

**UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET**

Milena Aćimović

**ZNAČAJ NEINVAZIVNIH DIJAGNOSTIČKIH
METODA ENDOMETRIOZE
U ODNOSU NA INVAZIVNE METODE**

doktorska disertacija

Beograd, 2015.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE**

Milena Aćimović

**SIGNIFICANCE OF NON-INVASIVE
METHODS FOR THE DIAGNOSIS OF
ENDOMETRIOSIS COMPARE TO INVASIVE
METHODS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

MENTOR:

Prof. dr Gordana Lazović-Radonjić, redovni profesor na katedri
Ginekologije i akušerstva
Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Prof. dr Aleksandar Stefanović, redovni profesor Medicinskog
fakulteta u Beogradu

2. Prof. dr Snežana Vidaković, redovni profesor Medicinskog fakulteta u
Beogradu

3. Prof. dr Ivan Tulić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu u
penziji

DATUM

ODBRANE: _____

*Mojoj porodici,
posvećujem ovaj rad sa zahvalnošću i ljubavlju.*

ZNAČAJ NEINVAZIVNIH METODA DIJAGNOSTIKE ENDOMETRIOZE U ODNOSU NA INVAZIVNE METODE

Milena Aćimović

REZIME

Cilj: Dijagnostika endometrioze je delikatna i složena, danas je zlatni standard u dijagnostici endometrioze laparoskopija uz patohistološku potvrdu. Laparoskopija predstavlja invazivnu dijagnostičku proceduru, koja podrazumeva uvođenje pacijentkinje u opštu anesteziju, kao i veliko hirurško iskustvo. Ogroman broj kliničkih i bazičnih studija fokusiran je na otkrivanju neinvazivnih dijagnostičkih postupaka, koji bi omogućili postavljanje dijagnoze, tako da bi invazivne metode bile rezervisane samo za one pacijente kojima istovremeno treba i operativni tretman. Glavni ciljevi ovog rada su: 1) Ispitati pojedinačnu i kombinovanu vrednost biomarkera (CA125, CA19.9, CEA, mRNA za Survivin, mRNA za VEGF) u odnosu na dijagnozu endometrioze i 2) Ispitati pouzdanost kombinacije ovih pet biomarkera i transvaginalnog ultrazvučnog pregleda u postavljanju dijagnoze endometrioze.

Metodologija: Ovo istraživanje predstavlja prospektivnu studiju preseka koja analizira značaj neinvazivnih metoda dijagnostike endometrioze u odnosu na invazivne procedure. Studija je obuhvatila 40 pacijentkinja kojima je zbog sumnje na postojanje endometrioze uradjena dijagnostička laparoskopija sa patohistološkom analizom u jednogodišnjem periodu od 2012.godine do 2013.godine, u Ginekološko akušerskoj klinici Kliničkog centra u Beogradu i na odeljenju Ginekologije Opšte bolnice u Užicu. Nakon završene patohistološke analize i na osnovu vrednosti serumskih biomarkera pacijentkinje će biti podeljene u dve grupe:

Grupa A – pacijentkinje kod kojih je verifikovano prisustvo endometrioze

Grupa B – pacijentkinje kod kojih je isključeno prisustvo endometrioze, one bi predstavljale KONTROLNU GRUPU ove studije .

Rezultati: Uočeno je da postoji statistički značajna razlika u vrednosti serumske koncentracije CA 125 između ispitivane i kontrolne grupe pacijentkinja ($p < 0,001$). Povišene vrednosti Ca125 (≥ 35) imalo je 26 (65%) žena, od kojih je 25 (96,2%) imalo dijagnozu endometrioze. Postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti povišenih vrednosti Ca125 između žena sa i bez endometrioze ($p < 0,001$). Performanse povišenog Ca125 kao dijagnostičkog testa za endometriozu su sledeće: Senzitivnost 83,3% Specifičnost 90,0% PPV=96,2% NPV=64,3% Stopa lažno pozitivnih nalaza $1/40=2,5\%$ Stopa lažno negativnih nalaza $5/40=12,5\%$. Povišene vrednosti Ca19-9 (≥ 37) imalo je 5 (12,5%) pacijentkinja. Ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti povišenih vrednosti Ca19-9 između pacijentkinja sa i bez endometrioze ($p > 0,05$). Na osnovu ROC analize utvrđena je tačka preseka za Ca19-9 koja razdvaja dijagnostički pozitivne i negativne pacijentkinje sa endometriozom (površina ispod krive 0,780; SE=0,072; $p=0,009$). Tačka preseka je 17. Postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti vrednosti Ca19-9 ≥ 17 između ispitanica sa i bez endometrioze ($p=0,042$), tj. žene sa endometriozom imaju češće vrednosti Ca19-9 ≥ 17 od žena bez endometrioze. Performanse Ca19-9 ≥ 17 kao dijagnostičkog testa za endometriozu su sledeće: Senzitivnost 76,7% Specifičnost Sp=60,0% PPV=85,2% NPV=46,2% Stopa lažno pozitivnih nalaza $4/40=10,0\%$ Stopa lažno negativnih nalaza $7/40=17,5\%$ UZ nalaz je bio pozitivan kod 27 (67,5%) ispitanica i kod svih 27 je potvrđena dijagnoza endometrioze. Negativan je bio kod 13 (32,5%) ispitanica, od kojih je kod 3 (23,1%) nakon operacije postavljena dijagnoza endometrioze. Postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti pozitivnog UZ nalaza između ispitanica sa i bez endometrioze ($p < 0,001$). Performanse UZ nalaza kao dijagnostičkog testa za endometriozu su sledeće: Senzitivnost 90% Specifičnost 100% PPV 100% NPV=76,9% Stopa lažno pozitivnih nalaza=0/40=0% Stopa lažno negativnih nalaza=3/40=7,5% .Lažno negativan UZ nalaz je bio kod 3 pacijentkinje koje su imale endometriozu samo peritoneuma, bez zahvaćenosti bilo kog jajnika. Ekspresija survivina je zabeležena kod 22 (55%) ispitanica. Od 22 ispitanice sa ekspresijom survivina, kod njih 20 (90,9%) je potvrđena dijagnoza endometrioze, a kod 2 (9,1%) ispitanice nije. Postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti ekspresije survivina

između ispitanica sa i bez endometrioze ($p=0,025$). Performanse ekspresije survivina kao dijagnostičkog testa za endometriozu su sledeće: Senzitivnost 66.7% Specifičnost $Sp=80\%$ $PPV=90.9\%$ $NPV=44.4\%$ Stopa lažno pozitivnih nalaza 2/40 (5%) Stopa lažno negativnih nalaza 10/40 (25%). Postoji statistički značajna razlika u ekspresiji VEGF-a između pacijentkinja sa i bez endometrioze ($p=0,009$). Pacijentkinje sa endometriozom imaju značajno veću vrednost ekspresije mRNA za VEGF (8,55 prema 10,17). Na osnovu ROC analize utvrđena je tačka preseka za VEGF koja razdvaja dijagnostički pozitivne i negativne pacijentkinje sa endometriozom (površina ispod krive 0,733; $SE=0,086$; $p=0,010$). Tačka preseka je 9,5. Postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti ekspresije VEGF prikazane kao razlika u ekspresiji "house keeping" gena i $VEGF < 9,5$ između ispitanica sa i bez endometrioze ($p=0,006$). Performanse ekspresije VEGF prikazane kao razlika u ekspresiji "house keeping" gena i $VEGF < 9,5$ kao dijagnostičkog testa za endometriozu su sledeće: Senzitivnost 80,0% Specifičnost 70,0% $PPV 88,9\%$ $NPV 53,8\%$ Stopa lažno pozitivnih nalaza 3/40 ili 7,5% Stopa lažno negativnih nalaza 6/40 ili 15%

Zaključak: Određivanje koncentracija biomarkera (CA 125, Ca 19-9 i CEA) kao i ekspresije mRNA za survivin i ekspresije mRNA za VEGF uz TVU predstavlja jednostavan test koji može doprineti dijagnostici endometrioze, a da se pri tom izbegnu invazivne dijagnostičke metode kao što je laparoskopska hirurgija.

Ključne reči: Endometriozna, Ca 125, Ca 19-9, survivin, VEGF, TVU, laparoskopija

SIGNIFICANCE OF NON-INVASIVE METHODS FOR THE DIAGNOSIS OF ENDOMETRIOSIS COMPARE TO INVASIVE METHODS

Milena Acimović

SUMMARY

Objective: Diagnosis of endometriosis is a delicate and complex. The gold standard in the diagnosis of endometriosis is a laparoscopy with histopathological confirmation. Laparoscopy is the invasive diagnostic procedure, which involves the introduction of the patient in general anesthesia, as well as extensive surgical experience. A huge number of clinical and basic studies focused on detection of non-invasive diagnostic procedures that would facilitate the diagnosis, so that invasive methods were reserved only for those patients who also need and surgical treatment. The main objectives of this study were: 1) to examine the individual and combined value of biomarkers (CA125, CA19.9, CEA, Survivin mRNA, mRNA for VEGF) in relation to the diagnosis of endometriosis and 2) to examine the reliability of the combination of these five biomarkers and transvaginal ultrasound in the diagnosis of endometriosis.

Methodology: This study is a prospective study that analyzes the importance of non-invasive methods of diagnosis of endometriosis compared to invasive procedures. The study included 40 patients undergoing laparoscopy for suspected endometriosis with histopathologic analysis in the one-year period from 2012 to 2013, in the departments of Gynecology and Obstetrics of the Medical Center Uzice and Clinical Center of Serbia.

After histopathological analysis and determinations of serum biomarkers concentrations patient were divided into two groups:

Group A - patients with verified presence of endometriosis.

Group B - patients in whom analysis excluded the presence of endometriosis, they were represent a control group of the study.

Results: It was observed that there is a statistically significant difference in serum concentrations of CA 125 between the experimental and control groups of patients ($p < 0.001$). Elevated CA125 values (≥ 35) had 26 (65%) women, of whom 25 (96.2%) had a diagnosis of endometriosis. There is a statistically significant difference in the prevalence of elevated CA125 values between women with and without endometriosis ($p < 0.001$). Performance of elevated CA125 levels as a diagnostic test for endometriosis are as follows: sensitivity 83.3%, specificity of 90.0% PPV = 96.2% NPV = 64.3% false positive rate $1/40 = 2.5\%$ rate of false negative findings $5 / 40 = 12.5\%$. Higher values CA19-9 (≥ 37) had 5 (12,5%) patients. There was no statistically significant difference in the prevalence of elevated CA 19-9 values between patients with and without endometriosis ($p > 0.05$). ROC analysis revealed a point of intersection for CA19-9 separating diagnostic positive and negative patients with endometriosis (area under the curve 0.780, SE = 0.072; $p = 0.009$). Point of intersection is 17. There is a statistically significant difference in the prevalence of ≥ 17 CA19-9 values between patients with and without endometriosis ($p = 0.042$). Women with endometriosis have CECS CA19-9 values ≥ 17 than women without endometriosis. Performance CA19-9 $> = 17$ as a diagnostic test for endometriosis are as follows: sensitivity 76.7% specificity Sp = 60.0% PPV = 85.2% NPV = 46.2% rate of false positives $4/40 = 10.0\%$ rate of false negative results $7/40 = 17.5\%$ and the results were positive in 27 (67.5%) subjects with all 27 confirmed diagnosis of endometriosis. The negative was in 13 (32.5%) subjects, one of which is in 3 (23.1%) after surgery diagnosed with endometriosis. There was a statistically significant difference in the prevalence of positive ultrasound findings between patients with and without endometriosis ($p < 0.001$). Performance with the findings as a diagnostic test for endometriosis are as follows: sensitivity 90% specificity 100% 100% NPV PPV = 76.9% rate of false positives = $0/40 = 0\%$ rate of false

negative results = $3/40 = 7.5\%$. False negative ultrasound findings was in 3 patients who had only peritoneal endometriosis, without any involvement of the ovaries. The expression of survivin was observed in 22 (55%), with 20 of them (90.9%) had a confirmed diagnosis of endometriosis. There was a statistically significant difference in the prevalence of survivin expression between patients with and without endometriosis ($p = 0.025$). Performance of survivin expression as a diagnostic test for endometriosis are: Sensitivity 66.7% Specificity Sp = 80% PPV = 90.9%. NPV = 44.4% rate of false positives 2/40 (5%) The rate of false negative findings were 10/40 (25%). There was a statistically significant difference in the expression of VEGF between patients with and without endometriosis ($p = 0.009$). Patients with endometriosis have a significantly higher value of the mRNA expression of VEGF (8.55 to 10.17). ROC analysis revealed a point of intersection for VEGF that separates diagnostic positive and negative patients with endometriosis (area under the curve 0.733, SE = 0.086; $p = 0.010$). Point section is 9.5. There was a statistically significant difference in the presence of VEGF expression displayed as differences in the expression "house keeping" genes and VEGF <9.5 between patients with and without endometriosis ($p = 0.006$). Performance of VEGF expression displayed as differences in the expression "house keeping" genes and VEGF <9.5 as a diagnostic test for endometriosis are: Sensitivity 80.0% Specificity 70.0% NPV PPV 88.9% 53.8% rate of false positives findings 3/40 ili7,5% rate of false negative results 6/40 or 15%.

Conclusion: Determination of serum markers concentrations (CA 125, CA 19-9 and CEA CA125) and mRNA expression levels for survivin and VEGF along with TVU can contribute to the higher accuracy of noninvasive diagnostic tools for endometriosis, and to thereby avoid invasive diagnostic procedures such as laparoscopic Surgery.

Key words: Endometriosis, Ca 125, Ca 19-9, survivin, VEGF, TVU, laparoscopy

SADRŽAJ

1. UVOD	13
1.1. Incidencija i faktori rizika	13
1.2. Patogeneza	15
1.2.1. Teorije histogeneze	15
1.3. Etiologija i patofiziologija	19
1.3.1. Peritonealna endometrioza	19
1.3.2. Ovarijalna endometrioza	20
1.3.3. Duboka infiltrativna endometrioza	22
1.3.4. Implantacija i invazija	23
1.3.5. Angiogeneza	25
1.3.6. Apoptoza	25
1.3.7. Inflamatorni citokini	27
1.4. Simptomi endometrioze	29
1.4.1. Bol	30
1.4.2. Neplodnost	31
1.5. Dijagnostika endometrioze	35
1.6. Biomarkeri za endometrioze	36
1.6.1. Ca125- karbohidratni antigen 125	36
1.6.2. CEA-karcinoembrionalni antigen	37
1.6.3. CA19-9 Karbohidratni antigen	37
1.6.4. Survivin	38
1.6.5. VEGF- vascularendotelni faktor rasta	39
1.6.6. Endometrijalni markeri endometrioze	40

1.7. Klasifikacija endometrioze	40
1.8. Terapija endometrioze	44
1.8.1. Hiruško lečenje	45
1.8.2. Medikamentozno lečenje	45
2. CILJA RADA	48
3. MATERIJAL I METOD ISTRAŽIVANJA	49
3.1. Principi testiranja	50
3.1.1. Odredjivanje koncentracije CA 125	50
3.1.2. Odredjivanje koncentracije Ca 19-9	51
3.1.3. Odredjivanje koncentracije CEA	52
3.2. Određivanje nivoa ekspresije gena	53
3.2.1. Uzimanje uzorka krvi	53
3.2.2. Izdvajanje mononuklearnih ćelija krvi	53
3.2.3. Izolacija RNK	54
3.2.4. Reverzna transkripcija	55
3.2.5. Reakcija lančanog umnožavanja (PCR)	56
4. REZULTATI	58
5. DISKUSIJA	73
6. ZAKLJUČAK	85
7. LITERATURA	88

1. UVOD

Endometrioza podrazumeva pojavu tkiva koje je nalik endometrijumu izvan uterusa. Nejasna etiologija i kontroverzna histogeneza ektopičnog endometrijalnog tkiva su osnovne karakteristike endometrioze. Varijabilnost simptomatologije, infertilitet i nepoznavanje uzroka nastanka bola, koji često prati postojanje pelvičnih lezija, druga je osnovna karakteristika ovog oboljenja (1). Kada govorimo o etiologiji endometrioze, danas je akcenat stavljen na polje imunologije i genetike. Smatra se da je endometrioza je poligeno nasledno oboljenje multifaktorijalne etiologije (2). I pored svih dosadašnjih naučnih saznanja endometrioza predstavlja enigmatsku bolest i veliki izazov za istraživanja. Koliko je tema i dan danas aktuelna, govori podatak da se godišnje u svetu objavi preko 500 radova na temu endometrioze u naučnim časopisima.

Prvi podaci o endometriozi su objavljeni 1690-te godine od strane Nemačkog lekara Danijela Shroena i to u njegovoj knjizi „Disputatio inauguralis Medica de ulceritis ulceri“. On precizno opisuje čir koji se u svom primarnom obliku distribuira po celom peritoneumu, bešici, crevima, širokim ligamentima, a izvan materice i grlića. Profesori Žak Donnez i Mišel Nisoppe, koji su radili zajedno na Katoličkom univerzitetu, prvi su objavili da postoje tri oblika endometrioze : peritonealna, ovarijalna i duboka endometrioza. Detaljan opis bolesti je dao Karl von Rokitanski, češki patolog koji je radio u Beču, on je endometriozu jajnika nazvao „cystosarcoma adenidese ovarii uterinum“. 1921 godine doktor Don Sampson Albertson opisao je endometriozu jajnika kao „perforating haemorrhagic (chocolate) cystis of the ovary“. On je tvorac teorije o retrogradnoj menstruaciji kao glavnom etiološkom faktoru endometrioze.

1.1. Incidenca i faktori rizika

Tačnu učestalost endometrioze je jako teško odrediti jer zavisi od dijagnostičkih kriterijuma i od analizirane populacije pacijentkinja. Veliki problem prilikom određivanja tačne incidence ovog oboljenja predstavlja povremeno odsustvo bilo

kakvih simptoma oboljenja. Dijagnoza se postavlja samo onda kada pacijent traži medicinsku pomoć, a to je najčešće kod infertiliteta. Mnoge žene sa asimptomatskim oboljenjem, koje ne žele koncepciju, nikad i ne zatraže medicinsku pomoć. Isto tako, poznato je da jedna od tri pacijentkinje sa endometriozom, koncipira bez ikakve medicinske pomoći (3).

Prema statističkim podacima od endometrioze boluje 10 do 15% žena reproduktivnog doba, to je otprilike 16 miliona žena u EU. Kod žena sa infertilitetom javlja se od 30% do 50%, dok kod žena sa hroničnim bolovima u maloj karlici endometriozna je prisutna od 10% pa čak do 70% (4).

Prema najpoznatijim epidemiološkim istaživanjima učestalost endometrioze u različitim populacijama je:

- opšta populacija 6-10%
- neplodnost 20-40 %
- hronični pelvični bol 20-40%
- histerektomija 28%
- menoragija, disfunkcijska krvarenja 20-30%

O godinama starosti, kao bitnom faktoru nastanka endometrioze, govori se još od 1983. godine kada je Von Recklinghausen otkrio i opisao bolest, koja je mnogo kasnije dobila naziv endometriozna. Mnoge teorije koje su govorile o uticaju rase na incidenciju endometrioze danas imaju samo istorijski značaj.

Kada govorimo o naslednim činiocima, porodična sklonost ka endometriozni je nedvosmislena, ćerke i sestre imaju 6-9 puta veći rizik za pojavu endometrioze (5). Ova učestalost je još veća kod pacijentkinja sa teškim oblikom endometrioze. Postoje tri grupe kandidata genskog polimorfizma:

- geni za metabolizam ksenobiotika
- geni za upalni odgovor

- geni za aktivnost steroida

Savremena istraživanja ukazuju na to da se endometrioza nasledjuje kao kompleksna genetska osobina, poput dijabetesa ili astme, što znači da je veliki broj gena u interakciji, ali se fenotip pojavljuje samo u prisustvu faktora rizika iz spoljašnje sredine. Dioksin je industrijski zagadjivač koji je posebno bio umešan (74).

Faktori rizika za endometriozu su: rana menarha, kratki ciklusi, menoragija, niska fertilnost, prekomerna upotreba alkohola i kofeina (5, 6).

Pojavu endometrioze smanjuju korišćenje hormonske kontraceptivne terapije, pušenje i fizička aktivnost (7, 8). Za endometriozu je karakteristično višegodišnje kašnjenje u dijagnozi, ranije se uspostavlja u specijalizovanim ustanovama i kada je udružena sa neplodnošću.

1.2. Patogeneza

Iako je oboljenje bilo opisano sredinom devetnaestog veka, naziv endometrioza prvi put je upotrebio Sampson 1920. godine (13). Od tada, ovo oboljenje se stalno ispituje, znanje o endometriozu se povećava, ali još uvek mnoga pitanja ostaju nerazjašnjena, posebno sa gledišta infertiliteta. Logično nametnulo se pitanje odakle endometrijum na ektopičnom mestu. I pored velikog broja eksperimenata, intenzivnih kliničkih ispitivanja, ono je ostalo nerešeno. Rezultat svega je nastanak velikog broja teorija o patogenezi ovog oboljenja.

1.2.1. Teorije histogeneze

1. Implantaciona teorija
2. Mehanička translaciona teorija
3. Limfatička metastatska teorija
4. Vaskularna metastatska teorija

5. Teorija direktnog širenja
6. Uterotubarna teorija
7. Teorija celomske metaplazije
8. Indukciona teorija
9. Razvoj iz ostatka Mullerovih ćelija
10. Razvoj iz ostatka Wolffovih ćelija
11. Zbirna teorija

Od svih njih, izdvaja se Simpsonova implantaciona teorija, prema kojoj se endometrijalno tkivo retrogradno transportuje kroz tube tokom menstruacije, a potom implantira po peritoneumu i abdominalnim organima (14). Odmah po objavljivanju ove teorije, 1927. godine, usledila su pitanja: Da li se tokom menstruacije dešava retrogradni transport menstrualne krvi kroz tube, da li se kroz tubu mogu preneti endometrijalne ćelije s obzirom na mali lumen, posebno u istmikointersticijalnom segmentu, i da li su delovi odbačenog endometrijuma sposobni za implantaciju. Laparoskopski rezultati učinjeni u perimenstrualnom periodu, kao i peritonealne dijalize tokom menstruacije, utvrdile su postojanje regurgitacije menstrualne krvi u vrlo visokom procentu, posebno kod pacijentkinja sa retrofleksijom materice. O tome su pisali Goodal, Halme i Liu sa saradnicima (15, 16, 17). Svi njihovi radovi dokazuju da se regurgitacija menstrualne krvi relativno često dešava. Geist, je svojim eksperimentom, prvi dokazao mogućnost transporta endometrijalne ćelije kroz cevčicu, čiji je lumen tri puta manji od lumena tube (18), a Te Linde i Scott, 1950. godine sposobnost endometrijalnog detritusa za implantaciju. Ali, klasični eksperiment sa transplantacijom endometrijuma u prednju očnu komoru majmuna, koji su izveli Markee i njegovi saradnici, dovodi u sumnju Sampsonovu teoriju implantacije (19). Posmatrajući ovaj endometrijum kroz 432 menstrualna ciklusa, kod 41 majmuna, otkrili su da su za vreme menstruacije, fragmenti odbačenog endometrijuma bez ikakve tendencije reimplantacije na okolno tkivo i da

bivaju brzo dezintegrirani (u okviru 30-60 minuta), zbog čega Markee zaključuje da odbačeni endometrijum ne može da bude uzrok peritonealne endometrioze.

Pojava endometrioze epiziotomije posle porodjaja ili prednjeg trbušnog zida, posle ginekoloških operacije, posebno posle carskog reza, podržava mehaničku transplantacionu teoriju jatrogenim putem. Ipak, ova teorija, bez obzira na brojne uspele eksperimente o nastanku endometrioze direktnom transplantacijom u animalnom svetu, ne može objasniti razvoj endometrioze kod osoba koje nisu operisane ili ,pak prisustvo endometrijalnih ognjišta u limfnim čvorovima, bubrezima, mozgu i plućima (20, 21). Čak ni Simpsonova teorija ne može da objasni ovu lokalizaciju endometrioze, tako da i on sam govori o limfogenom i hematogenom putu transmisije, ali ovu teoriju postavlja Halban (22). Po njemu, pojava endometrioze u udaljenim regijama (pleura, umbilikus, retroperitonealni prostor, urinarni trakt, donji ekstremiteti), posledica je nastalih metastaza endometrijalnih ćelija, putem limfe i krvi. U prilog ovoj teoriji idu otkrića izuzetno velike limfogene komunikacije između uterusa, ovarijuma, tuba i pelvičnih i vaginalnih limfnih čvorova, bubrega i umbilikusa (23). Mogućnost ulaska uterušnog sadržaja u vene (trfoblast, amnionksa tečnost, vernix kazeoza) danas je dobro poznat fenomen. Uterusne kontrakcije tokom menstruacije i porodjaja potpomažu ovaj prelaz u uterušne vene, i samo venskim transportom endometrijalnih ćelija mogu se objasniti ognjišta endometrioze u kičmenom stubu (pojava periferne neuralgije, zbog kompresije nervnih korenova), pleuri, parenhimu pluća, jetri, pankreasu, ureterima i kostima. Pored ovih teorija, pojavila se teorija direktnog širenja po kojoj endometrioza nastaje kao posledica direktne invazije ektopičnog endometrijuma kroz mišićni sloj uterusa (24). Cullen, koji je i postavio ovu teoriju, demonstrirao je postojanje direktnog kontakta između glandularnih elemenata adenomioze i uterušnog endometrijuma. Širenje endometrijalnih žlezda i strome, duž mišićnih vlakana i duž limfnih i krvnih sudova, može se samo prihvatiti kao preteča adenomioze, jer do danas nije otkrivena nikakva direktna veza između eutopičnog i ektopičnog endometrijuma, niti bilo kakva povezanost između endometrioze i adenomioze. Ali, invazivna teorija endometrijalnih implanta je dobro poznata. Ona je klinički dokumentovana otkrivanjem invazije implanta kroz zid i u lumen mokraćne bešike, uretera, uretre i creva. Ova osobina endometrioze, progresivnog rasta i širenja, nije otkrivena kod uterušnog (eutopičnog) endometrijuma. Uterotubarna teorija o nastanku endometrioze objavljena je 1939.

