

Molekularni označevalci endometriozе – možnost razvoja neinvazivne diagnostike?

Molecular biomarkers of endometriosis – an option for non-invasive diagnostics?

Tea Lanišnik Rižner

*Inštitut za biokemijo,
Medicinska fakulteta,
Ljubljana, Slovenija*

Korespondenca/ Correspondence:

Tea Lanišnik Rižner,
e: tea.lanisnik-rizner@mf.uni-lj.si

Ključne besede:

proteomika;
transkriptomika;
metabolomika;
biokemijski označevalci

Key words:

proteomics;
transcriptomics;
metabolomics; biomarker
discovery

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2014;
83: 782–91

Prispelo: 17. dec. 2013,
Sprejeto: 3. jul. 2014

Priprava članka je
potekala v okviru
projekta ARRS J3–4135.

Izvleček

Endometriozа je zelo pogosta ginekološka bolezen, ki predstavlja razrast endometriju podobnega tkiva zunaj maternične votline. Ocenjujejo, da se ta bolezen pojavlja pri 35–50 % neplodnih bolnic in do 10 % vseh žensk v rodni dobi. Trenutno diagnosticiranje minimalne in blage oblike endometriozе poteka le invazivno z laparoskopijo, kar kaže na velik pomen proučevanja molekularnih označevalcev, primernih za neinvazivno diagnostiko. V zadnjih letih je razvoj globalnih metodoloških pristopov, t.i. “omik”, omogočil identifikacijo številnih novih molekularnih označevalcev endometriozе. V tem preglednem članku so predstavljeni različni pristopi iskanja molekularnih označevalcev endometriozе ter označevalci z najboljšimi diagnostičnimi značilnostmi. Sledi ocena trenutnega stanja na področju diagnostičnih označevalcev endometriozе ter ocena možnosti njihovega prenosa v klinično prakso.

Abstract

Endometriosis is a common gynaecological disease defined as a presence of endometrial-like tissue outside the uterine cavity. Estimates show that this disease affects up to 10 % of premenopausal women and 35 %-50 % of women with infertility. At present, minimal and mild stages of endometriosis can only be unequivocally diagnosed invasively, using laparoscopy. There is thus an urgent need for discovery of biomarkers for non-invasive diagnosis. With the introduction of ‘omics’ methodologies, we have witnessed immense progress in the field of biomarkers of endometriosis. This paper overviews different approaches to the discovery of biomarkers and presents biomarkers with the highest diagnostic potential. Current status in the field of endometriosis biomarker discovery and their potential for clinical use are discussed.

Endometriozа

Endometriozа je pogosta ginekološka bolezen, ki predstavlja razrast endometriju podobnega tkiva zunaj maternične votline. Ocenjujejo, da se ta bolezen pojavlja kar pri 6–10 % žensk v rodni dobi in 30–50 % žensk z bolečinami v medenici in/ali neplodnostjo.¹ V svetovnem merilu endometriozа prizadevne kar 176 milijonov žensk.² Pri bolnicah z

endometriozo se endometrijsko tkivo oziroma t. i. endometriotična žarišča pojavljajo v različnih predelih peritonealne votline. Na osnovi razlik v mestu in naravi žarišč ločimo tri oblike endometriozе z različno etiologijo in patogenezo: endometriozo jajčnika, peritonealno endometriozo in globoko infiltrativno endometriozo.^{3,4} V redkih primerih

endometriju podobno tkivo najdemo tudi zunaj peritonealne votline v plevri ali celo v možganih.^{5,6} Na osnovi popravljene razvrstitve ameriškega združenja za plodnost (*angl.* Revised American Fertility Society Classification of Endometriosis) endometriozo delimo v minimalno (I. stadij), blago (II. stadij), zmerno (III. stadij) in hudo obliko (IV. stadij).⁷ Patogeneza endometrioze je zelo kompleksna in vključuje tvorbo adhezij, razgradnjo zunajceličnega matriksa, angiogenezo, proliferacijo, zmanjšano apoptozo, motnje v celični komunikaciji, spremenjen imunski odziv, spremenjeno sposobnost diferenciacije in druge patofiziološke procese.⁸ Vseh vidikov endometrioze ne moremo razložiti z eno samo teorijo. Razvoj endometrioze tako najpogosteje razlagamo s teorijo retrogradne menstruacije, v povezavi z motenim imunskim sistemom; pa tudi s teorijama metaplazije celomskega epitela, transplantacije preko limfnega in žilnega sistema ter teorijo ostankov Müllerjevih vodov.⁸⁻¹⁰

Neinvazivna diagnostika endometrioze

Simptomi endometrioze so nespecifični, zato je diagnosticiranje te bolezni problematično.¹¹ Trenutno je zlati standard v diagnostiki še vedno laparoskopija, ki omogoča neposreden pregled medeničnih organov. Ta diagnostični pristop je povezan tudi z zapleti, ki pa so dokaj redki. Tudi laparoskopski pregled ni vedno zanesljiv, zato ga je potrebno dopolniti s histološko analizo. Zaradi nespecifičnih simptomov in invazivne diagnostike je povprečen čas od pojava simptomov do postavljene diagnoze 6,7 let.¹ Raziskava evropskega društva za endometriozo (*angl.* European Endometriosis Alliance) je razkrila, da so kar 65 % od 7.025 v študijo vključenih bolnic z endometriozo postavili napačno diagnozo, 46 % bolnic pa je moralo obiskati pet ali več zdravnikov, preden so jim postavili pravo diagnozo.¹² Trenutno uporabnih molekularnih označevalcev za neinvazivno diagnostiko ne poznamo. Edini biokemijski označevalec, ki se bolj ali manj pogosto uporablja v rutinski diagnostiki, je CA-125. Ta označevalec dia-

gnosticira predvsem zmerno in hudo obliko (III-IV) endometrioze, medtem ko ima v splošnem občutljivost 24–94 % pri običajni mejni koncentraciji 35 U/ml.¹¹ Pri diagnosticiranju endometrioze se uporabljajo tudi ultrazvok, računalniška tomografija in magnetno resonančno slikanje, vendar pa je, v primerjavi z laparoskopijo, natančnost teh diagnostičnih metod slabša.^{1,13,14} Eden od zaključkov zadnjega svetovnega kongresa endometrioze leta 2011 je bil, da razvoj zanesljive zgodnje neinvazivne diagnostike endometrioze predstavlja prednostno področje.¹ Ocenjujejo, da ima do 45 % neplodnih bolnic z rednimi menstrualnimi cikli endometriozo, pri teh bolnicah bi bil neinvazivni diagnostični test neprecenljiv, saj bi omogočil zgodnjo diagnosticiranje in kirurško odstranjevanje manj razraščanih endometriotičnih žarišč, kar bi pri teh bolnicah lahko izboljšalo plodnost.^{15,16}

