



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Ана М. Девић

**Нивои цитокина пре и после хистероскопске
полипектомије код инфертилних пацијенткиња**

Докторска дисертација

Ментор: др сци. мед. Марија Шорак, доцент

Крагујевац, 2020



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Ana M. Dević

**Cytokine levels before and after hysteroscopic
polypectomy in infertile patients**

Doctoral Dissertation

Mentor: dr sci. med. Marija Šorak, Assistant Professor

Kragujevac, 2020

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Аутор
Име и презиме: Ана М. Девић
Датум и место рођења: 05. 04. 1974. године, Београд.
Садашње запослење: Специјалиста гинекологије и акушерства, субспецијалиста стерилитета и инфертилитета, Болница за Гинекологију и акушерство, КБЦ Земун.
Докторска дисертација
Наслов: Нивои цитокина пре и после хистероскопске полипектомије код инфертилних пацијенткиња
Број страница: 117
Број слика: 54
Број библиографских података: 120
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Научна област (УДК): 618/Медицина
Ментор: др сци. мед. Марија Шорак, доцент
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 28.06.2016.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: IV-03-133/15 од 08.02.2017.г.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: <ol style="list-style-type: none">1. Проф. др Миодраг Лукић, Редовни професор – емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија., председник2. Проф. др Младенко Васиљевић, Редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан3. Доц. др Марија Шорак, Доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан (ментор)4. Доц. др Иван Јовановић, Доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан5. Доц. др Слободанка Митровић, Доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, Онкологија, члан

Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:

1. Проф. др Мирјана Варјачић, Редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство, председник
2. Проф. др Иван Јовановић, Ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
3. Проф. др Младенко Васиљевић, Редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан

Датум одбране дисертације:

**IDENTIFIKACIONA STRANICA DOKTORSKE DISERTACIJE
NA ENGLESKOM JEZIKU**

Author
Name and surname: Ana M. Devic
Date and place of birth: 05. 04. 1974. Godine, Beograd
Current employment: Specialist in Gynecology and Obstetiks, subspecialist of sterility and infertility, Hospital for Gynecology and Obstetiks, Clinical Hospital Center Zemun
Doctoral Dissertation
Title: Cytokine levels before and after hysteroscopic polypectomy in infertile patients
No. of pages: 117
No. of images: 54
No. of bibliographic data: 120
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): 618/Medicine
Mentor: doc dr Marija Sorak
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date : 28.06.2016.
Decision number and date of acceptance of the doctoral/artistic dissertation topic: IV-03-133/15 since 08.02.2017.y.
Commision for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate
<ol style="list-style-type: none">1. Prof dr Miodrag Lukic, Emeritus Professor University of Kragujevac behind the scientific area Mycrobiology and Immunology, chairman2. Prof dr Mladenko Vasiljevic, Professor Faculty of Medicine, University of Belgrade, behind the scientific area Gynecology and Obstetrics, member3. Doc dr Marija Sorak, Assistent Professor University of Kragujevac behind the scientific area Gynecology and Obstetrics, mentor4. Doc dr Ivan Jovanovic, Assistent Professor University of Kragujevac behind the scientific area Microbiology and Immunology, member5. Doc dr Slobodanka Mitrovic, Assistent Professor University of Kragujevac behind the scientific area Microbiology and Immunology, Oncology, member

Commision for evaluation and defense of doctoral/artistic dissertation:

1. Prof dr Mirjana Varjadic, Professor University of Kragujevac behind the scientific area Gynecology and Obstetrics, chairman
2. Prof dr Ivan Jovanovic, Assistent Professor University of Kragujevac behind the scientific area Microbiology and Immunology, member
3. Prof dr Mladenko Vasiljevic, Professor Faculty of Medicine, University of Belgrade, behind the scientific area Gynecology and Obstetrics, member

Date of DissertationDefense:

Апстракт

Полип ендометријума је најчешће бенигна локализована пролиферација жлезда и строме ендометријума покривена епителом која се издиже изнад равни слузокоже. Најчешће се дијагностикују за време испитивиња узрока неуредног крварења из материце или неплодности.

Цитокини су биолошки активне супстанце са гласничком и регулаторном улогом у имуним и инфламаторним реакцијама. Сви цитокини се стварају и у ендометријуму. Цитокини су укључени у битне репродуктивне функције као што су овулација и имплантација.

Циљ студије је био да се утврде промене на нивоу ендометријума пре и после хистероскопске полипектомије код инфертилних пацијенткиња са ендометријалним полипом и код инфертилних пацијенткиња без ендометријалног полипа.

Код пацијенткиња са полипом ендометријума вредности експресије TNF- α су више у испирку утеруса него у серуму и пре и после хистероскопије. Након уклањања полипа вредности TNF- α су више у серуму код пацијенткиња без полипа ендометријума, него код пацијенткиња са полипом ендометријума. Код пацијенткиња са полипом ендометријума вредности TNF- α су више у испирку него у серуму и пре и после хистероскопије. Интензитет ИИИ експресија TNF- α у полипу ендометријума и биоптату ендометријума пацијенткиња без полипа показује значајну разлику, док између биоптата ендометријума пацијенткиња са полипом и биоптата ендометријума пацијенткиња без полипа, не показује значајну разлику интензитета сигнала ИИИ експресија TNF- α .

Вредности експресије INF- γ код пацијенткиња са полипом су више и у испирку и у серуму и пре и после хистероскопије, него код пацијенткиња без полипа. Код пацијенткиња са полипом ендометријума вредности INF- γ су ниже у испирку него у серуму и пре и после хистероскопије. Вредности INF- γ у серуму ових пацијенткиња су више након уклањања полипа у серуму. Скор експресије INF- γ у биоптату ендометријума, код пацијенткиња без полипа, је значајно нижи у односу на скор експресије INF- γ и у полипу и у биоптату код пацијенткиња са полипом ендометријума. Када се у испирку кавума утеруса детектују више вредности INF- γ имунохистохемијски можемо доказати постојање експресије INF- γ у ендометријуму.

Вредности Glycodelina су биле више код пацијенткиња са полипом ендометријума у испирку утеруса, док су вредности Glycodelina у серуму биле више код пацијенткиња без полипа. Након хистероскопије вредности Glycodelina у серуму код пацијенткиња са полипом ендометријума су порасле, а код пацијенткиња без полипа ендометријума вредности Glycodelina су пале након хистероскопије. Већи број пацијенткиња са полипом ендометријума не показује експресију Glycodelina, и то израженије у биоптату ендометријума него у полипу ендометријума. Постоји значајна разлика скора ИИИ експресије Glycodelina између полипа и биоптата ендометријума код пацијенткиња са полипом ендометријума.

Код пацијенткиња са полипом ендометријума вредност TNF- α у испирку кавуму утеруса и серуму може бити добар скрининг тест за откривање ендометријалног полипа. Код пацијенткиња са полипом ендометријума вредност INF- γ у серуму може бити скрининг тест за откривање полипа ендометријума. Код вредности Glycodelina не постоји предикторска способност теста у циљу откривања полипа ендометријума.

Кључне речи: Цитокини, полип ендометријума, инфертилитет, хистероскопија.

Abstract

An endometrial polyp is the most common benign localised proliferation of endometrial glands and stroma covered with the epithelium and extending above the level of the mucosa. Endometrial polyps are usually diagnosed while examining the cause of abnormal uterine bleeding or infertility.

Cytokines are biologically active substances with a mediating and regulatory role in immune and inflammatory reactions. All cytokines are also generated in the endometrium. They are involved in important reproductive functions such as ovulation and implantation.

The aim of this study was to determine endometrial changes prior to and following hysteroscopic polypectomy in infertile female patients with endometrial polyps and in infertile female patients without endometrial polyps.

In the patients with endometrial polyps the values of TNF- α expression were higher in the uterine flushings than in the serum both prior to and following hysteroscopy. Once the polyps had been removed, serum TNF- α values were higher in the patients without endometrial polyps than in the patients with endometrial polyps. In the patients with endometrial polyps, TNF- α values were higher in the uterine flushings than in the serum both prior to and following hysteroscopy. The intensity of IHC expression of TNF- α in the endometrial polyps and endometrial biopsy specimens obtained from the patients without endometrial polyps revealed a significant difference, whereas there was no significant difference observed in the signal intensity of IHC expression of TNF- α in the biopsy specimens obtained from the patients with and without polyps.

The values of INF- γ expression were higher in the uterine flushings and serum of the patients with polyps before and after hysteroscopy in comparison to the values obtained from the patients without polyps. The values INF- γ were lower in the uterine flushings than in the serum of the patients with endometrial polyps before and after hysteroscopy. In these patients, the serum values of INF- γ increased after the polyps had been removed. INF- γ expression score in endometrial biopsy specimens taken from the patients without endometrial polyps was significantly lower in comparison to INF- γ expression scores both in the polyps and biopsy specimens of the patients with endometrial polyps. When an analysis of uterine flushings reveals higher values of INF- γ , the immunohistochemical method is used to provide evidence for INF- γ expression in the endometrium.

The values of glycodeilin were higher in the uterine flushings of the patients with endometrial polyps, while higher values of glycodeilin were detected in the serum of the patients without polyps. The values of glycodeilin in the serum of the patients with endometrial polyps increased after hysteroscopy as opposed to the values of glycodeilin in the serum of the patients without endometrial polyps, which decreased after hysteroscopy. Glycodeilin expression was not detected in most patients, which was more obvious in the endometrial biopsy specimens than in the polyps. A significant difference in ICH scores of glycodeilin expression was observed between the polyps and endometrial biopsy specimens in the patients with endometrial polyps.

The values of TNF- α in the uterine flushings and serum of patients with endometrial polyps can be considered as a reliable screening test for the detection of endometrial polyps. In patients with endometrial polyps, the values of INF- γ in the serum can be used as a screening test for detecting endometrial polyps. The values of glycodelin do not have a predictive capacity of a test that could help detect endometrial polyps.

Key words: Cytokines, endometrial polyp, infertility, hysteroscopy.

Мојој деци: Николи, Луки и Јани, зато што ће бити...

Мом супругу др Александру Девићу, зато што јесте...

Мојим родитељима: Радмили и Милану Вјештици, зато што су били и биће...

Мојим сестрама: Ивани, Маји и Сањи, зато што постоје...

Мом благопочившем деди Луки Вјештици, зато што заиста...

„Само истинске звезде осветљавају пут другима“

Захвалница

Овим путем шаљем једно велико хвала свима који су ми помогли да истрајем на овом дугом путу:

Мојој менторки Доц. др Марији Шорак, на времену, посвећености, труду и подршци у свим фазама рада

Мом Проф. Младенку Васиљевићу на искреним саветима, сугестијама и несебичној помоћи током овог дугог пута

Проф. Ивану Јовановићу на реализацији експерименталне поставке, као и целом стручном тиму из лабораторије за имунологију

Проф. Слободанки Митровић за огроман труд, време и корисне сугестије приликом обраде података

Проф и пријатељу Горану Зајићу за сву моралну подршку, као и стручну помоћ која је допринела коначном изгледу ове дисертације

Мојим кумовима Проф. Ани Славковић и др Николи Славковићу за сву посвећеност, савете и време које су ми посветили у свим важним сегментима на изради дисертације

Мом супругу др Александру Девићу на изузетној подршци и на највећем доприносу да ова идеја постане стварност.

