



Лични подаци руководиоца пројекта

Име: Марија

Презиме: Шорак

Е-маил адреса: soraks@sbb.rs

Општи подаци и протокол истраживања:

Назив пројекта: **Нивои цитокина пре и после хистероскопске полипектомије код инфертилних пацијенткиња**

Кључне речи: полип, хистероскопија, инфертилитет, цитокини.

Сажетак

Неплодност је проблем који широм света погађа око 80 милиона парова. Сматра се да је око 15 % опште популације погођено овим проблемом. Ендометријални полипи настају када ендометријум хипертрофише услед стимулације естрогеном. Дијагноза се поставља на основу хистероскопског, сонографског или хистеросонографског налаза, када се у кавуму утеруса уочава полип различите величине.

Ендометријум је веома динамично ткиво у коме се дешавају цикличне промене не само у хистолошком смислу већ и у смислу продукције великог броја молекуларних медијатора укључујући адхезионе молекуле и велики број различитих цитокина.

Цитокини су велика фамилија протеинских молекула који функционишу као медијатори и регулатори ћелијских комуникација, како у физиолошким тако и у патолошким условима. Различите ћелије продукују цитокине делујући на хемотаксу, активацију, пролиферацију и диференцијацију других ћелија. Ћелије које луче највеће количине цитокина су леукоцити.

Циљ ове проспективне студије је утврдити промене у нивоима цитокина у ткиву ендометријалног полипа, ендометријума, испирку утеруса и венској крви код инфертилних пацијенткиња са ендометријалним полипом пре и након оперативног захвата.

Испитивањем корелације између експресије цитокина хистолошким и имунохистохемијским анализама у наведеним ткивима утврдићемо повезаност између експресије цитокина у ткиву полипа и ендометријуму у односу на измерене концентрације у серуму и испирку утеруса. Испитиваћемо нивое следећих цитокина: гликоделина (PP14), IL-6, IL-10, INF- γ , TNF- α у серуму инфертилних пацијенткиња са



полипом, као и инфертилних пацијенткиња без полипа, у ткиву полипа и околном ендометријуму, као и да пратимо њихов тренд у непосредном постоперативном току, односно месец дана након хистероскопске полипектомије.

Истраживање је планирано у виду отворене студије пресека на одређеном узорку од 50 пацијенткиња са ендометријалним полипом и 30 пацијенткиња без ендометријалног полипа које ће бити изведено у Гинеколошко акушерској клиници Народни фронт-Београд у периоду од маја 2012. до новембра 2013. и у Центру за молекулску медицину и испитивања матичних ћелија, Факултет медицинских наука, Крагујевац.

Очекује се да ће добијени резултати првенствено указати на постојање промена у ендометријуму у смислу алтерације нивоа цитокина у ткиву, испирку и венској крви код инфертилних пацијенткиња са ендометријалним полипом пре и након оперативног захвата.

Корелацијом добијених резултата између експресије цитокина у ткиву полипа и околном ендометријуму и измерене концентрације цитокина у серуму и испирку утеруса можемо добити важне податке: како што једноставније пратити и припремити пацијенткиње за фертилизацију, као и пратити терапијски одговор пацијенткиња након полипектомија које имају дугогодишњи проблем менометрорагија.

Циљеви истраживања

Циљ ове проспективне студије је испитати вредности цитокина у ткиву ендометријума, испирку утеруса и венској крви код инфертилних пацијенткиња са ендометријалним полипом пре и након оперативног захвата.

Испитати корелацију између експресије цитокина у полипу, околном ткиву ендометријума и утврдити повезаност између експресије цитокина у ткиву полипа и ендометријуму у односу на измерене концентрације у серуму и испирку утеруса. Сходно томе, поставили смо следеће задатке;

1. Одредити нивое гликоделина (PP14), IL-6, IL-10, INF- γ , TNF- α у серуму пацијенткиња пре оперативног захвата и месец дана након оперативног захвата код пацијенткиња са ендометријалним полипом и код контролне групе пацијенткиња
2. Одредити нивое гликоделина (PP14), IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α у испирку утеруса узетог у току операције код пацијенткиња са ендометријалним полипом и код контролне групе пацијенткиња
3. Испитати експресију гликоделина (PP14), IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α у ткиву полипа и ендометријалном ткиву код пацијенткиња са полипом, као и код пацијенткиња контролне групе.
4. Утврдити евентуалну повезаност између нивоа наведених цитокина у крви инфертилних пацијенткиња са дијагностикованим ендометријалним полипом са нивоима цитокина у испирку утеруса узетом током саме хируршке интервенције-хистероскопске полипектомије, као и повезаност са експресијом истих цитокина у самом полипу и околном ендометријуму.