Različni pristopi iskanja molekularnih označevalcev endometrioze

Biološki označevalec je lastnost, ki jo lahko objektivno merimo in ocenimo kot kazalnik normalnih bioloških procesov, patoloških procesov ali farmakoloških odzivov na zdravljenje.¹⁷ Med molekularne oz. biokemijske označevalce pa uvrščamo proteine, lipide, metabolite, RNA in druge molekule. Pred tremi leti je May s sodelavci¹¹ sistematično pregledal označevalce endometrioze. Kakovost posameznih študij je ocenil na osnovi meril za oceno kakovosti študij diagnostične natančnosti (*angl.* Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies, QUADAS).^{18,19} Čeprav je več kot 100 označevalcev endometrioze ustrezalo merilom izbora, pa med njimi niso našli niti enega označevalca ali nabora označevalcev, ki bi bil primeren za klinično uporabo.¹¹ V zadnjih letih se število identificiranih označevalcev endometrioze s precejšnjim diagnostičnim potencialom hitro povečuje, saj so se tudi na tem področju uveljavili globalni pristopi proteomike, transkriptomike in metabolomike.²⁰

Molekularne oz. biokemijske označevalce za neinvazivno diagnostiko so z različnimi metodološkimi pristopi doslej iskali predvsem v periferni krvi, serumu ali plazmi in v urinu.^{11,15} S tarčnimi študijami so označevalce našli med posameznimi proteini ali metaboliti in med nabori proteinov. Večje število označevalcev so našli tudi z netarčnimi globalnimi pristopi. Nekatere študije so temeljile na predhodnih študijah diferenčnega izražanja genov v evtopičnem in ektopičnem endometriju in na vnaprej postavljeni hipotezi, pri globalnih pristopih pa se je hipoteza najpogosteje razvila med študijo.

Posamezni proteini kot označevalci endometrioze

V diagnostiki endometrioze se v določenih primerih uporablja tudi označevalec raka jajčnikov CA-125. Szubert in sodelavci so pred kratkim preverjali uporabnost tega označevalca pri 44 bolnicah z endometrioza. Primerjava preiskovane in kontrolne skupine, ki je vključevala 15 neplodnih bolnic, bolnic z bolečinami v medenici, z benignimi ovarijskimi cistami in policističnimi jajčniki je pri mejni koncentraciji 11 U/ml razkrila občutljivost 68 % in specifičnost 67 % (Tabela 1).^{21,22} Pokazali so, da ima CA-125 boljše diagnostične značilnosti pri bolnicah z endometrioza zmerne in hude oblike (III in IV); pri mejni koncentraciji 14,7 U/ml so poročali o občutljivosti 92 % in specifičnosti 87 %^{21,22} in s tem potrdili nekatere prejšnje študije.¹¹ Kot možen označevalec endometrioze so proučevali tudi novejši označevalec epitelnega raka jajčnikov HE-4, ki je vključen v algoritem ROMA,²³ vendar v tem primeru med preiskovano in kontrolno skupino niso našli razlik.^{21,22}

Kot diagnostične označevalce so proučevali tudi proteine, ki se izločajo iz endometrija in endometriotičnih žariščih, kot so urokortin, aktivin A, folistatin, glikodelin A, in vaskularni endotelijski rastni faktor A (VEGF-A).²⁴⁻²⁷ V nasprotju z objavami¹¹ Tokmak s sodelavci in Reis s sodelavci nista našla razlik v koncentraciji urokortina in folistatina pri bolnicah z endometrioza.²⁴⁻²⁷ Poročali pa so o povišani koncentraciji pro-

teina aktivin A, z nizko občutljivostjo 30 % in specifičnostjo 90 %.²⁵ Naša skupina je pred kratkim izmerila višje koncentracije proteina glikodelin A pri 57 bolnicah z ovarijsko endometrioza v primerjavi s kontrolno skupino, ki je vključevala 11 bolnic z benignimi ovarijskimi cistami in 31 zdravih žensk.²⁶ Diagnostični model, ki je vključeval starost, indeks telesne mase (ITM) in koncentracijo proteina glikodelin A, je pri mejni koncentraciji 2,1 ng/ml pokazal občutljivost 82,1 % in specifičnost 78,4 % (Tabela 1).²⁶ Tudi v primeru proteina VEGF-A so poročali o statistično značilno višjih koncentracijah pri 30 bolnicah z zmerno in hudo obliko endometrioze (III-IV) v primerjavi s 30 neplodnimi bolnicami s kroničnimi bolečinami v medenici ali brez njih.²⁷ V primerjavi s CA-125 je določanje koncentracije proteina VEGF-A pri mejni koncentraciji 680 pg/ml razkrilo boljši diagnostični potencial z občutljivostjo kar 93,3 % in specifičnostjo 96,7 % (Tabela 1).²⁷ Poudariti je treba, da so vse omenjene študije vključevale sorazmerno majhno število bolnic in kontrolnih oseb ter predstavljajo le fazo odkrivanja diagnostičnih označevalcev. Zato so potrebne še nadaljnje študije validacije.

