kontrolne skupine. EME može i maligno alterirati te razina proteina CYFRA 21-1 ima važnu prognostičku vrijednost za žene oboljele od karcinoma jajnika. Izrazito povišene vrijednosti proteina CYFRA 21-1 ukazuju na lošiji tijek bolesti i slabije preživljavanje bolesnika (Hua-Hsi i sur., 2014.). Porast razine proteina CYFRA 21-1 u urinu žena oboljelih od EME može biti neinvazivan dijagnostički marker kao i marker za praćenje tijeka bolesti, odnosno obećavajući je biomarker

za razlučivanje pacijentica s EME od onih koje tu bolest nemaju (FO i sur., 2018.; Gjavotchanoff, 2015).

#### 2.10. Antigen CA 125

Ugljikohidratni antigen 125, karcinomski antigen, CA 125 ili mucin 16 su sinonimi za protein koji je tumorski biljeg i kodiran je genom MUC 16 (Felder i sur., 2014.; Yin i sur., 2001.; Yin i sur., 2002.; Duraisamy i sur., 2006.; Bast i sur., 1998.). To je najveći membranski mucin koji se sastoji od 22000 različitih aminokiselina. Veličinom se izdvaja od ostalih membranskih mucina (Gipson i sur., 2007.; Gniewek i sur., 2012.). Određivanje razine CA 125 u serumu je specifičnije kod karcinoma jajnika, no s obzirom da su njegove koncentracije povišene i kod drugih stanja nije adekvatan za otkrivanje bolesti, već se najčešće koristi u praćenju tijeka bolesti. Referentna granica CA 125 je 0 - 35 kU/l, a vrijednosti iznad te razine govore u prilog patološkim stanjima (American Cancer Society, 2020. ; Hu i sur., 2019.; King, 2021.). Povišene vrijednosti CA 125 ukazuju na postojanje malignih promjena, ali su vrlo često povišene i kod drugih stanja poput EME. Povećanjem stupnja EME (rASRM I-IV) povećava se i razina antigena CA 125 (Rao i sur., 2018.). Celomski epitelni antigen pod nazivom CA 125 je glikoprotein velike molekularne mase i koristi se za eventualno postavljanje dijagnoze, ali posebno je koristan u praćenju određenih bolesti (Alagoz i sur., 1994.). Serumske razine CA 125 kod žena koje boluju od EME povećavaju se krajem luteinske faze i za vrijeme menstruacije, ali u folikularnoj i ranoj luteinskoj fazi takve promjene nisu zabilježene. Što je EME više izražena, a pogotovo kod duboke EME veća je razina CA 125. Nakon kirurškog zahvata CA 125 se smanjuje i dobar je biomarker za praćenje EME nakon kirurškog zahvata (Acien i sur., 1989.; Kauppila i sur., 1988.). Međutim, iako je dobar biomarker za EME CA 125 je glikoprotein koji je povišen i kod epitelnih tumora jajnika te ne može biti biomarker EME (Jacobs i sur., 1989.).

Za vrijeme menstrualnog krvarenja nalazimo izrazito povišene vrijednosti CA 125 kod žena oboljelih od EME. Glavni faktor njegovog lučenja je ektopični endometrij u kojem dolazi do vaskularnih oštećenja u endometriotičnim žarištima (Takahashi i sur., 1990.; Masahashi i sur., 1988.; Pittaway i sur., 1987.). Takvo povećanje razine CA 125 nalazimo i kod žena s upalnom bolešću zdjelice, trudnica i kod miomatoznih stanja (Koninckx i sur., 1992.). Kod žena s EME povišene su vrijednosti CA 125 uglavnom kod postojećih endometriotičnih cista na jajniku i duboke EME. Razlog tome je što je CA 125 velike molekularne mase, te je njegova resorpcija usporena iz peritonealnog prostora gdje ga luče mali endometrijski plakovi i druga površinska

EME, dok duboka infiltrirajuća EME i veće čokoladne cistične tvorbe luče CA 125 izravno u krvotok. Povišenu ekspresiju CA 125 u drugoj fazi menstruacijskog ciklusa i ranoj početnoj fazi menstruacijskog krvarenja najvjerojatnije reguliraju hormonalne promjene (Koninckx i sur., 1992.). Tako ćemo aspiracijom čokoladnog sadržaja iz cista EME naći povišene vrijednosti CA 125, ali niske razine estradiola i progesterona. U EME CA 125 je većim djelom porijeklom iz endometralnih stanica i peritoneuma koji je upalno podražen. Taj biomarker ne može biti jedini faktor u dijagnostici EME ali je vrlo dobar biomarker uz druge dijagnostičke postupke kao i za diferenciranje kronične zdjelične boli (Muyldermans i sur.; 1995.; Koninckx i sur., 1993.).

### 2.11. Proteini u urinu

U publikacijama osim proteina CYFRA 21-1 rijetka su istraživanja proteinskih faktora u urinu u etiopatogenezi EME. Ovdje su navedeni urinski proteini koji su prema dosadašnjim istraživanjima povezivani s EME. Prethodna istraživanja se razlikuju od ove analize proteoma urina u EME, jer su provedena na drugim stanicama tkiva i tekućina, Nadalje, analizom proteoma urina identificirani su proteini koji nisu bili povezivani s EME, ali su u značajno većoj koncentraciji u usporedbi s kontrolnom skupinom te su i oni ovdje navedeni. Proteini imaju višestruke aktivnosti i djelovanja im se međusobno preklapaju. Odabrana je važnija uloga svakog proteina te su podijeljeni u sljedeće glavne grupe: imunosni faktori i upalni citokini, proteini s proteolitičkom aktivnosti i inhibitori proteaza, proteini koji sudjeluju u staničnoj migraciji i proliferaciji, proteini koji sudjeluju u stvaranju adhezija, proteini koji sudjeluju u apoptozi, proteini s učinkom na krvožilni sustav, proteini s antioksidacijskom aktivnosti u oksidacijskom stresu i ostali proteini koji sudjeluju u etiopatogenezi EME (Méar i sur., 2022.).

Smatra se da jednu od važnijih uloga u etiopatogenezi EME ima proupalno aktiviran imunološki sustav. U peritonealnom prostoru imunosni faktori se luče u povećanoj količini, moduliraju imunosni odgovor i otvaraju prostor ekstrauterinoj implantaciji i proliferaciji endometrijskih stanica. Unatoč učinjenim brojnim istraživanjima ne može se sa sigurnošću tvrditi je li proupalno aktiviran imunološki sustav uzrok nastajanja EME ili faktor u njenoj progresiji. Proteini u urinu koji mogu imati utjecaj na proupalno aktiviran imunosni sustav su: Komponente komplementa C3, komplementa C4-A, komplementa C5, alfa lanac komplementa C8, komplementa C9, faktor komplementa B, faktor komplementa H, antagonist receptora interleukina 1, beta podjedinica receptora interleukina 10, beta podjedinica receptora interleukina 6, vezni protein interleukina 18, inducibilni ligand koji kostimulira T stanice, Beta

receptor transformirajućeg faktor rasta – tip 2, stimulator kolonije makrofaga 1 i galektin-9B (Agostinis i sur., 2021.; Ahn i sur., 2015.).

**Antagonist receptora interleukina 1** (IL1RN, od eng. *Interleukin-1 receptor antagonist protein*) je protein koji inhibira aktivnost interleukina-1 vezanjem na receptor IL1R1 (Interleukin-1 receptor antagonist protein (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB)

**Beta podjedinica receptora interleukina 6** (IL6ST, od eng. *Interleukin-6 receptor subunit beta*) je proteinski receptor čija je glavna aktivnost prijenos signala. Receptori za interleukin 6 (IL6), interleukin 11 (IL11), onkostatina M (OSM), faktor inhibicije leukemije (LIF), cilijarni neutrofilni faktor (CNTF) i citokinski faktor 1 sličan kardiotropinu (BSF3) koriste ovu receptorsku podjedinicu za aktiviranje prijenosa signala (Piva i sur., 2001.). Beta podjedinica receptora interleukina 6 posreduje prijenos signala u regulaciji imunskog odgovora kod upalnih stanja, kontroli boli, hematopoezi i metabolizmu kostiju (Interleukin-6 receptor subunit beta (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Beta podjedinica receptora interleukina 10** (IL10RB, od eng. *Interleukin-10 receptor subunit beta*) potreban je za aktivaciju citokina IL10, IL22, IL26, IL28 i interferona lambda 1 (IFNL1) (Interleukin-10 receptor subunit beta (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Vezni protein interleukina 18** (IL18BP, od eng. *Interleukin-18-binding protein*) je izoforma proteina koji se veže na IL-18 i na taj način inhibira njegovo djelovanje. IL-18 ima aktivnost inhibitora ranog odgovora citokina (Interleukin-18-binding protein (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

Aktivaciju sustava komplementa kod EME uzrokuju proupalni faktori. Peritonealna tekućina u EME bogata je proupalnim stanicama i može povećati ekspresiju komplementa C3. Nastali anafilatoksini stimuliraju peritonealne makrofage i mastocite na pojačano lučenje citokina i histamina. Kaskadni niz djelovanja komplementa započinje koagulacijom koja je reakcija periodičnog krvarenja ekstrauterinog endometrijskog tkiva. Reakcija je posredovana aktiviranim trombocitima. Trombin uzrokuje konverziju komplementa C3 u C3a i C3b. Drugi faktor aktivatora komplementa C3 je hem nastao oslobađanjem iz hemoglobina zbog hemolize. To dovodi do povećane permeabilnosti krvnih žila u ektopičnom endometrijskom tkivu. Navedeni procesi imaju za posljedicu upalnu reakciju i bol. Aktivacijom C5 komplementa pokreće se kaskadna reakcija koja posreduje oštećenje stanica. Komplement C5 pod djelovanjem C5 konvertaze razgrađuje se na C5a i C5b. Međusobno povezivanje komponenti

komplementa C5b i C6 stvara hidrofilni kompleks koji se povezuje s komplementom C7. Takav hidrofilni kompleks omogućuje komplementu C8 da svojim alfa i beta podjedinicama prodiere u membranski dvoslojni lipidni omotač. Novostvoreni kompleks komplementa C5b, C6, C7 i C8 s komplementom C9 stvara transmembranske porozne kanale koji uzrokuju osmotsku neravnotežu. Cijeli opisani proces inducira pojačanu lizu stanica. Navedeni komplementi i njihove komponente su pojačano eksprimirani u urinu s EME i mogu imati ulogu u etiopatogenezi EME (Agostinis i sur., 2021).

**Komplement C3** (C3, od eng. *Complement C3*) jedan je od najzastupljenijih proteina plazme i ima središnju ulogu u aktivaciji sustava komplementa. Komplement C3 se sastoji od polipeptidnih lanaca vezanih disulfidnim vezama (C3 $\alpha$  i C3 $\beta$ ). Razlikujemo tri različita puta aktivacije komplementa, a to su klasični, alternativni i lektinski. Sva tri puta međusobno konvergiraju kako bi se iz komplementa C3 stvorio njegov aktivni oblik C3b. Glavni izvor komplementa C3 su hepatociti, a može se lokalno stvarati i u svim drugim tkivima i stanicama. Lokalno eksprimiran komplement C3 je uključen u proces regeneracije tkiva (Complement C3 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Komplement C4-A** (C4A, od eng. *Complement C4-A*) ključna je molekula u sustavu komplementa i nastaje proteolitičkom razgradnjom komplementa C4. Komplement C4 je najpolimorfiji protein u sustavu komplementa i predstavlja važan faktor urođenog imuniteta. Njegovom ekspresijom imunološki sustav trenutno prepoznaje patološke faktore i potiče njihovu eliminaciju. Ima vrlo važnu ulogu u funkcioniranju klasičnih i lektinskih puteva komplementa (Wang H i sur., 2021.; Hongbin W i sur., 2021.). Komplement C4-A je anafilatoksin i posreduje lokalne upalne procese aktivacijom oslobađanja bazofilnih leukocita i histamina iz mastocita. Između ostalih bioloških funkcija komplement C4 potiče apoptozu stanica. (Complement C4-A (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Komplement C5** (C5, od eng. *Complement C5*) aktivira se spontano pomoću C5 konvertaze. Komplement C5a je anafilatoksin i nastaje proteolizom C5. Vezanjem za specifični receptor posreduje u reakciji lokalnog upalnog odgovora oslobađanjem bazofilnih leukocita i histamina iz mastocita. Značajnu ulogu ima i kao kemokin aktivirajući polimorfonuklearne leukocite te usmjerava njihovu migraciju na mjesto upalnog procesa. Kompleks komplementa C5b do C6 je osnova za stvaranje litičkog kompleksa komplementa (Complement C5 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).



**Komponenta komplementa C7-alfa lanac** (C7, od eng. *Complement component C7 alpha chain*) ima važnu ulogu u urođenom i stečenom imunitetu (Complement component C7 alpha chain (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Alfa lanac komponenta komplementa C8** (C8A, od eng. *Complement component C8 alpha chain*) je dio sustava membranskog atakirajućeg kompleksa (MAC) koji ima ključnu funkciju u urođenom i stečenom imunosnom odgovoru. Komplement C8 se veže za ciljne stanice stvarajući pore na plazmatskoj membrani (Complement component C8 alpha chain (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Komponenta komplementa C9 alfa lanac** (C9, od eng. *Complement component C9 alpha chain*) ima vrlo sličnu funkciju kao komponenta komplementa C9 aktivirajući citolizu. Aktivira komplemente u klasičnom i alternativnom putu (Complement component C9 alpha chain (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Faktor komplementa B** (CFB, od eng. *Complement factor B*) je dio alternativnog puta u sustavu komplementa. Uključen je u diferencijaciju i proliferaciju B limfocita i migraciju monocita periferne krvi na mjesto upalno zahvaćenih tkiva (Complement factor B (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Faktor komplementa H** (CFH, od eng. *Complement factor H*) je glikoprotein koji ima važnu ulogu u održavanju ravnoteže u imunosnim reakcijama moduliranjem aktivacije komplementa (Complement factor H (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Inducibilni ligand koji kostimulira T stanice** (ICOSLG, od eng. *Inducible T Cell Costimulator Ligand*, ) je transmembranska glikolizirana molekula na površini stanica. Specifičan je receptor za ICOS-T limfocite. Aktivira proliferaciju T limfocita i diferencijaciju B limfocita u plazma stanice. Potiče pojačanu ekspresiju citokina i na taj način aktivno sudjeluje u odgovoru imunološkog sustava na upalne procese. Vrlo važna biološka funkcija mu je određivanje signalnih puteva receptora za T limfocite (ICOS ligand (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Beta receptor transformirajućeg faktora rasta – tip 2** (TGFB2, od eng. *TGF-beta receptor type-2* ) je protein koji prenosi signal sa stanične membrane u citoplazmu. Receptor je za TGFB1, TGFB2 i TGFB3. Regulira diferencijaciju i proliferaciju mezenhimalnih stanica, kontrolira zacjeljivanje rana i imunološki sustav. Značajan je faktor u karcinogenezi (TGF-beta receptor type-2 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Faktor 1 stimulacije kolonije makrofaga** (CSF1, od eng. *Macrophage colony-stimulating factor 1*) je citokin koji ima vrlo važnu ulogu u diferencijaciji i proliferaciji hematopoetskih monocita i makrofaga. Neophodan je za fiziološki razvoj kostiju i urednu žensku i mušku plodnost. Regulira adheziju i migraciju stanica (Macrophage colony-stimulating factor 1 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Galektin 9B** (GAL 9, od eng. *Galectin-9B*) je topljivi imunosni modulator s višestrukim aktivnostima. Važnu ulogu ima u aktivnostima kontrole imunološkog sustava. U fiziološkim koncentracijama galektin 9B održava imunosnu ravnotežu (Niki T i sur., 2018.; Galectin-9B (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

U proteaze ubrajamo proteinaze (peptidaze) koje enzimski kataliziraju reakcije razgradnje proteina. U polipeptidnom lancu aminokiseline su povezane pepitdnim vezama. Proteaze hidroliziraju peptidne veze i razgrađuju proteinske lance na manje fragmente. Ovakvim reakcijama proteini gube kontroliranu primarnu aktivnost i uzrokuju razgradnju ekstracelularnog prostora što otvara prostor za razvoj EME. Inhibitori proteaza imaju suprotan učinak i vezivanjem za receptore enzimski aktivnih proteina suprimiraju njihovu aktivnost. Proteini u urinu koje ćemo razmotriti u skupini proteaza i njihovih inhibitora su: katepsin B, katepsin D, katepsin G i katepsin L, matriks metaloproteinaze 9, inhibitor metaloproteinaze 2, inhibitor plazmatske proteaze C1, lektin serininska proteaza 2 koja veže manan, inhibitor serinske proteaze Kazal tip 5, inhibitor proteaze tipa Kunitz 2, inhibitor serinske proteaze Kazal tip 5, proteaza vezana na membranu transkripcijskog faktora 1 i i prostatin (Bałkowiec i sur., 2018.; Porter i sur., 2016.; Skrzypczak i sur., 2012.; Chen i sur., 2019.). Katepsine dijelimo u serinske (Cat G), cisteinske (CatB i CatL) i asparginske proteaze (Cat D). Pohranjeni su u lizosomima gdje njihovi prekursori proteolitički sazrijevaju. Otpušteni iz lizosomskih vezikula razgrađuju proteine izvanstaničnog prostora. Ovisno o pH medija u kojem se nalaze katepsini imaju različite aktivnosti. U neutralnom pH aktivnost katepsina se smanjuje, dok ih lužnati pH inaktivira. Inhibitori blokiraju aktivnost katepsina i mogu suprimirati angiogenezu, migraciju i invaziju stanica (Patel i sur., 2018.).

**Katepsin B** (CTSB, CatB, od eng. *Cathepsin B*) predstavlja lizosomsku cisteinsku proteazu i ima ulogu u transportu i razgradnji proteina. Razlikuje se od ostalih peptidaza, jer ima aktivnost endopeptidaze i egzopeptidaze. Njegova aktivnost ovisi o pH sredine u kojoj se nalazi. Katepsin B se može pronaći u različitim organskim sustavima gdje ima ulogu u razgradnji i prometu proteina (Thangavelu B i sur., 2021.; Hook G i sur., 2015.). Molekularna funkcija mu je vezanje



kolagena te utjecaj na aktivnost peptidaze i endopeptidaze cisteinskog tipa (Cathepsin B (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Cathepsin D** (CTPS, CatD, od eng. *Katepsin D*) je kisela proteaza koja proteolitički razgrađuje intracelularne proteine (Letronne i sur., 2016.; Cathepsin D (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Katepsin G** (CTSG, CatG, od eng. *Cathepsin G*) je serinska proteaza nalik na tripsin i kimotripsin. Kontrolira aktivnost imunološkog sustava i tradicionalno se smatra jednim od glavnih faktora upalnih procesa. Katepsin G može razgraditi peptidne veze karboksilnih skupina, aromatskih (leucin, fenilalanin i tirozin) i pozitivno nabijenih (lizin i arginin) aminokiselina. Najčešće ga nalazimo u polimorfonuklearnim neutrofilima. Započinje niz reakcija koje nastaju u upalnim procesima. Katepsin G regulira aktivnost imunskog odgovora stimulirajući ekspresiju kemokina i citokina. Aktivirajući metaloproteaze katepsin G razdvaja proteine u ekstracelularnom prostoru i na taj način potiče migraciju neutrofila (Zamolodchikova i sur., 2020.). Biološki procesi u kojima sudjeluje katepsin G su citokinima posredovani signalni putevi, proteoliza, aktivacija trombocita i hidroliza faktora koagulacije (Cathepsin G (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Katepsin L1** (Prokatepsin L, CatL1, od eng. *Cathepsin L1*) je tiol proteaza koja ima ulogu u lizozomskoj razgradnji proteina, obradi antigena, migraciji proteina, i remodeliranju kostiju. Također je uključen u oslobađanje tiroidnog hormona T4, ali njegova aktivnost ovisi o proteolizi tireoglobulina u štitnjači. U neuroendokrinom sustavu katalizira reakciju prijelaza proenkefalina u neurotransmiter aktivni enkefalin. U timusu regulira histokompatibilnost klase II (MHC II). Enzim je koji razgrađuje elastin u neutralnom pH mediju (Cathepsin L1 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Matriks metaloproteinaze-9** (MMP9, od eng. *Matrix metalloproteinase-9*) ima važnu ulogu u proteolizi izvanstaničnog prostora kao i u leukocitnoj migraciji, angiogenezi, diferencijaciji makrofaga i regulaciji apoptoze (Matrix metalloproteinase-9 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Inhibitor metaloproteinaze 2** (TIMP2, od eng. *Metalloproteinase inhibitor 2*) nepovratno inhibira i deaktivira metaloproteinaze vežući se na njihov kofaktor cink. Poznato je da djeluje na skupine od MMP od 1 do MMP19 (Metalloproteinase inhibitor 2 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Inhibitor plazmatske proteaze C1** (SERPING 1, od eng. *Plasma protease C1 inhibitor*) je proteaza koja kontrolira aktivnost C1-inhibitora. Sastavni je dio proteolitičkog kompleksa C1s i C1r proteaza. Potencijalno ima važnu ulogu u aktivaciji komplementa, fibrinolizi i zgrušavanju krvi. Inhibira faktor koagulacije XIIa, kalikrein i kimotripsin (Plasma protease C1 inhibitor (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Lektin serinska proteaza 2 koja veže manan** (MASP 2, od eng. *Mannan-binding lectin serine protease 2*) je a proteaza koja aktivira sustav komplementa uz pomoć lektina koji na sebe veže manozu. Stimulira C3 konvertazu i pokreće autokatalitičku reakciju cijepanjem C2 i C4 (Mannan-binding lectin serine protease 2 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Receptor supstrata kinaze epidermalnog faktora rasta 8 sličnog proteinu 2** (EPS8L2, od eng. *Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2*) je protein koji može imati ulogu u destrukciji stanične membrane i remodeliranju aktinskog citoskeleta. Na molekularnoj razini veže kaderin i aktin (Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Inhibitor serinske proteaze Kazal tip 5** (SPINK5, od eng. *Serine protease inhibitor Kazal-type 5*) inhibira serinske proteaze i sudjeluje u protuupalnoj zaštiti epitela. Glavna aktivnost mu je inhibicija kalikreina 5 (KLK5) koja ovisi o pH medija u kojem se nalazi. S manjim afinitetom inhibira kalikrein 7 (KLK7), kalikrein 14 (KLK14), kaspazu-14 (CASP14) i tripsin (Serine protease inhibitor Kazal-type 5 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Inhibitor proteaze Kunitz tip 2** (SPINT2, od eng. *Kunitz-type protease inhibitor 2*) je protein čija je osnovna aktivnost inhibicija serinskih proteaza. Inhibira aktivator receptora faktora rasta hepatocita (HGF) koji sprječava ekspresiju aktiviranog HGF. Suprimira rast tumora kao i aktivnost plazmina i kalikreina (Kunitz-type protease inhibitor 2 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Proteaza vezana na membranu transkripcijskog faktora 1** (MBTPS1, od eng. *Membrane-bound transcription factor site-1 protease*) je proteaza koja kataliziranjem reakcije započinje proteolitičku aktivaciju proteina i cAMP-a ovisnog o transkripcijskom faktoru. Sudjeluje u migraciji lizosoma (Membrane-bound transcription factor site-1 protease (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Transmembranska serinska proteaza 2** (TMPRSS2, od eng. *Transmembrane protease serine 2*) je serinska proteaza koju nalazimo na staničnoj plazmatskoj membrani. Potaknuta

androgenima TMPRSS2 aktivira pro-hepatocitni faktor rasta (HGF) i proteazu aktiviranog receptora-2 (F2RL1) (Transmembrane protease serine 2 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Prostazin** (PRSS8, od eng. *Prostasin*) je proteaza slična tripsinu, a izlučuje se u epitelnim stanicama. Lokaliziran je na kromosomu 16p11.2 koji je prekomjerno eksprimiran u bolesnika s karcinomom jajnika (Rastogi M i sur., 2016., Prostasin (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

Proliferacija ili nekontrolirano umnožavanje stanica endometrija u peritonealnom prostoru važna je odlika EME. U ektopičnim endometrijskim stanicama vlada neadekvatan odnos između faktora apoptoze i onih koji potiču rast stanica. Osim neravnomjernog odnosa faktora rasta i apoptoze ektopične endometrijske stanice su vrlo otporne na apoptozu. Ove okolnosti omogućavaju bolju učinkovitost proteinima koji potiču proliferaciju. Neki proteini moguće imaju učinak u etiopatogenezi EME, ali do sada nisu u kontekstu EME istraživani. Proteini s proliferativnim djelovanjem pokazani u urinu su: faktor rasta sličan inzulinu koji veže protein-2, faktor rasta sličan inzulinu koji veže protein-3, faktor rasta sličan inzulinu koji veže protein-7, IGF-u sličan receptor 1, protein specifičan za zaustavljanje rasta 6, receptor tirozin-protein kinaze i ezrin (Scotti i sur., 2020.; Renner i sur., 2015.; Wingfield i sur., 1995.)

**Faktor rasta sličan inzulinu koji veže protein 2** (IGFBP-2, od eng. *Insulin-like growth factor-binding protein 2*) je protein koji veže IGF s mogućom dvostrukom funkcijom. Svojom aktivnošću može učinak IGF-a na stanicu stimulirati ili inhibirati (Insulin-like growth factor-binding protein 2 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Faktor rasta sličan inzulinu koji veže protein 3** (IGFBP-3, od eng. *Insulin-like growth factor-binding protein 3*) je protein koji ima slične aktivnosti kao i IGFBP2. Sudjeluje u reakcijama apoptoze i antiproliferativnim reakcijama koje nisu ovisne o IGF-u, a posredovane su IGF receptorom (Insulin-like growth factor-binding protein 3 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Faktor rasta sličan inzulinu koji veže protein 7** (IGFBP-7, od eng. *Insulin-like growth factors-binding protein 7*) je protein čija je osnovna aktivnost vezanje faktora rasta sličnih inzulinu (IGF-I i IGF-II). Stimulira ekskreciju prostaciklina (PGI<sub>2</sub>) i adheziju stanica. Ima vrlo sličan genetski slijed kao inzulin (Insulin like growth factors -binding protein 7 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Receptor faktora rasta sličnog inzulinu 1** (IGFLR1, od eng. *IGF-like family receptor 1*) je receptor stanične membrane iz obitelji receptora sličnih IGF-u. Ima *veći* afinitet za IGFL1 i IGFL3 od afiniteta za IGFL2 (IGF-like family receptor 1 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Protein specifičan za zaustavljanje rasta 6** (GAS6, od eng. *Growth arrest-specific protein 6*) je ligand za tirozin-kinaza receptore TYRO3 (receptor tirozin-protein kinaze), AXL (NLO receptor tirozin-protein kinaze) i MER (tirozin-protein kinaza). Aktivacija tih receptora uključena je u staničnu migraciju i adheziju te preživljavanje i rast stanica. Signalizacija kompleksa GAS6/AXL ima ulogu u različitim biološkim procesima kao što su sprečavanje apoptoze, otpornost endotelnih stanica na oštećenje u kiselom mediju, signalizacija citokina u procesu s NK stanicama, aktivacija i regulacija trombocita (Growth arrest-specific protein 6 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Receptor tirozin-protein kinaze** (TYRO3, TULP1, od eng. *Sky, Tyrosine-protein kinase receptor*) je receptorska tirozin-kinaza. Veže se na različite ligande uključujući GAS6. Regulira diferencijaciju, migraciju i preživljavanje stanica. Signalizacija TYRO3 receptora ima važnu ulogu u procesima reorganizacije citoskeleta stanica, koordiniranja agregacije trombocita i zaštite neurona od citotoksičnog oštećenja (Tyrosine-protein kinase receptor TYRO3 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Ezrin** (EZR, od eng. *Ezrin*) je protein kojemu aktivnost ovisi o obliku konformacije. Razlikujemo zatvoreni inaktivni molekularni oblik i otvoreni aktivni oblik ezrina. Protein je membransko-citoskeletne veze. Član je kompleksa ezrin–radiksin–moezin (ERM). Funkcija mu je stabilnost oblika citoskeleta stanice, dioba, adhezija i migracija stanica. U stanici najvjerojatnije povezuje plazmatsku membranu s citoskeletnim strukturama. Molekularne funkcije su mu brojne, a neke od njih su vezanje proteina S100, aktina i aktinskih filamenata. Ezrin sudjeluje u brojnim signalnim putevima kod tumorogeneze. U interakciji je s različitim receptorima adhezijskih molekula i faktora rasta. Izrazito visoke razine EZR nalazimo kod metastatskih oblika različitih vrsta malignih bolesti (Ezrin (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

Adhezija je u osnovi sila koja međusobno privlači dva tijela. U organizmu je pojava adhezija (priraslica) patološki proces koji je najčešće posljedica reakcije ozlijeđenog tkiva nakon kirurškog zahvata. Međutim, mnogi drugi uzroci mogu utjecati na pojavu adhezija. U upalnim intraperitonealnim procesima ili uznapredovanom stadiju EME često nalazimo guste priraslice.

To su trakaste izrasline koje dovode do međusobnog sljepljivanja susjednih organa. Proteini čija je osnovna aktivnost adhezija stanica, a pokazali su pojačanu ekspresiju u urinu kod EME su: stanična adhezijska molekula-1, stanični adhezijski vaskularni protein-1, SPARC-u sličan protein 1, trombospondin-1, L-selektin, protokaderin gama-C3, protokaderin-1, desmoplakin, antigen CD 44 i mucin1 (Li i sur., 2018.; Kuessel i sur., 2017.; Liu i sur., 2020.; Gupta i sur., 2006.).

**Stanična adhezijska molekula-1** (ICAM-1, od eng. *Intercellular adhesion molecule 1*) je protein adhezije leukocita (LFA-1). Nalazi se u vaskularnom endotelu, limfocitima i makrofagima. Kontinuirano je u niskim koncentracijama prisutan u membranama endotelnih stanica i leukocita. Molekule ICAM-1 potiču međusobnu adheziju stanica te ometaju aktivnost imunološkog sustava. Za vrijeme akutne upale ekspresiju ICAM 1 stimuliraju citokini. Leukocitnu adheziju na endotelnu stjenku aktivira ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Stanični adhezijski vaskularni protein-1** (VCAM 1, od eng. *Vascular cell adhesion protein 1*) je adhezijska molekula koja je važna u međustaničnom prepoznavanju. Ima ulogu u adheziji leukocita s endotelnim stanicama, veže integrine i ima aktivnost primarne oksidaze (Vascular cell adhesion protein 1 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Protein 1 sličan SPARC-u** (SPARCL 1, od eng. *SPARC-like protein 1*) je protein čije su biološke aktivnosti povezane s prijenosom signala, razvojem organa i adhezijom sinapsa (SPARC-like protein 1 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Trombospodin 1** (THBS1, TSP1, od eng. *Thrombospondin-1*) je adhezijski glikoprotein koji sudjeluje u međustaničnim interakcijama. Ligand je za CD36 koji je aktivan u različitim vaskularnim reakcijama. Aktivirajući transkripcijski faktor 6 alfa (ATF6) eksprimira adaptivne faktore koji imaju ulogu u odgovoru na stres (Thrombospondin-1 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**L-selektin** (SELL, od eng. *L-selectin*) pripada skupini lektina ovisnih o kalciju. Međusobnim povezivanjem glikoproteina na staničnoj plazmatskoj membrani posreduje u staničnim adhezijama. Sudjeluje u procesu adhezije limfocita za endotel vena u perifernim limfnim čvorovima te adheziji i početnoj migraciji leukocita u endotelu krvnih žila (Wedepohl i sur., 2017.; D'souza i sur.; 2017.; L-selectin (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Protokaderin gama-C3** (PCDHGC3, od eng. *Pcdh, Protocadherin gamma-C3*) član je superfamilije kaderina. Kaderini su molekule stanične adhezije i imaju važnu ulogu u embrionalnoj morfogenezi i formiranju neuralnog spleta, poticanju angiogeneze i procesu malignih oboljenja (Mah i sur., 2016.). Disregulacija ekspresije PCDH ima ulogu u progresiji malignih bolesti. Smatra se da PCDH regulira staničnu proliferaciju i apoptozu. Njegova aktivnost je izravno povezana s koncentracijom kalcija (Pancho i sur.; 2020.; Protocadherin gamma-C3 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Protokaderin-1** (PCDH1, od eng. *Protocadherin-1*) je protein uključen u procese međustaničnih interakcija, adheziji stanica i razvoju živčanog sustava. (Protocadherin-1 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Dezmoplakin** (DSP, od eng. *Desmoplakin*) glavni je protein u dezmosomima. Sudjeluje u sidrenju intermedijarnih filamenata za dezmosome. Također ima aktivnost u međustaničnoj adheziji, umrežavanju peptida, regulaciji srčane frekvencije i akcijskom potencijalu (Desmoplakin (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Antigen CD44** (CD 44, od eng. *Antigen CD44*) je adhezijska molekula koja se nalazi na staničnoj površini. Djeluje kao integralni protein stanične membrane. Važnu ulogu ima u međusobnim interakcijama stanica i stanične tekućine. Izvanstanična komponenta CD 44 u interakciji je s molekulama izvanstaničnog prostora kao što su hijaluron (HA), citokini, faktori rasta, kolagen i proteaze. U interakciji s tim molekulama CD44 služi kao nosač za prijenos signala molekulama koje sadrže membranske proteaze i receptorske kinaze. Antigen CD 44 usklađuje signalne puteve koji određuju aktin-posredovano remodeliranje citoskeleta važnog za staničnu migraciju i adheziju (CD 44 antigen (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Mucin 1** (MUC1., od eng. *Mucin 1*) ima dvostruka svojstva i može imati aktivnost adhezijskog i antiadhezijskog proteina. Beta podjedinica sudjeluje u međustaničnoj signalizaciji. Mucin 1 sudjeluje u vezanju i prijenosu signala antigena p53, potiče acetilaciju histona H4, a specifičnim vezanjem na DNA sudjeluje u regulaciji transkripcije (Mucin 1 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

Apoptoza predstavlja fiziološki proces koji otklanjanjem odumrlih stanica održava homeostazu u organizmu. Međutim, apoptoza može biti i patološka, a to je najčešće kada je njezina aktivnost prekomjerno suprimirana. Pojačana apoptoza kod EME je nužan proces kako bi se otklonile ekstrauterine endometrijske stanice iz peritonealnog prostora. Proteini čija je glavna aktivnost apoptoza uglavnom su eksprimirani u povećanoj koncentraciji u EME. Aktivnost proteina koji



sudjeluju u apoptozi kod EME nije dovoljno izražena, jer ekstrauterine endometrijske stanice pokazuju povećanu otpornost prema apoptozi. Veća aktivnost i smanjena učinkovitost apoptoze najvjerojatnije nastaje zbog utjecaja drugih faktora koji sudjeluju u etiopatogenezi EME. Klasterin, tetraspanin-1, aneksin A2 i cink-alfa-2-glikoprotein su proteini koji imaju aktivnost apoptoze i pojačano su eksprimirani u proteomu urina kod EME (Rohne i sur., 2016.; Konrad i sur., 2016.; Nazri sur., 2020.; Shin i sur., 2021.; Anastasiu i sur., 2020.)

**Klasterin** (CLU, SPG2, TRPM-2, ApoJ, Apolipoprotein J, od eng. *Clusterin*) je apolipoprotein čija stanična izoforma pojačava apoptozu. Izvanstanična izoforma sprječava agregaciju proteina, štiti komplementom stanice od citolize i smanjuje apoptozu. Unutarstanična izoforma stabilizacijom mitohondrijske membrane postiže supresiju apoptoze. Ima važnu ulogu u metaboliziranju imunskih kompleksa koji nastaju tijekom staničnog oštećenja (Clusterin (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Tetraspanin-1** (TSPAN 1, od eng. *Tetraspanin 1*) pripada skupini proteina koji imaju četiri transmembranske domene i sudjeluju u mnogim staničnim reakcijama. Tetraspanini se izravno i specifično vežu s proteinima i drugim tetraspaninima. Njihovo međusobno povezivanje stvara hijerarhijski kaskadni niz interakcija koje potiču razdvajanje stanica i membrane (Charrin i sur., 2014.; Tetraspanin-1 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Aneksin A2** (ANXA2, od eng. *Annexin A2*) član je obitelji aneksina. Izlučuje se u stanicama koštane srži, mononuklearnim leukocitima, makrofagima, endotelnim stanicama i nekim stanicama tumora. Ima ulogu u proliferaciji i diferencijaciji stanica, prijenosu međustaničnog signala, apoptozi i upali (Li i sur., 2015., Annexin A2 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Cink-alfa-2-glikoprotein** (AZGP1, od eng. *Zinc-alpha-2-glycoprotein*) sudjeluje u antigenskim reakcijama i detekciji gorkog okusa, posreduje staničnu adheziju i suprimira staničnu proliferaciju (Zinc-alpha-2-glycoprotein Protein knowledgebase-UniProtKB).

Stanice u tijelu imaju potrebu za dobrom krvnom opskrbom kako bi se pravilno oksigenirale i dobivale hranjive tvari. Distribucija krvožilnog sustava ima važnu ulogu i u preživljavanju ektopičnih endometrijskih stanica u EME.

Neadekvatna vaskularizacija dovodi do smrti stanice i apoptoze. Otpornost na apoptozu i dobra vaskularizacija potiču rast i razvoj ekstrauterinih endometrijskih stanica kod EME i imaju učinak u progresiji bolesti. Lumican, endoglin, receptor B6 efrina, alfa lanac fibrinogena, oligomerni protein hrskavičnog matriksa, angiotenzin i tenascin su proteini u urinu koji svojim

koncentracijama iskazuju moguću ulogu u etiopatogenezi EME (Irungu i sur., 2019.; Chen i sur., 2019.; Liang i sur., 2021.; Janše i sur. 2021.)

**Lumikan** (LUM, od eng. *Lumican*) je član obitelji proteoglikana bogatih aminokiselinom leucin. Nalazimo ga u izvanstaničnom prostoru brojnih tkiva. Zastupljen je u mišićima, koži, hrskavici i rožnici. U koži je prisutan u obliku glikoproteina. Ima važnu aktivnost u procesu fibrinogeneze kolagena (Brézillon i sur., 2013.; Lumican (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Endoglin** (ENG, od eng. *Endoglin*) je vaskularni membranski glikoprotein koji se nalazi u endotelu krvnih žila i regulira angiogenezu. Nalazi se na površini stanica i predstavlja domenu TGF- $\beta$  receptora. Iznimno je važan u krvožilnom sustavu za održavanje normalne funkcije i strukture. Migracija i neoangiogeneza je pod kontrolom endoglina. U ranom embrionalnom razvoju u vrijeme angiogeneze ENG regulira vaskularno remodeliranje (Castonguay i sur., 2011.; Nolan-Stevaux i sur., 2012.; Endoglin (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Receptor 6 efrina B** (EPH B6, od eng. *Ephrin type-B receptor 6*) je efrinski receptor koji pripada najvećoj skupini receptorskih tirozin kinaza za molekule skupine efrina B (Ephrin type-B receptor 6 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Alfa lanac fibrinogena** (FGA, od eng. *Fibrinogen alpha chain*) je protein koji stvara netopivi fibrin u zajedničkom djelovanju i polimerizaciji s fibrinogenom gama (FGG) i fibrinogenom beta (FGB). Fibrin je jedna od glavnih komponenti krvnih ugrušaka i ima važnu ulogu u hemostazi (Fibrinogen alpha chain (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Oligomerni protein hrskavičnog matriksa** (COMP, od eng. *Cartilage oligomeric matrix protein*) u interakciji s fibronektinom i kolagenom održava strukturni integritet hrskavice. Suprimira apoptozu u primarnim hondrocitima blokiranjem aktivnosti kaspaze-3 i aktivacijom obitelji inhibitora apoptoze (IAP). Posreduje interakcije hondrocita s hrskavičnim izvanstaničnim prostorom pomoću integrinskih receptora (Cartilage oligomeric matrix protein (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Angiotenzin** (AGT, od eng. *Angiotensinogen*) važna je komponenta renin-angiotenzinskog sustava (RAS) i snažan regulator krvnog tlaka. Razlikujemo nekoliko podtipova angiotenzina. Angiotenzin 2 je vazokonstriktor, stimulira lučenje hormona aldosterona, a djelovanjem na simpatički živčani sustav regulira srčanu aktivnost. Angiotenzin 3 aktivira lučenje aldosterona iz nadbubrežne žlijezde (Angiotensinogen (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).



**Tenascin** (TNC, od eng. *Tenascin*) se nalazi u ekstracelularnom prostoru. Ligand je za integrine alfa-8/beta-1, alfa-9/beta-1, alfa-V/beta-3 i alfa-V/beta-6. U tumorima stimulira adheziju i neoangiogenezu (Tenascin (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

Smatra se da je oksidativni stres jedan od važnijih faktora u progresiji EME. Nastaje zbog neravnomjernog odnosa između slobodnih kisikovih radikala i antioksidansa. Kod EME dolazi do promjena u aktivnosti imunološkog sustava i aktivacije drugih faktora koji pridonose otpornosti ektopičnih endometrijskih stanica na oksidacijski stres. Antioksidansi štite stanice od oksidacijskog oštećenja. Afamin, superoksid dismutaza Cu-Zn, kromogranin i peroksiredoksin 2 su proteini u urinu kod EME, a imaju aktivnost proteina koji smanjuju oksidacijski stres (Nasladek i sur., 2020.; Amreen i sur., 2019.; Turgut i sur., 2013.; Yu i sur. 2020.).

**Afamin** (AFM, od eng. *Afamin*) je glikoprotein koji pripada skupini albumina, metabolizira se putem jetre i izlučuje u krv. Nalazimo ga u plazmi, folikularnoj i sjemennoj tekućini, a može se eksprimirati i u cerebrospinalnom likvoru. U tjelesnim tekućinama AFM ima funkciju nosača hidrofobnih molekula i iznimno je važan u aktivnosti lipidnih molekula obitelji Wnt. Veže iona cinka, masnih kiselina i vitamina E (Dieplingerab i sur., 2015.). Vitamin E je dio obitelji antioksidansa koji imaju neenzimsku funkciju. U ekstravaskularnim tekućinama vitamin E je aktivan uz proteinski nosač afamin (Afamin (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Superoksid dismutaza (Cu-Zn)** (SOD1, Cu-Zn SOD, od eng. *Superoxide dismutase (Cu-Zn)*) predstavlja jedan od vrlo važnih enzimskih antioksidansa. Svojom aktivnošću ima sposobnost neutraliziranja superoksida i štiti različita tkiva od oksidacijskog oštećenja. Možemo ga naći u dvije izoforme, a to su intracelularni dimer Cu-Zn-SOD (SOD1) i ekstracelularni tetramer Cu-Zn-SOD (SOD3). Ovisno o izoformi glavnu aktivnost ima u citoplazmi (SOD1) ili izvanstaničnom prostoru (SOD3). Pozitivno regulira reakcije signalnog puta apoptoze koje uzrokuju oksidacijski stres (Lewandowski i sur., 2019.; Superoxide dismutase (Cu-Zn) (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Kromogranin A** (CHGA, CgA, od eng. *Chromogranin A*) pripada obitelji granina. Stvara se u ribosomima kao pre-protein gdje prolazi kroz posttranslacijske modifikacije. Pohranjen je u vezikulama endokrinih i imunskih stanica te u perifernim neuronima (Gkolfinopoulos i sur., 2017.). Kromogranin A ima aktivnost čistača slobodnih radikala, a može potaknuti proizvodnju citokina, migraciju mastocita i ekspresiju kemokina (Kromogranin A (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Peroksiredoksin 2** (PRDX2, od eng. *Peroxiredoxin-2*) je specifičan za tiol koji katalizira reakciju organskih hidroperoksida i redukciju vodikovog peroksida u alkohol i vodu. Štiti stanice od oksidacijskog stresa. Reguliranjem unutarstanične koncentracije vode sudjeluje u signalnim putevima faktora rasta i faktora tumorske nekroze-alfa (Peroxiredoxin-2 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

Proteini histon H1-4, histon H3-1, haptoglobin i hepcidin najvjerojatnije imaju važnu ulogu u nastanku EME (Hsiao i sur., 2017.; Samartzis i sur., 2013.; Kobayashi, 2016.; Hwang JH sur. 2014.).