САДРЖАЈ:

1. УВОД	1
1.1. Дефиниција и опште одредбе	3
1.2. Етиолошки фактори женског инфертилитета	4
1.3. Испитивање и дијагноза брачне неплодности	5
1.4. Анатомија и хистологија ендометријума	5
1.5. Морфолошке промене ендометријума у менструалном циклусу	7
1.5.1. Пролиферативна фаза ендометријума	8
1.5.2. Секреторна фаза ендометријума	10
1.5.3. Хуморално биохемијски фактори који регулишу пролиферативну фазу ендометријума	12
1.6. Клиничка процена ендометријалне функције	13
1.7. Анализа утерусног секрета	17
1.8. Биопсија ендометријума	18
1.9. Цитокини	19
1.9.1. Гликоделин	22
1.9.2. Интерферони	24
1.9.3. INF- γ	25
1.9.4. TNF- α	26
1.10. Полипи ендометријума	28
1.10.1. Преваленца полипа ендометријума код неплодних жена	29
1.10.2. Дијагноза ендометријалних полипа	31
1.10.3. Лечење ендометријалних полипа	31
1.11. Актуелне методе за унапређивање квалитета ендометрија	33
1.12. Хистеросалпингографија-HSG	34
1.13. Хистероскопија	35
1.13.1. Предност хистероскопије	37
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	38
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	40
3.1. Критеријуми за извођење експеримента	41
3.2. Прикупљање узорака крви из v.subitalis пацијенткиња за одређивање концентрације цитокина	42

3.3. Одређивање серумске концентрације цитокина у крви пацијенткиња	42
3.4. Прикупљање узорака испирка материчне шупљине пацијенткиња за одређивање концентрације цитокина	43
3.5. Одређивање концентрације цитокина у испирку утеруса	43
3.6. Имунохистохемијска испитивања ткива полипа и ткива ендометријума.....	44
3.7. Истраживачки поступак	45
3.8. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)	46
3.9. Имунохистохемијска анализа експресије цитокина TNF- α , INF- γ , Glycodelina у ткиву ендометријума и полипа	46
3.10. Снага студије и величина узорка	49
3.11. Статистичка анализа података	49
4. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА.....	51
4.1. Анализа концентрације цитокина добијене ELISA методом	52
4.1.1. Анализа концентрације вредности TNF – α добијене ELISA методом	52
4.1.2. Анализа концентрације INF- γ добијене ELISA методом	58
4.1.3. Анализа концентрације Glycodelina добијена ELISA методом	64
4.2. Анализа резултата добијени методом имунохистохемије	69
4.2.1. Анализа експресије INF- γ	69
4.2.2. Анализа експресије TNF- α	76
4.2.3. Анализа експресије Glycodelina	82
5. ДИСКУСИЈА	90
5.1. TNF- α (ELISA)	92
5.2. INF- γ (ELISA)	93
5.3. Glycodelin (ELISA)	94
5.4. INF- γ (IHH)	96

5.5. TNF- α (ИН)	97
5.6. Glycodelin (ИН)	98
6. ЗАКЉУЧЦИ	99
7. ЛИТЕРАТУРА	103
8. БИОГРАФИЈА.....	114
9. БИБЛИОГРАФИЈА.....	116

СПИСАК СЛИКА

Слика 1	Ултразвучни приказ полипа ендометријума слика преузета из ГАК Народни Фронт	16
Слика 2	Цитокини урођене и стечене имуности самостална израда	21
Слика 3	Утицај гликоделина на различите ћелије самостална израда	23
Слика 4	Утицај $INF-\gamma$ на различите ћелије организма самостална израда	26
Слика 5	Активност $TNF-\alpha$ у организму самостална израда	28
Слика 6	Хистероскопска полипектомија омчицом слика преузета из ГАК Народни Фронт	32
Слика 7	Хистероскопски приказ полипа ендометријума слика преузета из ГАК Народни Фронт	36
Слика 8	Шематски приказ извођења хистероскопије слика преузета са интернета (https://medium.com/@ivfsurrogacyin/hysteroscopy-treatment-in-india-surgery-which-is-smoothly-accomplished-without-any-hurdles-398b76699a35)	37
Слика 9	Полип ендометријума $INF-\gamma$ (увећање 10x) самостална израда	74
Слика 10	Контрола ендометријума $TNF-\alpha$ (увећање 100x) самостална израда	81
Слика 11	Контрола ендометријума $TNF-\alpha$ (увећање 200x) самостална израда	81
Слика 12	Биопсија ендометријума Glycodelin самостална израда	87
Слика 13	Полип ендометријума Glycodelin (увећање 10x) самостална израда	88

Слика 14	Полип ендометријума Glycodelin (увећање 20x) самостална израда	88
Слика 15	Контрола ендометријума Glycodelin (увећање 100x) самостална израда	89
Слика 16	Контрола ендометријума Glycodelin (увећање 200x) самостална израда	89

СПИСАК ТАБЕЛА

Табела 1.	Основне карактеристике и разблажења коришћених примарних антитела за цитокине	47
Табела 2.	Вредности TNF – α зависно од групе	52
Табела 3.	Површина испод ROC криве вредности TNF- α у испирка кавума утеруса	55
Табела 4.	Површина испод ROC криве вредности TNF- α у серуму пацијенткиња пре хистероскопије	56
Табела 5.	Вредности INF- γ зависно од групе	58
Табела 6.	Површина испод ROC криве вредности INF- γ у испирку кавума утеруса	61
Табела 7.	Површина испод ROC криве вредности INF- γ у серуму пре интервенције	62
Табела 8.	Вредности Glycodelina зависно од групе	64
Табела 9.	Површина испод ROC криве вредности Glycodelina у испирку кавума утеруса	67
Табела 10.	Површина испод ROC криве вредности Glycodelina у серуму пре интервенције	68
Табела 11.	Имунохистохемијска експресија INF- γ зависно од групе	69
Табела 12.	Скор ИИИ експресије INF- γ зависно од групе	71
Табела 13.	Интензитет сигнала ИИИ експресије INF- γ зависно од групе	72
Табела 14.	Корелације INF- γ у Експерименталној групи	75
Табела 15.	Имунохистохемијска експресија TNF- α зависно од групе	76
Табела 16.	Скор ИИИ експресије TNF- α зависно од групе	78
Табела 17.	Интензитет сигнала ИИИ експресије TNF- α зависно од групе	80
Табела 18.	Имунохистохемијска експресија Glycodelina зависно од групе	82
Табела 19.	Скор ИИИ експресије Glycodelina зависно од групе	84
Табела 20.	Интензитет сигнала ИИИ експресије Glycodelina зависно од групе	85

СПИСАК ГРАФИКОНА

Графикон 1.	Вредности TNF – α зависно од групе	53
Графикон 2.	ROC крива вредности TNF- α у испирку кавума утеруса	55
Графикон 3.	ROC крива вредности TNF- α у серуму пацијенткиња пре хистероскопије	56
Графикон 4.	Вредности INF- γ зависно од групе	59
Графикон 5.	ROC крива вредности INF- γ у испирку кавума утеруса	61
Графикон 6.	ROC крива вредности INF- γ у серуму пре интервенције	62
Графикон 7.	Вредности Glycodelina зависно од групе	64
Графикон 8.	ROC крива вредности Glycodelina у испирку кавума утеруса	67
Графикон 9.	ROC крива вредности Glycodelina у серуму пре интервенције	68
Графикон 10.	Имунохистохемијска експресија INF- γ зависно од групе	70
Графикон 11.	Скор ИНН експресије INF- γ зависно од групе	71
Графикон 12.	Интензитет сигнала ИНН експресије INF- γ зависно од групе	73
Графикон 13.	Имунохистохемијска експресија INF- γ гама зависно од групе	76
Графикон 14.	Скор ИНН експресије TNF- α зависно од групе	78
Графикон 15.	Интензитет сигнала ИНН експресије TNF- α зависно од групе	80
Графикон 16.	Имунохистохемијска експресија Glycodelina зависно од групе	82
Графикон 17.	Скор ИНН експресије Glycodelina зависно од групе	84
Графикон 18.	Интензитет сигнала ИНН експресије Glycodelina зависно од групе	86

1. УВОД

Ендометријални полипи су задебљања слузокоже материце и састоје се од жлезда ендометријума, строме и крвних судова. Полип настаје као фокална пролиферација базалног слоја ендометријума, а у основи полипа најчешће се налазе задебљали крвни судови. Учесталост ендометријалних полипа је око 24% у општој популацији. Сматра се да полипи дијаметра од 1cm могу бити узрок инфертилитета. Патолошко утерусно крварење је најчешћи клинички симптом постојања ендометријалног полипа. Код инфертилних жена дијагноза ендометријалног полипа је често случајан налаз.

Дијагноза постојања полипа ендометријума се поставља на основу хистероскопског и сонографског налаза. Терапија полипа се састоји у томе да он буде хируршки одстрањен и патохистолошка потврда. Хистероскопија представља златни стандард у дијагнози ендометријалних полипа, она омогућава постављање дијагнозе и истовремено уклањање полипа. Тако да хистероскопија представља дијагностичку и терапијску методу.

Цитокини су полипептиди и гликопептиди молекуларне масе 6-10 kDa. Цитокини испољавају ефекат преко специфичних рецептора у самој ћелији или на ћелијској мембрани. Активирањем специфичних рецептора долази до активације одређених гена, а као последица тога долази до фенотипских и функционалних промена у циљној ћелији. Цитокини могу бити позитивни и негативни регулатори имунског одговора. Основна функција цитокина је у међућелијској комуникацији. Ефекти цитокина су различити: синергизам, антагонизам, плеиотропност, сувишност, аутокрини, паракрини и ендокрини ефекти. Деловање једног цитокина може да индукује продукцију другог цитокина. Активност цитокина зависи од њихове концентрације. Синтезу цитокина могу зауставити инхибитори.

Mosmann и сарадници су први описали продукцију цитокина од стране одређених субпопулација CD4 Т хелпер ћелија. На основу тога је дошло до класификације цитокина, на основу њиховог цитокинског профила, на прву подгрупу: цитокини Th1 типа и цитокини Th2 типа.

1.1. Дефиниција и опште одредбе

Неплодност је према Светској здравственој организацији *WHO* (World Health Organization) болест репродуктивног система и представља немогућност постизања клиничке трудноће након годину или више дана незаштићених полних односа (1). Инфертилитет је стање у коме је пар услед одређених фактора са смањеном а не одсутном шансом за остваривање трудноће и овај израз се користи у међународној терминологији.

У развијеним земљама учесталост неплодности присутна је код 10% парова. У нашој земљи је око 15% парова инфертилно, што би значило да сваки шести или седми пар има проблем са добијањем потомства (2, 3). Од тог процента се код око 85-90% парова углавном открије узрок инфертилита. У 10-15% парова узрок инфертилитета остаје непознат и код њих су сви стандардни дијагностички тестови у физиолошким границама. Дијагноза непознатог узрока инфертилитета се готово два пута чешће поставља код жена старијих од 35 година (4, 5, 6). Разлози неплодности:

- неодговарајућа производња и / или транспорт сперматозоида код мушкарца (40%),
- неодговарајућа производња јајне ћелије код жене (25%),
- сметње у сусрету гамета, транспорт и имплантација зигота (25%),
- идиопатска неплодност (10%).

Проблем неплодности добија све више на значају због сталног пораста броја парова који не могу имати потомство тако да тај проблем није само индивидуални већ и медицински и социјални проблем. У последњих двадесетак година биомедицинска потпомогнута оплодна је једна од области медицине која је можда највише напредовала у поређењу са другим медицинским областима (7). Технолошки и фармацеутски развој, примена генетског инжењеринга и стална увођења нових методологија рада доказ су тенденције даљег убрзаног напретка ове области медицине (7).

1.2. Етиолошки фактори женског инфертилитета

Етиолошки фактори женског инфертилитета су бројни и могу се сврстати у две основне групе:

-екстрагенитални поремећаји функције ендокриних жлезда, поремећаји метаболизма, психогени, имунолошки и генетски поремећаји

-генитални који се по локализацији могу поделити на: вагинални, цервикални, утерусни, оваријални и тубарни фактор.