Godine, a njeni tvorci su Philip i Huber (25). U osnovi, ona predstavlja kombinaciju teorija direktnog širenja endometrijuma i implantacione teorije. Nastala je posle histološkog otkrića da se endometrijalne ćelije nalaze u lumenu tuba u visokom procentu, u pacijentkinja sa pelvičnom endometriozaom, kod kojih je tuba operativno otklonjena. Mayer postavlja teoriju celomske metaplazije po kojoj je endometrioza posledica metaplazije ćelija pelvičnog peritoneuma (26). Ova dosta atraktivna teorija oslanja se na embriološke studije koje demonstriraju zajedničko poreklo Mullerovih kanala, germinativnog epitela ovarijuma i pelvičnog peritoneuma. Njihov zajednički izvor je epitel celomskog zida (27). Preduslov za održavanje ove teorije je dokazivanje prisustva nediferenciranih ćelija, u germinativnom i peritonealnom epitelu, koje su sposobne za diferencijaciju u endometrijalni epitel, ili pak, sposobnost diferencijacije samog peritonealnog i germinativnog epitela u endometrijum. Originalni Mayerovi radovi sugeriraju da ponovljeni, inflamatorni procesi celomskog epitela, mogu u prisustvu fragmenta menstrualne krvi, indukovati njegovu metaplaziju u endometrilano tkivo (28). Ovom teorijom celomske metaplazije može se objasniti nastajanje endometrioze na svim poznatim lokalizacijama. Ipak, ova teorija nema mnogo pristalica, a ni kompletnog naučnog objašnjenja. Sampsonov odgovor na ovu teoriju je da inflamacija produkuje mesto gde će lakše doći do implantacije menstrualnog detritusa. Ali, iako ova teorija ima malo pristalica, ne može se ni potpuno zanemariti, jer je endometrioza moguća i kod histerektomisanih žena, pa i kod muškaraca pod estrogenom terapijom (29). Indukciona teorija nastanka endometrioze pojavila se 1955. godine, njeni tvorci su Levander i Normann (30). Prema ovoj teoriji, sam endometrijum oslobadja specifičnu supstancu koja aktivira nediferencirane mezenhimske ćelije i izaziva njihovu diferencijaciju u tkivo endometrioze. Ova hipotetička teorija, nadovezuje se na teoriju celomske metaplazije, što ove nediferencirane ćelije trpe metaplaziju, pod uticajem neke supstance ili možda nekih partikula iz uterusnog endometrijuma. Teoriju embrionalnih ostataka postavljaju Von Recklinghausen i Russell, po njoj se implanti endometrioze razvijaju iz zaostalih embrionalnih ostataka Mullerovih i Wolffovih kanala (31, 32). Iako ovu teoriju embriolozi danas odbacuju kao moguću, pojava endometrijuma u hilusu ovarijuma podržava ovu hipotezu razvoja endometrioze. Zbirna teorija o histogenezi endometrioze predstavlja kombinaciju implantacione, vaskularno- limfogeno metastatske teorije i teorije direktnog širenja

endometrijuma, koju postavlja Javert, 1949.godine (33). Prema ovoj teoriji, endometrioza nastaje kao posledica diseminacije i metastaza uterusnog endometrijuma. Ovo širenje se ostvaruje : 1) direktnim širenjem u miometrijum , tubu i okolne organe 2) preko tube i njenog abdominalnog ostijuma 3) implantacijom ćelija po peritoneumu i okolnim organima 4) limfnim putem do regionalnih limfnih žleza i susednih organa 5) hematogenim putem do udaljenih organa (pleura, pluća, bubrezi, skeletni mišići, koža). Iako do sada nije dokazano, autor veruje da i sam ektopični endometrijum može biti sekundarni izvor daljeg širenja, odnosno metastaza (34).Značaj ove teorije je što dozvoljava višestruku histogenezu endometrijalnog tkiva, jer bolest koja se tako različito može manifestovati, najverovatnije i nastaje različitim načinima.

1.3. Etiologija i patofiziologija

Etiologija i patofiziologija endometrioze nisu u potpunosti razjašnjene. Mnoge teorije su prisutne, ali nijedna nije dovoljna da objasni sve aspekte ove zagonetne bolesti. Alternativno objašnjenje je da je endometrioza heterogena, drugim rečima, duboka infiltrativna endometrioza, peritonealna endometrioza, ovarijalna endometrioza predstavljaju različite manifestacije ove bolesti i svaka od njih ima svoju sopstvenu etiologiju.

1.3.1. Peritonealna endometrioza

Peritonealna endometrioza predstavlja lezije rasute po peritoneumu i po površini jajnika. Takve promene mogu se delom objasniti Simpsonovom teorijom retrogradne menstruacije, koja datira iz 1927godine, koja kaže da se menstrualna krv transportuje u peritonealnu šupljinu u retrogradnom pravcu kroz Falopijeve tube. Retrogradna menstruacija predstavlja mehanizam koji objašnjava kako se razvija peritonealna endometrioza. Međutim, većina žena ne razvija peritonealnu endometriozu, iako je retrogradna menstruacija uobičajena pojava. Postoji nekoliko objašnjenja ovog paradoksa, količina menstrualne krvi može biti važan faktor koji utiče na verovatnoću razvoja endometrioze, kao i dužina trajanja menstruacije. Faktori koji

utiču na adhezivnost, implantaciju i proliferaciju endometrijalnog tkiva su veoma različiti kod različitih pacijentkinja.

Ćelijski adhezivni molekuli su medijatori u početnom vezivanju endometrijalnog tkiva za površinu peritoneuma, preko oba intracelularnog i ekstracelularnog matrixa, mada tačna priroda ovih procesa nije u potpunosti razjašnjena. Na primer, površni ćelijski glikoproteini, koji pripadaju ekstracelularnom matriksu (ECM) različito su izraženi u eutopičnom endometrijum i u endometrijalnom tkivu (35, 36). $\alpha 3$ i $\alpha 6$ integrini su pokazali aberantnu ekspresiju u endometrijalnom tkivu (37). Slično, ekspresija epitelijalnog (E) cadherina, Ca zavisnog ćelija-ćelija adhezivnog molekula koji deluje kao supresor u malignom tkivu (37), smanjena je u endometrijalnom tkivu u odnosu na eutopični endometrijum (38).

In vitro istraživanja potvrđuju da invazivno endometrijalno tkivo ima smanjen nivo E-cadherina (39). Dakle, povećana invazivnost endometriotičnog tkiva može biti posredovana smanjenom ekspresijom E-cadherina, kroz delovanje trenutno nepoznatog termički stabilnog proteina peritonealne tečnosti (40). Međućelijski adhezivni molekul (ICAM-1) igra važnu ulogu u patogenezi endometrioze. ICAM-1 je glikoprotein ćelijske membrane koji omogućava adheziju u imunološkim i upalnim procesima, utiče i na aktivnost NK ćelija (41). Nivo ICAM-1 u peritonealnoj tečnosti je visok kod pacijentkinja sa endometriozom (42).

1.3.2. Ovarijalna endometrioza

Patogeneza ovarijalne endometrioze je kontraverzna, postoje tri teorije koje nastoje da objasne kako ovaj oblik endometrioze nastaje. Prva hipoteza navodi da se površne lezije za kortexa jajnika invertuju i dolazi do njihove invaginacije, prema drugoj teoriji endometrioza nastaje od funkcionalnih cista jajnika ili metaplazijom od celomskog epitela koji pokriva jajnik.

Hughesdon je predložio prvu hipotezu 1957 godine (52). Nakon analize serijskih preseka jajnika koji je zahvaćen endometriozom, on je zaključio da su iste nastale invaginacijom od cortexa, nakon menstrualnih ostataka sa površine jajnika

(retrogradnom menstruacijom) koji su bili nagomilani na ovarijalnoj površini. Dokazi koji podržavaju ovu teoriju potiču iz rada Brosensa i saradnika, koji su koristili ovarioskopiju za inspekciju i biopsiju ovarijalne endometrioze (36). Njihova studija je potvrdila da su u većini slučajeva endometriomi formirani invaginacijom cortexa i da se aktivni implantati nalaze na mestima invaginacije. Teorija je takodje u skladu sa tvrdnjom o bočnoj asimetriji ovarijalne endometrioze, endometriotične ciste se znatno češće javljaju na levoj nego na desnoj strani (53), što je u skladu sa anatomijom male karlice. Kolon descendens, levi jajovod i janik su znatno češće fiksirani adhezijama za karlicu, što ometa protok retrogradne menstruacije i time doprinose da se ćelije endometrijuma više adheriraju, implantiraju i proliferišu u levoj polovini karlice. Ovu tvrdnju podržava i činjenica da se neendometriotične ciste sa podjednakom učestalošću javljaju na levoj i desnoj strani karlice.

Medjutim, pojava endometrioze kod pacijentkinja sa Rokitansky-Kuster-Hauser sindromom je u potpunosti u skladu sa Hughesdon-ovom teorijom, obzirom da pacijentkinje bez materice ne mogu imati retrogradnu menstruaciju (54).

Postoji teorija koja navodi da mezotelijum ovarijuma invaginacijom formira mezotelijalne inkluzije, metaplastični proces koji se onda događa rezultira formiranjem endometrioze (55). Svakako je izvodljivo da se invaginacija može formirati unutar ovarijalnog endometrioma kroz metaplastični proces i ona se mnogo ne razlikuje od one koju je predložio Majer 1919. godine (56).

Neka od zapažanja koja podržavaju teoriju da je mezotelijum koji pokriva ovarijum dokazan u invaginacijama cortex-a (57) i da su epitelne invaginacije u kontinuitetu sa endometrijalnim tkivom (58) i da zid endometrioma može sekundarno invaginirati u cortex jajnika (59).

Iako, generalno priznata kao benigna bolest, endometrioza ima dosta zajedničkih karakteristika sa neoplazmama, kao što su klonske proliferacije (60, 63). Bolest je takodje povezana sa podtipovima ovarijalnih maligniteta, kao što su endometrioidni i svetloćelijski carcinom. Genetske promene u endometrijalnom tkivu su opisane kao gubitak heterozigota (LOH) studija (64, 67) i korišćenje komparativne genomske hibridizacije (CGH) i fluorescencije u situ hibridizaciji (FISH) (68, 70).

Naročito uključuje hromozomske regione koji sadrže poznate tobožnje supresore gena (TSGs), prethodno implicirane u ovarijalni karcinom, kao što su 1q21, 9p21 i 17p13 (45).

1.3.3. Duboka infiltrativna endometrioza

Duboka infiltrativna endometrioza rektovaginalnog septuma je prvi put opisana do strane Sampsona 1922. godine (70). Od tada su se pojavile tri teorije koje su pokušavale da objasne nastanak ovog oblika endometrioze. Prve dve hipoteze ukazuju da takve lezije nastaju sekundarnom infiltracijom (45) peritonealne endometrioze ili uterine adenomioze(46), treća teorija ukazuje da nastaju kao rezultat metaplastičnog procesa.

Kuplen je prvi izneo da rektovaginalna endometrioza nastaje kao posledica direktnog produžetka donje uterine adenomioze u rektovaginalni septum (70). Međutim, Brosens tvrdi da nema dokaza da adenomiotične lezije mogu progredirati i steći invazivni fenotip. Iako postoje in vitro dokazi da endometriotične ćelije imaju invazivni potencijal, endometrioza nikada ne napada stromu ovarijuma i masno tkivo u retroperitonealnom prostoru (71). S druge strane Verceplini i saradnici zaključuju, na osnovu činjenice da je dubina Douglasovog prostora smanjena kod pacijentkinja sa dubokom infiltrativnom endometriozom, lezije se ne razvijaju u rektovaginalnom septumu, već intraperitonealno i to priraslice prednjeg zida rektuma stvaraju lažno dno što odaje pogrešan utisak (70).

Donnez i sar. su poredili histološki izgled endometriotičnih čvorova uzetih iz rektovaginalnog septuma sa crnim peritonealnim lezijama (71). Endometrijalni čvorovi se sastoje od glatkog mišića (37), endometrijalnih žlezda i oskudne strome, pri čemu su sugerisali da stroma nije iz žlezdanog epitela i da ima invazivni potencijal. Oni su zaključili da se rektovaginalne endometriotične promene mogu smatrati adenomiozom t.j. detaljno su opisani kao nodularni agregati hiperplastičnog glatkog mišića i žlezdanih elemenata, i da kao takvi predstavljaju drugačiji entitet peritonealne lezije i verovatno proizilaze iz metaplazije Mullerovih ostataka.

Na kraju Koninckx i Martin su predložili da duboka infiltrativna endometrioza treba da bude podeljena u tri oblika:

tip I (konusne lezije koje svojim većim delom eksponirane u peritonealnu šupljinu) proizilaze iz infiltracije površne endometrioze

tip II (priraslice pokrivaju duboke lezije) uzrokovane retrakcijom

tip III (lezije koje su svojom većom površinom ispod peritonealne šupljine) zbog lokalne metaplazije (72).

1.3.4. Implantacija i invazija

Tokom poslednje decenije biohemiskim putem otkriven je veliki broj adhezivnih proteina i proteoglikana, proteolitičkih enzima za koje se može smatrati da učestvuju u procesu implantacije i invazije endometrijalnog tkiva. Među ovim makromolekulama, Laminin i Fibronektin su dva glavna adhezivna glikoproteina i imaju ključnu ulogu u vezivanju epitelnih ćelija za bazalnu membranu i stromu ćelija u intersticijalnom matrixu (75). Da bi duboko prodrle u tkivo domaćina, epitelne ćelije endometrijuma se moraju odvojiti od susednih za koje su povezane putem kadherina. Kadherin predstavlja kalcijum zavisne transmembranske molekule koje omogućavaju ćelija-ćelija interakciju(75). Kada je došlo do adhezije, lokalna degradacija ekstracelularnog matrixa (ECM) proteolitičkom digestijom je neophodna za uspešnu implantaciju. Dve grupe proteolitičkih enzima se smatraju odgovornim za degradaciju ECM, koji se sastoji od kolagena i glikoproteina kao što su fibronektin i laminin: serum proteaza i metaloproteaza matriksa (MMP).

Matriks metaloproteinaza (MMP) predstavlja porodicu endopeptidaza koje igraju glavnu ulogu u degradaciji i prometu ECM proteina. MMP ekspresija je u porastu u eutopičnom endometrijumu tokom menstruacije i može potencirati adheziju ćelija endometrijuma izlivenih u peritonealnu šupljinu (43). Ekspresija MMP je takodje povišena u crvenim endometriotičnim lezijama nezavisno od faze menstruacionog ciklusa (44). Sve ovo navodi na zaključak da su proteolitički enzimi važni sa pospešivanje invazije endometrijalnog tkiva koje je već adherirano za peritoneum (45).

Ekspresiju MMP kontroliše više faktora uključujući specifične tkivne inhibitore metaloproteinaze (TIMPs) (76), medijatore zapaljenja i hormone. Progesteron pospešuje stvaranje MMP, a estrogen održava (35).

Poremećeni imunološki mehanizmi su odgovorni za klirens menstruacionog preliva u peritonealnu šupljinu i oni povećavaju verovatnoću implantacije ćelija endometrijuma. Na primer, Oosterlynk i sar. su pokazali da postoji smanjena citotoksičnost ćelija endometrijuma kod žena sa endometriozaom zbog defekta u NK aktivnosti (45) i delimične otpornosti endometrijuma na NK citotoksičnost (46). Medjutim, ostaje nejasno da li je takav imuni sistem uzrok ili posledica bolesti. Uloga imunih ćelija i izlučivanje njihovih produkata u peritonealnu tečnost, perifernu krv i endometrioidno tkivo se intenzivno istražuje. Povećane koncentracija leukocita se nalaze u peritonealnoj tečnosti kod žena obolelih od endometrioze naročito u stadijumu I-II bolesti (47). Koncentracije makrofaga, T helper limfocita i ćelija prirodnih ubica (NK) su povišene u poredjenju sa grupom fertilnih pacijentkinja, iako se slične vrednosti javljaju kod pacijentkinja sa neobjašnjivim sterilitetom (47). Koncentracija makrofaga u peritonealnoj tečnosti žena obolelih od endometrioze je veća od bilo koje druge vrste ćelija, verovatno kao rezultat povećanih vrednosti chemotatic agenasa kao što su monocyte chemotatic protein 1 (MCP-1) i RANTES (before regulated upon activation normal T cell expressed and secreted) (48). Iako se povećava broj ćelija, to izgleda ne olakšava čišćenje endometrijalnog tkiva iz peritonealne šupljine, nego lučenje supstanci makrofaga doprinosi opstanku ektopičnog endometrijuma. Ovi faktori uključuju citokine kao što su IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alfa (TNF a) i faktore rasta i angiogeneze (49). Endometrijalni implantati mogu biti indukovani da luče supstance kao što su IL-6 i vascular endothelial grownth factor (VEGF), koji promovišu sopstveni opstanak, održavanjem obimnog dotoka krvi kako unutar tako i oko ektopičnog endometrijalnog tkiva (50). Ostali izvori VEGF uključuju peritonealnu tečnost, makrofage i eutopični endometrijum (50). Žene sa endometriozaom izgleda da imaju veću učestalost nekih autoimunih bolesti kao što su reumatoidni artritis, SLE i Sjognerov sindrom (51). Medjutim, neizvesno je u kojoj meri ovi nalazi ukazuju na to da je i sama endometrioza autoimuna bolest.

1.3.5. Angiogeneza

Kada je završen proces implantacije, dalji rast lezija zavisi od formiranja novih kapilara. Zaista, formiranje novih kapilara i snabdevanje krvlju je od suštinskog značaja za opstanak implantata i razvoj endometrioze. Angiogeneza je složen proces koji uključuje veliki broj različitih funkcija: proliferaciju, migraciju i adherenciju endotelnih ćelija za EMC, remodeliranje matriksa i formiranje lumena (77). Rastvorljive supstance uključene u proces angiogeneze su otkrivene u peritonealnoj tečnosti pacijentkinja sa endometriozom (78,79). Ovi angiogeni faktori mogu biti proizvedeni od strane peritonealnih makrofaga, endometrijalnih ćelija retrogradne menstruacije i/ili od strane ektopičnih endometriotičnih lezija (80). Nekoliko angiogenih faktora su identifikovani uključujući kisele i bazne faktore rasta fibroblasta (FGFa, FGFb), izolovani iz trombocita endotelijalnih ćelija. Identifikovani su i faktori rasta (PD-ECGF), TGF-a, TGF-b, TNF-a i VEGF (77).

VEGF predstavlja multifunkcionalnu porodicu citokina koji imaju ekspresiju u epitelnim i mezenhimalnim ćelijama u širokom spektru tkiva i u mnogim tumorima. Angiogenske aktivnosti VEGF se odvijaju posredstvom dva tipa ćelijskih receptora VEGF-R1 i VEGF-R2 (81). VEGF je imunohistohemijskim putem otkriven u epitelu endometriotičnih implanta, naročito u crvenim peritonealnim lezijama (82). Štaviše, VEGF, pored toga što učestvuje u angiogenezi, izaziva i povećanu propustljivost kapilarne mreže, što dovodi do curenja fibrinskih produkata u ekstracelularni prostor, što će povećati regrutovanje makrofaga i njihovu sekreciju TNF-a (77).

1.3.6. Apoptoza

Sposobnost endometriotičnih ćelija da proliferišu determinisana je ne samo stopom ćelijske proliferacije, već i stopom ćelijskog osipanja. Programirana ćelijska smrt t.j. apoptoza predstavlja glavni izvor iscrpljivanja.

Apoptoza, proces programirane ćelijske smrti, podrazumeva niz kompleksnih signalnih puteva i brojne kaskade molekularnih zbivanja. Ovaj proces je neophodan za pravilan embrionalni i fetalni razvoj, prilikom koga se dešava destrukcija i rekonstrukcija ćelijskih struktura. Kod odraslih, apoptoza je neophodna za održavanje diferenciranih tkiva, te se tako pronalazi ravnoteže između proliferacije ćelija i ćelijske smrti. Poznato je da intracelularni proteini-kaspaze degradiraju ćelijski sadržaj proteolizom, i to nakon aktivacije određenog puta programirane ćelijske smrti.

Kod ćelija sisara postoje dva glavna puta koja dovode do apoptoze.

a. SPOLJAŠNJI PUT- Iniciran od strane spoljašnjih liganada, njihovim vezivanjem za receptore-ubice na površini ćelije. Primer za ovo je vezivanje TNF-alfa (tumor nekroza faktora alfa) za TNF-alfa receptore. Aktivacija inicijalnih kaspaza pokreće nishodnu kaskadu događaja koji rezultiraju indukcijom efektorskih kaspaza koje funkcionišu u apoptozi (122, 124).

b. UNUTRAŠNJI PUT- Ovaj put se pokreće intracelularnim stimulansima. On je usmeren na otkrivanje nepravilnog funkcionisanja mitohondrija u ćeliji, kao rezultat toga, aktiviraju se signalni putevi da se izvrši samoubistvo ćelije. Membranska propustljivost mitohondrija se povećava i određeni proteini se oslobađaju u citoplazmu i tako se olakšava aktivacija inicijalnih kaspaza. Važan protein koji izlazi iz mitohondrija je CitohromC. CitohromC se vezuje za Apaf-1 u citosolu i postiže aktivaciju inicijalne kaspaze 9. Aktivacija inicijalne kaspaze 9 pokreće nishodnu kaskadu događaja koji rezultiraju indukcijom efektorskih kaspaza koje funkcionišu u apoptozi.(125, 126).

Survivin inhibiše apoptozu tako što se direktno vezuje za kaspazu i tako inhibira njenu enzimsku aktivnost.

Normalne ćelije zahtevaju mitogeni signal rasta za umnožavanje. Ovi signali se prenose do ćelija transmembranskim ili nuklearnim-citosolnim receptorima koji vezuje različite klase signalnih molekula: faktori rasta, ECM komponente, steroidi i cell-to-cell adhezivne molekule. Višestruki antiproliferativni signali postoje da bi održavali ćelije u stanju mirovanja i da bi regulisali tkivnu homeostazu. Signali

obuhvataju rastvorljive inhibitore rasta i imobilisane inhibitore ugrađene u ECM i na površini ćelije.

1.3.7. Inflamatorni citokini

Makrofage, koje čine dominantne ćelije u peritonealnoj tečnosti su uključeni u fagocitozu i pokretanje inflamatornih procesa. Peritonealna tečnost kod pacijentkinja sa endometriozom sadrži visok nivo peritonealnih makrofaga i inflamatornih citokina. Ovako aktivirane peritonealne makrofage kao i endometriotične ćelije luče različite citokine IL1, IL8, TNF-alfa. Povišena koncentracija TNF-alfa u peritonealnoj tečnosti pacijentkinja sa endometriozom u odnosu na kontrolnu grupu sugerije da ovaj citokin doprinosi i favorizuje implantaciju endometrijuma na peritonealnu površinu. TNF –alfa proinflamatorni citokin, aktivira inflamatorne leukocite i makrofage da proizvode druge citokine IL1, IL8, TNF-alfa.

In vitro proizvodnja sekretornih produkata makrofaga kao što su IL8, IL6 takodje je opisana kod pacijentkinja sa endometriozom (95, 96, 97, 98). Takodje postoji i korelacija izmedju koncentracije IL8 u peritonealnoj tečnosti i stadijuma endometrioze. Brojna istraživanja pokazuju da je IL8 važan angiogeni faktor koji promovise neovaskularizaciju i proliferaciju vanmateričnih endometrijalnih implanta (95). IL8 je hemotraktor (chemoattractor) i aktivator neutrofila, a ujedno i angiogeni agent. Potencijalni izvori IL8 koji doprinose njegovoj visokoj koncentraciji u peritonealnoj tečnosti kod pacijentkinja sa endometriozom su ćelije endometrijuma, mezotelne ćelije i peritonealne makrofage (96, 97). Nedavno je pokazano da IL8 povećava aktivnost MMP 2 i 9 kao i invazivni kapacitet ćelija endometrijuma u kulturi, to ukazuje da IL8 ima ključnu ulogu u patogenezi endometrioze (99).

Produkti makrofaga IL-1b i TNFalfa stimulišu epitelne ćelije endometrijuma, ćelije mezotela i endometriotične ćelije da proizvode protein hemotaksije monocita (MCP-1), proinflamatornih i angiogenih citokina (100). Pacijentkinje sa endometriozom imaju povećane koncentracije MCP-1 u poredjenju sa zdravim pacijentkinjama (97). Peritonealne makrofage pacijentkinja sa endometriozom pokazuju povećanu sposobnost

za izlučivanje MCP-1 i tendenciju za povećanje sekrecije faktora inhibicije migracije makrofaga (MIF) u poredjenju sa zdravim (101).

MIF može igrati ulogu u aktiviranju i zadržavanju peritonealnih makrofaga i u aktivaciji T limfocita. Štaviše, MIF može također da stimuliše proliferaciju endotelijalnih ćelija *in vitro* i da indukuje angiogenezu *in vivo*. MIF je izražen u žlezdanim epitelnim ćelijama, endotelijalnim ćelijama, makrofagama, T -limfocitima i stromi. Koncentracija MIF-a je daleko veća u crvenim lezijama u odnosu na crne i bele lezije (102). Ovo ukazuje da MIF igra značajnu ulogu u angiogenezi i u inflamatornim procesima (102). Leukociti i makrofage su akumulirani u ektopičnom endometriju i luče citokine (IL1, IL 6, IL8, TNF-alfa i RANTES).

RANTES (regulisan nakon aktivacije normalnih T ćelija izražen i sekretovan) je proizvod T limfocita uključen u zapošljavanju i aktivaciji makrofaga. Dokazane su povećane koncentracije RANTES-a u peritonealnoj tečnosti pacijentkinja sa endometriozom (102).

Estrogeni

Estrogeni regulišu rast, diferencijaciju i funkciju eutopičnog endometrijuma. Estrogeni receptori ERa i ERb imaju ključnu ulogu u regulaciji rasta eutopičnog endometrijuma. Iako su prisutne obe forme receptora ERa i ERb, dominantnija je ekspresija ERa (83). Matzuzain i sar. su poredili nivo m RNA za ERa i Erb i došli do zaključka da eutopični endometrijum i endometriotične lezije imaju viši nivo ERa nego Erb (84). Nivo mRNA ERa je značajno veći od nivoa mRNA ERb u crvenim u odnosu na crne peritonealne lezije i u odnosu na endometriotične ciste jajnika(84).