**Histon H1.4** (H1-4, od eng. *Histon H1.4*) veže se između nukleosoma u DNA molekuli i tvori molekularnu strukturu nazvanu kromatinsko vlakno. Funkcija mu je regulacija transkripcije gena i remodeliranje kromatina te određivanje međusobnog razmaka nukleosoma i metilacija DNA. U određenim uvjetima sudjeluje u negativnoj regulaciji destrukcije kromatina i rekombinaciji DNA te apoptozi induciranoj fragmentacijom DNA. Histoni H1 se tijekom staničnog ciklusa kontinuirano fosforiliraju. Maksimalnu fosforilaciju dostižu u G2 fazi nakon čega slijedi njihova nagla defosforilizacija (Leidecker i sur., 2016.; Vaquero i sur., 2004.; Histon H1.4 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Histon H3.1** (H3C1, H3-1, od eng. *Histon H3.1*) je osnovni dio nukleosoma. Funkcija nukleosoma je zbijanje DNK u kromatin. Histoni stoga imaju središnju ulogu u regulaciji transkripcije, popravku DNA, replikaciji DNA i kromosomskoj stabilnosti. Koncentracija DNK je regulirana složenim skupom posttranslacijskih modifikacija histona, također zvanih histonski kod i remodeliranjem nukleosoma (Histon H3.1 (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Haptoglobin** (HP, od eng. *Haptoglobin*) je protein koji nastaje kao rezultat hemolize. Hem se nakuplja u bubrezima i izlučuje mokraćom. Haptoglobin veže slobodan hemoglobin u plazmi kako bi omogućio jetreno metaboliziranje hema i spriječio oštećenje bubrega. Aktivnost haptoglobina se očitava i u funkciji antioksidansa, a ima i ulogu u imunom odgovoru kod akutnih stanja. Nastali kompleks hemoglobin/haptoglobin izlučuje se iz organizma putem receptora za vezanje makrofaga koji se eksprimira na površini Kupferovih stanica jetre. (Haptoglobin (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

**Hepcidin** (HAMP, od eng. *Hepcidin*) je protein koji se uglavnom izlučuje u hepatocitima. Najvažniji je vaskularni regulator distribucije i apsorpcije željeza u raznim tkivima. Adipociti, makrofagi i mozak izlučivanjem hepcidina imaju važnu ulogu u autokrinoj i parakrinoj regulaciji željeza na lokalnoj razini. Hepcidin se metabolizira putem bubrega i izlučuje urinom.

Kod uredne bubrežne funkcije koncentracije hepcidina u urinu su gotovo jednake s koncentracijama u serumu (Billesbolle i sur., 2020.; Aschemeyer i sur., 2018.; Nemeth i sur., 2009.; Hpcidin (nd) Protein knowledgebase-UniProtKB).

U Tablici 1. prikazana su tkiva i tekućine (eutopični i ektopični endometrij, peritonealna tekućina i stjenka, cervikalna sluz, folikularna tekućina, serum i urin) u kojima su pokazani navedeni proteini u uzorcima s EME.

Tablica 1. Stanice tkiva i tekućina u kojima su u dosadašnjim istraživanjima analizirani proteini u uzorcima s ekstrauterinom migracijom endometrija.

<b>Naziv proteina</b>	<b>Analizirani uzorci</b>
<b>IL1RN</b>	Peritonealna tekućina (Wyatt i sur., 2021.).
<b>IL10RB</b>	Nema podataka
<b>IL6ST</b>	Eutopični endometrij (Li i sur., 2017.; Sherwin i sur., 2008.).
<b>IL18BP</b>	Nema podataka
<b>C3</b>	Serum i peritonealna tekućina (Agostinis i sur., 2021.; Sikora i sur., 2018.)
<b>C4A</b>	Serum i peritonealna tekućina (Agostinis i sur., 2021.; Sikora i sur., 2018.)
<b>C5</b>	Serum i peritonealna tekućina (Agostinis i sur., 2021.)
<b>C7</b>	Eutopični i ektopični endometrij, peritonealna tekućina (Agostinis i sur., 2021.)
<b>C8</b>	Serum i peritonealna tekućina (Agostinis i sur., 2021.)
<b>C9</b>	Serum i peritonealna tekućina (Agostinis i sur., 2021.)
<b>CFB</b>	Eutopični i ektopični endometrij (Suryawanshi i sur., 2014.).
<b>CFH</b>	Eutopični i ektopični endometrij (Suryawanshi i sur., 2014.).
<b>ICOSLG</b>	Peritonealna tekućina (Perricos i sur., 2020.).
<b>TGFBR2</b>	Serum i ektopični endometrij (Chen i sur., 2019.)
<b>CSF1</b>	Serum (Anastasiu i sur., 2020.; Borrelli i sur., 2014.)
<b>GAL9</b>	Serum (Kovácsa i sur., 2021.)
<b>CatB</b>	Eutopični i ektopični endometrij (Kim i sur., 2013.; Laudanski i sur., 2013.)
<b>CatD</b>	Serum i peritonealna tekućina (Protopapas i sur., 2010.; Suzumori i sur., 2005.)
<b>CatG</b>	Eutopični i ektopični endometrij (Grzywa i sur., 2014.; Laudanski i sur., 2013.).
<b>CatL1</b>	Ektopični endometrij i peritonealno tkivo (Porter i sur., 2016.)

Nastavak „Tablica 1.“

<b>MMP9</b>	Serum, eutopični i ektopični endometriji i peritonealna tekućina (Liu i sur., 2015.; Huang i sur., 2004.; Szamatowicz i sur., 2002.)
<b>TIMP2</b>	Serum, eutopični i ektopični endometriji i peritonealna tekućina (Kuan i sur., 2021.; Madjid i sur., 2020.; Kodarahmian i sur., 2019.)
<b>SERPING1</b>	Folikularna tekućina, eutopični i ektopični endometriji (Rekker i sur., 2017.)
<b>MASP2</b>	Peritonealna tekućina (Agostinis i sur., 2021.; Sikora i sur., 2018.)
<b>EPS8L2</b>	Nema podataka
<b>SPINK5</b>	Nema podataka
<b>SPINT2</b>	Nema podataka
<b>MBTPS1</b>	Nema podataka
<b>TMPRSS2</b>	Nema podataka
<b>PRSS8</b>	Nema podataka
<b>IGFBP-2</b>	Peritonealna i folikularna tekućina (Kim i sur., 2000.; Jin i sur., 2020.)
<b>IGFBP-3</b>	Peritonealna i folikularna tekućina (Kim i sur., 2000.; Jin i sur., 2020.)
<b>IGFBP-7</b>	Serum i eutopični endometriji (Kutsukake i sur., 2008.; Kim i sur., 2000.)
<b>IGFLR-1</b>	Nema podataka
<b>GAS6</b>	Eutopični i ektopični endometriji (Sun i sur., 2002.)
<b>TYRO 3</b>	Eutopični i ektopični endometriji (Sun i sur., 2002.)
<b>EZR</b>	Eutopični i ektopični endometriji (Jiang i sur., 2012.; Song i sur., 2020.)
<b>ICAM-1</b>	Urin, serum, peritonealna stjenka i tekućina, eutopični i ektopični endometriji (Proestling i sur., 2020.; Gupta i sur., 2006.; Kuessel i sur., 2017.)
<b>VCAM-1</b>	Serum, peritonealna stjenka i tekućina, eutopični i ektopični endometriji (Kuessel i sur., 2017.)
<b>SPARCL1</b>	Serum, eutopični i ektopični endometriji (Gerarduzzi i sur., 2020.)
<b>THBS1</b>	Eutopični endometriji (Liu i sur., 2020.)
<b>SELL</b>	Eutopični i ektopični endometriji, peritonealna tekućina (Choi i sur., 2017.; Palomino i sur., 2007.)
<b>PCDHGC3</b>	Nema podataka
<b>PDCH1</b>	Nema podataka
<b>DSP</b>	Nema podataka
<b>CD44</b>	Eutopični i ektopični endometriji (Knudtson i sur., 2016.; Usta i sur., 2020.)

Nastavak „Tablica 1.“

<b>MUC1</b>	Serum, ektopični endometrij i peritonealna tekućina (Kralíčková i sur., 2015.; Vlad i sur., 2006.).
<b>CLU</b>	Cervikalna sluz (Konrad i sur., 2016.)
<b>ESPA1</b>	Serum (Shin i sur., 2021.)
<b>ANXA2</b>	Serum, ektopični endometrij i peritonealna tekućina (Nazri i sur., 2020.; Zhou i sur., 2012.).
<b>AZGP1</b>	Serum (Anastasiu i sur., 2020.; Crapper i sur., 2016.; Signorile i sur., 2016.).
<b>LUM</b>	Eutopični i ektopični endometrij (Irungu i sur., 2019.)
<b>ENG</b>	Eutopični i ektopični endometrij (Chen i sur., 2021.; Gupta i sur., 2006.).
<b>EPH B6</b>	Eutopični i ektopični endometrij (Faizullin i sur., 2021.)
<b>FGA</b>	Serum, eutopični i ektopični endometrij (Li i sur., 2020., Chen i sur., 2019.)
<b>COMPT</b>	Peritonealna tekućina (Janše i sur., 2021.)
<b>AGT</b>	Peritonealna tekućina (Janše i sur., 2021.)
<b>TNC1</b>	Eutopični i ektopični endometrij (Irungu i sur., 2019.; Tan i sur., 2008.)
<b>AFM</b>	Serum i peritonealna tekućina (Seeber i sur., 2010.)
<b>SOD1</b>	Serum, eutopični endometrij i peritonealna tekućina (Nasladek i sur., 2020.; Amreen i sur., 2019.; Turgut i sur., 2013.).
<b>CHGA</b>	Serum, eutopični i ektopični endometrij (Tsao i sur., 2007.)
<b>PRDX2</b>	Eutopični i ektopični endometrij (Yu i sur., 2020.)
<b>H1-4</b>	Eutopični i ektopični endometrij (Monteiro i sur., 2014.)
<b>H3-1</b>	Eutopični i ektopični endometrij (Monteiro i sur., 2014.)
<b>HP</b>	Serum, eutopični i ektopični endometrij (Sharpe-Timms i sur., 2010.)
<b>HAMP</b>	Serum i peritonealna tekućina (Hwang i sur., 2014.)

### 3. UZORCI I METODE

#### 3.1. Uzorci

U istraživanje su uključeni uzorci urina i krvi 150 pacijentica koje su bile predviđene za kirurško liječenje u Klinici za ginekologiju i porodništvo KBC Rijeka zbog oboljenja jajnika od kojih je zadovoljavajući uzorak za daljnje istraživanje imala 141 pacijentica. Dan prije planiranog kirurškog zahvata od svake pacijentice je uzet uzorak prvog jutarnjeg urina i krvi. Uzorci su podijeljeni nakon kirurškog zahvata u dvije osnovne skupine: skupina s EME (N = 84) i kontrolna skupina bez EME (N = 57).

Pacijentice su bile u dobi od 25-35 g, u folikularnoj fazi menstruacijskog ciklusa i nisu imale druge bolesti, stanja i navike koje bi mogle utjecati na razinu proteina CYFRA 21-1 u urinu i serumu (npr. pušenje cigareta). Isključni kriteriji za sudjelovanje u istraživanju su bile: postojeća akutna i kronična infekcija u organizmu, bolesti probavnog sustava, žučnih vodova i jetre, bolesti pluća i urinarnog sustava, ulkus želuca, autoimune bolesti, te maligne bolesti dojke, pluća, debelog crijeva i štitne žlijezde. Dijagnoza EME potvrđena je kirurški (stadij bolesti) i patohistološki. Nakon kirurškog liječenja i patohistološke potvrde EME, uzorci urina i krvi su također podijeljeni u dvije skupine po istom principu.

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Kliničkog bolničkog centra Rijeka, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

##### 3.1.1. Urin

Za potrebe kemijske i biokemijske analize urina korišteno je 20 ml prvog jutarnjeg urina. Analiziran je prvi jutarnji urin kako bi uzorak bio što koncentriraniji, odnosno kako bi u njemu bilo što više proteina koji se izlučuju u mokraću bubrežnom filtracijom. Ovisno o dokazanom stadiju EME uzorci su podijeljeni u dvije podskupine. U podskupini rASRM I-II (minimalni do srednji stadij EME) prikupljena su 42 uzoraka urina i u podskupini s višim stadijem bolesti i dubokom EME (rASRM III-IV) 42 uzoraka urina. Kontrolnu skupinu uzoraka činilo je ukupno 57 urina dobivenih od pacijentica bez EME.

### 3.1.2. Krv

Za potrebe biokemijske analize korišteno je 5 ml krvi. Krv je prikupljena venepunkcijom i pohranjena u biokemijskim epruvetama bez antikoagulansa (BD vacutainer systems-7ml, Plymouth, UK). Ovisno o dokazanom stadiju EME uzorci su podijeljeni u dvije podskupine. U grupi rASRM I-II (minimalni do srednji stadij EME) prikupljena su 42 uzoraka krvi i 42 uzoraka krvi kod višeg stadija bolesti i dubokom EME (rASRM III-IV). Kontrolnu skupinu činilo je ukupno 57 uzoraka krvi dobivenih od pacijentica bez EME.

### 3.1.3. Predanalitička priprema urina i krvi

Uzorci urina i krvi obrađeni su za potrebne analize na sljedeći način:

- a) Nakon odvajanja 20 ml urina uzorak je centrifugiran 30 min na 3500 rpm (Hettich centrifuge, Universal 320/320 R Andreas Hettich GmbH & Co., Tuttlingen, Germany). Talog koji nastaje centrifugiranjem se baca, a supernatant urina dalje obrađuje.
- b) Manji dio supernatanta urina (5 ml) je u zatvorenim biokemijskim epruvetama bez antikoagulansa bez daljnje obrade je pohranjen u hladnjaku na -80 °C za daljnju analitiku metodama ELISA, tekućinskom kromatografijom i spektrometrijom masa.
- c) Preostali supernatant urina se dalje pripremao do proteinskih taloga na sljedeći način.
  - 1) Acetonu (dipropanon, dimetil-keton) se dodao TTC (trikloroctena kiselina) i DDT (diklor-difenil-trikloretran) u omjeru 10% TCA i 3% DTT (Dithiothreitol - empirijska formula -C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>) na ukupnu količinu acetona.
  - 2) Dobivena otopina acetona (dipropanon, dimetil-keton + trikloroctena kiselina + diklor-difenil-trikloretran) se miješala sa supernatantom urina u omjeru 1:3, odnosno dodaje se 3 puta veća količina otopine acetona u odnosu na količinu urina (npr. 7,5 ml urina + 20 ml otopine acetona).
  - 3) Urin s otopinom acetona pohranjen je u zatvorenim epruvetama u hladnjaku na -20°C u trajanju od minimalno 20 sati, a najviše 24 sata.
  - 4) Slijedilo je ponovno centrifugiranje urina 30 min na 3500 rpm.
  - 5) Uzorak se potom dekantirao, a dobiveni proteinski talog izvagao i dalje obrađivao.



- 6) Proteinskom talogu urina dodao se pufer za liziranje u omjeru 1:5, što znači da se na određenu količinu proteinskog taloga dodalo 5 puta više pufera za liziranje. Pufer za liziranje se sastoji od uree ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ), tiouree ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$ ), CHAPS-a ( $\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{SO}_7$  - M614,9 g/mol) i destilirane vode u omjeru 2,1g uree + 0,7612g tiouree + 0,2g CHAPS + destilirane vode do 5 ml ukupne količine otopine.
  - 7) Na ukupnu količinu proteinskog taloga urina s puferom za liziranje dodalo se 1 % proteaznih inhibitora.
  - 8) Tako pripremljeni proteinski talozi urina pohranjeni se u epruvetama u hladnjaku na  $-80^\circ\text{C}$  do daljnje obrade za sljedeće analitičke metode: određivanje proteina s Bradfordovim reagensom, 1DE, metode ELISA, *western blot*, izoelektrično fokusiranje, 2DE, tekućinsku kromatografiju i masenu spektrometriju.
- d) Nakon prikupljanja 5 ml uzoraka krvi, uzorak je u biokemijskim epruvetama bez antikoagulansa odstajao 30 minuta, a potom je centrifugiran 30 min na 3500 rpm (Hettich centrifuge, Universal 320/320 R Andreas Hettich GmbH & Co., Tuttlingen, Germany). Odvojeni serum pohranjen je na  $-80^\circ\text{C}$  do daljnje obrade za analiziranje ECLIA metodom.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Određivanje koncentracije proteina u urinu metodom Bradford

Za proteomske analize proteina u urinu prethodno je određivana koncentracija proteina Bradfordovim reagensom koja se pripravlja na klasičan način. Dobivena otopina Coomassie Brilliant Blue G-250 ima vrlo karakterističnu plavu boju i poznata je pod nazivom Bradfordov reagens (Noble i sur., 2014.). Kontrolu adekvatno izmjerene koncentracije proteina u analiziranom uzorku radimo na način da se prvo učine mjerenja u kivetama u kojima je slijepa proba (kiveta bez proteina). Slijepa proba sadrži destiliranu vodu u koju se dodaje Bradfordov reagens. Uz kivete sa slijepom probom stavlja se još šest kiveta sa standardima u kojima su razrijeđenja proteina od manje prema većoj koncentraciji. Standard je albumin goveđeg seruma BSA (od eng. *bovine serum albumin*) koja ima unaprijed određenu vrijednost koncentracije proteina ( $\gamma = 1 \text{ mg/mL}$ ) i u njega se također dodaje Bradfordov reagens. Na kraju se postavljaju kivete s analiziranim uzorcima u kojima je vrijednost koncentracije proteina nepoznat, a jednako kao i ostale kivete u njih se dodaje Bradfordov reagens. Tako pripremljene otopine slijepa probe različitih razrijeđenja standarda i analiziranih uzoraka mjeri se absorbancija u



kivetama iz koje se izračunava koncentracija proteina iz dobivenog baždarnog dijagrama. Otopina sa standardnim proteinima (BSA) čuva se u hladnjaku na -20 °C, a upotrebljava na način da se sa super čistom destiliranom vodom i proteinima miješa u količini na standardni način. U ovom istraživanju uzorci proteinskih taloga su tretirani na gore opisan način (Spektrometar Varian Cary 100 i softver Cary WinUV, USA).

### 3.2.2. Izoelektrično fokusiranje proteina u urinu

Kod izoelektričnog fokusiranja potrebno je na IPG (od eng. *immobilized pH gradient*) strip staviti točno određenu količinu proteina koja je ranije izračunata. Količine se razlikuju ovisno o načinu kasnijeg bojenja gelova. U ovom istraživanju korištena je boja Coomassie Brilliant Blue G250 te je određena količina proteina prema osjetljivosti detektiranja CBB boje. Korišteni su gelovi (stripovi) *Immobiline Dry Strip* dužine 13 cm i pH raspona 3-11. (GE Healthcare, *Immobiline DryStrip pH 3-10*, 13 cm, Bio-Sciences AB SE-751 84, Sweden). Na svaki IPG strip stavlja se 250 µL ukupne količine otopine (proteini 50 µL, IPG puffer 0,5% od ukupne količine volumena, DTT 1% od ukupne količine volumena i rehidracijska otopina do volumena 250 µL. Sastojak IPG pufera su amfoliti koji se kovalentno vežu za gel i održavaju pH vrijednost između 3 i 11. Za pripremu rehidracijske otopine potrebni su: urea 2,1g, tiourea 0,7612g, CHAPS 0,1g, nekoliko kapi bromfenol modrog (3',3'',5',5''-tetrabromophenolsulfonephthalein - empirijske formule C<sub>19</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S) i do 5 ml destilirane vode. Dobivena otopina proteina i reagensa se ravnomjerno raspoređi na cijelu površinu nosača stripa koji je označen brojem. Potrebno je upariti broj IPG stripa s uzorkom proteina koji se analizira. Kod postavljanja IPG stripa u nosač treba paziti da je strana s gelom okrenuta prema otopini proteina. Na krajevima nosača stripa i samim IPG stripovima su oznake za katodnu elektrodu koje se trebaju dodirivati. Kako bi se izbjeglo isušivanje stripa za vrijeme izoelektričnog fokusiranja postavlja se na strip uljasta tekućina (od eng. *Dry strip cover fluid*). Nosač stripa se poklopi i stavi u uređaj za izoelektrično fokusiranje. U aparatu za izoelektrično fokusiranje potrebno je na uređaju odabrati temperaturu 20 °C i relativnu vlažnost do 70 % kako bi se izbjegla kondenzacija vlage na površini platforme. U slučaju nastanka kondenzacije platforme potrebno je smanjiti relativnu vlažnost ili temperaturu. U ovom istraživanju korišten je sustav za fokusiranje (GE Healthcare Bio-Sciences AB Björkgatan 30 751 84, Ettan IPGphor 3 IEF Isoelectric Focusing System Cytiva in Schönwalde-Glien, Germany).

Postupak IEF-a ima 7 koraka i započinje rehidracijom zato jer su stripovi u dehidriranom stanju i potrebno ih je rehidrirati. Taj postupak traje 12 sati i tijekom njega se proteini vežu za gel.

Nakon rehidracije započinje izoelektrično fokusiranje. U tablici su prikazane pojedine faze IEF-a s električnim potencijalima i trajanjem svakog koraka (Tablica 2.).

Tablica 2. Pojedine faze u procesu elektroforeze

Redni broj koraka	Razlika potencijala	Vrijeme	Način postizanja razlika potencijala
1. korak	50 V	1 sat	Izokratno
2. korak	200 V	1 sat	Izokratno
3. korak	500 V	1 sat	Izokratno
4. korak	1000 V	1 sat	Gradijentno
5. korak	8000 V	2 sata i 30 minuta	Gradijentno
6. korak	8000 V	30 minuta	Održavanje
7. korak	200 V	10 sati	-----

### 3.2.3. Zonska elektroforeza proteina u urinu

U ovom istraživanju korišteni su 12% gelovi dimenzija 16x16 cm. Rađena su dva gela u jednom nosaču prema sljedećem omjeru (ddH<sub>2</sub>O 60,2 ml, Akrlamid/bisakrlamid 42,0 ml, Tris/HCl pH 8,8 35,0 ml, 10% SDS 1,4 ml, 10% APS 1,4 ml i TEMED 56 µL. Nakon što se pripremila otopina dodavanjem inicijatora polimeziranja (APS i TEMED) ulije se u nosač u kojem će se gel polimerizirati. Na površinu otopine stavi se malo izopropanola u cilju što pravilnije i ravnije površine gela nakon kompletne polimerizacije. Vrijeme koje je potrebno da bi se gel kompletno polimerizirao je oko 5 sati i za to vrijeme stoji na sobnoj temperaturi. Stripove s proteinima nakon izoeletričkog fokusiranja treba prije elektroforeze rehidrirati u ekvilibracijskim otopinama (6M urea 86,4g, SDS 4,8g, 30% glicerol 72 ml, 50mM Tris/HCl pH 8,8 8 ml i super čista destilirana voda do 240 ml otopine). U 14 ml ekvilibracijske otopine se doda 0,14 g DTT-a (dithiothreitol), a u drugih 14 ml ekvilibracijske otopine 0,35 g IAA (jodoacetic acid-empirijska formula ICH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H). Stripovi se po 15 minuta rehidriraju u svakoj otopini, prvo u otopini u kojoj je DTT, a potom otopina sa IAA. Potom se stripovi postavljaju na površinu gela kao i marker nosač standarda proteina (mješavina proteina poznate molekularne mase). Kako bi se IPG strip s proteinima učvrstio na površini gela preko njega se stavi 2 ml 0,5 % agaroze (agarotetraoza - empirijske formule C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>O<sub>19</sub>) u SDS puferu te boja bromfenol plavo (3',3'',5',5''-Tetrabromophenolsulfonephthalein) za lakše praćenje procesa elektroforeze. Nosači gela sa stripovima se stavljaju u kadicu za elektroforezu i dodaje se pufer za anodu i katodu koji se stavlja u oba elektroforetska odjeljka, odnosno u kadicu za elektroforezu i u prostor nosača gela. U kadicu se stavi potrebna količina 1X SDS pufera (Tris 30g, glicin 144g,

SDS 10g i super čista destilirana voda do 1000 ml) , a u nosač gelova 2 x SDS pufera. Na taj način se zatvara strujni krug anode i katode. Spoje se elektrode na poklopac kadice i započinje proces elektroforeze. Proces traje nekoliko sati i dijelimo ga u dvije faze koje se razlikuju po jačini struje. Prva faza traje oko 20 minuta, snaga struje je 1W po gelu i to je vrijeme kada proteini sa stripa prelaze u gel. U drugoj fazi proteini ovisno o svojoj molekularnoj masi pod utjecajem struje snage 12W po gelu putuju kroz gel. Poroznost gela ima funkciju poput sita za molekule na način da molekule manje molekularne mase putuju brže kroz gel, dok one s većom molekularnom masom imaju sporiji i kraći put. Gel je u tom slučaju nosač za mobilnu fazu i smanjuje toplinsko djelovanje struje na molekule (Šterbić, 2013.).

Puferi korišteni tijekom dvodimenzionalne elektroforeze čine postupak efikasnijim. Tris-HCl pH 8,8 ima funkciju održavanja potrebnog pH raspona za vrijeme elektroforeze, urea i glicerol sudjeluju u boljem prijenosu proteina sa stripa na gel, na prekidanje disulfidnih veza u proteinu utječe DDT, a SDS regulira električni naboj proteina, dok IAA sprječava nastanak proteinskih mrlja i pruga na gelu (Stochaj, 2006.). Agarozni gelovi imaju veće pore i namijenjeni su za separiranje molekula veće molekularne mase dok poliakrilamidni gelovi zbog manjih pora separiraju molekule manje <200 bp te su vrlo dobri za analizu proteina male molekularne mase (Saraswathy, 2018.). U ovom istraživanju je korišten aparat za napajanje sustava elektroforeze Consort EV (Consort EV series power supplies EV243, Sigma Aldrich, Germany).

#### 3.2.4. Coomassie Brilliant blue G-250 metododa bojenja gelova

Proteini koji su razdvojeni u postupku 2DE na gelu bezbojni su i nisu vidljivi golim okom te ih je potrebno obojati kako bi se mogli vizualizirati. Korištena je metoda bojenja gelova koloidalnim Coomassie brilliant blue G-250 pri čemu se organsko bojilo veže za makromolekule proteina (Piljac, 2006.).

Gelovi se kroz najmanje 3 sata ili preko noći fiksiraju u otopini (50% etanol i 3% fosforna kiselina). Nakon što gelovi odstoje u otopini za fiksiranje ispiru se s ddH<sub>2</sub>O tri puta, a u svakoj ispranoj ddH<sub>2</sub>O odstoje 20 minuta. Gelove je potom potrebno predinkubirati (170g amonijevog sulfata se otopi u 30 ml 85% fosforne kiseline, 340 ml metanola i ddH<sub>2</sub>O do 1000ml). U tako pripremljenoj otopini gelovi se predinkubiraju 60 minuta, a nakon toga u otopinu dodajemo 0,35 g Coomassie blue G-250 gdje gelovi odstoje 4-5 dana. Protekom vremena od 5 dana gelovi se ispiru s ddH<sub>2</sub>O kako bi se isprao višak boje, a na gelovima ostanu jasno iscrtane proteinske

mrlje. Bojenje gelova predstavlja kvalitativnu analizu proteina u uzorku koje je potrebno kvantitativnom metodom obraditi kao što je masena spektrometrija.

### 3.2.5. Jednodimenzionalna gel - elektroforeza proteina u urinu

Kvantitativno određivanje proteina 1DE rađeno je za provjeru kvalitete predanalitičke pripreme proteinskih taloga urina. Dobra kombinacija veličine pora u poliakrilamidnom gelu i molekularnih masa proteina određuje brzinu kretanja proteina i predstavlja jednu od važnijih komponenti u planiranju postupka elektroforeze (Gallagher, 2007.). Nakon što se napravi poliakrilamidni gel i ulije u sustav za elektroforezu na vrhu gela stave se „češljevi“ koji će stvoriti udubine u koje se unose uzorci proteina. Češljevi se uklanjaju nakon što se gel dobro polimerizirao (Garfin, 1990.). Opisana metoda elektroforeze proteina daje nam informacije o čistoći uzoraka, količini i molekularnoj masi proteina. Selektirani proteini izvlačenjem iz poliakrilamidnih gelova mogu se dalje obrađivati različitim kvantitativnim analitičkim metodama poput spektrometrije masa (Gallagher, 2012.). U ovom istraživanju za jednodimenzionalnu elektroforezu korišten je sustava za elektroforezu (Bio-Rad Hercules, CA, SAD).

### 3.2.6. Masena spektrometrija proteina u urinu

Proteinski talozi u puferu za lizu E = uzorci urina skupine s endometriozom i K = uzorci urina kontrolne skupine (urea + tiourea + Chaps (7M+2M+4%) i 1% inhibitori proteaze. Omjer = talog : pufer za lizu = 1:5. Proteinski talozi bez pufera za lizu E-P = uzorci urina skupine s endometriozom i E-K = uzorci urina kontrolne skupine. Kako bi se proteinski talozi očistili za masenu spektrometriju otopljeni su u 100 µl pufera uree. Supernatant se filtrirao s filterom za proteine (> 3 kDa MWCO – od eng. *molecular weight cutoff*). Dobiveno je oko 50 µl očišćenog uzorka proteina svakog urina (E-P= 1,65 µg/µl, ukupan uzorak 50 µl, ukupno proteina 2,3 µg, K-P = 1,25 µg/µl, ukupan uzorak 50 µl, ukupno proteina 62,3 µg, E = 0,07 µg/µl, ukupan uzorak 100 µl, ukupno proteina 6,6 µg, K = 0,10 µg/µl, ukupan uzorak 100 µl, ukupno proteina 10,0 µg. Provedeno je razdavajanje proteina u uzorcima urinu i LCMS (od eng. *Liquid chromatography–mass spectrometry*) proteomska tehnika. Urini su analizirani s tekućinskom kromatografijom i masenom spektrometrijom (LC-MS/MS). Uzorci proteinskih taloga urina analizirani su pomoću UHPLC (od eng. *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*) - UHPLC 1290 sustava (Agilent, Santa Clara, California) spojenog na Orbitrap Q Exactive HF (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts), brzina nanoprotoka (~300 nL/min),

PepSep C18 analitičkom kolonom (15 cm, ID 75  $\mu\text{m}$ , 1,9  $\mu\text{m}$  Reprosil, 120Å). Nakon razdvajanja proteina urina tekućinskom kromatografijom uslijedila je analiza masenom spektrometrijom (Spektrometar 9.4 Tesla Fourierove transformacije ionske ciklotronske rezonancije, 9.4T MALDI/ESI SolariX Fourier Transform Ion Cyclotron). Rezultati su analizirani s MaxQuantom (verzija 1.6.17.0) s mogućnosti lažne detekcije  $<0,01$ . Identifikacija i kvantifikacija proteina analizirana je pomoću Proteome Discoverer verzije 2.2. tražilice Sequest.

### 3.2.7. Sendvič ELISA proteina u urinu

U ovom istraživanju korištena je metoda sendvič ELISA u vidu komercijalnog kompleta ELISA kita (Elabscience<sup>®</sup> Human CK-19/KRT19 /Cytokeratin 19/ELISA kit, Catalog No: E-EL-H2075 Houston, Texas) za detekciju CK-19/KRT19 odnosno za detekciju koncentracije proteina CYFRA 21-1 u urinu. Detekcija proteina CYFRA 21-1 je moguća već od 62.50 pg/mL. ELISA kit zajedno s reagensima do korištenja su pohranjeni u hladnjaku na temperaturi +4 °C, a za analizu su izvađeni na sobnu temperaturu +20°C oko 30 minuta. Uzorci proteinskih taloga urina pohranjeni su i čuvani u hladnjaku na -80 °C i obrađeni po prethodno opisanoj proceduri te su sporo odleživani na ledu. Određena je koncentracija proteina metodom ELISA, a uzorci su prethodno razrijeđeni 100 puta na način da se u 5  $\mu\text{L}$  uzorka stavi 495  $\mu\text{L}$  reagensa za razrjeđivanje uzoraka (od eng. *Sample diluent*). U prvom koraku potrebno je pripremiti sve reagense prema uputstvima proizvođača ELISA kita. Napravi se 750 mL pufera za ispiranje (od eng. *Wash buffer*) razrjeđivanjem 30 ml pufera sa 720 ml ddH<sub>2</sub>O. Standardna radna otopina (od eng. *Standard working solution*) se priređuje na sljedeći način: odmjeri se 1,0 ml reagensa koji sadrži referentni standard i razrjeđivač uzorka (od eng. *Referent standard & Sample Diluent*) i centrifugira na 10 000 x g dok se ne otopi, ostavi se 10 minuta i potom lagano promiješa. Zatim se naprave serijska razrijeđenja prema uputama proizvođača.

Koncentrirani reagens za detekciju (od eng. *Biotinylated Detection Ab working solution*) koji sadrži biotinizirana antitijela, centrifugira se na 800 x g 1 minutu te se razrijedi s radnom otopinom u omjeru 1:99. Izračuna se potrebna ukupna količina razrijeđenog reagensa s biotiniziranim antitijelima (od eng. *Biotinylated Detection Ab working solution*), jer se 50  $\mu\text{L}$  otopine stavlja u svaku jažicu. Koncentrirani konjugirani reagens radne otopine (od eng. *HRP Conjugate working solution*) centrifugira se na 800 x g 1 minutu te se razrijedi s konjugiranim razrjeđivačem (od eng. *HRP Conjugate Diluent*) u omjeru 1:99. Izračuna se potrebna ukupna količina reagensa, jer se u svaku jažicu stavlja 100  $\mu\text{L}$  otopine. Na mikrotitarskoj ploči u jažice

se stavi 50 µL razrijeđenog standarda, slijepe probe analiziranog uzoraka u duplikatu. Mikrotitarska ploča se potom pokrije i inkubira 90 minuta na temperaturi od 37°C. Nakon inkubacije otopine jažice se dekantiraju, ali ne ispiru i u njih se dodaje 100 µL reagensa za detekciju antigena (od eng. *Biotinylated Detection Ab working solution*). Slijedi inkubacija 60 min na temperaturi od 37°C. Jažice se ponovno dekantiraju i u svaku jažicu dodaje 350 µL pufera za ispiranje koji odstoji 1 minutu nakon čega se dekantira. Taj postupak se ponavlja 3 puta. Nakon procesa ispiranja u svaku jažicu se stavlja 100 µL konjugiranog radnog reagensa (od eng. *HRP Conjugate working solution*) i inkubira 30 min na temperaturi od 37 °C. Potom se jažice dekantiraju i u svaku doda 350 µL pufera za ispiranje koji odstoji 1 minutu nakon čega se dekantira, a postupak se ponavlja 5 puta. Nakon ispiranja u svaku jažicu se stavi 90 µL reagensa sa substratom (od eng. *Substrate Reagent*) i inkubira 15 min na temperaturi od 37 °C. Kod ovog postupka mikrotitarska ploča treba biti zaštićena od svijetlosti. Zadnji korak je dodavanje 50 µL reagensa za zaustavljanje reakcije (od eng. *Stop Solution*) u svaku jažicu.

Mikrotitarska ploča se postavlja u aparat koji očitava optičku gustoću na 450 nm (OD vrijednost) svake jažice. Dobivene absorbence se potom preračunavaju u koncentracije pomnožene sa stupnjem razrijeđenja. Nacrta se standardna krivulja s parametrima standardnih koncentracija na osi „X“ i vrijednosti absorbanci na osi „Y“. U ovom istraživanju korišten je aparat za očitavanje mikrotitarskih ploča Bio-tek EL808 IU (Express Lab Werks, Summerfield, Florida) i računalni program KCjunior1 (Bio-tek EL808 IU, BIOTEK808UI, Absorbance Microplate Reader, Gen5 Reader Control Software Gen5, Santa Clara, California)

### 3.2.8. Metoda *western blot* proteina u urinu

U istraživanju proteina CYFRA 21-1 u proteinskim talozima urina u uzorcima s EME i kontrolne skupine proteini su analizirani i metodom *western blot*. Prije analize određena je koncentracija ukupnih proteina izoliranih prema prethodno navedenom postupku iz uzoraka urina kolorimetrijskom metodom bicinkoninične kiseline (*BCA - bicinchoninic acid - empirijska formula (2,2'-bikolin) -4,4'-dikarboksilna kiselina, C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>*) prema uputi proizvođača (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Prod# 23227, Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD). Ova metoda se temelji na mjerenju apsorbancije na 562 nm valne duljine u odnosu na standard, pri čemu je kao standard korišten albumin iz goveđeg seruma (BSA) (Albumin, bovine fraction V, Approx. 99%, A-3059, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka). Budući da je vrijednost apsorbancije izravno proporcionalna koncentraciji ukupnih proteina, koncentracija ukupnih proteina je u svakom analiziranom uzorku urina izračunata korištenjem jednadžbe



kalibracijske krivulje standarda (BSA). Svi uzorci ukupnih proteina urina razdvojeni su prema masi elektroforezom na 12,5%-tnom poliakrilamidnom gelu uz natrijev dodecil-sulfat (od eng. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE*) pomoću sustava za elektroforezu (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD) u trajanju od 3 sata na 4 °C pri 140 V. Razdvojeni proteini su zatim preneseni na polivinilidenfluoridnu (*PVDF-poliviniliden fluorid* - empirijska formula -  $C_2H_2F_2n$ ) membranu (Immobilon E Transfer Membrane, IEVH00005, Merck Millipore, Tullagreen, Carrigtwohill, County Cork, Irska) polusuhim transferom (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD) u trajanju od 45 minuta pri 17 V, nakon čega je membrana s prenesenim proteinima inkubirana 5%-tnim nemasnim mlijekom (Blotting-Grade Blocker, Cat. #170-6404, Bio-Rad Laboratories, Inc., SAD) otopljenim u tris otopini pufera (TBS) (pH 7,5) s dodatkom Tween-20 (0,05%) (Code No. 17-1316-01, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Švedska) (TBST - 1X Tris-Buffered Saline, 0.1% Tween® 20 Detergent - 100mM Tris.HCl + 1.5M NaCl + 0.5% Tween-20, pH 7.5) 2 sata na sobnoj temperaturi kako bi se spriječio nespecifično vezanje protutijela. Zatim je slijedila inkubacija membrane s primarnim protutijelima preko noći na 4 °C. Korištena su mišja monoklonska protu-citokeratin 19 protutijela (Cytokeratin 19 (A53-B/A2), sc-6278, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), pripremljena razrjeđivanjem u reagensu za blokiranje (Western Blocking Reagent (10x), Cat. No. 11921763001, Roche Diagnostic, Mannheim, Njemačka) u omjeru 1:500. Drugo korišteno protutijelo je bilo mišje monoklonsko protu- $\beta$ -aktin protutijelo (Anti-beta Actin antibody, ab8226, Abcam), pripremljeno razrjeđivanjem u reagensu za blokiranje u omjeru 1:30000. Membrana je zatim isprana TBST-om tri puta u trajanju od 15 minuta te inkubirana 1 sat na sobnoj temperaturi odgovarajućim sekundarnim protutijelima (purificirano rekombinantno mišje sekundarno protutijelo, IgGk laki lanac vezujući protein konjugiran s peroksidazom hrena sc-516102, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) i sekundarnim poliklonskim kozjim protu-mišjim protutijelom konjugiranim s peroksidazom hrena (*horseradish peroxidase, HRP*) (IgG-HRP) (ab97023, Abcam) pripremljenim razrjeđivanjem u reagensu za blokiranje u standardnom omjeru. Nakon ispiranja TBST-om tri puta u trajanju od 15 minuta membrana je inkubirana reagensom za detekciju SignalFire Elite ECL Reagent (12757P, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD), te skenirana (UVItec Alliance 4.7 for Fluorescence and Chemiluminescence Systems, Cambridge, UK). Izražaj proteina CYFRA 21-1 kvantificiran je korištenjem računalnog programa za obradu slika i fotografija ImageJ (U.S. NIH, Bethesda, Maryland, SAD), a dobivene zone su normirane prema kućepaziteljskom proteinu  $\beta$ -aktinu.

### 3.2.9. Elektrokemiluminiscentna metoda

Uzorci krvi za analizu tumorskih biljega prikupljaju se u biokemijskim epruvetama bez antikoagulansa (BD vacutainer systems-7ml, Plymouth, UK). Centrifugiranje uzoraka krvi bez antikoagulansa provodi se najmanje 30 minuta nakon uzorkovanja krvi. Analizirani uzorci se centrifugiraju 10 minuta na 3500 o/min (okretaj/minuti). Nakon centrifugiranja krvi odvoje se serumi koji se koriste za mjerenje koncentracije određenih proteina ili tumorskih biljega. Stabilnost uzoraka za analizu osigurava se odvajanjem seruma od ugruška i pohranom u hladnjaku na +4°C kratkotrajno ili na -80°C za dugotrajnije pohranjivanje. U ovom istraživanju koncentracija proteina i tumorskih biljega mjerena je na analizatoru Cobas® E601 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), elektrokemiluminiscentnom metodom (ECLIA - electrochemiluminescence technology).

#### a) Elektrokemiluminiscentna metoda analize proteina CYFRA 21-1 u serumu

Polipeptidi citokeratina slabo su topljivi u tekućem mediju, međutim fragmenti citokertina 19, kao što je CYFRA 21-1 vrlo je topljiv i često je prisutan u krvi osoba s određenim bolestima i stanjima te se mogu identificirati u serumu u povišenim koncentracijama. Analiza proteina CYFRA 21-1 u serumu rađena je na analizatoru Cobas® E601 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Korišten je reagens Elecsys CYFRA 21-1 (Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim, Germany), REF 11820966 122. Kalibrator za protein CYFRA 21-1 CalSet (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), REF 11820974. Uzorci su razrijeđeni do koncentracije >250 ng/ml. Specifična kalibracijska krivulja generirana je analizatorom u dvije točke a glavna krivulja generirana je barkodom reagensa. Osnova metode je prethodno opisana, a za određivanje koncentracije proteina CYFRA 21-1 koristi se rutenij kao luminiscentna tvar koja je vezana na sekundarno antitijelo i daje signal u trenutku nastalog primarnog At-Ag (CYFRA 21-1) i sekundarnog kompleksa.