Вагинални фактор је присутан у око 5% случајева. То су најчешће механичке препреке, запаљења, лоша техника коитуса, конгениталне аномалије. Цервикални фактор је заступљен у 20% инфертилних пацијенткиња, и то су различите конгениталне малформација нпр. атрезија грлића, тумори грлића који чине механичку препреку у цервикланом каналу, запаљенске промене и промене имунолошког порекла. Утерусни фактор је присутан код 10% пацијенткиња и чине га: конгениталне малформације утеруса, тумори најчешће полипи и миоми и интраутерине адхезије. Оваријални фактор је присутан код 30-40% пацијенткиња и најчешће је присутна ендометриоза, ендокрина дисфункција у оквиру осовине хипоталамус-хипофиза-јајник, синдром полицистичних јајника, запаљења и тумори. Тубарни фактор, као најзаступљенији код 25-50% пацијенткиња је последица запаљенског процеса *PID* (Pelvic inflammatory disease), инфективног процеса у малој карлици или оклузије јајовода као и следствена ектопична трудноћа. Те то узрокује појаву прираслица. Такође ендометриоза и последични хематосалпингс, различити тумори и адхезије након абдоминалних операција су чести узроци тубарног инфертилитета (8, 9).

Узимајући у обзир претходне етиолошке узроке инфертилитета може се рећи да фактори који утичу на плодност жене према *Bairdi* и *Strassmannu* су свако и (10):

учесталост и темпирање полних односа, животно доба жене, присуство поремећаја менструалног циклуса, евентуална оштећења или анатомске малформације репродуктивног тракта жене, фактори средине и штетне животне навике.

1.3. Испитивање и дијагноза брачне неплодности

Неплодност је стање које подједнако и код мушкараца и жена доводи до осећаја беспомоћности, емоционалних и психичких криза. Испитују се увек оба партнера те се разлози неплодности увек траже истовремено код мушкараца и код жена (11). Испитивање неплодности почиње годину дана након неуспешних покушаја да дође до зачећа код жена старијих од 35 година. Постоје случајеви када се са лечењем почиње и раније, а то је када жена има аменореју или олигоменореју, када је жена старија од 38 година, у случају претходних гинеколошких операција, секундарне неплодности и сумње на инфертилитет мушкарца.

Најчешћи узроци женског инфертилитета су:

- поремећаји овулације у виду олиго-или ановулација и заступљени су код 30-35% пацијенткиња (12, 13)
- Тубарни фактор је заступљен код 32%35% пацијенткиња (14)
- Конгениталне аномалије су заступљене код 1-5% пацијенткиња (15)
- Остали фактори су: цервикални фактор, 3-5%, фибромиоми, ендометриоза и друга обољења (16)

1.4. Анатомија и хистологија ендометријума

Слузокожа утеруса (*tunica mukosa seu endometrium*) састављена је из једнослојног цилиндричног епитела са трепљама и танког везивног ткива. Материчне жлезде (*Glandule uterinae*) представљају дубоке уврате епитела и лишене су секреторних ћелија. Ове жлезде се спуштају све до мишићног слоја у који продиру, а улога им је да регенеришу епител који је одбачен приликом менструације (17).

Ендометријум (*endometrium*) или слузокожа материце, смештена је у шупљини троугластог облика унутар тела материце (*cavum uteri*). Два горња угла тела материце припадају ушћу јајовода (*ostia uterina tubae*), док доњи угао означава унутрашње ушће материце (*orificium uteri internum*) које се преко спољашњег ушћа (*orificium externum uteri*) кроз цервикални канал дуг око 3cm наставља у вагину (18). Код жена које нису рађале зидови материце су приљубљени један уз други, док код жена које су рађале зидови су размакнута и шупљина материце је реалан простор. Слузокожа материце је уско срасла са миометријумом и у потпуности облаже шупљину материце (*cavum*), а састоји се од епитела и везива (*lamina propria*). Епител слузокоже тела материце је гладак. Чине га једнослојне жлезде и цилиндричне ћелије са трепљама које трепере према спољашњем ушћу материце. У везивном ткиву ендометријума налазимо доста фибробласта, аморфне основне супстанце и тубулозне жлезде (*glandule uterinae*) које се протежу до миометријума (19). У везиву се налази доста лимфоцита, леукоцита и мезенхимних ћелија које могу примити у себе гликоген, липиде и остале хранљиве материје. У трудноћи мезенхимне ћелије прелазе у децидуалне. Слузокожа у телу материце подлеже цикличним променама и састоји се од два слоја: површински или функционални слој (*stratum functionale*) и дубљи или базални (*stratum basale*). Функционални слој се састоји од спонгиозног (*zona spongiosa*) и компактног дела (*zona compacta*) који се током менструације одљуште (*desquamatio*), а потом се у сваком наредном циклусу обнављају из базалног слоја и жлезда. Слузокожа у врату утеруса (*endocervix*) је дебља него у телу. Састоји се од уздужних набора сличних листовима палме (*plicae palmatae*). Набори се потом гранају и тако се стварају секундарни набори са удубљењима (*cryptae, niche*). Удубљења и набори имају физиолошку улогу и омогућавају складиштење и конзервацију сперматозоида, а тиме се побољшава фекундација. Улазећи један у други набори затварају цервикални канал (20).

Васкуларизација ендометријума потиче од *a. uterinae* која је највећа висцеларна грана која излази из *a. iliace interne (a. hypogastrica)*. Она даје огранке за материцу (*rami uterini*). Огранци у материци пролазе паралелно са шупљином материце и спајају се са истоименим контралатералним огранцима (*aa. arcuatae*). Од њих се одвајају огранци за миометријум који су усмерени ка шупљини материце (*aa. radiales*). Када се приближе ендометријуму радијалне артерије се гранају у функционални слој (*aa. spirales*), а за базални

слој дају посебене краће огранке (*aa. basales*). Вене углавном прате истоимене артерије при чему стварају и венске сплетове. У параметријуму се налази густо сплет (*plexus uterovaginalis*) који је повезан са везикопудендалним и оваријским сплетом. Крв се из њега углавном одводи преко *v. uterine* у вену *iliaci interni*, а преко оваријалних вена се сабирају у доњу шупљу вену. Лимфни судови су испреплетани многобројим анастомозама и уливају се у регионалне лимфне чворове. Лимфа из ендометријума завршава у лумбалним и ингвиналним лимфним чворовима. Инервација унутрашњих полних органа је од стране аутономног нервног система и цереброспиналног система (21).

1.5. Морфолошке промене ендометријума у менструалном циклусу

Ендометријум током менструалног циклуса пролази кроз јасно дефинисане фазе, док се не развије ендометријум довољно квалитетан за нидацију јајне ћелије. Овакве морфолошке промене су описане још 1950. године и под утицајем су сексуалних стероидних хормона, естрогена и прогестерона (22, 23).

Током децидуализације, повећана је продукција цитокина који доводе до миграције имуних ћелија до ендометријума од којих су најзначајнији моноцити и *NK* ћелије (*Natural killer cells*), због чега имунокомпетентне ћелије имају специфичну улогу у променама на нивоу ендометријума, у смислу измене ендометријалног миљеа (24, 25).

У последње две деценије описан је велики број протеина, цитокина и других молекула који се појављују у ендометријуму у различитим фазама циклуса. У ендометријуму се налазе и имуне ћелије које производе многобројне цитокине. Значај ових фактора за ендометријалну регулацију и интеракцију, као и за квалитет ендометријума још увек није у потпуности схваћен. Данас је познавање молекуларних механизма на нивоу ендометријума напредовало али је њихова примена у клиничкој пракси још увек ограничена. Временски период у коме се врши припрема ендометријума за нидацију назива се прозор имплантације (*windows of implantacion-WOI*) (26). Прозор имплантације представља период у средњој лутеалној фази менструалног циклуса у периоду од 19. до 24. дана менструалног циклуса, када имплантација може да се догоди. Имплантација је увек

ограничена у одређеном временском периоду (27). Нове технолошке могућности су показале да и велики број гена утиче на промене квалитета ендометријума, током читавог менструалног циклуса. Права функција ових гена још увек остаје отворено питање за разматрање (28, 29). Разликујемо четири групе ендометријалних ћелија: стромалне, епителијалне секреторне, епителијалне цилијарне и имуне ћелије. Стромалне ћелије сазревају под утицајем естрогена и могу утицати на различите облике децидуалних ћелија под утицајем прогестерона (29). Епителијалне ћелије су укључене и у адхезионе процесе у ембриону. Ендометријум је промељиво ткиво, које се циклично мења под утицајем полних хормона. Његова основна улога је да прихвати ембрион и прехрани га (30).

Функционални слој ендометријума се мења током сваког менструалног циклуса. Он расте и припрема се за имплантацију. Ако не дође до трудноће одљуштиће се и одбацити менструацијом. То се дешава 400 до 450 пута током репродуктивног доба жене. Базални слој се изузетно мало мења током менструалног циклуса и не одбацује се током менструације. Из њега се након менструације обнавља функционални слој (31, 32, 33).

Према променама које у ендометријуму индукују хормони јајника разликујемо следеће фазе ендометријалног циклуса: менструалну фазу, пролиферативну фазу, секреторну фазу.

Менструална и пролиферативна фаза у ендометријуму поклапају се са фоликуларном фазом оваријалног циклуса (34). Секреторна фаза ендометријума се поклапа са лутеланом фазом оваријалног циклуса (31).

1.5.1. Пролиферативна фаза ендометријума

Хистолошке промене на нивоу ендометријума током пролиферативне фазе менструалног циклуса описане су пре више од 50 година. Главна одлика ендометријалног

ткива током пролиферативне фазе јесте: активна пролиферација, ангиогенеза и потискивање апоптотичних фактора (35). Пролиферативна фаза ендометријума траје од 4 до 14 дана поклапа се са фоликуларном фазом оваријалног циклуса, тако да се може поделити на рану, средњу и касну. Повећана је секреција естрогена из фоликула који расте и изазива пролиферацију ендометријума са убрзаним митозама у ћелијама glandуларног епитела. Жлезде се издужују као и спиралне артериоле строме. Заједно са растом оваријалних фоликула и повећаном продукцијом естрогена напредује и пролиферативна фаза ендометријума. На почетку циклуса дебљина ендометријума износи око 1-2mm. Под утицајем естрогена долази до пролиферације епителијалних и стромалних ћелија тако да се ендометријум обнавља и расте. Под утицајем повишених вредности естрадиола умножавају се рецептори за естроген у епителу али и у строми (36, 37). У ћелијама функционалног слоја ендометријума и ћелијама крвних судова естрогенски рецептори су најгушћи. Повећава се синтеза *DNK* (dezoksiribonukleinska kiselina) као и број митоза жлезданих и стромалних ћелија. Од 5. дана менструалног циклуса пролиферише функционални слој (37). Естрадиол и хормон раста помажу неоангиогенезу и побољшавају васкуларизацију. Најзначајнија активност у пролиферативној фази циклуса је гликогенеза, а складиштење гликогена почиње око 10-ог дана циклуса (8). Како напредује пролиферација ендометријума умножавају се естрогенски рецептори-*ER*, прогестеронски рецептори-*PR*, повећава се концентрација *IGF-I* (Insulin -like growth factor 1), *TGF α* (Transforming growth factor alfa), *EGF* (Epidermal growth factor), *FGF* (Fibroblast growth factor), а инхибира се лучење *IL6* (интерлеукин 6) који је инхибитор епителизације (8, 9).

У том периоду веома је важна улога ензима у локалној стероидогенези: P450 ароматаза (Citohrom P450 oksidaza) претвара андростенедион у естрон, 17 β -хидроксистероид дехидогеназа претвара E2 (Estradiol) у E1 (Estrogen, Estrone) и обрнуто, E-сулфотрансфераза и E-сулфатаза инактивирају и активирају естрон (11). Посебно су важни путеви синтезе естрогена из андростенедиона што је одраз активности ароматазе. Њу подстичу естрадиол, инсулин и релаксин (8). Стромална компонента се такође развија и из свог компактног стања пролази кроз кратак период едема до коначног растреситог стања. Неразгранати спирални крвни судови пролазе кроз строму, све до испод епитела где формирају растреситу мрежу (8). Крај пролиферативне фазе означава пораст LH, након чега у периоду од 35 до 44 сата долази до овулације. Хистолошки налаз у преовулаторној фази

циклуса показује пролиферативне и ране секреторне промене чак и пре него што дође до почетка раста прогестерона (13). У касној пролиферативној фази задебљава ендометријум са развојем зоне спонгиозе и ширењем жлезда. Тада долази до матурације ендометријума, а потом до дискоординантне стромалне матурације са едемом и васкуларном хипертрофијом.

