

# Zastosowanie proteomiki do badań nad endometriozą

## Proteomics in endometriosis

Piotr Marianowski<sup>1</sup>, Iwona Szymusik<sup>1</sup>, Michał Hibner<sup>2</sup>, Ewa Barcz<sup>1</sup>, Mirosław Wielgoś<sup>1</sup>

<sup>1</sup> I Katedra i Klinika Położnictwa i Ginekologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Polska

<sup>2</sup> Division of Gynecologic Surgery, St. Joseph's Hospital and Medical Center, Creighton University School of Medicine, USA

### Streszczenie

*Etiologia endometriozy, pomimo wysiłku naukowców, wciąż nie została poznana w stopniu wystarczającym. Coraz częściej do badań nad tą jednostką chorobową wykorzystuje się wysoce specjalistyczne techniki molekularne - proteomikę. W ostatnich latach przeprowadzono wiele interesujących badań porównujących skład białkowy w różnych preparatach pochodzących od kobiet z endometriozą: surowicy krwi, płynie z jamy otrzewnowej, ogniskach endometrialnych na otrzewnej, torbieni jajnika, eutopowym endometrium oraz krwi miesięczkowej i moczu.*

*Wydaje się, że zastosowanie badań proteomicznych mogłoby przyczynić się do uzyskania pewnych danych związanych z patogenezą endometriozy, dać klinicytom nowe narzędzia służące dagnostyce. Dodatkowo badania dotyczące znaczenia poszczególnych białek dają szansę na opracowanie nowych markerów, mających znaczenie dla oceny progresji czy ryzyka nawrotu. Dadzą również być może szansę na opracowanie nowych strategii terapeutycznych.*

Słowa kluczowe: **proteomika / endometrioza / eutopowe endometrium / ogniska endometrialne /**

### Abstract

*Despite significant scientific progress, etiology of endometriosis remains enigmatic. New advances in molecular biology have allowed the use of proteomics in demystifying this puzzling disease. Proteomics is a technology that permits the visualization of thousands of proteins inside a cell, tissue, or organism, and simultaneous observation of any alterations in protein expression and post-translational modification that may have important, clinical implications. Owing to its capacity to reveal the structural and functional properties of proteins, proteomics might illuminate the biology of the disease much better than genomics can.*

*This state-of-the-art technology allows us to globally compare the expression and regulation profiles of proteins found in endometriosis with normal eutopic tissues (endometrium and peritoneum), as well as to compare those found in the different forms of endometriosis (i.e., peritoneal endometriosis, endometrioma, and adenomyoma). Proteomic analysis has been employed in endometriosis research in hope of discovering endometriosis-specific proteins, pathways, and potential biomarkers for precise, early detection.*

### Adres do korespondencji:

Piotr Marianowski

I Katedra i Klinika Położnictwa i Ginekologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Pl. Starynkiewicza 1/3; 02-015 Warszawa, Polska

Tel. + 48 22 502 14 30; Fax. +48 22 502 21 57

e-mail: pmarianowski@poczta.onet.pl

Otrzymano: 19.04.2013

Zaakceptowano do druku: 10.09.2013

Piotr Marianowski, et al. Zastosowanie proteomiki do badań nad endometriozą.

*In recent years, several published studies have compared serum and peritoneal fluid protein content in women with and without endometriosis, as well as protein composition in endometrial implants, eutopic endometrium, endometriomas, menstrual blood and urine. It appears that use of proteomics could revolutionize our understanding of etiopathogenesis of the disease. Some of the identified proteins could indeed be responsible for the onset and progression of endometriotic implants. Because early stages of endometriosis may be difficult to diagnose, it would be of the utmost importance to identify specific biological markers of the disease. Additionally, specific implant proteins could become targets for molecular treatment of endometriosis.*

*It is very challenging, however, to draw clear conclusions from the analysis of the obtained samples. First of all, the samples are usually pathologically confirmed to be endometriotic, but from a molecular stand point, the particular portion of the sample that is analyzed may matter greatly; none of the methods allow us to gain information about the molecular and pathological pattern of the same sample. Secondly, it is very difficult to define an 'unaffected peritoneum' as a control for the endometriotic lesions. Thirdly, the variety of options in each individual makes it difficult to see the molecular picture of the diseased area (such as the ovary or peritoneum) clearly. Ideally, the samples would be of greater value if obtained at an early age, that is, before puberty in each individual and then again when endometriosis occurs later in reproductive age. Such a project cannot be performed prospectively, although it may be considered as retrospective analysis of obtained material in some patients after successful chemotherapy due to oncological conditions.*