Avtoprotitelesa kot diagnostični označevalci endometrioze

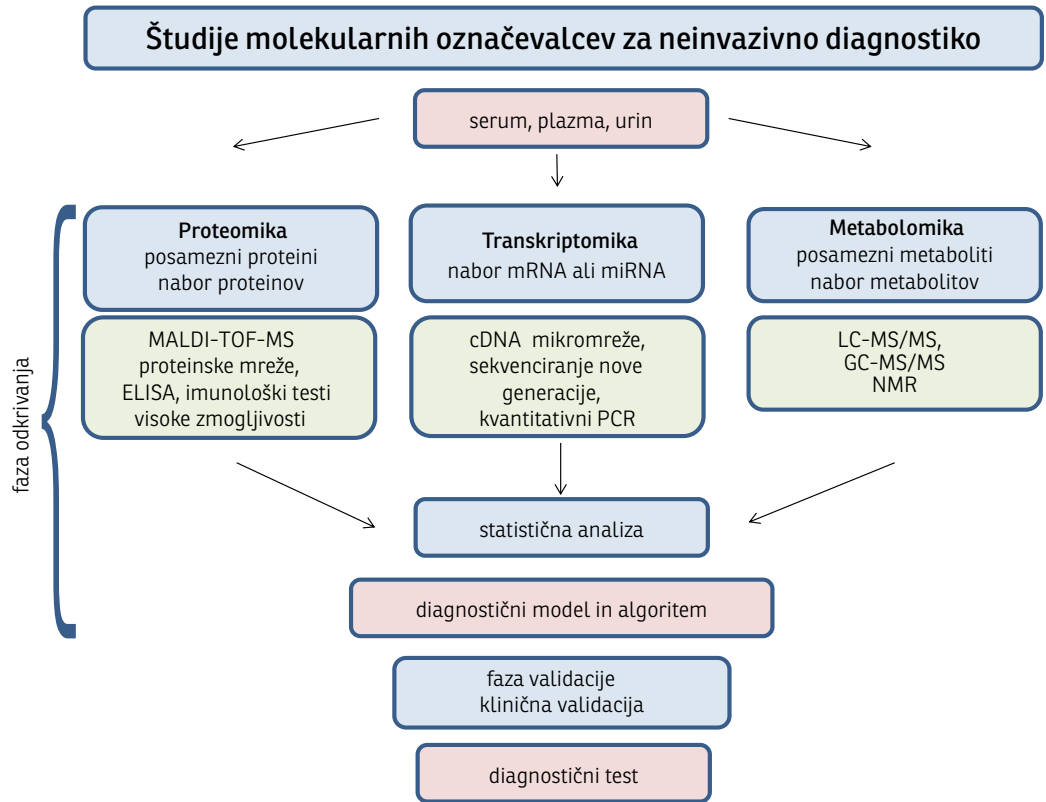
Endometrioza ima nekatere značilnosti avtoimunih bolezni,²⁸ zato so avtoprotitelesa možni označevalci te bolezni.¹¹ V zadnjih letih so proučevali avtoprotitelesa proti proteinom mezotelijskih in fibroblastičnih celičnih linij, ki predstavljajo modelne celice okolja v peritonealni votlini.²⁹ Pri bolnicah z endometrioza so tako dokazali prisotnost avtoprotiteles proti proteinom teh celičnih linij, pa tudi proti s tumorji povezanim antigenom.³⁰⁻³³ Pred kratkim je v dobro načrtovani in validirani študiji Gajbhiye s sodelavci³⁴ poročal o statistično značilno višjih koncentracijah avtoprotiteles proti trem endometrijskim proteinom (tropomiozinu 3, stomatinu-podobnemu proteinu 2 in tropomodulinu (TMOD)) pri bolnicah z endometrioza v primerjavi s kontrolno skupino.

Tabela 1: Potencialni molekularni označevalci endometrioze.