5. Испитати корелацију наведених цитокина у крви, испирку утеруса, ткиву полипа и ткиву околног ендометријума код пацијенткиња са дијагностикованим полипом са експресијом истих цитокина код инфертилних пацијенткиња без ендометријалног полипа.
6. Испитати корелацију наведених цитокина у крви, испирку утеруса, ткиву полипа и ткиву околног ендометријума код инфертилних пацијенткиња са полипом у односу на клиничко патолошке параметре.
7. Испитати корелацију наведених цитокина у крви, испирку утеруса и околном ендометријуму код инфертилних пацијенткиња без ендометријалног полипа у односу на клиничко патолошке параметре.

Актуелност истраживања (500 речи)

Претходне студије су показале да ендометријални полипи у кавуму утеруса доводе до повећања концентрације ендометријалних протеина и цитокина у испирку материце. Ендометријални полипи утичу на промену нивоа ендометријалних протеина и цитокина (IL-6, IL 10, TNF- α , IFN- γ и гликоделин) током различитих фаза менструалног циклуса (1,2). Неуспех имплантације је главни разлог неплодности код иначе здравих жена(3). Гликоделин (или плацентни протеин 14) је гликопротеин који се налази у glandуларном и површинском епителу ендометријума и у највећој концентрацији се продукује током секреторне фазе ендометријалног циклуса (4, 5).

IL-6 и IL 10 су цитокини који се у већим концентрацијама луче у glandуларном и луминалном епителу ендометријума нарочито током средине секреторне фазе, да би у касној секреторној фази њихова концентрација почела да опада(6). Сматра се да IL 6 има улогу у процесу имплантације обзиром да је детектован у смањеним концентрацијама код пацијенткиња са понављаним раним побачајима, а IL 10 је детектован у значајно мањој концентрацији код пацијенткиња са дијагностикованим миомима утеруса.

TNF- α , *cachexin* или *cachectin*, је цитокин који учествује у системској инфламацији. Активност му је проинфламаторна и антитуморска. Може да потакне смрт ћелије. Регулише пролиферацију и диференцијацију ћелија имунског система (7).

TNF- α инхибише синтезу прогестерона и естрогених хормона у гранулозним и трофобластним ћелијама. Инхибише раст трофобластних и ембрионалних ћелија(8). Концентрације TNF- α су значајно веће након полипектомије, а лучење достиже врхунац у секреторној фази. Повећана експресија може довести до неуспеха имплантације, абортуса и ендометриозе.

IFN- γ је мало сличан осталим интерферонима, продукују га активирани Т лимфоцити, НК ћелије, моноцити и макрофаги. Он је најважнији проинфламаторни цитокин одговоран за активацију и регулацију фагоцитне функције мононуклеарних ћелија.



TNF- α i INF- γ имају штетне ефекте на развој ембриона и имплантацију при великим концентрацијама. Укључени су у необјашњиве спонтане побачаје(9).

Коришћењем различитих техника вештачке оплодње успех имплантације је у просеку око 25%(10). Неадекватна рецептивност материце је узрок скоро 2/3 неуспелих покушаја имплантације, док је квалитет ембриона одговоран за 1/3 ових неуспеха(10, 11). Ендометријум је динамично ткиво у коме се дешавају цикличне промене у току сваког менструалног циклуса. Ендометријум има за циљ обезбеђивање оптималне средине за развој и одржавање трудноће. Током менструалног циклуса, у односу на промене у ендометријуму које остварују хормони, разликујемо две фазе: пролиферативну и секреторну. Средина секреторне фазе, тј временски ограничен период између 6. и 10. дана након овулације је дефинисана као “прозор рецептивности ендометријума” током којег су идеални услови за имплантацију бластоцисте.