Varijacije u nivoima enzima uključenih u lokalnu steroidogenezu prilikom proizvodnje etrogena u endometriotičnim implantima je nazavisan od nivoa estrogena u plazmi. Konverzija androstenediona i testosterona u estron i estradiol je katalizovana aromatazom koja je prisutna u humanim tkivima i ćelijama (granulosa ćelije jajnika, sinciciotrofoblast placentе, adipociti, fibroblasti, koža i mozak) (85). Aromatazna aktivnost je odsutna u normalnom endometriju, ali zato postoji u stromi i ćelijama

endometriotičnih lezija, rezultirajući u većoj lokalnoj proizvodnji estradiola (86, 87). Novi dokazi ukazuju također da prostaglandini E2 (PGE2) mogu regulisati ekspresiju aromataze u endometriotičnim lezijama (88).

Progesteron

Mnogobrojne studije su poredile hormonski indukovane promene u eutopičnom i ektopičnom endometrijumu i došle do zaključka da nisu u korelaciji. Tokom lutealne faze, ektopični endometrijum ne pokazuje morfološki sekretorne promene, mitoze su i dalje prisutne i to je sugerisalo da je hormonska nezavisnost udružena sa prisustvom progesteronskih receptora (PR) koji su biološki inaktivni (89, 90).

1.4. Simptomi endometrioze

Endometriozna je bolest koja napreduje, što pojačava simptome. Ipak postoji znatno kašnjenje, 8 do 9 godina od pojave prvih simptoma do dijagnoze i početka lečenja. Bolest se pojavljuje u dvadesetim godinama i traje oko 25 godina. Retka je u stanjima u kojima su niski estrogeni-premenarhalno i postmenopauzalno. Prevalenca endometrioze je 3-4% žena. Današnja dijagnostika je ozbiljnija, preciznija, te se stiče utisak o pojavljivanju endometrioze u ranijoj životnoj dobi (137, 138, 139). Prema studiji Endometriosis Association (AE) čak 38% devojaka sa ranom endometriozom beleže prve simptome i pre 15. godine života (136). Kod 95% pacijentkinja bol je redovan simptom endometrioze. Simptomi endometrioze su najčešće ciklični, ali nisu prediktivni i ekskluzivni. Prikaz simptoma i njihove učestalosti (103, 104, 137) :

- CPP 95%
- dismenoreja 95%
- umor, iscrpljenost 87%
- dispareunija 64 %
- bolovi creva prilikom stolice (dyscezia) 80%
- obilne menstruacije, krvavljenja 65%

- bolna ovulacija 50%
- nadutost 70-80%
- neplodnost 20- 30%
- mučnine, glavobolje 50-60%

Oko 10% žena sa endometriozom nema simptome (104, 136, 140)

1.4.1. Bol

Glavni simptom endometrioze je rekurentni bol u maloj karlici. Bol može da varira od blagih do ozbiljnih grčeva koji se javljaju na obe strane karlice, u donjem delu ledja, u predelu rektuma, čak i da se propagiraju niz nogu. Intenzitet bola koji žena oseća slabo korelira sa stepenom ili fazom endometrioze (141,143), tako da pacijentkinje sa ozbiljnom endometriozom mogu osećati slab ili nikakav bol, kao i pacijentkinje sa diskretnijm endometriotičnim promenama mogu osećati izuzetno jake bolove.

Bol kod endometrioze može biti ispoljen kao:

- dismenoreja (bolne menstruacije)
- hroničan bol u maloj karlici CPP
- dispareunija (bolni odnosi)
- dizurija (bolno mokrenje)

Endometriotične lezije reaguju na hormonske stimulacije i mogu da „krvare“ za vreme menstruacije. Krv se lokalno akumulira, izaziva oticanje i inflamatorne odgovore uz aktivaciju citokina (142). Ovaj proces može da izazove bol. Bol može da se javi i od priraslica (unutrašnji ožiljak) organa u maloj kalrici, pri čemu može doći i do

njihove dislokacije. Jajnik, jajovod, materica, bešika i rektum mogu biti povezani priraslicama i tako prouzrokovati bolove nezavisno od menstruacije.

1.4.2. Neplodnost

Endometrioza je jedan od najčešćih uzroka infertiliteta mladih žena. Prema najnovijim podacima, fertilitet je prisutan kod 20-30% pacijentkinja obolelih od endometrioze (103). Mehanizam nastanka infertiliteta kod endometrioze još uvek nije u potpunosti razjašnjen, postoje mnogobrojna saopštenja koja su često kontraverzna. Danas dominiraju dva stava. Jedan se oslanja na mehanički uzrok, koji sprečava nastanak koncepcije, dok drugi stav podrazumeva mnogobrojne nedovoljno razjašnjene biohemijske mehanizme, kojima se tumači infertilitet kod blagih oblika endometrioze.

Mehanički uzrok neplodnosti

Kada je endometrioza toliko razvijena da izaziva tubarnu opstrukciju ili pelvične adhezije, uzrok infertiliteta je jasan. Tada dolazi do mehaničkog sprečavanja kontakta između ovuluma i spermatozoida. Okluzija tuba je relevantan mehanički faktor infertiliteta i dokazuje se histerosalpingografijom i laparoskopijom. U najvećem broju slučajeva, okluzija zahvata intramuralne segmente tuba. Ova intramuralna opstrukcija najčešće nastaje kao posledica hiperplazije i polipozne transformacije endometrijuma u regionu intersticijalnog segmenta. Primenom medikamentoznih sredstava, odnosno izazivanjem ovarijalne supresije, nastaje posledična amenoreja sa zaustavljanjem endometrijalne proliferacije i izazivanjem njegove regresije, odnosno atrofije. Na ovaj način se kod izvesnog broja pacijentkinja može postići željena pasaža tuba (144).

Funkcionalna neplodnost

Do danas su učinjeni mnogobrojni eksperimentalni radovi i publikovane mnogobrojne kliničke studije, koje su imale za cilj objašnjenje infertiliteta kod endometrioze pomoću biohemijskih poremećaja. Zbog tih biohemijskih promena

nastaju poremećaji u ovularnom oslobadjanju, ovularnom transportu, funkciji korpusa luteuma, implantaciji i motilitetu spermatozoida. Posebna pažnja je posvećena prostaglandinima, za koje se smatra da imaju važnu ulogu u nastanku ovih poremećaja. Velika količina ovih hormona otkrivena je u sekretornom endometriju (145, 146).

Jordan i Pokoly prvi otkrivaju povezanost između nivoa estradiola i progesterona u venskim sudovima uterusa i nivoa prostaglandina u endometrijalnim ćelijama (147). Oni su otkrili direktnu povezanost između estradiola i prostaglandina, dok su posebno visoke vrednosti prostaglandina otkrivene samo u prisustvu progesterona. Njihov zaključak je da tokom menstrualnog ciklusa estradiol povećava sintezu prostaglandina u endometrijalnom tkivu, a progesteron povećava njegovo nagomilavanje i deponovanje. Kada progesteronski nivo padne, prostaglandini se oslobadaju iz ćelija, izazivajući, sa jedne strane vazospazam, odnosno hipoksiju tkiva (što dovodi do desktrukcije i odvajanja tkiva), a sa druge strane materične kontrakcije. Izvesna količina prostaglandina je neophodna sa oslobadjanje jajne ćelije, za njen transport, za tubarni motilitet, za steroidogenezu, za relaksaciju i kontraktilnost uterusa, kao i za normalan motilitet spermatozoida. Zato izmenjen nivo prostaglandina dovodi do poremećaja u svim ovim sistemima. Wilman i saradnici prvi saopštavaju da se srednje vrednosti koncentracije pojedinih prostaglandina povećane u endometriju pacijentkinja sa endometrioza (148).

Poremećaji oslobadjanja jajne ćelije

Jedan od uzroka infertiliteta je luteinizacija folikula bez oslobadjanja jajne ćelije. Danas je dokazano da nivoi prostaglandina rastu tokom maturacije folikula i da je sam proces ovulacije zavistan od prostaglandinske stimulacije. Ti prostaglandini se stvaraju u rastućem folikulu pod dejstvom luteinizirajućeg hormona (LH) (149) i oni su odgovorni za incijalne kontrakcije u folikularnom zidu (150). Brojni eksperimenti i klinička istraživanja ukazali su na izvesnu povezanost između luteinizirajućeg nerupturiranog folikula (LUF) i endometrioze. Tako, na primer, Brosens sa saradnicima radio je laparoskopiju u lutealnoj fazi, pacijentkinjama sa endometrioza i bez nje. U

grupi pacijentkinja bez endometrioze kod njih 94% otkrivena je stigma, dok u grupi pacijentkinja sa endometriozom, stigma je vidjena kod njih 21% (151). Iako je prvi zaključak bio da kod endometrioze postoji neki dodatni faktor koji remeti proces ovulacije, pojavila su se i mišljenja da je pogrešno na osnovu laparoskopskog nalaza odsustva stigme isključiti mogućnost ostvarene ovulacije.

Promena ovularnog transporta

Postoji mišljenje da endometrioza utiče na ovulatorni transport (153). Croxatto sa saradnicima je demonstrirao da ovuum posle ulaska u tubu ostaje 72 sata u ampularnom segmentu, odakle stiže u endometrijalnu šupljinu materice oko 80-og sata od trenutka ovulacije (153, 154). Prostaglandini stvoreni u ektopičnom endometriju utiču na uterotubarni mehanizam, izazivajući njegovu hiperaktivnost. Tako, konceptus stiže do endometrijuma pre nego što je pripremljen za nidaciju. Istovremeno i sam konceptus nije dostigao stepen zrelosti koji mu omogućava uranjanje i preživljavanje u endometriju.

Izmenjena funkcija korpusa luteuma

Već odavno se zna da postoji lokalni feedback mehanizam između peritonealne tečnosti i ovarijuma, odnosno rastućeg folikula. Maathuis i saradnici su prvi otkrili da volumen i steroidna koncentracija peritonealne tečnosti utiču na cikličnu ovarijalnu aktivnost (155). Tako promena volumena i koncentracije prostaglandina može uticati na funkciju korpusa luteuma. Brosens i saradnici navode da je interval između pika LH i trenutka nastajanja menstruacije kraći u grupi pacijentkinja sa endometriozom nego u kontrolnoj grupi (151). Varijabilnost u dužini trajanja luteinske faze I kašnjenje u podizanju vrednosti progesterona, kod pacijentkinja sa endometriozom, ukazuje na izvesnu povezanost između oboljenja i funkcije korpusa luteuma.

Promene u implantaciji

Mnoge studije su pokazale da postoji duboka biohemijska abnormalnost u eutopičnom endometriju pacijentkinja sa endometriozom (134). Prema pojedinim istraživačima, prostaglandini mogu sprečiti implantaciju blastociste, izazivajući hiperkontraktilnost uterusa. Poznato je da se uterusi prostaglandini uglavnom stvaraju u endometriju (156). Povišen nivo ovih hormona nadjen je u menstrualnoj krvi pacijentkinja sa dismenorejom (148). Objavljen je veliki broj radova koji potvrđuju efikasnost davanja nesteroidnih inflamatornih lekova kod pacijentkinja sa dismenorejom, ali još uvek naučno nije dokazano da li davanje prostaglandina u humanoj populaciji može sprečiti nidaciju blastociste.

Ispitjuću uzroke muškog infertiliteta, došlo se do zaključka da postoji upadljiva povezanost između smanjenog nivoa prostaglandina (PGE) semene tečnosti i nerazjašnjenog infertiliteta (157).

Evidentno je da prostaglandini imaju ulogu u nastanku muškog i ženskog infertiliteta, mada tačan mehanizam njihovog patofiziološkog delovanja nije u potpunosti razjašnjen. Promenjene vrednosti prostaglandina intrauterino i intraperitonealno, kod endometrioze, verovatno da imaju svoj efekat na motilitet spermatozoida, njihovu kapacitaciju i sposobnost imopregnacije.

Uloga makrofaga

Kada se govori o intraperitonealnim vrednostima prostaglandina, teško je ne pomenuti još jedan mogući njihov izvor, a to su makrofagi. Peritonealni inflamatorni odgovor na endometriotična žarišta jeste izazivanje okolnog vazospazma s povećanjem koncentracije limfocita i makrofaga. Te makrofage pokazuju pojačanu aktivnost, koja se ogleda u stvaranju znatne količine prostaglandina i drugih faktora, koji prave neadekvatnu peritonealnu sredinu i za ovocite i za spermatozoide. Istovremeno, oni pokazuju pojačanu fagocitozu prema spermatozoidima. S obzirom na njihov povećan broj i na njihovu povećanu aktivnost kod endometrioze uloga makrofaga se ne može isključiti iz mehanizma nastanka infertiliteta.

Uloga endometrioze u nastanku infertiliteta, osim u slučajevima postojanja mehaničke prepreke, u potpunosti nije razjašnjena. Budući da neke žene sa ovim oboljenjem, koncipiraju bez ikakvih teškoća, a druge sa endometriozom su infertilne, jasno je da ne postoji jedinstveno objašnjenje za sve slučajeve infertiliteta. Zato nastaju pretpostavke i teorije koje stimulišu dalji rad i istraživanja.

1.5. Dijagnostika endometrioze

Dijagnostika endometrioze je veoma delikatna i složena i postavlja se kombinacijom sledećih nalaza (103,104,105):

- iscrpna anamneza
- pregled (osetljivost u celoj karlici, fiksirana RVF, osetljivi uterosakralni ligamenti, čvorovi na vagini i cerviksu, vaginalni i rektalni pregled daju više podataka u vreme menstruacije)
- laboratorijska pretraga
- vizuelna pretraga:

a. UZ pregled b.kolonoskopija c.cistoskopija d.magnetna rezonanca e.laparoskopija

„Zlatni standard“ za konačnu dijagnozu jeste laparoskopija sa biopsijom barem jedne lezije i histološkom analizom. Pozitivna histologija potvrđuje dijagnozu, ali je negativna ne isključuje. Ipak laparoskopija je jedina metoda koja dokazuje ili isključuje endometriozu. Potvrđuje dijagnozu u 80% pacijentkinja sa sumnjom na endometriozu. Laparoskopija ima 3% manjih i 1% ozbiljnijih komplikacija(106).

Kao što je dobro poznato laparoskopija predstavlja invazivnu dijagnostičku proceduru, koja podrazumeva uvođenje pacijentkinje u opštu anesteziju, kao i veliko hirurško iskustvo. Zbog svega ovoga značajan broj studija, I kliničkih i bazičnih, fokusiran je na otkrivanju neinvazivnih dijagnostičkih postupaka, koji bi omogućili postavljanje dijagnoze, tako da bi invazivne metode dijagnoze bile rezervisane samo za one pacijente kojima istovremeno treba i operativni tretman (2, 3). Ono što je dobro

poznato, endometrijalna ognjišta (gde god da su) uvek prati izrazita inflamatorna reakcija i neoangiogeneza okolnog tkiva. Zbog toga su koncentracije inflamatornih citokina signifikantno veće kod žena sa endometriozom u odnosu na žene bez endometrioze. Određivanje i visoko senzitivnog CRP i lokalnih hormona rasta, takodje imaju svog opravdanja

1.6. Biomarkeri za endometriozu

Jedan od osnovnih ciljeva kliničkih studija je da se pronađu odgovarajući biohemijski markeri za jednostavnije dijagnostikovanje endometrioze. Idealni serumski markeri za endometriozu trebalo bi da imaju visoku senzitivnost i specifičnost, veliki prognostički značaj, kao i da obezbede dobru korelaciju između njihove koncentracije i ozbiljnosti bolesti. CA 125 ima veoma važnu ulogu u svim sprovedenim statističkim analizama vezanim za neinvazivne markere endometrioze, takodje su aktuelna ispitivanja vezana za CA 19-9 i CEA.

1.6.1. Ca125- karbohidratni antigen 125

CA 125 je protein, površinski ćelijski antigen, član mucinske porodice glikoproteina, kodiran od strane MUC 16 gena, poznat od ranih 80-ih (1). Predstavlja vrlo značajan marker karcinoma jajnika, od koristi je za praćenje uspešnosti terapije karcinoma jajnika kao i za otkrivanje ranih recidiva istog (2, 108). Ovaj parametar pokazuje porast i kod drugih karcinoma kao što su karcinomi endometrijuma, jajovoda, pluća, karcinom dojke i pankreasa (109). Kod zdravih žena koncentracija CA 125 se neznatno povećava za vreme ovulacije i značajno se povećava za vreme menstruacije. Značajno povećanje nivoa CA 125 je primećeno i tokom trudnoće (110, 111).

1.6.2. CEA-karcinoembrionalni antigen

Drugi biomarker endometrioze je CEA. On predstavlja skup jako povezanih glikoproteina koji su uključeni u ćelijske adhezije. CEA se proizvodi u gastrointestinalnom traktu tokom fetalnog razvoja, njegova proizvodnja prestaje pre rođenja tako da je CEA prisutan u jako niskim koncentracijama u krvi zdravih osoba. Međutim, koncentracija CEA se povećavaju u krvi pacijentkinja obolelih od pojedinih vrsta karcinoma, te se CEA može koristiti kao TU marker u kliničkim ispitivanjima. Koncentracije CEA mogu biti povišene i kod dugogodišnjih pušača. Kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom koncentracije CEA su povišene. Određivanje koncentracije CEA se koristi kao TU marker za praćenje tretmana kolorektalnog karcinoma, za identifikaciju recidiva posle hiruške resekcije, za stejdžing ili lokalizaciju širenja karcinoma. Koncentracije CEA mogu biti povišene i kod Ca želuca, Ca pankreasa, Ca pluća, Ca dojke, medulanog Ca štitne žlezde, kao i kod neneoplastičnih bolesti kao što su ulcerozni kolitis, pankreatitis, ciroza jetre, hipotireoidizam (112, 113). Povišene koncentracije CEA treba da se vrate na normalne vrednosti nakon uspešne hiruške resekcije ili nakon uspešnog lečenja. Kod ljudi, CEA antigen porodica se sastoji od 29 gena, od kojih je 18 normalno eksprimovano (114).

1.6.3. CA19-9 Karbohidratni antigen

Karbohidratni antigen 19-9 ili kancer antigen 19-9 ili Levis antigen predstavlja tumorski marker koji se prvenstveno koristi za otkrivanja raka pankreasa (115). Ca 19-9 je otkriven 1981. godine u serumu pacijenata obolelih od Ca debelog creva i Ca pankreasa (116). Kod pacijentkinja sa promenama na pankreasu Ca 19-9 može biti od koristi u diferencijalnoj dijagnostici između Ca pankreasa i drugih bolesti ove žlezde (117). Koncentracija Ca 19-9 može biti povišena i u drugim vrstama Ca digestivnog trakta kao što je kolorektalni Ca, Ca jednjaka, hepatocelularni Ca (115). Osim kod karcinoma, povišene koncentracije Ca 19-9 mogu biti i kod pankreatitisa, ciroze jetre i bolesti žučnih kanala (115,117). Koncentracija Ca19-9 može biti povišena i kod opstrukcije žučnih puteva (117). Kod pacijentkinja koje nemaju Levis antigen, što predstavlja 10% populacije belaca, koncentracija Ca 19-9 je normalna čak i kada postoje veliki tumori (118). Ovo je posledica nedostatka fructosiltransferaze enzima koji je potreban za stvaranje Levis antigena (118).

1.6.4. Survivin

Survivin je protein, član porodice inhibitora apoptoze (IAP), kodiran je od strane BIRC 5 gena, koji se nalazi na 17g25 hromozomu (119). Funkcija Survivina je da inhibira aktivaciju kaspaza, čime dovodi do negativne regulacije apoptoze t.j. programirane ćelijske smrti. Survivin je visoko eksprimovan u većini tumora u ljudskom organizmu i u fetalnim tkivima, ali je njegova ekspresija potpuno odsutna u terminalno diferentovanim ćelijama (120). Ekspresija survivina je izražena samo u G2-M fazi ćelijskog ciklusa. Poznato je da se survivin lokalizuje na mitotskom vretenu putem interakcije sa tubulinom tokom mitoze, i tako može imati značajnu ulogu u regulaciji mitotske aktivnosti. Molekularni mehanizmi regulacije ekspresije survivina još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni, ali se pretpostavlja da su povezani sa proteinom p53 (121).

Značajna funkcija survivina se tokom evolucije nije menjala, očuvana je ista kako kod kičmenjaka tako i kod bezkičmenjaka (122). Prvi članovi familije inhibitora apoptoze otkriveni su kod baculo virusa IAP-s, CP- IAP, OP- IAP, svi oni se vezuju za kaspazu i na taj način doprinose efikasnijoj infekciji i omogućavaju replikaciju u domaćinu (122). Kasnije je otkriveno još pet članova porodice inhibitora apoptoze: XIAP, c-IAP1, C-IAP2, NAIP i survivin. Survivin, kao i ostali je otkriven preko njegove strukturalne homologije sa IAP familijom, kao i humane B ćelije limfoma. Pokazano je da se IAP-s, XIAP, c-IAP1, c-IAP2 vezuju za kaspazu 3 i kaspazu 7, koje predstavljaju efektorske kaspaze u signalnom putu apoptoze (122). Zajednička karakteristika svih članova porodice IAP je prisustvo BIR (Baculovirus IAP repeat, tačnije lanca od 70 aminokiselina) u jednom od tri primerka. Tamm et al. je pokazao da odstranjivanje BIR2 iz XIAP dovodi do gubitka funkcije inhibicije kaspaze, odnosno inhibicije apoptoze. To implicira da je BIR komponenta ustvari odgovorna za anti-apoptičnu funkciju porodice inhibitora apoptoze (IAP). BIR komponenta survivina pokazuje sličnu sekvencu u poredjenju sa BIR komponentom XIAP (122).

Izoforme survivina

U zavisnosti od primarnog transkripta postoje četiri iziforme survivina (123):

- Survivin koji se sastoji od 3 egzona i 4 introna
- Survivin- 2B koji nastaje ubacivanjem alternativnog egzona 2
- Survivin- Delta- Ex-3 koji ima uklonjen egzon3. Uklanjanje egzona 3 rezultira u promeni okvira čitanja i na taj način nastaje jedinstven karboksiterminalni kraj proteina sa novom funkcijom.
- Survivin- 3B koji nastaje ubacivanjem alternativnog egzona 3.

Survivin inhibiše apoptozu tako što se direktno vezuje za kaspazu i tako inhibira njenu enzimsku aktivnost.

1.6.5. VEGF- vascular endotelni faktor rasta

Kao što je dobro poznato, angiogeneza igra ključnu ulogu u ektopičnoj implantaciji endometrijalnog tkiva i u razvoju endometriotičnih lezija (130, 131). Angiogeneza, de novo formiranje kapilara iz već postojećih krvnih sudova, podrazumeva intererakciju velikog broja čvrsto regulisanih molekula uključujući vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) koji se prepoznaje kao ključni angiogeni faktor (131, 132).

VEGF je 23plus minus 45 kDa i predstavlja heparin vezujući glikoprotein endotelnih ćelija sa specifičnom mitogenom i vaskularno-permeabilnom aktivnošću (131). Vezujući se za jedan od nekoliko tirozin-kinaza receptora VEGF izaziva njihovu autofosforilaciju i dovodi do aktivacije mitogen-aktiviranih proteina (131). Otkrivena je ekspresija mRNK za VEGF u endometriotičnim lezijama i dokazano je da je ona veća u crvenim lezijama (aktivne) nego u crnim lezijama (stare), što je povezano sa višim nivoom vaskularizacije u crevnim lezijama (180). Ekspresija mRNK za VEGF je otkrivena u eutopičnom endometrijumumu i ima ulogu u regulaciji krvavljenja tokom ciklusa (180, 181).

1.6.6. Endometrijalni markeri endometrioze

Mnoge studije su pokazale da postoji duboka biohemijska abnormalnost u eutopičnom endometriju pacijentkinja sa endometriozom (134). Komparativna analiza uzoraka endometrijuma između pacijentkinja obolelih od endometrioze i onih bez endometrioze otkriva postojanje mnogobrojnih razlika u ekspresiji citokina, faktora rasta, adhezivnih molekula, proteolitičkih enzima kao i tkivnih inhibitora enzima. Međutim, pokušaji da se ove molekularne razlike iskoriste u dijagnostičke svrhe su bili neuspešni iz nekoliko razloga:

- a) nivo ekspresije gena varira od pojedinca do pojedinca
- b) izgled endometrijuma varira zavisno od faze ciklusa i najzad
- c) gotovo svi faktori endometrijuma određuju se imunobojenjem

Nedavne studije su pokazale da aromataza P 450, enzim koji katalizuje konverziju C19 steroida (androstenedion i testosteron) u estron (E1) je izražen u eutopičnom endometriju pacijentkinja sa endometriozom, ali ne i kod pacijentkinja bez endometrioze (135). Pored toga nivo aromataze P450 i i RNK izgleda da ne zavise od faze ciklusa čineći ga potencijalno „idealnim“ markerom koji ne zahteva kvantitativno i vremensko definisanje biopsije uzorka (135). Kitawaki i sar. su otkrili da se određivanje koncentracije P450 aromataze u uzorku endometrijuma može koristiti kao skrining test za endometriozu, sa osetljivošću i specifičnošću od 91%- 100%.

1.7. Klasifikacija endometrioze

Američko udruženje za reproduktivnu medicinu (American Society for reproductive Medicine-ASRM)-AFS SKOR predložilo je četiri stupnja izraženosti endometrioze (139):

<u>stadijum</u> (bodovi)	<u>obeležja</u> (izražavaju se u bodovima)
I stadijum 0-5 (minimal)	minimalna bolest - nekoliko površinskih lezija
II stad 6-15 (mild)	blaga bolest - veći broj lezija, neke i dublje
III stadij 16-40 (moderate)	srednje izražena - brojne lezije na jajniku, tanke adhezije
IV stadij > 41 (severe)	izražena bolest - brojne lezije, endometriomi, guste priraslice, endometrioza u rektouterinom prostoru.

U nastojanju da se što iscrpnije klasifikuju uznapredovali oblici endometrioze uradjena je revizija AFS skora za duboku endometriozu. Taj ENZIAN skor ocenjuje veličinu (0-3cm) žarišta u rektovaginalnom septumu, ligg sacrouterina, vagini i rektumu. Takodje se ocenjuju i ekstragenitalne lokacije endometrioze, kao i adenomioza. Ta klasifikacija ocenjuje endometriom, veličinu, lokalizaciju po osi i eventualnu obostranost. ENZIAN klasifikacija omogućuje bolju reproducibilnost i uporedivost rezultata lečenja. Prema lokalizaciji koriste se oznake A,B,C, a prema veličini manje od 1 do 3cm.