Študija	Analit	Vzorec	Preiskovana skupina	Kontrolna skupina	Model
Szubert 2012 ²¹	CA-125	serum	44 bolnic; F faza; 10 I, 17 II, 11 III, 1 IV,	15 kontrol (neplodnih bolnic, z bolečinami v medenici, BOC, PCO)	E III/IV/ kontrole CA-125 > 14,7 U/ml OBČ: 92 %; SP: 87 %
Kocbek 2013 ²⁵	glikodelin A	serum	57 bolnic; 3 I, 9 II, 34 III, 11 IV; 37 P, 20 S faza; starost: 32,9 ± 5,6, ITM: 21,8 ± 3,5	42 kontrol (31 zdravih žensk, 11 bolnic z BOC), 20 P, 22 S faza starost: 38,4 ± 5,8, ITM: 24,8 ± 4,3	OE I-IV/kontrole glikodelin A + starost + ITM OBČ: 82 %; SP: 78 %
Mohamed. 2013 ²⁶	VEGF-A	serum	30 bolnic, III-IV; F faza; 16 (18–30 let), 14 (31–40 let)	30 kontrol (neplodne ženske z/brez bolečin v medenici); F faza; 13 (18–30 let), 17 (31–40 let)	E III-IV/kontole VEGF-A > 680 pg/ml OBČ: 93 %; SP: 97 % CA-125 > 35 U/ml OBČ: 70 %; SP: 83 %
Gajbhiye 2012 ³³	avtoproti-telesa	serum	Faza odkrivanja: 40 bolnic, 17 I-II, starost: 29,8 ± 4,0; 23 III-IV; starost: 32,3 ± 5,4 Faza potrjevanja: 50 bolnic, 18 I-II; starost: 31,8 ± 5,9; 32 III-IV; starost: 32,9 ± 5,0	Faza odkrivanja: 30 kontrol starost: 28,9 ± 5,3 Faza potrjevanja: 27 kontrol starost: 29,8 ± 4,3	avtoprot. proti-TMOD3c E/kontrole OBČ: 82 %; SP: 93 % E I-II/kontrole OBČ: 78 %; SP: 93 % CA-125 E/kontrole OBČ: 32 %; SP: 89 %
Mihalyi 2010 ³⁴	IL-6, IL-8, TNF α , hsCRP, CA-125, CA19-9	plazma	201 bolnic 132 I-II; (25 M, 60 P, 47 S faza); 69 III-IV (15 M, 23P, 31 S faza)	93 neplodnih bolnic (19 M, 36 P, 38 S faza)	IL-6, TNF α , CA-125: E III-IV/kontrole OBČ: 100 %; SP: 84 % IL-6, TNF α : E I-II / kontrole OBČ: 87 %; SP: 71 %
VodoLazkaia 2012 ³⁷	28 označevalcev	plazma	232 bolnic, starost: 31,2 ± 4,0; 148 I-II, 84 III-IV (83 M, 135 F, 135 L faza), faza odkrivanja (155); faza potrjevanja (77)	121 neplodnih žensk, starost: 31,7 ± 5,3 faza odkrivanja (80 kontrol; 19 M, 29 F, 32 L faza); faza potrjevanja 41 kontrol (8 M, 17 F, 16 L faza)	1. model : annexin V + VEGF + CA-125 + glikodelin A; 2. model: annexin V+ VEGF+ CA-125+ siCAM-1; v M fazi; E, ki je UZ ne zazna: OBČ: 81–90 %; SP: 68–81 %
Zheng 2011 ⁴²	peptidi in proteini	serum	126 bolnic (50 I-II, 76 III-IV), starost: 29,0 ± 2,6; faza odkrivanja (70); faza potrjevanja (56)	120 zdravih žensk, starost: 33,1 ± 2,9 faza odkrivanja (60), faza potrjevanja (60)	E I-IV/kontrole 3 peptidi (m/z 5988,7; 7185,3 in 8929,8) OBČ: 89 %-91 % SP: 90 %-95 %
El-Kasti 2011 ³⁹	peptidi	urin	23 bolnic, starost: 35 (20–46); ITM: 25 (19–39); I-IV	16 kontrol (neplodnost, bolečine v medenici); starost: 35 (26–50); ITM: 27 (20–35)	E III-IV/kontrole 1 767,1 Da v pO fazi OBČ: 75 %; SP: 85 %
Wang 2013 ⁴⁶	765 miRNA	serum	Faza odkrivanja: 10 Faza preverjanja: 60 (41 OE, 19 PE, 18 z DIE); ITM: 20,6 (14,5–24,9); starost: 34,4 (20–58); 42 F, 18 L faza; 17 I, 5 II, 14 III, 24 I	Faza odkrivanja: 10 Faza preverjanja: 25 ITM: 20,6 (16,7–27,9); starost: 30,0 (24–39); 22 F, 3 L faza	E/ kontrole miR-199a, miR-122, miR-145*, miR-542-3p OBČ: 93 %; SP: 96 %
Vouk 2012 ⁶⁰	140 lipidov	plazma	40 bolnic (14 OE, 20 OE + PE, 6 OE + PE + GIE); 12 P, 8 PP/ZS, 20 S faza; starost: 33,3 ± 6,1; ITM: 20,9 ± 2,7	52 zdravih žensk; 17 P, 11 LP/ZS, 21 S faza, 2 ND, 1 NP; starost: 40,6 ± 3,1; ITM: 25,7 ± 4,1	E III-IV/kontrole SMOH C16:1 + PCaa C36:2/ PCae C34:2 + starost + ITM OBČ: 90 %; SP: 84 %

Legenda: BOC – benigne ovarijske ciste, E – bolnice z endometriozo, F – folikularna faza, GIE – globoka infiltrativna endometrijoza, ITM – indeks telesne mase, L – lutealna faza, M – menstruacijska faza, OBČ – občutljivost, OE – ovarijska endometrijoza, PCO – policistični ovariji, P – proliferacijska faza, PE – peritonealna endometrijoza, S – sekrecijska faza, SP – specifičnost, SMOH – hidroksisfingomielin, PCaa/PCae – glicerofosfolipidi, PP – pozna proliferacijska faza, ZS – zgodnja sekrecijska faza.

Slika 1: Potek proučevanja molekularnih označevalcev za neinvazivno diagnostiko endometriozе. Označevalce endometriozе so doslej iskali v vzorcih seruma, plazme in urina; med posameznimi proteini, nabori proteinov, med posameznimi metaboliti; pa tudi z globalnimi pristopi proteomike, transkriptomike in metabolomike. Začetni fazi odkrivanja novih označevalcev vedno sledi validacijska faza. Uspešni klinični validaciji sledi razvoj diagnostičnega testa in prenos v rutinsko klinično uporabo.



Z določanjem koncentracije avtoproteiteles proti TMOD so diagnosticirali različno obsežne oblike endometriozе (I-IV) z občutljivostjo 82 % in specifičnostjo 93 % ter minimalne in blage oblike endometriozе (I-II) z občutljivostjo 78 % in specifičnostjo 93 % (Tabela 1).³⁴ Avtoproteitelesa proti TMOD tako kažejo precejšen potencial kot neinvazivni diagnostični označevalci. Z razvojem tehnologij “omik” pa pričakujemo globalne študije, ki bodo z uporabo proteinskih mrež, ki so že na trgu (na primer PhotoArray®, HuProt™ Arrays,..), preverile prisotnost avtoproteiteles proti večjem številu možnih antigenov.

Nabor proteinov kot diagnostični označevalec

Nabori označevalcev imajo pričakovano boljše diagnostične značilnosti kot posamezen označevalec.¹¹ V zadnjih letih so kot diagnostične označevalce endometriozе proučevali nabore, ki so vključevali tudi do 28 proteinov.³⁵⁻³⁹ Med temi študijami so rezultati Mihalyi s sodelavci³⁵ in Vodolazkaia s sodelavci³⁸ najbolj obetajoči. Prva študija,

ki je vključevala 201 bolnico z endometriozo in 93 neplodnih bolnic, je s postopno logistično regresijsko analizo izbrala nabor treh proteinov (interlevkin 6 (IL-6), faktor tumorske nekroze (TNFα) in CA-125), ki je v sekrecijski fazi diagnosticiral zmerne in hude oblike endometriozе (III-IV) z občutljivostjo 100 % in specifičnostjo 84 % (Tabela 1).³⁵ Medtem ko sta proteina IL-6 in TNFα diagnosticirala minimalne in blage oblike endometriozе (I-II) z občutljivostjo 87 % in specifičnostjo 71 % (Tabela 1).³⁵ Na osnovi logistične regresije so prikazali tudi algoritem za izračun verjetnosti endometriozе pri posamezni bolnici.³⁵ Še boljši diagnostični potencial pa imata modela, ki ju je na osnovi multivariatne statistične analize panela 28 proteinov pri 232 bolnicah z endometriozo in 121 neplodnih bolnicah predlagala skupina Vodolazkaia s sodelavci.³⁸ Modela, ki vključujeta koncentracije štirih proteinov (aneksin V + VEGF + CA-125 + glikodelin A in aneksin V + VEGF + CA-125 + siCAM-1) v menstruacijski fazi ločita bolnice z endometriozo, ki je z ultrazvokom ne diagnosticirajo (predvsem minimalne in blage oblike, I-II) od neplodnih bolnic s specifičnostjo 81–90 % in občutljivostjo 68–81 %.³⁸