Компоненте рецептивног ендометријума су:

-*луминални епител* са специфичном диференцијацијом која подразумева експресију адхезионих молекула на апикалној површини епитела, које омогућавају адхезију бластоцисте;

-*гландуларне епителне ћелије* које секретују супстанце неопходне за развој бластоцисте;

-*децидуалне ћелије* и велики грануларни лимфоцити које врше модулацију трофобластне функције и ангиогенезе путем секреције фактора раста, везујућих протеина за факторе раста, ангиогених фактора и цитокина и

-*стромални екстрацелуларни матрикс* који олакшава инвазију трофобласта и његову пролиферацију, али истовремено спречава неконтролисану пенетрацију. Сви ови процеси су под контролом ендокриних, аутокриних и паракриних фактора. Ендометријум је веома динамично ткиво у коме се дешавају цикличне промене не само у хистолошком смислу већ и у смислу продукције великог броја молекуларних медијатора укључујући адхезионе молекуле, цитокине, факторе раста, липиде итд(12). Ендометријална рецептивност је тачка загушења репродуктивног процеса. Модерни приступи, који укључују припрему ембриона на одговарајући начин (*embryon hatching*) или узимање узорка из материце заједно са факторима који би требало да побољшају везивање, би могли да повећају шансу за имплантацију поготово у случајевима где је имплантација више пута била неуспешна(13).

Узорци ендометријалне биопсије се могу користити за идентификацију молекула који су повезани са рецептивношћу ендометријума да би се добио бољи увид у процес имплантације код људи.

Досадашњи подаци указују да ендометријална рецептивност може да буде измењена уколико је повећана концентрација гликоделина око овулације, када би те вредности требале бити ниске или да их нема(14, 15). Концентрације гликоделина у ендометријуму и последично кавуму утеруса су максималне 6 дана после ЛН пика(16,17). Концентрације гликоделина у испирку утеруса и плазми су знатно више код пацијенткиња са полипом ендометријума у поређењу са контролном групом (18,19).



Највећа експресија ендометријалног IL6 је у средњој и касној секреторној фази менструалног циклуса те је могуће да има улогу и у имплантацији ембриона (20,21). Снижене су му концентрације код жена са понављаним спонтаним побачајим(22,23).

IL10 има ниже концентрације средином секреторне фазе код жена са понављаним побачајима (24).

Концентрације TNF- α су значајно веће након полипектомије, а његова експресија достиже врхунац у секреторној фази. TNF- α и INF- γ имају штетне ефекте на развој ембриона и имплантацију уколико су експримирани у великим концентрацијама, што је у неким радовима сугерисано да су укључени у необјашњиве спонтане побачаје (25, 26).

Сматра се да повећане или смањене концентрације цитокина у крви пацијенткиња, као и у испирку и самом ткиву ендометријума значајно утичу на њихову фертилност, тј да је значајно смањују. Такође присуство ендометријалног полипа мења концентрације наведених цитокина и доводи до смањене фертилности пацијенткиња. Хируршко одстрањивање полипа доводи до промена у концентрацијама наведених цитокина, након чега се рецептивност ендометријума мења у смислу повећане фертилности испитиваних пацијенткиња.

До сада непостоји ниједан стручни рад који је пратио промену више од два цитокина у серуму и испирку утеруса, као ниједан рад који је пратио корелацију истих цитокина у ткиву самог полипа и ендометријума.

Боље поимање механизма који регулише имплантацију ембриона би могло да повећа могућност лекара да лечене плодноост, спрече ране прекиде трудноће и развију нова средства за контрацепцију.

**Предмет и опис истраживања:
задачи, методологија, очекивани резултати**

Задачи истраживања су:

Истраживање је планирано у виду клиничке, проспективне студије на одређеном узорку (80 пацијенткиња). Прикупљање узорака крви, ткива полипа, ендометријалног ткива и испирка утеруса током хистероскопије ће бити изведено у Гинеколошко акушерској клиници Народни фронт у Београду.

Учествоваће пацијенткиње у генеративном периоду (старости од 20-43 година) код којих је дијагностикован едометријални полип као узрок инфертилитета. Дијагностиковање полипа ће бити вршено трансвагиналним ултразвучним прегледима, током прве фазе циклуса или хистеросонографским прегледима, као и током саме хистероскопије код пацијенткиња са сумњом на ендометријалну полипозу, а на основу анамнестичких података. Поред наведене групе у студији ће учествовати и контролна група пацијенткиња исте старосне доби, које се лече од инфертилитета и које немају ендометријални полип. Предвиђено је праћење пацијенткиња током месец дана након



интервенције у смислу узимања узорака периферне венске крви и одређивања нивоа истих цитокина, и контролни УЗ преглед.