U pokušaju da se klasifikacija endometrije boduje tako da pomogne oceni plodnosti, nedavno je objavljen Endometriosis fertility index (EFI) koji prilikom operacije predviđa buduću plodnost. Nizak EFI skor (<4) ukazuje na malu verovatnoću postizanja trudnoće nakon operacije. Preporučuje sa da pacijentkinje sa slabijom prognozom šalju na VTO.

Prema Svetskoj metaanalizi postoji znatno kašnjenje u postavljanju dijagnoze. Žene prosečno čekaju 4,5 godina da se dodje do dijagnoze i početka lečenja. Gotovo 20% žena treba konsultovati 5 lekara dok se ne dodje do dijagnoze (104). Lečenje endometrioze, posebno simptoma bolesti, može se započeti i bez definitivne dijagnoze. Takav odabir čest je pri sumnji na adolescentnu endometriozu.

Endometriotične lezije imaju različite oblike (135):

a. Peritonealna endometrioza

- plavo-crvene lezije
- petehijske (crveni implanti)
- smeđe- žute promene
- vezikularne (serozne) promene
- polipoidne promene
- male hemoragične ciste

b. Endometriotične ciste- endometriomi

- nastale invaginacijom
- imaju gust sadržaj i debele priraslice

c. Duboki čvorovi koji prodiru više od 5mm ispod peritoneuma

- prodiru u crevo, mokraćnu bešiku, ureter i vaginu
- dubina invazije utiče na ozbiljnost simptoma
- u 50% slučajeva prate površinske lezije i u 70% endometriome

Endometriomi su čest oblik bolesti i nalazimo ih u 30-40% pacijentkinja sa endometriozom. Nastaju metaplazijom ili ingavinacijom kortexa jajnika nakon ektopične implantacije endometrijuma. U 20- 30% slučajeva su bilateralni. U 80% slučajeva uz endometriozu u stromi jajnika postoje i mikroskopska zarišta endometrioze

(104). Nedvosmislena je pojava estrogene aktivnosti u endometriozii. Poremećena je proizvodnja i metabolizam estrogena koji promovišu bolest, a nivo Er β receptora je stotinu puta veći nego u normalnom endometriju. Lokalni učinak estrogena je višestruk:

- proizvodnja u jajniku- cirkulacija-peritoneum
- proizvodnja u masnom tkivu iz androgena
- stvaranje u endometriotičnom tkivu koje poseduje aromatazu

U endometriotičkom žarištu povišena je aktivnost ciklooksigenaze 2 (COX-2) i aromataze, a snižena aktivnost 17 β hidroksisteroiddehidrogenaze (17 β HSD). Rezultat je visok lokalni estradiol i prostaglandini – PgE2. Povišen nivo PgE2 i PgFa kod pacijentkinja sa endometriozom utiču na upalu i bol (148).

Dokaze o povezanosti hormona i endometrioze predstavljaju sledeći navodi:

- endometriozia je retka i detinjstvu i menopauzi
- retka je i u hipoestrogenim amenorejama
- povoljna su stanja sa visokim progesteronom-trudnoća
- ne postoji kod muškaraca
- endometriotično tkivo ima estrogenske i progesteronske receptore ER i P4R
- povoljan je učinak inhibitora estrogenske aktivnosti- analoga GnRH, inhibitora aromataze, gestagena
- u endometriozii je znatno povišen STEROIDOGENIC FACTOR- I (SF-I) koji stimulira steroidogenezu
- u endometriozii je niža gustina P4R ili je smanjena njihova osetljivost (progesteronska rezistencija)

Prodor endometrijuma kroz endometrijsko-miometrijsku granicu- (EMI) uterusa, stvara mogućnost nastanka endometriotičnih žarišta u dubini miometrijuma. To

se naziva adneomiozom. Taj vid endometrioze je povezan sa obilnim menstauacijama (menoragijom) i neplodnošću i drugačije se naziva unutrašnja endometriozna.

1.8. Terapija endometrioze

Raznolika patogeneza i nepoznata etiologija endometrioze upućuju na brojne mogućnosti lečenja, bez konsenzusa o optimalnom pristupu. Danas je stav individualizirati lečenje. Korisno je svako nastojanje da se spreči napredovanje bolesti, pa makar simptomi nisu naglašeni. Danas se endometriozna ne može izlečiti, zato su glavni ciljevi lečenja:

- smanjiti bol
- ublažiti ostale simptome
- očuvati plodnost
- reducirati lezije
- poboljšati kvalitet života.

Na postoji jedinstveno i najbolje lečenje. Najčešće su opcije hirurško i medikamentozno lečenje i njihova kombinacija. Aktuelne svetske studije preporučuju empirijsko medikamentozno lečenje i bez dokazane endometrioze (158). I pored mnogobrojnih saznanja i dalje ne postoji jedinstven stav o izboru lečenja, ono zavisi od simptoma, znakova i posledica bolesti, kao i od želje za očuvanjem plodnosti (103, 104, 159, 160).

1.8.1. Hiruško lečenje

Hiruško lečenje ima nekoliko mogućnosti:

- ekscizija lezija – endometrioma („striping“)
- ablacija lezija, destrukcija lezija
- rešavanje priraslica
- ventrosuspenzija uterusa
- ablacija živaca (LUNA)
- presakralna neuroektomija

Hiruško lečenje može biti pošteno i radikalno. Najčešći izbor je laparoskopija koja istovremeno omogućava i dijagnozu i operativni tretman. Kod uznapredovale i duboke karlične endometrioze potreban je multidisciplinarni pristup. Nema dokaza da suspenzija uterusa i LUNA imaju povoljan učinak (103, 104). Hiruško lečenje je primarni izbor za pacijentkinje sa endometriomom većim od 3-4cm u promeru, kao i kod pacijentkinja sa uznapredovalom endometriozom (103, 104, 161). U petogodišnjem periodu posle operacije rizik od recidiva je 30-40%, pa gotovo polovina pacijentkinja iziskuje ponovnu operaciju, a 25% pacijentkinja tri ili više hirurških zahvata(162, 163).

1.8.2. Medikamentozno lečenje

Kao što znamo endometrioza je hronična upalna bolest koja napreduje. Retko je asimptomatska, a najčešće dominiraju simptomi kao što su bol, umanjen kvalitet života i neplodnost. Kod pacijentkinja sa jakim dismenorejama i hroničnim bolom u maloj karlici , laparoskopija nije uvek obavezna. Laparoskopija pomaže dugotrajno u samo polovine bolesnica sa tim stanjima (103, 104). Zato je medikamentozno lečenje neizbežno, iako za 20% pacijentkinja nije uvek optimalno. Za izbor medikamentoznog

tretmana neophodan je individualiziran pristup. Izbor zavisi od simptoma, želje za očuvanje plodnosti, stepena izraženosti bolesti, od statusa estrogenskih i progesteronskih receptora u ektopičnom endometriju.

Medikamentozno lečenje se preporučuje:

- pre operacije
- dodatno lečenje nakon operacije
- lečenje ozbiljnih simptoma bez operacije
- priprema za lečenje neplodnosti - posebno IVF
- lečenje adolescentica i žena u premenopauzi
- za lečenje adenomioze

Delotvornost medikamentoznog tretmana se temelji na antiupalnom učinku, inhibiciji estrogena i progesteronske rezistencije i na inhibiciji aktivnosti prostaglandina. (159, 160, 161)

Medikamentozni tretman podrazumeva:

a) Nesteroidni protivupalni lekovi inhibiraju stvaranje ciklooksigenaze (COX) i prostaglandina i na taj način umanjuju upalu i bol.

b) Hormonsko lečenje danas predstavlja najčešći odabir

- kombinovana oralna kontracepcija (KOK)
- gestageni (progestini)
- agonisti gonadotropnog releasing hormona (ag GnRH)
- intrauterini uložak sa levonorgestrelom u posebnim indikacijama

Navedeni lekovi bitno se razlikuju u nuspojavama i u ceni. Neke nuspojave stvaraju metaboličke rizike i zahtevaju terapijske dodatke. Nije u potpunosti dokazano da hormonsko lečenje ima citoredukcijski učinak (162).

Tražeci bolje mogućnosti medikamentoznog tretmana koje bi ciljano reducirale lezije i simptome, sve se više pominje verovatna korist od sledećih medikamenata (103, 161):

- antagonisti GnRH
- inhibitori aromataze
- selektivni modulatori progesteronskih receptora-SPRM
- statini
- biljni preparati
- antiangiogenetički preparati
- uterini ulošci sa danazolom.

2. CILJA RADA

Ciljevi ovog istraživanja su:

- Ispitati pojedinačnu i kombinovanu vrednost biomarkera (CA 125, CA 19.9, CEA, mRNA za Survivin, mRNA za VEGF) u odnosu na dijagnozu endometrioze.
- Ispitati pouzdanost kombinacije ovih pet biomarkera i transvaginalnog ultrazvučnog pregleda u postavljanju dijagnoze endometrioze.

3. MATERIJAL I METOD

Ovo istraživanje predstavlja prospektivnu studiju preseka koja analizira značaj neinvazivnih metoda dijagnostike endometrioze u odnosu na invazivne procedure. Studija je obuhvatila 40 pacijentkinja kojima je zbog sumnje na postojanje endometrioze uradjena dijagnostička laparoskopija sa patohistološkom analizom u jednogodišnjem periodu od 2012.godine do 2013.godine, u Ginekološko akušerskoj klinici Kliničkog centra u Beogradu i na odeljenju Ginekologije Opšte bolnice u Užicu.

Nakon završene patohistološke analize i na osnovu vrednosti serumskih biomarkera pacijentkinje će biti podeljene u dve grupe:

- Grupa A – pacijentkinje kod kojih je verifikovano prisustvo endometrioze
- Grupa B – pacijentkinje kod kojih je isključeno prisustvo endometrioze, one bi predstavljale KONTROLNU GRUPU ove studije

Kriterijumi za uključivanje u studiju

Pacijentkinje starosne dobi 19-43 godina kod kojih postoji sumnja na postojanje endometrioze (dismenoreja, dispareunija, sterilitet, hronični bol u maloj karlici, ultrazvučno verifikovano prisutvo promene koja je suspektna na endometriozu)

Kriterijumi za isključivanje iz studije:

Pacijentkinje kojima je uradjena laparoskopija kada je otkriveno postojanje i nekog drugog tumora (mioma, cista druge etiologije) ili znaci hroničnog zapaljenja na ginekološki organima (abscesi jajnika ili piosalpinks) ili postojanje graviditeta.

Pacijentkinje koje imaju malignu bolest, autoimuno ili neko hematološko oboljenje.

Biohemijski parametri

Uzorci krvi ispitanica se uzimaju venepunkcijom u toku preoperativne pripreme pacijentkinja za hirušku intervenciju i isti će se koristiti za određivanje koncentracije biohemijskih markera (CA 125, CA 19-9, CEA) enzimskim imunotestovima. Uzorci krvi koristiće se i za molekularnu dijagnostiku, pod kojom podrazumevamo izolaciju totalne mRNA iz mononuklearnih ćelija periferne krvi, zatim reverznu transkripciju mRNA u komplementarnu cDNA. cDNA će se koristiti u kvantitativnoj PCR metodi (qPCR) da bi se odredio nivo ekspresije gena za Survivin i VEGF.

Ultrazvučni pregledi : Ultrazvučni pregledi se obavljaju korišćenjem vaginalne sonde na ultrazvučnom aparatu tipa Medison sonoace 6000c, a u toku preoperativne pripreme.

3.1. Principi testiranja

Uzorci krvi ispitanica uzimaju se venepunkcijom u toku preoperativne pripreme. Serum je preporučena vrsta uzorka za određivanje koncentracija CA125, CA 19-9 i CEA.

3.1.1. Određivanje koncentracije CA 125

Koncentracija CA125 markera se određuje ADVIA Centaur testom. ADVIA Centaur je “sendvič” imunotest sa dva mesta u kome se koristi direktna hemiluminometrijska tehnologija, u kojoj se koriste dva monoklonska antitela, specifična za CA 125. Prvo antitelo je usmerno prema M11 antigenom domenu i markiran je sa akridinijum estrom. Drugo antitelo je usmereno prema OC 125 antigenom domenu i markirano je fluoresceinom. Imunokompleks formiran sa CA 125 zarobljen je sa monoklonskim mišjim anti-fluorescein antitelom vezanim za paramagnetske čestice u Solid Phase (čvrstoj fazi).

Sistem automatski izvodi sledeće stupnjeve:

- odmerava 50 μL uzorka u kivetu
- odmerava 100 μL Lite Reagensa i inkubira 18 minuta na 37°C
- odmerava 250 μL Solid Phase i inkubira 18 minuta na 37°C
- izdvaja, aspirira i pere kivete sa reagens vodom
- odmerava po 300 μL Acid Reagent (acidni reagens) i Base Reagent (bazni reagens) da inicirahemiluminiscentnu reakciju objavljuje rezultate prema odabranoj opciji, kao što je opisano u uputstvu za upotrebu sistema ili na online help sistemu.

Postoji direktan odnos između koncentracije CA 125 prisutne u uzorku pacijenta i količine relativnih svetlosnih jedinica (RLUs) koje je sistem detektovao.

3.1.2. Odredjivanje koncentracije Ca 19-9

Koncentracija Ca 19-9 se određuje uz pomoć ADVIA Centaur CA 19-9 testa. ADVIA Centaur CA 19-9 test je “sendvič” imunotest sa dva mesta u kome se koristi direktna hemiluminometrijska tehnologija, u kojoj se koristi pojedinačno monoklonsko antitelo, 1116-NS-19-9, i za Solid Phase i za Lite Reagent. Antitelo je kovalentno vezano za paramagnetske čestice u Solid Phase (čvrstoj fazi) i isti klon antitela markiran je akridijum estrom u Lite Reagensu. Uzorak i Solid Phase se inkubiraju na 37°C 7.5 minuta zatim sledi pranje da bi se odstranio višak nevezanih antigena. Lite Reagens zatim odreaguje sa CA 19-9 antigenima vezanim za Solid Phase (čvrstu fazu) radi dodatne inkubacije od 20 minuta. Zato je hook efekat visokih doza eliminisan u ovom testu.

Sistem automatski izvodi sledeće stupnjeve:

- odmerava 75 μL uzorka u kivetu

- odmerava 350 μ L Solid Phase i inkubira 7.5 minuta na 37°C
- aspirira i pere kivete sa Wash 1
- resuspenduje u 100 μ L reagens vode⁵
- odmerava 100 μ L Lite Reagens a i inkubira 20 minuta na 37°C
- aspirira i pere kivete sa Wash 1, a zatim sa reagens vodom⁵
- odmerava po 300 μ L Acid Reagent (acidni reagens) i Base Reagent (bazni reagens) da hemiluminiscentnu reakciju

Postoji direktan odnos između koncentracije CA 19-9 prisutne u uzorku pacijenta i količine relativnih svetlosnih jedinica (RLUs) koje je sistem detektovao.

3.1.3. Određjivanje koncentracije CEA

Koncentracija CEA se određuje pomoću ADVIA Centaur CEA testa. ADVIA Centaur CEA test je “sendvič” imunotest sa dva mesta u kome se koristi direktna hemiluminometrijska tehnologija, u kojoj se upotrebljavaju konstantne količine dva antitela. Prvo antitelo, u Lite Reagensu, je prečišćeno poliklonsko zečje anti-CEA antitelo markirano sa akridinijum estrom. Drugo antitelo, u Solid Phase (čvrsta faza), je monoklonsko mišje anti-CEA antitelo kovalentno vezano za paramagnetne čestice.

Sistem automatski izvodi sledeće stupnjeve:

- odmerava 50 μ L uzorka u kivetu
- odmerava 50 μ L Lite Reagent i 250 μ L Solid Phase i inkubira 7.5 minuta na 37°C
- izdvaja, aspirira i pere kivete reagens vodom
- odmerava po 300 μ L Acid Reagent (acidni reagens) i Base Reagent (bazni reagens) da inicira hemiluminiscentnu reakciju

3.2. Određivanje nivoa ekspresije gena

Relativna ekspresija gena za survivin i VEGF u uzorcima krvi pacijenata određivana je poređenjem u odnosu na ekspresiju konstitutivno eksprimiranog gena (tzv. „house-keeping“ gena) za glicerilaldehid 3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH) korišćenjem kvantitativne reakcije lančanog umnožavanja u realnom vremenu (engl. Real-time polymerase chain reaction, Real-time PCR). Prethodno je iz ćelija ispitivanih uzoraka izolovana RNK i reverznom transkripcijom prevedena u komplementarnu DNK (engl. complementary DNA, cDNK).

3.2.1. Uzimanje uzorka krvi

U toku preoperativne pripreme venepunkcijom se uzima 10ml krvi pacijentkinja koje se pripremaju za laparoskopsku operaciju. Prilikom venepunkcije se koristi vacutainer sa antikoagulasom EDTA.

3.2.2. Izdvajanje mononuklearnih ćelija krvi

Epruvete sa krvi dobijenom venepunkcijom su kratkotrajno centrifugirane (100g, 5 minuta), a potom je oko 80% gornjeg dela tečne faze iz svake epruvete poreklom od istog pacijenta prebacivano u nove epruvete i promešano („pulovano“). Odatle je krv prenošena u epruvete sa 3 ml separacionog medijuma (PAA Laboratories, Austrija) uz pažljivo nanošenje i epruvete su potom centrifugirane sa minimalnim ubrzanjem i bez korišćenja kočnice (1000 g, 20 minuta na 22°C). Dobijeni beličasti prsten sa mononuklearnim ćelijama je zatim pažljivo uziman pipetom i prenošen u novu epruvetu i ćelije su prane tri puta, od čega dva puta u fosfatnom puferu (PBS), a treći put u medijumu RPMI sa 5% fetalnog telećeg seruma (FCS, PAA Laboratories, Austrija). Nakon svakog pranja ćelije su obarane centrifugiranjem (700 g, 5 minuta). Potom su ćelije resuspendovane u mediju (RPMI sa 5% FCS-a) i brojane. Za određivanje broja ćelija deo ćelija je resuspendovan u PBS-u sa 0,1 % tripan-plavog

(BDSL, V. Britanija) i ćelije su brojane pod mikroskopom pomoću komore po Neubauer-u (Improved Neubauer, Hauser Scientific, SAD), pri čemu mrtve ćelije (obojene u plavo usled narušene građe membrane) nisu uzimane u obzir. Tako dobijene ćelijske suspenzije su dalje korišćenje za izolaciju RNK.

3.2.3. Izolacija RNK

U cilju izolacije RNK, iz svakog uzorka je prenošeno po 5×10^6 izdvojenih mononuklearnih ćelija u epruvete od 1,5 ml (Eppendorf, Nemačka) koje su potom centrifugirane (2000 g, 3 minuta) da bi se uklonio medijum. Po odstranjivanju medijuma ćelije su lizirane blagim pipetiranjem u 500 μ l reagensa za izolaciju RNK (TRI Reagent solution, Ambion SAD). Potom su epruvete dopunjavane sa 100 μ l hloroforma, mešane na mešalici tokom 10 sekundi, ostavljane 10 minuta na 4°C i i na kraju centrifugirane tokom 15 minuta (12000 g, 4°C). Nakon centrifugiranja i formiranja tri faze u epruveti, vodena faza koja sadrži izdvojenu RNK prenošena je u drugu epruvetu i RNK je precipitirana dodavanjem izopropanola u zapremini koja je bila jednaka zapremini prenešene vodene faze (oko 300 μ l). Nakon mešanja invertovanjem (10-tak puta žustrim pokretima), epruvete su ostavljane tokom 30 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirane 15 minuta (12000 g, 4°C). Potom je istaložena RNK ispirana dva puta sa po 1 ml 75%-nog etanola. Pri svakom pranju je po dodavanju alkohola, obavljeno mešanje na vorteksu (kako bi se postiglo da talog „pliva“ u etanolu) i centrifugiranje (12000 g, 4°C). Po završetku drugog ispiranja, pipetom je pažljivo izvučen 75%-ni etanol i ostavljen talog RNK da se suši na sobnoj temperaturi (dok talog ne postane staklastog izgleda). Osušeni talog je resuspendovan u demineralizovanoj vodi (zapremina je zavisila od količine taloga). Ovako dobijene resuspendovane RNK su analizirane na 1%-nom agaroznom gelu (Sigma, SAD) sa dodatkom 0,5 μ g/ml etidijum-bromida (Gibco BRL, SAD) kako bi se ispitao kvalitet izolovane RNK, odnosno proverilo da li je došlo do njene degradacije. Takođe je određivana koncentracija izolovane RNK u uzorcima merenjem apsorpcije na 260 nm i poređenjem sa vrednostima dobijenim za vodu, odnosno ispitivan stepen njene čistoće na 280 nm talasne dužine na kojoj je maksimalna moć apsorpcije aromatičnih amino kiselina. (Odnos A_{260nm}/A_{280nm} između 1,7 i 2 ukazuje na visok stepen čistoće RNK u

odgovarajućem rastvoru). U tu svrhu korišćen je spektrofotometar (GeneQuant pro, Amersham, SAD).

3.2.4. Reverzna transkripcija

Nakon izolacije i određivanja koncentracije, izolovana RNK je reakcijom reverzne transkripcije prevođena u cDNK. Iz uzoraka je uzimana ona zapremina koja je sadržavala 1 μ g rastvorene RNK i dopunjavana je do 14,5 μ l demineralizovanom vodom sa 0,2 μ g heksamerskih prajmera nasumičnih sekvenci (Fermentas, Litvanija) i smeše dezoksiribonukleotid-trifostata (dNTP, Fermentas) u količini koja odgovara finalnoj koncentraciji od 0,5 mM za svaki dNTP. Po mešanju, rastvorena RNK je denaturisana na 70°C 10 minuta, posle čega su uzorci vađeni, kratko obarani u centrifugi i stavljeni 2 minuta na led. Nakon toga u uzorke je dodavano po 4 μ l 5 puta koncentrovanog pufera za reverznu transkripciju (5 x reaction buffer, Fermentas), 0,5 μ l inhibitora RNA-ze (RiboLock RNase Inhibitor, Fermentas) i 1 μ l (200 U) reverzne transkriptaze Moloni virusa mišje leukemije (RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase, Fermentas). Uzorci su mešani i inkubirani na 25°C, 15 minuta, a potom na 42°C, 60 minuta. Konačno, reakcija je prekidana inkubacijom uzoraka na 70°C, 10 minuta i 95°C, 3 minuta. Uzorci sa cDNK su čuvani na 4°C do dalje upotrebe. Reakcija reverzne transkripcije obavljena je u epruvetama od 200 μ l (Eppendorf), a inkubacija na različitim temperaturama je obavljena pomoću odgovarajućeg aparata (Mastercycler Gradient, Eppendorf). U cilju provere postojanja kontaminacije, u svakoj reakciji korišćena je i negativna kontrola koja je sadržavala demineralizovanu vodu sa svim reagensima osim RNK, dok je eventualna fragmentisanost uzoraka ispitivana na 1 %-nom agaroznom gelu.

3.2.5. Reakcija lančanog umnožavanja (PCR)

Komplementarna DNK dobijena reverznom transkripcijom RNK izolovane iz ispitivanih uzorka dalje je umnožavana kvantitativnom PCR reakcijom, pri čemu je relativna ekspresija gena za survivin i VEGF određivana u odnosu na GA.

Prajmeri i probe

Prajmeri korišćeni u PCR reakcijama dizajnirani su na osnovu sekvenci dostupnih u bazi podataka ENTREZ korišćenjem odgovarajućeg kompjuterskog programa (Primer Express® software v2.0, Applied Biosystems, SAD). Sekvence, pozicija u sekvenci čitavog gena i finalne koncentracije prajmera koji su korišćeni za umnožavanje i detektovanje cDNK za survivin, VEGF i GAPDH navedeni u Tabeli I. Prajmeri za survivin i VEGF su sintetisani i nabavljeni od strane kompanije Applied Biosystems, a probe za GAPDH od strane kompanije Metabion (Nemačka).

Prajmeri korišćeni u PCR reakcijama

Gen	Sekvenca (5'-3')	Pozicija u genu	Konc. (nM)
GAPDH			
F -	CATCCATGACAACCTTTGGTATCG	564	300
R -	CCATCACGCCACAGTTTCC	671	300
Survivin (BIRC-5)			
F -	GCCAAGAACAATAATTGCAAAGG	515	900
R -	TCTCCGCAGTTTCCTCAAATTC	578	900
VEGF			
F -	GCCCACTGAGGAGTCCAACAT	1323	900
R -	TGAGGTTTGATCCGCATAATCTG	1373	900

F – prajmer komplementaran kodirajućem („sens“) lancu DNK

R – prajmer komplementaran nekodirajućem („antisens“) lancu DNK

Kvantitativni PCR („Real-time“ PCR)

U eksperimentima je korišćena ploča sa 96 bazenčića adaptirana za kvantitativni PCR (MicroAmp™ Optical, Applied Biosystems) i u svaki od bazenčića dodavano je ukupno po 15 µl reakcione smeše, koja se sastojala od 7,5 µl 2 puta koncentrovanog komercijalno pripremljenog „master-miksa“ koji je sadržao DNK polimerazu AmpliTaq Gold®, dNTP i optimizovane komponente pufera (2x Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems), 0,75 µl interkalirajuće boje koja vezuje DNK (20x EvaGreen, Biotium, SAD), po 1 µl specifičnih nukleotida (prajmera) za gen od interesa odnosno za GAPDH u odgovarajućoj koncentraciji (Tabela I), po 1 µl ukupne cDNK dobijene reverznom transkripcijom izolovane RNK iz svakog pojedinačnog uzorka i demineralizovanu vodu (do 15 µl). Bazenčići su zapečaćeni optičkim adhezivnim filmom (Applied Biosystems), ploča je kratko centrifugirana na velikoj brzini (1000g) i prenetu u termoblok aparata za kvantitativni PCR (Realplex2 Mastercycler ep gradient S, Eppendorf). Uslovi amplifikacije bili su sledeći: 2 minuta na 50°C, 10 minuta na 95°C, a zatim 60 ciklusa koji su obuhvatali 15 sekundi na 95°C i 1 minut na 60°C. Na kraju poslednjeg ciklusa smeša je zagrevana još 15 sekundi na 95°C i 1 minut na 60°C i potom je u cilju provere postojanja više PCR produkata ili prajmerskih dimera rađena kriva topljenja tako što je temperatura tokom 20 minuta postepeno podizana od 60°C do 95°C i na kraju još denaturisana tokom 15 sekundi na 95°C. Koncentracije prajmera i uslovi amplifikacije za ispitivane gene određeni su u preliminarnim eksperimentima. Svi uzorci i odgovarajuće kontrole (kontrola reverzne transkripcije i negativna kontrola bez cDNK) su rađeni u duplikatima. Za analizu dobijenih rezultata korišćen je odgovarajući kompjuterski program (Mastercycler ep realplex) obezbeđen od strane proizvođača aparata za kvantitativni PCR (Eppendorf). Ciklus u kojem vrednost fluorescencije prelazi prag analize (Ct, engl. cycle of threshold) određivan je za svaki gen arbitrarno i bio je podešen na 200 relativnih fluorescentnih jedinica. Srednje Ct vrednosti duplikata za GAPDH su oduzete od srednjih Ct vrednosti duplikata za gene od interesa (survivin, odnosno VEGF) i na taj način je dobijen ΔCt , dok je relativna ekspresija za oba analizirana gena izražena kao 2.