1.5.2. Секреторна фаза ендометријума

Лутеална и секреторна фаза циклуса трају од 14. до 28. дана менструалног циклуса, и то у циклусима који трају један лунарни месец. У неправилним циклусима који трају мање од 21 дан или дуже од 35 дана, секреторне фазе могу бити знатно краће или знатно дуже. Овулацијом почиње брз пораст производње *P* (прогестерона) и поступни привремени пад *E2* (38). Хистолошка слика ендометријума у секреторној фази приказује комбиновану реакцију на деловање естрогена и прогестерона (21). Ендометријум задржава своју дебљину из преовулаторне фазе. Долази до увртања жлезда и увртања спиралних крвних судова. Стромалне ћелије и њихова једра хипертрофишу и строма постаје едематозна и богато васкуларизирана, развијајући псеудодецидуалну реакцију. Први знак овулације је појава гликогенских вакуола у епителним ћелијама жлезда. То се дешава 3 до 4 дана после овулације. Гликоген прелази са базалног на апикални пол, а ћелијска једра прелазе на базални пол. Секрет богат гликогеном сакупља се у луменима жлезда, а строма постаје едематозна. Потом извијугане жлезде почињу да луче гликопротеине и пептиде у шуљину материце (13). Врхунац ових секреторних промена је седам дана после овулације када треба да дође до имплантације. Између 20. и 23. дана циклуса када су оптимални услови за имплантацију ембриона и назива се имплантациони прозор-*WOI* (26). По неким ауторима тај период настаје раније, између 17. и 19. дана циклуса. Под утицајем високе концентрације *P4* и *E2* у ендометријуму се производе протеини постелице, пептидни хормони, фактори раста, простагландини, релаксин и пролактин. Сви ови процеси су регулисани аутокриним и паракриним механизмима (15). У средини секреторне фазе ендометријум достиже пуну зрелост, када под утицајем *corpus luteum* прогестерон изазива фазу пуне зрелости ендометријума. Жлезде ендометријума као и артериоле се издужују и све више увијају. Једра епителних ћелија су положена ближе лумену због продукције и депоновања гликогена

на базалном полу. Естрогени стимулишу пролиферацију ендометријума под дејством *IGF1*, а прогестерон под утицајем *IGFBP* (Insulin-like growth factor-binding protein), који зауставља ефекте *IGF1*, стимулише развој стромалне компоненте ендометријума и његову секреторну трансформацију, а утиче и на децидуализацију и трофобласну инвазију (27). Прогестерон остварује свој ефекат преко нуклеарних рецептора, само ако је утерус претходно естрогенизован. Један од првих ефеката прогестерона јесте редукција естрогених рецептора. Прогестерон потом инхибише ароматазу, сулфотрансаминазу, 17β хидроксистероид дехидрогеназу- 17β -HSD, а активира децидуализацију, секрецију, одржава интегритет лизозома и *MMP* (*matrix metalloproteinase*). Заједничким деловањем естрогена и прогестерона долази до накупљања гликогена. Под дејством прогестерона у glandуларним ћелијама настају субнуклеарне вакуоле, испуњене гликогеном, које потом мигрирају ка луменској површини и потом се излучују у лумен жлезда. Накупљање гликогена достиже свој максимум између 16. и 20. дана циклуса, после чега наступа период када је ендометријум најспремнији за имплантацију (31). У току лутелане фазе на нивоу ендометријума и миометријума долази до повећања простагландина *PgF2 α* (Prostaglandin *PgF2* alfa), у односу на *PgE2* (Prostaglandin *PgE2*). *PgF2 α* има улогу у стимулацији материчних контракција, док од *PgE2*, има инхибиторни утицај на материчне контракције. Под утицајем естрогена и прогестерона ендометријалне стромалне ћелије продукују и *ET-1* (Endotelin-1), који је високо потентни дугоделујући вазоконстриктор. Уколико не дође до фертилизације и имплантације ембриона, концентрације естрогена и прогестерона опадају, а функција жутог тела престаје. У ћелијама строме доминантна је инфилтрација полиморфонуклеарима и моноцитима, што представља почетак цитоллизе. Ендометријалне жлезде колабирају и почиње њихова фрагментација. Смањује се дебљина ендометријума и настају вазомоторне промене у спиралним артериолама услед дејства *PgF2 α* , долази до исхемије ендометријума, а убрзо након тога до менструалног крварења.

Ако дође до фертилизације ооцита, одређене концентрације стероидних хормона, простагландина, пролактина, локалних пептида и имуних ћелија (citoкина) имају улогу за припрему ендометријума за имплантацију (8). Од 22. до 23. дана циклуса, тачније између 8. и 9. дана секреторне фазе поново долази до митотичких промена које воде ка децидуализацији. Децидуа потиче из строме и има улогу у раној трудноћи. Морфолошке промене у току децидуализације одигравају се независно од концепције (39). Све врсте

ћелија ендометријума су под утицајем оваквих промена, што се дешава кроз ћелијску децидуалну диференцијацију и инфилтацију коју омогућава велики број имуних ћелија. Ендометријум у средњој па све до касне секреторне фазе, као и децидуа, су инфилтрисани различитим имуним ћелијама, које потичу из коштане сржи (40). Доминантна популација ћелија, око 70% јесу гранулирани лимфоцити, познати као децидуалне природне ћелијске убице НК ћелије, као и Т ћелије и макрофази (29, 41). У току секреторне фазе долази до васкуларног ремоделирања са доминантним ангиогенетским механизмом, коме су подложне спиралне артерије-интусусцепција (36). Током оваквих промена мења се квалитет ендометријума у смислу припреме за имплантацију бластоцисте (41).

1.5.3. Хуморално биохемијски фактори који регулишу пролиферативну фазу ендометријума

Правилан развој ендометријалног ткива у току пролиферативне фазе циклуса је од великог значаја за квалитетан развој ендометријума током секреторне фазе, а која је пресудна за имплантацију (41). Један од важних фактора који има утицај на пролиферативну фазу је хормон естроген који се постепено повећава. Естроген утиче на пролиферацију ћелија тако што стимулише експресију стероидних рецептора као што су прогестеронски-*PR* који утиче на активност прогестерона током секреторне фазе али утиче и на експресију естрогенских рецептора *ER* (Estrogens receptors) као и ретиноичног киселог рецептора и андроген рецептора (23, 42, 43). Ове промене показују интеракцију између имуних ћелија и ендометријалних ћелија у току ове фазе менструалног циклуса (44, 45). Оваријални хормони утичу на раст и неких других фактора као што је фактор раста који личи на инсулин-*IGF* и протеин који везује *IGFBP*. Сматра се да је активност *IGF-I* под дејством естрогена, током пролиферативне фазе и да значајно доприноси пролиферацији ендометријума (22, 45).

Фактор инхибиције миграције макрофага-*MIF* (Macrophage migration inhibitory factor) је мултифункционални цитокин који је укључен у ангиогенезу и у ремоделирање

тквива (27, 43). Он се у доминантном смислу појављује у жлездама и у површинском епителу током касне пролиферативне фазе и предменструалне фазе (26). Током пролиферативне фазе, у ендометријуму, ангиогенеза је неопходна како би се обезбедило довољно хранљивих састојака. Ангиогенеза се одиграва током целог менструалног циклуса са значајно повећаном динамиком у базалном слоју и у субепителијалном плексу током првог дела циклуса пролиферације (27). Инхибира се *IL6* који је инхибитор епителизације. Гликоделин се налази у glandularном и површном ендометријуму и у највећој концентрацији се продукује током секреторне фазе менструалног циклуса. Најниже концентрације су у фоликуларној фази. У ендометријуму током овулације концентрације гликоделина су ниске 6 дана пре и 5 дана после овулације. То може да омогући или дозволи да се обави оплодња (38, 39). За време имплантације концентрација гликоделина се значајно повећава и онемогућава деловање *NK* ћелија, оспособљава ендометријум за имплантацију и донекле штити ембрион од штетног дејства *NK* ћелија (34). Концентрације гликоделина у ендометријуму су максималне 6 дана након ЛН пика (28). Пораст концентрације гликоделина током секреторне фазе овулаторног циклуса се вероватно дешава због пораста прогестерона (8). Уколико дође до имплантације те вредности остају повећане (29). *INF* γ и *TNF- α* имају штетне ефекте на развој ембриона и имплантацију при великим концентрацијама (46). Основна физиолошка улога *TNF- α* је да стимулише миграцију неутрофила и моноцита на месту инфекције и да их активира да уклоне микроорганизме. *TNF- α* инхибише синтезу прогестерона и естрогених хормона у гранулозним ћелијама и трофобластним ћелијама (47). Такође, инхибише раст трофобластних и ембрионалних ћелија (46, 47). Концентрације *TNF- α* достижу максималне вредности у секреторној фази (48). Повећана експресија *INF* γ и *TNF- α* може довести до неуспеха имплантације, абортуса (49).

1.6. Клиничка процена ендометријалне функције

Данас клиничари могу анализирати ендометријалну функцију путем ултразвука, путем анализе ендометријалне секреције или испирка утеруса и путем анализе биопсије ендометријума. Најчешће се користи најмање инвазивна ултразвучна дијагностика

ендометријума, док се остале методе користе током научних истраживања у циљу проналажења нових маркера.

Технике за проверу ендометријалне функције, као и за предвиђање квалитета ендометријума морају да буду: лако изводљиве током дневне клиничке праксе и да буду неинвазивне (50). Ултрасонографским мерењем ендометријалне дебљине и његовог ехо модела овакви захтеви се могу испунити. Неки аспекти ендометријалних функција се могу анализирати методама као што су ендометријална перфузија, испитивањем ендометријалне секреторне функције, биохемијске провере серума и коначно ендометријалном биопсијом (51).

У процени квалитета ендометријума ултразвучном техником, најбитније је мерење дебљине ендометријума, процена динамике раста ендометријума, изглед ендометријума и ендометријална прокрвљеност у корелацији са фазом менструалног циклуса и одговарајућим хормонским статусом (52). У лонгитудиналним пресецима најбоље се показују дебљина и текстура ендометријума. Дебљина се мери као максимални антеропостериорни дијаметар кавума утеруса (8). Може се рећи да ултразвук помаже у детерминисању добрих услова неопходних за имплантацију у спонтаним и стимулираним циклусима. Континуираним ултразвучним прегледом се прати дебљина ендометријума и динамика раста, док се структура ендометријума одређује на основу ехогености ултразвучне слике ендометријума (53).

У стандардној клиничкој пракси се поред дводимензионалне ултразвучне процедуре која се највише користи, све више се примењује тродимензионална ултразвучна дијагностика као и мерење крвних протока колор доплер техником.

Дебљина ендометријума достиже своје максималне вредности око времена овулације када износи од 8 до 10mm. Слика преовулаторног ендометријума, позната као "овулаторни прстен" може се користити као додатни показатељ предстојеће овулације.

Однос између хиперехогене зоне и дебљине ендометријума у време овулације износи 30-40%, а девети дан након овулације износи 100%. Дебљина ендометријума је веома битан параметар за процену концентрације естрадиола. Ултразвуком је доказано да се дебљина ендометријума повећава током пролиферативне фазе менструалног циклуса и да постоји значајна корелација између нивоа естрадиола у касној фоликуларној фази и дебљине ендометријума (4).

Контраверзни су ставови о повезаности дебљине ендометријума као једног од параметара и трудноће. Већина аутора се слаже да само дебљина ендометријума има ниску позитивну предиктивну вредност. Концепт минималне дебљине ендометријума је данас широко прихваћен. Из свега досада наведеног се може закључити, да ултразвучно мерење дебљине ендометријума може помоћи у детерминисању добрих услова неопходних за имплантацију (54).