Key words: **proteomics / endometriosis / eutopic endometrium /  
/ endometriotic lesions /**

Endometrioza stanowi złożony, enigmatyczny i frustrujący dla ginekologów problem zdrowia kobiet. Jest chorobą dotyczącą głównie pacjentek w wieku reprodukcyjnym, rzadko obserwowaną w okresie dojrzewania lub po menopauzie, polegającą na wzroście endometrialnych gruczołów i zrębu poza jamą macicy [1, 2].

Rozpoznanie na podstawie objawów klinicznych oraz badania przedmiotowego u części kobiet z zaawansowaną chorobą może być oczywiste, niemniej jednak w większości przypadków jest nierozstrzygające, szczególnie u pacjentek we wczesnych stadiach rozwoju choroby. Rozpoznanie endometriozy opiera się obecnie na wizualizacji zmian endometrialnych w trakcie zabiegu chirurgicznego i następowego badania histopatologicznego pobranego materiału. W tych przypadkach do diagnozy i rozpoczęcia leczenia konieczny jest zabieg chirurgiczny.

Objawy kliniczne endometriozy często bywają niejednoznaczne, dolegliwości bólowe przybierają bardzo różny charakter, są zmienne w czasie i wielokrotnie sugerujące istnienie innych schorzeń. Z powyższych faktów wynika częste opóźnienie w stawianiu rozpoznania tej patologii; wg Hadfield i wsp. czas od pojawienia się pierwszych objawów choroby do jej rozpoznania wynosi średnio 8 lat [3]. Na przełomie lat wielu autorów poszukiwało markerów, które mogłyby być wykorzystywane do ambulatoryjnej diagnostyki endometriozy. Obecnie jedynie antygen CA-125 uznawany jest za pomocny przy rozpoznaniu, jednak należy pamiętać, że jego podwyższone stężenie w surowicy nie jest swoiste dla endometriozy i służy jedynie jako wykładnik dodatkowy, jednakże nie różnicujący i nie mający zastosowania zarówno do oceny zaawansowania choroby, jak również oceny ryzyka nawrotu [4, 5].

Ogromny postęp dokonujący się w ostatnich latach w biologii i medycynie pozwala coraz lepiej rozumieć biochemiczne i molekularne podstawy funkcjonowania żywych organizmów. Więcej też wiadomo o patogenezie wielu chorób.

W ostatnich latach wiele uwagi skupia się na poznaniu ludzkiego genomu. Naukowcy podjęli się też badań nad poznaniem ludzkiego proteomu (z ang. *PROTEin complement of the genOME*), czyli wszystkich białek pojawiających się w organizmie w ciągu całego jego życia. Dyscypliną, która się tym zajmuje, jest młoda i szybko rozwijająca się dziedzina naukowa nazwana proteomiką. Technologie proteomiczne można podzielić na te stosowane do charakterystyki białek oraz generowania map białkowych, a także te, które służą do badania ich funkcji i interakcji pomiędzy nimi [6, 7].

W panelu narzędzi molekularnych stosowanym powszechnie były elektroforeza dwuwymiarowa oraz spektrometria mas, tzn. desorpcja laserowa z udziałem matrycy (z ang. *MALDI – matrix assisted laser desorption/ionization*) oraz elektrorozpylanie (z ang. *ESI – electrospray ionization*). Modyfikacją metody MALDI jest SELDI – powierzchniowo wzmocniona laserowa desorpcja/ionizacja, w której badana próbka jest wstępnie frakcjonowana przy zastosowaniu jednej z technik chromatograficznych. Obecnie najbardziej popularnym analizatorem jest analizator czasu przelotu (z ang. *Time Of Flight – TOF*), w którym mierzony jest czas, jaki zajmuje jonom przebycie drogi od jonizatora do detektora. W ostatnich latach zaczęto łączyć ze sobą dwa analizatory TOF, tworząc w ten sposób tandemową spektrometrię mas (MS/MS) [8].