Дијагностичко-оперативна хистероскопија би била извођена у општој анестезији, у операционој сали са одговарајућом опремом и инструментима. Преоперативна припрема би обухватила комплетну дијагностику и рутинско узимање потребних анализа: цервикални и вагинални брис, брис на хламидију, микоплазму и уреаплазму, ПАПА тест, ултразвучни преглед. Одређивање крвне групе, крвне слике и биохемијских анализа уз анестезиолошки преглед и давање сагласности за оперативно лечење. Оперативни захвати би били рађени код инфертилних пацјенткиња до средине пролиферативне фазе-непосредно по завршетку менструалног крварења.

Критеријуми за укључење у студију су испитанице са верификованим ендометријалним полипом старости од 20-43 година, које се лече од примарног или секундарног инфертилитета и инфертилне испитанице без ендометријалног полипа исте старосне доби.

Критеријуми за искључење из студије за обе групе испитаница је постојање субмукозног миома, ендометриозе, карцинома ендометријума, аномалија утеруса, пацјенткиње које су имале операције на утерусу и тубама и пацјенткиње са неуспешним претходним стимулацијама овулације.

Обзиром на наш општи циљ испитивања ендометријалне рецептивности код пацјенткиња са ендометријалним полипом као и код контролне групе пацјенткиња без ендометријалног полипа користићемо следеће методе за одређивање концентрација наведених цитокина:

1. За анализу цитокина у серуму: узимамо 5ml периферне венске крви, пре операције, ради одређивања $INF\gamma$, IL-10, IL-6, $TNF\alpha$, гликоделин (PP14). Крв се узима вакуаимером са хепарином и центрифугира се 10 минута на 2500 обртаја. Супернатант се сакупи и чува на температури од $-20^{\circ}C$, а потом се материјал шаље у лабораторију Клиничког центра Крагујевац-Центар за молекулску медицину и испитивање матичних ћелија. Детекција и концентрација наведених цитокина ће бити одређиване ELISA методом. Периферна венска крв се узима код пацјенткиња обе испитиване групе пре хистероскопске операције и месец дана након операције.
2. Узимање испирка утеруса за време операције ради одређивања $TNF\alpha$, $INF\gamma$, IL-6, IL-10, гликоделин (PP14). Потребно је убризгати 10ml физиолошког раствора у кавум утеруса и одмах аспирирати без контаминације. Центрифугирати на 2500 обртаја 10 минута. Супернатант се сакупи и чува на температури од $-20^{\circ}C$, а потом се материјал шаље у Центар за молекулску медицину и испитивање матичних ћелија. Детекција и концентрација наведених цитокина ће бити одређиване ELISA методом.
3. Узимање дела одстрањеног полипа и дела ендометријалног ткива уз полип ради имунохистохемијског испитивања код пацјенткиња са верификованим ендометријалним полипом као и узимање дела ендометријалног ткива код пацјенткиња контролне групе. Ткиво дела полипа и ендометријума поред полипа, фиксирати у 10 % формалину а затим утопљен у парафин, сече се на 4 μ m дебљине и боји хематофикселином и еозином, а потом се ради имунохистохемијско испитивање.
4. Елиса тест: испирак утерус и узорак плазме од сваке пацјенткиње се додају у одвојене трослојне лабораторијске посуде и стављају у инкубацију преко ноћи на $37^{\circ}C$. Следећег дана лабораторијске посуде се оперу 3 пута физиолошким



раствором који је разблажен фосфатима и блокирање се ради на собној температури у трајању од једног сата употребом млека са 1 % масти. Лабораторијске посуде се оперу више пута физиолошким раствором који је разблажен фосфатима и остављен у инкубатору у трајању од 2 сата на температури од 37°C са 100 микролитара пилећих антигликоделинских антитела прочишћених путем афинитетне хроматографије у односу 1 : 50. Лабораторијске посуде се поново оперу 3 пута а, другостепено антитело (зечији и антипилећи IgG удружен са алкалном фосфатазом) се дода у размери од 1: 35000 у физиолошки раствор који је ублажен и стављен у инкубацију на 37 °C у трајању од 2 сата. Лабораторијске посуде се поново оперу и дода се супстрат паранитрофенил фосфат. Оптичка густина се мери на 405 nm после 30 минута (Poddaridr.,1998).