Динамика раста ендометријума може бити један од маркера квалитета ендометријума (54, 55). Имплантација зависи не само од дебљине ендометријума већ и од динамике раста ендометријума, без обзира на старосну доб пацијенткиња. Већа почетна дебљина ендометријума уз одговарајући раст ендометријума чини бољу основу за имплантацију и трудноћу (56).

Текстура ендометријума може имати већу прогностичку вредност за имплантацију него што је дебљина или динамика раста ендометријума (26) Данас је прихваћена подела ендометријума на три типа, зависно од фазе циклуса (54):

- Тип А-хомоген, хиперехоген без централне ехогене линије.
- Тип Б-средњи изо-ехогени шаблон, са истом рефлексивношћу као окружени ендометријум и нејасна или одсутна ехогена линија.
- Тип Ц-више слојева, трострука линија ендометријума састављена од истакнуте спољашње и централне хиперехогене линије и унутрашњег хипоехогеног или "црног" региона.

У зависности од визуализације ултразвучне вишеслојности ендометријум се дели на две групе: (55)

- Без вишеслојности-хомогени хиперехогени или изо-ехогени ендометријум
- Вишеслојни ендометријум, трослојни шаблон са хиперехогеном линијом споља и у централном делу и централни хипоехогени слој.

Троструко појављивање линије код ендометријума у време овуације је добар прогностички знак за добру имплантацију. Трослојни изглед је најприхваћенији ултразвучни параметар који је најчешће удружен са трудноћом. Три студије су упоредиле присуство средње линије са биоптичким резултатима ендометријума. Студије су показале на ултразвучну осетљивост од 100% и специфичност од 62% за откривање хистолошки нормалног ендометријалног развоја (52).



Слика 1. Ултразвучни приказ полипа ендометријума

У односу на животну доб пацијенткиња пронађен је лошији градус ендометријума код 25% жена старијих од 40 година у односу на 5% жена млађих од 40 година (54). Такође налазе и 87% лошег ендометријалног градуса код жена које су имале утерину патологију у

односу на 11% лошег ендометријалног градуса код жена без утерине патологије. Једна од првих клинички релевантних техника употребљених за проверу квалитета ендометријума је дводимензионална ултразвучна анализа ендометријума. Међутим, његова прогностичка вредност у одређивању стопе трудноће је ниска без обзира на лако извођење ултразвучног прегледа (53, 55, 56).

1.7. Анализа утерусног секрета

Ендометријалне жлезде, у различитим фазама циклуса, секретују различите производе, од којих зависи функција ендометријума. Највећи део утерусног секрета чине продукти ендометријалних епителних и glandуларних ћелија, имунолошке ћелије, продукти инфламације, некада примесе крви и вероватно неке друге материје које још нису откривене. Неки продукти ендометријалних ћелија се могу наћи у серуму. Ти продукти се могу биохемијским анализама открити и мерити. За сада постоје три студије које су се бавиле предвиђањем квалитета ендометријума детекцијом појединих ендометријалних протеина у плазми или серуму (31, 41). Мерењем концентрације *Glycodelina*, у материчном испирку, током средње лутелане фазе откривена је значајна корелација између хистолошке слике ендометријума и концентрације *Glycodelina* у испирку (35, 39, 51).

Утврђено је да се мерење концентрације гликоделина у серуму може искористити као неинвазивна алтернатива ендометријалној биопсији (17, 22).

Новије студије су указале да анализа серумске концентрације гликоделина не може да обезбеди прогностички вредне информације за ендометријалну функцију и имплантацију (26, 29).

Рађени су експерименти где је сакупљан утерини испирак у току ране секреторне фазе циклуса, како би се одредио квалитет ендометријума. Утврђено је да прогностичка

вредност квалитета ендометријума а самим тим и вероватноћа успешне имплантације значајно већа уколико се ендометријални испирак анализира током средње секреторне фазе (37, 32, 30).

Ова техника није уведена у рутинску клиничку праксу јер су могућности за такво испитивање још увек ограничене. Анализа утерусног испирка омогућава директну евалуацију ендометријалних секреторних функција и мање је инвазивна метода него биопсија ендометријума. За сада постоје ограничавајући фактори за рутинску примену ове методе. Развој технике и примена нових метода, које су резултат бројних радова, сугеришу да у будућности осим ултразвучног прегледа од великог значаја ће бити и анализа утерусног секрета и специфичних маркера у одређивању квалитета ендометријума.

1.8. Биопсија ендометријума

Биопсија ендометријума је хируршка интервенција која се изводи у циљу анализе ендометријума и може се изводити у различитим фазама ендометријалног циклуса. Највећи значај је имала информација о променама у секреторној фази циклуса (57, 58). Бројне студије су показале да промене у хистолошкој слици ендометријума прате промене у односу на фазу менструалног циклуса тј. вредности Е2 и Р у серуму. Како су се развијале нове методе за праћење концентрације хормона тако је биопсија ендометријума изгубила на значају. Биопсија ендометријума је била златни стандард за процену ендометријалне функције. Данас, хистолошко одређивање квалитета ендометријума и анализе ендометријалне функције аспирацијом ендометријалне секреције, заједно могу обезбедити важне податке везане за испитивање ендометријалне функције (59). Репрезентативност ендометријалне биопсије у претходном циклусу, за други наредни циклус је од значаја за клиничара. Ендометријална биопсија се изводи у средини лутеалне фазе. Најбоље је узети биопсију ендометријума 3-4 дана пред очекивану менструацију. Раније се саветовало да се биопсија изводи први дан менструалног крварења како се не би повредио ембрион у фази имлантације. Проба се изводи Новаковом сондом или Рандалс киретом која је типа усисне кирете. Избегава се дилатција грлића. Важно је да се материјал узме из фундуса преко

предњег материчног зида идући ка истмусу. Секреторна фаза циклуса обележена је према *Noyes*+1 дан, тада говоримо о позитивној овулацији и нормалној хормоналној функцији жутог тела. Смањена секреторна фаза говори о лошој хормоналној функцији жутог тела и треба да буде протумачена паралелно са анализима хормона. Искусан патолог може врло прецизно утврдити када је била овулација и који је постовулацијски дан. То се назива датирање ендометријума. На овај начин се биопсијом ендометријума може доказати да ли жена има овулацију. Међутим, прогностичка вредност биопсије ендометријума је у великој мери ограничена, имајући у виду временски период неопходан за обављање анализе. Ставови неких истраживача су да хистолошко утврђивање података које говори о стању ендометријума, током рутинске евалуације неплодног пара, требало би да се одбаци из рутинске клиничке праксе (59, 60). Неопходно је да се валидност ендометријалне биопсије утврди у складу са валидношћу маркера ендометријалне функције. Ендометријална биопсија данас није често коришћена метода за процену квалитета ендометријума. Данас се ендометријална биопсија користи ради дијагностиковања неких патолошких стања ендометријума, који између осталог утичу и на квалитет ендометријума. У патолошким стањима ендометријална биопсија уз ултрасонографску анализу ендометријума је још увек значајна метода. У физиолошким стањима, када је умањен квалитет ендометријума, ендометријална биопсија није популарна метода испитивања стања ендометријума (60). Инвазивност ове методе је један од ограничавајућих фактора, јер се данас тежи методама које су неинвазивне и клинички лако применљиве.

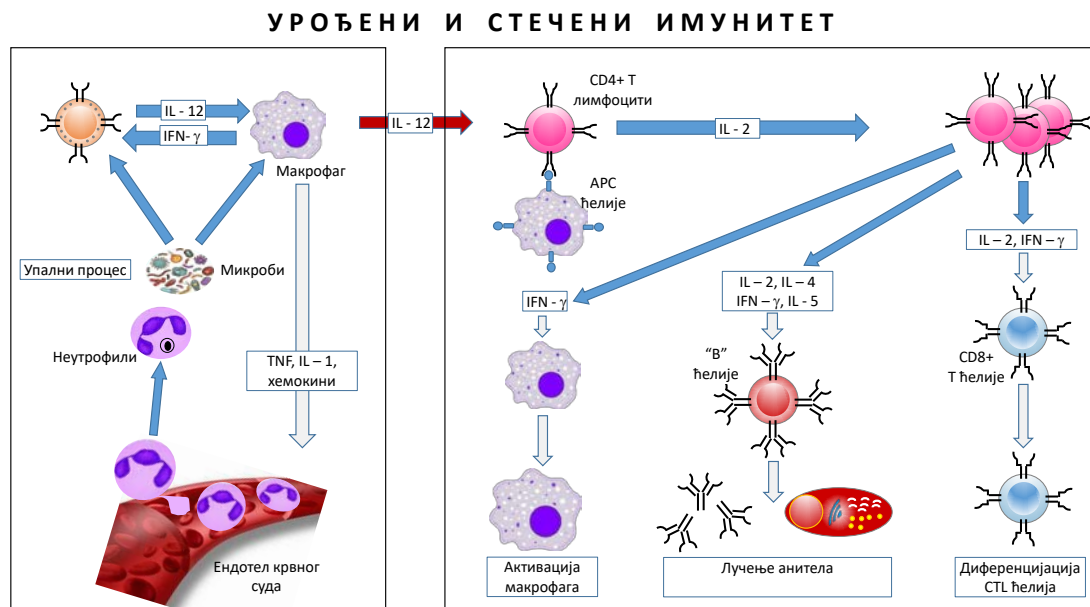
1.9. Цитокини

Реч цитокин је изведена из две речи грчког порекла: *cytos* што значи ћелија и "*kine*" из речи "*kinein*" што значи кретати се (61). То су полипептиди или гликопептиди молекуларне масе 6-10kDa. Могу бити позитивни и негативни регулатори имунског одговора. Цитокини предају информацију циљној ћелији која испољава одговарајући рецептор, настаје активација гена с последичним фенотипским или функционалним променама циљне ћелије. Синтезу цитокина могу зауставити инхибитори. Ефекторске

функције ових протеина су активација и диференцијација ћелија, хемотакса и пролиферација. Активност зависи од њихове концентрације и јачине експресије специфичних рецептора на површини циљне ћелије. Стварање цитокина је потакнуто антиген специфичном активацијом CD4⁺ Т лимфоцита, али и друге ћелије имунског система продукују цитокине. Данас познајемо преко 30 различитих цитокина (многи су фактори раста ћелија, неки су хематопоетски фактори раста, неки имају антивиралну активност и зовемо их интерферонима). Израз интерлеукин је прихваћен за групу медијатора одговорних за међусобно комуницирање леукоцита (61, 62). Цитокини су биолошки активне супстанце са гласничком и регулаторном улогом у имуним и инфламаторним реакцијама. Цитокини се везују за рецепторе на површини различитих ћелија, нарочито леукоцита, покрећући механизме ћелијске активације, пролиферације или диференцијације, инхибиције и апоптозе (63). Највеће количине цитокина луче леукоцити, мада поједине цитокине секретују и други ћелијски типови који немају битнијег удела у имуном одговору (8).

Номенклатура цитокина заснована је често на њиховом извору секреције. Цитокини које луче лимфоцити названи су лимфокини, цитокини продуковани од стране моноцита и макрофага означени су као монокини, док су сигналне супстанце које имају улогу гласника међу различитим типовима леукоцита познате као интерлеукини (61). Цитокини се могу класификовати на различите начине (49). У зависности од утицаја који испољавају на запаљенску реакцију цитокини се деле на проинфламаторне и анти инфламаторне (48, 63).

Уколико се као критеријум користи њихова биолошка улога, најприкладнија је подела цитокина на три функционалне категорије: а) регулатори урођеног имунитета; б) регулатори стеченог (специфичног) имунитета и ц) стимулатори хематопоезе (41), (Слика 2).



Слика 2. Цитокини урођене и стечене имуности

Првој категорији припадају *IL-1*, *IL-6*, *IL-12*, *IL-15*, *IL-18*, *TNF* (Tumor necrosis factor), интерферони тип I (*INF-a* *INF-b* и *INF-w*) и хемокини. Другој категорији припадају *IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-13*, *INF-γ* (интерферон), *TGF-b* (Transforming growth factor) и *LT* (Lymphotoxin) (39, 41, 44). У стимулаторе хематопоезе убрајају се *IL-3*, *IL-7*, фактор стем ћелија, као и *CSF* (Colony-stimulating factors), означени као *GM-CSF* (*GM* од гранулоцити моноцити), *G-CSF* (*G* од гранулоцити) и *M-CSF* (*M* од моноцити) (34, 30, 29, 28, 64). На овом месту описани су цитокини чија је главна улога регулација специфичног имуног одговора.