W ciągu ostatnich dwóch dekad przeprowadzono wiele badań z zastosowaniem technik proteomiki do szczegółowej oceny materiałów biologicznych, w których zmiany mogły być pośrednio lub bezpośrednio związane z endometriozą (surowica krwi, torbiele endometrialne jajników, zmiany endometrialne na otrzewnej, otrzewna bez zmian patologicznych, płyn z jamy otrzewnowej, eutopowe endometrium, a nawet krew miesięczkowa i mocz).

## Surowica krwi

Pierwsze doniesienia o zastosowaniu technik proteomicznych do badania surowicy krwi kobiet z endometrią pochodzą z 1986 roku. Wówczas autorzy nie przedstawili jednak konkretnych wyników swoich badań, tak więc ich pracę należy traktować jako doniesienie wstępne, dotyczące możliwości zastosowania metody w danym zagadnieniu [9]. Na uwagę zasługuje badanie Zhang i wsp., w którym autorzy przy pomocy elektroforezy na żelu poliakrylamidowym zidentyfikowali 13 białek wykazujących różną ekspresję w surowicy kobiet z potwierdzoną endometrią, w porównaniu do grupy pacjentek, u których nie stwierdzono tej choroby (m. in. wimentyna, 3-aktyna, podjednostka 3 syntazy ATP) [10, 11].

Wprowadzenie spektrometrii masowej pozwoliło na uzyskanie dokładniejszych danych na temat identyfikowanych białek. Liu i wsp. zastosowali SELDI-TOF MS do porównania próbek osocza uzyskanych od 52 kobiet z endometrią rozpoznaną histologicznie i 46 kobiet z grupy kontrolnej. Spektra kobiet z i bez endometrii różniły się znacząco. Autorzy opisali 20 białek o różnych modelach ekspresji w grupie badanej i kontrolnej. Spomiędzy nich wyselekcjonowano 3, które w modelu diagnostycznym charakteryzowały się 88% czułością i 86% swoistością, jednak żadne z tych białek nie zostało przedstawione jako patognomoniczne dla endometrii [12]. Analogiczne badanie przeprowadzili Wang i wsp., opisując pięć innych białek o 92% czułości i 90% swoistości dla endometrii, jednak – podobnie jak poprzednicy – żadnemu nie przypisuje kluczowej roli [13].

W kolejnych latach przeprowadzono jeszcze kilka badań o podobnej charakterystyce, uzyskując bardziej szczegółowe, aczkolwiek często sprzeczne rezultaty [14-18]. Fassbender i wsp. zaprezentowali wyniki badania krwi u 254 kobiet poddawanych laparoskopii z powodu niepłodności i/lub dolegliwości bólowych w miednicy mniejszej. Autorzy przedstawili model pozwalający przewidzieć rozpoznanie endometrii przy pomocy analizy składu białek w surowicy krwi pacjentek. Wskazali 5 białek, o swoistości i czułości w zakresie 75-85% w zależności od stopnia zaawansowania endometrii, a największe znaczenie przypisali łańcuchowi beta fibrynogenu [19]. Jednakże w 2013 roku ci sami autorzy opublikowali dość krytyczny raport, przedstawiający dotychczasowe doniesienia literaturowe o zastosowaniu proteomiki do badania surowicy krwi kobiet z endometrią. Apelowali w nim o wprowadzenie ogólnowiatowych standardowych procedur (SOP – *standard operating procedures*) pobierania, obróbki, bankowania oraz technik analizy materiału. Wydaje się, że jest to warunek *sine qua non* realnego postępu w tej dziedzinie wiedzy, pozwalający na zunifikowane przedstawienie uzyskanych danych w odniesieniu do innych publikacji [20].