#### b) Elektrokemiluminiscentna metoda analize antigena CA 125 u serumu

Karcinomski antigen 125 (CA 125) je peptidna antigenska determinanta mucina 16 (MUC16). Produkcija mu je u korelaciji s proliferacijom malignih stanica i umanjuje razinu imunskog odgovora domaćina na malignu bolest. Metoda kojom je određivan MUC16 je sendvič elektrokemiluminiscentna imunoanaliza. Korišteno je detekcijsko antitijelo OC 125 i specifično hvatajuće antitijelo MAb M11. Primarno monoklonsko antitijelo specifično je za CA 125, a sekundarno monoklonsko antitijelo je obilježeno kompleksom rutenija. U uzorku seruma



antitijela reagiraju s antigenom CA 125 stvarajući sendvič kompleks. Elektroda uređaja koja je pod naponom dovodi do kemiluminiscentne reakcije u trenutku nastalog kompleksa primarnog At-Ag (CA 125) sa sekundarnim At. Kalibracijskom krivuljom određuje se koncentracija CA 125 u uzorku seruma. Upotrebljen je analizator Cobas® E601 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Korišten je reagens Elecsys CA 125 (Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim, Germany), REF 11776223 190. Kalibrator za protein CA 125 protein CYFRA 21-1. Uzorci su razrijeđeni do koncentracije > 1000 U/mL. Specifična kalibracijska krivulja generirana je analizatorom u dvije točke a glavna krivulja generirana je barkodom reagensa.

### 3.2.10. Statističke metode

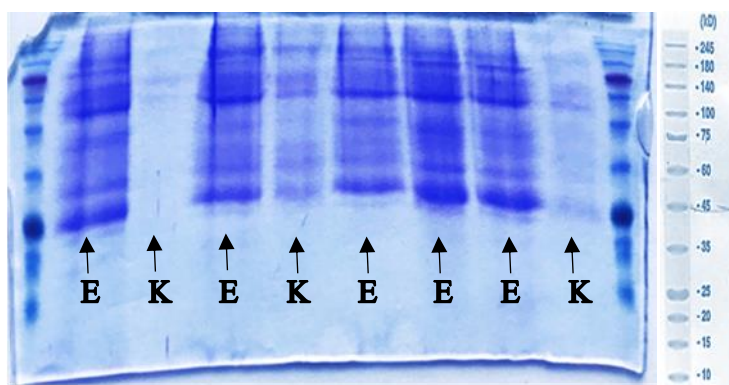
Analiza prikupljenih podataka uključuje prikaz veličine istraživanih skupina, razlika između članova pojedine skupine, osnovnu deskriptivnu statistiku vrijednosti pokazatelja zabilježenih kod tih skupina i statističko testiranje hipoteza o postojanju razlika među skupinama. Izračunat je raspon (minimum, maksimum), srednja vrijednost, medijan, aritmetička sredina i standardna devijacijom. Budući da nije zadovoljeno pravilo normalne Gaussove raspodjele vrijednosti pokazatelja, postojanje razlika među skupinama s obzirom na očekivane srednje vrijednosti i raspršenje statistički su testirane neparametrijskim testom (Wilcoxonov test raspona sume, poznat i kao Mann-Whitney U test). Rezultati ovog testiranja uključuju iznos procjene razlike uz pripadajuće intervale pouzdanosti, vrijednost testnog U parametra i razinu statističke značajnosti. Testovi su učinjeni uz pretpostavku o mogućnosti razlike u oba smjera i razinu pouzdanosti od 95%.

## 4. REZULTATI

Analiziran je ukupno 141 uzoraka seruma i 150 uzoraka urina, a 141 uzorak urina je zadovoljio kriterije za daljnje analize. Uzorci su podijeljeni u dvije osnovne skupine. Skupina uzoraka s EME (N=84) je nešto veća u odnosu na kontrolnu skupinu (N=57). Skupina s EME je podijeljena na isti broj članova ovisno o procijenjenom blažem rASRM I-II (N=42) ili težem rASRM III-IV stupnju bolesti (N=42).

### 4.1. Kvalitativna analiza proteina u proteinskim talozima urina

Kvalitativna analiza proteina u uzorcima je analizirana s 1DE. Ovom metodom su analizirani svi uzorci urina skupine s EME i kontrolne skupine. U svim analiziranim uzorcima proteini su jasno prisutni i razdvojeni (Slika 1.). U svim uzorcima proteinskih taloga urina prisutna je dovoljna količina proteina različitih molekularnih masa potrebnih za daljnje analitičke analize.



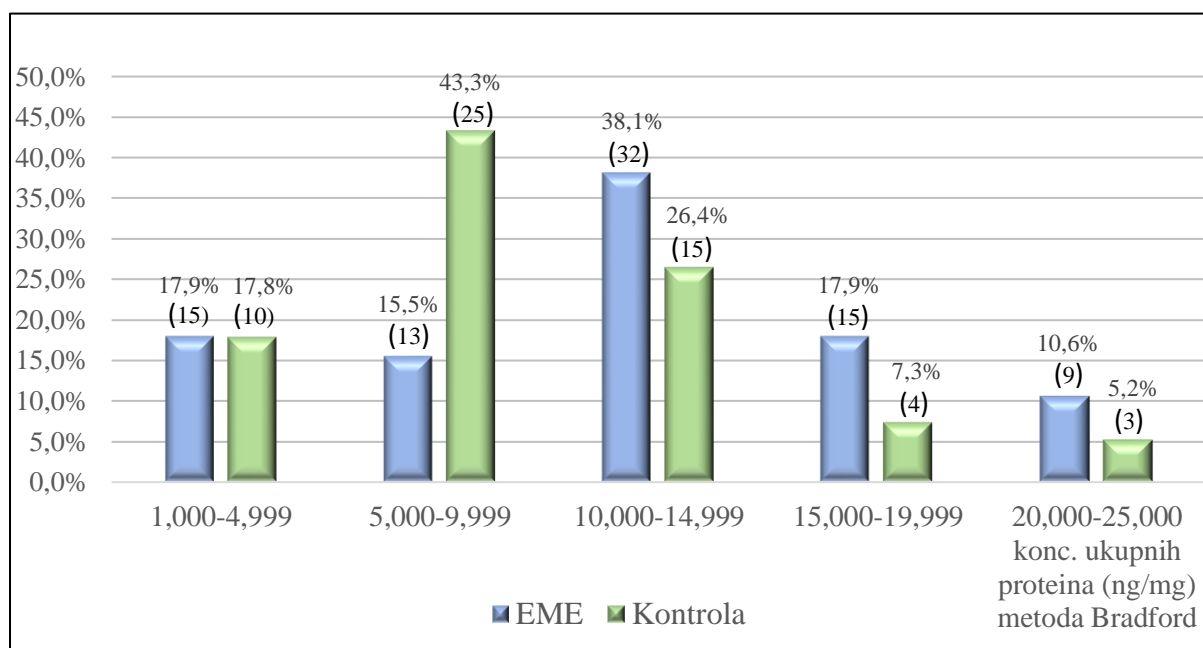
Slika 1. Reprezentativni prikaz jednodimenzionalne elektroforeze proteina u urinu pacijentica s dijagnozom EME

### 4.2. Koncentracija ukupnih proteina u urinu – određena metodom Bradford

Kvantitativno određivanje proteina u uzorcima urina bilo je nužno za druge analitička analize, a učinjeno je metodom Bradford. Dobivene vrijednosti proteina CYFRA 21-1 u svim daljnjim analiziranjima korelirane su s ukupnom koncentracijom proteina u analiziranom uzorku. Takvim postupkom korekcije rezultata ovisno o koncentraciji proteina ujednačeni su kriteriji rezultata svih analiziranih uzoraka. Zabilježena je statistički značajna razlika u koncentraciji proteina između uzoraka skupine s EME i kontrolne skupine, međutim između uzoraka podskupina EME - rASRM I-II i rASRM III-IV nije pokazana statistički značajna razlika u koncentraciji izlučenih proteina u urinu. Wilcoxonovim testom uz razinu pouzdanosti od 95% pokazane koncentracije izlučenih proteina (ng/mg) u urinu analizirane metodom Bradford u

uzorcima s EME (N=84) statistički su značajno veće nego u uzorcima kontrolne skupine (N=57),  $p < 0,05$ .

Raspon koncentracije proteina izlučenih u urinu (metoda Bradford) u skupini uzoraka s EME i uzorcima kontrolne skupine podijeljen je u 5 grupa. Svaka grupa ima jednak raspon koncentracije proteina (5000 ng/mg). Prikazan je broj uzoraka skupine s EME i kontrolne skupine u svakoj grupi ovisno o koncentraciji proteina u urinu i udjelu ovisno o veličini skupine (Slika 2.).



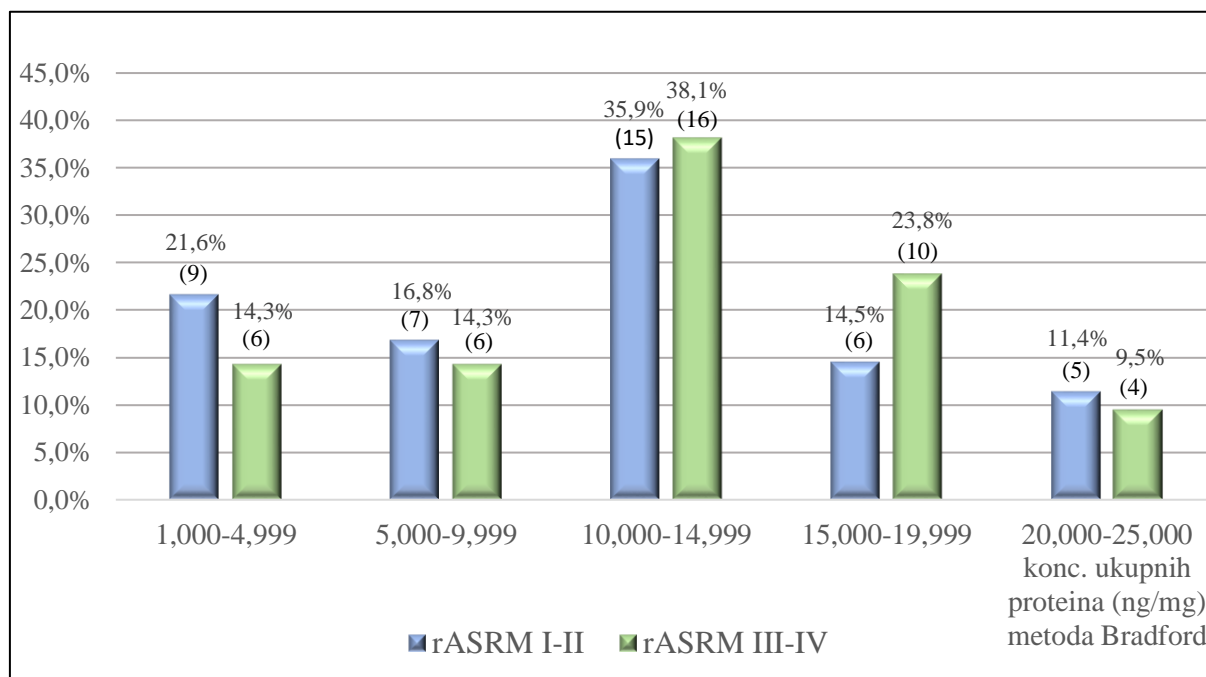
Slika 2. Prikaz raspodjele uzoraka urina u skupinama ovisno o rasponu koncentracije ukupnih proteina u urinu (ng/mg) i udio uzoraka ovisno o veličini grupe s ektrauterinom migracijom endometrija (N=84) i kontrolne skupine (N=57) (metoda Bradford).

Nakon koncentracije ukupnih proteina u urinu veće od 5,000 (ng/mg) dolazi do značajnijeg grupiranja uzoraka s EME, dok se u koncentracijama manjim od te vrijednosti grupiraju uzorci obje skupine.

Wilcoxonovim testom uz razinu pouzdanosti od 95% pokazano je da nema statistički značajne razlike u vrijednostima koncentracije izlučenih proteina (ng/mg) u urinu, analiziranih metodom Bradford u podskupinama uzoraka EME - rASRM I-II (N=42) i rASRM III-IV (N=42).

Ukupan raspon koncentracije proteina izlučenih u urinu (metoda Bradford) u podskupinama EME rASRM I-II i rASRM III-IV podijeljen je u 5 grupa. Svaka grupa ima jednak raspon

koncentracije proteina (5000 ng/mg). Prikazan je broj uzoraka podskupina EME rASRM I-II i rASRM III-IV u svakoj grupi ovisno o koncentraciji proteina u urinu i udjel ovisno o veličini skupine (Slika 3.).

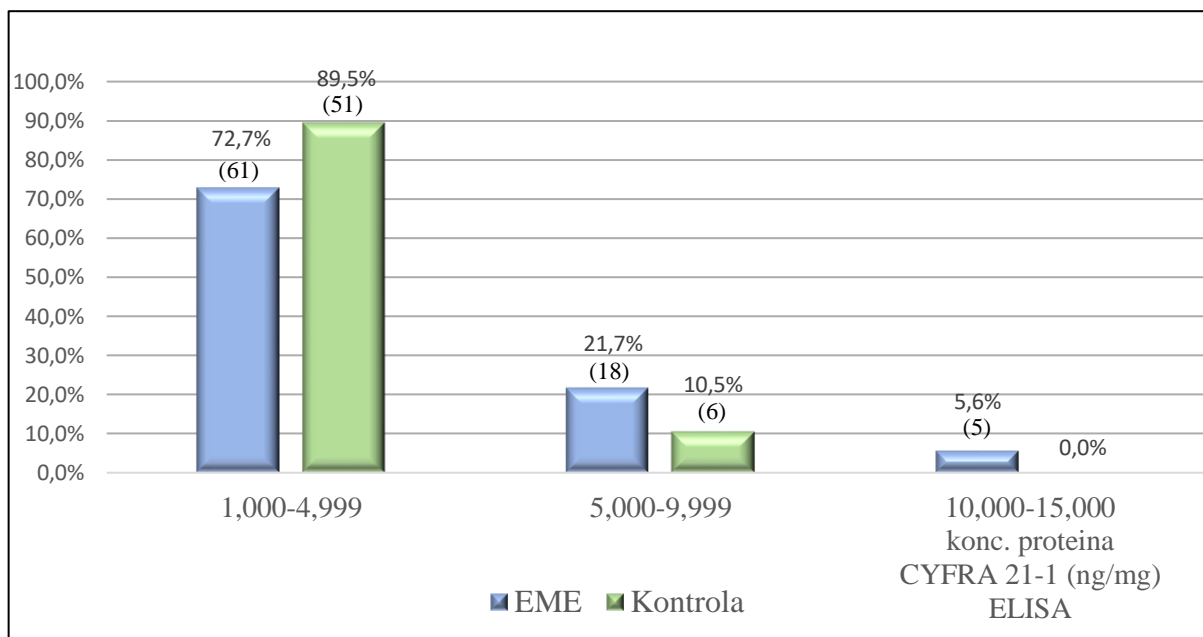


Slika 3. Prikaz raspodjele uzoraka urina u podskupinama ekstrauterine migracije endometrija rASRM I-II (N=42) i rASRM III-IV (N=42) ovisno o rasponu koncentracije ukupnih proteina (ng/mg) i udio uzoraka ovisno o veličini grupe (metoda Bradford).

#### 4.3. Koncentracija proteina CYFRA 21-1 u urinu – određena metodom ELISA

Analizom koncentracije proteina CYFRA 21-1 u urinu metodom ELISA pokazana je statistički značajna razlika u koncentraciji proteina CYFRA 21-1 u uzorcima urina skupine s EME i kontrolne skupine, kao i između uzoraka podskupina EME - rASRM I-II i rASRM III-IV. Osim veće koncentracije proteina CYFRA 21-1 u skupini uzoraka urinu s EME, razina koncentracije ovisi i o stupnju proširenosti EME. Wilcoxonovim testom uz pouzdanost od 95% pokazane su vrijednosti koncentracije proteina CYFRA 21-1 (ng/mg) u urinu analizirane metodom ELISA u skupini uzoraka s EME (N=84) statistički značajno veće nego u uzorcima kontrolne skupine (N=57),  $p < 0,05$ .

Ukupan raspon koncentracije proteina CYFRA 21-1 u urinu (ELISA) u uzorcima skupine s EME i kontrolne skupine podijeljen je u 3 grupe. Svaka grupa ima jednak raspon koncentracije proteina CYFRA 21-1 (5000 ng/mg). Prikazan je broj uzoraka skupine s EME i kontrolne skupine u svakoj grupi ovisno o koncentraciji proteina CYFRA 21-1 u urinu i udjel ovisno o veličini skupine (Slika 4.).

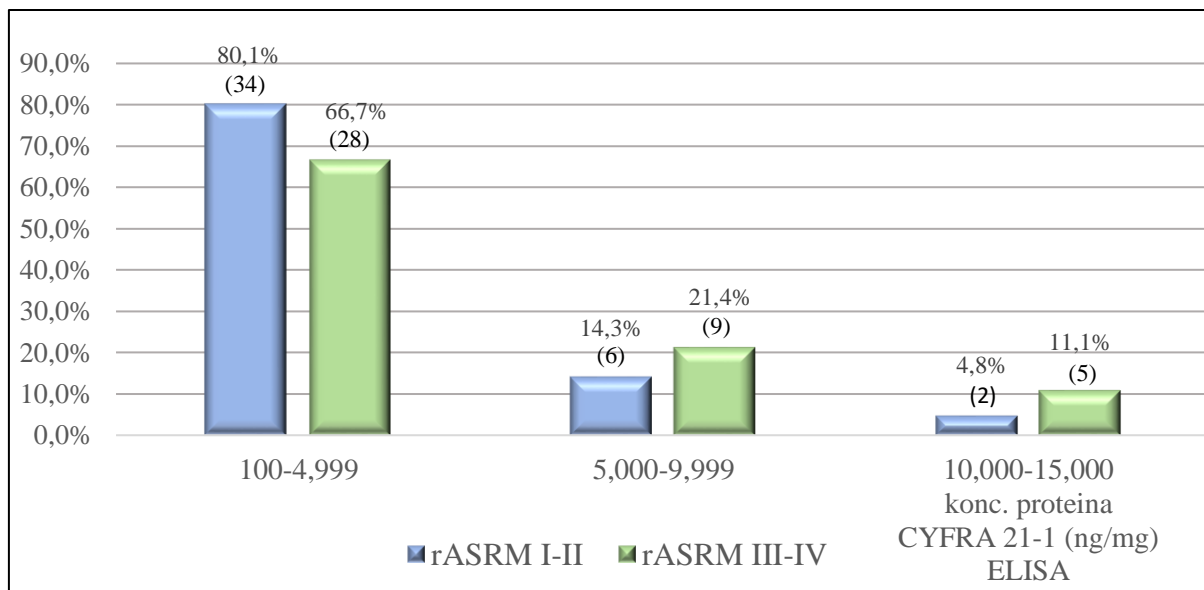


Slika 4. Prikaz raspodjele uzoraka urina u skupinama ovisno o rasponu koncentracije proteina CYFRA 21-1 (ng/mg) i udio uzoraka ovisno o veličini skupine s ekstrainterinom migracijom endometrija (N=84) i kontrolne skupine (N=57) (ELISA).

Nakon koncentracije proteina CYFRA 21-1 u urinu veće od 5,000 (ng/mg) dolazi do statistički značajnog grupiranja uzoraka s EME, dok se u koncentracijama manjim od te vrijednosti grupiraju uzorci u obje skupine.

Wilcoxonovim testom uz pouzdanost od 95% pokazane su vrijednosti proteina CYFRA 21-1 (ng/mg) u urinu analizirane metodom ELISA u uzorcima podskupine EME rASRM III-IV (N=42) statistički značajno veće nego u uzorcima podskupine rASRM I-II (N=42),  $p < 0,05$ .

Raspon koncentracije proteina CYFRA 21-1 (ng/mg) u urinu (ELISA) u uzorcima podskupina EME rASRM I-II i rASRM III-IV podijeljen je u 3 grupe. Svaka grupa ima jednak raspon koncentracije proteina CYFRA 21-1 (5000 ng/mg). Prikazan je broj uzoraka podskupina EME rASRM I-II i rASRM III-IV u svakoj grupi ovisno o koncentraciji proteina CYFRA 21-1 u urinu i udjel ovisno o veličini skupine (Slika 5.).



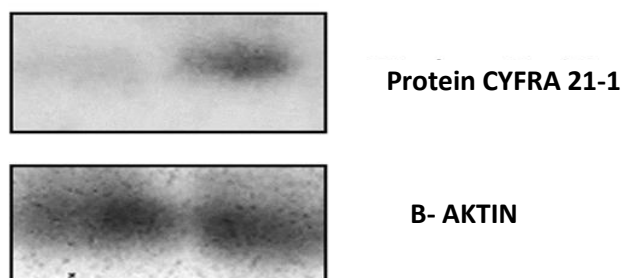
Slika 5. Prikaz raspodjele uzoraka urina u podskupinama ekstrauterine migracije endometrija rASRM I-II (N=42) i rASRM III-IV (N=42) ovisno o rasponu koncentracije proteina CYFRA 21-1 (ng/mg) i udio uzoraka ovisno o veličini podskupine (ELISA).

#### 4.4. Koncentracija proteina CYFRA 21-1 u urinu - određena metodom *western blot*

Analizom koncentracije proteina CYFRA 21-1 u uzorcima proteinskih taloga urina metodom *western blot* pokazana je statistički značajna razlika u koncentracijama između skupine s EME i kontrolne skupine, kao i između uzoraka podskupina EME rASRM I-II i rASRM III-IV. Osim povišene koncentracije proteina CYFRA 21-1 u uzorcima s EME njegova koncentracija ovisi i o stupnju proširenosti EME. Koncentracija proteina CYFRA 21-1 analizirana je su svim uzorcima urina s EME i kontrolne skupine metodom ELISA. Metoda *western blot* je rađena radi potvrde dobivenih rezultata te je analiziran manji broj uzoraka urina u skupini s EME (N=50) i u kontrolnoj skupini (N=25).

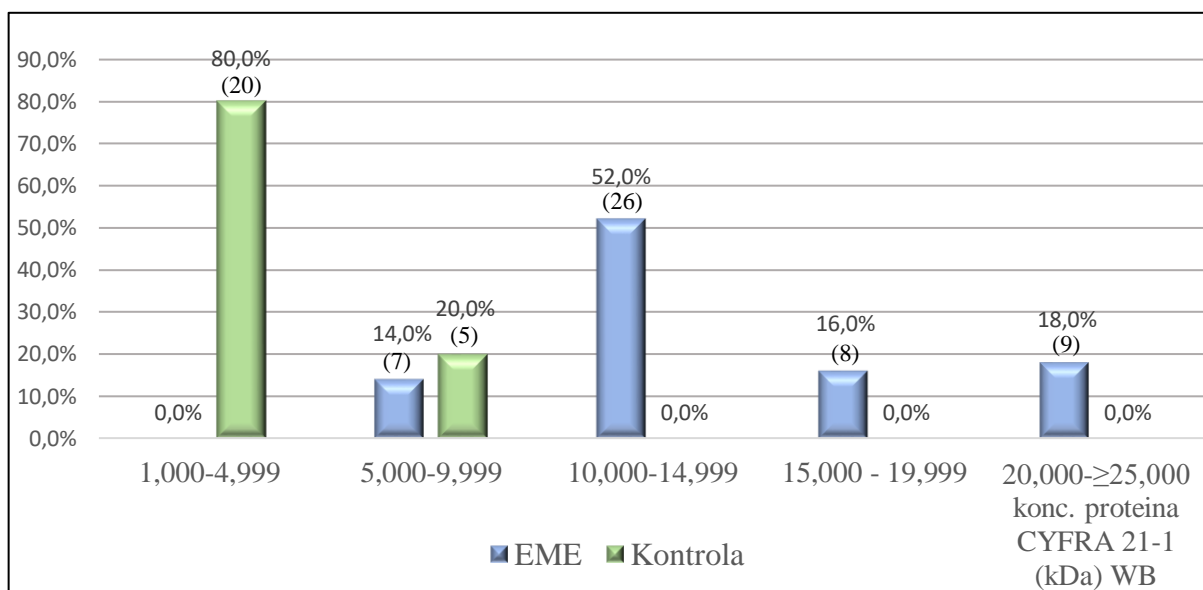
Metodom *western blot* potvrđeni su rezultati metode ELISA i smatrano je da nema potrebe analizirati sve uzorke. Wilcoxonovim testom uz pouzdanost od 95% pokazana je koncentracija proteina CYFRA 21-1 u urinu analizirana metodom *western blot* u uzorcima s EME statistički značajno veća u odnosu na uzorke kontrolne skupine,  $p < 0,05$ . Na Slici 6. prikazana je analiza proteina u urinu CYFRA 21-1 i kućepaziteljskog proteina  $\beta$ - aktina metodom *western blot*.

KONTROLNA SKUPINA SKUPINA S EME



Slika 6. Reprezentativni prikaz analize proteina CYFRA 21-1 i kućepaziteljskog proteina  $\beta$ -aktina u urinu metodom *western blot*.

Raspon koncentracije proteina CYFRA 21-1 u urinu (*western blot*) u skupini uzoraka s EME i u kontrolnoj skupini podijeljen je u 5 grupa. Svaka grupa ima jednak raspon koncentracije proteina CYFRA 21-1 (5000 kDa). Prikazan je broj uzoraka skupine s EME i kontrolne skupine u svakoj grupi ovisno o koncentraciji proteina CYFRA 21-1 i udjel ovisno o veličini skupine (Slika 7.).

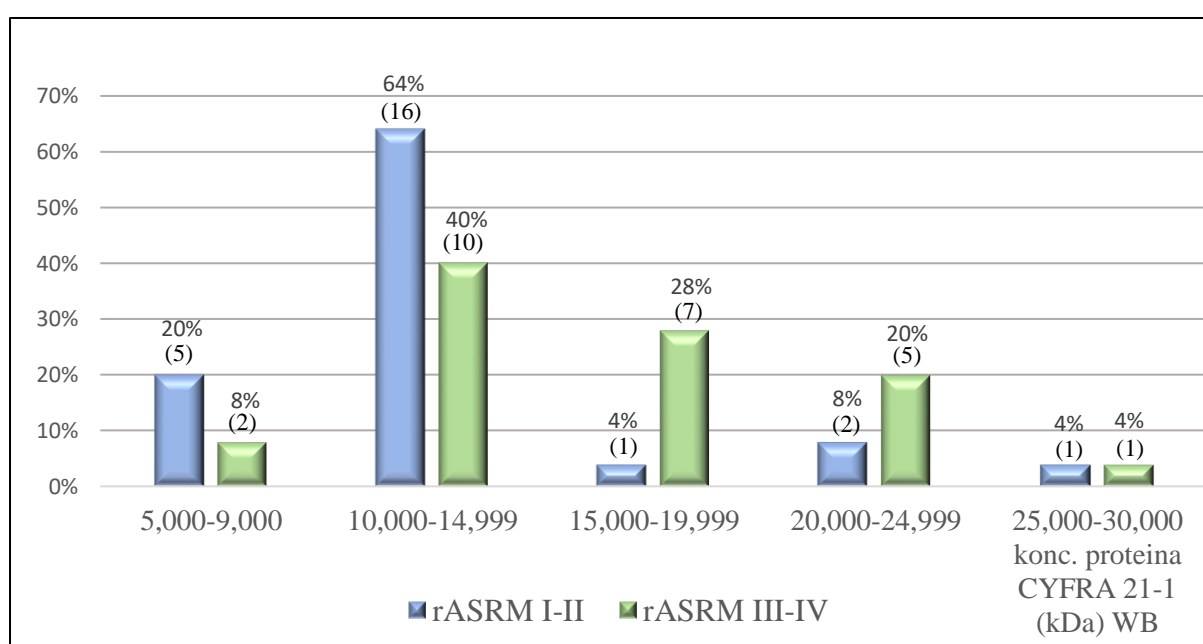


Slika 7. Prikaz raspodjele uzoraka urina u skupinama ovisno o rasponu koncentracije proteina CYFRA 21-1 (kDa) i udio uzoraka ovisno o veličini skupine s ekstrainterinom migracijom endometrija (N=50) i kontrolne skupine (N=25) (*western blot*).

Nakon koncentracije proteina CYFRA 21-1 u urinu veće od 10,000 (kDa) dolazi do značajnijeg grupiranja uzoraka s EME, dok se u koncentracijama manjim od te vrijednosti grupiraju uzorci kontrolne skupine.

Wilcoxonovim testom uz pouzdanost od 95% pokazane su vrijednosti proteina CYFRA 21-1 u urinu analizirane metodom *western blot* u uzorcima podskupina EME rASRM III-IV (N=25) statistički značajno veće nego vrijednosti u uzorcima podskupine rASRM I-II (N=25),  $p < 0,05$ .

Ukupan raspon koncentracije proteina CYFRA 21-1 (kDa) u urinu (*western blot*) u uzorcima podskupina EME rASRM I-II i rASRM III-IV podijeljen je u 5 grupa. Svaka grupa ima jednak raspon koncentracije proteina CYFRA 21-1 (5000 kDa). Prikazan je broj uzoraka u podskupinama EME rASRM I-II i rASRM III-IV u svakoj grupi ovisno o koncentraciji proteina CYFRA 21-1 u uzorcima urina i udjel ovisno o veličini skupine (Slika 8.).



Slika 8. Prikaz raspodjele uzoraka urina u podskupinama ekstrauterine migracije endometrija rASRM I-II (N=25) i rASRM III-IV (N=25) ovisno o rasponu koncentracije proteina CYFRA 21-1 (kDa) i udio uzoraka ovisno o veličini podskupine (*western blot*).

Raspodjelom uzoraka prema koncentraciji proteina CYFRA 21-1 statistički značajno se grupiraju uzorci podskupine EME rASRM III-IV iznad koncentracije veće od 15,000 kDa.

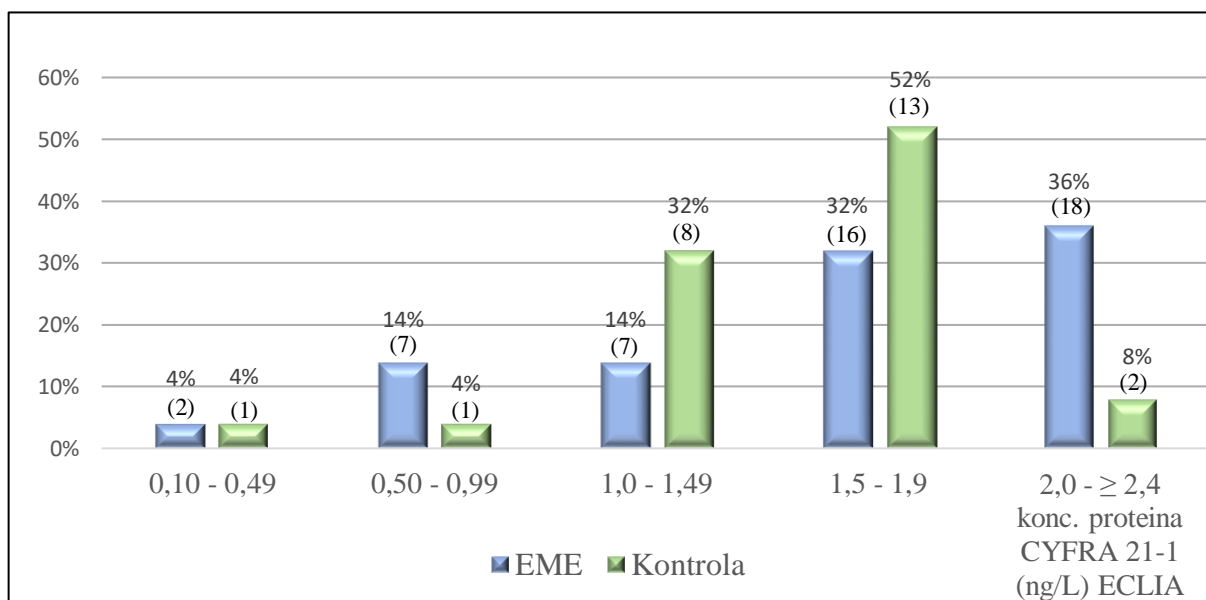
#### 4.5. Koncentracija proteina CYFRA 21-1 u serumu – određena elektrokemiluminiscentnom metodom

Analizom koncentracije proteina CYFRA 21-1 u uzorcima seruma (ng/L) ECLIA metodom pokazana je statistički značajna razlika u koncentraciji proteina CYFRA 21-1 u skupini uzoraka s EME (N=50) i kontrolnoj skupini (N=25). U podskupinama uzoraka EME rASRM



I-II (N=25) i rASRM III-IV (N=25) nema statistički značajne razlike u vrijednostima koncentracije proteina CYFRA 21-1 u serumu. Wilcoxonovim testom uz pouzdanost od 95% pokazane su vrijednosti koncentracije proteina CYFRA 21-1 (ng/L) analizirane ECLIA metodom u uzorcima seruma s EME statistički značajno veće nego u uzorcima kontrolne skupine,  $p < 0,05$ . Iako je koncentracija proteina CYFRA 21-1 u serumu veća u skupini uzoraka s EME u odnosu na uzorke kontrolne skupine ta je razlika relativna, jer nije zabilježena koncentracija iznad gornje granice normalnih vrijednosti ( $< 3,3$  ng/L) niti u jednom uzorku u uspoređenim skupinama. Koncentracija proteina CYFRA 21-1 analizirana je u svim uzorcima urina s EME i kontrolnoj skupini metodom ELISA (N=141). Metodom *western blot* (N=75) su potvrđeni rezultati metode ELISA. U uzorcima seruma ECLIA metodom analizirana je koncentracija proteina CYFRA 21-1 u skupini s EME (N=50) i kontrolnoj skupini (N=25). U analiziranim uzorcima seruma nije pokazana statistički značajna razlika u koncentraciji proteina CYFRA 21-1 između uzoraka obje skupine. Smatrano je da analiziranjem većeg broja uzoraka seruma ne bi promijenilo rezultate.

Raspon koncentracije proteina CYFRA 21-1 u uzorcima seruma (ECLIA) u skupini s EME i kontrolnoj skupini podijeljen je u 5 grupa. Svaka grupa ima jednak raspon koncentracije proteina CYFRA 21-1 (0,50 ng/L). Prikazan je broj uzoraka skupine s EME i kontrolne skupine u svakoj grupi ovisno o koncentraciji proteina CYFRA 21-1 u serumu i udjel ovisno o veličini skupine (Slika 9.).

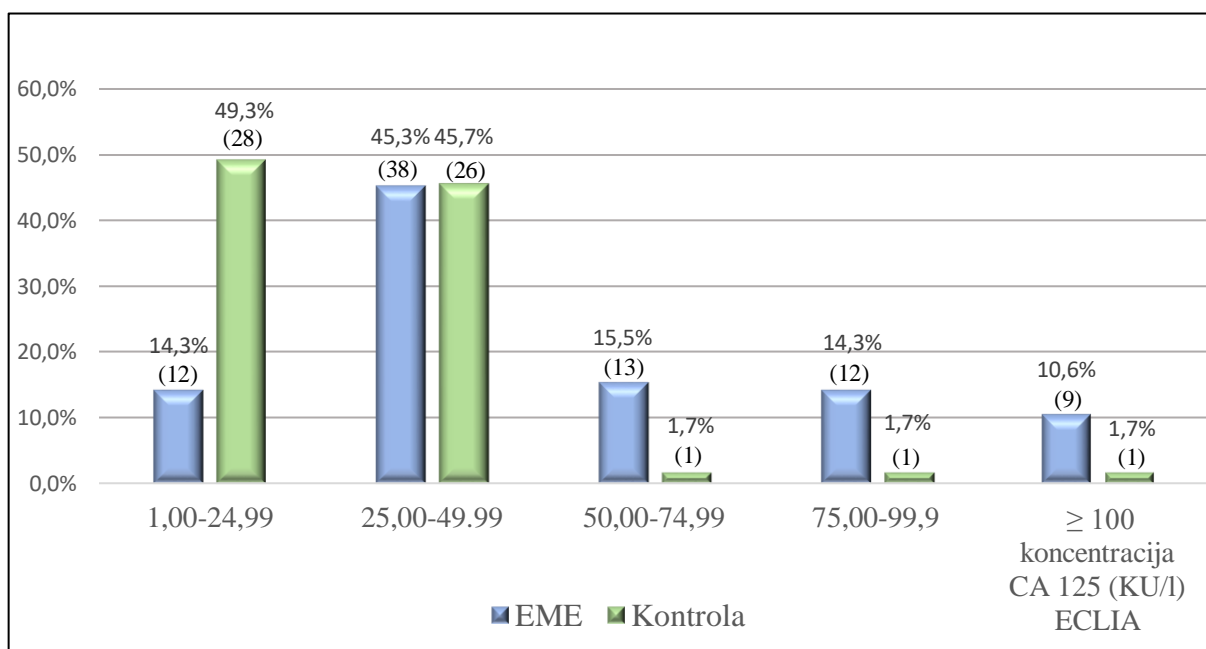


Slika 9. Prikaz raspodjele uzoraka seruma u skupinama ovisno o rasponu koncentracije proteina CYFRA 21-1 (ng/L) i udio uzoraka ovisno o veličini skupine s ekstrasuterinom migracijom endometrija (N=50) i kontrole skupine (N=25) (ECLIA).

Nakon koncentracije proteina CYFRA 21-1 u serumu veće od 2,0 (ng/L) dolazi do značajnijeg grupiranja uzoraka s ekstrauterinom migracijom endometrija iako su te koncentracije unutar normalnih vrijednosti. Wilcoxonovim testom uz pouzdanost od 95% pokazano je da nema statistički značajne razlike u vrijednostima koncentracije proteina CYFRA 21-1 (ng/L) analiziranih metodom ECLIA u uzorcima u podskupina EME rASRM I-II i rASRM III-IV.

#### 4.6. Koncentracija antigena CA 125 u serumu – određena elektrokemiluminiscentnom metodom

Analizom koncentracije CA 125 (KU/l) u uzorcima seruma ECLIA metodom u skupini s EME (N=84) i kontrolnoj skupini (N=57) pokazana je statistički značajna razlika u koncentraciji CA 125 (KU/l) u serumu, ali ne i u odnosu na stupanj proširenosti EME. Wilcoxonovim testom uz pouzdanost od 95% pokazano je da su koncentracije CA 125 (KU/l) u uzorcima seruma analiziranih ECLIA metodom u skupini s EME statistički značajno veće nego u uzorcima kontrolne skupine,  $p < 0,05$ . Ukupan raspon koncentracije CA 125 u uzorcima seruma (ECLIA) skupine s EME i kontrolne skupine podijeljen je u 5 grupa. Svaka grupa ima jednak raspon koncentracije CA 125 (24,99 KU/l). Prikazan je broj uzoraka skupine s EME i kontrolne skupine u svakoj grupi ovisno o koncentraciji CA 125 i udjel ovisno o veličini skupine (Slika 10.).



Slika 10. Prikaz raspodjele uzoraka seruma u skupinama ovisno o rasponu koncentraciji CA 125 (KU/l) i udio uzoraka ovisno o veličini skupine s ekstrauterinom migracijom endometrija (N=84) i kontrolne skupine (N=57) (ECLIA).

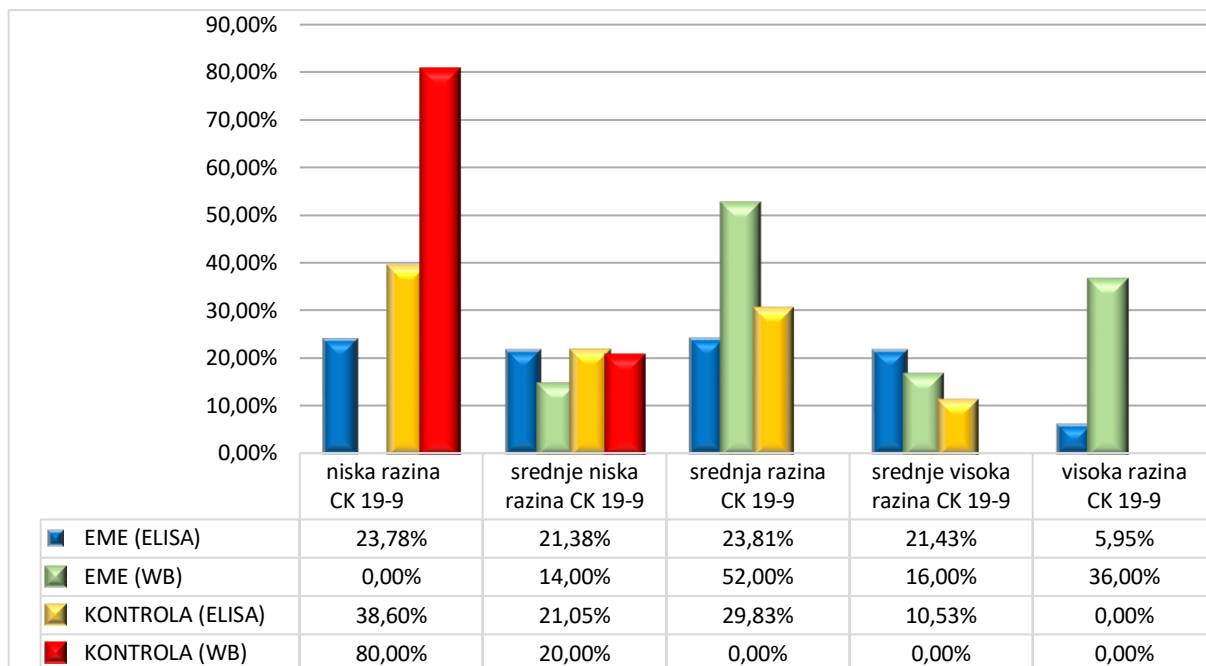
Nakon koncentracije CA 125 u serumu veće od 50,00 (KU/l) dolazi do statistički značajnog grupiranja uzoraka s EME

Wilcoxonovim testom uz pouzdanost od 95% nije pokazana statistički značajna razlika u serumskim vrijednostima koncentracije CA 125 (KU/l) u uzorcima podskupina EME - rASRM I-II (N=42) i rASRM III-IV (N=42).