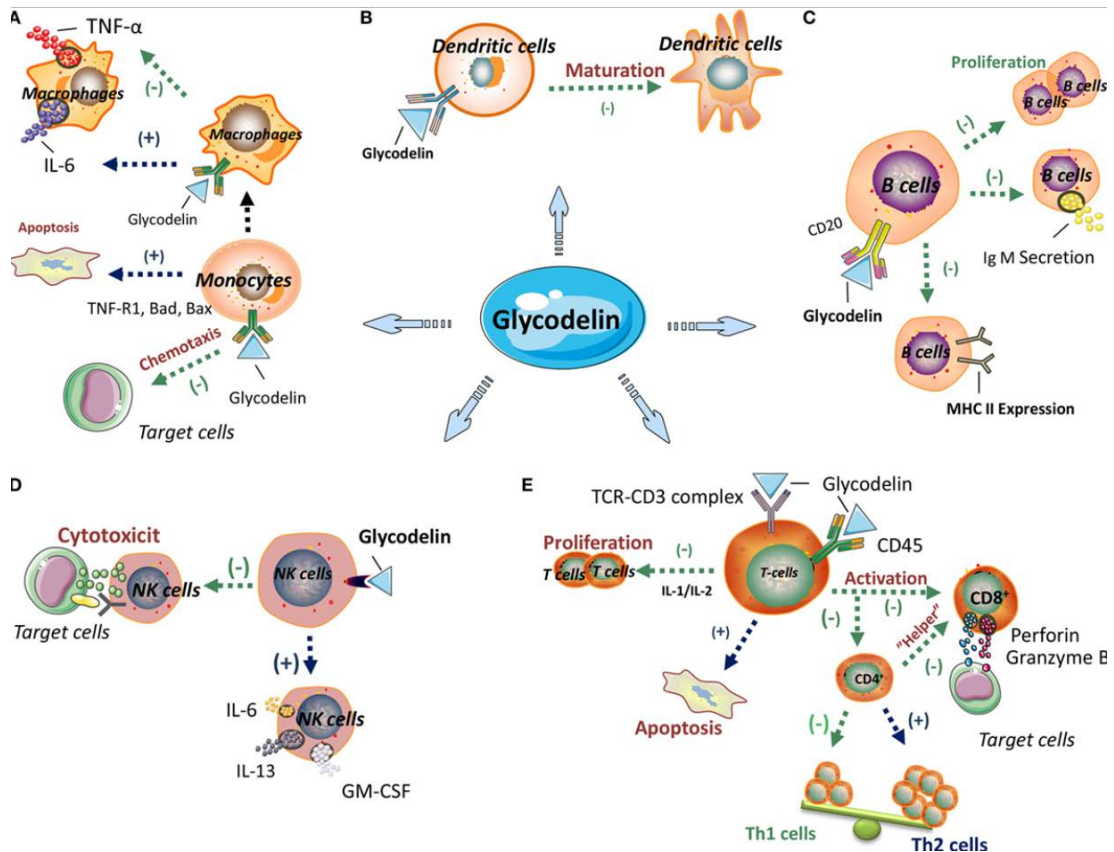
Проинфламаторни и антиинфламаторни молекули су укључени не само у успостављање имплантационог прозора него и у комуникацију ембриона и ендометријума. Сви цитокини се стварају у ендометријуму али и ембрион ствара неке од њих у различитим фазама развоја. У контексту имплантације, индукција инфламације може да се посматра као вид агресије од стране ембриона. Цитокини које производи ембрион су проинфламаторни што сугерише да је имплантација процес агресије у којој ембрион изазива и форсира ендометријум да га прихвати. С друге стране, мајчини сигнали су неопходни за стварање проинфламаторног окружења у утерусу у виду имплантационог прозора, независно од

ембриона, имплицирајући ово дејство као позив. Мајчини стероиди индукују анти-инфламаторне молекуле као што су *IGFBP-1* и *IL-11* и тако контролишу инфламацију изазвану од ембриона и независних матерналних сигнала. Контролисана агресија се објашњава и следом догађаја, супресија проинфламаторног *TNF α* од стране анти-инфламаторног *IL-11* након пика *TNF- α* у секреторној фази (48, 64, 65). Цитокини имају важну улогу у процесима одржавања запаљења, који се одвија током сваког менструалног циклуса у ендометријуму. Цитокини су укључени у битне репродуктивне функције као што су овулација и имплантација (44). На основу досадашњих сазнања са великим степеном сигурности се може рећи да поједини цитокини и фактори раста играју кључну улогу у правилном одвијању ендометријалног циклуса и нидацији бластоцисте. Грешке у цитокинској мрежи ендометријума, јајовода или саме бластоцисте могу довести до неких облика инфертилитета, спонтаних побачаја и грешака током нидације са последичним развијањем ванматеричне трудноће. Ендометријум не подлеже значајним морфолошким и функционалним променама од завршетка ембрионалног развоја па до менархе, изузев промена које су везане за физички раст читавог организма. Ендометријум започиње свој циклични живот који је праћен крупним анатомским, хистолошким и функционалним променама са почетком функционисања јајника у пубертету. Цикличност промена ендометријума диктирају хормони хипоталамо-хипофизно-оваријалне осовине као и стероидни хормони који потичу из других извора (масно ткиво, надбубрежна жлезда). Полни хормони се у ендометријалном циклусу појављују само као први сигнал који покреће читаву каскаду активације и инхибиције одређених гена на основу чије активности се синтетише и секретује низ цитокина и фактора раста који представљају другу линију сигнала (41, 44, 63).

1.9.1. Гликоделин

Плацентни протеин 14 или остепонтин, како је још познат Гликоделин у литератури, је гликопротеин од 28kDa који садржи 180 аминокиселина, а кодиран путем само једног гена који се налази у хромозомској регији 9q34 (66). Гликоделин се налази у glandуларном

и површном епителу ендометријума и у највећој концентрацији се продукује током секреторне фазе ендометријалног циклуса (67). Најниже концентрације су у фоликуларној фази. Ниво гликоделина достиже свој врхунац 12 дана после овулације.



Слика 3. Утицај гликоделина на различите ћелије

Гликоделин спречава везивање сперматозоида за зону пелуциду уколико је присутан у вишој концентрацији (Слика 3). Недостатак гликоделина у преовулаторном периоду може бити важан за успешну оплодњу, то су његове контрацептивне особине (68). У људском ендометријуму током овулације ниво гликоделина је низак 6 дана пре и 5 дана после овулације. То може да омогући или дозволи да се обави оплодња. За време имплантације ниво гликоделина се значајно повећава, онемогућава деловање *NK* ћелија, оспособљава ендометријум за имплантацију и донекле штити ембрион од штетног дејства *NK* ћелија (69). Досадашњи подаци указују да ендометријумска рецептивност може да буде измењена уколико је повећана концентрација гликоделина око овулације, када би те вредности

требале бити ниске или да их нема (35). Концентрације гликоделина у ендометријуму и последично кавуму утеруса су максималне 6 дана после *LH* пика. Пораст концентрације гликоделина током секреторне фазе овулаторног циклуса се вероватно дешава због прогестерона (34). Ендометријум током имплантације има повећане концентрације гликоделина. Ако дође до зачећа вредности остају повећане и то указује на постојање везе између гликоделина у плазми и нивоа прогестерона (70, 71, 72). Недавно је доказано да гликоделин има улогу у ангиогенези, те се налази у повишеним концентрацијама у ткивима бенигну и малигну гинеколошких тумора (72, 73). Синтетички пептид који имитира гликоделин повећава миграцију ћелија ендотела пупчане вене и ћелија ендотела артерија као и обликовање капилара што су све значајне компоненте ангиогенезе. Гликоделин је гликопротеин депонован у жлезданим и епителним ћелијама ендометријума (74). Сматра се важним фактором у процесу имплантације, а његови трагови се могу наћи у повишеним концентрацијама у испирку утеруса добијеним у тренутку имплантације, док су у пролиферативној фази циклуса, концентрације гликоделина ниске (75, 76).

Током секреторне фазе и ране трудноће ниво гликоделина константно расте (77). Он супримира имунолошки одговор мајке на фетус. Инхибира миграцију *T* лимфоцита и супримира препознавање од стране лимфоцита и смањује ћелијску лизу од стране *NK* ћелија (72, 78).

1.9.2. Интерферони

Интерферони *INF* су протеини из групе гликопротеина, које стварају ћелије имуног система, као одговор на присуство патогених фактора, као што су вируси, бактерије, паразити и разне врсте туморских ћелија. Код људи постоје три изоформе *INF*, а то су: алфа, бета и гама (79). Ови протеини бране организам од вируса, повећавају отпорност ћелија на вирусну инфекцију и делују као цитокини. Имају широки спектар деловања: антимикуробни, имуномодулаторни, антипролиферативни и стимулишу диференцијацију ћелија, као и апоптозу (80). Препознатљиви су по својој способности да инхибирају репликацију вируса

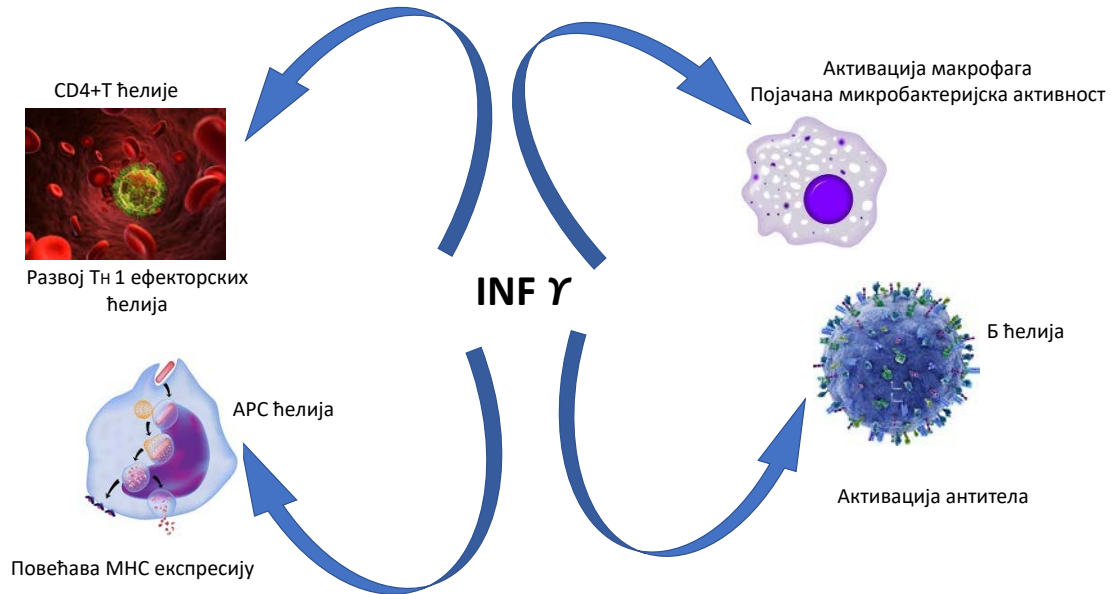
у ћелијама. Познати су инхибитори пролиферације хематопоетских ћелија. *INF-α* и *INF-γ* су снажни супресори мијелоидних колонија. Делују синергистички (81). Неки од интерферона (*INF-α* и *INFβ*) могу се стварати у ћелијама као непосредна поседица инфекције ћелија вирусом, при томе штитећи ћелије од инфекције новим вирусом. Другу групу интерферона (*INF-β* и *INF-γ*) стварају лимфоцити као одговор на стимулацију антигенима. За лучење интерферона потребан је индуктор и то је најчешће вирус, а произвођач је хумана ћелија (82). Интерферони мењају имуни систем индукцијом *MHC* (Mean cell hemoglobin) и *HLA* (Human leukocyte associated antigen) система.