## Eutopowe endometrium

Łatwy dostęp do materiału (biopsja aspiracyjna endometrium), jakim jest błona śluzowa jamy macicy, skłania do próby zlokalizowania markerów mogących pozwalać na wczesne rozpoznanie choroby w grupie kobiet z endometrią. Od ponad 25 lat w literaturze ukazało się kilka prac przeprowadzonych na niewielkim materiale (zakres 10-20 kobiet), wskazujących kolejne białka jako potencjalne markery endometrii [21-25]. Wśród wymienionych białek pojawiły się apolipoproteina A2, pereredoksyna 2, aneksyna 2 i wimentyna. Jednak żadna z grup naukowców na podstawie uzyskanych wyników nie podjęła się

wskazania jednego białka jako swoistego i specyficznego markera endometrii w eutopowym endometrium. Co więcej, przedstawiane wyniki niejednokrotnie były sprzeczne i wzajemnie wykluczały się. Próbuąc tłumaczyć tę sytuację bardzo poważnie brano pod uwagę dużą liczebność badanej grupy jako wadę, a nie zaletę badania z użyciem tak dokładnej metody, jaką jest proteomika [26].

## Endometrioza otrzewnowa – płyn z jamy otrzewnowej i wszczyepy endometrialne na otrzewnej

W latach 90. XX wieku Nothnick i wsp. wykorzystali elektroforezę na żelu poliakrylamidowym w celu określenia, czy płyn otrzewnowy kobiet z endometrią zawiera grupę glikoprotein (ENDO-I), które – jak wykazano wcześniej – są syntetyzowane i wydzielane *in vitro* przez zmiany endometrialne u szczura i człowieka. Analiza jakościowa ujawniła obecność grupy białek podobnych do ENDO-I w ludzkim płynie otrzewnowym. Zwrócono uwagę na potencjalną rolę białka nazwanego EPF-32 (rozmiar 32 kd); znajdowano je aż w 18 spośród 19 badanych próbek płynu z jamy otrzewnowej kobiet z endometrią, podczas gdy w grupie kobiet bez objawów tej choroby częstość występowania tego białka była znamienne statystycznie rzadsza (w 2 spośród 27 badanych próbek) [27].

Technika elektroforezy na żelu poliakrylamidowym, połączona z immunoblottingiem lub spektrometrią masową z chromatografią cieczą (LC-MS/MS), została wykorzystana przez Ferrero i wsp. w celu porównania proteomu płynu otrzewnowego uzyskanego od kobiet z lub bez endometrii [28, 29]. Autorzy zauważyli, że płyn otrzewnowy pacjentek z endometrią zawierał nieprawidłową ekspresję niektórych izoform białek: czterech izoform glikoproteiny Heremans Schmidt  $\alpha 2$ , trzech izoform antytrypsyny  $\alpha 1$  i jednej izoformy haptoglobiny, białka S100-A8 i apolipoproteiny A-1. Białka te są związane z procesami immunologicznymi oraz reakcją na stan zapalny w organizmie. Fakt ten wydaje się zgodny z naszym rozumieniem zmian zachodzących w jamie otrzewnowej u kobiet cierpiących z powodu endometrii (szczególnie w III i IV stopniu zaawansowania wg AFS).

Kyama i wsp. zastosowali SELDI-TOF MS do porównania białek produkowanych przez eutopowe endometrium, tkanki endometriotyczne, otrzewnowe zmiany endometriotyczne i makroskopowo prawidłową otrzewną [30, 31]. Autorzy wykazali, że zmiany endometriotyczne charakteryzują się podwyższoną ekspresją wielu białek i peptydów, wskazując transgrelinę jako białko o największej powtarzalności występowania w zmianach o charakterze endometrii.

Podobnie jak w przypadku eutopowego endometrium, liczba publikacji na temat zawartości płynu z jamy otrzewnowej u kobiet z endometrią jest przytłaczająca. Jednak poza oczywistymi doniesieniami o potwierdzeniu obecności protein odpowiedzialnych za występowanie stanu zapalnego oraz eliminację żelaza z organizmu (konsekwencja krwawienia do jamy otrzewnowej), większość z nich nie miała implikacji klinicznych, czy też nie uzyskiwano jednoznacznych wyników.

## Mocz

W ostatnich latach ukazały się również publikacje dotyczące oceny jakościowej moczu u kobiet z endometrią, jako potencjalnego źródła materiału, w którym mogą znajdować się

swoiste markery dla tej choroby [32]. Inerujące dane przedstawił Tokushige i wsp., wskazując cytokeratynę 19 jako białko o podwyższonej ekspresji w moczu kobiet ze zdiagnozowaną endometrią. Doniesienie to należy niewątpliwie traktować jako wstępne. Niezmiernie jednak interesująca i zachęcająca do badań jest możliwość wprowadzenia nieinwazyjnego testu, którego zastosowanie pozwala postawić rozpoznanie lub wpłynąć na decyzję odnośnie dalszego postępowania z pacjentką (np. decyzja o zabiegu operacyjnym u kobiet z problemem niepłodności) [33].