4. REZULTATI

U studiju je uključeno 40 ispitanica, prosečne starosti 32,3+/-4,4 godine. Najmladja ispitanica je imala 24 godine, a najstarija 42 godine. Prosečan BMI je bio 23,08+/-1,95 (min-max je 19-27). 36 ispitanica (90%) je imalo normalan BMI. 2 ispitanice (5%) su imale BMI<20 i 2 ispitanice (5%) su imale BMI>25.

U tabeli 1. prikazane su osnovne karakteristike pacijentkinja koje su laparoscopski operisane zbog sumnje na postojanje endometriozе. Obe grupe su slične u pogledu ovih karakteristika. Prosečna starost pacijentkinja ispitivane grupe je iznosila 32.13±4.8, prosečna starost pacijentkinja u kontrolnoj grupi je iznosila 32.8±2.7. Najstarija pacijentkinja u ispitivanoj grupi je imala 42 godine, a u kontrolnoj 35 godina. Razlika u godinama starosti između pacijentkinja ispitivane i kontrolne grupe nije bila statistički značajna (p=0,459). Prosečna vrednost BMI u ispitivanoj grupi je iznosila 23.50±1.8 , dok je u kontrolnoj grupi iznosila 21.8±1.8. Postoji statistički značajna razlika između prosečnih vrednosti BMI kod pacijentkinja sa i bez endometriozе. (p=0,015). Pacijentkinje sa endometriozom imaju veći BMI. Infertilitet je bio najčešći razlog laparoscopske hirurgije i u ispitivanoj i u kontrolnoj grupi pacijentkinja (46,6 %, 60 %). Hronični bol u maloj karlici kao indikacija je bila prisutna sa učestalošću 43,3% u ispitivanoj grupi kao i 30% u kontrolnoj. Dismenoreja je bila indikacija kod 10 % pacijentkinja i u ispitivanoj grupi i u kontrolnoj grupi. Ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti različitih indikacija kod pacijentkinja sa i bez endometriozе (p>0,05).

Tabela br. 1 Karakteristike ispitivanih pacijentkinja

Karakteristike ispitivanih pacijentkinja	Bez dijagnostikovane endometriozе (N = 10)	Sa dijagnostikovanom endometriozom (N =30)
Starost pacijentkinja – godine	32,80±2,7 (28-35)	32.13±4.8 (24-42)
Indikacije za laparoskopsku operaciju broj(%)	Hronični bol u maloj karlici	3 (30 %)
	Neploidnost	6 (60 %)
	Dismenoreja	1 (10 %)
BMI	21,8±1,8	23,50±1,8

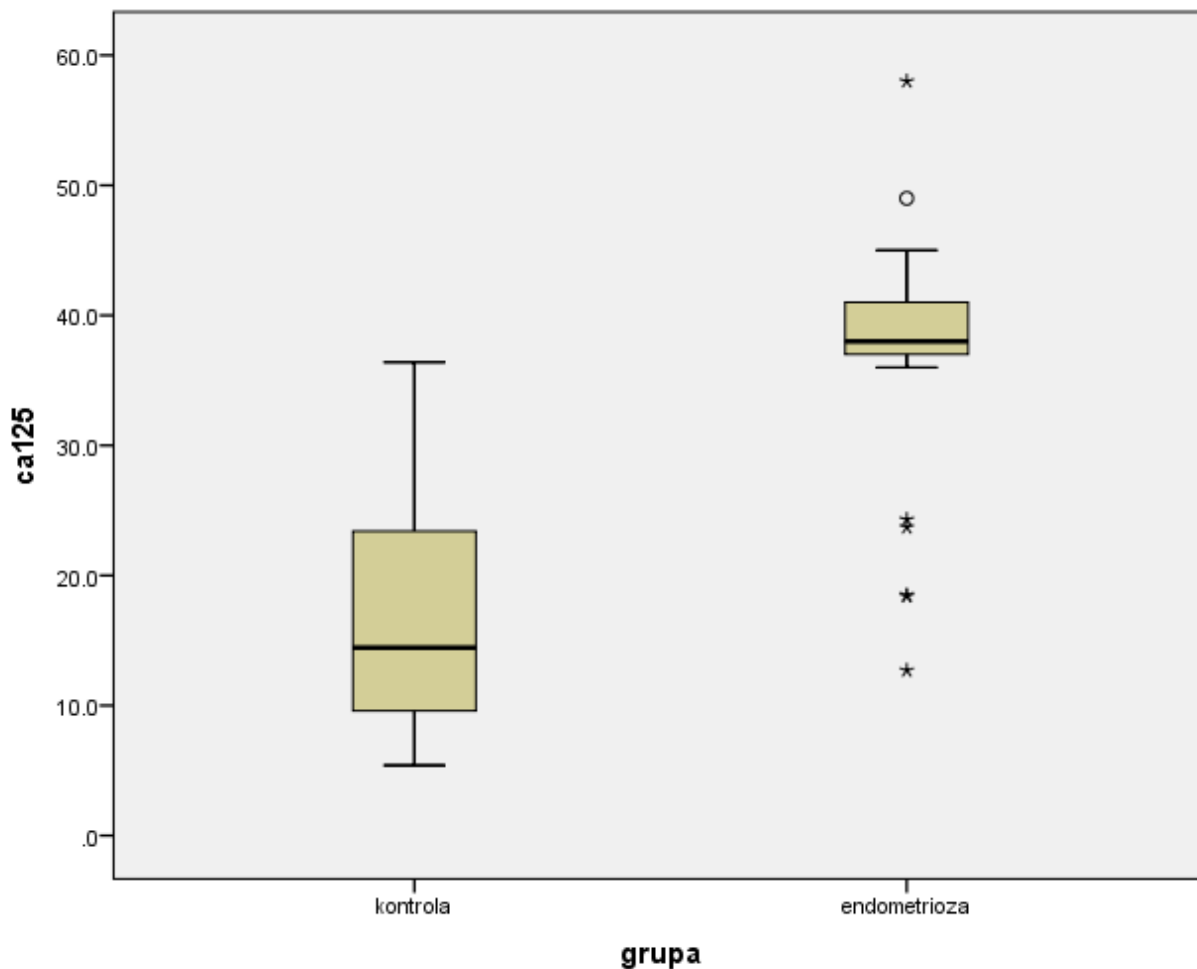
Tabela br. 2 prikazuje karakteristike endometriozе u ispitivanom uzorku u vreme operacije. Endometriozа je bila statistički značajno češće prisutna na levom nego na desnom jajniku (63.3% and 46.6%, respectively, $p=0.04$) 14.3 % pacijentkinja je imalo bilateralne endometriome, a 17,9 % pacijentkinja nije imalo endometriozе na jajnicima. Srednja veličina endometrioma je bila $33,7 \pm 1,67$ mm (20 mm min, 70 mm max). Nije bilo značajne razlike između veličine endometrioma levog i desnog jajnika. DIE je pronađena samo kod jedne pacijentkinje (3,33%).

Tabela br.2 Lokalizacija i karakteristike endometriotičnih promena kod pacijentkinja sa endometriozaom

Lokalizacija	N=30
Levi jajnik	19 (63,3 %)
Desni jajnik	14 (46,6 %)
Oba jajnika	7 (16,6 %)
Peritoneum	17 (56 %)
DIF	1 (3,33 %)

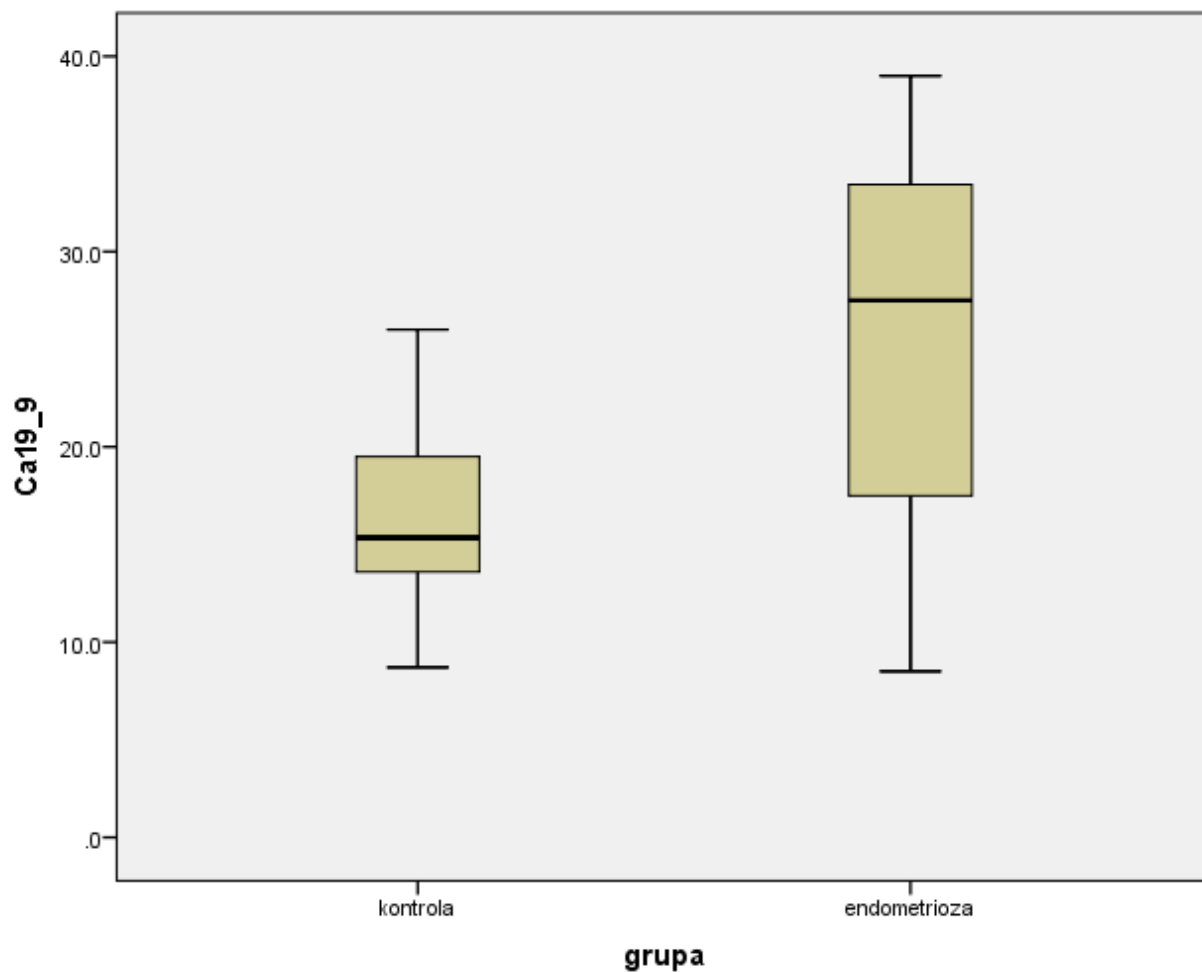
Kod pacijentkinja kod kojih je laparoskopskim putem dijagnostikovana endometrioza srednja vrednost ispitivanog biohemijskog markera CA 125 je bila $37,9 \pm 9,3$ IU/ml. Vrednosti CA 125 markera u kontrolnoj grupi pacijentkinja iznosile su $17,7 \pm 10,7$ IU/ml. Najveća izmerena vrednost CA 125 u grupi sa dijagnostifikovanom endometriozaom je bila 58.0 IU/ml, a u kontrolnoj grupi 36.4 IU/ml. Uočeno je da postoji statistički značajna razlika u vrednosti serumske koncentracije CA 125 između ispitivane i kontrolne grupe pacijentkinja ($p < 0,001$).

Slika br 1. Srednja vrednost Ca 125 u ispitivanoj i kontrolnoj grupi



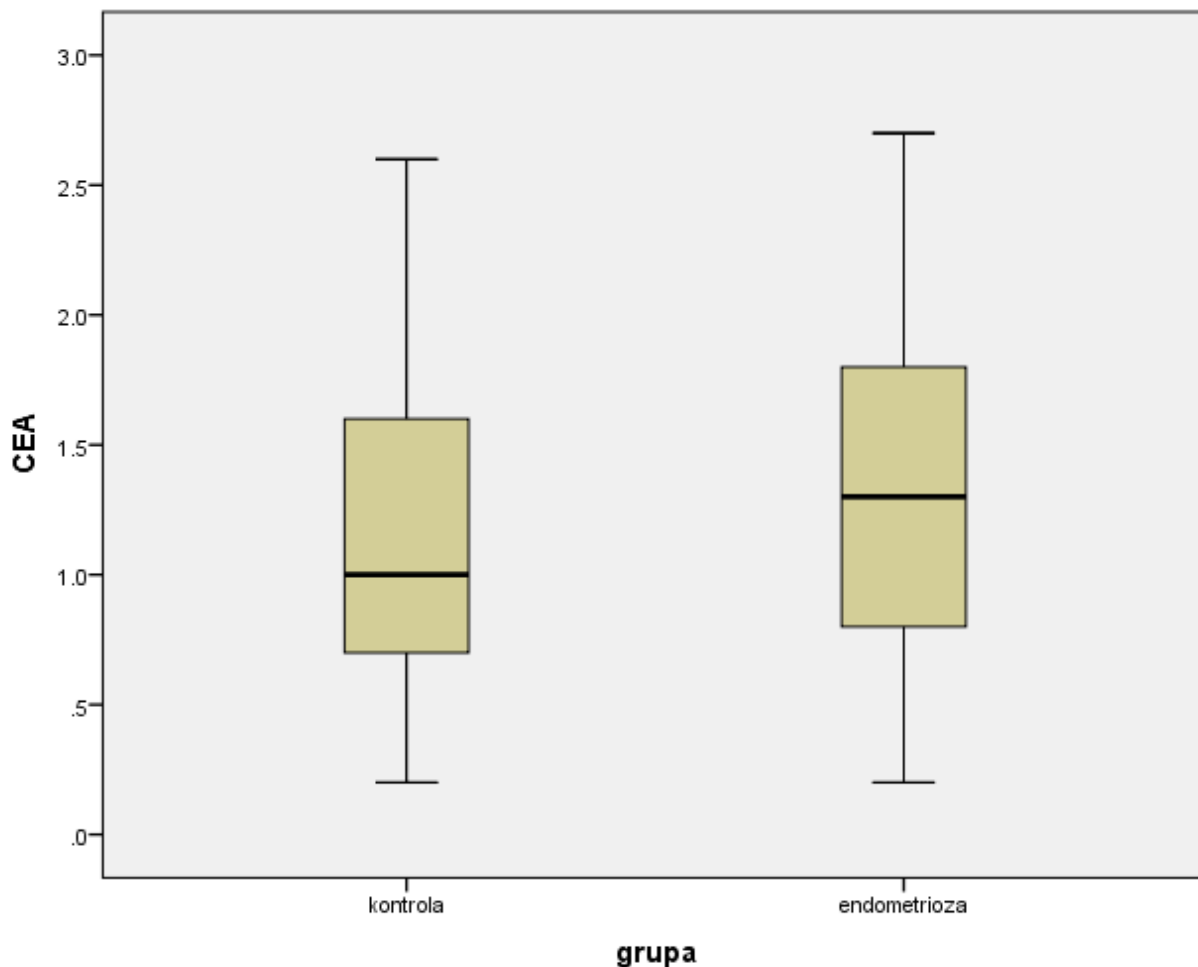
Srednja vrednost ispitivanog biohemijskog markera CA 19-9 kod pacijentkinja kod kojih je nakon laparoskopije dijagnostikovana endometrijoza je bila $25,31 \pm 9,3$ $\mu\text{g/ml}$. Vrednosti CA 19-9 markera u kontrolnoj grupi pacijentkinja iznosile su $16,41 \pm 5,01$ $\mu\text{g/ml}$. Najveća izmerena vrednost CA 19-9 u grupi sa dijagnostikovanom endometriozom je bila $39,0$ $\mu\text{g/ml}$, a u kontrolnoj grupi $26,0$ $\mu\text{g/ml}$. Uočeno je da ne postoji statistički značajna razlika u vrednosti serumske koncentracije CA 19-9 između ispitivane i kontrolne grupe pacijentkinja.

Slika br. 2. Srednja vrednost Ca 19-9 u ispitivanoj i kontrolnoj grupi



Srednja vrednost ispitivanog biohemijskog markera CEA ispitivanoj grupi je bila $1,4 \pm 0,68$ ng/ml. Vrednosti CEA markera u kontrolnoj grupi pacijentkinja iznosile su $1,2 \pm 0,8$ ng/ml. Najveća izmerena vrednost CEA u grupi sa dijagnostikovanom endometriozom je bila 2.7 ng/ml, a u kontrolnoj grupi 2.6 ng/ml. Uočeno je da ne postoji statistički značajna razlika u vrednosti serumske koncentracije CEA između ispitivane i kontrolne grupe pacijentkinja.

Slika br.3. Srednja vrednost CEA u ispitivanoj i kontrolnoj grupi



U tabeli br. 3 prikazano je prisustvo, odnosno odsustvo endometrijoze kod pacijentkinja operisanih laparoscopski u odnosu na koncentraciju CA 125 u serumu. U kontrolnoj grupi 90,0% pacijentkinja je imalo vrednosti CA 125 ispod 35 UI/ml, a svega 10,% je imalo vrednosti pomenutog markera iznad 35 UI/ml. U ispitivanoj grupi (pacijentkinje sa endometriozom) rezultati su bili drugačiji. 16,66 % pacijentkinja je imalo vrednosti CA 125 ispod 35 U/ml, a čak 83,33 % pacijentkinja je imalo vrednosti CA 125 iznad 35 U/ml.

Tabela br. 3 Raspodela serumske koncentracije CA 125 u kontrolnoj i ispitivanoj grupi pacijentkinja u odnosu na graničnu vrednost

Nivo CA125	Broj pacijentkinja bez endometrioze	Broj pacijentkinja sa endometriozom	Ukupan broj ispitanica
< 35U/ml	9 (90%)	5 (16,7%)	14
≥35U/ml	1 (10%)	25(83,33%)	26

Povisene vrednosti Ca125 (≥ 35) imalo je 26 (65%) žena, od kojih je 25 (96,2%) imalo dijagnozu endometrioze. Postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti povišenih vrednosti Ca125 između žena sa i bez endometrioze (Fisher-ov test; $p < 0,001$). Performanse povišenog Ca125 kao dijagnostičkog testa za endometriozu su sledeće:

Senzitivnost $S_n = 83,3\%$

Specifičnost $S_p = 90,0\%$

Pozitivna prediktivna vrednost $PPV = 96,2\%$

Negativna prediktivna vrednost $NPV = 64,3\%$

Stopa lažno pozitivnih nalaza $1/40 = 2,5\%$

Stopa lažno negativnih nalaza $5/40 = 12,5\%$

U tabeli br. 4 prikazano je prisustvo, odnosno odsustvo endometrioze kod pacijentkinja operisanih laparoscopski u odnosu na koncentraciju CA 19-9 u serumu. Sve pacijentkinje u kontrolnoj grupi su imale vrednost Ca 19-9 ispod $37 \mu\text{g/ml}$, odnosno

100%. U ispitivanoj grupi (pacijentkinje sa endometriozom) rezultati su bili drugačiji. 16,6% pacijentkinja je imalo vrednosti CA 19-9 iznad 37 $\mu\text{g/ml}$, a čak 83,4% pacijentkinja je imalo vrednosti CA 19-9 ispod 37 $\mu\text{g/ml}$.

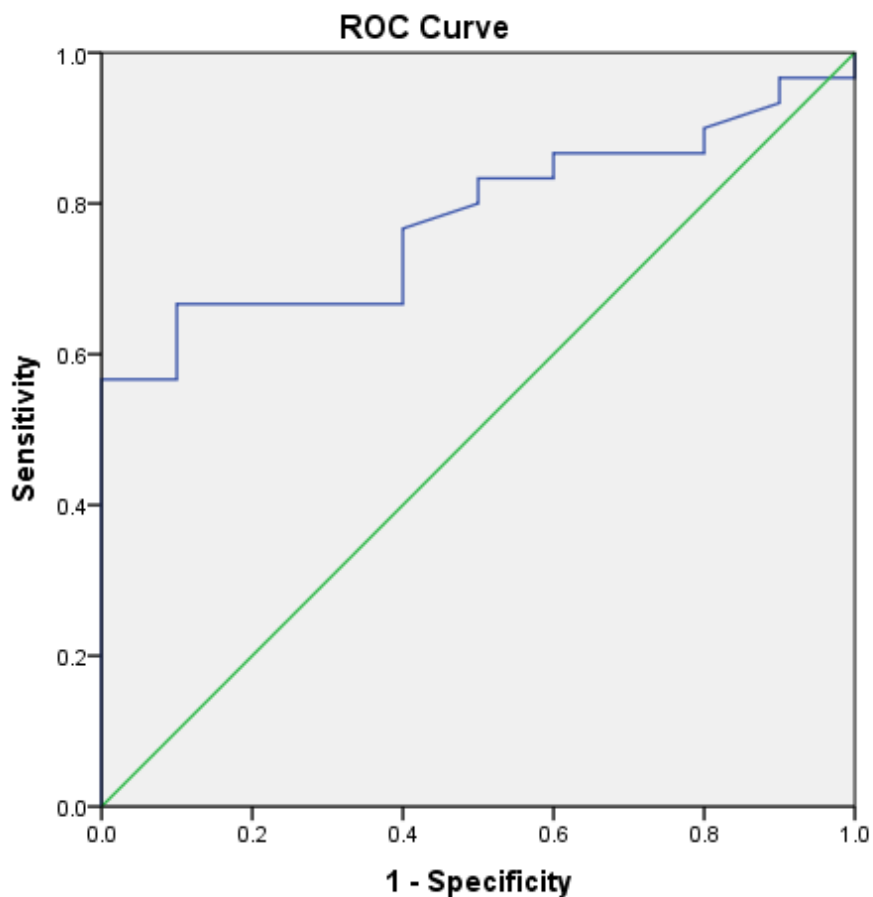
Tabela br. 4 Raspodela serumske koncentracije CA 19-9 u kontrolnoj i ispitivanoj grupi pacijentkinja u odnosu na graničnu vrednost

Nivo CA19-9	Broj pacijentkinja bez endometrioze	Broj pacijentkinja sa endometriozom	Ukupan broj ispitanica
<37 $\mu\text{g/ml}$	10 (100%)	25 (83,4%)	35
\geq 37 $\mu\text{g/ml}$	0	5 (16,6%)	5

Povišene vrednosti Ca19-9 (\geq 37) imalo je 5 (12,5%) pacijentkinja. Ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti povišenih vrednosti Ca19-9 između pacijentkinja sa i bez endometrioze ($p>0,05$).

Na osnovu ROC analize utvrđena je tačka preseka (cut-off vrednost) za Ca19-9 koja razdvaja dijagnostički pozitivne i negativne pacijentkinje sa endometriozom (površina ispod krive 0,780; SE=0,072; $p=0,009$).

Slika br 4. ROC Curve za Ca 19-9.



Diagonal segments are produced by ties.

Tačka preseka je 17. Postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti vrednosti $\text{Ca19-9} \geq 17$ između ispitanica sa i bez endometrioze (Fišer-ov test; $p=0,042$), tj. žene sa endometriozom imaju češće vrednosti $\text{Ca19-9} \geq 17$ od žena bez endometrioze.

Performanse Ca19-9 ≥ 17 kao dijagnostičkog testa za endometrioze su sledeće:

- Senzitivnost $S_n = 76,7\%$
- Specifičnost $S_p = 60,0\%$
- Pozitivna prediktivna vrednost $PPV = 85,2\%$
- Negativna prediktivna vrednost $NPV = 46,2\%$
- Stopa lažno pozitivnih nalaza $4/40 = 10,0\%$
- Stopa lažno negativnih nalaza $7/40 = 17,5\%$

U tabeli br. 5 prikazano je prisustvo, odnosno odsustvo endometrioze kod pacijentkinja operisanih laparoskopski u odnosu na koncentraciju CEA u serumu. U kontrolnoj i u ispitivanoj grupi sve pacijentkinje su imale vrednost CEA manju od 3 ng/ml.

Tabela br. 5 Raspodela serumske koncentracije CAE u kontrolnoj i ispitivanoj grupi pacijentkinja u odnosu na graničnu vrednost

Nivo CEA	Broj pacijentkinja bez endometrioze	Broj pacijentkinja sa endometriozom	Ukupan broj ispitanica
< 3 ng/ml	10	30	40
> 3 ng/ml	0	0	0

U tabeli br. 6 vidimo da je UZ nalaz je bio pozitivan kod 27 (67,5%) ispitanica i kod svih 27 je potvrđena dijagnoza endometrioze. Negativan je bio kod 13 (32,5%) ispitanica, od kojih je kod 3 (23,1%) nakon operacije postavljena dijagnoza endometrioze. Postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti pozitivnog UZ nalaza između ispitanica sa i bez endometrioze ($p < 0,001$).