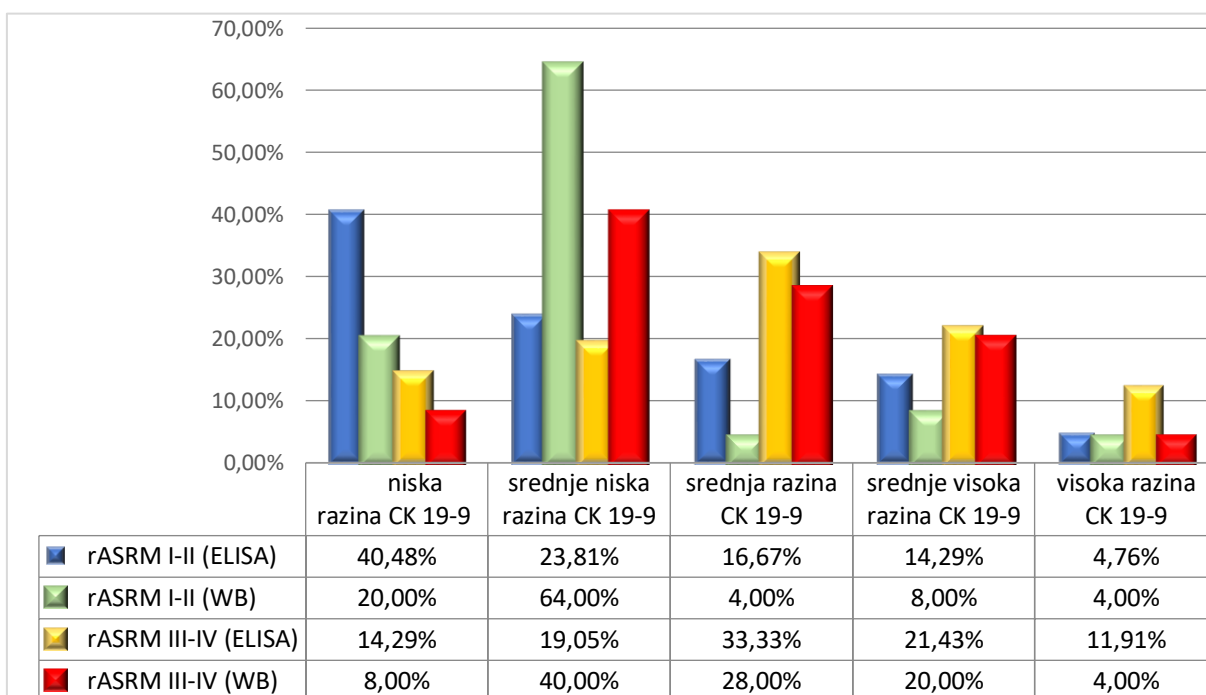
#### 4.7. Usporedba koncentracije proteina CYFRA 21-1 u urinu – određene metodama ELISA i *western blot*

Analizom koncentracija proteina CYFRA 21-1 u urinu metodama ELISA i *western blot* zabilježeni su slični rezultati uspoređujući uzorke urina s EME i kontrolne skupine. U obje metode u uzorcima urina pokazane su statistički značajno veće koncentracije proteina CYFRA 21-1 u skupini s EME u odnosu na kontrolnu skupinu. Međutim, uspoređujući uzorke urina podskupina EME rASRM I-II i rASRM III-IV metodom ELISA su pokazane statistički značajno veće koncentracije u podskupini EME rASRM II-IV u odnosu na rASRM I-II, dok se metodom *western blot* ta razlika nije pokazala. Analiziran je različiti broj uzoraka urina metodama ELISA u odnosu na *western blot*. Metodom ELISA analizirano je više uzoraka urina skupine uzoraka s EME i kontrolne skupine negoli metodom *western blot*. Rezultati ovih analiza prikazani su u različitim mjernim vrijednostima te kao takvi nisu međusobno usporedivi. Zbog toga su rezultati proteina CYFRA 21-1 u urinu podijeljeni u pet grupa: nisku (ELISA = 100 - 499 ng/mg, WB = 1000 – 4999 kDa), srednje nisku (ELISA = 500 - 999 ng/mg, WB = 5000 – 9999 kDa), srednju (ELISA = 1000 - 4999 ng/mg, WB = 10000 – 14999 kDa), srednje visoku (ELISA = 5000 - 9999 ng/mg, WB = 15000 – 19999 kDa) i visoku razinu rezultata (ELISA =  $\geq$  10000 ng/mg, WB =  $\geq$  20000 kDa).

U obje vrste analiza rezultati su podijeljeni u skupine na jednak način uzimajući u obzir sve izmjerene vrijednosti. Različiti broj analiziranih uzoraka i različito izraženi rezultati analiza pojedinih metoda su uspoređeni tako da su rezultati podijeljeni u skupine u obje analize izraženi udjelom u odnosu na broj uzoraka u određenoj grupi. Napravljena je usporedba rezultata koncentracije proteina CYFRA 21-1 u proteinskim talozima urina analiziranih metodama ELISA i *western blot* u skupini uzoraka s EME i uzoraka kontrolne skupine (Slika 11.). Na isti način uspoređeni su rezultati analiza proteinskih taloga uzoraka urina u podskupinama EME - rASRM I-II i rASRM III-IV (Slika 12.).



Slika 11. Zastupljenost proteina CYFRA 21-1 u uzorcima urina s ektrauterinom migracijom endometrija i kontrolne skupine određen metodama ELISA i *western blot*.



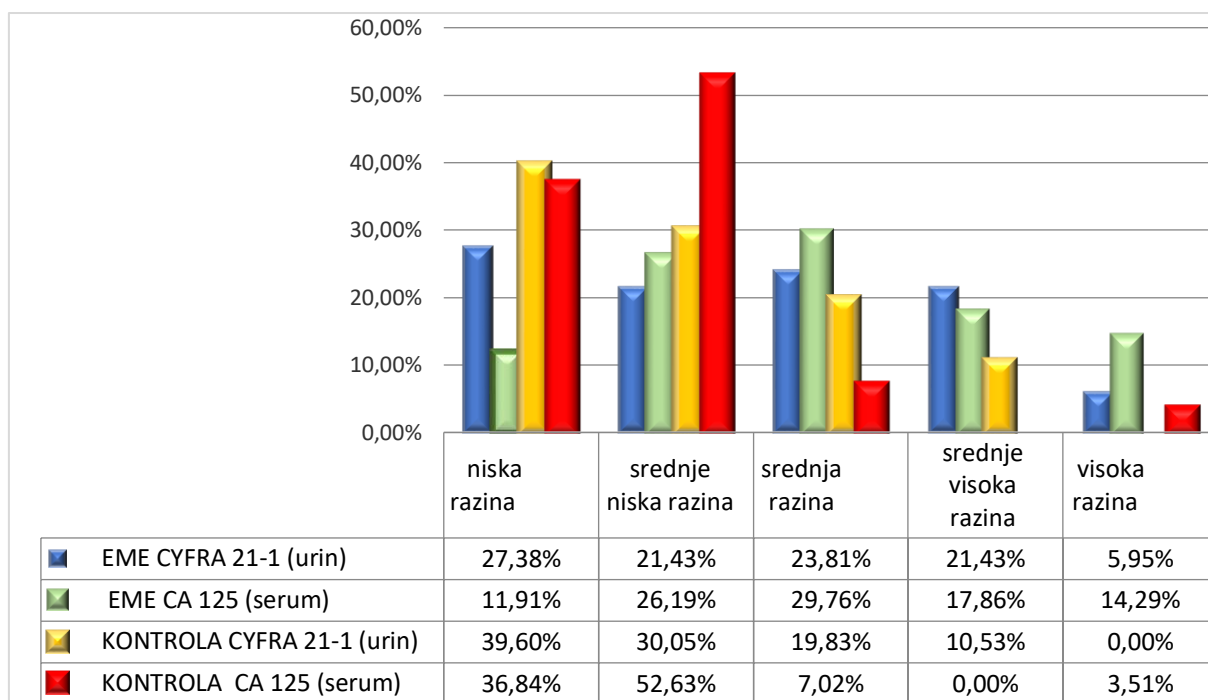
Slika 12. Zastupljenost proteina CYFRA 21-1 u uzorcima urina u podskupinama ektrauterine migracije endometrija rASRM I-II i rASRM III-IV određen metodama ELISA i *western blot*.

4.8. Usporedba koncentracije proteina CYFRA 21-1 u urinu i CA 125 u serumu - određene metodom ELISA i elektrokemiluminiscentnom metodom

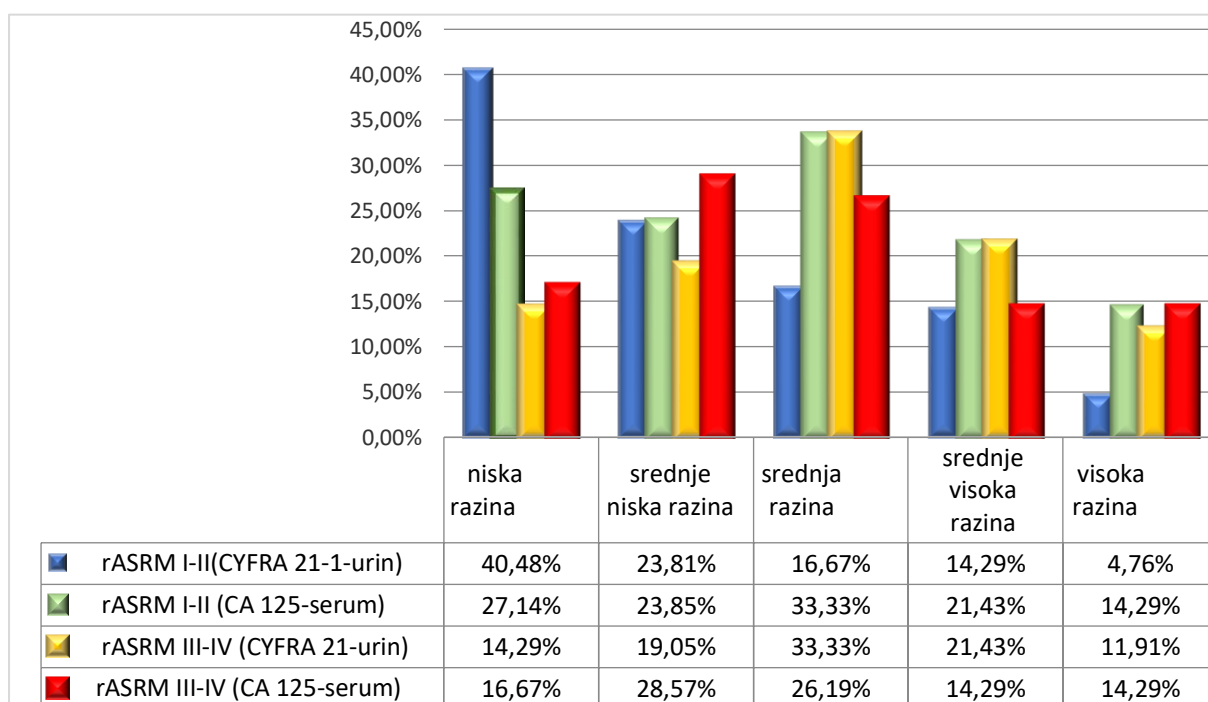
Analizom koncentracija proteina CYFRA 21-1 u urinu metodom ELISA i antigena CA 125 u serumu metodom ECLIA zabilježeni su slični rezultati uspoređujući uzorke urina uzoraka s EME i kontrolne skupine kao i u podskupina EME rASRM I-II i rASRM III-IV. Pokazane su statistički značajno veće koncentracije proteina CYFRA 21 i antigena CA 125 u skupini uzoraka s EME i podskupini EME rASRM II-IV u odnosu na kontrolnu skupinu i podskupinu rASRM I-II. Međutim, uspoređujući ta dva parametra u uzorcima urina protein CYFRA 21-1 bilježi preciznije rezultate u odnosu na antigen CA 125.

Analiziran je jednaki broj uzoraka skupine uzoraka s EME, kontrolne skupine i podskupina uzoraka EME - rASRM I-II i rASRM III-IV. Ove dvije metode iskazuju rezultate u različitim mjernim vrijednostima te kao takve nisu međusobno usporedive. Rezultati su podijeljeni u pet skupina: nisku (CYFRA 21-1 = 100 - 499 ng/mg, CA 125 = 10,00 – 19,99 KU/l), srednje nisku (CYFRA 21-1 = 500 - 999 ng/mg, CA 125 = 20,00 – 34,90 KU/l), srednju (CYFRA 21-1 = 1000 - 4999 ng/mg, CA 125 = 35,00 – 49,90 KU/l), srednje visoku (CYFRA 21-1 = 5000 - 9999 ng/mg, CA 125 = 50,00 – 99,00 KU/l) i visoku razinu rezultata (CYFRA 21-1 =  $\geq 10000$  ng/mg, CA 125 =  $\geq 100$  KU/l). U obje analize skupine rezultati su podijeljeni na jednak način uzimajući u obzir sve izmjerene vrijednosti.

Rezultate analize urina metodom ELISA i seruma metodom ECLIA su uspoređeni nakon što su rezultati podijeljeni u skupine u obje analize izraženi udjelom u odnosu na veličinu analizirane skupine. Rezultati koncentracija proteina CYFRA 21-1 u urinu analiziranih metodom ELISA i CA 125 u serumu ECLIA metodom uspoređeni su za skupinu uzoraka s EME i kontrolnu skupinu (Slika 13.). Na isti način uspoređene su koncentracije proteina CYFRA 21-1 u urinu (ELISA) i CA 125 u serumu (ECLIA) u podskupinama uzoraka EME - rASRM I-II i rASRM III-IV (Slika 14.).



Slika 13. Zastupljenost proteina CYFRA 21-1 u urinu (ELISA) i CA 125 u serumu (ECLIA) u uzorcima s ekstrauterinom migracijom endometrija i kontrolnoj skupini.



Slika 14. Zastupljenost proteina CYFRA 21-1 u urinu (ELISA) i CA 125 u serumu (ECLIA) u podskupinama ekstrauterine migracije endometrija rASRM I-II i rASRM III-IV.

### Proteini u urinu – određeni dvodimenzionalnom elektroforezom

U ovom dijelu istraživanja učinjena je dvodimenzionalna elektroforeza (izoelektrično fokusiranje + SDS page elektroforeza) ukupno 60 uzoraka proteinskih taloga urina uzoraka skupine s EME (podskupine EME - rASRM I-II i rASRM III-IV) i kontrolne skupine. Ovom metodom nije prikazano razdvajanje proteina prema njihovoj molekulskoj masi iako je na jednodimenzionalnoj elektroforezi pokazana prisutnost proteina različite molekulske mase u uzorcima proteinskih taloga urina. Nakon bojenja elektroforetski obrađenih gelova s Coomassie brilliant blue G 250 bojom nisu se u dovoljnoj količini prikazali proteini na SDS-gelu niti nakon 4 dana bojenja gelova u otopini. Pretpostavljen je uzrok neuspjeloj analizi proteina u strukturi gela. Izrađeni su gelovi s većim i manjim porama. Međutim rezultat je bio nepromijenjen na 30 SDS gelova s većim porama i 30 SDS gelova s manjim porama. Ostali uzorci proteinskih taloga urina nisu dalje analizirani dvodimenzionalnom elektroforezom s obzirom da je napravljeno 60 SDS gelova na kojima su se elektroforetski razdvajali prethodno izoelektrično fokusirani proteini na IPG trakama koji nisu dali očekivane rezultate.

### 4.9. Proteini u urinu – određeni masenom spektrometrijom

Masenom spektrometrijom analizirani su proteinski talozi urina uzoraka skupine s EME (N=35) i kontrolne skupine (N=25). Rezultati su prikazani srednjom vrijednosti i statističkom vrijednosti „p“. Priprema proteinskih taloga urina za analizu masenom spektrometrijom rađena je na dva načina s puferom i bez pufera za lizu. Izdvojeno je 66 proteina koji su podijeljeni u 8 skupina prema aktivnosti u etiopatogenezi EME: imunosni faktori i upalni citokini, proteini s proteolitičkom aktivnosti i inhibitori proteaza, proteini koji sudjeluju u staničnoj migraciji i proliferaciji, proteini koji sudjeluju u stvaranju adhezija, proteini koji sudjeluju u apoptozi, proteini s učinkom na krvožilni sustav, proteini s antioksidacijskom aktivnosti u oksidacijskom stresu i ostali proteini koji sudjeluju u etiopatogenezi EME.

### Imunosni faktori i upalni citokini u urinu

Wilcoxonovim testom uz pouzdanost od 95% pokazano je da su koncentracije proteina Beta receptora transformirajućeg faktora rasta – tip 2 (ug/μl) analiziranog u urinu masenom spektrometrijom u skupini uzoraka s EME statistički značajno veće nego u uzorcima urina kontrolne skupine,  $p \leq 0,05$ . Koncentracija proteina Inducibilnog liganda koji kostimulira T stanice (ug/μl) u urinu u skupini uzoraka s EME statistički je značajno manja nego u uzorcima

kontrolne skupine,  $p < 0,05$ . Nema statistički značajne razlike u koncentraciji proteina faktora 1 stimulacije kolonije makrofaga i galektina 9B ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) između analiziranih skupina (Tablica 3.).

Tablica 3. Srednja vrijednost koncentracije ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) imunskih faktora i upalnih citokina u urinu: inducibilni ligand koji kostimulira T stanice (ICOS LG), beta receptor transformirajućeg faktora rasta – tip 2 (TGFB2), faktor 1 stimulacije kolonije makrofaga (CSF1) i galektin 9B (GAL9) u skupini uzoraka s ekstruterinom migracijom endometrija i uzorcima kontrolne skupine analiziranih masenom spektrometrijom (MS)

<b>Analizirani proteini u urinu (MS)</b>	<b>Uzorci skupine s EME srednja vrijednost (<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>) (N=30)</b>	<b>Uzorci kontrolne skupine srednja vrijednost (<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>) (N=25)</b>
<b>ICOS LG</b>	96,3 *	135,1
<b>TGFB2</b>	287,7 *	112,3
<b>CSF1</b>	105,8	101,8
<b>GAL9</b>	174,4	165,6

\* - statistička značajnost,  $p \leq 0,05$

Wilcoxonovim testom uz pouzdanost od 95% pokazano je da su koncentracije proteina antagonista receptora interleukina 1 i beta podjedinice receptora interleukina 6 ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) u urinu analiziranih masenom spektrometrijom u uzorcima skupine s EME statistički značajno veće nego u uzorcima kontrolne skupine,  $p \leq 0,05$ . Koncentracija veznog proteina interleukina 18 ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) u urinu u uzorcima skupine s EME značajno je manja nego u uzorcima kontrolne skupine,  $p < 0,05$ . Nema statistički značajne razlike u koncentraciji proteina beta podjedinice receptora interleukina 10 ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) između analiziranih skupina (Tablica 4.).

Tablica 4. Srednja vrijednost koncentracije ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) antagonista receptora interleukina 1 (IL1RN), beta podjedinice receptora interleukina 6 (IL10RB), beta podjedinica receptora IL-6 (IL6ST) i veznog proteina interleukina 18 (IL18BP) u urinu u skupini uzoraka s ekstruterinom migracijom endometrija i uzoraka kontrolne skupine analiziranih masenom spektrometrijom (MS).

<b>Analizirani proteini u urinu (MS)</b>	<b>Uzorci skupine s EME srednja vrijednost (<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>) (N=30)</b>	<b>Uzorci kontrolne skupine srednja vrijednost (<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>) (N=25)</b>
<b>IL1RN</b>	71,1 *	27,6
<b>IL10RB</b>	190,3	209,7
<b>IL6ST</b>	44,2 *	7,5
<b>IL18BP</b>	130,0 *	257,0

\* - statistička značajnost,  $p \leq 0,05$



Wilcoxonovim testom uz pouzdanost od 95% pokazano je da su koncentracije proteina komponenta komplementa C3, komplementa C4-A, faktora komplementa B i faktora komplementa H (ug/μl) u urinu analiziranih masenom spektrometrijom u uzorcima skupine s EME statistički značajno veće nego u uzorcima kontrolne skupine,  $p \leq 0,05$ . Koncentracije proteina komplementa C5, komplementa C7, komplementa C8 - alfa lanac i komplementa C9 (ug/μl) u urinu u skupini uzoraka s EME su statistički značajno manje nego u uzoraka kontrolne skupine,  $p \leq 0,05$  (Tablica 5.).

Tablica 5. Srednja vrijednost koncentracije (ug/μl) komplementa u urinu: komponente komplementa C3 (C3), komplementa C4A (C4A), komplementa C5 (C5), komplementa C7 (C7), komplementa C8 (C8) i komplementa C9 (C9), faktora komplementa B (CFB) i faktora komplementa H (CFH) u skupini uzoraka s ekstrauterinom migracijom endometrija i .uzorcima kontrolne skupine analiziranih masenom spektrometrijom (MS)

<b>Analizirani proteini u urinu (MS)</b>	<b>Uzorci skupine s EME srednja vrijednost (ug/μl) (N=30)</b>	<b>Uzorci kontrolne skupine srednja vrijednost (ug/μl) (N=25)</b>
<b>C3</b>	272,6 *	109,2
<b>C4A</b>	307,0 *	87,9
<b>C5</b>	50,4 *	349,5
<b>C7</b>	61,3 *	239,7
<b>C8</b>	138,5 *	250,9
<b>C9</b>	139,7 *	218,9
<b>CFB</b>	122,5 *	63,5
<b>CFH</b>	136,5 *	44,3

\* - statistička značajnost,  $p \leq 0,05$

#### Proteini s proteolitičkom aktivnosti i inhibitori proteaza u urinu

Wilcoxonovim testom uz pouzdanost od 95% pokazano je da su koncentracije proteina katepsina G i katepsina L1 (ug/μl) u urinu analizirane masenom spektrometrijom u uzorcima skupine s EME statistički značajno veće nego u uzorcima kontrolne skupine,  $p \leq 0,05$ . Nema statistički značajne razlike u koncentraciji proteina katepsina B i katepsina D (ug/μl) između analiziranih skupina (Tablica 6.).

Tablica 6. Srednja vrijednost koncentracije (ug/μl) proteina u urinu: katepsin B (CatB), katepsin D (CatD), katepsin G (CatG) i katepsin L (CatL) u skupini uzoraka s ekstrauterinom migracijom endometrija i uzorcima kontrolne skupine analiziranih masenom spektrometrijom (MS)

<b>Analizirani proteini u urinu (MS)</b>	<b>Uzorci skupine s EME srednja vrijednost (ug/μl) (N=30)</b>	<b>Uzorci kontrolne skupine srednja vrijednost (ug/μl) (N=25)</b>
<b>CatB</b>	147,4	155,9
<b>CatD</b>	58,9	52,3
<b>CatG</b>	256,4 *	24,4
<b>CatL</b>	219,1 *	173,2

\* - statistička značajnost,  $p \leq 0,05$

Wilcoxonovim testom uz pouzdanost od 95% pokazano je da su koncentracije proteina matriksa metaloproteinaze-9, inhibitora metaloproteinaze 2, inhibitora plazmatske proteaze C1, lektin serinske proteaze 2 koja veže manan i receptora supstrata kinaze epidermalnog faktora rasta 8 sličnog proteinu 2 (ug/μl) u uzorcima urina analizirani masenom spektrometrijom u skupini s EME statistički značajno manje nego u uzorcima kontrolne skupine,  $p \leq 0,05$  (Tablica 7.).

Tablica 7. Srednja vrijednost koncentracije (ug/μl) proteina s protealitičkom aktivnošću i inhibitora proteaza u urinu: matriks metaloproteinaza 9 (MMP-9), inhibitor metaloproteinaze 2 (TIMP-2), inhibitor plazmatske proteaze C1 (SERPING1), lektin serinska proteaza 2 koja veže manan (MASP2) i receptor supstrata kinaze epidermalnog faktora rasta 8 sličnog proteinu 2 (EPS8L2) u skupini uzoraka s ekstrauterinom migracijom endometrija i uzorcima kontrolne skupine analiziranih masenom spektrometrijom (MS)

<b>Analizirani proteini u urinu (MS)</b>	<b>Uzorci skupine s EME srednja vrijednost (ug/μl) (N=30)</b>	<b>Uzorci kontrolne skupine srednja vrijednost (ug/μl) (N=25)</b>
<b>MMP-9</b>	121,3 *	400,0
<b>TIMP-2</b>	166,7 *	233,3
<b>SERPING1</b>	11,4 *	124,9
<b>MASP2</b>	77,1 *	289,3
<b>EPS8L2</b>	55,6 *	344,4

\* - statistička značajnost,  $p \leq 0,05$

Wilcoxonovim testom uz pouzdanost od 95% pokazano je da su koncentracije proteina Inhibitora serinske proteaze kazal tip 5, inhibitora proteaze Kunitz tip 2, proteaze vezane na membranu transkripcijskog faktora 1 i transmembranske serinske proteaze 2 (ug/μl) u urinu analizirane masenom spektrometrijom u skupini uzoraka s EME statistički značajno manje nego

u uzorcima kontrolne skupine,  $p \leq 0,05$ . Koncentracije proteina prostazina ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) u urinu analizirane masenom spektrometrijom u skupini uzoraka s EME statistički su značajno veće nego u uzorcima kontrolne skupine,  $p < 0,05$  (Tablica 8.).

Tablica 8. Srednja vrijednost koncentracije ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) proteina s proteolitičkom aktivnosti i inhibitora proteaza u urinu: inhibitor serinske proteaze Kazal tip 5 (SPINK5), inhibitor proteaze Kunitz tip 2 (SPINT2), proteaza vezana na membranu transkripcijskog faktora 1 (MBTPS1), transmembranska serinska proteaza 2 (TMPRSS2) i prostazin (PRSS8) u skupini uzoraka s ektrauterinom migracijom endometrija i uzoraka kontrolne skupine analiziranih masenom spektrometrijom (MS)

<b>Analizirani proteini u urinu (MS)</b>	<b>Uzorci skupine s EME srednja vrijednost (<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>) (N=30)</b>	<b>Uzorci kontrolne skupine srednja vrijednost (<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>) (N=25)</b>
<b>SPINK5</b>	138,1 *	257,9
<b>SPINT2</b>	40,7 *	284,3
<b>MBTPS1</b>	23,3 *	376,7
<b>TMPRSS2</b>	0,0 *	280,0
<b>PRSS8</b>	479,0 *	170,9

\* - statistička značajnost,  $p \leq 0,05$

#### Proteini u urinu koji sudjeluju u stvaranju adhezija

Wilcoxonovim testom uz pouzdanost od 95% pokazano je da su koncentracije proteina adhezijskog staničnog vaskularnog proteina-1, proteina 1 sličan SPARC-u, L-selektina, protokaderina gama-C3, protokaderina-1, dezmozoplakina, antigena CD44 i mucina 1 ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) u urinu analizirani masenom spektrometrijom u skupini uzoraka s EME statistički značajno veće nego u uzorcima kontrolne skupine,  $p \leq 0,05$ . Statistički značajno manja razlika je u koncentraciji proteina trombospodina-1 ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) u urinu u skupini uzoraka s EME u usporedbi s kontrolnom skupinom,  $p < 0,05$ . Nema statistički značajne razlike u koncentraciji proteina stanične adhezijske molekule-1 ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) u uzorcima urina između analiziranih skupina (Tablica 9.).

Tablica 9. Srednja vrijednost koncentracije (ug/ $\mu$ l) proteina koji sudjeluju u stvaranju adhezija u urinu: stanična adhezijska molekula-1 (ICAM-1), adhezijski stanični vaskularni protein-1 (VCAM-1), protein 1 sličan SPARC-u (SPARCL1), trombospondin-1 (THBS1), L-selektin (SELL), protokaderin gama-C3 (PCDHGC3), protokaderin-1 (PDCH1), dezmozoplakin (DSP), antigen CD44 (CD44) i mucin 1 (MUC1) u skupini uzoraka s ekstrauterinom migracijom endometrija i uzorcima kontrolne skupine analiziranih masenom spektrometrijom (MS)

<b>Analizirani proteini u urinu (MS)</b>	<b>Uzorci skupine s EME srednja vrijednost (ug/<math>\mu</math>l) (N=30)</b>	<b>Uzorci kontrolne skupine srednja vrijednost (ug/<math>\mu</math>l) (N=25)</b>
<b>ICAM-1</b>	157,2	169,5
<b>VCAM-1</b>	190,1 *	21,8
<b>SPARCL1</b>	221,5 *	137,8
<b>THBS1</b>	28,6 *	62,4
<b>SELL</b>	222,7 *	156,1
<b>PCDHGC3</b>	216,3 *	134,7
<b>PDCH1</b>	400,0 *	67,7
<b>DSP</b>	285,1 *	114,9
<b>CD44</b>	274,8 *	151,9
<b>MUC1</b>	201,3 *	108,6

\* - statistička značajnost,  $p \leq 0,05$

#### Proteini u urinu koji imaju učinak na krvožilni sustav

Wilcoxonovim testom uz pouzdanost od 95% pokazano je da su koncentracije proteina lumikana, alfa lanaca fibrinogena i tenascina (ug/ $\mu$ l) u urinu analizirane masenom spektrometrijom u uzorcima skupine s EME statistički značajno veće nego u uzorcima kontrolne skupine,  $p \leq 0,05$ . Koncentracija proteina endoglina i angitenzina (ug/ $\mu$ l) u urinu u skupini uzoraka s EME statistički značajno su manje nego u uzorcima kontrolne skupine,  $p \leq 0,05$ . Nema statistički značajne razlike u koncentraciji proteina receptora 6 efrina B i oligomernog proteina hrskavičnog matriksa između analiziranih skupina (Tablica 10.).

Tablica 10. Srednja vrijednost koncentracije (ug/μl) proteina u urinu koji imaju učinak na krvožilni sustav: lumikan (LUM), endoglin (ENG), receptor 6 efrina B (EPH B6), alfa lanac fibrinogena (FGA), oligomerni protein hrskavičnog matriksa (COMPT), angiotenzin (AGT) i tenascin (TNC) u skupini uzoraka s ekstrauterinom migracijom endometrija i uzorcima kontrolne skupine analiziranih masenom spektrometrijom (MS)

<b>Analizirani proteini u urinu (MS)</b>	<b>Uzorci skupine s EME srednja vrijednost (ug/μl) (N=30)</b>	<b>Uzorci kontrolne skupine srednja vrijednost (ug/μl) (N=25)</b>
<b>LUM</b>	129,3 *	11,5
<b>ENG</b>	144,4 *	255,6
<b>EPH B6</b>	65,5	79,6
<b>FGA</b>	134,3 *	80,8
<b>COMPT</b>	186,3	213,7
<b>AGT</b>	166,6 *	233,4
<b>TNC</b>	308,8 *	98,2

\* - statistička značajnost,  $p \leq 0,05$

#### Proteini u urinu koji sudjeluju u apoptozi

Wilcoxonovim testom uz pouzdanost od 95% pokazano je da su koncentracije proteina klasterina, tetraspanina-1, aneksina A2 i cink-alfa-2-glikoproteina (ug/μl) u urinu analizirani masenom spektrometrijom u skupini uzoraka s EME statistički značajno veće nego u uzorcima kontrolne skupine,  $p \leq 0,05$  (Tablica 11.).

Tablica 11. Srednja vrijednost koncentracije (ug/μl) proteina u urinu koji sudjeluju u apoptozi: klasterin (CLU), tetraspanin-1 (TSPAN1), aneksin A2 (ANXA2) i cink-alfa-2-glikoprotein (AZGP1) u skupini uzoraka s ekstrauterinom migracijom endometrija i uzorcima kontrolne skupine analiziranih masenom spektrometrijom (MS)

<b>Analizirani proteini u urinu (MS)</b>	<b>Uzorci skupine s EME srednja vrijednost (ug/μl) (N=30)</b>	<b>Uzorci kontrolne skupine srednja vrijednost (ug/μl) (N=25)</b>
<b>CLU</b>	191,1 *	102,3
<b>TSPAN1</b>	246,5 *	89,4
<b>ANXA2</b>	228,7 *	131,3
<b>AZGP1</b>	181,6 *	53,3

\* - statistička značajnost,  $p \leq 0,05$

### Proteini u urinu koji sudjeluju u staničnoj migraciji i proliferaciji

Wilcoxonovim testom uz pouzdanost od 95% pokazano je da su koncentracije proteina faktora rasta sličnog inzulinu koji veže protein 2, faktora rasta sličnog inzulinu koji veže protein 3, inzulinu sličnom faktoru rasta koji veže protein 7, receptora faktora rasta sličnog inzulinu 1, proteina specifičnog za zaustavljanje rasta 6, receptora tirozin-protein kinaze i ezrina (ug/μl) u urinu analizirane masenom spektrometrijom u uzorcima skupine s EME statistički značajno manje nego u uzorcima kontrolne skupine,  $p \leq 0,05$  (Tablica 12.).

Tablica 12. Srednja vrijednost koncentracije (ug/μl) proteina koji sudjeluju u staničnoj proliferaciji i migraciji u urinu: faktor rasta sličan inzulinu koji veže protein 2 (IGFBP-2), faktor rasta sličan inzulinu koji veže protein 3 (IGFBP-3), faktor rasta sličan inzulinu koji veže protein 7 (IGFBP-7), receptor faktora rasta sličnog inzulinu 1 (IGFLR-1), protein specifičan za zaustavljanje rasta 6 (GAS6), receptor tirozin-protein kinaze (TYRO 3) i ezrin (EZR) u skupini uzoraka s ekstrauterinom migracijom endometrija i uzorcima kontrolne skupine analiziranih masenom spektrometrijom (MS)

<b>Analizirani proteini u urinu (MS)</b>	<b>Uzorci skupine s EME srednja vrijednost (ug/μl) (N=30)</b>	<b>Uzorci kontrolne skupine srednja vrijednost (ug/μl) (N=25)</b>
<b>IGFBP-2</b>	139,3 *	260,7
<b>IGFBP-3</b>	129,3 *	232,4
<b>IGFBP-7</b>	119,7 *	184,9
<b>IGFLR-1</b>	100,1 *	300,3
<b>GAS6</b>	55,1 *	344,9
<b>TYRO 3</b>	0 *	400,0
<b>EZR</b>	75,9 *	320,3

\* - statistička značajnost,  $p \leq 0,05$

### Proteini u urinu s antioksidacijskom aktivnosti u oksidacijskom stresu

Wilcoxonovim testom uz pouzdanost od 95% pokazano je da je koncentracije proteina kromogranina A (ug/μl) u urinu analizirana masenom spektrometrijom u uzorcima skupine s EME statistički značajno veća nego u uzorcima kontrolne skupine,  $p < 0,05$ . Koncentracije proteina afamina, superoksid dismutaze (Cu-Zn) i peroksiredoksina 2 (ug/μl) u urinu u skupini uzoraka s EME statistički značajno su manje nego u uzorcima kontrolne skupine,  $p \leq 0,05$  (Tablica 13.).

Tablica 13. Srednja vrijednost koncentracije (ug/μl) proteina u urinu koji imaju ulogu antioksidansa: afamin (AFM), superoksid dismutaza (Cu-Zn) (SOD1), kromogranin A (CHGA) i peroksiredoksin 2 (PRDX2) u skupini uzoraka s ekstrauterinom migracijom endometrija i uzorcima kontrolne skupine analiziranih masenom spektrometrijom (MS)

<b>Analizirani proteini u urinu (MS)</b>	<b>Uzorci skupine s EME srednja vrijednost (ug/μl) (N=30)</b>	<b>Uzorci kontrolne skupine srednja vrijednost (ug/μl) (N=25)</b>
<b>AFM</b>	67,1 *	118,2
<b>SOD1</b>	44,3 *	184,4
<b>CHGA</b>	100,9 *	49,2
<b>PRDX2</b>	32,1 *	117,9

\* - statistička značajnost,  $p \leq 0,05$

#### Ostali proteini koji imaju potencijalnu ulogu u etiopatogenezi EME

Wilcoxonovim testom uz pouzdanost od 95% pokazano je da su koncentracije histona H1-4, histona H3-1 i hepcidina (ug/μl) u urinu analizirane masenom spektrometrijom u skupini uzoraka s EME statistički značajno veće nego u uzorcima kontrolne skupine,  $p < 0,05$ . Koncentracija proteina haptoglobina (ug/μl) u urinu u skupini uzoraka s EME statistički značajno je manja nego u uzorcima kontrolne skupine,  $p < 0,05$  (Tablica 14.)

Tablica 14. Srednja vrijednost koncentracije proteina (ug/μl): histon H1-4 (H1-4), histon H3C1 (H3-1), haptoglobin (HP) i hepcidin (HAMP) u urinu u skupini uzoraka s ekstrauterinom migracijom endometrija i uzorcima kontrolne skupine analiziranih masenom spektrometrijom (MS)

<b>Analizirani proteini u urinu (MS)</b>	<b>Uzorci skupine s EME srednja vrijednost (ug/μl) (N=30)</b>	<b>Uzorci kontrolne skupine srednja vrijednost (ug/μl) (N=25)</b>
<b>H1-4</b>	263,1 *	68,7
<b>H3-1</b>	360,1 *	40,2
<b>HP</b>	4,4 *	97,5
<b>HAMP</b>	375,6 *	24,4

\* - statistička značajnost,  $p \leq 0,05$

## 5. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja pokazuju statistički značajnu povezanost EME s različitim vrstama proteina u urinu. Koncentracija ukupno izlučenih proteina u prvom jutarnjem urinu je statistički značajno veća u skupini uzoraka s EME u usporedbi s kontrolnom skupinom. Veće koncentracije ukupno izlučenih proteina u urinu pokazane su u svim stadijima proširenosti bolesti prema rASRM kriteriju, međutim nije pokazana statistički značajna razlika u koncentraciji proteina u urinu ovisno o stupnju proširenosti EME. Do sada je samo jedno istraživanje određivalo koncentracije izlučenih proteina u urinu kod EME. Studija Lessey (Lessey, 2014.) nije pokazala razliku u koncentraciji ukupnih proteina u urinu u uzorcima skupine s EME u odnosu na uzorke kontrolne skupine. Suprotno od rezultata dobivenih u navedenom istraživanju u ovom istraživanju zabilježena je statistički značajno veća koncentracija ukupnih proteina u urinu u uzorcima s EME. Razlika zabilježenih rezultata vjerojatno je zbog različite predanalitičke pripreme urina u ovom istraživanju za razliku od studije Lessey (Lessey, 2014.)

### 5.1. Protein CYFRA 21-1

Rezultati više različitih analitičkih metoda u ovom istraživanju pokazuju moguću povezanost povišene koncentracije proteina CYFRA 21-1 u urinu s EME kao i moguću povezanost promjene koncentracije proteina CYFRA 21-1 u urinu s klinički procijenjenim stupnjem proširenosti EME. Iako je protein CYFRA 21-1 u većini analitičkih metoda značajno povišen u uzorcima s EME u odnosu na kontrolnu skupinu uzoraka rezultati se djelomično preklapaju između uzoraka s EME i kontrolne skupine. Razine koncentracije proteina CYFRA 21-1 koreliraju s koncentracijom ukupnih proteina u urinu.

Osim statistički značajno povišene koncentracije proteina CYFRA 21-1 u urinu u skupini uzoraka s EME, pokazane su i statistički značajno različite koncentracije proteina CYFRA 21-1 ovisno o stupnju proširenosti EME. U slučaju veće proširenosti bolesti (EME-rASRM III-IV) koncentracija proteina CYFRA 21-1 u urinu je statistički značajno veća u odnosu na manji stupanj bolesti (EME - rASRM I-II) gdje se bilježe niže vrijednosti. Ovo istraživanje proteoma urina se razlikuje od slične studije rađene 2020. godine u kojoj su autori pokazali značajnu povezanost proteina CYFRA 21-1 i EME, ali nisu pokazali promjene koncentracije ovisno o stupnju proširenosti EME prema rASRM klasifikaciji (Draj i sur., 2020.).



Patofiziologija EME nije dovoljno razjašljena te postoji više teorija njenog nastanka. EME je u osnovi bolest spolnog sustava, međutim lokalizacije EME su različite. Nepostojanje specifičnog i neinvazivnog načina dijagnosticiranja dovodi do kasnog postavljanja dijagnoze. Često u trenutku početka liječenja postoji značajna progresija EME (Parasar i sur., 2017.). EME se najčešće nalazi na organima spolnog sustava, a rjeđe lokalizacije su na udaljenim mjestima koja nisu usko povezana sa spolnim organima (American Society for Reproductive Medicine, 1997.). Nepravovremeno i neuniformirano liječenje EME i nejednak odgovor na primijenjenu terapiju povezani su sa značajnim svakodnevnim poteškoćama u bolesnica s EME (Burney i sur 2012.). Ovim istraživanjem se željelo detektirati proteina CYFRA 21-1 u urinu kao mogući biomarker EME. Analizirani su i drugi proteini u urinu kao potencijalni biomarkeri EME. Urinarni biomarkeri bi omogućili rano i neinvazivno postavljanje dijagnoze EME kao i praćenje tijeka bolesti. Protein CYFRA 21-1 u fiziološkim okolnostima normalno se nalazi u epitelnim tkivima tvoreći vlaknasti citoskelet epitelnih stanica. Povišene koncentracije proteina CYFRA 21-1 u krvi i urinu vjerojatno nastaju djelovanjem serumskih proteaza i oslobađanja fragmenata citokeratinskih niti u krv, a potom bubrežnom filtracijom u urin (Menha i sur., 2008.). Određivanje proteina CYFRA 21-1 u serumu enzimskim imunološkim testom razvio je Boehringer Mannheim. Garcia-Valdecasas je 2020. godine multivarijantnim analizama postavio granicu povišene razine proteina CYFRA 21-1 u serumu. Enzimskim imunološkim testom definirao je normalne vrijednosti koncentracije proteina CYFRA 21-1 u serumu do 3,15 ng/mL (Garcia-Valdecasas i sur., 2020.; Takada i sur., 1995.; Menha i sur., 2008.).

Embrionalno se spolni sustav započinje razvijati iz iste osnove kao mokraćni sustav, a potom se od Wolfvog kanala odvaja ureteralni pupoljak koji će tvoriti kanalni sustav bubrega. U kasnijem tijeku razvoja u ženskog spola dolazi do regresije Wolfvog kanala i razvoja Müllerovih kanala (Sadler i sur., 2012.). Više je prihvaćenih teorija etiopatogeneze EME uključujući i teoriju embrionalnog Müllerovog kanala. Protein CYFRA 21-1 je koristan tumorski marker kod urotelijalnog karcinoma mokraćnog mjehura (Miyake i sur., 2017.). EME nastaje i na mokraćnom mjehuru. Patološke promjene koje nalazimo u mokraćnom sustavu uključujući i EME mokraćnog mjehura mogu maligno alterirati. Kod malignih bolesti urinarnog trakta gotovo uvijek nalazimo povišene vrijednosti proteina CYFRA 21-1 (Maggiore i sur., 2015.).