## Płyn z jamy macicy i krew miesięczkowa

Kolejnym materiałem biologicznym, w którym poszukiwano markerów endometrii przy pomocy technik proteomicznych był płyn z jamy macicy, uzyskiwany poprzez aspirację z jamy macicy przy pomocy cewnika powszechnie stosowanego do transferu zarodka w programie zapłodnienia pozaustrojowego. Ametzazurra i wsp. wskazali w nim glikodelinę jako potencjalny marker endometrii [34]. Jest to białko już wcześniej wiązane z funkcjami błony śluzowej macicy, odgrywające rolę przy procesie zapłodnienia i implantacji. Dzięki swoim właściwościom immunosupresyjnym hamuje lokalną odpowiedź immunologiczną wobec zagnieżdżającego się zarodka [35]. Wydaje się, że badania w tym kierunku mają niewątpliwą wartość na poziomie nauk podstawowych, jednak ich znaczenie kliniczne i możliwość wykorzystania w praktyce na chwilę obecną jest znikoma.

Preparatem budzącym wiele kontrowersji odnośnie przydatności do ewentualnego rozpoznawania endometrii jest krew miesięczkowa. Z jednej strony jest to preparat prosty do pozyskania w najbardziej nieinwazyjny sposób (badanie tamponów lub też specjalne „kubeczki“ zakładane na szyjkę macicy do zbierania krwi miesięczkowej). Z drugiej strony jednak czynniki wpływające potencjalnie na jakość uzyskanego materiału (czas od rzeczywistego złuszczenia do pozyskania materiału, wpływ środowiska macicy i pochwy na preparat oraz możliwość kontaminacji próbki) zdecydowanie przemawiają na niekorzyść tej metody. Ponadto łatwość pobrania materiału „świeżego“ endometrium, przy coraz częściej postulowanym korzystnym wpływie tzw. *scratchingu* na proces implantacji, stawia analizę krwi miesięczkowej w świetle wielce niekorzystnym.

W piśmiennictwie światowym na uwagę zasługuje praca opublikowana w 2013 roku przez Yang i wsp. Autorzy, po wstępnym zastosowaniu proteomiki do badania krwi miesięczkowej u zdrowych kobiet, postulują rozszerzenie projektu na pacjentki z endometrią i innymi schorzeniami ginekologicznymi w celu poszukiwania korelacji [36].

## Podsumowanie

Badania proteomiczne są obecnie powszechnie stosowane na świecie. Zakres uzyskiwanych wyników przytłacza, niejednokrotnie przekraczając możliwości analizy całego dostępnego materiału przez jednego człowieka-badacza. Z tego też powodu w przyszłości zasadnym wydaje się skupienie na poszczególnych grupach białek, pełniących podobne funkcje lub zaangażowanych we wspólne procesy metaboliczne w organizmie ludzkim. Ponadto niezmiernie ważnym zagadnieniem jest ustalenie, czy określona grupa białek zmienia swoje dotychczasowe funkcje i w konsekwencji doprowadza do powstania jednostki chorobowej, czy też odwrotnie: w wyniku zaistnienia patologii dochodzi do zmian wychwytywanych na poziomie molekularnym.

Rozwój technik proteomicznych może ułatwić odpowiedź na powyższe pytania. Dzięki wprowadzeniu w ostatnich latach nowej generacji metody sekwencjonowania do analizy transkryptomu, możliwa stała się jednoczesna identyfikacja wszystkich klas RNA ulegających ekspresji w komórce w danym czasie. Wielką zaletą metody sekwencjonowania jest nie tylko analiza poziomu ekspresji transkrybowanych molekuł oraz różnych izoform tego samego białka, lecz również identyfikacja zmian na poziomie pojedynczych nukleotydów.

Dużym utrudnieniem w projektowaniu badań dotyczących endometrii jest dobór pacjentek do grupy kontrolnej. Wobec częstego braku objawów u pacjentek we wczesnych stadiach rozwoju choroby, wnioskowanie na podstawie materiału uzyskanego od kobiety potencjalnie zdrowej jest obarczone możliwością błędu.