Tabela br. 6 Uz nalaz kod pacijentkinja ispitivane i kontrolne grupe

UZ nalaz	Broj pacijentkinja bez endometriozе	Broj pacijentkinja sa endometriozom	Ukupan broj ispitanica
pozitivan	0	27	27 (67,5%)
negativan	10	3	13 (32,5%)

Performanse UZ nalaza kao dijagnostickog testa za endometriozu su sledece:

- Senzitivnost $S_n=90\%$ Specifičnost $S_p=100\%$
- Pozitivna prediktivna vrednost $PPV=100\%$
- Negativna prediktivna vrednost $NPV=76,9\%$
- Stopa lažno pozitivnih nalaza= $0/40=0\%$
- Stopa lažno negativnih nalaza= $3/40=7,5\%$
- Lažno negativan UZ nalaz je bio kod 3 pacijentkinje koje su imale endometriozu samo peritoneuma, bez zahvaćenosti bilo kog jajnika.

U tabeli br. 7 prikazana je ekspresija survivina u ispitivanoj i kontrolnoj grupi pacijentkinja. Ekspresija survivina je zabeležena kod 22 (55%) ispitanica. Od 22 ispitanice sa ekspresijom survivina, kod njih 20 (90,9%) je potvrđena dijagnoza endometriozе, a kod 2 (9,1%) ispitanice nije. Postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti ekspresije survivina između ispitanica sa i bez endometriozе ($p=0,025$), tj. žene sa endometriozom imaju češće ekspresiju survivina od žena bez endometriozе

Tabela br. 7 Ekspresija survivina u ispitivanoj i kontrolnoj grupi

ekspresija Survivina	Broj pacijentkinja bez endometriozе	Broj pacijentkinja sa endometriozom	Ukupan broj ispitanica
pozitivan	2 (9,1%)	20 (90,9%)	22 (55%)
negativan	8	10	18

Kod ispitanica sa dijagnozom endometriozе u našoj studiji, medijana razlike izmedju ekspresije "house keeping" gena (GAPDH) i ekspresije survivina je bila 13.32 (min 4.20; max 23.68).

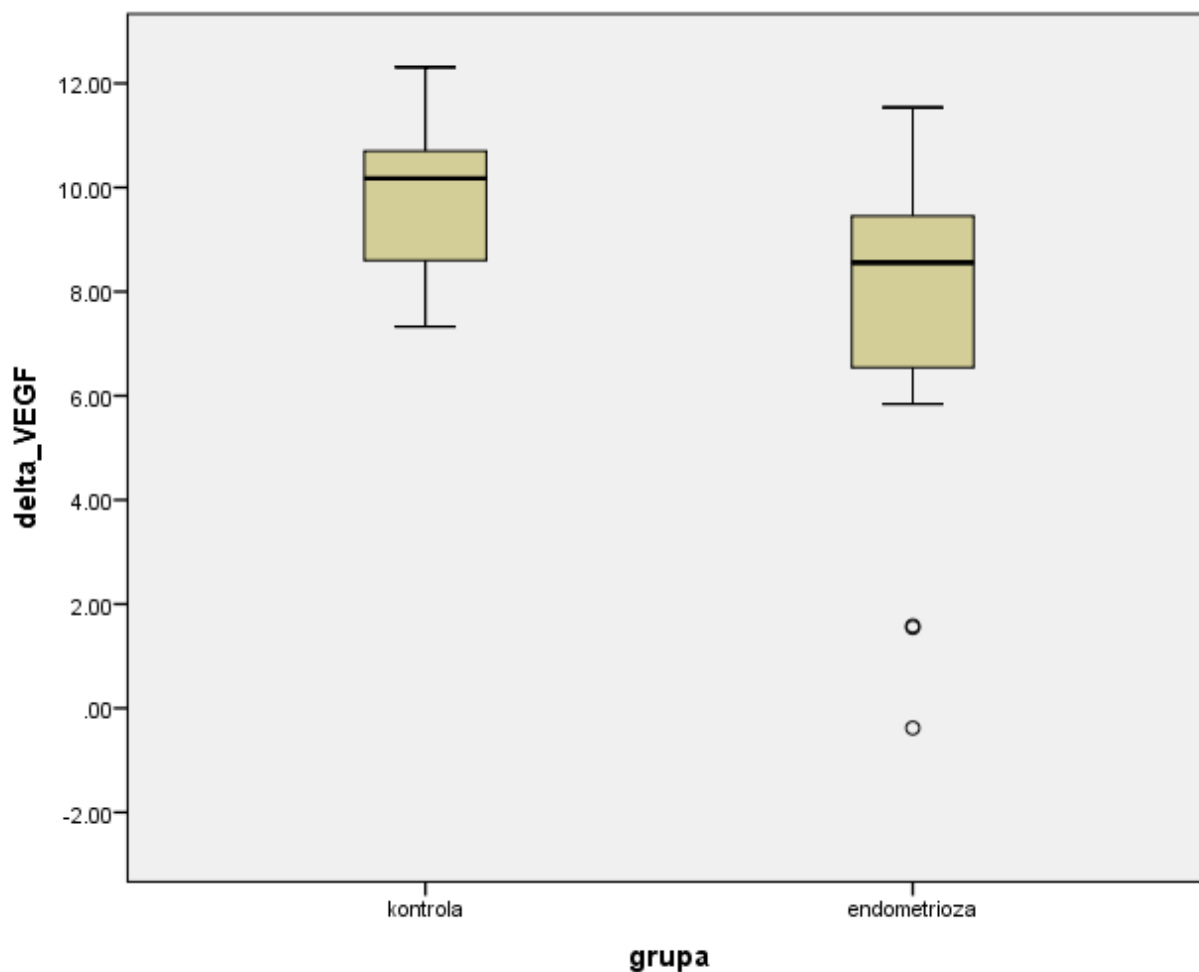
Performanse ekspresije survivina kao dijagnostickog testa za endometriozu su sledece:

- senzitivnost Sn=66.7%
- specifičnost Sp=80%
- pozitivna prediktivna vrednost PPV=90.9%.
- negativna prediktivna vrednost NPV=44.4% .
- stopa lažno pozitivnih nalaza 2/40 (5%) .
- stopa lažno negativnih nalaz 10/40 (25%).

Kod ispitanica sa dijagnozom endometriozе, medijana razlike izmedju ekspresije "house keeping" gena (GAPDH) i ekspresije VEGF-a je bila 8,55 (minimalno -0,38, maksimalno 11,54). Kod ispitanica bez endometriozе, medijana razlike izmedju ekspresije "house keeping" gena (GAPDH) i ekspresije VEGF-a je bila 10,17 (minimalno 7,33, maksimalno 12,31). Postoji statistički značajna razlika u ekspresiji VEGF-a izmedju pacijentkinja sa i bez endometriozе (Mann-Whitney test; p=0,009.

Pacijentkinje sa endometriozom imaju značajno veću vrednost ekspresije mRNA za VEGF (8,55 prema 10,17).

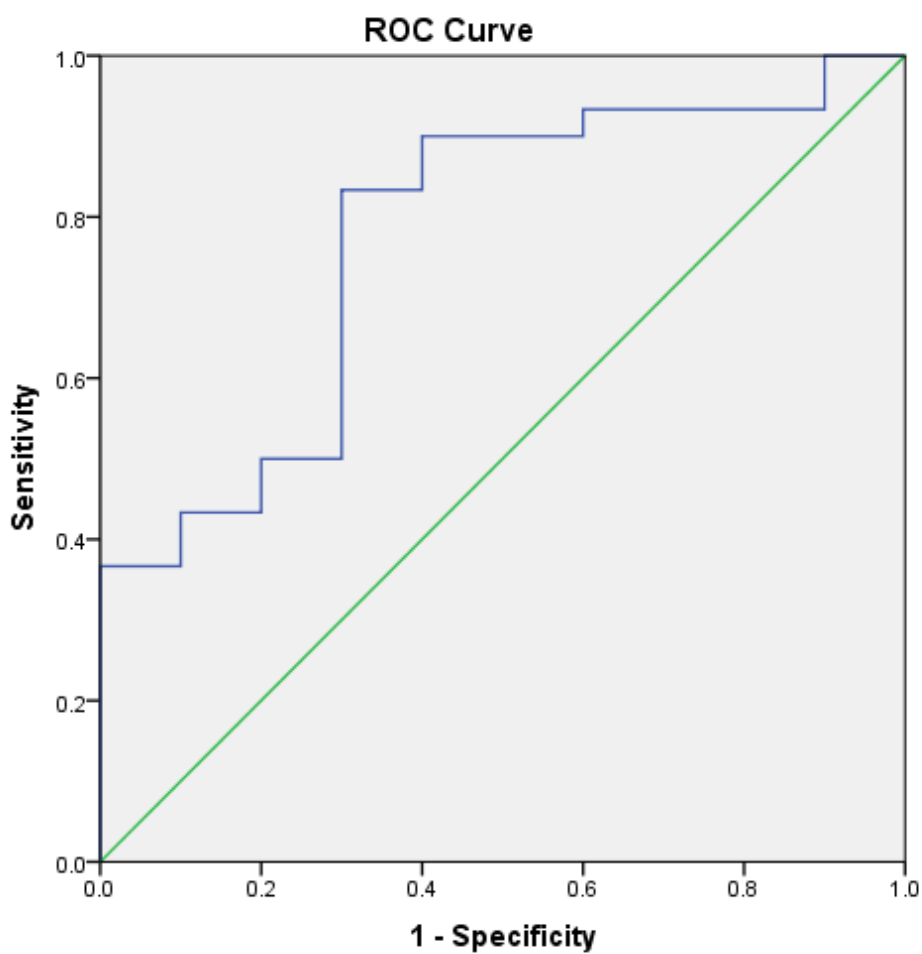
Slika br. 5 Ekspresija mRNA za VEGF u ispitivanoj i kontrolnoj grupi



Obzirom da je ekspresija gena prikazana kao razlika izmedju ekspresije "house keeping" gena (GAPDH) i ekspresije VEGF-a, manja vrednost razlike ukazuje na vecu ekspresiju gena. Na osnovu ROC analize utvrdjena je tačka preseka (cut-off vrednost) za VEGF koja razdvaja dijagnostički pozitivne i negativne pacijentkinje sa endometriozom (površina ispod krive 0,733; SE=0,086; p=0,010). Tačka preseka je 9,5. Postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti ekspresije VEGF prikazane kao

razlika u ekspresiji "house keeping" gena i VEGF <9,5 između ispitanica sa i bez endometrioze ($p=0,006$), tj. Pacijentkinje sa endometriozom imaju češće razliku u ekspresiji ova dva gena manju od 9,5 od pacijentkinja bez endometrioze.

Slika br. 6 ROC kriva- grafički prikaz senzitivnosti i specifičnosti za VEGF



Tačka preseka je 9,5. Postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti ekspresije VEGF prikazane kao razlika u ekspresiji "house keeping" gena i VEGF <9,5 između ispitanica sa i bez endometrioze (p=0,006), tj. pacijentkinje sa endometriozom imaju češće razliku u ekspresiji ova dva gena manju od 9,5 od pacijentkinja bez endometrioze. Performanse ekspresije VEGF prikazane kao razlika u ekspresiji "house keeping" gena i VEGF <9,5 kao dijagnostičkog testa za endometriozu su sledeće:

- Senzitivnost Sn=80,0%
- Specifičnost Sp=70,0%
- Pozitivna prediktivna vrednost PPV 88,9%
- Negativna prediktivna vrednost NPV 53,8%
- Stopa lažno pozitivnih nalaza 3/40 ili 7,5%
- Stopa lažno negativnih nalaza 6/40 ili 15%

5. DISKUSIJA

Dobro poznata činjenica je da endometrioza predstavlja oboljenje koje se javlja tokom reproduktivnih godina, u periodu izražene steroidogeneze i da je veoma retko pre menarhe. O godinama starosti, kao bitnom faktoru nastanka endometrioze, govori se još od 1983. godine kada je Von Recklinghausen otkrio i opisao bolest, koja je mnogo kasnije dobila naziv endometrioza. Bruser, 1955 godine, objavljuje rad o povezanosti između endometrioze i godina starosti (9). Studija koju zajednički izdaju Kelly i Schlademan pokazuje da je „najmladja pacijentkinja imala 20, a najstarija 65 godina“. Iznoseći sve ove podatke, Bruser i sam komentariše da postoji porast otkrivanja endometrioze i da je ova bolest čak u porastu kod osoba mlađih od 25 godina starosti. U poslednjih par dekada, posle sve učestalije, rutinske primene endoskopskih metoda i znanja da primarna dismenoreja kod mladih osoba može biti prouzrokovana endometriozom, bolest je dijagnostikovana i kod tinejdžerki (7). Slučaj najmladje pacijentkinje je opisao Schifrin (10). Bila je to devojčica, stara 12 godina, sa jednim nekomunikantnim uterusnim rogom. Endometrioza do sada nije opisana ni kod jedne osobe pre menarhe, dok je reaktivacija bolesti opisana samo kod nekoliko slučajeva u postmenopauzalnom dobu (11). U ovoj studiji prosečna starost pacijentkinja sa endometriozom je iznosila 32.13 ± 4.8 , dok je prosečna starost pacijentkinja bez endometrioze bila 32.8 ± 2.7 . Najmladja pacijentkinja u ispitivanoj grupi je imala 24, a najstarija pacijentkinja 42 godine. Velika Nemačka studija iznosi podatke da je u grupi starosne dobi 0-45 godina bilo 33814 pacijentkinja (80.36%), 23 pacijentkinje (0.05%) su bile mlađe od 15 godina. U grupi pacijentkinja starosne dobi 45-55 godina bilo je 7.19 pacijentkinja (17.09%) i u grupi pacijentkinja 55-95 godina bila je 1.074 pacijentkinja ili 2.55% (23).

Kada govorimo o drugim faktorima rizika do sredine 1960. godine, dominiralo je verovanje da crna rasa nosi specifični zaštitni imunitet od ove bolesti. Zaista, endometrioza je retko otkrivana kod siromašnjih crnkinja. Ali slično zapažanje postoji i za siromašne bele žene. Presudnu ulogu verovatno ima, ne rasni imunitet, već

socioekonomski faktor koji vodi do pelvičnih inflamatornih oboljenja i ranijih češćih trudnoća. Mada je pre II Svetskog rata, odnos crnih prema belim ženama sa endometriozom bio je 1:8 (12). 1964. Godine Lioyd objavljuje učestalost kod crnih pacijentkinja od 6,9% u posmatranoj grupi i učestalost endometroze kod belih pacijentkinja od 7,7%. Sva ova i mnogobrojna kasnija saopštenja ukazuju na to da rasa nema udela u nastanku i razvoju ovog oboljenja (8).

Duži period izražene estrogene aktivnosti deluje kao predisponirajući faktor, tako da je incidenca ovog oboljenja veća kod gojaznih pacijentkinja, a niža kod osoba sa smanjenom produkcijom endogenih estrogena kao što su sportistkinje ili žene pušači (24). Iz istih razloga endometrioza posle menopauze praktično izčezava. U našoj studiji prosečna vrednost BMI u ispitivanoj grupi je iznosila 23.50 ± 1.8 , dok je u kontrolnoj grupi iznosila 21.8 ± 1.8 . Nakon statističke analize došli smo do zaključka da postoji statistički značajna razlika između prosečnih vrednosti BMI kod pacijentkinja sa i bez endometrioze. ($p=0,015$). Pacijentkinje sa endometriozom imaju veći BMI, što se slaže sa aktuelnim svetskim podacima.

U našoj studiji, neplodnost je bila razlog za laparoskopsku hirurgiju kod 46,6% pacijentkinja sa endometriozom. Prethodne studije su pokazale da se endometrioza javlja u 30 – 40 % žena sa problemom neplodnosti. Pokazano je da je težak oblik ove bolesti povezan sa prisustvom adhezija u karlici, što dovodi do mehaničke blokade, sprečavanja fuzije spermatozoida i jajne ćelije. Takođe, pokazano je da žene sa endometriozom imaju veću verovatnoću za nastanak neplodnosti, čak i kada ovuliraju i imaju anatomski prohodne jajovode, iako nemaju priraslice ili anatomske nepravilnosti karlice. Sugerisano je da razlog neplodnosti može biti posledica disfunkcije ili ovulatornog luteinizirajućeg sindroma (LUF) (24, 25, 26).

Ispitujući povezanost endometrioze i infertiliteta, Kang i saradnici su pokazali da nivo ekspresije gena za E-cadherin može biti potencijalni molekularni marker za postojanje primarnog infertiliteta kod pacijentkinja sa ovarijalnom endometriozom (dodatak diskusije). Savremena istraživanje se bave ispitivanjem eutopičnom endometrijumom kod pacijentkinja sa endometriozom, kao i problemom implantacije koja je takodje kompromitovana. Shen i saradnici iznose podatke da je ekspresija Mucin-1 (MUC1) glikoproteina i ekspresija progesteronskih receptora u endometrijumu

pacijentkinja sa endometriozom smanjena, i to bi predstavljalo jedan od uzroka infertiliteta kod endometrioze (157).

CPP je veliki zdravstveni problem, koji je razlog za 10 % svih ambulantnih poseta ginekologu, kao i da je odgovoran za oko 40 % svih laparoskopskih procedura. Dobro je poznato da je CPP povezan sa endometriozom kod žena u reproduktivnom dobu (27, 28). U našoj studiji 43,3% pacijentkinja sa endometriozom je imalo CPP kao razlog laparoskopije. Nedvosmislena je pojačana estrogena aktivnost u endometriozu, odnosno poremećena je proizvodnja i metabolizam estrogena koji promovišu bolest. U endometriotičkom žarištu povišena je aktivnost ciklooksigenaze 2 (COX-2) i aromataze, a snižena aktivnost 17 β hidrosisteroiddehidrogenaze (17 β HSD). Rezultat je visok lokalni estradiol i prostaglandini – PgE2. Povišen nivo PgE2 i PgFa kod pacijentkinja sa endometriozom utiču na upalu i bol. Imajući u vidu da prisustvo bola u maloj karlici predstavlja veliki problem za svakodnevno funkcionisanje i čest razlog za lekarsku pomoć, mnogobrojna istraživanja su fokusirana na otkrivanje adekvatne minimalno invazivne terapije bola.

Najnovija istraživanja Lin i saradnika govore o značaju tradicionalne kineske medicine (TKM) u tretmanu bolnih menstruacija. Nakon obavljenih ispitivanja i procene intenziteta bola kod 70 pacijentkinja, a u trajanju od 12 nedelja, dolaze do zaključka da terapija TKM predstavlja metodu izbora u tretmanu dismenoreje kod pacijentkinja sa endometriozom (158).

Takođe, u našoj studiji kod 90% pacijentkinja kod kojih je potvrđena endometriozna je bio pozitivan uz nalaz, uglavnom su to bile pacijentkinje sa ovarijalnom endometriozom. Naši nalazi su u skladu sa objavljenim radovima u kojima TVU može precizno identifikovati endometriome, ali samo ako su dovoljno veliki (podaci u različitim studijama govore o veličini endometrioma između 40mm i 60mm). Endometriomi manji od 20 mm retko se detektuju preoperativno primenom TVU (29, 30). Srednja vrednost veličine endometrioma u našoj studiji je 3,37 cm.

Endometriomi su bili značajno češći na levom nego na desnom jajniku. Kada su uključeni i bilateralni endometriomi, 63,3 % je na levoj strani i 46,6 % na desnoj strani. Nalaz bočne asimetrije u nastanku endometrioma jajnika je kompatibilan sa anatomskim razlikama levog i desnog hemipelvisa (levi deo kolona, levi jajovod i levi

jajnika koji su češće pričvršćeni priraslicama u karlici) i podržavaju teoriju menstrualnog refluksa. Prečnik ciste nije u korelaciji sa stranom na kojoj su ciste locirane. Rezultati dobijeni u ovoj studiji su u skladu sa prethodno objavljenim podacima (31, 32, 33, 34). Ovu tvrdnju podržava i činjenica da se neendometriotične ciste sa podjednakom učestalošću javljaju na levoj i desnoj strani karlice (35).

Glavni razlog za sve veće interesovanje da se otkrije pouzdana neinvazivna dijagnostička metoda, je dug interval između prvog simptoma i uspostavljanja dijagnoze endometrioze. Otkriće pouzdane metode bi znatno skratilo ovo vreme, poboljšalo rezultat lečenja i smanjilo stopu recidiva bolesti (21).

Veliki broj studija je pokazao ulogu CA 125 glikoproteina u neinvazivnoj dijagnostici endometrioze. Koncentracija CA 125 je povećana u serumu pacijentkinja sa dijagnostikovanom endometriozom. Meta analiza Bedaiwy i saradnika je pokazala da senzitivnost CA 125 varira u širokom rasponu od 24% do 94 % (8). Prema meta analizi CA 125 test ima specifičnost od 89% u otkrivanju umerene i teške endometrioze (8). Značajnost CA 125 kod pacijentkinja sa blagom endometriozom je ograničena i pokazuje nezadovoljavajuću osetljivost i specifičnost (8). Senzitivnost CA 125 markera postignuta u ovoj studiji je bila 83,33 %, specifičnost 90%, a granična vrednost koncentracije CA 125 je 35 IU/ml. Takođe naša studija je pokazala postojanje statistički značajne razlike u vrednosti CA 125 između ispitivane i kontrolne grupe pacijentkinja. Povišenu vrednost CA 125 je imalo 26 pacijentkinja (65%), od kojih je 25 imalo potvrđenu dijagnozu endometrioze (96,2%). Rezultati našeg rada su u korelaciji sa do sada publikovanim i pokazali su značajnu kliničku primenu CA 125 markera u dijagnostici endometrioze na ispitivanoj grupi pacijenata.

Nedavno je predloženo da se CA 19-9 kao i serumski protein CEA koriste u dijagnostici endometrioze zajedno sa CA 125. Međutim prava korist ovih proteina kao serumskih biomarkera treba tek da se otkrije. Ca 19-9 kao i CA 125 je glikoprotein čije koncentracije su povišene kod pacijentkinja sa Tu jajnika (24). Mali broj studija je urađen sa ciljem da se utvrdi uloga CA 19-9 proteina kao potencijalnog markera endometrioze. Rezultati dobijenih studija su kontardiktorni. Kurdoglu je pokazao da je Ca 19-9 dragocen marker za dijagnozu endometrioze, a može se koristiti i za predviđanje pacijentkinja sa teškom endometriozom kada se koristi u korelaciji sa Ca

125 (22). U ovoj studiji pronašli su znatno viši nivo oba Tu markera Ca 125 i Ca 19-9 u serumu žena sa endometriozom. Harada i saradnici su nedavno poredili vrednosti Ca 19-9 i Ca 125 i sugerisali da su vrednosti Ca 19-9 korisnije za određivanje ozbiljnosti bolesti (19). Svi pacijenti sa povišenim nivoima CA 19-9 su imali težak oblik endometrioze sugerišući da bi to mogao biti test posebno pogodan za detektovanje teških oblika bolesti. Serumski nivoi Ca 19-9 se povećavaju u skladu sa napredovanjem kliničke faze bolesti bilo sami ili zajedno sa Ca 125. Sa druge strane Somigliana sa saradnicima detaljnim ispitivanjem nije dobio statističku značajnost CA 19-9 kao markera za endometriozu pojedinačno, kao ni u kombinaciji sa CA 125 (20). Naši rezultati su u skladu sa rezultatima objavljenim od strane Somigliana. Na uzorku od 40 pacijentkinja nismo dobili statističku značajnost CA 19-9 kao biomarkera endometrioze, samo 5 pacijentkinja (12,5%) je imalo povišenu vrednost Ca 19-9. Na osnovu ROC analize utvrđena je tacka preseka (cut-off vrednost) za Ca19-9 koja razdvaja dijagnostički pozitivne i negativne pacijentkinje sa endometriozom. Tacka preseka u ovoj studiji je 17. Postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti vrednosti $Ca19-9 \geq 17$ između ispitanica sa i bez endometrioze tj. pacijentkinje sa endometriozom imaju češće vrednosti $Ca19-9 \geq 17$ od pacijentkinja bez endometrioze.

Treći marker ispitivan u ovoj studiji je CEA složeni glikoprotein za koji postoje mnoge studije o njegovoj pozitivnoj prediktivnoj vrednosti kod različitih vrsta karcinoma (40, 41). Potvrđeno je da je povišen nivo CEA otkriven u naprednim fazama različitih karcinoma. Sa druge strane samo je nekolicina studija uključila ovaj marker u ispitivanja endometrioze. Naši rezultati su pokazali da je senzitivnost CEA markera jako mala. Sa druge strane u našoj ispitivanoj grupi pacijentkinja nije detektovano povećanje koncentracije markera u serumu iznad preporučene granične vrednosti. S obzirom na veličinu ispitivane grupe kao i samo jedan slučaj duboke infiltrativne endometrioze koji je dijagnostikovao kod ispitanica, moguće je da zato nismo detektovali povećanje koncentracije markera. Naravno ovaj rezultat ne može isključiti prognostički značaj ovoga markera u dijagnostici endometrioze, štaviše veća serija se zahteva da se proceni da li koncentracija ovog proteina može imati neku vrednost u otkrivanju specifičnih oblika endometrioze.