Rezultate analize proteina CYFRA 21-1 u urinu metodom ELISA potvrđeno je i metodom *western blot*. U ovom istraživanju metoda *western blot* analize proteina CYFRA 21-1 u urinu nije osnovna metoda već potvrda rezultata metode ELISA. Koncentracija proteina CYFRA 21-

I u uzorcima urina skupine s EME (ELISA, *western blot*) statistički značajno je veća u odnosu na uzorake kontrolne skupine. Ovisno o stupnju proširenosti EME koncentracije proteina CYFRA 21-1 u urinu rastu sa stupnjem kliničke proširenosti bolesti. U slučaju manjeg stupnja EME (rASRM I-II) vrijednosti proteina CYFRA 21-1 statistički značajno su niže u odnosu na veći stupanj proširenosti EME (rASRM III-IV).

Istraživanje koncentracije proteina CYFRA 21-1 u urinu metodom *western blot* u skupini uzoraka s EME prvi puta je objavljeno 2011. godine, ali na vrlo malom broju analiziranih urina (N=13) (Tokushige i sur., 2011.). Analiza proteoma urina u ovom istraživanju temelji se na značajno većem broju analiziranih uzoraka urina skupine s EME kao i uzoraka urina kontrolne skupine (N=141). Usporedbom ovog istraživanja s navedenim koncentracijama proteina CYFRA 21-1 u urinu uzimajući u obzir samo uzorke skupine s EME rezultati su slični. Međutim, za razliku od ovog istraživanja promjene koncentracije proteina CYFRA 21-1 u urinu ovisno o stupnju proširenosti EME drugi autori nisu pokazali (Tokushige i sur., 2011.; Draž i sur., 2020.).

Većina dosadašnjih istraživanja (Tokushige i sur., 2011.; Draž i sur., 2020.) koja se odnose na koncentraciju proteina CYFRA 21-1 u uzorcima urina skupine s EME rađena je metodom *western blot*, a samo u pojedinim istraživanjima metodom ELISA. Sung-hee (Sung-hee i sur., 2017.) uspoređivao je rezultate metoda ELISA i *western blot* analizirajući raspon detekcije, standardnu devijaciju i točnost rezultata u obje metode. Zaključuje da u sva tri analizirana parametra metoda ELISA u odnosu na metodu *western blot* pokazuje veću detekciju proteina, manju standardnu devijaciju i veću točnost rezultata. Metoda *western blot* ima manju osjetljivost, odnosno manji raspon detekcije proteina u odnosu na metodu ELISA. U ovom istraživanju proteoma urina niske koncentracije proteina CYFRA 21-1 u urinu su detektirane metodom ELISA, ali ne i metodom *western blot*.

Mnogi su autori od početka 2011. godine pa do danas pokušali identificirati protein CYFRA 21-1 u urinu kao biomarker urina koji će se istaknuti u dijagnostici EME i praćenju tijeka bolesti. Međutim, samo nekoliko istraživača je djelomično pokazalo takvu povezanost (Tokushige i sur., 2011.; Draž i sur., 2020.), dok drugi u svojim studijama nisu mogli potvrditi povezanost proteina CYFRA 21-1 i EME (Kuessel, 2014.; Lui i sur., 2015.; El-Kasti i sur., 2011.). Razlog nejednakim rezultatima koncentracije proteina CYFRA 21-1 u urinu u uzorcima s EME mogu biti zbog različite predanalitičke pripreme urina. Nisman (Nisman B, 2002.) smatra da necentrifugirani uzorci urina imaju bolje rezultate koncentracije proteina CYFRA 21-1. Precipitacija proteina u urinu s puferom za lizu rijetko se koristila u drugim istraživanjima.

Pojedini istraživači smatraju da određene faze menstruacijskog ciklusa utječu na aktivnost EME i imaju važnu ulogu u ekspresiji proteina CYFRA 21-1 u urinu. Dok jedni smatraju važnost provođenja istraživanja u preovulacijskoj fazi menstruacijskog ciklusa, drugi autori se ne slažu s time (Tokushige, 2011.; Draž i sur., 2020.; El-Kasti i sur., 2011.). Pretpostavka utjecaja faze menstruacijskog ciklusa na ishod rezultata usmjerila je i ovo istraživanje analize proteoma urina. Svi uzorci skupine s EME i kontrolne skupine bili su u folikularnoj fazi menstruacijskog ciklusa. Uzorci urina analiziranih skupina su tijekom predanalitičke pripreme centrifugirani, a urini su precipitirani puferom za lizu. Zabilježeni rezultati proteina CYFRA 21-1 u urinu ne potvrđuju nesumljivo da u etiopatogenezi EME sudjeluje protein CYFRA 21-1, međutim takva mogućnost postoji s obzirom na statistički značajno povećane koncentracije proteina CYFRA 21-1 u uzorcima urina s EME u usporedbi s uzorcima kontrolne skupine.

U slučaju visokih koncentracija proteina CYFRA 21-1 u urinu (ELISA, WB) obje su metode pokazale statistički značajno veću koncentraciju proteina CYFRA 21-1 u uzorcima s EME u odnosu na uzorke kontrolne skupine. Međutim, kod niskih koncentracija metoda *western blot* nije imala širinu raspona detekcije proteina u urinu kao metodom ELISA. Niže koncentracije proteina CYFRA 21-1 u urinu ( $\leq 7500$  kDa) u kontrolnoj skupini uzoraka nisu detektirane metodom *western blot*. Metoda *western blot* se zbog toga pokazala boljom, ali manje preciznom od metode ELISA u grupiranju uzoraka s EME od zdrave kontrole. Ovom metodom nakon vrijednosti proteina CYFRA 21-1 u urinu većoj od 7500 kDa nema preklapanja rezultata i jasno su razdvojeni uzorci s EME od uzoraka kontrolne skupine.

Draž (Draž i sur., 2020.) je istraživao razinu koncentracije proteina CYFRA 21-1 u serumu kod EME te je zabilježio veće koncentracije u uzorcima seruma skupine s EME u odnosu na kontrolnu skupinu uzoraka. U ovom istraživanju mjerene su također serumske koncentracije proteina CYFRA 21-1 u skupini uzoraka s EME i uzoraka kontrolne skupine. Nisu potvrđeni rezultati drugih istraživanja. Pokazana je statistički značajno veća koncentracija proteina CYFRA 21-1 u uzorcima seruma skupine s EME u odnosu na kontrolnu skupinu, ali sve izmjerene vrijednosti su bile u granicama normalnih ( $< 3,3$  ng/l). Moguće objašnjenje tih rezultata je u funkciji proteina CYFRA 21-1 u serumu kao jedne vrste enzimskog substrata (neutrofilne elastaze) i zato se brzo razgrađuje u serumu kod upalnih bolesti kao što je EME (Gjavotchanoff, 2015.; Bartek, 1986.). Budući da ipak postoji razlika u koncentraciji proteina CYFRA 21-1 u uzorcima seruma s EME u odnosu na serume kontrolne skupine postoji mogućnost da je došlo do lize određene koncentracije proteina CYFRA 21-1 u uzorcima seruma s EME zbog upalnog stanja. Razina koncentracije proteina CYFRA 21-1 u uzorcima seruma s

EME prije analize seruma moguće je bila veća, ali je prethodno došlo do njegove proteolize. U kontrolnoj skupini uzoraka nema upalne bolesti i zbog toga nema proteolize proteina CYFRA 21-1. Opisana proteoliza je vrlo moguća kod EME i zbog toga unatoč manjim koncentracijama proteina CYFRA 21-1 u skupini uzoraka s EME ipak postoji statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolnom skupinom uzoraka.

## 5.2. Antigen CA 125

Danas se postavljanje dijagnoze EME temelji na laparoskopskom kirurškom zahvatu s obaveznom patohistološkom dijagnozom. Tumorski marker CA 125 se u serumu koristi za praćenje tijeka bolesti. Pojedini istraživači smatraju da je serumska razina koncentracije CA 125 dobar pokazatelj stupnja proširenosti EME. Ne slažu se svi istraživači s time i smatraju da CA 125 ne pokazuje dovoljnu specifičnost u dijagnozi i praćenju proširenosti EME (Zhao i sur., 2020.; Karimi-Zarchi i sur., 2016). Serumska razina CA 125 je primarno povišena kod malignih bolesti jajnika, a kod EME pokazuje varijabilne rezultate posebno promatrajući njegovu koncentraciju u različitim stadijima progresije EME. Uspoređeni su rezultat koncentracije CA 125 u serumu i proteina CYFRA 21-1 u urinu u skupini uzoraka s EME u odnosu na kontrolnu skupinu. Protein CYFRA 21-1 u urinu kao i CA 125 u serumu pokazuju veće koncentracije u skupini s EME. Međutim, usporedbom različitih kliničkih stupnjeva proširenosti EME prema rASRM klasifikaciji koncentracija proteina CYFRA 21-1 u urinu se povećava s većim stupnjem progresije EME, dok CA 125 u serumu ne pokazuje takvu promjenu koncentracije.

U ovom istraživanju određivanje koncentracije CA 125 u serumu pokazalo se dobro u praćenju tijeka liječenja EME, ali nedovoljno dobro za određivanje stupnja progresije bolesti prema rASRM klasifikaciji. Koncentracija CA 125 u uzorcima seruma s EME je statistički značajno veća u odnosu na uzorke kontrolne skupine. Međutim, nije pokazana statistički značajna razlika u razini koncentracije između minimalnog i teškog oblika EME prema rASRM klasifikaciji. U objavljenim publikacijama ističu se različite razine koncentracije CA 125 u uzorcima serumu s EME u odnosu na ovo istraživanje (Karimi-Zarchi i sur., 2016.; Bedaiwy i sur., 2004). Postoji mogućnost da veća razina upalnog procesa u uzorcima podskupine EME rASRM III-IV mijenjajući propusnost endotela krvnih žila ima utjecaj na serumsku razinu CA 125 (Claesson-Welsh i sur., 2020.).

Tokushige (Tokushige, 2011.) je 2011. godine dvodimenzionalnom elektroforezom izdvojio proteine u urinu koji se nalaze u povećanoj koncentraciji u skupini uzoraka s EME. Nakon elektroforetskog razdvajanja proteina, gelovi su obojeni otopinom Sypro ruby za bojenje gelova

te potom analizirani masenom spektrometrijom. U ovom istraživanju proteoma urina uzorci urina su također analizirani dvodimenzionalnom elektroforezom, a gelovi s elektroforetski razdvojenim proteinima obojeni Coomassie blue brilliant G-250 otopinom boje. Nakon bojenja gelova nije dobivena dovoljna količina proteinskih mrlja kako bi se mogla analizirati razlika između uzoraka urina s EME i uzoraka kontrolne skupine. Za takav rezultat postoji pretpostavka da je uzrok u neadekvatnoj veličini pora na SDS gelu kao i u odabiru boje. Veličina pora na gelu se određuje koncentracijom akrilamida u cijelokupnoj smjesi za polimerizaciju gela. Napravljeni su elektroforetski gelovi s većim i manjim porama mijenjajući koncentraciju akrilamida. Na gelovima je nakon bojenja prikazan određen broj proteinskih mrlja što je potvrdilo ispravan postupak pri cijelokupnoj analizi, ali je ta količina elektroforetski razdvojenih proteina bila nedovoljna za daljnju analizu. S obzirom da je metoda ispravno rađena smatralo se da ovom metodom nije moguće pokazati proteine molekularne mase manje od 50 kDa zbog praga osjetljivosti metode. Osjetljivost detekcije Coomassie brilliant blue G250 boje manja je od 1 ng proteina u gelu, dok Sypro Ruby boja ima nešto veću mogućnost detekcije proteina u analiziranom uzorku. Jednaki uzorci obojeni su s Coomassie brilliant blue G250 i Sypro Ruby bojom koja je detektirala više proteinskih mrlja na gelu u odnosu na CBB G250. Obje metode bojenja SDS gelova u metodi dvodimenzionalne elektroforeze imaju svoje prednosti i nedostatke, a razlike među njima su male (Tokushige, 2011.; Hempelmann, 2008.; Butt i sur., 2013.). Postoji mala mogućnost neuspjele analize proteina uzoraka urina s 2DE metodom zbog odabira načina izrade SDS gela i uporabe Coomassie brilliant blue G-250 boje. Analizom proteina u proteinskim talozima urina kod EME masenom spektrometrijom potvrđeni su rezultate drugih istraživanja u serumu, peritonealnoj tekućini, eutopičnom i ektopičnom endometriju na neinvazivan način analiziranjem prvog jutarnjeg urina. Osim toga pokazana je statistički značajno povećana koncentracija i drugih proteina koji do sada nisu bili istraživani u EME.

### 5.3. Imunosni faktori i upalni citokini

Analizom imunskih faktora i upalnih citokina u urinu potvrđeni su rezultati objavljenih studija te je zabilježena veća ekspresija beta podjedinice receptora IL-6 i antagonista receptora IL-1 u urinu u skupini uzoraka s EME. Koncentracije antagonista receptora IL-1 u peritonealnoj tekućini značajno su veće u skupini uzoraka s EME u odnosu na kontrolnu skupinu. Također se bilježe veće koncentracije kod viših stupnjeva proširenosti EME (Wyatt i sur., 2021.). U više studija analizom biopsije eutopičnog endometrija i ektopičnih endometrijskih stanica

zabilježena je značajno veća koncentracija beta podjedinice receptora IL-6 u skupini uzoraka s EME u odnosu na kontrolnu skupinu (Li i sur., 2017.; Sherwin i sur., 2008.). Zabilježena je statistički značajno veća koncentracije komplementa C3, C4a, faktora komplementa B i faktora komplementa H i manje koncentracije C5, C7, C8 i C9 u urinu u skupini uzoraka s EME u odnosu na kontrolnu skupinu. Navedeno je istraživanja u kojem su snižene koncentracije komplementa u serumu kod EME za razliku od njihove koncentracije u peritonealnoj tekućini. Agostinis (Agostinis i sur., 2021.) analizom uzoraka seruma i peritonealne tekućine s EME bilježi povećane razine koncentracije komplementa C3, C4, C5b, C6, C7, C8 i C9 u peritonealnoj tekućini i smanjene koncentracije istih komplementa u serumu uzoraka s EME u odnosu na kontrolnu skupinu. Takvi rezultati istraživanja direktno impliciraju i snižene koncentracije komplementa u urinu kakvi su zabilježeni. S druge strane C3 i C4 komponente komplementa su proteini koji sudjeluju u akutnoj upali i povišene koncentracije u serumu nisu nužno povezane s EME. Sikora (Sikora i sur., 2018.) sugerira postojanje neuravnotežene regulacije komplementa u lektinskom i klasičnom putu u peritonealnoj tekućini uzoraka s EME. Takvo stanje ima proupalnu funkciju izazivajući kroničnu upalu i bol. Zaključuje da uzorcima u peritonealne tekućine s EME postoje značajno povećane koncentracije komponenti komplementa C3c i C4 u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu. Na osnovu ovog istraživanja potvrđuje važnu ulogu komplementa C3 u etiopatogenezi EME. Analizom endometrijskih stanica rijetko je zabilježena prisutnost komplementa C3 i C4 kod težih oblika EME za razliku od blažih oblika bolesti gdje su njihove koncentracije povišene. Komplementi C7, CFB i CFH, ovisno o analiziranim stanicama su različito eksprimirani u uzorcima s EME i kontrolne skupine. Zabilježene su visoke koncentracije komplementa C7 u ektopičnim endometrijskim stanicama dok eutopične endometrijske stanice pokazuju izrazito niske koncentracije komplementa C7 u skupini uzoraka s EME. Ekspresija proteina CFB i CFH također je viša u ektopičnim endometrijskim stanicama u odnosu na uzorke eutopičnog endometrija s EME (Suryawanshi i sur., 2014.).

Pokazana je statistički značajno manja koncentracija veznog proteina interleukina 18, inducibilnog liganda koji kostimulira T stanice, faktora 1 stimulacije kolonije makrofaga i granulocitnog faktora 1 stimulacije kolonije makrofaga u urinu u skupini uzoraka s EME u odnosu na kontrolnu skupinu. U publikacijama zabilježene su snižene koncentracije IL-18 u uzorcima peritonealne tekućine i seruma s EME u odnosu na kontrolnu skupinu uzoraka, ali nisu pronađena istraživanja u kojima se povezuju vezni protein interleukina 18 i EME (Glitz i sur., 2009.; Fairbanks i sur., 2009.; Ning i sur., 2004.). Citokin IL-18 regulira ravnotežu



protuupalnih citokina. Njegovu aktivnost s vrlo visokim afinitetom poništava IL18BP. Ekspresiju interferona gama (IFN $\gamma$ ) određuje IL18, a ekspresiju IL-18BP određuje IFN $\gamma$ . Budući da je IL18 iznimno važan aktivator patološke upale, njegova regulacija negativnom povratnom spregom pomoću IL18BP posredovanog IFN $\gamma$  ključan je mehanizam u upalnim procesima (Mühl i sur., 2019.) Povezanost IL 18 i IL18BP može objasniti jednako niske koncentracije IL18 u peritonealnoj tekućini i IL18RB u urinu.

Perricos (Perricos i sur., 2020.) je istraživao koncentraciju ICOS liganda u peritonealnoj tekućini kod EME i usporedio je s kontrolnom zdravom skupinom. Zabilježio je značajno nižu koncentraciju ICOS liganda u peritonealnoj tekućini kod EME u odnosu na kontrolnu skupinu. U peritonealnoj tekućini kod EME postoji neravnoteža protuupalnih i proupalnih medijatora. Povišena je koncentracija cijelog niza proupalnih proteina koji podržavaju kronično upalno stanje EME. Koncentracije protuupalnih citokina kao i ICOS liganda su snižene kao i u ovom istraživanju proteina u urinu (Perricos i sur., 2020.).

Rezultati povišenih koncentracija anti-GM-CSF u serumu u skladu su s zabilježenim rezultatima snižene koncentracije GM-CSF i CSF1 u uzorcima urina skupine s EME u ovom istraživanju. U istraživanju neinvazivnih biomarkera EME u serumu nije pronađena razlika u koncentraciji faktora stimulacije kolonije makrofaga granulocita (GM-CSF) u odnosu na kontrolnu skupinu (Anastasiu i sur., 2020.; Borrelli i sur., 2014.). Aligeti (Aligeti i sur., 2011.) je zabilježio povećane razine CSF-1 u peritonealnoj tekućini kod EME i zaključio da CSF-1 podržava kronično upalno stanje EME. U drugoj studiji analizirana je koncentracija anti-GM-CSF (anti-CSF2) u uzorcima seruma s EME, a rezultati su uspoređeni i sa stupnjem proširenosti bolesti.

Koncentracija anti-GM-CSF je značajno veća u uzorcima seruma s EME u odnosu na kontrolnu skupinu i povećava se s većim stupnjem proširenosti EME, a najveća je kod duboke zdjelične EME (Toullec i sur., 2020). Faktor stimulacije kolonije makrofaga (CSF1) ima ulogu u održavanju kroničnog upalnog stanja kod EME. Povišene koncentracije anti-GM-CSF u serumu direktno smanjuju koncentracije GM-CSF. Faktor stimulacije kolonija makrofaga (CSF1) i faktor stimulacije kolonije granulocita-makrofaga (CSF2) imaju isti učinak na aktivnost makrofaga. Nisu pronađene publikacije vezane za istraživanja CSF1 i EME u serumu. Potkrijepljeni su rezultati istraživanja proteina u urinu s CSF2 i anti-GM-CSF u serumu, jer koncentracija proteina u serumu mogu implicirati i jednake razine u urinu.

U ovom istraživanju proteoma urina nema razlike u koncentraciji galektina 9 i receptora galektina 9 imunoglobulina-3 T stanica u analiziranim skupinama. Receptor galektina 9 je imunoglobulin-3 T stanica (Tim-3). Interakcija Tim-3 s njegovim ligandom GAL 9 inducira apoptozu (Sakuishi i sur., 2011.). Kovácsa (Kovácsa i sur., 2021.) i suradnici analizirali su koncentraciju LGALS9 u uzorcima seruma s EME. Galectin-9 je bio značajnije viši kod uzoraka skupine s EME u odnosu na kontrolnu skupinu. Galektini su vjerojatno uključeni u regulaciju apoptoze i na taj način imaju indirektnu ulogu u progresiji EME. Brubel (Brubel i sur., 2017.) je također analizom uzoraka seruma s EME potvrdio značajno povišenu koncentraciju GAL-9 u odnosu na kontrolnu skupinu. Koncentracija GAL-9 bilježi i promjenu s povećanjem stupnja proširenosti EME. U EME nije dovoljno izražena apoptoza ektopičnih endometrijskih stanica što implicira mogući razlog rezultata koncentracija Gal9 i Tim3 u ovom istraživanju u urinu.

U literaturi nisu pronađena istraživanja koja povezuju EME s beta podjedinicom receptora IL-10 i Beta receptora transformirajućeg faktora rasta 2. U urinu u uzorcima skupine s EME zabilježena je veća koncentracija beta podjedinice receptora IL-10, ali ta razlika nije statistički značajna u odnosu na kontrolnu skupinu. Nekoliko je autora u svojim studijama istaknulo povišene vrijednosti IL-10 u ektopičnim endometrijskim stanicama i peritonealnoj tekućini u skupini uzoraka s EME uključujući i adenomiozu (Suen i sur., 2019.; Satriani i sur., 2019.; Alborzi i sur., 2019.). Koncentracije IL10RB nisu istraživane u serumu kod EME. Analizom koncentracije IL10RB u serumu mogla bi se ustvrditi moguća povezanost s EME i objasniti koncentracije u urinu. Osim toga u navedenim se studijama navode povišene koncentracije IL10 što indirektno implicira i povišene koncentracije njegovog receptora IL10RB.

Chen (Chen i sur., 2019.) je analizom seruma i ektopičnih endometrijskih stanica primjetio izrazito povišene koncentracije TGFBR1 u skupini uzoraka s EME. Receptori TGFBR1 i TGFBR2 su izoforme TGFBR. Kompleks TGF- $\beta$  sastoji se od dva transmembranska receptora tipa 1 i tipa 2 koji imaju aktivnost serin/treonin kinaze. Nakon aktiviranja TGF- $\beta$ , TGFBR2 fosforilira TGFBR1. Zajedno tvore kompleks koji se veže na TGF- $\beta$  proteine (Kamato i sur., 2013). Proteolitički TGF- $\beta$  je povišen u skupini uzoraka s EME. Sastavni je dio kompleksa TGF- $\beta$  su i TGFBR1 i TGFBR2. Povećane razine TGFBR1 iziskuju i povećane koncentracije TGFBR2 i istovremeno bilježe promjene koncentracije. Rezultati navedenog istraživanja gdje je povišen TGFBR1 su u skladu s povišenim koncentracijama analize TGFBR2 u uzorcima urinu skupine s EME.



#### 5.4. Proteini s proteolitičkom aktivnosti i inhibitori proteaza

Analizom koncentracije proteina s proteolitičkom aktivnosti i inhibitora proteaza katepsina G, katepsina L i lektin serinske proteaze 2 koja veže manan u urinu kod EME zabilježene su povećane koncentracije u skupini uzoraka s EME u odnosu na kontrolnu skupinu. U više studija istraživana je utjecaj Cat G u etiopatogenezi EME. U literaturi autori imaju jednak zaključak. Povećane koncentracije katepsina G u folikularnoj fazi menstrualnog ciklusa u stanicama eutopičnog endometrija mogu imati ulogu u nastanku EME (Laudanski i sur., 2013.). Razina katepsina G zabilježena u uzorcima tkiva ektopičnog endometrija kod EME bila je više od dvostruko veća u odnosu na eutopični endometrija uzoraka kontrolne skupine. (Grzywa i sur., 2014.). U ovom istraživanju proteoma urina zabilježena je statistički značajno veća koncentracija katepsina L u uzorcima skupine s EME. Porter (Porter i sur., 2016.). također bilježi do pet puta veća koncentracija CatL u stanicama ektopičnog endometrija u odnosu na peritonealno tkivo uzorcima s EME. U više istraživanja je zabilježena značajno veća koncentracije MASP 2 u peritonealnoj tekućini skupine uzoraka s EME u usporedbi s kontrolnom skupinom (Agostinis i sur., 2021.; Sikora i sur., 2018.). Veće koncentracije MASP 2 zabilježene su i analizom urina u skupini uzoraka s EME čime su potvrđena dosadašnja istraživanja i povezanost MASP2 i EME.

Analizom proteoma urina u skupini uzoraka s EME zabilježene su statistički značajno niže vrijednosti katepsina B, matriks metaloproteinaze-9, inhibitora metaloproteinaze 2 i inhibitora plazmatske proteaze C1 u odnosu na kontrolnu skupinu. U mnogim istraživanjima razlikuju se serumske koncentracije proteina od onih u endometrijskim stanicama ili peritonealnoj tekućini. S obzirom da nisu pronađane publikacije analize Cat B u serumu kod EME postoji vjerojatnost da je to razlog razlike između dosadašnjih studija i zabilježenih rezultata Cat B u urinu. U više studija su istraživane koncentracije katepsina B u eutopičnom i ektopičnom endometrijskom tkivu uzoraka s EME. Kim (Kim i sur., 2013.) navodi da bi veća ekspresija Cat B u eutopičnim endometrijskim stanicama mogla biti povezana s razvojem EME. Laudanski (Laudanski i sur., 2013.) analiziranjem eutopičnog endometrija kod EME i uočavanjem povećanih koncentracija katepsina B potvrđuje ključnu ulogu katepsina B u etiopatogenezi EME .

Analizom MMP-9 i TIMP-2 u proteinskim talozima urina u skupini uzoraka s EME je potvrdila dvije od dosadašnjih studija te su MMP-9 i TIMP-2 imali niže koncentracije u odnosu na kontrolnu skupinu. Omjer MMP9 i TIMP2 ima važnu ulogu u nastanku EME od njihovih koncentracija u analiziranom uzorku. Neadekvatna regulacija MMP može biti faktor u

etiopatogenezi EME. Nije jasno da li je neadekvatna regulacija MMP i TIMP kod uzoraka s EME primarni uzrok ili sekundarna reakcija ekstrauterinih endometriotičnih lezija.

Značajno niže koncentracije MMP-9 u odnosu na kontrolnu skupinu bile su u serumu i peritonealnoj tekućini (Liu i sur., 2015.). Analiza koncentracije MMP u uzorcima peritonealne tekućine s EME pokazuje povišenu koncentraciju MMP-9 i smanjenu koncentraciju TIMP -2 u odnosu na kontrolnu skupinu uzoraka (Huang i sur., 2004.; Szamatowicz i sur., 2002.). Skupina istraživača analizirala je MMP-9 i TIMP-2 u skupini s EME u eutopičnim i ektopičnim endometrijskim stanicama, serumu i peritonealnoj tekćini. Eutopične endometrijske stanice su pokazale niske koncentracije MMP-9 i visoke TIMP-2, dok su ektopične endometrijske stanice imale visoke koncentracije MMP-9 i niske TIMP-2 (Kuan i sur., 2021.). U drugim su istraživanjima u serumu i peritonealnoj tekućini kod EME pronađene niske koncentracije TIMP-2 (Rambulangi i sur., 2015.) i visoke razine MMP-9 (Kodarahmian i sur., 2019.) U jednoj studiji su zabilježene više koncentracije MMP-9 u eutopičnim enometrijskim stanicama uzoraka s EME u odnosu na kontrolnu skupinu (Madjid i sur., 2020.). Neadekvatna ekspresija MMP i TIMP može potaknuti EME aktivirajući procese migracije i invazije endometrijskih stanica i neoangiogenezu (Bałkowiec i sur., 2018.). Smatra se da MMP uz ostale faktore ima vrlo važnu ulogu u nastanku ekstrauterine implantacije endometriotičnih stanica, dok TIMP ima supresivnu ulogu u etiopatogenezi EME inhibirajući MMP (Madjid i sur., 2020.).

Reeker (Rekker i sur., 2017.) je analizirao potencijalne gene i biomarkere vezane uz EME u eutopičnim i ektopičnim endometrijskim stanicama. Inhibitor komplemenata SERPING 1 je povišen u uzorcima ektopičnog endometrija s EME (Regiani i sur., 2015.). U folikularnoj tekućini s EME SERPING 1 je bio detektiran u skupini uzoraka s EME, ali ne i u kontrolnoj skupini uzoraka. Protein SERPING1 je inhibitor serinske proteaze. Uključen je u regulaciju kaskadne reakcije komplemenata. Aktivacija C1 komplemenata pod kontrolom je C1 inhibitora tako što sprječava njegovu spontanu aktivaciju. U uzorcima urina skupine s EME zabilježene su izuzetno niske razine C1r i C1s u odnosu na kontrolnu skupinu. Koncentracije proteina SERPING 1 i C1s su očekivane. Moguće je da se oba proteina lokalno ekspimiraju u visokim koncentracijama, dok su njihove serumske koncentracije značajno niže (Rekker i sur., 2017.). Niskim koncentracijama SERPING 1 u serumu mogu se tumačiti i jednako niske koncentracije u uzorcima urina s EME.

Analizom proteina u urinu nije nađena razlika u koncentraciji CathD između analiziranih skupina. Kim (Kim i sur., 2013.) zamijećuje da je ekspresija CathD u sinergiji s koncentracijom estrogena. Zabilježene su veće koncentracije CathD u uzorcima peritonealne tekućine s EME i

koncentracija se povećava s većim stupnjem proširenosti EME. Zaključuje da katepsin D može regulirati proliferaciju i invaziju stanica u EME. U drugoj studiji analizirana je koncentracija katepsina-D u uzorcima seruma s endometriomima jajnika koja je bila značajno veća u odnosu na uzorke kontrolne skupine. Također je uočena korelacija koncentracije CathD sa stupnjem proširenosti EME (Protopapas i sur., 2010.). Suzumori (Suzumori i sur., 2005.) u istraživanju bilježi drugačije rezultate i ne nalazi značajne razlike u koncentraciji CathD u uzorcima seruma kod s EME. Možemo zaključiti da je urin manje dobar uzorak za analizu CathD u skupini s EME. S druge strane iako istraživanje nije recentno, rezultati ovog istraživanja proteina u urinu potvrđuju rezultate autora Suzumori (Suzumori i sur., 2005.). Ipak postoji mala mogućnost da unazad 15 godina analiza seruma nije bila na jednakoj razini kao danas i zbog toga možda nema razlike u koncentracijama CathD između analiziranih skupina.

Nema publikacija koje povezuju proteine receptora supstrata kinaze epidermalnog faktora rasta 8 sličnog proteinu 2, inhibitora serinske proteaze Kazal tip 5, inhibitora proteaze Kunitz tip 2, proteaze vezane na membranu transkripcijskog faktora 1, transmembranske serinske proteaza 2 i prostazina s EME. U ovom istraživanju analizom proteoma urina EPS8L2, SPINK 5, SPINT 2, MBTPS1, TMPRSS2 i PRSS8 imaju višestruko manju koncentraciju u skupini uzoraka s EME u odnosu na kontrolnu skupinu. Stanična adhezija, migracija i invazija stanica povezani su s EME. Remodeliranje aktinskog citoskeleta nužno je za postizanje stanične adhezije i migracije. Protein EPS8L2 veže faktor stimulacije rasta s aktinom i regulira remodeliranje aktinskog citoskeleta. Nadalje, EPS8L2 pojačava aktivnost EGF-a, a epidermalni faktor rasta sudjeluje u diferencijaciji stanica i mitozima. Zapaženo je da se EPS8 prekomjerno eksprimira u malignim bolestima jajnika (Luo i sur., 2021.; Flamini i sur., 2009.; Offenhäuser i sur., 2004.). Kako EME jajnika može imati maligni potencijal, moguće je da se EPS8L2 eksprimira u povećanoj koncentraciji kod visokorizične EME.

U urinu u skupini uzoraka s EME zabilježene su niske razine TMPRSS2. Mehanizam djelovanja kod EME može biti sličan kao i kod SPINT 2 utjecajem na aktivnost HGF. Poznato je da EME jajnika može imati maligni potencijal i alterirati u epitelni karcinom jajnika. U zdravom epitelu dobro je regulirana ekspresija gena za prostazin i on nije ekspimiran u nekancerogenim stanicama. Prekomjerna ekspresija prostazina izražena je u samom početku nastanka karcinoma jajnika. Progresijom karcinoma jajnika bilježi se porast koncentracije prostazina. Ta činjenica sugerira da bi PRSS8 mogao odražavati fenotip ovarijskog karcinoma (Tamir i sur., 2016.). Veliki broj autora istraživao je povezanost PRSS8 kod karcinoma jajnika. U slučajevima ovarijskog karcinoma zabilježili su značajno povišene koncentracije PRSS8. (Chunyan i sur.,

2021.; Kumar i sur., 2020.; Singh i sur., 2019.). S obzirom da su u ovom istraživanju patohistološkom analizom utvrđena samo dva uzorka s visokorizičnom EME, a PRSS8 se eksprimira u kancerogenim stanicama PRSS8 bi možda mogao biti dobar marker za selekciju visokorizične EME.

#### 5.5. Proteini koji sudjeluju u staničnoj migraciji i proliferaciji

U ovom istraživanju proteina u urinu koji sudjeluju u staničnoj migraciji i proliferaciji EME izdvojeni su protein specifičan za zaustavljanje rasta 6, receptor tirozin-protein kinaze i ezrin bilježe statistički značajno niže koncentracije u skupini uzoraka s EME u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod akutnih i kroničnih upalnih stanja izrazito su povišeni GAS6 i TYRO3 u serumu. Moguće je da su zbog proteolize u serumu manje koncentracije tih proteina u urinu. Naime, u literaturi nisu pronađena istraživanja u kojima su u serumu i urinu analizirane koncentracije proteina GAS6 i TYRO3 kod neoštećene funkcije bubrega. Protein Gas6 je ligand za Axl/Tyro3 receptorske tirozin-kinaze (RTK). Protein Tyro3 poznat je pod nazivom Sky. Afinitet vezanja Gas6 na receptore je veći za Axl nego Tyro3. Jednom receptorski vezan Gas6 aktivira fosforilaciju receptora, a koliko će reakcija biti jaka ovisi o njegovoj koncentraciji (Cormack i sur., 2008.). U istraživanju autora Sun (Sun i sur., 2002.). u kojem je analiziran protein GAS 6 i njihove tirozin-kinaza receptore Axl i Sky u uzorcima tkiva eutopičnog endometrija i ektrauterinih endometriotičnih lezija u skupni s EME. U svim analiziranim uzorcima endometrijskih stanica eutopičnog i ektopičnog endometrijskog tkiva pronađena je ekspresija Gas 6, Axl i Sky. Koncentracija Sky mRNA receptora tirozin-kinaze je bila jednaka u svim analiziranim tkivima uzoraka s EME. Međutim, koncentracije Gas6 i Axl mRNA u ektopičnom endometriju značajno su veće nego u uzorcima endometrijskih stanica eutopičnog endometrija u skupini s EME. Povišene koncentracije Axl mRNA zadržale su jednaku razinu u svim fazama menstrualnog ciklusa. Receptori Axl/Sky imaju aktivnost transformacije stanica te se smatra da su kod EME ekspimirani u povećanoj koncentraciji i uključeni u proliferaciju stanica i razvoj bolesti (Sun i sur., 2002.).

Više je istraživanja u kojima je analizirana ekspresija proteina ezrin u skupini uzoraka s EME. Jiang (Jiang i sur., 2012.) ukazuje na prekomjernu ekspresiju EZR kod uzoraka s EME i sugerira njegovu značajnu ulogu u procesu migracije endometrijskih stanica u EME. Analizirane su stanice eutopičnog i ektopičnog endometrija skupine s EME u odnosu na kontrolnu skupinu uzoraka. Zabilježene su značajno veće ekspresije ezrina u ektopičnim endometrijskim stanicama u odnosu na eutopičan endometriju (Song i sur., 2020.). Uspoređujući dosadašnja

istraživanja koja povezuju protein ezrin i EME s istraživanjem EZR u urinu nisu potvrđeni dosadašnji rezultati. Razlog nejednakim rezultatima može ležati u činjenici da su analizirani različiti uzorci. Naime, proteini u urinu produkt su staničnog metabolizma te je moguća njihova razgradnja proteolitičkim enzimima u krvi.

Nije nađena recentna literatura vezana uz istraživanja faktora rasta sličnog inzulinu koji veže protein 2, faktora rasta sličnog inzulinu koji veže protein 3, faktora rasta sličnog inzulinu koji veže protein 7 i receptora faktora rasta sličnog inzulinu 1 u uzorcima urina s EME. Zabilježeni rezultati u urinu uspoređeni su sa starijim studijama. U svim analiziranim uzorcima urina koncentracije IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-7 i IGFLR1 su statistički značajno niže u skupini uzoraka s EME u odnosu na kontrolnu skupinu, te su potvrđeni rezultati dosadašnjeg istraživanja (Kim i sur., 2000.). Moguće je da lokalno nisko eksprimirane koncentracije IGFBP-2 i IGFBP-3 imaju istu ekspresiju i u serumu što implicira niske koncentracije u urinu. U recentnoj literaturi se sugerira da su IGFBP-2, IGFBP-3 i IGFBP čimbenici koji dovode do proliferacije stanica karcinoma i progresiju bolesti (Li i sur., 2020.; Jin i sur., 2020.; Frisch sur., 2015.). Usporedbom koncentracije IGFB u peritonealnoj tekućini kod EME sa kontrolnom skupinom koncentracije IGFBP-3 i IGFBP-2 su u peritonealnoj tekućini značajno niže u uzorcima skupine s EME (Kim i sur., 2000.). Analizom koncentracije IGFBP-3 u folikularnoj tekućini u skupini uzoraka s EME nije zabilježena razlika u odnosu na kontrolnu skupinu (Cunha-Filho i sur., 2003.). Kutsukake (Kutsukake i sur., 2008.) je analizirao IGFBP-7 u ektopičnim endometrijskim stanicama za vrijeme menstruacijskog krvarenja i uzorcima seruma s EME. Koncentracije IGFBP-7 u serumu su znatno niže za razliku od povećane ekspresije IGFBP-7 u maternici tijekom menstruacije. Zaključuje da je IGFBP-7 povezan s etiopatogenezom EME.

Čimbenici rasta su važni u etiopatogenezi EME. Inzulin i čimbenici rasta slični inzulinu sudjeluju u diferencijaciji i proliferaciji stanica u endometriju tijekom menstrualnog ciklusa, a vjerojatno imaju i utjecaj u ektrauterinoj invaziji endometrijskih stanica u EME. Ekspresija receptora faktora rasta sličnog inzulinu 1 je manja u ektopičnim endometrijskim stanicama u usporedbi s ektopičnim endometrijem kod istih uzoraka s EME (Florova i sur., 2021.). Niže koncentracije receptora IGFLR impliciraju i niže koncentracije IGFLR-1 čime su vjerojatno potvrđeni rezultati dosadašnjih istraživanja.

## 5.6. Proteini koji sudjeluju u stvaranju adhezija

Koncentracije proteina u urinu koji sudjeluju u stvaranju adhezija stanične adhezijske molekule ICAM-1, adhezijskog staničnog vaskularnog proteina ICAM-1, trombospodina 1, L selektina, antigena CD44 i mucina 1 u urinu znatno su veće u skupini uzoraka s EME. Više je studija (Li i sur., 2018.; Proestling i sur., 2020.; Gupta i sur., 2006.; Kuessel i sur., 2017.) u kojima je analiziran utjecaj ICAM-1 u etiopatogenezi EME. Navodimo studiju (Li i sur., 2018.) u kojoj je zaključeno da serumski ICAM-1 ima graničnu dijagnostičku vrijednost kod EME. Dijagnostička točnost puno je veća kod azijske populacije u usporedbi s bijelcima. U drugoj studiji zaključeno je da nema razlike u koncentraciji ICAM-1 u uzorcima seruma između skupine s EME i kontrolne skupine. Jednako tako koncentracija ICAM-1 nije povezana sa stupnjem progresije EME (Proestling i sur., 2020.). U istraživanju koncentracije ICAM-1 u peritonealnoj tekućini u skupini s EME nema značajne razlike u usporedbi s kontrolom skupinom. Koncentracije ICAM-1 ne razlikuju se niti među uzorcima s različitim stadijima EME (Gupta i sur., 2006.). Navodimo istraživanje u kojem su analizirane koncentracije VCAM-1 i ICAM-1 u ektopičnim i eutopičnim endometrijskim stanicama, peritoneumu i serumu u skupini uzoraka s EME u odnosu na kontrolnu skupinu. Koncentracije VCAM-1 i ICAM-1 u skupini uzoraka s EME znatno su veće u ektopičnim endometrijskim stanicama u odnosu na eutopični endometrij. Jednako su zabilježene veće koncentracije VCAM-1 i ICAM-1 u peritonealnim stanicama u skupini uzoraka s EME koje nisu bile zahvaćene s endometrijskim plakovima u odnosu na kontrolnu skupinu. Eutopične endometrijske stanice uzoraka s EME bilježe veće koncentracije VCAM-1 u odnosu na kontrolnu skupinu. Analizom serumskih koncentracija uzoraka s EME zabilježene su niže koncentracije ICAM-1 i više koncentracije VCAM-1 u odnosu na kontrolnu skupinu uzoraka. Koncentracija VCAM-1 u serumu bila je povezana sa stupnjem proširenosti EME (Kuessel i sur., 2017.).

Potvrđena je povećana ekspresija TSP1 molekula unutar signalnog puta u skupini uzoraka s EME. Signalni put TSP1-CD47-SIRP $\alpha$  podržava razvoj ektopičnih endometrijskih stanica aktivirajući pojačano lučenje makrofaga i neoangiogenezu. Stvarajući prouplani milje u peritonealnoj tekućini TSP1 sudjeluje u nastanku i progresiji EME. Aktivacija makrofagne fagocitoze u eutopičnim endometrijskim stanicama povećava se blokiranjem CD47-SIRP $\alpha$  signalnog puta (Liu i sur., 2020.).

Analizirane su eutopične endometrijske stanice i endometrijske stanice ektopičnih lezija u skupini uzoraka s EME s ciljem identificiranja proteina koji imaju ulogu u adheziji stanica pojačanih s TGF- $\beta$ 1. Određivana je koncentracija nekoliko adhezijskih molekula za koje se



smatra da imaju važnu ulogu u etiopatogenezi EME. Ekspresija CD44, integrina  $\beta 5$ , ICAM-1 i L-selektina nisu imali povećane koncentracije u skupini uzoraka s EME u odnosu na kontrolnu skupinu uzoraka (Choi i sur., 2017.). Siregar (Siregar i sur., 2014.) je analizirao ekspresiju L-selektina u ektopičnom endometriju i zabilježio znatno veću koncentraciju u peritoneumu u skupini s EME. Također sugerira da se progresijom EME povećavaju i razine koncentracije L-selektina. Ligand L-selektin je imao značajno niže koncentracije u eutopičnim i ektopičnim endometrijskim stanicama u skupini uzoraka s EME u odnosu na kontrolnu skupinu (Palomino i sur., 2007.).