Методологија:

Истраживање је планирано у виду клиничке, проспективне студије на одређеном узорку (80 пацијенткиња). Прикупљање узорака крви, ткива полипа, ендометријалног ткива и испирка утеруса током хистероскопије ће бити изведено у Гинеколошко акушерској клиници Народни фронт у Београду у периоду од 01.06.2012. до 01.11.2013. а на основу одобрења Етичког одбора ГАК Народни фронт дел.број 04-24/3-1 од 24.05.2012. Испитиване пацијенткиње су са територије Републике Србије, Републике Српске и Републике Црне Горе које су хоспитализоване у циљу лечења инфертилитета или припреме за методе АРТ. Кандидат учествује у свим фазама планираног истраживања.

СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Величина узорка одређена је на основу формуле за израчунавање величине узорка имплементирану у софтвер PASS 11.0. Величина узорка одређена је за моћ студије $1-\beta=0,8$ и ниво грешке $\alpha=0,05$. Да би се открила значајна разлика између контролне и групе жена са полипозом по серумском гликоделину од 25 ng/ml потребно је по 9 и 15 пацијенткиња док је за разлику утериног испирка од 160ng/ml потребно је по 30 и 48 пацијенткиња. За исте пацијенте потребно је по 77 и 124 пацијенткиње да би се добила значајна разлика од 2.5 ng/ml TNF- α . Насупрот томе, да би се добила значајна разлика између група по IFN- γ од 18.3 ng/ml потребно је по 10 и 16 пацијената. Из приложеног се види да је минималан број пацијената за ову студију 9 у контролној и 15 у експерименталној групи, док је оптималан број 30 и 48 . Разлику по TNF- α тешко је доказати јер су остала истраживања показала да се ради о веома великом варијабилитету испитиваних параметара ($CV>3$ и $CV\approx 0.8$) и за ове анализе потребни су велики узорци.

У статистичкој анализи биће коришћене дескриптивне и аналитичке статистичке методе. Од дескриптивних, биће коришћени апсолутни и релативни бројеви, мере



централне тенденције (аритметичка средина, медијана) и мере дисперзије (стандардна девијација, интервал варијације). Од аналитичких статистичких метода биће коришћени тестови разлике, параметарски и непараметарски. Од параметарских тестова биће коришћени Т тест и ANOVA поновљених мерења. Од непараметарских тестова биће коришћени Хи-квадрат тест, McNemar тест, Mann-Whitney У тест и Wilcoxon тест. Дискриминациона и логистичка регресиона анализа биће коришћени у циљу дискриминације испитиваних параметара.

Сви резултати биће обрађени помоћу SPSS 15.0 софтверског пакета. Вероватноћа одбацивања нулте хипотезе биће 0,05(35).

Очекивани резултати и значај истраживања:

Очекује се да ће добијени резултати првенствено указати на постојање промена у квалитету ендометријума, а следствено, праћењем и мењањем непожељних фактора на нивоу ендометријума можемо повећати успех метода АРТ код инфертилних пацијенткиња са ендометријалним полипом.

Обзиром на релативно мали број стручних радова који су се на овај начин бавили тематиком ендометријалне рецептивности у генеративном периоду жена са дијагностикованим ендометријалним полипом добијени резултати могу да буду од велике користи у третману инфертилних пацијенткиња са дијагностикованим ендометријалним полипом.

Корелацијом добијених резултата између експресије цитокина у ткиву полипа и околном ендометријуму и измерене концентрације цитокина у серуму и испирку утеруса можемо добити важне податке: како што једноставније пратити и припремити пацијенткиње за фертилизацију, као и пратити терапијски одговор пацијенткиња након полипектомија које имају дугогодишњи проблем менометрорагија.

Податке можемо применити и код праћења пацијенткиња са субмукозним миомима који дају веома сличну симптоматологију.

Проширивањем истраживања у смислу праћења промена на нивоу ендометријума код пацијенткиња са IUD (интраутерусним системима-спиралама) могуће је повећати ефикасност оваквих контрацептива, а евентуално смањити непожељна дејства ових контрацептива-честа компликација је PID и тубооваријални апсцеси.

Временски оквир:

Истраживање ће бити спроведено у временском периоду од две године.