Veliki broj svetskih studija se bavi istaživanjem biomarkera (ili kombinacija biomarkera) u perifernoj krvi pacijentkinja sa endometriozom za koje se veruje da imaju veze sa patofiziologijom bolesti i da mogu biti od značaja za dijagnostiku endometrioze. Od skora su istraživanja naučnika fokusirana na promene u apoptozi kao glavnom uzročnom faktoru u nastajanju endometriotičnih implanta (159). Apoptoza je karakterističan oblik programirane ćelijske smrti, koju karakterišu biohemijski i morfološki događaji koji dovode do efikasnog uklanjanja ćelija iz tkiva bez izazivanja inflamatornog odgovora (160). Identifikovani su specifični geni koji kodiraju proteine odgovorne za iniciranje, napredovane i završetak ćelijske smrti, kao i geni koji kodiraju proteine odgovorne za inhibiciju apoptoze. Depalo i saradnici su analizirali cortex jajnika pacijentkinja sa i bez endometrioze, procenjujući ekspresiju pro-apoptičnih gena (BAX,BAC i p 53) i anti-apoptičnih gena (BCL2,BCL-XL i survivin (161). Proces apoptoze može biti odgovoran za atreziju folikula u stromi jajnika, ali je istovremeno odgovoran i za nastajanje endometriotičnih lezija na jajnicima (162). Obzirom na veličinu uzorka, ne mogu se doneti značajni zaključci, da li inhibicija apoptičnih procesa u korteksu jajnika dovodi do predispozicije za endometriozu. Još uvek nije jasno da li inhibicija apoptoze predstavlja svojstvo samog tkiva ili je rezultat mnogobrojnih ćelijskih i molekularnih interakcija odgovornih za proliferaciju ili apoptozu. Survivin je inhibitor apoptoze u ćelijskom ciklusu. Ranije studije su otkrile ekspresiju survivina u fetalnim tkivima i placenti i samo u nekim terminalno diferentovanim tkivima odraslih (163). Umesto toga, povišen nivo survivina zabeležen je u različitim vrstama tumora (164) i odnosi sa na smanjen nivo apoptoze. Medjutim, iako je znatno niži nivo nego u ćelijama karcinoma, mnoga normalna tkiva odraslih i različiti tipovi ćelija pokazuju ekspresiju Survivina (165). Prisustvo mRNA za survivin je takodje dokazano u normalnom ciklusu endometrijuma (166) sa najvišim nivoima u proliferativnoj fazi menstrualnog ciklusa (167, 168). Survivin ekspresija gena u humanom endometrijumu je regulisana polnim hormonima, pokazujući veći izraz posle tretmana estrogenima i smanjen nivo posle tretmana progesteronom (168). Slično karcinomu endometrijuma, prekomerna ekspresija Survivina je karakteristična i za nekoliko benignih promena endometrijuma kao što su endometrijalna hiperplazija (169) i endometrioz (170). Kod endometrioze ekspresija survivin gena je signifikantno veća u ektopičnim lezijama nego u eutopičnom endometrijumu (170, 171,172) i smanjen broj apoptičnih ćelija u

endometriotičnim lezijama je posledica over ekspresije survivina (170). U ranim stadijumima peritonealne lezije sa visokom proliferativnom aktivnošću pokazuju viši nivo survivina u poredjenju sa uznapredovalim lezijama, što može ukazivati da u početnim stadijumima skok survivina nastaje zbog pokušaja endometrijalnih fragmenata da se spasu od apoptoze (171). U endometriotičnim ovarijalnim cistama otkrivena je ekspresija survivina, sa maskimalnim novoima u mikrofokusima spoljašnje fibrozne kapsule (173).

Beliard i saradnici su pokazali da endometriotične ćelije imaju nižu osetljivost na apoptozu nego eutopične endometrijalne ćelije, stoga smanjena osetljivost tkiva endometrioze na apoptozu može biti povezana sa uspehom implantacije ovih ćelija na ektopičnim lokalizacijama (174). Imajući u vidu značaj survivina u normalnom funkcionisanju endometrijuma (168), njegovu over ekspresiju u endometriotičnom tkivu (170), smanjenu apoptičnu aktivnost endometriotičnih ćelija, gen survivina se može smatrati kao vrlo atraktivan gen kandidat za ispitivanje endometrioze.

PCR analizom survivin gen je dektovan u ektopičnom i u eutopičnom endometrijumu i ekspresija gena je udružena sa smanjivanjem apoptoze ćelije. Survivin praktično pomaže ektopičnom endometrijalnom tkivu da se izbori sa apoptozom kako bi opstali endometrijalni implantati. Gen za survivin se nalazi na 17q25 hromozomu, sastoji se od 4 egzona i 3 introna. Dve nove splice varijante koje se donose na isti fokus su nedavno opisane: Survivin 2B i Survivin EX3 (175). Mahotka et al (1999) je objavio da je uloga survivin EX3 očuvanje apoptoze, a uloga survivin 2B smanjivanje apoptičnih potencijala. Nasuprot ranijim studijama da se survivin ne pojavljuje u normalnim tkivima odraslih, skorašnje studije pokazuju da se survivin nalazi u koži, endometrijumu, endotelnim ćelijama, limfocitima iz krvi, pankreasu, slezini, debelom crevu (176, 177, 178, 179). Iamada et al. (2003) su takodje analizirali ekspresiju gena za survivin i obe splice varijante u uzorcima tkiva mozga i došli do zaključka da je mRNK za survivin izražena u malim količinama, a da su koncentracije survivina 2B i survivina EX3 nemejljive.

Sadašnja istraživanja pokazuju da eutopičan endometrijum žena sa ili bez endometrioze ima nižu ekspresiju gena za survivin, survivin 2B i survivin EX3. Smanjena ekspresija gena za Survivin i obe splice varijante u normalnih

diferencijalnim tkivima odraslih može se povezati sa smanjenom proliferativnom aktivnošću u poređenju sa neoplastičnim lezijama (179). Ekspresija gena za survivin u ektopičnom endometriju je znatno veća od ekspresije gena u eutopičnom endometriju dobijenog kod pacijentkinja sa ili bez endometrioze. Zanimljivo je da nivo mRNA za Survivin je znatno veći u crvenim lezijama u odnosu na crne lezije. Donnez et al. je sugerisao da endometrioza nastaje izlivanjem endometrijalnih ćelija u peritonealnu šupljinu tokom retrogradne menstruacije i da se crvene lezije koje imaju daleko veći proliferativni potencijal, mogu smatrati početnom fazom endometrioze-implantacije.(180) Uznapredovale lezije koje su najčešće plave ili crne su daleko manje aktivne od ranih lezija (181). Tako da prisustvo većih količina survivina u crvenim endometrijskim lezijama olakšava proces implantacije i nastajanja endometrioze u peritonealnoj šupljini. Goteri et al su pokazali da je koncentracija survivina znatno povećana i u endometriju jajnika, i da vrednosti survivina imaju uticaja na rast ciste. (182) Sadašnja istraživanja pokazuju da ne postoje statistički značajne razlike u ekspresiji gena za survivin i splice varijante u eutopičnom endometriju pacijentkinja sa ili bez endometrioze. Ekspresija gena za survivin i smanjenje apoptoze u endometrijskim lezijama može biti posledica uticaja različitih faktora rasta i citokina iz peritonealne tečnosti pacijentkinja sa endometriozom. (174). Stavovi o povezanosti ekspresije gena survivina i faze menstrualnog ciklusa su kontraverzni. Konno et al. 2000 navodi da je ekspresija gena survivina najveća u kasnoj sekretornoj fazi, dok Lehner et al 2002 navodi da je ekspresija gena najveća u proliferativnoj fazi.(176,167)

U ovoj studiji smo merili ekspresiju mRNA za survivin u perifernoj krvi ispitanica. Ekspresija survivina je zabeležena kod 22 (55%) ispitanica. Od 22 ispitanice sa ekspresijom survivina, kod njih 20 (90.9%) je potvrđena dijagnoza endometrioze, a kod 2 (9.1%) ispitanice nije. Postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti ekspresije survivina između ispitanica sa i bez endometrioze tj. pacijentkinje sa endometriozom imaju češće ekspresiju survivina od pacijentkinja bez endometrioze.

Performanse ekspresije survivina kao dijagnostičkog testa za endometriozu su sledeće: senzitivnost Sn=66.7%, specifičnost Sp=80%, pozitivna prediktivna vrednost PPV=90.9%, negativna prediktivna vrednost NPV=44.4% , stopa lažno pozitivnih

nalazaje 2/40 (5%) , stopa lažno negativnih nalaza je 10/40 (25%). Mabrouk i saradnici su takodje ispitali značaj nivoa ekspresije mRNA za Survivin i drugih biomarkera u dijagnozi endometrioze, senzitivnost ekspresije mRNA za Survivin je iznosila 75%, a stopa lažno pozitivnih nalaza je iznosila 10%. Oni su takodje analizirali senzitivnost prilikom kombinovanja vrednosti ekspresije mRNA za Survivin, nivo Ca125 i nivo Ca 19-9, koja je tada iznosila 87% u 10% lažno pozitivnih rezultata.(183)

Kao što znamo postoje ubedljivi dokazi da angiogeneza igra ključnu ulogu u ektopičnoj implantaciji endometrijalnog tkiva i u razvoju endometriotičnih lezija (181,184). Angiogeneza, de novo formiranje kapilara iz već postojećih krvnih sudova, podrazumeva intererakciju velikog broja čvrsto regulisanih molekula uključuju vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) koji se prepoznaje kao ključni angionege faktor (185, 184). VEGF je 23plus minus 45 kDa i predstavlja heparin vezujući glikoprotein endotelnih ćelija sa specifičnom mitogenom i vaskularno-permeabilnom aktivnošću (184). Vezujući se za jedan od nekoliko tirozin-kinaza receptora VEGF izaziva njihovu autofosforilaciju i dovodi do aktivacije mitogen-aktiviranih proteina (184). Otkrivena je ekspresija mRNK za VEGF u endometriotičnim lezijama i dokazano je da je ona veća u crvenim lezijama (aktivne) nego u crnim lezijama (stare), što je povezano sa višim vivoom vaskularizacije u crevnim lezijama (180). Ekspresija m RNK za VEGF je otkrivena u eutopičnom endometrijumu i ima ulogu u regulaciji krvavljenja tokom ciklusa (180, 185). Kada uporedimo ekspresiju mRNK VEGF u eutopičnom endometrijumu žena obolelih od endometrioze u odnosu na kontrolnu grupu zdravih žena, dolazimo do zaključka da je ekspresija mRNK VEGF veća u lutealnoj fazi kod žena obolelih od endometrioze (180, 185). Ovi rezultati pokazuju da pre nego što se javi retrogradna menstruacija, eutopično endometrijalno tkivo već ima veći kapacitet da promoviše svoju implantaciju na ektopičnim lokalizacijama kroz lučenje VEGF. Osim toga, nekoliko studija je pokazalao povišenu koncentraciju VEGF i njegovu povišenu angionege aktivnost u peritonelanoj tečnosti pacijetkinja obolelih od endometrioze (186,181, 184). Povećani nivoi VEGF u peritonealnoj tečnosti obolelih osoba mogu da ukazuju da je VEGF izmenjen i u serumu obolelih. Medjutim, Pellicer et al 1998 navodi da nema značajne razlike u nivoima VEGF u serumu pacijetkinja obolelih od endometrioze u odnosu na kontrolnu grupu.(187) Matalliotakis et al.2003 navodi blagu ali signifikantnu u koncentraciji VEGF u serumu u odnosu na kontrolnu grupu.(188)

Ovako kontraverzni rezultati mogu biti posledica malog broja do sada testiranih uzoraka. Postoje podaci koji ukazuju da VEGF može biti povišen i kod benignih ginekoloških oboljenja kao što su hiperplazija endometrijuma, abnormalna krvavljanja iz materice i ciste jajnika.(189, 190) Detekcija povišenih nivoa VEGF u serumu pacijentkinja sa endometriozom može imati veliki značaj za dijagnostiku endometrioze i za bolje razumevanje etiologije bolesti. Može se zaključiti da iako VEGF ima ključnu ulogu lokalno u razvoju endometriotičnih lezija, ne postoje značajne razlike u koncentraciji cirkulišućeg VEGF u serumu.

U našoj studiji kod ispitanica sa dijagnozom endometrioze, medijana razlike između ekspresije "house keeping" gena (GAPDH) i ekspresije VEGF-a je bila 8,55 (min -0.38, max 11.54). Kod ispitanica bez endometrioze, medijana razlike između ekspresije "house keeping" gena (GAPDH) i ekspresije VEGF-a je bila 10.17 (min 7.33, max 12.31). Postoji statistički značajna razlika u ekspresiji mRNA za VEGF-a između pacijentkinja sa i bez endometrioze. Pacijentkinje sa endometriozom imaju značajno veću vrednost ekspresije mRNA za VEGF (8,55 prema 10,17). Obzirom da je ekspresija gena prikazana kao razlika između ekspresije "house keeping" gena (GAPDH) i ekspresije VEGF-a, manja vrednost razlike ukazuje na veću ekspresiju gena. Na osnovu ROC analize utvrđena je tačka preseka (cut-off vrednost) za VEGF koja razdvaja dijagnostički pozitivne i negativne pacijentkinje sa endometriozom. Tačka preseka je 9,5. Postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti ekspresije VEGF prikazane kao razlika u ekspresiji "house keeping" gena i VEGF <9,5 između ispitanica sa i bez endometrioze, tj. žene sa endometriozom imaju česće razliku u ekspresiji ova dva gena manju od 9,5 od žena bez endometrioze. Detekcija povišenih nivoa ekspresije mRNA za VEGF u serumu pacijentkinja sa endometriozom može imati veliki značaj za dijagnostiku endometrioze i za bolje razumevanje etiologije bolesti.

Performanse ekspresije VEGF prikazane kao razlika u ekspresiji "house keeping" gena i VEGF <9,5 kao dijagnostičkog testa za endometriozu su sledeće: senzitivnost $S_n=80.0\%$, specifičnost $S_p=70.0\%$, pozitivna prediktivna vrednost $PPV=88.9\%$, negativna prediktivna vrednost $NPV=53.8\%$, stopa lažno pozitivnih nalaza je 3/40 (7.5%), stopa lažno negativnih nalaza je 6/40 (15%).

Mabrouk i saradnici su takodje ispitivali nivo ekspresije mRNA za VEGF u perifernoj krvi pacijentkinja sa bez endometrioze, i u njihovoj studiji nije bilo statistički značajne razlike u nivou ekspresije mRNA za VEGF između pacijentkinja sa i pacijentkinja bez endometrioze.(183)

Vodolazkaia i saradnici su u serumu pacijentkinja kod kojih postoji sumnja na endometriozu preoperativno određivali vrednosti VEGF u kombinaciji sa CA125,annexin V i ICAM-1 pri čemu su dobili senzitivnost 81-90%, a specifičnost je iznosila 63-81%.(191)

Imajući u vidu da je dijagnoza endometrioze teška i jako često odložena, zbog nespecifičnosti i kasnog pojavljivanja simptoma i upotrebe laparoskopije koja je limitirana raspoloživošću finansijskih sredstava, iskustvom hirurga kao i svojom inazivnošću, ja sam u ovoj studiji uradila i performanse kombinacije TVU, Survivina, ΔCT VEGF i CA 125. Može da se napravi i skor od kombinacije UZnalaz + survivin + ΔCT VEGF + Ca125. Tako da skor može da bude 0 što znači da žena nema ni jedan od ovih nalaza pozitivan, pa do gde žena ima sva 4 nalaza pozitivna. Onda taj skor može da podeli žene u dve grupe prema tome koliko ima pozitivnih nalaza. Cut off je 1. U tabeli br. 8 su prikazane performanse skora >1 kao dijagnostičkog testa za endometriozu

Tabela br. 8 Performanse kombinacije biomarkera i uz nalaza u dijagnostici endometrioze

Dg markeri	Sn	Sp	PPV	NPV	LP	LN	Tačnost
Survivin ekspresija	66.7	80	90.9	44.4	5.0	5	70
Δ CT VEGF<9.5	80.0	70.0	88.9	53.8	7.5	5	75
CA125>35	83.3	90.0	96.2	64.3	2.5	2.5	85
TVU	90.0	100	100	76.9	0	5	92.5
Diagnostic Score>1	93.3	90.0	96.6	81.8	2.5	0	92.5

6. ZAKLJUČAK

1. Odredjivanjem koncentracije CA125 u uzorku krvi ispitanica utvrđeno je sledeće:

CA 125 je odličan dijagnostički marker endometrioze, visoke senzitivnosti i specifičnosti, kao i velikog prognostičkog značaja. Određivanje njegove koncentracije zajedno sa drugim biohemijskim markerima predstavlja izazov za dalja istraživanja u neinvazivnoj dijagnostici kao i u prognozi kliničkog toka bolesti kao što je endometrioza.

2. Odredjivanjem koncentracije Ca19-9 u uzorku krvi ispitanica utvrđeno je sledeće:

Ca 19-9 nema statističku značajnost prilikom dijagnostike endometrioze, daleko je niže senzitivnosti i specifičnosti od Ca 125. Na osnovu ROC analize utvrđena je tačka preseka (cut-off vrednost) za Ca19-9 koja razdvaja dijagnostički pozitivne i negativne pacijentkinje sa endometriozom. Tačka preseka je 17. Postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti vrednosti $Ca19-9 \geq 17$ između ispitanica sa i bez endometrioze

3. Odredjivanjem koncentracije CEA u uzorku krvi ispitanica utvrđeno je:

Da ne postoji povećanje koncentracije CEA markera u serumu ispitivanih pacijentkinja iznad preporučene granične vrednosti, odnosno da nema statističke značajnosti ovog markera prilikom dijagnostike endometrioze.

4. Analizom preoperativnog uz nalaza ispitanica utvrđeno je sledeće :

TVU pregled kao dijagnostički test za ovarijalnu endometriozu ima visoku senzitivnost i specifičnost, i da je stopa lažno negativnih rezultata veća kod peritonealne endometrioze.

5. Odredjivanje ekspresije mRNA za survivin u uzorku krvi ispitanica utvrđeno je:

Pacijentkinje sa endometriozom imaju češću ekspresiju survivina od pacijentkinja bez endometrioe i da ekspresija mRNA za survivin kao dijagnostički test za endometriozu ima visoku senzitivnost i specifičnost.

6. Odredjivanjem ekspresije mRNA za VEGF u uzorku krvi ispitanica utvrđeno je sledeće:

Pacijentkinje sa endometriozom imaju značajno veću vrednost ekspresije mRNA za VEGF , odnosno postoji visoka statistička značajnost u ekspresiji VEGF-a između pacijentkinja sa i bez endometrioze. Na osnovu ROC analize utvrđena je tačka preseka (cut-off vrednost) za VEGF koja razdvaja dijagnostički pozitivne i negativne žene sa endometriozom .Tačka preseka je 9,5. Ekspresija mRNA za VEGF kao dijagnostički test za endometriozu ima visoku senzitivnost i specifičnost.

7. Skor (TVU nalaz + ekspresija survivin + Δ CT VEGF<9.5 + Ca125 >35) može da

Podeli pacijentkinje u dve grupe prema tome koliko ima pozitivnih nalaza. Cut off je 1. Navedeni skor kao dijagnostički test za endometriozu ima visoku senzitivnost i specifičnost.

8. Određivanje koncentracija biomarkera (CA 125, Ca 19-9 i CEA) kao i ekspresije mRNA za survivin i ekspresije mRNAVEGF uz TVU predstavlja jednostavan test koji može doprineti dijagnostici endometrioze, a da se pri tom izbegnu invazivne dijagnostičke metode kao što je laparoskopska hirurgija.

7. REFERENCE

1. Adamson GD. Endometriosis classification: an update. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2011;23:213-20.
2. Garcia- Velasco J.A. Rizik B.R. Endometriosis Current Management and Future trends. Jaypee Broth. Med. Pub.,St Louis,2010.
3. Janssen EB, Rijkers ACM, Hoppenbrouwers K, et al. Prevalence of endometriosis diagnosed by laparoscopy in adolescents with dysmenorrhoea or chronic pelvic pain: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2013; 19(5): 570-582.
4. Vigano P, Parazzini F, Somigliana E, et al. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004;18:177– 200.
5. Rier SE, Martin DC, Bowman RE, et al. Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fundam Appl Toxicol* 1993; 21(4): 433–441.
6. Kvaskoff M, Mu F, Terry KL, Harris HR, Poole EM, Farland L, Missmer SA. Endometriosis: a high-risk population for major chronic diseases? *Hum Reprod Update.* 2015. 11. pii: dmv013.
7. Kennedy S., Bergqvist A., Chapron C., et al. ESCRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum. Reprod.* 2005;20:2698-2704.

8. Crosignani P., Olive D., Bergqvist A., Luciano A. Advances in the management of endometriosis:an update for clinicians. Hum. Reprod. Update 2006; 12:179-189.
- 9.Farquhar C. Endometriosis, BMJ 2007; 334:249-253.
10. Laufer M.R., Sanfilippo J., Rose G. Adolescent endometriosis: diagnosis and treatment approaches. J. Pediatr. Adolesc. Gynecol 2003; 16:53-511.
11. Sampson JA: The development of the implantation theory for the origin of peritoneal endometriosis. Am J Obstet Gynecol 1940; 40:549.
12. Sampson JA: Perforating haemorrhagic (chocolate) cysts of the ovary. Their importance and especially their relation to pelvic adenomas of endometrial type („adenomyoma“ of the uterus, rectovaginal septum, sigmoid etc). Arch Surg.1921; 3:245.
13. Goodal JR: A study of endometriosis,Endosalpingosis, Endocervicosis and Peritoneoovarian sclerosis:A clinical and Pathological Study. Philadelphia, JB Lippincott, 1943.
14. Halme J,Hammond MG, Hulka JF, Raj SG: Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. Obstet Gynecol. 1984. 64:151.
15. Liu DTY, Hitchcock A: Endometriosis : Its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology.BR J Obstet Gynecol. 1986: 93:859.
16. Geist SH: The viability of fragments of menstrual endometrium. Am J Obstet Gynecol 1933; 25:751.

17. Markee JE: Menstruation intraocular endometrial transplants in the rhesus monkey. *Contrib Embriol* 1940; 28:223.
18. Lash A.F. and Rappaport H. Primary endometriosis og the cervics uteri. *Surg Gynecol Obstet.*1973: 77:576.
19. Hovak E.R, Joes G.S. and Jones H.W. endometriosis in E.R. Novak et all (eds), *Novak s Textbooh of Gynecol* (8th ed) Baltimore: Wiliams& Wilkins, 1970,p 390.
20. Halban H: Hysteroadenosis metastatica. Die Lyphogene Genese der sogenannte Adenofirbomatosis heterotopica. *Arch Gynecol.*1925; 124:457.
21. Ranney B. The prevention, inhibition, paliation and tretment of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.*1975: 123:775.
22. Cullen TS: Adenomyoma of the uterus. Phyladelphia WB Saunders, 1908.
23. Philip E, Huber H: Die Entstehung der Endometriose. Gleichzeitig ein Beitrag zur Pathologie des intestitielllen Tubenabschnittes. *Zentralbl Gynecol.*1939; 63:7.
24. Meyer R: Metaplasia Theory with inflamation as a Primary Inducing Factor: Adenomyosis, Adenofinrosis and Adenomyoma. In H.von Walter (ed), *Veit- Stockel Handbuch der Gynecol.* Munich: - Bergman, 1930.
25. Gruenwald P: Origin of endometriosis from the mezenchyne of the coelomic walls. *Am J Obstet Gynecol* 1942; 44:470.
26. Meyer R: Uber endometrium in der Tube, sowie uber die herausentstehenden wirklichen und vermantlichen Folgen; *Zentralbl Gynecol.*1927; 51:1482.

27. Pinkert TC, Catlow CCE, Straus R: Endometriosis of the urinary bladder in a man with prostatic carcinoma. *Cancer*.1979. 43:1562.
28. Levander G. Normann P: The patogenesis of endometriosis. An experimental study. *Acta Obstet Gynecol Scand*.1955; 34:366.
29. Russell WW: Aberrant portions of the Mullerian duct found in an ovari. Ovarian cystis of Mullerian origin. *Bull Johns Hopkins Hosp*.1899; 10:8.
30. Von Reckinghausen F: Adenomyomas and cystadenomas of the wall of the uterus and tube: Their origin as remnants of the wolffian body. *Wien Clin Woshenchr*.1896; 8:530.
31. Javert CT: Patogenesis of the endometriosis based on endometriol homeoplasia, direct extension, exfoliation and implantation, Lymphatic and hematogenous metastasis. Including five cave reports of endometrial tissue in pelvic Lymph nodes. *Cancer*,1949, 399.
32. Javert CT: Opsevation of the pathology and spread of endometriosis based on the theory of benign metastasis. *Am J Obstet Gynecol*.1951; 62:477.
33. Regidor PA, Vogel C, Regidor M, et al. Expression pattern of integrin adhesion molecules in endometriosis and human endometrium. *Hum Reprod Update* 1998; 4(5): 710–718.
34. Van der Linden PJ, de Goeij AF, Dunselman GA, et al. Expression of integrins and E-cadherin in cells from menstrual effluent, endometrium, peritoneal fluid, peritoneum, and endometriosis. *Fertil Steril* 1994; 61(1): 85–90.

35. Rai V, Hopkisson J, Kennedy S, et al. Integrins alpha 3 and alpha 6 are differentially expressed in endometrium and endometriosis. *J Pathol* 1996; 180(2): 181–187.
36. Scotti S, Regidor PA, Schindler AE, et al. Reduced proliferation and cell adhesion in endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2000; 6(7): 610–617.
37. Gaetje R, Kotzian S, Herrmann G, et al. Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule Ecadherin. *Am J Pathol* 1997; 150(2): 461–467.
38. Starzinski-Powitz A, Gaetje R, Zeitvogel A, et al. Tracing cellular and molecular mechanisms involved in endometriosis. *Hum Reprod Update* 1998; 4(5): 724–729.
39. Fukaya T, Sugawara J, Yoshida H, et al. Intercellular adhesion molecule-1 and hepatocyte growth factor in human endometriosis: original investigation and a review of literature. *Gynecol Obstet Invest* 1999; 47 (Suppl 1): 11–16.
40. Kupker W, Schultze MA, Diedrich K. Paracrine changes in the peritoneal environment of women with endometriosis. *Hum Reprod Update* 1998; 4(5): 719–723.
41. Hughesdon PE. The structure of endometrial cysts of the ovary. *J Obstet Gynaecol Br Emp* 1957; 64: 481–487.
42. Pabalan N, Jarjanazi H, Christofolini DM, Barbosa CP, Bianco B. Association of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene polymorphisms with endometriosis: a systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2015
43. Vercellini P, Aimi G, De GO, et al. Is cystic ovarian endometriosis an asymmetric disease? *Br J Obstet Gynaecol* 1998; 105(9): 1018–1021.

44. Rosenfeld DL, Lecher BD. Endometriosis in a patient with Rokitansky–Küster–Hauser syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 139(1): 105.
45. Nisolle M. Ovarian endometriosis and peritoneal endometriosis: are they different entities from a fertility perspective? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2002; 14(3): 283–288.
46. Meyer R. Über den stauung der frage der adenomyosites adenomyoma in allgemeinen und adenomyometritis sarcomastosa. *Zentralbl Gynakol* 1919; 36: 745–750.
47. Motta PM, Van Blerkom J, Mekabe S. Changes in the surface morphology of ovarian germinal epithelium during the reproductive life and in some pathological conditions. *Submicroscopy Cytol* 1992; 99: 664–667.
48. Goumenou AG, Arvanitis DA, Matalliotakis IM, et al. Loss of heterozygosity in adenomyosis on hMSH2, hMLH1, p16Ink4 and GALT loci. *Int J Mol Med* 2000; 6(6): 667–671.
49. Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 1997; 68(4): 585–596.
50. Mayr D, Amann G, Siefert C, et al. Does endometriosis really have premalignant potential? A clonal analysis of laser-microdissected tissue. *FASEB J* 2003; 17(6): 693–695.
51. Jimbo H, Hitomi Y, Yoshikawa H, et al. Evidence for monoclonal expansion of epithelial cells in ovarian endometrial cysts. *Am J Pathol* 1997; 150: 1173–1178.
52. Bischoff FZ, Heard M, Simpson JL. Somatic DNA alterations in endometriosis: high frequency of chromosome 17 and p53 loss in late-stage endometriosis.