Veliki je broj studija (Knudtson i sur., 2016.; Borland i sur., 1988.; Burkle i sur., 2013.; Koo i sur., 2013.; Usta i sur., 2020.) koje u svojim istraživanjima analiziraju ulogu antigena CD44 u nastanku i progresiji EME. Knudtson (Knudtson i sur., 2016.) ukazuje na pojačanu ekspresiju CD44v6 u endometrijskim stomalnim stanicama bazirajući studiju u *in vitro* uvjetima i *in vivo* na miševima. Smatra kako CD44 utječe na povećanu adheziju endometrijskih stanica za peritonealne mezotelne stanice (PMC). Borland (Borland i sur., 1988.) je još prije tri desetljeća zaključio važnost uloge antigena CD44 u staničnim procesima adhezije i migracije stanica. Također navodi molekulu CD44 kao marker matičnih stanica raka. Autor Burkle (Burkle i sur., 2013.) istraživanjem uloge CD44 u EME zapaža povezanost CD44 u međusobnoj adheziji i migraciji stanica u skupini s EME. Ovim saznanjima prethodila je studija autora Koo (Koo i sur., 2013.) u kojoj nije nađena izravna poveznica između CD44 i povećane adhezije stanica endometrijske strome na PMC. U studiji na mišjem modelu Knudtson (Knudtson i sur., 2020.) je pokazao manju progresiju EME kod nižih vrijednosti CD44. Zaključuje da izoforma antigena CD44 i karakteristike eutopičnih endometrijskih stanica imaju složenu ulogu u razvoju EME. Studiju na uzorcima eutopičnog endometrijskog tkiva s EME istraživao je Usta (Usta i sur., 2020.) i zaključio kako smanjena ekspresija adhezijskih molekula i povećana ekspresija Oct-4 u endometrijskim tkivima mogu imati važnu ulogu u razvoju i napredovanju EME. Aktivnost oktamer-vezujućeg proteina 4 (Oct-4) uzrokuje pluripotenciju i samoobnavljanje stanica u različitim vrstama benignih i malignih tkiva, dok aktivnost adhezijske molekule ima antigen CD44. Razlike u dobivenim rezultatima između ovog i prethodnih istraživanja gotovo da nema unatoč različitim analiziranim uzorcima.

U studiji Dharmaraj (Dharmaraj i sur., 2014.) prikazana je mala razlika u ekspresiji transmembranskog MUC1 i MUC16, a analizom MUC4 nije se zabilježena razlika između eutopičnih endometrijskih stanica kontrolne skupine i ektopičnog endometrijskog tkiva s EME. Zapazili su kontinuirano jednaku koncentraciju transmembranskog mucina u svim fazama

menstruacijskog ciklusa. Imunološkim bojenjem endometrijskih stanica vidi se snažna ekspresija MUC1 i MUC16 i iznimno mala MUC4. Transmembranski MUC1 se u fiziološkim uvjetima nalazi na eutopičnim endometrijskim stanicama. Kod EME jajnika u ektopičnim endometrijskim stanicama MUC 1 pokazuje pojačanu ekspresiju. Koncentracije anti-MUC1 mogu utjecati na promjenu ekspresije MUC1. Induciranjem EME na transgenim Kras miševima i razvojem MUC1 pozitivnih lezija nalik na EME zabilježene su visoke koncentracije IgG anti-MUC1 antitijela (Kralíčková i sur., 2015.). U ranijim istraživanjima također je pokazano da je glikoprotein MUC1 pojačano eksprimiran kod EME i u epitelnim tumorima jajnika (Vlad i sur., 2006.). EME jajnika može maligno alterirati. Etiološki čimbenici razvoja karcinoma jajnika i EME imaju sličnosti. Pojačanu ekspresiju glikoproteina MUC1 nalazimo u oba patološka stanja. Protein MUC1 u urinu kod EME bilježi statistički značajno veće vrijednosti čime su potvrđena ranija istraživanja.

Nije pronađena literatura povezanosti proteina 1 sličnog SPARC-u, protokaderina 1, dezmozoplakina i EME. Azmy (Azmy i sur., 2014.) ističe da su kultivacijom matičnih stanica izdvojeni proteini specifični za EME. Matične stanice su kultivirane iz uzoraka seruma s EME i pokazuju veću ekspresiju proteina SPARC u odnosu na kontrolnu skupinu. Navedeni rezultati govore u prilog teorije matičnih stanica u nastanku EME. Meola (Meola i sur., 2010.) je u peritonealnim lezijama EME i endometriomima jajnika analizirao koncentracije SPARC-a te ih je usporedio s uzorcima zdravih kontrola. Zabilježene su značajno veće koncentracije proteina SPARC u svim analiziranim uzorcima u skupini s EME u odnosu na uzorke bez EME. Uočena je i značajna razlika između peritonealnih lezija i endometrioma jajnika. Protein SPARC je kiseli protein bogat cisteinom. Članovi obitelji SPARC dijele iste domene i razvrstani su u pet različitih skupina SPARCL1, SPARCs, SPOCKs, SMOCs, i FSTL1. Svi članovi obitelji SPARC inhibiraju staničnu adheziju, reguliraju aktivnost citokina i diferencijaciju stanica te aktiviraju matriks metaloproteinaze (Gerarduzzi i sur., 2020.). U ovom istraživanju u kojem je analiziran proteom urina u skupini uzoraka s EME zabilježena je statistički značajno veća koncentracija SPARCL 1 u odnosu na kontrolnu skupinu. Zbog iznimne sličnosti u molekularnom djelovanju ova dva proteina prikazana je analiza SPARC i EME. Smatra se da povišene koncentracije proteina SPARC impliciraju i povišene koncentracije SPARCL 1 u etiopatogenezi EME.

Iako su protokaderini članovi skupine kaderina među njima postoje bitne razlike. Podkaderini su samo slični kaderinima. Imaju više kaderinskih ponavljanja u ektodomeni, posjeduju transmembransku domenu i posve drugačiji citoplazmatski rep. U fiziološkim uvjetima PCDH



se uglavnom eksprimira samo tijekom embrionalnog razvoja mozga. U odrasloj dobi samo nekoliko tkiva izražava ekspresiju PCDH. Većina PCDH se smatra supresorima tumora. Pretpostavlja se da reguliraju diferencijaciju i regeneraciju stanica (Pancho i sur., 2020.). U ovom istraživanju analizom proteoma urina koncentracije protokaderina gama C3 i protokaderina 1 statistički značajno su veće u skupini uzoraka s EME u odnosu na kontrolnu skupinu. S obzirom na njihove aktivnosti moguća je pojačana ekspresija kod EME kao odgovor na intraperitonealna zbijanja proliferacije i adhezije ektopičnih endometrijskih stanica.

Desmoplakin I/II nađen je u endometrijskom žljezdanom epitelu u proliferativnoj i sekrecijskoj fazi menstrualnog ciklusa (Tabibzadeh i sur., 1995.). U ovom istraživanju analizom proteinskih taloga urina desmoplakin je statistički značajno povišen u skupini uzoraka s EME u odnosu na kontrolnu skupinu. Desmoplakin je jedan od važnijih komponenti desmosoma koji učvršćuju intermedijarne filamente i učvršćuju strukturu stanice i povećavaju adheziju stanica. U EME jako je izražena adhezija stanica što može objasniti i povećane koncentracije desmoplakina.

#### 5.7. Proteini koji sudjeluju u apoptozi

Pokazana je statistički značajno povećana koncentracija proteina u urinu koji sudjeluju u apoptozi klasterina, tetraspanina 1, aneksina A2 i cink alfa 2-glikoproteina u skupini uzoraka s EME u usporedbi s kontrolnom skupinom. U literaturi pronađeno je samo jedno istraživanje u kojem je analizirana povezanost EME i CLU. Ispitivanjem koncentracije CLU u cervikalnoj sluzi u skupini s EME zabilježene su povišene vrijednosti, ali ne značajno u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod EME ako se koristi terapija hormonskim oralnim kontraceptivima značajno su niže koncentracije CLU u odnosu na one bez terapije (Konrad i sur., 2016.). Povećana ekspresija klasterina utječe na obnavljanje membranskih lipida u apoptozi stanica (Jones i sur., 2002.). Ekspresija ApoJ je pojačana kod oksidacijskog stresa, upale i oštećenja stanica. Smatra se da ApoJ ograničava ozljedu stanica poticanjem remodeliranja tkiva (Ma i sur., 2019.). Povećana ekspresija CLU je u ravnoteži s redoks neravnotežom, degeneracijom tkiva i nekrozom stanica. Također je povećana koncentracija CLU povezana sa stresom kod oksidacijskog i proteolitičkog djelovanja na stanice (Rohne i sur., 2016.). Analizom koncentracije CLU u uzorcima urina zabilježene su povišene vrijednosti u skupini s EME u odnosu na kontrolnu skupinu. Povećana koncentracija klasterina u uzorcima s EME može biti posljedica pojačane apoptoze i proteolize stanica uzrokovanih oksidacijskim stresom. Navedene biokemijske reakcije opravdavaju rezultate ovog istraživanja CLU u urinu.

Analizom jajnika životinjskog porijekla zaključeno je da tetraspanini imaju važnu ulogu kod proliferacije stanica i određuju stanični odgovor na oksidacijski stres. Funkcija TSPAN1 moguće je povezana sa suzbijanjem proliferacije, migracije i invazije stanica. Smanjenja koncentracija TSPAN1 potiče staničnu proliferaciju. Smatra se da bi dovoljno visoke razine koncentracije TSPAN1 mogle suprimirati proliferaciju i migraciju stanica (Zhang i sur., 2019.). U istraživanju na tkivu jajnika svinja autori su željeli povezati EME s njezinom malignom transformacijom u karcinom svijetlih stanica jajnika (OCCC). Pokazali su da TSPAN1 aktivira protein kinazu (AMPK) potičući nastanak EME i rast endometrijskih stanica. Zaključili su da povećane razine TSPAN1 imaju ulogu u razvoju EME visokog rizika koja ima potencijal maligne alteracije pod utjecajem visokih koncentracija proteina TSPAN1 kao gena uključenog u proces, EME može napredovati prema OCCC. Aktivnost AMPK i kaskadno TSPAN1 potiču rast endometrijskih stanica i nastanak EME (Shin i sur., 2021.). U navedenim istraživanjima analizirano je tkivo jajnika za razliku od ovog istraživanja proteoma urina gdje su izmjerene povećane koncentracije kod EME.

Kaya (Kaya i sur., 2018.) analizom uzoraka seruma s EME zaključuje da je koncentracija proteina ANXA2 značajno viša u skupini s EME u odnosu na kontrolnu skupinu. Koncentracija ANXA2 povezana je i s proširenošću EME te su zabilježene razlike između ASRM I-II i ASRM III-IV stupnja EME. Pojedini autori su istraživali proteine u egzosomima peritonealne tekućine kod EME. Izolirali su egzosome u peritonealnoj tekućini kod EME i usporedili nalaze s kontrolnom skupinom. Proteomskim tehnikama izdvojeni su specifični proteini u egzosomima s EME koji nisu pronađeni u uzorcima kontrolne skupine. Također su zaključili da koncentracija, ali ne i sadržaj egzosoma varira ovisno o fazi menstrualnog ciklusa i fazi proliferacije EME. U uzorcima skupine s EME za razliku od kontrolne skupine identificiran je protein Aneksin 2 (Nazri i sur., 2020.). Povećanu ekspresiju ANXA2 u ektopičnim lezijama endometrijskih stanica kod adenomioze potvrdili su Zhou i suradnici (Zhou i sur., 2012.). Razina koncentracije ANXA 2 usporediva je s jačinom dismenoreje. Također su pokazali da je kod viših koncentracija proteina ANXA2 povećana i neoangiogeneza kod adenomioze. Analizom proteoma urina potvrđena su dosadašnja istraživanja.

Više je autora analiziralo koncentracije Cink alfa 2-glikoproteina u uzorcima seruma u skupini s EME i zabilježili su značajno veće koncentracije u odnosu na kontrolnu skupinu. Zaključili su da AZGP1 ima važnu ulogu u etiopatogenezi EME (Anastasiu i sur., 2020.; Crapper i sur., 2016.; Signorile i sur., 2016.). Statistički značajno povećane koncentracije AZGP1 u uzorcima urina s EME sugeriraju isti zaključak kao u navedenim istraživanjima.

#### 5.8. Proteini s učinkom na krvožilni sustav

Analizom proteina u urinu s učinkom na krvožilni sustav pokazane su statistički značajno veće koncentracije lumikana, endoglina, alfa lanca fibrinogena i tenescina u skupini uzoraka s EME i moguće sudjeluju u njenoj etiopatogenezi. Prikazana je retrospektivna studija analize eutopičnog i ektopičnog endometrijskog tkiva skupine s EME, a rezultati su uspoređeni s kontrolnom skupinom. U svim tkivima analiziran je protein LUM. Ekspresija LUM-a znatno je veća u uzorcima skupine s EME u usporedbi s kontrolnom skupinom. Viša koncentracija LUM-a je u ektopičnom endometriju u usporedbi s eutopičnim endometrijskim tkivom skupine s EME. Navedeni rezultati su zabilježeni u sekrecijskoj, ali ne i u proliferativnoj fazi menstrualnog ciklusa (Irungu i sur., 2019.). Analizom proteoma urina u skupini uzoraka s EME u odnosu na kontrolnu skupinu uzoraka potvrđena su dosadašnja istraživanja. Koncentracija proteina lumikan u urinu u skupini uzoraka s EME u proliferativnoj fazi menstrualnog ciklusa je statistički značajno veća u odnosu na kontrolnu skupinu. Međutim, iako su potvrđeni rezultati navedene studije vezano za koncentraciju LUM-a i EME faza menstrualnog ciklusa nije bila identična. S obzirom da su u ovom istraživanju proteoma urina svi uzorci bili u proliferacijskoj fazi menstrualnog ciklusa, nameće se pitanje moguće istih rezultata i u sekrecijskoj fazi.

Analizom endoglina u stanicama eutopičnog i ektopičnog endometrijskog tkiva zabilježena je značajno veća razina ENG u uzorcima ektopičnog endometrija kod EME. Endoglin je u drugim istraživanjima također imao povećanu ekspresiju u ekstrauterinom endometrijskom tkivu, ali i u eutopičnom endometriju u skupini s EME. Kod određenih patoloških stanja može doći do pojačane ekspresije ENG-a što stimulira staničnu migraciju i invaziju te apoptozu (Chen i sur., 2021.). Analizom endometrijskih stanica ektopičnog endometrija u skupini s EME pokazana je povećana koncentracija endoglina u odnosu na eutopični endometrij (Gupta i sur., 2006.). Koncentracije ENG u ovom istraživanju u urinu bilježe jednake rezultate.

U dvije različite studije (Irungu i sur., 2019.; Tan i sur., 2008.) analizirana je koncentracija TNC u ektopičnom endometrijskom tkivu u skupini s EME i zabilježeni su proturiječni rezultati. U jednoj su studiji zabilježili veću koncentraciju TNC u ektopičnom endometriju u uzorcima skupine s EME u odnosu na eutopični endometrij kontrolne skupine. Druga skupina autora sugerira gubitak cikličke ekspresija TNC u uzorcima endometrija s EME i ne nalaze povećanu ekspresiju TNC u stanicama ektopičnog endometrija. Ipak su zaključili da povišene

koncentracije TNC mogu potaknuti proliferaciju i adheziju stanica u EME. Povećane koncentracije TNC u urinu sugeriraju na povećanu proliferaciju i adheziju stanica.

U istraživanju Li (Li i sur., 2020.) analizirana je koncentracija FGA u endometrijskim stanicama eutopičnog endometrija u skupini s EME jajnika stupnja ASRM III-IV. Zabilježeni rezultati su uspoređeni s tkivom jajnika kontrolne skupine. Značajno veća ekspresija FGA u skupini s EME usko je povezana sa stupnjem bolesti. Zaključeno je da FGA ima važnu ulogu u etiopatogenezi EME. Chen (Chen i sur., 2019.) je izvjestio o značajno većoj koncentraciji FGA u serumu, eutopičnom i ektopičnom tkivu endometrijskih stanica kod EME. Visoka ekspresija FGA povezana je sa stupnjem proširenosti EME. Zabilježena je veća koncentracija kod jače izražene stanične adhezije i invazije. U ovom istraživanju FGA u urinu nema razlike između analiziranih skupina što može biti posljedica različito analiziranih uzoraka.

Budući da u literaturi nisu pronađene publikacije vezane uz istraživanje ekspresije EPH B6 i EME, a značajno više istraživanja je povezano s malignim oboljenjima jajnika i endometrija (Gu i sur., 2016.; Adu-Gyamfi i sur., 2021.) nemoguće je usporediti rezultate s uzorcima urina s EME. U urinu nije zabilježena razlika u koncentraciji EPH B6 između analiziranih uzoraka. Poremećena regulacija EPH B6 izrazito je povezana s proliferativnim bolestima (Liang i sur., 2021.). Proliferacija stanica u EME može biti potaknuta i međustaničnom signalizacijom posredovanom povećanom koncentracijom EPH B6. Receptor EPH je specifičan za efrin-B1 i efrin-B2. Vezivanjem efrina B2 na receptor može imati dvojak aktivnost i potaknuti aktivirajuće ili supresivno djelovanje stanične adhezije. Vrsta reakcije ovisi o razini koncentracije efrina B-2. Stimulacijom efrina B-2 suprimira se izlučivanje interleukina 2 i ekspresija molekule CD25. Između ostalih bioloških funkcija EPH B6 pozitivno utječe na regulaciju aktivnosti kinaze i na transmembranski receptor proteina tirozin-kinaze. Efrinski receptori sudjeluju u embronalnom razvoju, angiogenezi i metastazama stanica raka. U malignim stanicama nalazimo izrazito visoke koncentracije efrinskih receptora. Povišene koncentracije EPH receptora zamijećene su i kod EME. Vezanjem efrina i EPH receptora aktiviraju se procesi koji reguliraju staničnu proliferaciju, angiogenezu, diferencijaciju i migraciju stanica. Izrazito visoka koncentracija EPH receptora između ostalih oboljenja vežu se i s epitelnim karcinomom jajnika. (Adu-Gyamfi i sur., 2021.). Obama (Obama i sur., 2005.) ističe različitu funkciju EPH B6 ovisno o koncentraciji efrin-B2. Niske koncentracije efrina-B2 stimulacijom EPH B6 potiču adheziju i migraciju stanica, dok su visoke koncentracije efrina B2 imale suprotan učinak. Faizullin (Faizullin i sur., 2021.) je analizirao ekspresiju efrinskih

receptora s EME te je pokazao pojačanu ekspresiju EPH receptora u uzorcima ektopičnih endometrijskih stanica u odnosu na uzorke eutopičnog endometrija.

Analizom koncentracije proteina Oligomernog proteina hrskavičnog matriksa i angiotenzina u uzorcima urina nema razlike u skupini s EME u odnosu na kontrolnu skupinu. Nisu izdvojeni COMPT i AGT u urinu kao faktori koji sudjeluju u etiopatogenezi EME. Janše (Janše i sur., 2021.) navodi pretpostavku da bi COMP mogao taloženjem kolagena poticati stvaranje intraperitonealnih adhezija u EME. Taj proces može eksprimirati povećane razine COMP-a na lokalnoj razini, ali ne i u povećanoj koncentraciji u serumu i urinu. Nedavno je u istraživanju analizirana peritonealna tekućina u skupini s EME koristeći antitijela za detekciju proteina. Izolirano je 16 različitih proteina koji su se uglavnom odnosili na angiogenezu, disfunkcionalni imunološki sustav, fibrinogenezu i kroničnu upalu u EME. Između ostalih proteina analiziran je i protein COMP koji je statistički značajno povišen u skupini uzoraka s EME u odnosu na kontrolnu skupinu (Janše i sur., 2021.). Veće koncentracije u odnosu na kontrolnu skupinu zabilježio je i AGT, ali ta razlika nije statistički značajna. Ovi proteini imaju važnu ulogu u etiopatogenezi EME. U navedenoj studiji razine AGT u peritonealnoj tekućini su vrlo slične rezultatima u ovom istraživanju proteina u urinu.

#### 5.9. Proteini s antioksidacijskom aktivnosti u oksidacijskom stresu

S obzirom na različito analizirane uzorke u istraživanju proteoma urina u skupini uzoraka s EME u usporedbi s kontrolnom skupinom nije se moglo u potpunosti potvrditi dosadašnja istraživanja proteina s antioksidacijskoj aktivnosti u oksidacijskom stresu. Zabilježene su statistički značajno veće vrijednosti afamina i kromogranina A u urinu u skupini uzoraka s EME u odnosu na kontrolnu skupinu. U EME jedan od važnijih faktora je oksidacijski stres. Afamin je pojačano eksprimiran u oksidacijskom stresu. Vrlo vjerojatno se AFM pojačano eksprimira kod EME što je pokazano u ovom istraživanju. Seeber (Seeber i sur., 2010.) je analizirao koncentracije afamina i vitamina E u uzorcima seruma i peritonealne tekućine u skupini s EME u odnosu na zdrave uzorke kontrolne skupine. Zaključio je da su razine afamina u peritonealnoj tekućini direktno povezane s razinom oksidacijskog stresa kod EME, dok razine AFM u serumu nisu bile povećane. Unutar peritonealne tekućine koncentracije afamina značajno su niže kod EME u stadijima rASRM I, II i III u odnosu na rASRM IV. Koncentracija vitamina E je jednaka vrijednostima afamina. Međutim, nisu zabilježene značajne razlike u koncentraciji AFM u serumu između analiziranih skupina. Ovim istraživanjem je zaključeno da su nastanak i progresija EME povezani s oksidacijskim stresom u peritonealnoj tekućini.

Tsao (Tsao i sur., 2007.) i suradnici su analizirali uzorke seruma asimptomatskih s EME s više različitih tumorskih markera. Između ostaloga su mjerili serumske koncentracije CA 125 i kromogranina A. Zabilježili su u skupini uzoraka s EME povećane koncentracije CA 125 i CgA. Pojedini uzorci su imale povećane koncentracije Cga, ali ne i CA 125. Sugeriraju važnost istovremenog određivanja koncentracije CA 125 i CgA kod određenih patoloških stanja povezanih s jajnikom ili maternicom .

U ovom istraživanju analizom proteoma urina zabilježene su statistički značajno niže koncentracije Cu-Zn superoksid dismutaze i peroksiredoksina 2 u skupini uzoraka s EME u odnosu na kontrolnu skupinu. Iako se radi o analizi različitih uzoraka ovom istraživanju koncentracije proteina Cu-Zn superoksid dismutaze i peroksiredoksin 2 u urinu u skupini uzoraka s EME potvrđene su dosadašnje spoznaje vezane za mogući utjecaj u nastanku EME. U različitim istraživanja je analizirana koncentracija SOD 1 u peritonealnoj tekućini s EME. Utvrđene su niže vrijednosti koncentracije superoksid dismutaze u odnosu na kontrolnu skupinu uzoraka. U peritonealnoj tekućini s povećanjem stupnja proširenosti EME koncentracija superoksid dismutaze je sve manja. Zaključeno je da ima važnu ulogu u smanjenoj razgradnji slobodnih kisikovih radikala i progresiji EME (Amreen i sur., 2019.; Turgut i sur., 2013.). U nekoliko studija sugerira se važnost različitih antioksidansa, uključujući i cink kao faktor koji može imati važnu ulogu u nastanku i progresiji EME. Cink ima funkciju antioksidansa, a sudjeluje i u regulaciji imunološkog sustava kod upalnih stanja. Njegova razina ima direktan utjecaj na aktivnost Cu-Zn superoksid dismutaze (SOD1), a time i nastanak EME (Nasladek i sur., 2020.). Pejić (Pejić i sur., 2008.) je u analizi uzoraka seruma i tkiva endometrija u skupini s polipom endometrija, hiperplazijom i adenokarcinom endometrija. Analiziran je utjecaj promijenjene razine enzima Cu-Zn-SOD kod tih bolesti. Rezultati upućuju na sudjelovanje kisikovih radikala u etiopatogenezi ginekoloških bolesti. Istraživanje upućuje na smanjenu razinu i aktivnost Cu-Zn-SOD kod ginekoloških poremećaja u kojima je oksidacijsko oštećenje stanica potaknuto djelovanjem slobodnih kisikovih radikala (ROS). Neravnoteža u koncentraciji ROS-a i SOD-a može imati važnu ulogu u etiopatogenezi oštećenja stanica kod ginekoloških bolesti..

U istraživanju u kojem su analizirani PRDX1, PRDX2 i PRDX3 u uzorcima seruma u skupini s EME zabilježene su značajno niže koncentracije u usporedbi s kontrolnom skupinom. Sve tri izoforme peroksiredoksina značajno su manje u ektopičnim endometrijskim stanicama u odnosu na eutopični endometrij kod EME (Yu i sur., 2020.). Sova (Sova i sur., 2012.) je analizirao koncentracije PRDX2 u tkivu jajnika uspoređujući ekspresiju PRDX2 kod karcinoma



jajnika povezanih s EME i u uzorcima bez EME, ali s malignim bolestima jajnika. Karcinomi jajnika su pretežno bili s histološkom slikom seroznog karcinoma. Analizirani uzorci s karcinomom jajnika bez EME imaju značajno manju ekspresiju PRDX2 u usporedbi s uzorcima koje uz karcinomu jajnika imaju i EME.

#### 5.10. Ostali proteini koji imaju potencijalnu ulogu u etiopatogenezi EME

U ovom istraživanju statistički značajno je veća koncentracija histona H3.1, H1.4 i hepcidina u uzorcima urina u skupini s EME u odnosu na kontrolnu skupinu. S obzirom na vrlo visoke vrijednosti H3.1 moguća je veća aktivnost histonske acetiltransferaze u odnosu na dosadašnje studije. Regulacija strukture kromatina ovisi o acetilaciji histona. Veliki je broj istraživanja raznih tkiva i staničnih linija kod patoloških procesa endometrija u kojima često postoji aberantna acetilacija histona i promijenjene koncentracije histon deacetilaze (HDAC). To se posebno odnosi na karcinome endometrija i EME. Visoke razine HDAC-a također su povezane s EME (Gujral i sur., 2020.). Samartzis (Samartzis i sur., 2013.) je pokazao da su zbog promijenjene regulacije ekspresije HDAC kod EME koncentracije acetiliranog histona u ektopičnom endometriju značajno niže u odnosu na eutopične endometrijske stanice kontrolne skupine. Epigenetske modifikacije koje uključuju modifikaciju histona, metilaciju DNA i ekspresiju mikroRNA važan su faktor u etiopatogenezi EME. Ovi epigenetski čimbenici su u sinergiji s oksidacijskim stresom, visokim koncentracijama lokalnog estradiola i velikom količinom proupalnih citokina koji sudjeluju u nastajanju i progresiji EME (Hsiao i sur., 2017.). Vrlo je malo studija u kojima je analizirana koncentracija histona H1 kod EME. Povećane koncentracije histona H1.4 u urinu u skupini s EME mogu biti posljedica niskih razina HDAC. Montiero (Monteiro i sur., 2014.) sugerira da bi kod EME neregulirana funkcija deacetilaze imala za posljedicu hipoacetilaciju histona. Dugotrajnom hipoacetilacijom histona nastaje fenotip EME koji potiče nastanak i progresiju EME. Analizirane su ektopične endometrijske stanice kod EME i eutopični endometriji kontrolne skupine (Xia i sur. 2013.). Ekstrauterine endometrijske stanice imaju niže koncentracije acetilacije H3 u usporedbi s kontrolnom skupinom. Kod EME postoje specifične histonske modifikacije koje nazivamo histonski kod. Dvije studije su u svojim istraživanjima zabilježile sniženu rzinu acietilacije H3 u stromalnim endometrijskim stanicama kod EME (Monteiro i sur., 2014.) U zdravim stanicama prevladava acitilacija histona dok u malignim stanicama deacitilacija što smanjuje ukupnu koncentraciju proteina. Histoni se acetiliraju pomoću histonske acetiltransferaze (HAT) acetilacijom lizinskih ostataka. Histon deacitilaza (HDAC) uklanja acetilnu skupinu histonskih ostataka lizina

(Suraweera i sur., 2018.). Analizom koncentracije hepcidina u uzorcima urina u skupini s EME potvrđena su istraživanja koncentracije hepcidina u peritonealnom prostoru. Zabilježena je izrazito veća koncentracija hepcidina u uzorcima urina u skupini s EME u odnosu na kontrolnu skupinu. S obzirom da se hepcidin metabolizira putem bubrega i njegove koncentracije u plazmi su gotovo jednake onima u urinu rezultat je bio očekivan. Takav rezultat je vjerojatno posljedica češćih krvarenja u uznapredovanim stadijima EME te dolazi do nakupljanja ekstravaskularnog željeza i pojačane produkcije hepcidina. Nakupljanje željeza u organizmu narušava ravnotežu u antioksidacijskoj zaštiti stanica i stvaranja slobodnih radikala što ima za posljedicu citotoksični učinak na stanice. Kod EME su pronađene velike količine željeza u peritonealnoj šupljini koje su vjerojatno porijeklom iz ekstrauterinih endometriotičnih lezija koje mogu periodično krvariti. Nakupljanje željeza aktivira prekomjernu proizvodnju slobodnih kisikovih radikala stvarajući oksidacijski stres. Makrofagi fagocitiraju stare eritrocite, aktiviraju proupalne kemokine, citokine i adhezijske molekule. Takvo peritonealno okruženje potiče upalno stanje i aktivira pojačanu sekreciju hepcidina. Nakupljanje željeza u makrofagima i stanje oksidacijskog stresa dovode do stvaranja kronične upale, smanjene apoptoze i proliferacije ekstrauterinih endometrijskih stanica (Manolov i sur., 2013.). Manolov (Manolov i sur., 2015.) je analizom uzoraka seruma s EME zaključio da povećane razine hepcidina u serumu imaju važnu ulogu u etiopatogenezi EME. Kobayashi (Kobayashi, 2016.) je u istraživanju analizirao potencijalne uzroke maligne alteracije EME i nastanka karcinoma jajnika. Zaključio je da postoje najmanje dva faktora koji bi mogla sudjelovati u tom procesu. Prvi faktor je nakupljanje hemoglobina, hema i željeza u peritonealnoj tekućini kod EME što dovodi do staničnih mutacija i oštećenja DNK zbog stanja oksidacijskog stresa. U takvom miljeu kontinuirano se izlučuju antioksidansi koji mogu imati prokancerogeno djelovanje što navodi kao drugi mogući faktor maligne alteracije EME.

Pokazane su statistički značajno snižene razine haptoglobina u uzorcima urina u skupini s EME u odnosu na kontrolnu skupinu. Hwang (Hwang i sur., 2014.) je analizom uzoraka plazme s EME zabilježio značajno smanjenu koncentraciju haptoglobina u plazmi u odnosu na kontrolne uzorke. U drugom istraživanju zabilježeni su posve drugačiji rezultati od onih koji su zabilježeni u ovom istraživanju, ali u uzorcima eutopičnog i ektopičnog endometrijskog tkiva s EME. Zaključili su da ektopične endometrijske stanice eksprimiraju poseban oblik haptoglobina (protein endometrioze-I) čija je aktivnost regulirana interleukinom 6 (IL-6). Haptoglobin eksprimiran u ektopičnim endometrijskim stanicama smanjuje fagocitnu funkciju makrofaga i povećava koncentraciju IL-6. Ektopične endometrijske stanice lučenjem



haptoglobina izbjegavaju fagocitozu putem peritonealnih makrofaga, ali i stimuliraju pojačanu ekspresiju IL-6 koji pak potiče dodatnu ekspresiju haptoglobina u ektopičnim endometrijskim stanicama. Kao posljedica tih procesa peritonealni makrofazi kod EME pojačano vežu haptoglobin što potiče sintezu IL-6 i razvoj EME (Sharpe-Timms i sur., 2002.). Isti autori su nekoliko godina kasnije u sličnom istraživanju ustanovili da eutopični endometriji kod EME zbog reakcije na prisutnost upalnih citokina proizvodi povećane razine haptoglobina. Zaključili su da pojačana ekspresija endometrijskog HP-a ima ulogu u etiopatogenezi EME (Sharpe-Timms i sur., 2010.).

Ovim istraživanjem pokazani su proteini koji se kod EME izlučuju u povišenoj koncentraciji putem urina. Njihovom identifikacijom i određivanjem razine koncentracije te potvrđivanjem promjena razine koncentracije ovisno o stupnju proširenosti EME pokazano je moguće njihovo sudjelovanje u etiopatogenezi EME.

Nedostatak ovog istraživanja jest u činjenici da protein CYFRA 21-1 u serumu osim kod EME može biti povišen i kod malignih bolesti u vidu adenokarcinoma jajnika, pluća i mokraćnog mjehura te metastatskih karcinoma dojke, želuca, debelog crijeva, melanoma i metastatskog karcinoma neodređenog porijekla. Kod navedenih onkoloških stanja CYFRA 21-1 u serumu je povišena u 75% slučajeva kod karcinoma pluća, 15 % slučajeva kod metastatskih tumora i 10 % slučajeva kod urotelijalnih karcinoma. Povišene razine proteina CYFRA 21-1 nalazimo i kod neonkoloških bolesti kao što su akutna i kronična infekcija u organizmu, bolestima probavnog trakta u smislu gastritisa i ulkusa želuca, opstrukcije žučnih vodova i jetre, bolestima pluća kao što su dispneja i KOBP te kod autoimunih bolesti.

Iako su isključeni iz analize uzorci urina i seruma s nekom od navedenih bolesti postoji vrlo mala mogućnost postojanja neke od tih bolesti koje još nisu dijagnostičane. Za sve navedene onkološke i neonkološke bolesti koncentracije proteina CYFRA 21-1 su analizirane u serumu, osim kod urotelijalnog karcinoma gdje su analizirani serum i urin. Postoji mogućnost da iako nisu rađena istraživanja koncentracije proteina CYFRA 21-1 u urinu kod bolesti koje pokazuju povišene koncentracije proteina CYFRA 21-1 u serumu one budu povišene i u urinu koji je osnovni analizirani uzorak u ovom istraživanju (Garcia-Valdecasas i sur., 2020.; Huang, 2015.).

## 6. ZAKLJUČCI

Ovim istraživanjem pokazana je povezanost povišenih koncentracija ukupno izlučenih proteina, proteina CYFRA 21-1 i drugih specifičnih proteina u urinu kao i CA 125 u razvojem EME. Promjena razine koncentracije proteina CYFRA 21-1 u urinu također pokazuje povezanost sa stupanjem proširenosti EME.

1. Ukupna koncentracija izlučenih proteina u proteinskih taloga urina analizirana metodom Bradford u skupini uzoraka s EME je statistički značajno viša u odnosu na uzorke kontrolne skupine.
2. Koncentracije proteina CYFRA 21-1 u proteinskih taloga urina analiziranih metodom ELISA su statistički značajno veće u skupini uzoraka s EME u odnosu na uzorke kontrolne skupine. Razlike u koncentraciji proteina CYFRA 21-1 povezane su i sa stupnjem proširenosti EME.
3. Vrijednosti koncentracije proteina CYFRA 21-1 u proteinskim talozima urina analiziranih metodom *western blot* u skupini uzoraka s EME statistički značajno su veće u odnosu na uzorke kontrolne skupine.
4. Koncentracija CA 125 u serumu analizirana ECLIA metodom je veća u skupini uzoraka s EME u odnosu na uzorke kontrolne skupine dok u podskupinama EME rASRM I-II i rASRM III-IV nema statistički značajne razlike u razini koncentracije CA 125 u serumu.
5. Spektrometrijom masa proteoma urina pokazani su proteini koji su u statistički značajno većim koncentracijama u uzorcima s EME i za koje se pretpostavlja da bi mogli sudjelovati u etiopatogenezi bolesti.
6. Analiza koncentracije proteina CYFRA 21-1 u proteinskim talozima urina analiziranih metodom ELISA u odnosu na analizu metodom *western blot* pokazala se jednako vrijedno uspoređivanjem uzoraka s EME u odnosu na kontrolnu skupinu. Međutim, kod niskih koncentracija proteina CYFRA 21-1 u uzorcima proteinskih taloga urina metoda *western blot* nije najbolji odabir za analizu.
7. Određivanje koncentracije proteina CYFRA 21-1 u urinu u dijagnostici EME ima sličnu vrijednost kao i CA 125 u serumu. Kod određivanja stupnja proširenosti EME prema rASRM klasifikaciji koncentracija proteina CYFRA 21-1 u urinu pokazala se bolja u odnosu na vrijednost koncentracije CA 125 u serumu za ista stanja.

## **7. PRILOG – POPIS PROTEINA**

**VCAM 1** (*od eng. Vascular cell adhesion protein 1*) - adhezijski stanični vaskularni protein-1

**AFM** (*od eng. Afamin*) - afamin

**FGA** (*od eng. Fibrinogen alpha chain*) - alfa lanac fibrinogena naziv

**C8A** (*od eng. Complement component C8 alpha chain*) - alfa lanac komponenta komplementa C8

**ANXA2** (*od eng. Annexin A2*) - aneksin A2

**AGT** (*od eng. Angiotensinogen*) - angiotenzinogen

**IL1RN** (*od eng. Interleukin-1 receptor antagonist protein*) - antagonist receptora interleukina 1

**CD 44** (*od eng. Antigen CD44*) - antigen CD44

**IL10RB** (*od eng. Interleukin-10 receptor subunit beta*) - beta podjedinica receptora interleukina 10

**IL6ST** (*od eng. Interleukin-6 receptor subunit beta*) - beta podjedinica receptora interleukina 6

**TGFBR2** (*od eng. TGF-beta receptor type-2*) - beta receptor transformirajućeg faktora rasta – tip 2

**CTPS** (*od eng. Cathepsin D*) katepsin D

**AZGP1** (*od eng. Zinc-alpha-2-glycoprotein*) - cink-alfa-2-glikoprotein

**CSF1** (*od eng. Macrophage colony-stimulating factor 1*) - faktor 1 stimulacije kolonije makrofaga

**CFB** (*od eng. Complement factor B*) - faktor komplementa B

**CFH** (*od eng. Complement factor H*) - faktor komplementa H

**DSP** (*od eng. Desmoplakin*) - deztoplakin

**ENG** (*od eng. Endoglin*) - endoglin

**EZR** (*od eng. Ezrin*) - ezrin

**LGALS9B, GAL 9** (*eng. Galectin-9B*) - galektin 9B

**HP** (*od eng. Haptoglobin*) - haptoglobin

**HAMP** (*od eng. Hepcidin*) hepcidin

**H1-4** (*od eng. Histon H1.4*) - histon H1.4

**H3C1, H3-1** (*od eng. Histon H3.1*) - histon H3.1

**ICOSLG** (*od eng. Inducible T Cell Costimulator Ligand*) - inducibilni ligand koji kostimulira T stanice

**TIMP2** (*od eng. Metalloproteinase inhibitor 2*) - inhibitor metaloproteinaze 2

**SERPING1** (*od eng. Plasma protease C1 inhibitor*) - inhibitor plazmatske proteaze C1

**SPINT2** (*od eng. Kunitz-type protease inhibitor 2*) - inhibitor proteaze Kunitz tip 2

**SPINK5** (*od eng. Serine protease inhibitor Kazal-type 5*) - inhibitor serinske proteaze Kazal tip 5

**IGFBP-2** (*od eng. Insulin-like growth factor-binding protein 2*) - inzulinu sličan faktor rasta koji veže protein 2

**IGFBP-3** (*od eng. Insulin-like growth factor-binding protein 3*) - inzulinu sličan faktor rasta koji veže protein 3

**IGFBP-7** (*od eng. Insulin-like growth factors -binding protein 7*) - inzulinu sličan faktor rasta koji veže protein 7

**CTSB, CatB** (*od eng. Cathepsin B*) - katepsin B

**CTSG, CatG** (*od eng. Cathepsin G*) - katepsin G

**CTSL, CatL1** (*od eng. Cathepsin L1*) - katepsin L1, prokatepsin L

**CLU, SPG2, TRPM-2, ApoJ** (*od eng. Clusterin*) - klasterin, apolipoprotein J

**C3** (*od eng. Complement C3*) - komplement C3

**C4-A** (*od eng. Complement C4-A*) - komplement C4-A

**C5** (*od eng. Complement C5*) - komplement C5

**C7** (*od eng. Complement component C7 alpha chain*) - komponenta komplemента C7-alfa lanac

**C9** (*od eng. Complement component C9 alpha chain*) - komponenta komplemента C9 alfa lanac

**CHGA, CgA** (*eng. Chromogranin A*) - kromogranin A

**MASP 2** (*od eng. Mannan-binding lectin serine protease 2*) - lektin serinska proteaza 2 koja veže manan

**SELL** (*od eng. L-selectin*) - L-selektin

**LUM** (*od eng. Lumican*) - lumikan

**MMP9** (*od eng. Matrix metalloproteinase-9*) - matriks metaloproteinaze-9

**MUC1** (*od eng. Mucin1*) - mucin 1

**COMP** (*od eng. Cartilage oligomeric matrix protein*) - oligomerni protein hrskavičnog matriksa

**PRDX2** (*od eng. Peroxiredoxin-2*) – peroksiredoksin 2

**PRSS8** (*od eng. Prostasin*) - prostazin

**MBTPS1** (*od eng. Membrane-bound transcription factor site-1 protease*) - proteaza vezana na membranu transkripcijskog faktora 1

**SPARCL 1** (*od eng. SPARC-like protein 1*) - protein 1 sličan SPARC-u

**GAS6** (*od eng. Growth arrest-specific protein 6*) - protein specifičan za zaustavljanje rasta 6

**PCDHGC3, Pcdh** (*od eng. Protocadherin gamma C3*) - protokaderin gama-C3

**PCDH1** (*od eng. Protocadherin-1*) - protokaderin-1

**EPH B6** (*od eng. Ephrin type-B receptor 6*) - receptor 6 efrina B

**IGFLR1** (*od eng. IGF-like family receptor 1*) - receptor faktora rasta sličnog inzulinu 1

**EPS8L2** (*od eng. Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2*) - receptor supstrata kinaze epidermalnog faktora rasta 8 sličnog proteinu 2

**TYRO3, TULP1, Sky** (*od eng. Tyrosine-protein kinase receptor*) - receptor tirozin-protein kinaze

**ICAM-1** (*od eng. Intercellular adhesion molecule 1*) - stanična adhezijska molekula-1

**Cu-Zn SOD, SOD1** (*od eng. Superoxide dismutase - Cu-Zn*) - superoksid dismutaza (Cu-Zn)

**TNC** (*od eng. Tanscin*) - tenascin

**TSPAN 1** (*od eng. Tetraspanin1*) - tetraspanin-1

**TMPRSS2**, (*od eng. Transmembrane protease serine 2*) - transmembranska serinska proteaza  
2

**THBS1, TSP1** (*od eng. Thrombospondin-1*) - tromopspodin 1

**IL18BP** (*od eng. Interleukin-18-binding protein*) - vezni protein interleukina 18

## **8. CITIRANA LITERATURA**

Acien P, Shaw RW, Irvine L, Burford G, Gardner R (1989), CA 125 levels in endometriosis patients before, during and after treatment with Danazol or LHRH agonists, *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 32(3):241-246.