W planowaniu przyszłych badań naukowcy powinni wziąć pod uwagę możliwość cyklicznego oceniania profilu białkowego u tej samej pacjentki. W praktyce jest to niezmiernie trudne, gdyż wiązałoby się z koniecznością przeprowadzenia kilku zabiegów operacyjnych. Niemniej jednak, oceniając dostępny materiał – zarówno własny, jak i zawarty w załączonym piśmiennictwie – wskazane wydaje się wyodrębnienie wyników uzyskanych od poszczególnych kobiet i przeprowadzenie osobnej ich analizy. Zmienność osobnicza poszczególnych pacjentek może mieć kolosalne znaczenie dla wnioskowania z uzyskanego materiału. Niezwykle istotne dla interpretacji badań jest również wprowadzenie unifikacji wykorzystywanych procedur proteomicznych oraz niezwykle skrupulatny dobór grup badanych i kontrolnych.

## Oświadczenie autorów:

1. Piotr Marianowski 50% - autor koncepcji i założeń pracy, przygotowanie manuskryptu – autor zgłaszający, odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Iwona Szymusik 20% - przygotowanie manuskryptu.
3. Michał Hibner 10% - autor koncepcji i założeń pracy.
4. Ewa Barcz 10% - przygotowanie piśmiennictwa.
5. Mirosław Wielgoś 10% - ostateczna weryfikacja, akceptacja manuskryptu.

Źródło finansowania: część projektu finansowanego z grantu KBN nr N407021635.

## Piśmiennictwo

1. Sampson J. Heterotopic or misplaced endometrial tissue. *Am J Obstet Gynecol.* 1925, 10, 649-664.
2. Kennedy S, Bergqvist A, Chapton C. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod.* 2005, 20, 2698-2704.
3. Hadfield R, Mardon H, Barlow D, Kennedy S. Delay in the diagnosis of endometriosis: a survey of women from the USA and the UK. *Hum Reprod.* 1996, 11, 878-880.
4. Bedaiwy M, Falcone T. Laboratory testing for endometriosis. *Clin Chim Acta.* 2004, 340, 41-56.
5. Mol B, Bayram N, Lijmer G. The performance of CA-125 measurement in the detection of endometriosis: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 1990, 70, 1101-1108.