J Reprod Immunol 2002; 55(1–2): 49–64.

53. Sampson JA. Intestinal adenomas of endometrial type. Arch Surg 1922; 5: 21–27.

54. Cullen TS. The distribution of adenomyomata containing uterine mucosa. Arch Surg 1920; 1: 215–283.

55. Vercellini P, Aimi G, Panazza S, et al. Deep endometriosis conundrum: evidence in favor of a peritoneal origin. Fertil Steril 2000; 73(5): 1043–1046.

56. Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. Obstet Gynecol Clin North Am 1997; 24(2): 235–258.

57. Tsukahara Y, Satoh M, Kato J, Fukamatsu Y, Funamoto H, Kitahara T, Fukuta T. Clinicopathologic investigation of ovarian endometriosis: a comparative study of cystic and non-cystic types. Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi. 1985;37(5):751-7.

58. Scurry J, Whitehead J, Healey M. Classification of ovarian endometriotic cysts. Int J Gynecol Pathol. 2001 ;20(2):147-54.

59. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. Lancet 2004; 364(9447): 1789–1799.

60. Machado-Linde F, Sánchez-Ferrer ML, Cascales P, Torroba A, Orozco R, Silva Sánchez Y, Nieto A, Fiol G. Prevalence of endometriosis in epithelial ovarian cancer. Analysis of the associated clinical features and study on molecular mechanisms involved in the possible causality. Eur J Gynaecol Oncol. 2015;36(1):21-4.

61. Donnez J, Nisolle M, Smoes P, et al. Peritoneal endometriosis and 'endometriotic' nodules of the rectovaginal septum are two different entities. *Fertil Steril* 1996; 66(3): 362–368.
62. Koninckx PR, Martin DC. Deep endometriosis: a consequence of infiltration or retraction or possibly adenomyosis externa? *Fertil Steril* 1992; 58(5): 924–928.
63. Beliard A, Donnez J, Nisolle M, et al. Localization of laminin, fibronectin, E-cadherin and integrins in endometrium and endometriosis. *Fertil Steril* 1997; 67(2): 266–272.
64. Osteen KG, Keller NR, Feltus FA, et al. Paracrine regulation of matrix metalloproteinase expression in the normal human endometrium. *Gynecol Obstet Invest* 1999;48 (Suppl 1): 2–13.
65. Kokorine I, Nisolle M, Donnez J, et al. Expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) is related to the activity of human endometriotic lesions. *Fertil Steril* 1997; 68(2): 246–251.
66. Nezhat FR, Pejovic T, Reis FM, Guo SW. The link between endometriosis and ovarian cancer: clinical implications. *Int J Gynecol Cancer*. 2014;24(4):623-8.
67. Marbaix E, Kokorine I, Moulin P, et al. Menstrual breakdown of human endometrium can be mimicked in vitro and is selectively and reversibly blocked by inhibitors of matrix metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9120–9125

68. Hill JA, Faris HM, Schiff I, et al. Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 1988; 50(2): 216–222.
69. Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 75(1): 1–10.
70. Oral E, Arici A. Pathogenesis of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997; 24(2): 219–233.
71. McLaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Hum Reprod Update* 2000;6(1): 45–55.
72. Sinaii N, Cleary SD, Ballweg ML, et al. High rates of autoimmune and endocrine disorders, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and atopic diseases among women with endometriosis: a survey analysis. *Hum Reprod* 2002; 17(10): 2715–2724.
73. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267:10931–10934.
74. Oosterlynck DJ, Meuleman C, Sobis H, et al. Angiogenic activity of peritoneal fluid from women with endometriosis. *Fertil Steril* 1993; 59: 778–782.
75. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod* 1996; 11: 220–223.
76. Smith SK. Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and the endometrium. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 509–519.

77. Donnez J, Smoes P, Gillerot S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod* 1998; 13: 1686–1690.
78. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC. "IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs". *Cancer Res.* 1998;58 (23): 5315–20.
79. Shi Y. Survivin structure: crystal unclear. 2006. *Nat. Struct. Biol.* 7 (8):
80. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptotic gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. 1998: *Nat. Med.* 3 (8): 917–21.
81. Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*. 2004;23 (16): 2825–37.
82. Ryan IP, Tseng JF, Schriock ED, et al. Interleukin-8 concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 1995; 63: 929–932.
83. Arici A, Tazuke SI, Attar E, et al. Interleukin-8 concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis and modulation of interleukin-8 expression in human mesothelial cells. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 40–45.
84. Arici A. Local cytokines in endometrial tissue: the role of interleukin-8 in the pathogenesis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 955: 101–109.
84. Mulayim N, Savlu A, Guzeloglu-Kayisli O, et al. Regulation of endometrial stromal cell matrix metalloproteinase activity and invasiveness by interleukin-8. *Fertil Steril* 2004; 81(Suppl): 904–911.

86. Akoum A, Kong J, Metz C, et al. Spontaneous and stimulated secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage migration inhibitory factor by peritoneal macrophages in women with and without endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 77: 989-994.
87. Kats R, Metz C, Akoum A. Macrophage migration inhibitory factor is markedly expressed in active and early-stage endometriotic lesions. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 883–889.
88. Hornung D, Ryan IP, Chao VA, et al. Immunolocalization and regulation of the chemokine RANTES in human endometrial and endometriosis tissues and cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1621–1628.
89. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K. Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4258–4265.
90. Matsuzaki S, Murakami T, Uehara S, et al. Expression of estrogen receptor α and β in peritoneal and ovarian endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 75: 1198–1205.
91. Bulun SE, Zeitoun KM, Takayama K, et al. Estrogen biosynthesis in endometriosis: molecular basis and clinical relevance. *J Mol Endocrinol* 2000; 25: 35–42.
92. Noble LS, Simpson ER, John A, et al. Aromatase expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 174–179.
93. Bulun SE, Gurates B, Fang Z, et al. Mechanisms of excessive estrogen formation in endometriosis. *J Reprod Immunol* 2002; 55: 21–33.

94. Noble LS, Takayama K, Zeitoun KM, et al. Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 600–606.
95. Nisolle M, Casanas-Roux F, Wyns C, et al. Immunohistochemical analysis of estrogen and progesterone receptors in endometrium and peritoneal endometriosis: a new quantitative method. *Fertil Steril* 1994; 4: 751–759.
96. Nisolle M, Casanas-Roux F, Donnez J. Immunohistochemical analysis of proliferative activity and steroid receptor expression in peritoneal and ovarian endometriosis. *Fertil Steril* 1997; 68: 912–917.
97. Farquhar C. Endometriosis, *BMJ* 2007;334:249-253.
98. Laufer M.R., Sanfilippo J., Rose G. Adolescent endometriosis: diagnosis and treatment approaches. *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol* 2003;16:53-511.
99. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Treatment of pelvic pain associated with endometriosis. *Fertil. Steril* 2008; S260-S269.
100. Crosignani P., Olive D., Bergqvist A., Luciano A. Advances in the management of endometriosis: an update for clinicians. *Hum. Reprod. Update* 2006;12:179-189.
101. Garcia-Velasco J.A., Rizik B.R. Endometriosis Current Management and Future trends, Jaypee Broth. Med. Pub., St. Louis, 2010.
102. Kennedy S., Bergqvist A., Chapron C., et al. ESHRE guideline for diagnosis and treatment of endometriosis- *Hum. Reprod.* 2005; 20:2698-2704.
103. Crosignani P., Olive D., Bergqvist A., Luciano A. Advances in the management of endometriosis: an update for clinicians. *Hum. Reprod. Update* 2006;12:179-189.

104. Guo S.W. Recurrence of endometriosis and its control. *Hum.Reprod.Update* 2009;15:441-461.
105. Stratton P, Berkley KJ. Chronic pelvic pain and endometriosis: translational evidence of the relationship and implications". *Hum. Reprod. Update* . 2011;17 (3): 327–46.
107. Ballard K, Lane H, Hudelist G, Banerjee S, Wright J. Can specific pain symptoms help in the diagnosis of endometriosis? A cohort study of women with chronic pelvic pain. *Fertil. Steril.* 2011. 94 (1): 20–7.
108. Garcia CR. David SS.: Pelvic endometriosis: Infertility and pelvic pain. *Am J Obstet. Gynecol.*1987. 129:740.
109. Willman EA, Collina Wp, Clayton SG. : Studies in the involmment of prostaglandin in uterine symptomatology and pathology. *Br J Obstet Gynecol.*1976. 83:337.
110. Ylikorkala O, Dawood MY.: New concepts in dysmenorrhoea. *Am J Obstet Gynecol.*1978;130:833.
111. Jordon VC, Pokoly TB.: Steroid et prostaglandin relations during the menstrual cycle. *Obstet. Gynecol.* 1977;49:449.
112. Willman EA, Collina WP, Clayton SG.: Studies in the involmment of prostaglandin in uterine symptomatology and pathology. *Br J Obstet. Gynecol.*1976; 83:337.
113. Caldwell B.V., Behram H.R.: Prostaglandin in reproductive processes. *Med Clin North Am.*1981; 65:927.

114. Zor U., Lamprecht SA.: Mechanism of Prostaglandin Action in Endocrine Glands. In G. Litwach (ed), Biochemical Actions of Hormones New York: Academic, 1977;,p 85.
115. Brosens I.A., Konincks P.R., Corve leyn P.A.: A study of plasma progesterone, oestradiol-17, prolactin and LH levels and of the luteal phase appearance of the ovaries in patients with endometriosis and infertility. Br J. Obstet Gynecol.1978;1 85:246.
116. Croxatto HB, Ortiz ME, Diaz S. et al: Studies on the duration of egg transport by the human oviduct: II Ovum location at various intervals following luteinizing hormone peak. Am J Obstet. Gynecol.1978; 132:629.
117. Croxatto WP., Ortiz ME., Guilof E et al: Effect of 15(S)-15-methyl prostaglandin F2 on human oviductal motility and ovum transport. Fertil. Steril.1978; 30:408.
118. Maathuis JB, Van Look PFA.: Changes in volume, total protein and ovarian steroid concentrations of peritoneal fluid through the human menstrual cycle. J Endocrinol.1978;76:123.
119. Chung HW, Wen Y, Chun SH, Nezhat C, Woo BH, Lake Polan M. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 mRNA expression in ectopic and eutopic endometrium in women with endometriosis: a rationale for endometriotic invasiveness. Fertil Steril.2001; 75:152–159.
120. Lundstrom V, Green K.,: Endogenous levels of prostaglandin F2 and its main metabolites in plasma and endometrium of normal and dysmenorrhoeic women. Am J Obstet. Gynecol.1978; 130:690.

121. Brummer H.C. and Gillespie.: Seminal prostaglandins and infertility. Clin Endokrinol. (Oxf.) . 1972;1:363.
- 122.Farquhar C. Endometriosis, BMJ 2007; 334:249-253.
- 123.Morales AJ, Murphy AA. Endoscopic treatment for endometriosis associated pain. Obstet and Gynecol Clin 1999;26:121-33.
124. Janssen EB, Rijkers ACM, Hoppenbrouwers K, et al. Prevalence of endometriosis diagnosed by laparoscopy in adolescents with dysmenorrhoea or chronic pelvic pain: a systematic review. Hum Reprod Update. 2013; 19(5): 570-82.
125. Nowak-Markwitz E, Michalak M, Spaczyński M. Prediction value of serum Ca 125 level in benefit secondary cytoreduction in advanced ovarian cancer patients. Wspólcz Onkol 2003; 7: 662-7.
126. Mihalyi A, Gevaert O, Kyama CM, et al. Non-invasive diagnosis of endometriosis based on a combined analysis of six plasma biomarkers. Hum Reprod 2010; 25: 654-64.
127. Bedaiwy MA, Falcone T. Laboratory testing for endometriosis. Clin Chim Acta 2004; 340: 41-56.
128. Maestranzi, S.; Przemioslo, R.; Mitchell, H.; Sherwood, RA. The effect of benign and malignant liver disease on the tumour markers CA19-9 and CEA. Ann Clin Biochem.1988; 35 (Pt 1): 99–103.
129. De Mais, Daniel. ASCP Quick Compendium of Clinical Pathology, 2nd Ed. ASCP Press 2009.

130. Hammarström S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. 1999; *Seminars in Cancer Biology* 9 (2): 67–81.
131. Perkins, G.; Slater, E.; Sanders, G.; Prichard, J. *American family physician*. 2003; 68 (6): 1075–1082.
132. Koprowski H, Herlyn M, Steplewski Z, Sears HF. Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma". *Science*. 1981; 212 (4490): 53–5.
133. Goonetilleke KS, Siriwardena AK. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol* .2007. 33 (3): 266–70.
134. Locker G, Hamilton S, Harris J, Jessup J, Kemeny N, Macdonald J, Somerfield M, Hayes D, Bast R. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer". *J. Clin. Oncol*. 2006.24 (33): 5313–276.
135. Altieri DC. Molecular cloning of effector cell protease receptor-1, a novel cell surface receptor for the protease factor Xa". *J. Biol. Chem*. 1994. 269 (5): 3139–42.
136. Sah NK, Khan Z, Khan GJ, Bisen PS. Structural, functional and therapeutic biology of survivin". *Cancer Lett*. 2008. 244 (2): 164–71..
137. Olie RA, Simões-Wüst AP, Baumann B, Leech SH, Fabbro D, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U "A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy". *Cancer Res*. 2000;. 60 (11): 2805–9.

138. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC. "IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs". *Cancer Res.* 1999; 58 (23): 5315–20.
139. Caldas H, Jiang Y, Holloway MP, Fangusaro J, Mahotka C, Conway EM, Altura RA. Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death". *Oncogene.* 2005; 24 (12): 1994–2007.
140. Hammarström S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissue. *Seminars in Cancer Biology.* 1999. 9 (2): 67–81.
141. Perkins, G.; Slater, E.; Sanders, G.; Prichard, J. "Serum tumor markers". *American family physician* 2003; 68 (6): 1075–1082.
142. Koprowski H, Herlyn M, Steplewski Z, Sears HF. Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma". *Science.* 1981; 212 (4490): 53–5.
143. Goonetilleke KS, Siriwardena AK. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer". *Eur J Surg Oncol.* 2007; 33 (3): 266–70.
144. Locker G, Hamilton S, Harris J, Jessup J, Kemeny N, Macdonald J, Somerfield M, Hayes D, Bast R. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer". *J. Clin. Oncol.* 2006; 24 (33): 5313–276.
145. Altieri DC. "Molecular cloning of effector cell protease receptor-1, a novel cell surface receptor for the protease factor Xa". *J. Biol. Chem.* 1994; 269 (5): 3139–42.

146. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Treatment of pelvic pain associated with endometriosis. *Fertil. Steril* 2008; S260-S269.
147. Endometriosis: Diagnosis et Management, *JOGC*,2010.
- 148: Davison L., J., Kennedy S., S., Moore J., Prentice A. Oral contraceptives for pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst. Revs* 2007;3:CD001019.
149. Sagsveen M., Farmer J.E., Prentice A., Breeze A. Gonadotrophin-releasing hormone analogues for endometriosis: bone mineral density. *Cochrane Database Syst. Revs.* 2003;4:CD 001297.
150. Crosignani P., Olive D., Bergqvist A., Luciano A. Advances in the management of endometriosis: an update for clinicians. *Hum. Reprod. Update* 2006;12:179-189.
151. Laufer M. R., Sanfilippo J., Rose G. Adolescent endometriosis: diagnosis and treatment approaches. *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol* 2003;16:53-511.
152. Selak V., Farquhar C., Prentice A., Singla A.A. Danazol for pelvic pain associated with endometriosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007;4:CD000068.
153. Bruser M. The common occurrence of endometriosis in young women. *Can Med Assoc J.*1955; 72: 190.
154. Schiffrin B. S, Erez S. and Moore J.G. Teenage endometriosis . *Am J Obstet Gynecol.*1973. 116: 973.
155. Haas D, Chvalat R, Reichert B, et al. Endometriosis: a premenopausal disease? Age pattern in 42079 patients with endometriosis. *Arch Gynecol Obstet.* 2012; 286(3): 667-670.

156. Ridley J.H. The histogenesis of endometriosis, a review of facts and fancies. *Obstet Gynecol Surv.*1968; 23:1.
157. Shen F, Yan C, Liu M, Feng Y, Chen Y. Decreased expression of mucin-1 in endometriosis endometrium correlated with progesterone receptor B involved in infertility. *Arch Gynecol Obstet.* 2014.
158. Lin PY, Tsai YT, Lai JN, Yeh CH, Fang RC. Bian zheng lun zhi as a complementary and alternative treatment for menstrual cramps in women with dysmenorrhea: a prospective clinical observation. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014;2014:460386.
159. Beliard, A., Noel, A., Foidart, J.M., 2004. Reduction of apoptosis and proliferation in endometriosis. *Fertil. Steril.* 82, 80–85.
160. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* .1972;26, 239–257.
161. Depalo R, Nappi L, Loverro G et al. Evidence of apoptosis in human primordial and primary follicles. *Human Reproduction.*2003; 18, 2678–2682.
162. Vaskivuo TE, Anttonen M, Herva R 2001 Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life: apoptosis, apoptosis-related proteins, and transcription factor GATA-4. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86, 3421–3429.

163. Ambrosini, G., Adida, C., Altieri, D.C.. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* 3, 917–921. ASRM, 1997. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil. Steril.* 67, 817–821
164. Altieri, D.C.. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene.* 2003; 22, 8581–8589.
165. Fukuda, S., Pelus, L.M. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol. Cancer Ther.* 2006; 5, 1087–1098.
166. Konno, R., Yamakawa, H., Utsunomiya, H., Ito, K., Sato, S., Yajima, A. Expression of survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.* 2006; 6, 529–534.
167. Lehner, R., Enomoto, T., McGregor, J.A., Shroyer, L., Haugen, B.R., Pugazhenti, U., et al., Correlation of survivin mRNA detection with histologic diagnosis in normal endometrium and endometrial carcinoma. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2002; 81, 162–167.
168. Nabils, N.H., Broaddus, R.R., McCampbell, A.S., Lu, K.H., Lynch, H.T., Chen, L.M., et al. Sex hormone regulation of survivin gene expression. *J. Endocrinol.* 2010; 207, 237–243.
169. Erkanli, S., Bolat, F., Kayaselcuk, F., Demirhan, B., Kuscu, E. COX-2 and survivin are overexpressed and positively correlated in endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 2007; 104, 320–325.

170. Ueda, M., Yamashita, Y., Takehara, M., Terai, Y., Kumagai, K., Ueki, K., et al., Survivin gene expression in endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*2002; 87, 3452–3459.
171. Fujino, K., Ueda, M., Takehara, M., Futakuchi, H., Kanda, K., Yamashita, Y., et al. Transcriptional expression of survivin and its splice variants in endometriosis. *Mol. Hum. Reprod.* 2006; 12, 383–388.
172. Zhang, H., Li, M., Zheng, X., Sun, Y., Wen, Z., Zhao. Endometriotic stromal cells lose the ability to regulate cell-survival signaling in endometrial epithelial cells in vitro. *Mol. Hum. Reprod.* 2009; 15, 653–663.
173. Goteri G, Lucarini G, Pieramici T, Filosa A, Pugnali A, Montik N, Biagini G, Tranquilli AL, Fabris G, Ciavattini A et al. Endothelial cell surviving is involved in the growth of ovarian endometriotic cysts. *Anticancer Res.*2005; 25,4313–4318.
174. Beliard, A., Noel, A., Foidart, J.M. Reduction of apoptosis and proliferation in endometriosis. *Fertil. Steril.*2004; 82, 80–85.
175. Mahotka C, Krieg T, Krieg A, Wenzel M, Suschek CV, Heydthausen M, Gabbert HE and Gerharz CD. Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. *Int J Cancer.*2002; 100,30–36.
176. Konno R, Yamakawa H, Utsunomiya H, Ito K, Sato S and Yajima A. Expression of survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium. *Mol Hum Reprod.*2000; 6,529–534.
177. Shinozawa I, Inokuchi K, Wakabayashi I and Dan K. Disturbed expression of the anti-apoptosis gene, survivin, and EPR-1 in hematological malignancies. *Leuk Res.*2000; 24,965–970.

179. O'Driscoll L, Linehan R and Clynes M. Survivin: Role in normal cells and in pathological condition. *Curr Cancer Drug Targets* 2003; 3,131–152.
180. Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F and Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod.*1998; 13,1686–1690.
181. McLaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Hum Reprod Update* 2000; 6,45–55.
182. Goteri G, Lucarini G, Pieramici T, Filosa A, Pugnaroni A, Montik N, Biagini G, Tranquilli AL, Fabris G, Ciavattini A et al. Endothelial cell surviving is involved in the growth of ovarian endometriotic cysts. *Anticancer Res.*2005;25,4313–4318.
183. Mabrouk M, Elmakky A, Caramelli E, Farina A, Mignemi G, Venturoli S, Villa G, Guerrini M, Manuzzi L, Montanari G, De Sanctis P, Valvassori L, Zucchini C, Seracchioli R. Performance of peripheral (serum and molecular) blood markers for diagnosis of endometriosis *Arch Gynecol Obstet.* 2012 ;285(5):1307-12.
184. Taylor, R.N., Lebovic, D.I. and Mueller, M.D. Angiogenic factors in endometriosis. *Ann. NY Acad. Sci.*,2002 955, 89±100.
185. Smith, S.K. Regulation of angiogenesis in the endometrium. *Trends Endocrinol. Metab.*2001, 12, 147±151.
186. Oosterlynck, D.J., Meuleman, C., Sobis, H., Vandeputte, M. and Koninckx, P.R. Angiogenic activity of peritoneal fluid from women with endometriosis. *Fertil. Steril.*, 1993; 59, 778±782.
187. Pellicer, A., Albert, C., Mercader, A., Bonilla-Musoles, F., Remohi, J. and SimoÂn, C. The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. *Fertil. Steril.*,1998; 70,425±431.

188. Matalliotakis, I.M., Goumenou, A.G., Koumantakis, G.E., Neonaki, M.A., Koumantakis, E.E., Dionyssopoulou, E., Athanassakis, I. and Vassiliadis, S. Serum concentrations of growth factors in women with and without endometriosis: the action of anti-endometriosis medicines. *Int. Immunopharmacol.*, 2003; 3, 81±89.
189. Fasciani, A., D'Ambrogio, G., Bocci, G., Luisi, S., Artini, P.G. and Genazzani, A.R. Vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in ovarian cystic pathology. *Fertil. Steril.*, 2001; 75, 1218±1221.
190. Shaarawy, M. and El-Sharkawy, S.A. Biomarkers of intrinsic angiogenic and anti-angiogenic activity in patients with endometrial hyperplasia and endometrial cancer. *Acta Oncol.*, 2001; 40, 513±518.
191. Vodolazkaia A, El-Aalamat Y, Popovic D, Mihalyi A, Bossuyt X. Evaluation of panel of biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Hum. Reprod.* 2012 Sep;27(9):2698-711.

SPISAK SKRAĆENICA

ECM - ekstracelularni matriks

MMP - matriks metaloproteinaza

TNF - tumor necrosis factor

NMR - nuklearna magnetna rezonanca

CRP - C reaktivni protein

CPP - hronični bol u maloj karlici

LUF - luteinizirajući nerupturirani folikul

VTO - vantelesna oplodnja

KOK - kombinovana oralna kontracepcija

TVU - transvaginalni ultrazvuk

VEGF - vascular endotel grow factor

Sn - senzitivnost

Sp - specifičnost

PPV - pozitivna prediktivna vrednost

NPV - negativna prediktivna vrednost

LP - lažno pozitivno

LN - lažno negativno

BIOGRAFIJA

Dr Milena Aćimović je rođena 20. marta 1971. godine u Požegi, Srbija. Na Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala se školske 1990./91. a diplomirala jula 1996. godine s prosečnom ocenom 9,80 (devet-osamdeset).

Lekarski staž je obavila u Opštoj bolnici u Užicu u periodu 1996/97. godine. Stručni ispit za doktora medicine položila je u oktobru 1997. godine. Specijalizaciju iz ginekologije i akušerstva obavila je u Opštoj bolnici u Užicu i na "GAK– Višegradska" 2000.-2004. godine, a specijalistički ispit sa odličnom ocenom položila je decembra 2004. godine. Magistarske studije na smeru Humana reprodukcija upisala je 1997. godine na Medicinskom fakultetu Univeziteta u Beogradu, a magistarsku tezu pod nazivom "Značaj miomektomije u lečenju neplodnosti ", odbranila je sa odličnim uspehom juna 2007. godine. Užu specijalizaciju pod nazivom Sterilitet i fertilitet upisala je na Medicinskom fakultetu u Beogradu školske 2013./2014. godine. Usmeni ispit uže spicijalizacije, položila je 12.02.2015. godine sa ocenom deset. Izrada završnog rada pod nazivom "Biomarkeri u dijagnostici endometrioze" u toku. Dr Milena Aćimović je zaposlena na odeljenju Ginekologije i akušerstva Opšte bolnice u Užicu na radnom mestu načelnika odeljenja.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Milena Aćimović

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

"Značaj neinvazivnih dijagnostičkih metoda endometrioze u odnosu na invazivne metode"

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranta

U Beogradu, 09.09.2015. godine



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Milena Aćimović

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada "Značaj neinvazivnih dijagnostičkih metoda endometrioze u odnosu na invazivne metode"

Mentor Prof. dr Gordana Lazović Radonjić

Potpisani Milena Aćimović


izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranta

U Beogradu, 09.09.2015. godine



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

"Značaj neinvazivnih dijagnostičkih metoda endometrioze u odnosu na invazivne metode"

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

U Beogradu, 09.09.2015. godine

Potpis doktoranta