Adu-Gyamfi EA, Czika A, Liu TH, Gorleku PN, Fondjo LA, DjankpaFT et al. (2021), Ephrin and Eph receptor signaling in female reproductive physiology and pathology, *Biology of Reproduction*, 104(1):71-82.

Afamin (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P43652>, Pristupljeno 12.10.2021.

Agostinis C, Balduit A, Mangogna A, Zito G, Romano F, Ricci G et al. (2021), Immunological Basis of the Endometriosis: The Complement System as a Potential Therapeutic Target, *Frontiers in Immunology*, 11:3454.

Ahn SH, Singh V, Tayade C (2017), Biomarkers in endometriosis: challenges and opportunities, *Fertility and Sterility*, 107(3):523-532.

Ahn SH, Monsanto SP, Miller C, Singh SS, ThomasR, Tayade C (2015), Pathophysiology and Immune Dysfunction in Endometriosis, *BioMed Research International*, 2015:795976.

Alagoz T, Buller RE, Berman M, Anderson B, Manetta A, DiSaia P (1994), What is a normal CA 125 level?, *Gynecologic Oncology*, 53(1):93-97.

Alborzi S, Poordast T, Askary E, Dorniani G (2019), Effects of clarithromycin on inflammatory markers and clinical manifestations in postsurgical follow-up of patients with endometriosis: a double-blinded randomized placebo-controlled clinical trial, *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 299(5):1305-1312.

Alifano M, Cancellieri A, Fornelli A, Trisolini R, Boaron M (2004), Endometriosis-related pneumothorax: Clinicopathologic observations from a newly diagnosed case, *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 127(4):1219-1221.

Aligeti S, Kirma NB, Binkley PA, Schenken RS, Tekmal RR (2011), Colony-stimulating factor-1 exerts direct effects on the proliferation and invasiveness of endometrial epithelial cells, *Fertility and Sterility*, 95(8):2464-2466.

Alviggi C, Carrieri PB, Pivonello R, Scarano V, Pezzella M, De Placido G et al. (2006), Association of pelvic endometriosis with alopecia universalis, autoimmune thyroiditis and multiple sclerosis, *Journal of Endocrinological Investigation*, 29(2):182-189.

American Cancer Society (2020), *Ovarian Cancer Early Detection, Diagnosis, and Staging* Dostupno na: <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8775.00.pdf>, Pristupljeno : 07.08.2021.

American Society for Reproductive Medicine (1997), Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996, *Fertility and Sterility*, 67:817-821.

Amreen S, Kumar P, Gupta P, Rao R (2019), Evaluation of Oxidative Stress and Severity of Endometriosis, *Journal of Human Reproductive Sciences*, 12(1):40-46.

Anaf V, Simon P, El Nakadi I, Fayt I, Buxant F, Simonartet T et al. (2000), Relationship between endometriotic foci and nerves in rectovaginal endometriotic nodules, *Human Reproduction*, 15(8):1744-1750.

Anastasiu CV, Moga MA, Neculau EA, Bălan A, Scârneciu I, Dragomir RM et al. (2020), Biomarkers for the Noninvasive Diagnosis of Endometriosis: State of the Art and Future Perspectives, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5):1750.

Andreadis C, Touloupidis S, Galaktidou G, Kortsaris AH, Boutis A, Mouratidou D (2005), Serum CYFRA 21-1 in patients with invasive bladder cancer and its relevance as a tumor marker during chemotherapy, *Journal of Urology*, 174(5):1771-1775.

Angiotensinogen (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P01019>, Pristupljeno 12.10.2021.

Anglesio MS, Papadopoulos N, Ayhan A, Nazeran TM, Noë M, Horlingset HM et al. (2017), Cancer-Associated Mutations in Endometriosis without Cancer, *New England Journal of Medicine*, 376(19):1835-1848.

Annexin A2 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P07355>, Pristupljeno 12.10.2021.



Arnold J, Vercellino GF, Chiantera V, Chiantera V, Schneider A, Mechsner S, et al. (2013), Neuroimmunomodulatory alterations in non-lesional peritoneum close to peritoneal endometriosis, *Neuroimmunomodulation*, 20(1):9-18.

Aschemeyer S, Qiao B, Stefanova D, Valore EV, Sek AC, Ruwe TA et al. (2018), Structure-function analysis of ferroportin defines the binding site and an alternative mechanism of action of hepcidin, *Journal of Blood*, 131(8):899-910.

As-Sanie S, Harris RE, Napadow V, Kim K, Neshewat G, Kairyset A et al. (2012), Changes in regional gray matter volume in women with chronic pelvic pain: a voxel-based morphometry study, *Journal of Pain*, 153(5):1006-1014.

As-Sanie S, Kim J, Wilcke TS, Sundgren PC, Clauw DJ, Napadow V et al. (2016), Functional Connectivity Is Associated With Altered Brain Chemistry in Women With Endometriosis-Associated Chronic Pelvic Pain, *Journal of Pain*, 17(1):1-13.

Audebert A, Petousis S, Margioulas-Siarkou C, Ravanos K, Prapas N, Prapas Y (2018), Anatomic distribution of endometriosis: A reappraisal based on series of 1101 patients, *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 230:36-40.

Azmy O, Saidb K, El-Nouric MA, Elkadyb M, Mostafab M, Salamaa S (2014), Multicenter cohort molecular evidence of the presence of endometriosis-inducing factor (mir-130a) as a potent regulator of gene expression in endometriosis. *Medical Research Journal*, 13(1):1-4.

Bajaj P, Madsen H, Arendt-Nielsen L (2003), Endometriosis is associated with central sensitization: a psychophysical controlled study, *Journal of Pain*, 4(7):372-380.

Bałkowiec M, Maksym RB, Włodarski PK (2018), The bimodal role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in etiology and pathogenesis of endometriosis (Review), *Molecular Medicine Reports*, 18:3123-3136.

Ballard KD, Seaman HE, de Vries CS, Wright JT (2008), Can symptomatology help in the diagnosis of endometriosis? Findings from a national case-control study-Part 1, *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 115:1382.

Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R (2004), Clinical utility of cytokeratins as tumor markers, *Clinical Biochemistry*, 37(7):529-540.

Bartek J, Bartkova J, Taylor-Papadimitriou J, Rejthar A, Kovarik J, Lukaš Z et al. (1986), Differential expression of keratin 19 in normal human epithelial tissues detected by monospecific monoclonal antibodies, *Histochemical Journal*, 18(10):565-575.

Bast RC, Xu FJ, Yu YH, Barnhill S, Zhang Z, Mills GB (1998), CA 125: the past and the future, *International Journal of Biological Markers*, 13(4):179-187.

Bedaiwy MA, Falcone T (2004), Laboratory testing for endometriosis, *Clinica Chimica Acta*, 340:41-56.

Berek JS, Crum C, Friedlander M (2015), Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum, *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 131(2):111-122.

Berlanda N, Vercellini P, Carmignani L, Aimi A, Amicarelli F, Fedele L (2009), Ureteral and vesical endometriosis. Two different clinical entities sharing the same pathogenesis, *IObstetrical and Gynecological Survey*, 64(12):830-842.

Billesbolle CB, Azumaya CM, Kretsch RC, Powers AS, Gonen S, Schneider S et al. (2020), Structure of hepcidin-bound ferroportin reveals iron homeostatic mechanisms, *Nature*, 586(7831):807-811.

Borland G, Ross JA, Guy K (1988), Forms and functions of CD44, *Immunology*, 93:139-148.

Borrelli GM, Abrão MS, Mechsner S (2014), Can chemokines be used as biomarkers for endometriosis? A systematic review, *Human Reproduction*, 29:253-266.

Brawn J, Morotti M, Zondervan KT, Becker CM, Vincent K (2014), Central changes associated with chronic pelvic pain and endometriosis, *Human Reproduction Update*, 20(5):737-747.

Brézillon S, Pietraszek K, Maquart FX, Wegrowski Y (2013), Lumican effects in the control of tumour progression and their links with metalloproteinases and integrins, *The Federation of Europeab Biochemical Societiec Journal*, 280:2369-2381.

Brinton LA, Gridley G, Persson I, Baron J, Bergqvist A (1997), Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 176(3):572-579.

Brosens IA, Puttemans PJ, Deprest J (1994), The endoscopic localization of endometrial implants in the ovarian chocolate cyst, *Fertility and Sterility*, 61(6):1034-1038.

Brubel R, Bokor A, Pohl A, Schilli GK, Szereday L, Szamuel RB et al. (2017), Serum galectin-9 as a noninvasive biomarker for the detection of endometriosis and pelvic pain or infertility-related gynecologic disorders, *Fertility and Sterility*, 108(6):P1016-1025.E2.

Bulun SE, Cheng YH, Pavone ME, Xue Q, Attar E, Trukhacheva E, Tokunaga H et al. (2010), Estrogen receptor-beta, estrogen receptor-alpha, and progesterone resistance in endometriosis, *Seminars in Reproductive Medicine*, 28(1):36-43.

Bulun SE, Monsavais D, Pavone ME, Dyson M, Xue Q, Attar E, Tokunaga H et al. (2012), Role of estrogen receptor- $\beta$  in endometriosis, *Seminars in Reproductive Medicine*, 30(1):39-45.

Burkle B, Notscheid NK, Scheich J, Hefler L, Tempfer CB, Horvat R et al. (2013), Spread of endometriosis to pelvic sentinel lymph nodes: gene expression analysis, *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 169:370-375.

Burney RO, Giudice LC (2012), Pathogenesis and Pathophysiology of Endometriosis, *Fertility and Sterility*, 98(3):511-519.

Butt RH, Coorssen JR (2013), Coomassie Blue as a Near-infrared Fluorescent Stain: A Systematic Comparison With Sypro Ruby for In-gel Protein Detection, *Molecular and Cellular Proteomics*, 12(12):P3834-3850.

Cartilage oligomeric matrix protein (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P497471>, Pristupljeno 29.10.2021.

Castonguay R, Werner ED, Matthews RG, Presman E, Mulivor AW, Solban N et al. (2011), Soluble endoglin specifically binds bone morphogenetic proteins 9 and 10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation, and suppresses tumor growth, *Journal of Biological Chemistry*, 286(34):30034-30046.

Cathepsin B (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P07858>, Pristupljeno 12.10.2021.

Cathepsin D (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P07339>, Pristupljeno 18.10.2021.

Cathepsin G (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P08311>, Pristupljeno 12.10.2021.

Cathepsin L1 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P07711>, Pristupljeno 12.10.2021.

CD 44 antigen (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P16070>, Pristupljeno 12.10.2021.

Chantalat E, Valera MC, Vaysse C, Noirrit E, Rusidze M, Weyl A et al. (2020), Estrogen Receptors and Endometriosis, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8):2815.

Charrin S, Jouannet S, Boucheix C, Rubinstein E (2014), Tetraspanins at a glance, *Journal of Cell Science*, 127(17):3641-3648.

Chatman DL, Ward AB (1982), Endometriosis in adolescents, *Journal of Reproductive Medicine*, 27(3):156-160.

Chen S, Luo Y, Cui L, Yang Q Y (2019), miR-96-5p regulated TGF- $\beta$ /SMAD signaling pathway and suppressed endometrial cell viability and migration via targeting TGFBR1, *Cell Cycle*, 1740-1753.

Chen X, Wang J, Tu F, Yang Q, Wang D, Zhu Q (2021), Endoglin promotes cell migration and invasion in endometriosis by regulating EMT, *Ginekologia Polska*, 2021 Sep 20.

Chen Y, Li H, Cheng HY, Rui-Qiong M, Ye X, Cui H et al. (2019), Fibrinogen alpha chain is up-regulated and affects the pathogenesis of endometriosis, *Reproductive BioMedicine*, 39(6):893-904.

Choi HJ, Park MJ, KIM BS, Joo B, Lee KS, Choi JH et al. (2017), Transforming growth factor  $\beta$ 1 enhances adhesion of endometrial cells to mesothelium by regulating integrin expression, *Biochemistry and Molecular Biology Reports*, 50:8429.

Chunyan C, Yumei Z, Xing P (2021), Knocking down Sterol regulatory element binding protein 2 (SREBF2) inhibits the Serine Protease 8 (PRSS8) /sodium channel epithelial 1alpha subunit (SCNN1A) axis to reduce the cell proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transformation of ovarian cancer, *Bioengineered*, 12(2):9390-9400.

Claesson-Welsh L, Dejana E, McDonald DM (2020), Permeability of the Endothelial Barrier: Identifying and Reconciling Controversies, *Trends in Molecular Medicine*, 27(4):314-333.

Clement PB (2007), The pathology of endometriosis: a survey of the many faces of a common disease emphasizing diagnostic pitfalls and unusual and newly appreciated aspects, *Advances in Anatomic Pathology*, 14(4):241-246.

Clusterin (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P10909>, Pristupljeno 12.10.2021.

Complement C3 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P01024>, Pristupljeno 16.10.2021.

Complement C4-A (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P0C0L4>, Pristupljeno 16.10.2021.

Complement C5 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P01031>, Pristupljeno 16.10.2021.

Complement component C7 alpha chain (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P10643>, Pristupljeno 16.10.2021.

Complement component C8 alpha chain (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P07357>, Pristupljeno 16.10.2021.

Complement component C9 alpha chain (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P02748>, Pristupljeno 16.10.2021.

Complement factor B (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P00751>, Pristupljeno 16.10.2021.

Complement factor H (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q03591>, Pristupljeno 16.10.2021.

Cormack O, Chung W, Fitzpatrick P, Cooke F, Flynn B, Harrison M et al. (2008), Growth arrest-specific gene 6 expression in human breast cancer, *British Journal of Cancer*, 98:1141-1146.

Crapper PE (2016), *Clinical Biomarkers for the Noninvasive Diagnosis of Endometriosis*, Dostupno na: <http://hdl.handle.net/11375/20495>, Pristupljeno 10.11.2021.

Cunha-Filho JSL, Lemos NA, Freitas FM, Kiefer K, Faller M, Passos EP (2003), Insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein-1 and -3 in the follicular fluid of infertile patients with endometriosis, *Human Reproduction*, 18(2):423-428.

Czernobilsky B, Morris WJ (1979), A histologic study of ovarian endometriosis with emphasis on hyperplastic and atypical changes, *Obstetrics and Gynecology*, 53:318.

D'souza PM, Klopocki AG, Oganessian V, Terzyan S, Mather T, Liat Z et al. (2017), Glycan Bound to the Selectin Low Affinity State Engages Glu-88 to Stabilize the High Affinity State under Force, *Journal of Biological Chemistry*, 292(6):2510-2518.

Da Gama CRL, Santulli P, Marcellin L, Simões AM, Batteux F, Chapron C (2018), Immunology of endometriosis, *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 50:39-49.

Darai E, Detchev R, Hugol D, Quang NT (2003), Serum and cyst fluid levels of interleukin (IL)-6, IL-8 and tumour necrosis factor-alpha in women with endometriomas and benign and malignant cystic ovarian tumours, *Human Reproduction*, 18:1681-1685.

Dastur AE, Tank PD (2010), John A Sampson and the origins of Endometriosis, *Journal of Obstetrics and Gynecology of India*, 60(4):299-300.

Desmoplakin (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P15924>, Pristupljeno 08.10.2021.

Dharmaraj N, Chapela PJ, Morgado M, Hawkins SM, Lessey BA, Young SL (2014), Expression of the transmembrane mucins, MUC1, MUC4 and MUC16, in normal endometrium and in endometriosis, *Human Reproduction*, 29(8):1730-1738.

Dieplinger H, Dieplinger B (2015), Afamin - A pleiotropic glycoprotein involved in various disease states, *Clinica Chimica Acta*, 446:105-110.

Dovey S, Sanfilippo J (2010), Endometriosis and the adolescent, *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 53(2):420-428.

Draj HA, Abbas AAH, Abdullah TH (2020), Profiling cytokeratin-19 in endometriosis, *Annals of Tropical Medicine and Public Health*, 23(S14):SP231440.

Du H, Taylor HS (2007), Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis, *Stem Cells*, 25(8):2082-2086.

Duraisamy S, Ramasamy S, Kharbanda S, Kufe D (2006), Distinct evolution of the human carcinoma-associated transmembrane mucins, MUC1, MUC4 AND MUC16, *Gene*, 373:28-34.

El-Kasti MM, Wright C, Fye HK, Roseman F, Kessler BM, Becker CM (2011), Urinary peptide profiling identifies a panel of putative biomarkers for diagnosing and staging endometriosis, *Fertility and Sterility*, 95(4):1261-1266.

Endoglin (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P21802>, Pristupljeno 12.10.2021.

Engemise S, Gordon C, Konje JC (2010), Endometriosis, *Reproductive BioMedicine*, 340:c2168.

Ephrin type-B receptor 6 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/O15197>, Pristupljeno 12.10.2021.

Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9H6S3>, Pristupljeno 05.11.2021.

Eskenazi B, Warner ML (1997), Epidemiology of endometriosis, *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 24(2):235-258.

Ezrin (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P15311>, Pristupljeno 12.10.2021.

Fairbanks F, Abrão MS, Podgaec S, Dias JA, DeOliveira RM, Rizzo LV (2009), Interleukin-12 but not interleukin-18 is associated with severe endometriosis, *Fertility and Sterility*, 91(2):320-324.



Faizullin LZ, Muftaydinova SR, Buralkina NA, Chuprynin VD (2021), Eph receptors in cancer and endometriosis, *Obstetrics and Gynecology*, 4/2021.

Fan YH, Leong PY, Chiou JY, Wang YH, Ku MH, Wei MCC (2021), Association between endometriosis and risk of systemic lupus erythematosus, *Scientific Reports*, 11:532.

Fassbender A, Burney RO, FO D, D'Hooghe T, Giudice L (2015), Update on Biomarkers for the Detection of Endometriosis, *BioMed Research International*, 2114-2015.

Felder M, Kapur A, Gonzalez-Bosquet J, Horibata S, Heintz J, Albrecht A et al. (2014), MUC16 (CA 125): tumor biomarker to cancer therapy, a work in progress, *Molecular Cancer*, 13:129.

Ferrero S, Vellone VG, Barra F (2019), Pathophysiology of pain in patients with peritoneal endometriosis, *Annals of Translational Medicine*, 7(1):S8.

Fiala L, Bob P, Raboch J (2018), Oncological markers CA 125, CA 19-9 and endometriosis, *Medicine (Baltimore)*, 97(51):e13759.

Fibrinogen alpha chain (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P02671>, Pristupljeno 19.10.2021.

Figueira PGM, Abrão MS, Krikun G, Taylor HS (2011), Stem cells in endometrium and their role in the pathogenesis of endometriosis, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1221(1):10-17.

Flamini MI, Sanchez AM, Goglia L, Tosi V, Genazzani AR, Simoncini T (2009), Differential actions of estrogen and SERMs in regulation of the actin cytoskeleton of endometrial cells, *Molecular Human Reproduction*, 15(10):675-685.

Florio P, Reis FM, Torres PB, Calonaci F, Abrao MS, Nascimento LI et al. (2009), High serum follistatin levels in women with ovarian endometriosis, *Human Reproduction*, 24:2600-2606.

Florova MS, Yarmolinskaya MI, Tkachenko NN, Tolibova GK, Tral TG (2021), Role of insulin and insulin-like growth factor I receptor expression in the pathogenesis of genital endometriosis, *Journal of obstetrics and women's diseases*, 70(3):65-74.

FO D , Flores I , Waelkens E, D'Hooghe T (2018), Non-invasive diagnostics of endometriosis: review of modern biomarkers of peripheral blood and endometrium, *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 50:72-83.

Frisch CM, Zimmermann K, Zilleßen P, Pfeifer A, Racké K, Mayer P (2015), Non-small cell lung cancer cell survival crucially depends on functional insulin receptors, *Endocrine-Related Cancer*, 22(4):609-621.

Fujimoto A, Totoki Y, Abe T, Boroevich KA, Hosoda F, Nguyen HH et al. (2012), Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators, *Nature Genetics*, 44(7):760-764.

Fukunaga M, Nomura K, Ishikawa E, Ushigome S (1997), Ovarian atypical endometriosis: its close association with malignant epithelial tumours, *Histopathology*, 30(3):249-255.

Galectin-9B (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q3B8N2>, Pristupljeno 12.10.2021.

Gallagher SR (2007), One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins, *Current Protocols in Toxicology*, 32(1):4.0.1-A.3F.38.

Gallagher SR (2012), One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins, U: Coligan E, *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, New Jersey, 68(1):10.1.1-10.1.44.

Garcia-Valdecasas GS , Ruiz-Alvarez MJ , Gonzalez-Gay D, Ramos-Corral R , Marquez-Lietor E, Del Amo N et al. (2020), CYFRA 21-1 in patients with suspected cancer: evaluation of an optimal cutoff to assess the diagnostic efficacy and prognostic value, *Advances in Laboratory Medicine*, 1-4.

Gerarduzzi C, Hartmann U, Leask A, Drobetsky E (2020), The Matrix Revolution: Matricellular Proteins and Restructuring of the Cancer Microenvironment, *Cancer Research*, 80:2705-2717.

Gidwaney R, Badler RL, Yam BL, Hines JJ, Alexeeva V, Donovan V et al. (2012), Endometriosis of abdominal and pelvic wall scars: multimodality imaging findings, pathologic correlation, and radiologic mimics, *RadioGraphics*, 32(7):2031-2043.

Gipson IK (2007), The ocular surface: the challenge to enable and protect vision: the Friedenwald lecture, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(10):4391-4398.

Giudice LC (2010), Clinical practice-Endometriosis, *New England Journal of Medicine*, 362(25):2389-2398.

Gjavotchanoff R (2015), CYFRA 21-1 in urine: a diagnostic marker for endometriosis?, *International Journal of Women's Health*, 9(7):205-211.

Gkolfinopoulos S, Tsapakidis K, Papadimitriou K, Papamichael D, Kountourakis P (2017), Chromogranin A as a valid marker in oncology: Clinical application or false hopes?, *World Journal of Methodology*, 7(1):9-15.

Glitz C, Ssouza CA, Rodini GP, Genro V, Bilibio JP, Senger M (2009), Peritoneal and serum interleukin-18 levels are not increased in women with minimum or mild endometriosis, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42:11.

Gniewek P, Kolinski A (2012), Coarse-grained modeling of mucus barrier properties, *Biophysical Journal*, 102(2):195-200.

Goto T, Miyamoto H (2021), The Role of Estrogen Receptors in Urothelial Cancer, *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 12:643870.

Grandi G, Toss A, Cortesi L, Botticelli L, Volpe A, Cagnacil A (2015), The Association between Endometriomas and Ovarian Cancer: Preventive Effect of Inhibiting Ovulation and Menstruation during Reproductive Life, *BioMed Research International*, 2015:751571.

Growth arrest-specific protein 6 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q14393>, Pristupljeno 12.10.2021.

Gruenwald P (1942), Origin of endometriosis from the mesenchyme of the celomic walls, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 44(3):470-474.

Grzywa R, Gorodkiewicz E, Burchacka E, Lesner A, Laudański P, Łukaszewski Z et al. (2014), Determination of cathepsin G in endometrial tissue using a surface plasmon resonance imaging biosensor with tailored phosphonic inhibitor, *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 182:P38-42.

Gu Y, Li G, Qian N, Chen X, Wang H, Wang J (2016), Expression of EphB6 in ovarian serous carcinoma is associated with grade, TNM stage and survival, *Journal of Clinical Pathology*, 69(5):448-453.

Guan B, Gao M, Wu C-H, Wang T-L, Shih IeM (2012), Functional analysis of in-frame indel ARID1A mutations reveals new regulatory mechanisms of its tumor suppressor functions, *Neoplasia*, 14(10):986–993.

Gui Y, Guo G, Huang Y, Hu X, Tang A, Gao S, Wu R et al. (2011), Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder, *Nature Genetics*, 43(9):875-878.

Gujral P, Mahajan V, Lissaman AC, Ponnampalam AP (2020), Histone acetylation and the role of histone deacetylases in normal cyclic endometrium, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 18(1):84.

Gupta D, Hull ML, Fraser I, Bossuyt PMM, Johnson N, Nisenblat V (2016), Endometrial biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 4(4):CD012165.

Gupta S, Agarwal A, Sekhon L, Krajcir N, Cocuzza M, Falcone T (2006), Serum and peritoneal abnormalities in endometriosis: potential use as diagnostic markers, *Minerva Ginecologica*, 58:527-551.

Gustofson RL, Kim N, Liu S, Stratton P (2006), Endometriosis and the appendix: a case series and comprehensive review of the literature, *Fertility and Sterility*, 86(2):298-303.

Haas D, Oppelt P, Shebl O, Chvatal R, Shamiyeh A, Mayer R et al. (2013), Allen–Masters syndrome: Do the classic risk factors also apply in patients with endometriosis?, *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 39(11):1513-1517.

Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM (1984), Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 64(2):151-154.

Haptoglobin (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P007383>, Pristupljeno 12.10.2021.

Harada T, Kubota T, Aso T (2002), Usefulness of CA19-9 versus CA 125 for the diagnosis of endometriosis, *Fertility and Sterility*, 78(4):733-739.

Harris HR, Wieser F, Vitonis AF, Rich-Edwards J, Boynton-Jarrett R, Bertone-Johnson ER et al. (2018), Early life abuse and risk of endometriosis. *Human Reproduction*, 33(9):1657-1668.

Hediger ML, Hartnett HJ, Louis GM (2005), Association of endometriosis with body size and figure, *Fertility and Sterility*, 84(5):1366-1374.

Hempelmann E (2008), SDS-PAGE proteins and protein detection by silver staining and immunoblotting of Plasmodium falciparum proteins u: Moll K, Ljungström J, Perlmann H, Scherf A, Wahlgren M (5th ed), *Methods in Malaria Research*, 263-266.

Hepcidin (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P81172>, Pristupljeno 12.10.2021.

Histon H1.4 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P10412>, Pristupljeno 12.10.2021.

Histon H3.1 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P68431>, Pristupljeno 12.10.2021.

Holdenrieder S, Wehnl B, Hettwer K, Simon K, Uhlig S, Dayyani F (2017), Carcinoembryonic antigen and cytokeratin-19 fragments for assessment of therapy response in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis *British Journal of Cancer*, 116(8):1037-1045.

Hongbin W, Mengyao L (2021), Complement C4, Infections, and Autoimmune Diseases, *Frontiers in Immunology*, 12:2682.

Hook G, Jacobsen JS, Grabstein K, Kindy M, Hook V (2015), Cathepsin B is a New Drug Target for Traumatic Brain Injury Therapeutics: Evidence for E64d as a Promising Lead Drug Candidate, *Frontiers in Neurology*, 6:178.

Hsiao KY, Wu MH, Tsai SJ (2017), Epigenetic regulation of the pathological process in endometriosis, *Reproductive Medicine and Biology*, 16:314-319.

Hu M, Lan Y, Lu A, Ma X, Zhang L (2019), Glycan-based biomarkers for diagnosis of cancers and other diseases: Past, present, and future, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 162:1-24.

Hua-Hsi W, Peng-Hui W, Jiun-Yih Y, Yi-Jen C, Ming-Shyen Y, Rui-Lan H et al. (2014), Serum cytokeratin-19 fragment (Cyfra 21-1) is a prognostic indicator for epithelial ovarian cancer, *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 53(1):30-34.

Huang HF, Hong LH, Tan Y, Sheng JZ (2004), Matrix metalloproteinase 2 is associated with changes in steroid hormones in the sera and peritoneal fluid of patients with endometriosis, *Fertility and Sterility*, 81:1235–1239.

Huang YL, Chen J, Yan W, Zang D, Qin Q, Deng AM (2015), Diagnostic accuracy of cytokeratin-19 fragment (CYFRA 21-1) for bladder cancer: a systematic review and meta-analysis, *Tumour Biology*, 36(5):3137-3145.

Hwang JHH, Lee KS, Joo JK, Wang T, Son JB, Park JH et al. (2014), Identification of biomarkers for endometriosis in plasma from patients with endometriosis using a proteomics approach, *Molecular medicine reports*, 10:725-730.

ICOS ligand (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/O75144>, Pristupljeno 12.10.2021.

IGF-like family receptor 1 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P16070>, Pristupljeno 17.10.2021.

Insulin-like growth factor-binding protein 2 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P18065>, Pristupljeno 03.11.2021.

Insulin-like growth factor-binding protein 3 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P17936>, Pristupljeno 03.11.2021.

Insulin like growth factors-binding protein 7 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q16270>, Pristupljeno 14.11.2021.

Intercellular adhesion molecule (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P05362>, Pristupljeno 18.10.2021.

Interleukin-1 receptor antagonist protein (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P18510>, Pristupljeno 12.10.2021.

Interleukin-10 receptor subunit beta (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q08334>, Pristupljeno 12.11.2021.

Interleukin-18-binding protein (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/O95998>, Pristupljeno 16.11.2021.

Interleukin-6 receptor subunit beta (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P18510>, Pristupljeno 12.10.2021.

Irungu S, Mavrelou D, Worthington J, Blyuss O, Saridogan E, Timms JF (2019), Discovery of non-invasive biomarkers for the diagnosis of endometriosis, *Clinical Proteomics*, 16:14.

Jacobs I, Bast RC Jr (1989), The CA 125 tumour-associated antigen: A review of the literature, *Human Reproduction*, 4(1):1-12.

Jaime TJ, Jaime TJ, Ormiga P, Leal F, Nogueira OM, Rodrigues N, (2013) Umbilical endometriosis: report of a case and its dermoscopic features, *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 88(1):121-124.

Jansen RP, Russell P (1986), Nonpigmented endometriosis: clinical, laparoscopic, and pathologic definition, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 155(6):1154-1159.

Janše V, Klančič T, Pušić M, Klein M, Bokal EV, Frangež HB et al. (2018), Proteomic analysis of peritoneal fluid identified COMP and TGFBI as new candidate biomarkers for endometriosis, *Scientific Reports*, 11:20870.

Javert CT (1951), Observations on the pathology and spread of endometriosis based on the theory of benign metastasis, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 62(3):477-487.

Javert CT (1952), The spread of benign and malignant endometrium in the lymphatic system with a note on coexisting vascular involvement, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 64(4):780-806.



Jenkins S, Olive DL, Haney AF (1986), Endometriosis: pathogenetic implications of the anatomic distribution, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 67(3):335-338.

Jiang QY, Xia JM, Ding HG, Fei XW, Lin J, Wu RJ (2012), RNAi-mediated blocking of ezrin reduces migration of ectopic endometrial cells in endometriosis, *Molecular Human Reproduction*, 18(9):435-441.

Jin L, Shen F, Weinfeld M, Sergi C (2020), Insulin Growth Factor Binding Protein 7 (IGFBP7)-Related Cancer and IGFBP3 and IGFBP7 Crosstalk, *Frontiers in Oncology*, 10:727.

Jones S, Wang TL, Shih IeM, Mao TL, Nakayama K, Roden R et al. (2010), Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma, *Science*, 30(6001):228-231.

Jones SE, Jomary C (2002), Clusterin, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 34(5):427-431.

Jubanyik KJ, Comite F (1997), Extrapelvic endometriosis, *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 24(2):411-440.

Julian BA, Suzuki H, Suzuki Y, Tomino Y, Spasovski G, Novak J (2009), Sources of Urinary Proteins and their Analysis by Urinary Proteomics for the Detection of Biomarkers of Disease, *Proteomics - Clinical Applications*, 3(9):1012-1134.

Kamoto D, Burch ML, Piva TJ, Rezaei HB, Rostam MA, Xu S et al. (2013), Transforming growth factor- $\beta$  signalling: Role and consequences of Smad linker region phosphorylation, *Cellular Signalling*, 25(10):2017-2024.

Karimi-Zarchi M, Dehshiri-Zadeh N, Sekhavat L, Nosouhi F (2016), Correlation of CA 125 serum level and clinico-pathological characteristic of patients with endometriosis, *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 14(11):713-718.

Kaupila A, Telimaa S, Ronnberg L, Vuori J (1988), Placebo-controlled study on serum concentrations of CA 125 before and after treatment on endometriosis with Danazol or high-dose medroxyprogesterone acetate alone or after surgery, *Fertility and Sterility*, 49(1):37-41.

Kavoussi SK, Odenwald KC, As-Sanie S, Lebovic DI (2017), Incidence of ovarian endometrioma among women with peritoneal endometriosis with and without a history of hormonal contraceptive use, *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 215:220-223.

Kaya C, Alay I, Guraslan H, Gedikbasi A, Ekin M, Ertaş Kaya Set al. (2018), The Role of Serum Caspase 3 Levels in Prediction of Endometriosis Severity, *Gynecologic and obstetric investigation*, 83:576-585.

Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb Ret al. (2005), ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis, *Human Reproduction*, 20(10):2698-2704.

Kim CH, Lee YJ, Kim JB, Lee YJ, Ahn JW, Kim SH et al. (2013), Cathepsin B in eutopic and ectopic endometrial tissues of patients with endometriosis, *Development & Reproduction*, 17(2):133-140.

Kim HS, Kim TH, Chung HH, Song YS (2014), Risk and prognosis of ovarian cancer in women with endometriosis: a meta-analysis, *British Journal of Cancer*, 110(7):1878-1890.

Kim JG, Suh CS, Kim SH, Choi YM, Moon SY, Lee JY (2000), Insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins (IGFBPs), and IGFBP-3 protease activity in the peritoneal fluid of patients with and without endometriosis, *Fertility and Sterility*, 73(5):996-1000.

King GT (2021), CA 125, *Drugs & Diseases, Laboratory Medicine*, Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/2087557-overview>, Pristupkjeno 06.07.2021.

Knudtson JF, McLaughlin JE, Sultana M, Santos MT, Sureshkumar MA, Tekmal RR et al. (2020), CD44 variant 6 is involved in the attachment and invasion of endometrial cells to peritoneum, *Fertility and Sterility Science*, 1(2):188-194.

Knudtson JF, Tekmal RR, Santos MT, Binkley PA, Krishnegowda N, Valente P et al. (2016), Impaired development of early endometriotic lesions in CD44 knockout mice, *Reproductive Sciences*, 23:87-91.

Kobayashi H (2016), Potential scenarios leading to ovarian cancer arising from endometriosis, *Redox Report*, 119-126.

Kodarahmian M, Amidi F, Moini A, Kashani L, Nashtaei SM, Pazhohan A et al. (2019), The modulating effects of Resveratrol on the expression of MMP-2 and MMP-9 in endometriosis women: A randomized exploratory trial, *Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 35:719-726.

Koebel M, Kalloger SE, Huntsman DG, Santos JL, Swenerton KD, Seidman JD et al. (2010), Differences in tumor type in low-stage versus high-stage ovarian carcinomas, *International Journal of Gynecological Pathology*, 29(3):203-211.

Koninckx PR, Muyltermans M, Moerman P, Meuleman C, Deprest J, Cornillie FJ (1992), CA 125 concentrations in ovarian 'chocolate' cyst fluid can differentiate an endometriotic cyst from a cystic corpus luteum, *Human Reproduction*, 7(9):1314-1317.

Koninckx PR, Riittinen L, Seppala M, Cornillie FJ (1992), CA 125 and PP14 concentrations in plasma and peritoneal fluid of women with deeply infiltrating pelvic endometriosis, *Fertility and Sterility*, 57(3):523-530.

Koninckx PR, Muyltermansb M, Meulemana C, Comillie FJ (1993), CA 125 in the management of endometriosis, *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 49(1):109-113.

Konrad L, Hackethal A, Oehmke F, Berkes E, Engel J, Tinneberg HR (2016), Analysis of Clusterin and Clusterin Receptors in the Endometrium and Clusterin Levels in Cervical Mucus of Endometriosis, *Reproductive Sciences*, 23(10):1371-1380.

Koo YH, Na YJ, Ahn MY, Jeon HN, Yeom JI, Lee KS (2013), Expression of CD44 in endometrial stromal cells from women with and without endometriosis and its effect on the adherence to peritoneal mesothelial cells, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 56:102-109.

Kovácsa Z, Gloverb L Reidy F, MacSharry J, Saldova R (2021), Novel diagnostic options for endometriosis - Based on the glycome and microbiome, *Journal of Advanced Research*, 33:167-181.

Králíčková M, Vetvicka V (2015), Immunological aspects of endometriosis: a review, *Annals of Translational Medicine*, 3:11.

Kromogranin A (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P10645>, Pristupljeno 12.10.2021.

Kuan KKW, Gibson DA, Whitaker LHR, Horne AW (2021), Menstruation Dysregulation and Endometriosis Development, *Frontiers in Reproductive Health*, 3:68.

Kuessel C, Jaeger-Lamsky A, Pateisky P, Rossberg N, Schulz A, Schmitz AAP et al. (2014), Cytokeratin-19 as a biomarker in urine and in serum for the diagnosis of endometriosis - A prospective study, *Gynecological Endocrinology*, 30:38-41.

Kuessel L, Wenzl R, Proestling K, Balendran S, Pateisky P, Yotova 1st, et al. (2017), Soluble VCAM-1/soluble ICAM-1 ratio is a promising biomarker for diagnosing endometriosis, *Human Reproduction*, 32(4):770-779.

Kumar V, Gupta S, Varma K, Sachan M (2020), microRNA as Biomarker in Ovarian Cancer Management: Advantages and Challenges, *DNA and Cell Biology*, 39(12):2013-2124.

Kunitz-type protease inhibitor 2 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/O43291>, Pristupljeno 12.11.2021.

Kuo KT, Mao TL, Jones S, Veras E, Ayhan A, Wang TL et al. (2009), Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma, *American Journal of Pathology*, 174(5):1597-1601.

Kurdoglu Z, Gursoy R, Kurdoglu M, Erdem M, Erdem O, Erdem A (2009), Comparison of the clinical value of CA 19-9 versus CA 125 for the diagnosis of endometriosis, *Fertility and Sterility*, 92(5):1761-1763.

Kutsukake M, Ishihara R, Momose K, Isaka K, Itokazu O, Higuma C et al. (2008), Circulating IGF-binding protein 7 (IGFBP7) levels are elevated in patients with endometriosis or undergoing diabetic hemodialysis, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 19:6:54.

La Grenade A, Silverberg SG (1988), Ovarian tumors associated with atypical endometriosis, *Human Pathology*, 19(9):1080-1084.

Laudanski P, Gorodkiewicz E, Ramotowska B, Charkiewicz R, Kuzmicki M, Szamatowicz J (2013), Determination of cathepsins B, D and G concentration in eutopic proliferative endometrium of women with endometriosis by the surface plasmon resonance imaging (SPRI)

technique, *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* , 169(1):80-83.

Lee HJ, Park YM, Jee BC, Kim YB, Suh CK (2015), Various anatomic locations of surgically proven endometriosis: A single-center experience, *American Journal of Obstetrics and Gynecology Science*, 58(1):53-58.

Lee SY, Koo YN, Lee DH (2021), Classification of endometriosis, *Yeungnam University Journal of Medicine*, 38(1):10-18.

Leidecker O, Bonfiglio JJ, Colby T, Zhang Q, Atanassov I, Zaja R et al. (2016), Serine is a new target residue for endogenous ADP-ribosylation on histones, *Nature Chemical Biology*, 12(12):998-1000.

Lessey B, Savaris R, Ali S, Brophy S, Tomazic AS, Chwalisz K (2014), Diagnostic Accuracy of Urinary Cytokeratin 19 Fragment for Endometriosis, *Reproductive sciences* (Thousand Oaks, Calif), 22-25.

Letronne F, Laumet G, Ayral AM, Chapuis J, Demiautte F, Laga M et al. (2016), ADAM30 Downregulates APP-Linked Defects Through Cathepsin D Activation in Alzheimer's Disease, *eBioMedicine*, 9:278-292.

Lewandowski Ł , Kepinska M , Milnerowicz H (2019), The copper-zinc superoxide dismutase activity in selected diseases, *European Journal of Clinical Investigation*, 49:e13036.

Li H, Ma RQ, Cheng HY, Ye X, Zhu HL, Chang XH (2020), Fibrinogen alpha chain promotes the migration and invasion of human endometrial stromal cells in endometriosis through focal adhesion kinase/protein kinase B/matrix metalloproteinase 2 pathway, *Biology of Reproduction*, 103(4):779-790.

Li J, Shi Y, Zhou C, Lin J (2015), Diagnosis and treatment of perineal endometriosis: review of 17 cases, *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 292(6):1295-1299.

Li R, Qiu Y (2018), Diagnostic value of serum ICAM-1 for endometriosis: A meta-analysis, *Medicine (Baltimore)*, 97(31):e11760.

Li R, Tan S, Yu M, Jundt MC, Zhang S, Wu M (2015), Annexin A2 Regulates Autophagy in *Pseudomonas aeruginosa* Infection through the Akt1-mTOR-ULK1/2 Signaling Pathway, *Journal of Immunology*, 195(8):3901-3911.

Li S, Fu X, Wu T, Yang L, Hu C, Wu R (2017), Role of Interleukin-6 and Its Receptor in Endometriosis, *Medical Science Monitor*, 23:3801-3807.

Li T, Forbes ME, Fuller GN, Li J, Yang X, Zhang W (2020), IGFBP2: integrative hub of developmental and oncogenic signaling network, *Oncogene*, 39(11):2243–2257.

Liang LY, Roy M, Horne CR, Sandow J, Surudoj M, Dagley LF et al. (2021), The intracellular domains of the EphB6 and EphA10 receptor tyrosine pseudokinases function as dynamic signalling hubs, *Biochemical Journal*, 478(17):3351-3371.

Liang Y, Liu D, Yang F, Pan W, Zeng F, Wu J et al. (2018), Perineural invasion in endometriotic lesions contributes to endometriosis-associated pain, *Journal of Pain Research*, 11:1999-2009.

Liang Y, Yao S (2016), Potential role of estrogen in maintaining the imbalanced sympathetic and sensory innervation in endometriosis, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 424:42-49.

Liu E, Nisenblat V, Farquhar C, Fraser F, Bossuyt PMM, Johnsonet N et al. (2015), Urinary biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2015(12):CD012019.

Liu H, Wang J, Wang H, Tang N, Li Y, Zhang Y et al. (2015), Correlation between matrix metalloproteinase-9 and endometriosis, *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(10):13399-13404.

Liu Y, Li M, Wei C, Tang L, Sheng Y, Liu Y an al (2020), TSP1-CD47-SIRP $\alpha$  signaling facilitates the development of endometriosis by mediating the survival of ectopic endometrium, *American Journal of Reproductive Immunology*, 83(6):e13236.

Liu YG, Tekmal RR, Binkley PA, Nair HB, Schenken RS, Kirma NB (2009), Induction of endometrial epithelial cell invasion and c-fms expression by transforming growth factor beta, *Molecular Human Reproduction*, 15(10):665-673.

Longo LD (1979), Classic pages in obstetrics and gynecology. Aberrant portions of the müllerian duct found in an ovary: William Wood Russell Johns Hopkins Hospital Bulletin, 1899, American Journal of Obstetrics and Gynecology, 134(2):225-226.

L-selectin (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P14151>, Pristupljeno 18.10.2021.

Lumican (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P51884>, Pristupljeno 16.11.2021.