Moderni imunski testi visoke zmogljivosti (kot so Bioplex®, MSD Multi-Array®, Aushon Ciraplex®) omogočajo določitev koncentracij nabora proteinskih označevalcev v velikem razponu koncentracij v sorazmerno majhnem vzorcu krvi ter v kratkem času. Po ustreznih validacijskih in kliničnih študijah bi tovrstno določanje koncentracije nabora proteinov z visoko občutljivostjo in specifičnostjo lahko prenesli tudi v klinično prakso.

Iskanje označevalcev endometrioze s pristopi proteomike

Proteomika proučuje globalne spremembe v koncentracijah oziroma profilih proteinov v posamezni celici, tkivu ali organizmu v različnih stanjih. Z razvojem masne spektrometrije z novimi možnostmi ionizatorjev in analizatorjev, je ta tehnologija bistveno prispevala k identifikaciji novih označevalcev endometrioze v vzorcih seruma, plazme in urina.^{11,40-43} Zheng s sodelavci⁴³ je v vzorcih seruma z (*angl.* matrix assisted laser desorption ionization time of flight) MALDI-TOF-MS našel tri proteine (5988,7; 7185,3, 8929,8 m/z), ki so ločevali bolnice z endometriozo v primerjavi z zdravimi ženskami z občutljivostjo 89,3–91,4 % in specifičnostjo 90–95 % (Tabela 1). Ta študija je potekala v dveh fazah, fazi odkrivanja in validacije. Vključevala je kar 126 bolnic z endometriozo ter 120 zdravih žensk.

Tudi v vzorcih urina so z metodo MALDI-TOF-MS identificirali šest peptidov, ki so se pri 23 bolnicah z zmerno in hudo obliko endometrioze (III-IV) in 16 kontrolnih bolnicah nahajali v statistično različnih koncentracijah.⁴⁰ V periovulacijski fazi so z določanjem koncentracije peptida z maso 1767,1 Da prepoznali bolnice z obliko endometrioze III-IV z občutljivostjo 75 % in s specifičnostjo 85 %, medtem ko so z določanjem koncentracije peptida z maso 3280,9 Da ločili bolnice z minimalno ali blago obliko (I-II) od bolnic z zmerno in hudo obliko bolezni (III-IV) z občutljivostjo 82 % in specifičnostjo 88 %.⁴⁰

Doslej uporabljeni pristopi proteomike omogočajo le določitev mase oziroma raz-

merja med maso in nabojem (m/z), zato bo v prihodnje z ustreznimi metodami (MS/MS) treba ugotoviti, za katere peptide oz. proteine gre v opisanih primerih. To je predpogoj za nadaljnje validacijske študije in morebiten razvoj diagnostičnih testov.

Iskanje označevalcev endometrioze s pristopi transkriptomike

Transkriptomika proučuje spremembe v koncentracijah oziroma profilih RNA molekul v posamezni celici, tkivu ali organizmu v različnih stanjih z uporabo mikromrež DNA, kvantitativne verižne reakcije s polimerazo, v zadnjem času pa tudi s sekvenciranjem nove generacije.⁴⁴ Poleg mRNA molekul imajo še večji diagnostični potencial mikro RNA (miRNA) molekule. Pri človeku so do sedaj našli že več kot 1500 različnih miRNAs (<http://mirbase.org>).⁴⁵ Te enoverižne RNA molekule se vežejo na mRNA in tako preprečijo prepis določene mRNA v protein ali pa usmerijo določeno mRNA v razgradnjo. V periferni krvi se miRNA molekule nahajajo v presenetljivo stabilni obliki,⁴⁶ zato so jih že proučevali kot nove diagnostične označevalce različnih oblik raka.⁴⁷ Pred kratkim pa so objavili prvi dve študiji, v katerih so miRNA proučevali tudi pri bolnicah z endometriozo.^{48,49} Suryawans s sodelavci⁴⁸ je proučil koncentracije 113 miRNA molekul v fazi odkrivanja pri sedmih bolnicah z endometriozo in šestih zdravih oseb in našel 23 miRNA v statistično značilno spremenjenih koncentracijah. V validacijski fazi so našli tri miRNA (miR-16, miR-191, miR-195), ki so ločevale bolnice z endometriozo od zdravih oseb, z občutljivostjo 88 % in specifičnostjo 60 %.⁴⁸ Rezultati skupine Wang s sodelavci⁴⁹ so še bolj obetajoči. V fazi odkrivanja in validacije, ki sta vključevali 10 bolnic z endometriozo/ 10 oseb kontrolne skupine in 60 bolnic z endometriozo/ 25 oseb kontrolne skupine, so preverjali koncentracije 765 miRNA. S statistično analizo so identificirali štiri miRNA (miR-199a, miR-122, miR-145, miR-542-3p), ki diagnosticirajo bolnice z endometriozo z občutljivostjo 93 % in specifičnostjo 96 %

(Tabela 1). Opisani študiji tako potrjujeta velik potencial miRNA molekul kot diagnostičnih označevalcev endometriozе.