Литература:

1. Nathani F, Clark T.J.: Uterine polypectomy in the management of abnormal uterine bleeding: A systematic review. *J Minim Invasive Gynecol.* 2006; 13(4): 260-8.
2. Silberstein T, Saphier O, van Voorhis BJ, Plosker SM.: Endometrial polyps in reproductive age fertile and infertile women. *Isr Med Assoc J.* 2006;8(3):192-5.
3. Stamatellos I, Apostolides A, Stamatopoulos P, Bontis J.: Pregnancy rates after hysteroscopic polypectomy depending on the size or number of the polyps. *Arch Gynecol Obstet.* 2008;277(5):395-9.
4. Richlin S. S, Ramachandran S, Shanti A, Murphy A. A and Parthasarathy S. Glycodelin levels in uterine flushings and in plasma of patients with leiomyomas and polyps: implications for implantation. *Hum Reprod.* 2002;17: 2742-7.
5. J. Ben-Nagi J. Miell D. Mavrelou J. Naftalin C. Lee D. Jurkovic. Endometrial implantation factors in women with submucous uterine fibroids. *Reproductive BioMedicine Online* 2010;21 (5): 610-5.
6. Melinda J. Jasper, Kelton P. Tremellen, Sarah A. Robertson. Reduced expression of IL-6 and IL-1 α mRNAs in secretory phase endometrium of women with recurrent miscarriage. *Journal of Reproductive Immunology.* 2007;73(74-84).
7. M.von Wolff, I. Classen-Linke, D. Heid, C.A. Krusche, K. Beier-Hellwig, C. Karl and H.M. Beier. Tumor necrosis factor α (TNF- α) in human endometrium and uterine secretion: an evaluation by immunohistochemistry, ELISA and semiquantitative RT-PCR. *Molecular Human Reproduction* 1999;vol.5 no.2 pp. 146-152.
8. K. Okuda, R. Sakumoto, N. Okamoto, T. j. Acosta, H. Abe, F. Sinowatz, D. J. Skarzynski. Cellular localization of genes and proteins for tumor necrosis factor- α (TNF), TNF receptor types I and II in bovine endometrium. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2010; 330(41-48).
9. J. Ben-Nagi J. Miell, J. Yazbek, T. Holland, D. Jurkovic. The effect of hysteroscopic polypectomy on the concentrations of endometrial implantation factors in uterine flushings. *Reproductive BioMedicine Online* 2009; Vol 19. No 5. 737-744.
10. Hanna Achache and Ariel Revel. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human Reproduction Update* 2006; 12 (6): 731-46.
11. Inagaki N, Ung L, Otani T, Wilkinson D, Lopata A. Uterine cavity matrix metalloproteinases and cytokines in patients with leiomyoma, adenomyosis or endometrial polyp. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003;111(2):197-203.
12. Casals G, Ordi J, Creus M, Fábregues F, Casamitjana R, Quinto L, Campo E, Balasch J. Osteopontin and α v β 3 integrin expression in the endometrium of infertile and fertile women. *Reprod Biomed Online.* 2008;16(6):808-16.
13. Ursula Bentin-Ley, Anette Lindhard, Vibeke Raven, Henrik Islin, Steen Sorensen. Glycodelin in endometrial flushing fluid and endometrial biopsies from infertile women. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 2011;156(60-66).
14. Nick A. Bersinger, Martin H. Birkhäuser, Mengistu Yared and Dorothea M. Wunder. Serum glycodelin pattern during the menstrual cycle in healthy young women. *Acta Obstetrica et Gynecologica.* 2009;88:1215-1221.
15. Zaid M. Tabbaa, Ye Zheng and Gaurang S. Daftary. KLF11 Epigenetically Regulates Glycodelin-A, a Marker of Endometrial Biology Via Histone-Modifying Chromatin Mechanisms. *Reproductive Sciences.* 2013.00(0) 1-10