Интерфероне делимо, у односу на ћелије које га производе, на *INF-α* кога стварају леукоцити, *INF-β* кога стварају фибробласти, *INF-γ* кога стварају имунокомпетентне ћелије. Интерферони утичу на регулисање ћелијске функције као што је фагоцитоза, али и повећавају цитотоксичност лимфоцита *T* као на пример *INF-γ*, активност макрофага и *NK*-ћелија (83, 84).

1.9.3. *INF-γ*

То је најважнији проинфламаторни цитокин одговоран за активацију и регулацију фагоцитне функције моноклеарних ћелија. Његова биолошка активност зависи од експресије његовог рецептора (85). *INF-γ* је врло мало сличан осталим интерферонима, а стварају га активирани лимфоцити *T* и лимфоцити *T4* као одговор на *IL-12*, *IL-18*, *NK* ћелије, моноците и макрофаге. Игра врло важну улогу у одбрани домаћина. Важну улогу има у контроли бактеријских, вирусних и паразитарних инфекција (Слика 3). Регулише стварање неколико имуномодулацијских и проинфламаторних цитокина као што су *IL-12* и *TNF-α*. Снижене вредности налазимо код реуматоидног артритиса, *SLE* (Systemic lupus erythematosus), лимфома, конгениталне рубеоле, маларије, херпес симплекс инфекције, *AIDS*-а (Acquired immune deficiency syndrome), лаишманије и *TBC* (Tuberculosis)(86). Успорава еритропоезу. *IL-1* и *TNF-α* инхибирају стварање еритроидних колонија индиректно тако да стимулишу отпуштање *INF-γ* (87). Функционална интеракција *INF-γ* с

молекулима укупне интерлеукинске и цитокинске мреже је данас тема многих истраживања.



Слика 4. Утицај $INF-\gamma$ на различите ћелије организма

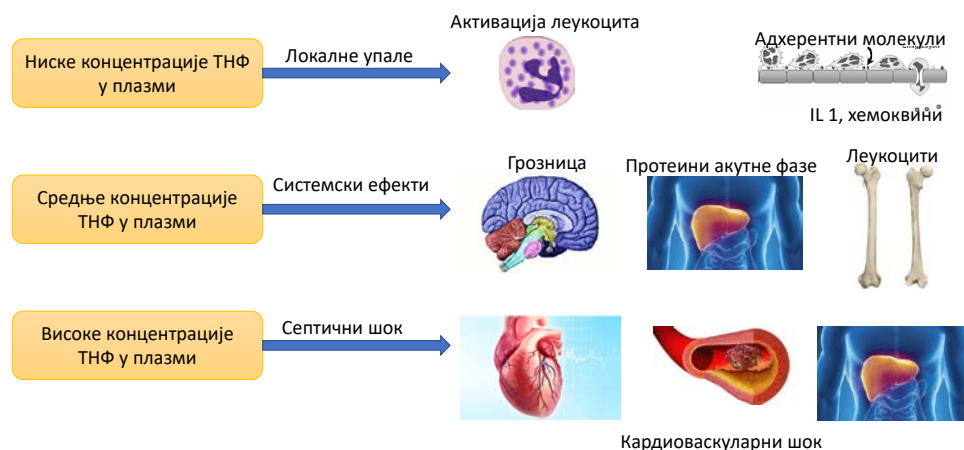
Колико је међусобно повезана интерлеукинска мрежа показали су истраживачи када су доказали да антиинфламаторни цитокини $IL4$ и $IL-10$ инхибирају $IL-2$ индуковану синтезу $INF-\gamma$ (64). $INF-\gamma$ спада у интерфероне типа II. Насупрот интерферонима типа I ($INF-\alpha$, $INF-\beta$) $INF-\gamma$ се не излучује у одговору на вирусне инфекције и показује веома слабу антивирусну активност. Он се може сматрати главним ефекторним цитокином у имуном одговору. $INF-\gamma$ секретују првенствено Th лимфоцити (T helper), CTL (*Citotoksični T limfociti*), NK ћелије и макрофаги као одговор на $IL-2$, митогене, антигене или удружене ефекте $IL-12$ и $IL-18$ (86, 87).

1.9.4. $TNF-\alpha$

$TNF-\alpha$ (*Tumor necrosis factor*), *cachexin* или *cachectin*, је цитокин који учествује у системској инфламацији. Он је члан групе цитокина који стимулишу акутну фазу

инфламаторне реакције. Има снажно стимулативно дејство на секрецију свих хипофизних хормона. Моћан цитокин кога стварају макрофази, фибробласти, моноцити, *T* и *B* лимфоцити. Најбоље је проучена његова улога у индукцији инфламације (88, 89). Активност му је проинфламаторна и антитуморска. Може да подстакне смрт ћелије. Регулационо пролиферацију и диференцијацију ћелија имуног система, укључен је у процесе везане за септични шок, аутоимуне болести (90, 91, 92). *TNF- α* инхибише синтезу прогестерона и естрогених хормона у гранулозним ћелијама и трофобласним ћелијама. Инхибише раст трофобласних и ембрионалних ћелија. Узорци биопсије ткива могу бити употребљени да се идентификују молекули везани за квалитет ендометријума да би се добио бољи увид у имплантацију (93). Успешна имплантација захтева рецептиван ендометријум (94). Често су повишени приликом спонтаних побачаја (95). Промене ендометријалног миљеа су повезане са коришћењем *IUD* (Intrauterine Device) и већом продукцијом *IL-1 β* , *TNF- α* и *IL-6*. *TNF α* у репродуктивном тракту је откривен у јајницима, јајоводима, преимплантационом ембриону и ендометријуму. Повећана експресија може довести до неуспеха имплантације и абортуса. Код пацијенткиња са ендометриозом је утврђена повећана експресија овог цитокина (96, 97, 98).

TNF- α стимулише стварање осталих цитокина (*IL-1*, *IL-6*, *IL-8*, *GM-CSF*) али посредује у каскади цитокина, која узрокује упалу и деструкцију зглобова у реуматоидном артритису преко рецептора који су локализовани на макрофазима или у ћелијама синовијалне мембране (98, 99). Исто као и *IL-1*, *TNF- α* је у стању са стимулише хипотеремију тако да повећа унос гвожђа у макрофаге и моноците што представља део акутне фазе имуног одговора везаног уз цитокине. Доказано је да рекомбинантни *TNF* узрокује значајни пад серумског гвожђа али не узрокујући промене у тоталном капацитету преноса гвожђа (100, 101).



Слика 5. Активност *TNF- α* у организму

Активност му је проинфламаторна и антитуморска (слика 5). Уз многе особине описана је и његова способност да подстакне смрт ћелија. Регулише пролиферацију и диференцијацију имуних ћелија, а укључен је у процесе везане за септични шок, аутоимуне болести и *GvHD* (Graft versus host disease). Индиректно регулише упалне реакције тако да стимулише отпуштање кортикотропина из хипофизе стимулишући на тај начин кору надбубрежне жлезде да отпушта кортизол, који инхибише упалне процесе. Након блокарања *TNF- α* антителима значајно се смањује стварање *IL-1*, *IL-6*, *IL-3* и *GM-CSF* (Granulocyte macrophage colony stimulatig factor). Блокирање овог цитокина може имати пресудну улогу у концентрацији осталих цитокина у синовијалној течности (92, 96). Блокирањем *TNF- α* моноклонским антителима можемо зауставити активност болести тип II колаген индукованог артритиса код мишева (99, 102).

1.10. Полипи ендометеријума

Ендометријални полипи су задебљања слузокоже материце и састоје се од жлезда ендометријума, строме и крвних судова. Учесталост ендометријалних полипа је око 10% у

општој женској популацији (44, 45, 103). Могу бити асимптоматски и обично се дијагностикују за време испитивања узрока неуредног крвављења из материце или неплодности. Учесталост полипа ендометријума креће се између 20% и 30% (104, 105, 106). Код инфертилних жена дијагноза ендометријалног полипа је често случајан налаз. О повезаности ендометријалних полипа и инфертилитета постоје контраверзна мишљења, пошто и жене са ендометријалним полипима могу имати успешне трудноће. Последњих година у литератури постоје бројни радови који наводе да полипи могу да утичу на плодност. Сматра се да полипи дијаметра ≥ 1 цм могу бити узрок инфертилитета.

1.10.1. Преваленца полипа ендометријума код неплодних жена

Савремена дијагностика као што је трансвагинални ултразвук и хистероскопија су допринели чешћој дијагностици полипа код инфертилних жена. Они могу бити узрок неплодности и могу бити узрок понављајућих губитака раних трудноћа. Полипи могу имати негативан утицај на квалитет ендометријума, као и на имплантацију (105, 106). Извођењем хистероскопије пре процедуре *IVF* (In vitro fertilisation) код 11%-45% жена откривају се патолошке промене шупљине материце као што су полипи, субмукозни миоми и интраутерусне адхезије. Најчешћи структурни поремећаји у шупљини материце су ендометријални полипи. Једна студија је идентификовала полипе код 32% жена које су припремане и касније подвргнуте процедури *IVF*, док је друга студија нашла полипе у 6% жена пре процедуре *IVF*. Код жена код којих се понављају неуспеле имплантације након *IVF* процедуре, ендометријални полипи су нађени у 16,7% жена, а код жена са ендометриозом у 46,7% случајева (107, 108). Још увек је слабо познат механизам како полип узрокује неплодност и губитак ране трудноће. Они могу механичким путем ометати транспорт сперматозоида и имплантацију ембриона а могу узроковати инфламаторне промене на нивоу ендометријума или повећати производњу цитокина као што је гликоделин. У неким ранијим студијама где су обрађиване инфертилне жене које су биле подвргнуте хистероскопији и полипектомији закључено је да локализација

ендометријалних полипа може утицати на стопу спонтаних трудноћа и плодност (108). Стопа трудноћа 6 месеци након хистероскопске полипектомије износила је 57,4% за полипе који су били локализовани на утеротубарном ушћу, 40,3% за мултипле полипе, 28,5% за полипе на задњем зиду шупљине материце, 18,8% за полипе на бочном зиду и 14,8% за полипе на предњем зиду шупљине материце (106, 107). Овакви резултати нас наводе да закључимо да полипи могу ометати репродуктивне процесе, транспорт сперматозоида, имплантацију ембриона и развој трудноће (75). Међутим у другим студијама у којима је испитивано 83 инфертилне пацијенткиње које су у анамнези имале менструалне поремећаје, нађено је да хистероскопска полипектомија повећава стопу плодности и трудноћа без обзира на величину или број полипа (86, 94, 108).

Непостојање повезаности између величине полипа и плодности су у супротности са механичким ефектима полипа, јер би се већи ефекат могао очекивати код већих полипа. Показано је да гликоделин, инхибира везивање сперматозоида и овоцита, те повећава активност *NK*-ћелија. У време овулације у хуманом ендометријуму ниво гликоделина је врло низак у периоду између 6 дана пре овулације и 5 дана после овулације. Низак ниво гликоделина може олакшати оплодњу, а затим се нивои значајно повећавају 6. дана након овулације и сузбијају активност *NK*-ћелија и чине ендометријум пријемчивим за имплантацију (75). То би могло значити да се квалитет ендометријума може променити повећаном производњом гликоделина у шупљини материце у перивулаторном периоду код жена са ендометријалним полипима и субмукозним миомима, када би концентрације утерусног гликоделина требало да буду јако ниске или одсутне (76). То нам може указати да присуство полипа може повећати експресију *XOXA10* и *XOXA11* гена. Они су молекуларни маркери ендометријалне рецептивности и на тај начин мењају квалитет ендометријума са полипима (107, 108).