V nasprotju s pristopi proteomike si pristopi transkriptomike šele utirajo pot na področju odkrivanja označevalcev za neinvazivno diagnostiko endometriozе. Kljub temu pa je jasno, da bi merjenje koncentracije izbranih miRNA molekul v periferni krvi z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo, ki se že uporablja v klinični praksi, precej enostavno prenesli v fazo klinične validacije in po uspešnem zaključku te faze v kasnejšo rutinsko diagnostiko.

Iskanje označevalcev endometriozе s pristopi metabolomike

Metabolomika proučuje metabolom (nabor metabolitov v posamezni celici, tkivu ali organizmu) v različnih stanjih, najpogosteje s pomočjo masne spektrometrije, pa tudi z jedrsko magnetno resonanco ($^1\text{H-NMR}$). Pristop metabolomike se že uporablja na področju iskanja novih diagnostičnih ali prognostičnih označevalcev. Prvi primer tovrstne rutinske klinične analize je MS/MS analiza za ugotavljanje genetskih metaboličnih bolezni pri novorojenčkih.^{50,51} V zadnjih letih so proučevali metabolite tudi kot označevalce raka, sladkorne bolezni in srčno-žilnih bolezni.⁵² Metabolične označevalce endometriozе so najprej iskali med posameznimi metaboliti.^{53,54} Naša skupina je v sodelovanju z Ginekološko kliniko UKC Ljubljana na področju označevalcev endometriozе prva uporabila pristop metabolomike. V vzorcih plazme 40 bolnic z ovarijsko endometriozo in 52 zdravih žensk smo z metodo ESI-MS/MS določili koncentracije 148 lipidov, 92 glicerofosfolipidov, 15 sfingolipidov in 41 acilkarnitinov.⁵⁵ Ugotovili smo, da se osem metabolitov nahaja v statistično značilno višjih koncentracijah v plazmi bolnic, pa tudi 81 razmerij med metaboliti se je statistično značilno razlikovalo med bolnicami in zdravimi osebami. Z logistično regresijo smo določili model, ki vključuje koncentracijo hidrokisfingomielina (SMOH C16:1), razmerje v koncentraciji

dveh glicerofosfolipidov (PCaa C36:2/ PCae C34:2), starost bolnic in ITM. Ta model diagnosticira 90 % bolnic (občutljivost 90 %), med bolnice pa uvrsti tudi 16 % zdravih oseb (specifičnost 84 %)⁵⁵ (Tabela 1).

Pred kratkim je pri iskanju označevalcev endometriozе pristop metabolomike uporabila tudi skupina Dutta in sodelavci.⁵⁶ Z uporabo $^1\text{H-NMR}$ so našli 13 metabolitov, predvsem amino kisline pa tudi nekatere druge metabolite, ki so se v serumu bolnic z endometriozo v primerjavi z osebami kontrolne skupine nahajali v statistično različnih koncentracijah.⁵⁶ Predlagali so model, ki je razkril občutljivost 82 % in specifičnost 91 %.⁵⁶ Čeprav bo obe omenjeni študiji metaboloma v prihodnje potrebno preveriti na večjem številu bolnic in oseb kontrolne skupine, pa tudi pri drugih oblikah endometriozе in drugih populacijah, ti obetajoči rezultati kažejo, da označevalce endometriozе lahko najdemo tudi s pristopi metabolomike.

Zaključki

Pri vsaki študiji diagnostičnih označevalcev je izjemno pomembno ustrezno zbiranje vzorcev ter obdelava in hranjenje vzorcev in seveda ustrezna analiza vzorcev in meritve.⁵⁷ Vsi ti koraki morajo potekati v skladu z vnaprej določenimi standardnimi pogoji. Bistveno je, da je celoten postopek odzema, obdelave in hranjenja vzorcev preiskovane in kontrolne skupine povsem enak. Študije diagnostičnih označevalcev praviloma vključujejo velike preiskovane in kontrolne skupine,⁵⁸ v katerih osebe preiskovane in kontrolne skupine izberemo iz iste tarčne populacije bolnic z enakimi simptomi.⁵⁹ Pomembno je, da sta obe skupini ustrezno poenoteni glede starosti, ITM, menstrualne faze, uporabe hormonskega oziroma drugega zdravljenja. Začetni fazi odkrivanja nujno sledi validacijska faza, v kateri koncentracije izbranih označevalcev preverimo v isti populaciji.⁵⁰ Uspešni validacijski fazi izbranih označevalcev pa končno sledi še klinično preverjanje.

Diagnostični označevalci morajo imeti dobro občutljivost in specifičnost pa tudi ustrezno pozitivno in negativno napovedno

vrednost. Pomembno je, da ima presejalni diagnostični test visoko občutljivost, da je cenovno sprejemljiv in se sorazmerno enostavno vpelje v rutinsko klinično uporabo.⁵⁸ Griffith in Grimes sta leta 1990 predlagala enostavno merilo za ocenjevanje diagnostičnih označevalcev; pri dobrih diagnostičnih testih naj bi bila vsota občutljivosti in specifičnosti $\geq 1,5$; pri zelo dobrih diagnostičnih testih pa naj bi bila vsota $\geq 1,8$.⁶⁰ V zadnjih treh letih so poročali o štirih naborih označevalcev z zelo dobrimi diagnostičnimi značilnostmi^{35,42,43,49} in devetih posameznih označevalcev ali naborih, pri katerih je vsota občutljivosti in specifičnosti $\geq 1,7$ (Tabela 1). Zelo dobre diagnostične značilnosti so doslej opisali predvsem za primere diagnosticiranja zmernih in hudih oblik endometriozе (III-IV), medtem ko so doslej le avtoprotitelesa proti TMOD3,³⁴ nabor petih proteinov izbranih izmed 28 proteinov³⁸ in pet peptidov identificiranih s pristopi proteomike⁴¹ pokazali ustrezen diagnostični potencial tudi za minimalno in blago obliko endometriozе (I-II).