16. Li, T.C., Ling, E., Dalton, C., Bolton, A.E. and Cooke, I.D. Concentration of endometrial PP14 in uterine flushings throughout themenstrual cycle in normal, fertile women. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 1993; 100:460–4.
17. Veronica Zaga-Clavellina, Ruiz Velasco-MuñMartha, Pilar Flores-Espinosa. In Vitro Secretion Profile of Pro-Inflammatory Cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-6, and of Human Beta-Defensis(HBD)-1, HBD-2, and Stimulation with Gardnerellavaginalis. *American Journal of Reproductive Immunology.* 2011; 67(34-43).
18. M.von Wolff, S. Stieger, K.Lumpp, Bücking, T.Strowitzki and C.J.Thaler. *Molecular Human Reproduction* . 2002; Vol 8, No.12 pp. 1096-1102.
19. Valle RF.: Therapeutic hysteroscopy in infertility. *Int J Fertil.* 1984;29(3):143-8.
20. Bettocchi S, Ceci O, Di Venere R, et al. Advanced operative office hysteroscopy without anaesthesia: analysis of 501 cases treated with a 5 Fr bipolar electrode. *Hum Reprod.* 2002;17:2435-8.
21. McGurgan P, Taylor L.J, Duffy S.R, O'Donovan P.J.: Are endometrial polyps from premenopausal women similar to post-menopausal women? An immunohistochemical comparison of endometrial polyps from pre- and post-menopausal women. *Maturitas,* 2006;20;54(3):277-84.
22. Preutthipan S, Herabutya Y.: Hysteroscopic polypectomy in 240 premenopausal and postmenopausal women. *FertilSteril.* 2005;83(3):705-9.
23. Preutthipan S, Herabutya Y.: Hysteroscopic polypectomy in 240 premenopausal and postmenopausal women. *FertilSteril.* 2005;83(3):705-9.
24. Henriquez D.D, van Dongen H, Wolterbeek R, Jansen F.W.: Polypectomy in premenopausal women with abnormal uterine bleeding: effectiveness of hysteroscopic removal. *J Minim Invasive Gynecol.* 2007;14(1):59-63.
25. Bradley LD.: Hysteroscopic resection of myomas and polyps. In: Bradley LD, Falcone T, eds. *Hysteroscopy: Office Evaluation and Management of the Uterine Cavity.* Philadelphia: Mosby, 2009: 221-39.
26. Jansen FW, Vredevoogd CB, van Unslzen K, Hermans J, Trimbo JB, Trimbo-Kemper TC. Complications of hysteroscopy: a prospective, multicenter study. *ObstetGynecol.* 2000; 96(2):266-70.
27. Cooper J.M, Brady R.M. Intraoperative and early postoperative complications of operative hysteroscopy. *ObstGynecolClin North Am.* 2001; 27: 347-66.
28. Propst A. M, Liberman R. F, Harlow B. L, Ginsburg E. S. Complications of hysteroscopic surgery: predicting patients at risk. *ObstetGynecol* 2009; 96(4): 517-20.
29. Oehninger, S., Coddington, C.C., Hodgen, G.D. and Seppala, M. Factors affecting fertilization: endometrial placental protein 14 reduces the capacity of human spermatozoa to bind to the human zonapellucida. *Fertil.Steril.* 1995;63: 377-83.
30. Okamoto, N.A., Uchida, A., Takakura, K., Kariya, Y., Kanzaki, H., Riittinen, L., Koistininen, R., Seppala, M. and Mori, T. Suppression by human placenta protein 14 of natural killer cell activity. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1991;26: 137-42.
31. Song, M., Ramaswamy, S., Ramachandran, S., Flowers, L.C., Horowitz, I.R., Rock, J.A. and Parthasarathy, S. Angiogenic role for Glycodelin intumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 9265-70.
32. Machin, D., Campbell, M., Fayers, P., and Pinol, A. 1997. *Sample Size Tables for Clinical Studies*, 2nd Edition. Blackwell Science. Malden, MA.
33. Kevin K.W.Lam, Philip C.N.Chiu, Cheuk-Lun Lee, Ronald T.K.Pang, Crmen O.N.Leung, Hannu Koistininen, Markku Seppala, Pak-Chung Ho and William



- S.B. Yeung. Glycodelin –A Protein Interacts with Siglec-6 Protein to Suppress Trophoblast Invasiveness by Down-regulating Extracellular Signal-regulated Kinase(ERK)/c-Jun Signaling Pathway. *J.Biol.Chem.* 2011;286:37118-37127.
34. S.LaVignera ,R.Condorelli, S.Bellanca, B.La Rosa, A.Mousavi,B.Busa, L.O.Vicari, E.Vicari. Obesity is associated with a higher level of pro-inflammatory cytokines in follicular fluid of womwn undergoing medically assisted procreation(PMA) programs.
35. Machin D., Campbell M.,Fazers P. and Pinol A.1977. Sample Size Tables for Clinical Studies; 2nd Edition Blackwell Science.Malden,MA.