Luo K, Zhang L, Liao Y, Zhou H, Yang H, Luo M et al. (2021), Effects and mechanisms of Eps8 on the biological behaviour of malignant tumours (Review), Oncology Reports, 45:824-834.

Ma Y, Gong, Z, Nan K, Qi S, Chen J, Ding C et al. (2019), Apolipoprotein-J blocks increased cell injury elicited by ox-LDL via inhibiting ROS-CaMKII pathway, Lipids in Health and Disease, 18:117.

Macrophage colony-stimulating factor 1 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P09603>, Pristupljeno 16.10.2021.

Madjid TH, Ardiansyah DF, Permadi W, Hernowo B (2020), Expression of Matrix Metalloproteinase-9 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 in Endometriosis Menstrual Blood, Diagnostics (Basel), 2020;10(6):364.

Maggiore ULR, Remorgida V, Sala P, Vellone VG, Biscaldi E, Ferrero F (2015), Spontaneous Uroperitoneum and Preterm Delivery in a Patient With Bladder Endometriosis, Journal of Minimally Invasive Gynecology, 22(6):923-924.

Mah K, Houston D, Weiner J (2016), The  $\gamma$ -Protocadherin-C3 isoform inhibits canonical Wnt signalling by binding to and stabilizing Axin1 at the membrane, Scientific Reports, 6:31665.

Mannan-binding lectin serine protease 2 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/O00187>, Pristupljeno 12.11.2021.

Manolov V, Marinov B, Vasilev V (2015), Serum hepcidin levels in endometriosis, Akusherstvo i ginekologija (Sofia), 54(1):32-38.



Manolov V, Marinov B, Vasilev V, Tzatchev K, Hadjiev E, Bogov I et al. (2013), Endometriosis and Serum Hecpidin Levels, International Journal of Science and Research, 4(1):2428-2430.

Marianowski P, Szymusik I, Barcz E, Wielgoś M, Hibner M (2013), Proteomics in endometriosis, Ginekologia Polska, (10):877-881.

Marsh EE, Laufer MR (2005), Endometriosis in premenarcheal girls who do not have an associated obstructive anomaly, Fertility and Sterility, 83(3):758-760.

Martínez CM, Somoano ST (2017), Abdominal wall endometriosis, American Journal of Obstetrics and Gynecology, 217(6):701-702.

Masahashi T, Matsuaawa K, Ohsawa M, Narita O, Asai T, Ishihara M, (1988), Serum CA 125 levels in patients with endometriosis: Changes in CA 125 levels during menstruation. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 72(3):328-331.

Matorras R, Cobos P (2010), Endometriosis Current Managment and Future trends Epidemiology of Endometriosis (1st ed), Jaypee Brothers Medical Publishers New Delhi.

Matrix metalloproteinase-9 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P14780>, Pristupljeno 12.10.2021.

Matsuura K, Ohtake H, Katabuchi H, Okamura H (1999), Coelomic metaplasia theory of endometriosis: evidence from in vivo studies and an in vitro experimental model, Gynecologic and obstetric investigation, 47(1):18-20.

Matsuzaki S, Canis M, PoulyJ-L, Déchelotte PJ, Mage G (2006), Analysis of aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 messenger ribonucleic acid expression in deep endometriosis and eutopic endometrium using laser capture microdissection, Fertility and Sterility, 85(2):308-313.

Matsuzaki S, Darcha C (2013), Involvement of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in the cellular and molecular mechanisms of fibrosis in endometriosis, PloS One, 8(10):e76808.

Mc Kinnon BD, Bertschi D, Bersinger NA, Mueller MD (2015), Inflammation and nerve fiber interaction in endometriotic pain, rends in Endocrinology & Metabolism, 26(1):1-10.

Méar L, Com E, Fathallah K, Guillot L, Lavigne R, Guével B et al (2022), The Eutopic Endometrium Proteome in Endometriosis Reveals Candidate, Markers and Molecular Mechanisms of Physiopathology, 12:419.

Mechsner S, Kaiser A, Kopf A, Gericke C, Ebert A, Bartley J (2009), A pilot study to evaluate the clinical relevance of endometriosis-associated nerve fibers in peritoneal endometriotic lesions, Fertility and Sterility, 92(6):1856-1861.

Membrane-bound transcription factor site-1 protease (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q14703>, Pristupljeno 12.11.2021.

Menha S, Ragaba HM, Abdalla NA, El-Asmar AB (2008), Soluble cytokeratin-19 and E-selectin biomarkers: their relevance for lung cancer detection when tested independently or in combinations, Cancer Biomarkers, 43:43-54.

Meola J, Silva JCR, Dentillo DB, Silva WA, Castelli JCV, Souza LA et al. (2010), Differentially expressed genes in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis, Fertility and Sterility, 93(6):1750-1773.

Metalloproteinase inhibitor 2 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P16035>, Pristupljeno 12.10.2021.

Metzemaekers J, Haazebroek P, Smeets MJGH, English J, Blikkendaal MD, Twijnstra ARH et al. (2020), EQUUSUM: Endometriosis QUality and grading instrument for SURgical performance: proof of concept study for automatic digital registration and classification scoring for r-ASRM, EFI and Enzian, Human Reproduction Open, 2020(4):053.

Metzger DA, Lessey BA, Soper JT, McCarty KS Jr, Haney AF (1991), Hormone-resistant endometriosis following total abdominal hysterectomy and bilateral salpingo-oophorectomy: correlation with histology and steroid receptor content, American Journal of Obstetrics and Gynecology, 78(5):946-950.

Missmer SA, Chavarro JE, Malspeis S, Bertone-Johnson ER, Hornstein MD, Spiegelman D et al. (2010), A prospective study of dietary fat consumption and endometriosis risk, Human Reproduction, 25(6):1528-1535.

Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, Barbieri LR, Marshall LM, Hunter DJ (2004), Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors, *American Journal of Epidemiology*, 160(8):784-796.

Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, Barbieri RL, Michels KB, Hunter DJ (2004), In utero exposures and the incidence of endometriosis, *Fertility and Sterility*, 82(6):1501-1508.

Miyake M, Morizawa Y, Hori S, Tatsumi Y, Onishi S, Owari T, et al. (2017), Diagnostic and prognostic role of urinary collagens in primary human bladder cancer, *Journal of Cancer Science*, 108:2221-2228.

Miyamoto H, Yao JL, Chau A, Zheng Y, Hsu I, Chang C (2012), Expression of androgen and oestrogen receptors and its prognostic significance in urothelial neoplasm of the urinary bladder, *BJU International*, 109(11):1716-1726.

Moll R (1993), Cytokeratins as markers of differentiation. Expression profiles in epithelia and epithelial tumors, *Veroff Pathology*, 142:191-197.

Monteiro JB, Colón-Díaz M, García M, Gutierrez G, Colón M, Seto E, et al. (2014), Endometriosis is characterized by a distinct pattern of histone 3 and histone 4 lysine modifications, *Reproductive Sciences*, 21(3):305-318.

Mowers EL, Lim CS, Skinner B, Mahnert N, Kamdar N, Morgan DM et al. (2016), Prevalence of Endometriosis During Abdominal or Laparoscopic Hysterectomy for Chronic Pelvic Pain, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 127(6):1045-1053.

Mucin 1 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P15941>, Pristupljeno 12.11.2021.

Mühl H, Bachmann M (2019), IL-18/IL-18BP and IL-22/IL-22BP: Two interrelated couples with therapeutic potential, *Cellular Signalling*, 63:109388.

Mujyambere B, Jayaraj R, Suja S (2018), Cytokeratin 19 (CK19) as a marker for Epithelial Differentiation and Malignant Transformation: Its Clinical relevance in Diagnosis, Prognosis and Treatment response monitoring, *International Peer-Reviewed Journal*, 2(3):51-61.

Muyldermans M, Cornillie FJ, Koninckx PR (1995), CA 125 and endometriosis, *Human Reproduction Update*, 1(2):173-187.

Muzii L, Bianchi A, Bellati F, Cristi E, Pernice M, Zullo MA et al. (2007), Histologic analysis of endometriomas: what the surgeon needs to know, *Fertility and Sterility*, 87(2):362-366.

Nasladek M, Stragierowicz J, Klimczak M, Kilanowicz A (2020), The Role of Zinc in Selected Female Reproductive System Disorders, *Nutrients*, 12(8):2464.

Nazri HM, Imran M, Fischer R, Heilig R, Manek S, Dragovic RA et al. (2020), Characterization of exosomes in peritoneal fluid of endometriosis patients, *Fertility and Sterility*, 113(2):P364-373E2.

Nemeth E, Ganz T (2009), The role of hepcidin in iron metabolism, *Acta Haematologica*, 122(2):78-86.

Ness RB (2003), Endometriosis and ovarian cancer: thoughts on shared pathophysiology, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 189(1):280-294.

Nezhat C, Lindheim SR, Backhus L, Vu M, Vang N, Nezhat C (2019), Thoracic Endometriosis Syndrome: A Review of Diagnosis and Management, *Journal of the Society of Laparoendoscopic Surgeons*, 23(3):e2019.00029.

Nezhat F, Datta MS, Hanson V, Pejovic T, Nezhat C, Nezhat C (2008), The relationship of endometriosis and ovarian malignancy: a review, *Fertility and Sterility*, 90(5):1559-1570.

Niki T, Fujita K, Rosen H, Hirashima M, Masaki T, Hattori T et al. (2018), Plasma Galectin-9 Concentrations in Normal and Diseased Condition Cell, *Journal of Physiology and Biochemistry*, 50:1856-1868.

Ning W, Huang H, Jin F (2004), Expression of IL-18 in endometriosis, *International Congress*, 1271:244-247.

Nisenblat V, Prentice L, Bossuyt PMM, Farquhar C, Hull ML, Johnson N (2016), Combination of the non-invasive tests for the diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016(7):CD012281.

Nisman B, Barak V, Shapiro A, Golijanin D, Peretz T, Pode D (2002), Evaluation of urine CYFRA 21-1 for the detection of primary and recurrent bladder carcinoma, *Cancer*, 94(11):2914–2922.

Nnoaham KE, Webster P, Kumbang J, Kennedy SH, ZondervanIs KT (2012), Is early age at menarche a risk factor for endometriosis? A systematic review and meta-analysis of case-control studies, *Fertility and Sterility*, 98(3):702-712.e6.

Noble JE (2014), Quantification of protein concentration using UV absorbance and Coomassie dyes, *Methods in Enzymology*, 536:17-26.

Nolan-Stevaux O, Zhong W, Culp S, Shaffer K, Hoover J, Wickramasinghe D et al. (2012), Endoglin requirement for BMP9 signaling in endothelial cells reveals new mechanism of action for selective anti-endoglin antibodies, *PLoS One*, 7(12):e50920.

Nothnick WB (2001), Treating endometriosis as an autoimmune disease, *Fertility and Sterility*, 76(2):223-231.

Obama H, Kelly ML, Matsui T, Nakamoto M (2005), Biphasic functions of the kinase-defective Ephb6 receptor in cell adhesion and migration, *Journal of Biological Chemistry*, 280(32):29355-29363.

Offenhäuser N, Borgonovo A, Disanza A, Romano P, Ponzanelli I, Iannolo G (2004), The eps8 family of proteins links growth factor stimulation to actin reorganization generating functional redundancy in the Ras/Rac pathway, *Molecular and Cell Biology*, 15(1):91-98.

Ogawa S, Kaku T, Amada S, Kobayashi H, Hirakawa T, Ariyoshi K et al. (2000), Ovarian endometriosis associated with ovarian carcinoma: a clinicopathological and immunohistochemical study, *Gynecologic Oncology*, 77(2):298-304.

Oliveira FR, Dela Cruz C, Del Puerto HL, Vilamil QTMF, Reis M, CamargosA F (2012), Stem cells: are they the answer to the puzzling etiology of endometriosis?, *Histology and Histopathology*, 27(1):23-29.

Overton C, Davis C, McMillan L, Shaw RW (2007), Basic science of endometriosis, U: Koh C (3th ed.) *An Atlas of Endometriosis*, London, Taylor & Francis, 1-51.

Palomino WA, Likes CE, MO B, Forstein DA (2007), Progesterone resistance in endometriosis: examination of L-selectin ligand in eutopic and ectopic endometrium using in vivo and in vitro models, *Fertility and Sterility*, 88(1):S59-S60.

Pancho A, Aerts T, Mitsogiannis MD., Seuntjens E (2020), Protocadherins at the Crossroad of Signaling Pathways , *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13:117.

Papari E, Noruzinia M, Kashani L, Foster WG (2020), Identification of candidate microRNA markers of endometriosis with the use of next-generation sequencing and quantitative real-time polymerase chain reaction, *Fertility and Sterility*, 113(6):1232-1241.

Parasar P, Ozcan P, Terry KL (2017), Endometriosis: Epidemiology, Diagnosis and Clinical Management, *Current American Journal of Obstetrics and Gynecology Reports*, 6:34–4

Patel S, Homaei A, El-Seedi HR, Akhtar N (2018), Cathepsins are proteases that are vital for survival but can also be fatal, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 105:526-532.

Pavićević R, Miličić J, Bubanović G, Peričić M (1998), Serumski tumorski biljeg CYFRA 21-1 u dijagnostici NSCLC pluća, *Paediatrica Croatica*, 42(3):38-38.

Pejić S, Todorović A, Stojiljković V, Cvetković D, Lučić N, Radojičić RM et al. (2008), Superoxide dismutase and lipid hydroperoxides in blood and endometrial tissue of patients with benign, hyperplastic and malignant endometrium, *Biomedical and Medical Sciences*, 80:3.

Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilla-Musoles F, Remohl J, Simon C (1998), The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production, *Fertility and Sterility*, 70:425-431.

Pernick N (2013), Cytokeratin 19 (CK19, K19) PathologyOutlines.com, Dostupno na: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsck19.html>, Pristupljeno: 22.08.2021.

Peroxiredoxin-2 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P32119>, Pristupljeno 12.10.2021.

Perricos A, Wenzl R, Husslein H, Eiwegger T, Gstoettner M, Weinhaeusel A et al. (2020), Does the Use of the "Proseek Multiplex Oncology I Panel" on Peritoneal Fluid Allow a Better Insight in the Pathophysiology of Endometriosis, and in Particular Deep-Infiltrating Endometriosis?, *Journal of clinical medicine*, 9(6):2009.

Piljac I (2006), Elektroforeza, Media print tiskara Hrastić d.o.o.Zagreb.

Pittaway DE, Fayez JA (1987), Serum CA 125 antigen levels increase during menses. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 56(1):75-76.

Piva M, Horowitz GM, Sharpe-Timms KL (2001), Interleukin-6 differentially stimulates haptoglobin production by peritoneal and endometriotic cells in vitro: a model for endometrial-peritoneal interaction in endometriosis, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86(6):2553-2561.

Plasma protease C1 inhibitor (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P05155>, Pristupljeno 16.11.2021.

Porpora MG, Scaramuzzino S, Sangiuliano C, Piacenti I, Bonanni V, Piccioni MG et al. (2020), Benedetti Panici, P.L. High prevalence of autoimmune diseases in women with endometriosis: A case-control study, Gynecological Endocrinology, 36(4):356-359.

Porter KM, Wieser FA, Wilder CL, Sidell N, Platt MO (2016), Cathepsin Protease Inhibition Reduces Endometriosis Lesion Establishment, Reproductive Sciences, 23(5):623-629.

Prefumo F, Todeschini F, Fulcheri E, Venturini PL (2002), Epithelial abnormalities in cystic ovarian endometriosis, Gynecologic Oncology, 84(2):280-284.

Proestling K, Wenzl R, Yotova I, Hauser C, Husslein H, Kuessel L (2020), Investigating selected adhesion molecules as urinary biomarkers for diagnosing endometriosis, Reproductive Biomedicine Online, 40(4):P555-558.

Prostasin (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q16651>, Pristupljeno 12.10.2021.

Protocadherin gamma-C3 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9UN70>, Pristupljeno 12.10.2021.

Protocadherin-1 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q08174>, Pristupljeno 14.10.2021.

Protopapas A, Markaki S, Mitsis T, Milingos D, Athanasiou S, Haidopoulos D et al. (2010), Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors, and cathepsin-D in ovarian endometriosis: correlation with severity of disease, Fertility and Sterility, 94(6):2470-2472.



Rahmioglu N, Nyholt DR, Morris AP, Missmer SA, Montgomery GW, Zondervan KT (2014), Genetic variants underlying risk of endometriosis: insights from meta-analysis of eight genome-wide association and replication datasets, *Human Reproduction Update*, 20(5):702-716.

Rambulangi S, Abdullah N, Yusuf I, Rauf S (2015), The Balance of Matrix Metalloproteinase-2 (Mmp-2) and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-2 (Timp-2) on Severe Endometriosis, *Journal of Gynecology and Obstetrics*, 3(6):111-114.

Rana N, Braun DP, House R, Gebel H, Rotman C, Dmowski WP (1996), Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis, *Fertility and Sterility*, 65(5):925-930.

Rao S, Kapurubandara S, Anpalagan A (2018), Elevated CA 125 in a CASE of Leaking Endometrioma, *Case Reports American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1-5.

Rastogi M, Gupta S, Sachan M (2016), Biomarkers towards Ovarian Cancer Diagnostics: Present and Future Prospects, *Human and Animal Health*, 59.

Regiani T, Cordeiro TB, Costa LVT, Salgueiro J, Cardozo K, Carvalho VM et al. (2015), Follicular fluid alterations in endometriosis: label-free proteomics by MSE as a functional tool for endometriosis, *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 61(5):263-276.

Rei C, Williams T, Feloney M (2018), Endometriosis in a Man as a Rare Source of Abdominal Pain: A Case Report and Review of the Literature, *Case Reports American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2018:2083121.

Reisman D, Glaros S, Thompson EA (2009), The SWI/SNF complex and cancer, *Oncogene*, 28(14):1653-1668.

Rekker K, Saare M, Eriste E, Tasa T, Kukuškina V, Roost Am et al. (2017), High-throughput mRNA sequencing of stromal cells from endometriomas and endometrium, *Reproduction*, 154(1):93-100.

Renner SP, Strissel PL, Beckmann MW, Lermann S, Burghaus S, Hackl J et al. (2015), Inhibition of Adhesion, Proliferation, and Invasion of Primary Endometriosis and Endometrial Stromal and Ovarian Carcinoma Cells by a Nonhyaluronan Adhesion Barrier Gel, *BioMed Research International*, 2314-6133.

Riccio LGC, Santulli P, Marcellin L, Simões Abrão M, Batteux F, Chapron C (2018), Immunology of endometriosis, *Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 50:39-49.

Rohne P, Prochnow H, Koch-Brandt C (2016), The CLU-files: disentanglement of a mystery, *Biomolecular Concepts*, 7(1):1-15.

Rosenfeld DL, Lecher BD (1981), Endometriosis in a patient with Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 139(1):105.

Rossing MA, Cushing-Haugen KL, Wicklund KG, Doherty JA, Weiss NS (2008), Risk of epithelial ovarian cancer in relation to benign ovarian conditions and ovarian surgery, *Cancer Causes Control*, 19(10):1357-1364.

Saavalainen L, Lassus H, But A, Tiitinen A, Härkki P, Gissleet M et al. (2018), A Nationwide Cohort Study on the risk of non-gynecological cancers in women with surgically verified endometriosis, *International Journal of Cancer*, 143(11):2725-2731.

Saavalainen L, Lassus H, But A, Tiitinen A, Härkki P, Gissleret M et al. (2018), Risk of Gynecologic Cancer According to the Type of Endometriosis, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 131(6):1095-1102.

Sadler TW (2012), *Langman's Medical Embriology* (12 ed.) Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 232-235.

Sakuishi K, Jayaraman P, Behar SM, Anderson AC, Kuchroo VK (2011), Emerging Tim-3 functions in antimicrobial and tumor immunity, *Trends of Immunology*, 32(8):345-349.

Samartzis EP, Noske A, Samartzis N, Fink D, Imesch P (2013), The expression of histone deacetylase 1, but not other class I histone deacetylases, is significantly increased in endometriosis, *Reproductive Sciences*, 20(12):1416-1422.

Samartzis EP, Samartzis N, Noske A, Fedier A, Caduff R, Dedes KJ et al. (2012), Loss of ARID 1A/BAF250a-expression in endometriosis: a biomarker for risk of carcinogenic transformation?, *Modern Pathology*, 25(6):885-892.

Sampson JA (1927), Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation, *American Journal of Pathology*, 3(2):93-110.

Saraswathy SD (2018), Electrophoresis, Dostupno na: [http://www.bdu.ac.in/schools/biotechnology-and-genetic-engineering/biomedical science/docs/course materials/ Biotechniques/ Electrophoresis.pdf](http://www.bdu.ac.in/schools/biotechnology-and-genetic-engineering/biomedical%20science/docs/course_materials/Biotechniques/Electrophoresis.pdf), Pristupljeno: 12.8.2012.

Sasson IE, Taylor HS (2008), Stem cells and the pathogenesis of endometriosis, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1127:106-115.

Satriani DE, Rambulangi J, Riu DS, Chalid MT, Abdullah N, Irianta T (2019), Comparing Interleukin10 (IL-10) Level in Women with Adenomyosis and without Adenomyosis, *Research Journal of Obstetrics and Gynecology*, 12:28-32.

Schrodt GR, Alcorn MO, Ibanez J (1980), Endometriosis of the male urinary system: a case report, *Journal of Urology*, 124(5):722-723.

Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM et al. (2006), New consensus nomenclature for mammalian keratins, *Journal of Cell Biology*, 174(2):169-174.

Scotti S, Regidor PA, Schindler AE, Winterhager E (2020), Reduced proliferation and cell adhesion in endometriosis, *Molecular Human Reproduction*, 6(7):610–617.

Seeber B, Sammel MD, Fan X, Gerton GL, Shaunik A, Chittams J et al. (2008), Panel of markers can accurately predict endometriosis in a subset of patients, *Fertility and Sterility*, 89:1073-1081.

Seeber BE, Czech T, Buchner H, Barnhart KT, Seger C, Daxenbichler G et al. (2010), The vitamin E-binding protein afamin is altered significantly in the peritoneal fluid of women with endometriosis, *Fertility and Sterility*, 94(7):P2923-2926.

Seidman JD (1996), Prognostic importance of hyperplasia and atypia in endometriosis, *International Journal of Gynecological Pathology*, 15(1):1-9.

Serine protease inhibitor Kazal-type 5 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9NQ38>, Pristupljeno 12.11.2021.

Shafrir AL, Farland LV, Shah DK, Harris HR, Kvaskoff M, Zondervan K (2018), Risk for and consequences of endometriosis: A critical epidemiologic review, *Best Practice & Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 51:1-15.

Sharpe-Timms KL, Nabli H, Zimmer RL, Birt JA, Davis JW (2010), Inflammatory cytokines differentially up-regulate human endometrial haptoglobin production in women with endometriosis, *Human Reproduction*, 25:1241-1250.

Sharpe-Timms KL, Zimmer RL, Ricke EA, Piva M, Horowitz GM (2002), Endometriotic haptoglobin binds to peritoneal macrophages and alters their function in women with endometriosis, *Fertility and Sterility*, 78(4):810-819.

Sherwin JRA, Sharkey AM, Mihalyi A, Simsa P, Catalano RD, D'Hooghe TM (2008), Global gene analysis of late secretory phase, eutopic endometrium does not provide the basis for a minimally invasive test of endometriosis, *Human Reproduction*, 23(5):1063–1068.

Shigesu N, Kvaskoff M, Kirtley S, Feng Q, Fang H, Knight JC et al. (2019), The association between endometriosis and autoimmune diseases: a systematic review and meta-analysis, *Human Reproduction Update*, 25(4):486-503.

Shin HY, Yang W, Chay DB, Lee EJ, Chung JY, Kim HS, et al. (2021), Tetraspanin 1 promotes endometriosis leading to ovarian clear cell carcinoma, *Molecular Oncology*, 15(4):987-1004.

Signorile PG, Baldi A (2016), Prototype of Multiplex Bead Assay for Quantification of Three Serum Biomarkers for In Vitro Diagnosis of Endometriosis, *Journal of Cellular Physiology*, 231:2622-2627.

Signorile PG, Baldi F, Bussani R, D'Armiento M, De Falco M, Baldi A (2009), Ectopic endometrium in human foetuses is a common event and sustains the theory of müllerianosis in the pathogenesis of endometriosis, a disease that predisposes to cancer, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 28(1):49.

Sikora J, Wróblewska-Czech, A, Smycz-Kubańska M, Mielczarek-Palacz A, Cygal A, Witek A et al. (2018), The role of complement components C1q, MBL and C1 inhibitor in pathogenesis of endometriosis, *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 297:1495-1501.

Simpson JL, Elias S, Malinak LR, Buttram VC (1980), Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 137(3):327-331.

Sinaii N, Plumb K, Cotton L, Cotton L, Lambert L, Kennedy S et al. (2008), Differences in characteristics among 1,000 women with endometriosis based on extent of disease, *Fertility and Sterility*, 89(3):538-545.

Singh A, Gupta S, Sachan M (2019), Epigenetic Biomarkers in the Management of Ovarian Cancer: Current Prospectives, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7:182.

Siregar, Henry Salim (2014), Role of L-Selectin Gene P213S Polymorphism and Macrophage Profiles (M1, M2) in Cases of Endometriosis, *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 2224-3208.

Skrzypczak M, Springwald A, Latrich C, Häring J, Schüler S, Ortmann O et al. (2012), Expression of Cysteine Protease Cathepsin L is Increased in Endometrial Cancer and Correlates With Expression of Growth Regulatory Genes, *Cancer Investigation*, 30(5):398-403.

Somigliana E, Vigano' P, Parazzini F, Stoppelli S, Giambattista E, Vercellini P (2006), Association between endometriosis and cancer: a comprehensive review and a critical analysis of clinical and epidemiological evidence, *Gynecologic Oncology*, 101(2):331-341.

Sonavane SK, Kantawala KP, Menias CO (2011), Beyond the boundaries-endometriosis: typical and atypical locations, *Current Problems in Diagnostic Radiology*, 40(6):219-232.

Song Y, Ma X, Zhang M, Wang M, Wang G, Ye Y et al. (2020), Ezrin Mediates Invasion and Metastasis in Tumorigenesis: A Review , *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8:1321.

Soo-Young Le, Yu-Jin K, Dae-Hyung L (2021), Classification of endometriosis, *Journal of Yeungnam Medical Science*, 38(1):10-18.

Sova H, Kangas J, Puistola U, Santala S, Liakka A, Karihtala P (2012), Down-regulation of 8-Hydroxydeoxyguanosine and Peroxiredoxin II in the Pathogenesis of Endometriosis-associated Ovarian Cancer, *Anti Cancer Research*, 32(8)3037-3044.

SPARC-like protein 1 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q14515>, Pristupljeno 18.10.2021.

Stavljenić Rukavina A, Matišić D (2002), Elektroforeza i pridružene tehnike, Janković S (1st ed) Fizikalne osnove i klinički aspekti medicinske dijagnostike, Medicinska naklada Zagreb,.224-227, Dostupno.na: <https://www.bib.irb.hr/102338/download/102338.Elektroforeza-tekst.doc>, Pristupljeno 10.08.2021.

Stochaj WR, Berkelman T Laird N (2006), Preparative 2D Gel Electrophoresis with Immobilized pH Gradients:IPG Strip Equilibration, Cold Spring Harbor Protocols, 2006(5):pdb.prot4584.

Suen JL, Chang Y, Shiu YS, Hsu CY, Sharma P, Chiu CC et al. (2019), IL-10 from plasmacytoid dendritic cells promotes angiogenesis in the early stage of endometriosis, Journal of Pathology, 249(4):485-497.

Suginami H (1991), A reappraisal of the coelomic metaplasia theory by reviewing endometriosis occurring in unusual sites and instances, American Journal of Obstetrics and Gynecology, 65(1):214-218.

Sun WS, Misao R, Iwagaki S, Fujimoto J, Tamaya T (2002), Coexpression of growth arrest-specific gene 6 and receptor tyrosine kinases, Axl and Sky, in human uterine endometrium and ovarian endometriosis, Molecular Human Reproduction, 8(6):552-558.

Sundqvist J, Andersson KL, Scarselli G, Gemzell-Danielsson K, Lalitkumar PGL (2012), Expression of adhesion, attachment and invasion markers in eutopic and ectopic endometrium: a link to the aetiology of endometriosis, Human Reproduction, 27(9):2737-2746.

Sung-hee O, Yong-bok C, June-hyun K, Conrad CW, Jeong-sun J (2017), Quantification of autophagy flux using LC3 ELISA, Analytical Biochemistry, 530:57-67.

Superoxide dismutase (Cu-Zn) (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P00441>, Pristupljeno 12.10.2021.

Suraweera A, O'Byrne KJ, Richard DJ (2018), Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACI, Frontiers in Oncology, 8:92.

Suryawanshi S, Huang X, Elishaev E, Budiu RA, Zhang L, Kim S et al. (2014), Complement pathway is frequently altered in endometriosis and endometriosis-associated ovarian cancer, *Clinical Cancer Research*, 20(23):6163-6174.

Suzumori N, Ozaki Y, Ogasawara M, Suzumori K (2005), Increased concentrations of cathepsin D in peritoneal fluid from women with endometriosis, *Molecular Human Reproduction*, 7(5):459-462.

Szamatowicz J, Laudański P, Tomaszewska I (2002), Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1: A possible role in the pathogenesis of endometriosis, *Human Reproduction*, 17:284-288.

Šterbić L (2013), Sastavljanje optičkih mapa: modul za korekciju grafa, Dostupno na: <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.bib.irb.hr%2F637138%2Fdownload%2F637138.ZR5.pdf&psig=AOvVaw1KuZgH5e3gfmJZL-sBKyo&ust=1628946464318000&source=images&cd=vfe&ved=0CBYQtaYDahcKEwjgpOjzjK7yAhUAAAAAHQAAAAQHw>, Pristupljeno: 03.08.2021.

Tabibzadeh S, Babaknia A, Kong QF, Zupi E, Marconi D, Romanini C et al. (1995), Menstruation is associated with disordered expression of desmoplakin I/II and cadherin/catenins and conversion of F- to G-actin in endometrial epithelium, *Human Reproduction*, 10(4):776-784.

Takada M, Masuda N, Matsuura E, Kusunoki Y, Matui K, Nakagawa K et al. (1995), Measurement of cytokeratin 19 fragments as a marker of lung cancer by CYFRA 21-1 enzyme immunoassay, *British Journal of Cancer*, 71(1):160-5.

Takahashi K, Nagata H, Abu Musa A, Shibukawa T, Yamasaki H, Kitao M (1990). Clinical usefulness of CA 125 levels in the menstrual discharge in patients with endometriosis, *Fertility and Sterility*, 54(2):360-362.

Tamir A, Gangadharan A, Balwani S, Tanaka T, Patel U, Hassan A et al. (2016), The serine protease prostasin (PRSS8) is a potential biomarker for early detection of ovarian cancer, *Journal of Ovarian Research*, 9:20.

Tan O, Ornek T, Seval Y, Sati L, Arici A (2008), Tenascin is highly expressed in endometriosis and its expression is upregulated by estrogen, *Fertility and Sterility*, 89(5):1082-1089.

Tempfer C, Hefler L, Heinzl H, Loesch A, Gitsch G, Rumpold H et al. (1988) CYFRA 21-1 serum levels in women with adnexal masses and inflammatory diseases, *British Journal of Cancer*, 78(8):1108-1112.

Tenascin (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P24821>, Pristupljeno 02.11.2021.

Tetraspanin-1 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/O60635>, Pristupljeno 12.10.2021.

TGF-beta receptor type-2 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P37173>, Pristupljeno 16.10.2021.

Thangavelu B, Boutté AM (2021), Single Molecule Assay for Ultrasensitive Detection of Cathepsin B in Human Blood, *American Chemical Society Omega*, 9609–9616.

Thrombospondin-1 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P07996>, Pristupljeno 12.11.2021.

Tian Z, Chang ZX, Zhao Y, Hong-Lan Z (2020), Current biomarkers for the detection of endometriosis, *Chinese Medical Journal*, 133(19):2346-2352.

Tokushige N, Markham R, Crossett B, Ahn SB, Nelaturi VL, Khan A, Fraser IS (2011), Discovery of a novel biomarker in the urine in women with endometriosis, *Fertility and Sterility*, 95(1):46-49.

Toullec L, Batteux F, Santulli P, Chouzenoux S, Jeljeli M, Belmondo T et al. (2020), Levels of Anti-GM-CSF Antibodies in Deep Infiltrating Endometriosis, *Reproductive Sciences*, 27(1):211-217.

Tran LVP, Tokushige N, Berbic M, Markham R, Fraseret IS (2009), Macrophages and nerve fibres in peritoneal endometriosis, *Human Reproduction*, 24(4):835-841.

Transmembrane protease serine 2 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/O15393>, Pristupljeno 18.10.2021.



Treloar SA, Bell TA, Nagle CM, Purdie DM, Green AC (2010) Early menstrual characteristics associated with subsequent diagnosis of endometriosis, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 202(6):534.e1-6.

Treloar SA, Wicks J, Nyholt DR, Montgomery GW, Bahlo M, Smith V et al. (2005), Genomewide linkage study in 1,176 affected sister pair families identifies a significant susceptibility locus for endometriosis on chromosome 10q26, *American Journal of Human Genetics*, 77(3):365-376.

Tsao KC, Hong JH, Wu TL, Chang PY, Sun CF, Wu JT (2007), Elevation of CA 19-9 and chromogranin A, in addition to CA 125, are detectable in benign tumors in leiomyomas and endometriosis, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 21:193-196.

Turgut A, Özler A, Görük NY, Tunç SY, Evliyaoğlu O, Gülc T (2013), Copper, ceruloplasmin and oxidative stress in patients with advanced-stage endometriosis, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 17:1472-1478.

Tyrosine-protein kinase receptor TYRO3 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q06418>, Pristupljeno 12.10.2021.

Ueki M (1991), Histologic study of endometriosis and examination of lymphatic drainage in and from the uterus, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 165(1):201-209.

Usta CS, Turan G, Bulbul CB, Usta A, Adali E (2020), Differential expression of Oct-4, CD44, and E-cadherin in eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriomas and their correlations with clinicopathological variables, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 18(1):116.

Van der Linden PJ, Dunselman GA, de Goeij AF, Van der Linden EP, Evers JL, Ramaekers FC (1995), Epithelial cells in peritoneal fluid - of endometrial origin?, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 173(2):566-570.

Vaquero A, Scher M, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D (2004), Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin, *Molecular Cell*, 16(1):93-105.

Vascular cell adhesion protein 1 (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P19320>, Pristupljeno 18.10.2021.

Vercellini P, Bracco B, Mosconi P, Roberto A, Alberico D, Dhouha D et al. (2016), Norethindrone acetate or dienogest for the treatment of symptomatic endometriosis: a before and after study, *Fertility and Sterility*, 105(3):734-743.e3.

Vercellini P, Somigliana E, Consonni D, Frattaruolo MP, De Giorgi O, Fedele L (2012), Surgical versus medical treatment for endometriosis-associated severe deep dyspareunia: I. Effect on pain during intercourse and patient satisfaction, *Human Reproduction*, 27(12):3450-3459.

Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L (2014), Endometriosis: pathogenesis and treatment, *Nature Reviews Endocrinology*, 10:261.

Victory R, Diamond MP, Johns DA (2007), Villar's nodule: a case report and systematic literature review of endometriosis externa of the umbilicus, *Journal of Minimally Invasive Gynecology*, 14(1):23-32.

Viganò P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P (2004), Endometriosis: epidemiology and aetiological factors, *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 18(2):177-200.

Vinatier D, Dufour P, Oosterlynck D (1996), Immunological aspects of endometriosis, *Human Reproduction Update*, 2(5):371-384.

Vlad AM, Diaconu I, Gantt KR (2006), MUC1 in endometriosis and ovarian cancer, *Immunology Research*, 36:229-236.

Wang G, Tokushige N, Markham R, Fraser IS (2009), Rich innervation of deep infiltrating endometriosis, *Human Reproduction*, 24(4):827-834.

Wang H, Liu M (2021), Complement C4, Infections, and Autoimmune Diseases, *Frontiers in Immunology*, 12:2682.

Washino S, Hirai M, Matsuzaki A, Kobayashi Y (2011), Clinical Usefulness of CEA, CA19-9, and CYFRA 21-1 as Tumor Markers for Urothelial Bladder Carcinoma, *Urologia Internationalis*, 87(4):420-428.

Wedepohl S, Dervedde J, Vahedi-Faridi A, Tauber R, Saenger W, Bulut H (2017), ChemBioChem journal, 18:1338.

Wenzl R, Kiesel L, Huber JC, Wieser F (2003), Endometriosis: a genetic disease, Drugs Today (Barc), 39(12):961-972.

Wheeler MA, Heffner DL, Kim S, Espy SM, Spano AJ, Cleland CL et al. (2014), TNF- $\alpha$ /TNFR1 signaling is required for the development and function of primary nociceptors, Neuron, 82(3):587-602.

Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM, Zhao Y, Tse K, Zeng T et al. (2010), ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas, New England Journal of Medicine, 363(16):1532-1543.

Wingfield M, Macpherson A, Healy DL, Rogers PAW (1995), Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis, Fertility and Sterility, 64(2):340-346.

Woodward PJ, Sohaey R, Mezzetti TP (2001), Endometriosis: radiologic-pathologic correlation, Radiographics, 21(1):193-216.

Worley MJ, Welch WR, Berkowitz RS, Ng SW (2013), Endometriosis-associated ovarian cancer: a review of pathogenesis, International Journal of Molecular Sciences, 14(3):5367-5379.

Wyatt KA, Filby CE, Davies-Tuck ML, Suke SG, Evans J, Gargett CE (2021), Menstrual fluid endometrial stem/progenitor cell and supernatant protein content: cyclical variation and indicative range, Human Reproduction, 36(8):2215-2229.

Xia M, Zhao M, Ma J, Fang X (2013), Aberrant histone acetylation and methylation levels in woman with endometriosis, Archives of Gynecology and Obstetrics, 287:487-494.

Xue YH, You LT, Ting HF, Chen YW, Sheng ZY, Xie YD et al. (2021), Increased risk of rheumatoid arthritis among patients with endometriosis: a nationwide population-based cohort study, Rheumatology (Oxford), 60(7):3326-3333.

Yamamoto S, Tsuda H, Takano M, Tamai S, Matsubara O (2012), Loss of ARID1A protein expression occurs as an early event in ovarian clear-cell carcinoma development and frequently coexists with PIK3CA mutations, Modern Pathology, 25(4):615-624.

Yamamoto S, Tsuda H, Takano M, Tamai S, Matsubara O (2012), PIK3CA mutations and loss of ARID1A protein expression are early events in the development of cystic ovarian clear cell adenocarcinoma, *Virchows Archiv*, 460(1):77-87.

Yang H, Hu T, Hu P, Qi C, Qianmi L (2021), miR-143-3p inhibits endometriotic stromal cell proliferation and invasion by inactivating autophagy in endometriosis, *Molecular Medicine Reports*, 23(5):356.

Yin BW, Dnistrian A, Lloyd KO (2002), Ovarian cancer antigen CA 125 is encoded by the MUC16 mucin gene, *International Journal of Cancer*, 98(5):737-740.

Yin BW, Lloyd KO (2001), Molecular cloning of the CA 125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16, *Journal of Biological Chemistry*, 276(29):27371-27375.

Yu CQ, Yu J, Han J, Zhou QL, Shen W (2009), Regulatory mechanism of malignant behavior of endometriosis mediated by puerarin, *Journal of Chinese integrative medicine*, 7(1):41-7.

Yu H, Hao JM, Li X, Li F, Li J, Li L (2020), Decreased Expression of Peroxiredoxin in Patients with Ovarian Endometriosis Cysts, *Archives of Medical Research*, 51(7):670-674.

Zamolodchikova TS, Tolpygo SM, Svirshchevskaya EV (2020), Cathepsin G-Not Only Inflammation: The Immune Protease Can Regulate Normal Physiological Processes, *Frontiers in Immunology*, 401:411.

Zeitoun K, Takayama K, Sasano H, Suzuki T, Moghrabi N, Andersson S et al. (1998), Deficient 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17beta-estradiol, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(12):4474-4480.

Zhang F, Tang L, Ran X, Mao N, Ruan Y, Yi F et al. (2019), Changes in Ovary Transcriptome and Alternative splicing at estrus from Xiang pigs with Large and Small Litter Size, *BioRxiv journal*, 547810.

Zhao T, Xiao-Hong C, Yan Z, Hong-Lan Z (2020), Current biomarkers for the detection of endometriosis, *Chinese Medical Journal*, 133(19):2346-2352.

Zhou S, Yi T, Liu R, Bian C, Qi X, He X et al. (2012), Proteomics identification of annexin A2 as a key mediator in the metastasis and proangiogenesis of endometrial cells in human adenomyosis, *Molecular and Cellular Proteomics*, 11(7):M112.017988.

Zinc-alpha-2-glycoprotein (nd), Protein knowledgebase (UniProtKB), Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/P25311>, Pristupljeno 12.11.2021.

## 9. ŽIVOTOPIS

Alenka Višnić rođena je u Rijeci, gdje je završila svoje cjelokupno obrazovanje. Srednju školu „Centar usmjerenog obrazovanja za kadrove u zdravstvu“ završava u Rijeci 1990 g. Od završetka srednjoškolskog obrazovanja pa do 1996 g. zaposlena je kao medicinska sestra u Dječjoj bolnici Kantrida KBC Rijeka. Iste 1996 g. upisuje sa na Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci - smjer opća medicina te diplomira s zvanjem doktora medicine. Po završenom obaveznom pripravničkom stažu u trajanju od godine dana pred ispitnom komisijom Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske polaže Državni ispit za doktore medicine čime stječe licencu za samostalni rad. Poslijediplomski doktorski studij na Prirodoslovno matematičkom fakultetu - smjer biologija Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2011g., a subspecijalističko usavršavanje iz ginekološke endokrinologije i humane reprodukcije započinje 2021 g. Radila je na otoku Korčuli kao liječnik obiteljske i hitne medicine, a potom 2007 g. zasniva radni odnos u Općoj županijskoj bolnici Pakrac i BHV te započinje specijalizaciju iz ginekologije i porodništva. Pred ispitnom komisijom u KBC-Zagreb 2013 g. polaže specijalistički ispit te dobiva zvanje specijalistice ginekologije i porodništva. U Općoj županijskoj bolnici Pakrac i BHV zaposlena je do 2019 g., a potom zasniva radni odnos u Klinici za ginekologiju i porodništvo KBC Rijeka. Aktivno sudjeluje na domaćim strukovnim simpozijima i kongresima s međunarдным sudjelovanjem. U funkciji predavača radila je u Srednjoj medicinskoj školi Pakrac. Autor je i koautor u nekoliko znanstvenih članaka. Pohađala je niz tečajeva u kojima stječe dodatna znanja vezana za struku. Aktivno govori od engleski i slovenski, a pasivno talijnski i francuski jezik. Bavi se primijenjenom umjetnošću te je imala nekoliko samostalnih i skupnih izložbi.