V zadnjih letih so tako pristopi proteomike, transkriptomike in metabolomike bistveno prispevali k odkrivanju novih

označevalcev za neinvazivno diagnostiko endometriozе. V prihodnje bodo te tehnologije omogočile identificirati nove označevalce z ustrezno občutljivostjo in specifičnostjo za diagnosticiranje različnih oblik endometriozе. Analize koncentracij različnih molekul (proteinov, metabolitov, mRNA, miRNA) v krvi ali urinu v kombinaciji s kliničnimi podatki (ITM, starost,...) z multivariatnimi statističnimi pristopi bodo omogočile razvoj modelov in algoritmov, ki bodo diagnosticirali predvsem minimalno/blago obliko endometriozе ter razlikovali med različnimi vrstami endometriozе: ovarijsko, peritonealno in globoko infiltrativno endometriozo. Tovrstne nabore označevalcev in ustrezne algoritme bodo v naslednjih letih preverjali v kliničnih študijah. Uspešni klinični validaciji pa sledi še precej dolgotrajen proces prenosa diagnostičnega testa v rutinsko klinično uporabo.

Zahvala

Priprava članka je potekala v okviru projekta ARRS J3-4135. Za diskusijo in komentarje se zahvaljujem doc. dr. Andreju Voglerju z Ginekološke klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

Literatura

1. Rogers PA, D'Hooghe TM, Fazleabas A, et al. Defining future directions for endometriosis research: workshop report from the 2011 World Congress of Endometriosis In Montpellier, France. *Reprod Sci* 2013; 20: 483-99.
2. Adamson G, SH K, L H. Creating solutions in endometriosis: global collaboration through the World Endometriosis Research Foundation. *J Endometriosis* 2010; 2: 3.
3. Brosens I, Benagiano G. Endometriosis, a modern syndrome. *Indian J Med Res* 2011; 133: 581-93.
4. Jacques D, Oliver D, Jean-Christophe L, Jean S. Peritoneal, ovarian, and rectovaginal endometriosis are three different entities. In: C GL, H E JL, L HD, eds. *Endometriosis Science and Practice*. Singapore Markono Print Media Pte Ltd: Willey-Blackwell A John Willey and Sons Ltd.; 2012: 92-108.
5. Hsu AL, Khachikyan I, Stratton P. Invasive and noninvasive methods for the diagnosis of endometriosis. *Clin Obstet Gynecol* 2010; 53: 413-9.
6. Antonio B, Diane D, Anne G, Marco A. Extra-Abdominal Endometriosis. In: C GL, H E JL, L HD, eds. *Endometriosis Science and Practice*. Singapore Markono Print Media Pte Ltd: Willey-Blackwell A John Willey and Sons Ltd.; 2012: 108-17.
7. Revised American Fertility Society classification of endometriosis: 1985. *Fertil Steril* 1985; 43: 351-2.
8. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2012; 98: 511-9.
9. Nap AW. Theories on the pathogenesis of endometriosis. In: Giudice LC, Evers JL, Healy DL, eds. *Endometriosis Science and Practice*. Singapore: Wiley-Blackwell A John Wiley and Sons, Ltd. Publication; 2012: 42-53.
10. Endometriozа-epidemiologija, etiologija, patofiziologija in klasifikacija. In: Ribič-Pucelj M, ed. *Endoskopske operacije v ginekologiji*. Radovljica: Didakta; 2007: 163-7.
11. May KE, Conduit-Hulbert SA, Villar J, Kirtley S, Kennedy SH, Becker CM. Peripheral biomarkers of endometriosis: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2010; 16: 651-74.
12. Ballard K, Lowton K, Wright J. What's the delay? A qualitative study of women's experiences of reaching a diagnosis of endometriosis. *Fertil Steril* 2006; 86: 1296-301.
13. Chamié LP, Blasbalg R, Pereira RM, Warmbrand G, Serafini PC. Findings of pelvic endometriosis at transvaginal US, MR imaging, and laparoscopy. *Radiographics* 2011; 31:E77-100.