6. Upadhyay R, Balasinar N, Kumar A, [et al.]. Proteomics in reproductive biology: beacon for unraveling the molecular complexities. *Biochim Biophys Acta*. 2013, 1834, 8-15.
7. Sutovsky P. Cell biology solves mysteries of reproduction. *Cell Tissue Res*. 2012, 349, 631-633.
8. Wasinger V, Zeng M, Yau Y. Current status and advances in quantitative proteomic mass spectrometry. *Int J Proteomics*. 2013, 2013, Article ID 180605, 12 pages; <http://dx.doi.org/10.1155/2013/180605>. [Epub ahead of print].
9. Joshi S, Zamah N, Raikar R, [et al.]. Serum and peritoneal fluid proteins in women with and without endometriosis. *Fertil Steril*. 1986, 46, 1077-1082.
10. Zhang H, Niu Y, Feng J, [et al.]. Use of proteomic analysis of endometriosis to identify different protein expression in patients with endometriosis versus normal controls. *Fertil Steril*. 2006, 86, 274-282.
11. 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, 1184-1192.
12. Liu H, Lang J, Zhou Q, [et al.]. Detection of endometriosis with the use of plasma protein profiling by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Fertil Steril*. 2007, 87, 988-990.
13. Wang L, Zheng W, Ding XY, [et al.]. Identification biomarkers of eutopic endometrium in endometriosis using artificial neural networks and protein fingerprinting. *Fertil Steril*. 2010, 93, 2460-2462.
14. Seeber B, Czech T, Buchner H, [et al.]. The vitamin E-binding protein afamin is altered significantly in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2010, 94, 2923-2926.
15. Wöfler M, Meinhold-Heerlein I, Söhlgen L, [et al.]. Two-dimensional gel electrophoresis in peritoneal fluid samples identifies differential protein regulation in patients suffering from peritoneal or ovarian endometriosis. *Fertil Steril*. 2011, 95, 2764-2768.
16. Polak G, Wertel I, Tarkowski R, Kotarski J. Peritoneal fluid iron levels in women with endometriosis. *Ginekol Pol*. 2010, 81, 20-23.
17. Polak G, Wertel I, Tarkowski R, [i wsp.]. Ferritin levels in the peritoneal fluid-a new endometriosis marker? *Ginekol Pol*. 2006, 77, 389-393.
18. Ferrero S, Gillott D, Remorgida V, [et al.]. Proteomic analysis of peritoneal fluid in women with endometriosis. *J Proteome Res*. 2007, 6, 3402-3411.
19. Fassbender A, Waelkens E, Verbeeck N, [et al.]. Proteomics analysis of plasma for early diagnosis of endometriosis. *Obstet Gynecol*. 2012, 119, 276-285.
20. Fassbender A, Vodolazkaia A, Saunders P, [et al.]. Biomarkers of endometriosis. *Fertil Steril*. 2013, 99, 1135-1145.
21. Kyama C, Overbergh L, Debrock S. Increased peritoneal and endometrial gene expression of biologically relevant cytokines and growth factors during the menstrual phase in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2006, 85, 1667-1675.
22. Fowler P, Tattum J, Bhattacharya S. An investigation of the effects of endometriosis on the proteome of human eutopic endometrium: a heterogeneous tissue with a complex disease. *Proteomics*. 2007, 7, 130-142.
23. Ten Have S, Fraser I, Markham R, [et al.]. Proteomic analysis of protein expression in the eutopic endometrium of women with endometriosis. *Proteomics Clin Appl*. 2007, 1, 1243-1251.
24. Stephens A, Hannan N, Rainczuk A, [et al.]. Post-translational modifications and protein-specific isoforms in endometriosis revealed by 2D DIGE. *J Proteome Res*. 2010, 9, 2438-2449.
25. May K, Villar J, Kirtley S, [et al.]. Endometrial alterations in endometriosis: a systematic review of putative biomarkers. *Hum Reprod Update*. 2011, 17, 637-653.
26. Fassbender A, Verbeeck N, Börnigen D, [et al.]. Combined mRNA microarray and proteomic analysis of eutopic endometrium of women with and without endometriosis. *Hum Reprod*. 2012, 27, 2020-2029.
27. Nothnick W, Curry T, Muse K. Detection of a unique 32-kd protein in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril*. 1994, 61, 283-288.
28. Ferrero S, Gillott D, Remorgida V, [et al.]. Peritoneal fluid proteome in women with different ASRM stages of endometriosis. *Gynecol Endocrinol*. 2008, 24, 433-441.
29. Ferrero S, Gillott D, Anserini P, [et al.]. Vitamin D binding protein in endometriosis. *J Soc Gynecol Investig*. 2005, 12, 272-277.
30. Kyama C, Mihalyi A, Gevaert O, [et al.]. Evaluation of endometrial biomarkers for semi-invasive diagnosis of endometriosis. *Fertil Steril*. 2011, 95, 1338-1343.
31. Kyama C, Mihalyi A, Simsa P, [et al.]. Role of cytokines in the endometrial-peritoneal cross-talk and development of endometriosis. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2009, 1, 444-454.
32. El-Kasti M, Wright C, Fye H, [et al.]. Urinary peptide profiling identifies a panel of putative biomarkers for diagnosing and staging endometriosis. *Fertil Steril*. 2011, 95, 1261-1266.
33. Tokushige N, Markham R, Crossett B, [et al.]. Discovery of a novel biomarker in the urine in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2011, 95, 46-49.
34. Ametzazurra A, Matorras R, Garcia-Velasco J, [et al.]. Endometrial fluid is a specific and non-invasive biological sample for protein biomarker identification in endometriosis. *Hum Reprod*. 2009, 24, 954-965.
35. Seppälä M, Koistinen H, Koistinen R, [et al.]. Glycodelin in reproductive endocrinology and hormone-related cancer. *Eur J Endocrinol*. 2009, 160, 121-133.
36. Yang H, Zhou B, Prinz M, Siegel D. Proteomic analysis of menstrual blood. *Mol Cell Proteomics*. 2012, 11, 1024-1035.