14. Grasso RF, Di Giacomo V, Sedati P, et al. Diagnosis of deep infiltrating endometriosis: accuracy of magnetic resonance imaging and transvaginal 3D ultrasonography. *Abdom Imaging* 2010; 35: 716–25.
15. Fassbender A, Vodolazkaia A, Saunders P, et al. Biomarkers of endometriosis. *Fertil Steril* 2013; 99: 1135–45.
16. Meuleman C, Vandenabeele B, Fieuws S, Spiessens C, Timmerman D, D'Hooghe T. High prevalence of endometriosis in infertile women with normal ovulation and normospermic partners. *Fertil Steril* 2009; 92: 68–74.
17. Group. BDW. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 89–95.
18. Whiting PF, Rutjes AW, Westwood ME, et al. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Ann Intern Med* 2011; 155: 529–36.
19. Whiting P, Rutjes AW, Reitsma JB, Bossuyt PM, Kleijnen J. The development of QUADAS: a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews. *BMC Med Res Methodol* 2003; 3: 25.
20. Lanišnik Rižner T. Noninvasive biomarkers of endometriosis: myth or reality? *Expert Rev Mol Diagn* 2014; 14: 365–85.
21. Huhtinen K, Suvitie P, Hiissa J, et al. Serum HE4 concentration differentiates malignant ovarian tumours from ovarian endometriotic cysts. *Br J Cancer* 2009; 100: 1315–9.
22. Szubert M, Suzin J, Wierzbowski T, Kowalczyk-Amico K. CA-125 concentration in serum and peritoneal fluid in patients with endometriosis—preliminary results. *Arch Med Sci* 2012; 8: 504–8.
23. Van Gorp T, Cadron I, Despierre E, et al. HE4 and CA125 as a diagnostic test in ovarian cancer: prospective validation of the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm. *Br J Cancer* 2011; 104: 863–70.
24. Vodolazkaia A, Bossuyt X, Fassbender A, et al. A high sensitivity assay is more accurate than a classical assay for the measurement of plasma CRP levels in endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9: 113.
25. Reis FM, Luisi S, Abrao MS, et al. Diagnostic value of serum activin A and follistatin levels in women with peritoneal, ovarian and deep infiltrating endometriosis. *Hum Reprod* 2012; 27: 1445–50.
26. Kocbek V, Vouk K, Mueller MD, Rižner TL, Bersinger NA. Elevated glycodelin-A concentrations in serum and peritoneal fluid of women with ovarian endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 2013; 29: 455–9.
27. Mohamed ML, El Behery MM, Mansour SA. Comparative study between VEGF-A and CA-125 in diagnosis and follow-up of advanced endometriosis after conservative laparoscopic surgery. *Arch Gynecol Obstet* 2013; 287: 77–82.
28. Eisenberg VH, Zolti M, Soriano D. Is there an association between autoimmunity and endometriosis? *Autoimmun Rev* 2012; 11: 806–14.
29. Young VJ, Brown JK, Saunders PT, Horne AW. The role of the peritoneum in the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod Update* 2013; 19: 558–69.
30. Nabeta M, Abe Y, Kagawa L, et al. Identification of anti- α -enolase autoantibody as a novel serum marker for endometriosis. *Proteomics Clin Appl* 2009; 3: 1201–10.
31. Nabeta M, Abe Y, Haraguchi R, Kito K, Kusanagi Y, Ito M. Serum anti-PDIK1L autoantibody as a novel marker for endometriosis. *Fertil Steril* 2010; 94: 2552–7.e1.
32. Nabeta M, Abe Y, Takaoka Y, Kusanagi Y, Ito M. Identification of anti-syntaxin 5 autoantibody as a novel serum marker of endometriosis. *J Reprod Immunol* 2011; 91: 48–55.
33. Yi YC, Wang SC, Chao CC, Su CL, Lee YL, Chen LY. Evaluation of serum autoantibody levels in the diagnosis of ovarian endometrioma. *J Clin Lab Anal* 2010; 24: 357–62.
34. Gajbhiye R, Sonawani A, Khan S, et al. Identification and validation of novel serum markers for early diagnosis of endometriosis. *Hum Reprod* 2012; 27: 408–17.
35. 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.
36. Socolov R, Butureanu S, Angioni S, et al. The value of serological markers in the diagnosis and prognosis of endometriosis: a prospective case-control study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; 154: 215–7.
37. Drosdzol-Cop A, Skrzypulec-Plinta V. Selected cytokines and glycodelin A levels in serum and peritoneal fluid in girls with endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res* 2012; 38: 1245–53.
38. Vodolazkaia A, El-Aalamat Y, Popovic D, et al. Evaluation of a panel of 28 biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Hum Reprod* 2012; 27: 2698–711.
39. Anastasi E, Granato T, Falzarano R, et al. The use of HE4, CA125 and CA72-4 biomarkers for differential diagnosis between ovarian endometrioma and epithelial ovarian cancer. *J Ovarian Res* 2013; 6: 44.
40. El-Kasti MM, Wright C, Fye HK, Roseman F, Kessler BM, Becker CM. Urinary peptide profiling identifies a panel of putative biomarkers for diagnosing and staging endometriosis. *Fertil Steril* 2011; 95: 1261–6.e1–6.
41. Fassbender A, Waelkens E, Verbeeck N, et al. Proteomics analysis of plasma for early diagnosis of endometriosis. *Obstet Gynecol* 2012; 119: 276–85.
42. Long X, Jiang P, Zhou L, Zhang W. Evaluation of novel serum biomarkers and the proteomic differences of endometriosis and adenomyosis using MALDI-TOF-MS. *Arch Gynecol Obstet* 2013; 288: 201–5.
43. Zheng N, Pan C, Liu W. New serum biomarkers for detection of endometriosis using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Int Med Res* 2011; 39: 1184–92.
44. Mendrick DL. Transcriptional profiling to identify biomarkers of disease and drug response. *Pharmacogenomics* 2011; 12: 235–49.
45. Teague EM, Print CG, Hull ML. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Hum Reprod Update* 2010; 16: 142–65.

46. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 10513–8.
47. Madhavan D, Cuk K, Burwinkel B, Yang R. Cancer diagnosis and prognosis decoded by blood-based circulating microRNA signatures. *Front Genet* 2013; 4: 116.
48. Suryawanshi S, Vlad AM, Lin HM, et al. Plasma microRNAs as novel biomarkers for endometriosis and endometriosis-associated ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 1213–24.
49. Wang WT, Zhao YN, Han BW, Hong SJ, Chen YQ. Circulating microRNAs identified in a genome-wide serum microRNA expression analysis as noninvasive biomarkers for endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 281–9.
50. Xia J, Broadhurst DI, Wilson M, Wishart DS. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. *Metabolomics* 2013; 9: 280–99.
51. Chace DH, Spitzer AR. Altered metabolism and newborn screening using tandem mass spectrometry: lessons learned from the bench to bedside. *Curr Pharm Biotechnol* 2011; 12: 965–75.
52. Gowda GA, Zhang S, Gu H, Asiago V, Shanaiah N, Raftery D. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2008; 8: 617–33.
53. Prieto L, Quesada JF, Cambero O, et al. Analysis of follicular fluid and serum markers of oxidative stress in women with infertility related to endometriosis. *Fertil Steril* 2012; 98: 126–30.
54. Khanaki K, Nouri M, Ardekani AM, et al. Evaluation of the relationship between endometriosis and omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids. *Iran Biomed J* 2012; 16: 38–43.
55. Vouk K, Hevir N, Ribic-Pucelj M, et al. Discovery of phosphatidylcholines and sphingomyelins as biomarkers for ovarian endometriosis. *Hum Reprod* 2012; 27: 2955–65.
56. Dutta M, Joshi M, Srivastava S, Lodh I, Chakravarty B, Chaudhury K. A metabonomics approach as a means for identification of potential biomarkers for early diagnosis of endometriosis. *Mol Biosyst* 2012; 8: 3281–7.
57. Chandramouli K, Qian PY. Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity. *Hum Genomics Proteomics* 2009; 2009.
58. Siristatidis CS. What have the ,omics done for endometriosis? *Med Sci Monit* 2009; 15: RA116–23.
59. Zondervan KT, Cardon LR, Kennedy SH. What makes a good case-control study? Design issues for complex traits such as endometriosis. *Hum Reprod* 2002; 17: 1415–23.
60. Griffith CS, Grimes DA. The validity of the post-coital test. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162: 615–20.