1.10.2. Дијагноза ендометријалних полипа

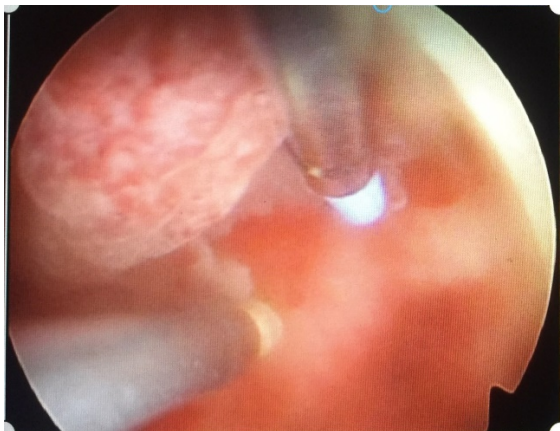
Модалитети дијагностике који се користе за дијагнозу ендометријалних полипа укључују 2Д и 3Д трансвагинални ултразвук који је најбоље урадити у раној пролиферативној фази циклуса, *SIS* (Saline Infusion Sonography) ултразвучни преглед шупљине материце након убацивања у шупљину физиолошког раствора и хистероскопија. Дијагностичка тачност 2Д ултразвука је лошија у поређењу са 3Д ултразвуком, *SIS* и хистероскопијом. Сесилни полип може да се замени са субмукозним миомом. Такође је ултразвучно тешко разликовати прави ендометријални полип од полипоидног ендометријума посебно након суперовулације која узрокује појаву густог пролиферативног ендометријума. У једној студији нађено је да су се ултразвучни налази слагали са налазима хистероскопије у дијагнози ендометријалних полипа у 90% случајева (56, 59). Многе студије наводе велику дијагностичку тачност *SIS* у дијагнози патологије шупљине материце (полипи, миоми, адхезије) са сензитивношћу од 88% и специфичношћу од 94% (55). Хистероскопија представља златни стандард у дијагнози ендометријалних полипа, она омогућава постављање дијагнозе и истовремено уклањање полипа (58).

1.10.3. Лечење ендометријалних полипа

Лечење ендометријалних полипа може бити хируршки или код мањих полипа праћење. Примећено је да у 27% случајева долази до спонтане регресије полипа који су мањи од 1cm (centimetra). За уклањање полипа најчешће се користи *office* хистероскопија или ресектоскопска хистероскопија. Полипи се могу уклонити хистероскопским маказима или форцепсом. Раније су се полипи уклањали наслепо експлоративном киретажом или киретажом под контролом ултразвука (57, 58).

Полип ендометријума је бенигна локализована пролиферација жлезда и строме ендометријума покривена епителом која се издиже изнад равни слузокоже (106). Полип

настаје као фокална пролиферација базалног слоја ендометријума, а у основи самог полипа најчешће се налазе задебљали крвни судови (105). Полипи се најчешће јављају у фундусу утеруса, а за ендометријум их везује широка основа, то су сесилни полипи или петељка различите дужине и дебљине, то су пендукулусни полип. Полипи могу бити различите величине. Величина се креће од дискретних израштаја ендометријума до ткивних маса које испуњавају читаву шупљину материце. Дистални део полипа може да допре до канала грлића материце и вагине. Полипи се најчешће јављају код жена у перименопаузи, а пре менархе изузетно су ретки (106). Заступљеност полипа у општој популацији жена износи око 24%, а код 20% жена полипи су мултипли (107, 108). Патолошко утерусно крварење је најчешћи клинички симптом постојања ендометријалног полипа. Полип настаје као последица естрогене стимулације слузокоже материце и неједнаке осетљивости појединих делова ендометријума на деловање естрогена. Функционални полипи под дејством стероидних хормона естрогена и прогестерона показују цикличне промене карактеристичне нормалном ендометријуму (106). Атрофични полипи се јављају код жена у постменопаузи и претпоставља се да настају као резултат регресије хиперпластичних и функционалних полипа (105, 106). У полипу могу да се развију различити типови хиперплазије и карцинома ендометријума (107). Заступљеност полипа, према доступним подацима, са малигним тумором је 0–13%, а 12–34% болесница са карциномом ендометријума истовремено има и полип (107). Једини симптом полипа је крварење из материце које се јавља у средини или после менструације. Дијагноза постојања полипа у ткиву ендометријума је на основу хистероскопског или сонографског налаза. Терапија полипа се састоји у томе да он буде хируршки одстрањен и послат на патохистолошку верификацију (Слика 6).



Слика 6. Хистероскопска полипектомија омчицом

1.11. Актуелне методе за унапређивање квалитета ендометријума

Претходне студије су откриле неадекватну регулацију ендометријалних фактора као што су: LIF, бета 3 интегрини, остеопоентин и многих других који су одговорни за идиопатску неплодност код пацијената са стерилитетом. Нови приступ је указао на могућност повећавања имплантације директним третманом дисрегулисаних ендометријалних протеина. Али сви ови третмани су засновани на лошем разумевању сложених ендометријалних реакција које обухватају ендотелијалне и епителијалне ћелије, макрофаге, лимфоците и NK ћелије (78). Тренутно се испитују три различите могућности третмана: системски интравенозни третман, вирални или генски трансфер уз помоћ трансцервикалне администрације и стимулација ендометријума уз помоћ трансцервикално примењених протеинских коктела. Прва опција је системско давање хепарина и аспирина како би се поправила перфузија, потом третман преднизолом да би се сузбило одбацивање фетуса, а потом интравенско давање имуноглобулина за модулирање имуно ћелијске функције, као и примена рекомбинантног LIF-а (49, 65). Мање пилот студије су биле охрабрујуће али велике рандомизирани студије нису могле да потврде утицај ових системских третмана да би потврдиле утицај овог третмана на стопу имплантације (48, 49). Под утицајем макрофага дендритичних ћелија и гранулоцита ови инфламаторни фактори стимулишу екстравазацију и инфилтрацију епителијалног стромалног ткива. Код људи сексуални однос доводи до неутрофилног регрутовања у површинском епителијуму цервикалног ткива. Ин витро студије су откриле повећану експресију ендометријалних протеина као што су LIF и IL6 под утицајем стимулације семиналном плазмом која очигледно доспева преко цервикса под утицајем утерусних контракција до кавума или се транспортује из цервикса до ендометријума под утицајем васкуларног сплета (44).

Ендометријални развој у правцу испитивања рецептивности захтева сарадњу огромног броја различитих фактора. Иако су многи од њих описани, цитокинска мрежа још увек није у потпуној мери и на задовољавајући начин описана. Многим студијама недостају функционални експерименти који се тешко изводе код људи.

1.12. Хистеросалпингографија (HSG)

Хистеросалпингографија *HSG* потиче од грчке речи *hystero-cavum* и *graphein* - писати, означава ендографску радиолошку методу снимања шупљине унутрашњих гениталних органа, материце и јајовода уз помоћ јодног контрастног средства. Овом методом се испитује стање цервикалног канала, облик и величина кавума, положај утеруса, пролазност туба, аномалије и обољење туба, као и однос утеруса и туба са околним органима (109). *HSG* је до данас, од стране многих клиничара рутинска техника и прва линија у испитивању интраутерине патологије код инфертилних пацијенткиња. Ова дијагностичка метода је постала скрининг процедура у свим случајевима инфертилитета суспектних на интраутерине абнормалности, као и за испитивање тубарне проходности. *HSG* се у клиничкој пракси примењује скоро сто година. Прву радиографију утеруса и јајовода урадили су 1914. године *Rubin* и *Caru* у *SAD* и *Dimier* и *La Lorier* у Француској независно једни од других. *Carlos Hauser* је 1924. године први искористио липиодол (контрасни медијум од 40% јода у уљу маковог зрна) као контраст у хистеросалпинографији (109,110). То је низ година био стандард у хистеросалпингографији, а касније је замењен оним средствима која су растворљива у води.

Данас се за хистеросалпингографију користи апарат за *HSG* по *G.K.F. Schultzeu* који је касније модификавао *Bernhard*. Неопходно је да испитивање буде урађено под флуороскопском контролом. Слика се може бележити на филму, филмској камери и видео траци (109). Хистеросалпингографија се изводи у преовулаторној, пролиферативној фази циклуса, најбоље између 8 и 10-ог дана менструалног циклуса. Препорука је да менсutralно крврење престане 2-3 дана пре интвенције. *HSG* се никада не изводи у постовулаторној фази због могућег оштећења ране трудноће (110).

Припрема пацијенткиње за извођење *HSG*-а обухвата узимање анамнезе, општи и гинеколошки преглед, стандардне лабораторијеске анализе, брис грлића и вагине на бактерије, хламидију и микоплазму и уреапласму (109). Интервенција може да се изводи у локалној парацервикланој или блок анестезији (*Cystocain*, *Lidocain*).

Хистеросалпингграфија се изводи на столу са уређајем за радиографију. Примена канила система или балон -катетер система за убризгавање контраста зависи од избора лекара, али и стања цервикса и утеруса (109, 110). На уредном *HSG* налазу приказује се цервикални канал, кавум утеруса, јајоводи и уочава се прелазак контраста у абдоминалну дупљу. Ова радиолошка метода по правилу користи минимално зрачење испод 500mRad.

Све суспектне налазе *HSG*, где је доказано оштећење туба или ако за 6 месеци од уредног *HSG* налаза не дође до зачећа, треба разјаснити лапароскопски. Када се упоређује са лапароскопијом, осетљивост *HSG*-а за утврђивање проходности јајовода је 65% (45, 109).

1.13. ХИСТЕРОСКОПИЈА

Хистероскопија је минимално инвазивна ендоскопска хируршка техника која омогућава дијагностику патолошких стања матичне шупљине, ушћа јајовода, цервикалног канала и лечење готово свих промена које погађају наведене делове матичне. Управо је то разлог што се хистероскопија данас сматра златним стандардом(44, 45). Техника се одликује минималном инвазивношћу јер користи природне физиолошке отворе на телу (41). У испитивању узрока стерилитета хистероскопија пружа добре услове визуализације матичне шупљине и ушћа јајовода, даје увид у стање развијености ендометријума омогућавајући циљану биопсију појединих његових делова. Код постојања развојних аномалија утеруса хистероскопија је незамењива у избору стратегије лечења. Хистероскопија је интервенција која може бити дијагностичка и оперативна. Има важну улогу у испитивању стерилитета, поновљених побачаја и абнормалног крварења из матичне (40, 111). При обављању хистероскопије користи се хистероскоп (танак телескоп малих димензија) који се уноси у матичну дупљу кроз вагину и грлић матичне (Слика8) Дијагностичка хистероскопија се обавља ради испитивања унутрашњости матичне, односно матичне дупље и слузокоже како би се дијагностификовали прираслице, полипи,

миоми или неке друге абнормалности. При овом захвату, обично се ради биопсија –узимање узорака материчне слузокоже, чије анализе често откривају постојање поремећаја у самој грађи слузокоже. При дијагностичкој хистероскопији након дистензије кавума утеруса са физиолошким раствором, матерична шупљина се посматра оптиком под углом од 30 степени, при чему се визуализују оба ушћа јајовода, фундус, предњи и задњи зид материце као и латералне стране материчне шупљине (111). У висини унутрашњег материчног ушћа хистероскопом се прикаже панорамска слика материчне шупљине, а након тога се прикаже и цервикални канал. Мускулатура зида утеруса захтева минимални притисак од 40 mmHg. Оперативна хистероскопија се изводи коришћењем ресектоскопа који користи биполарну струју (110, 111). Ресектоскоп носи електроде за сечење различитог облика у зависности од врсте захвата који се изводи. Електроде могу бити у виду омче, игле, куглице, ваљка итд. (Слика 7) Оперативном хистероскопијом изводе се поред полипектомије и миомектомија (субмукозни миоми типа 0, 1, 2), ресекција адхезија кавума утеруса, ресекција комплетних и парцијалних септума утеруса и хистероскопска стерилизација и хистероскопска аблација ендометријума (111) (Слика 7).



Слика 7. Хистероскопски приказ полипа ендометријума

Хистероскопски преглед се углавном обавља у првој фази менструационог циклуса, између 6 и 12 дана циклуса. Неколико је разлога за овакав став:

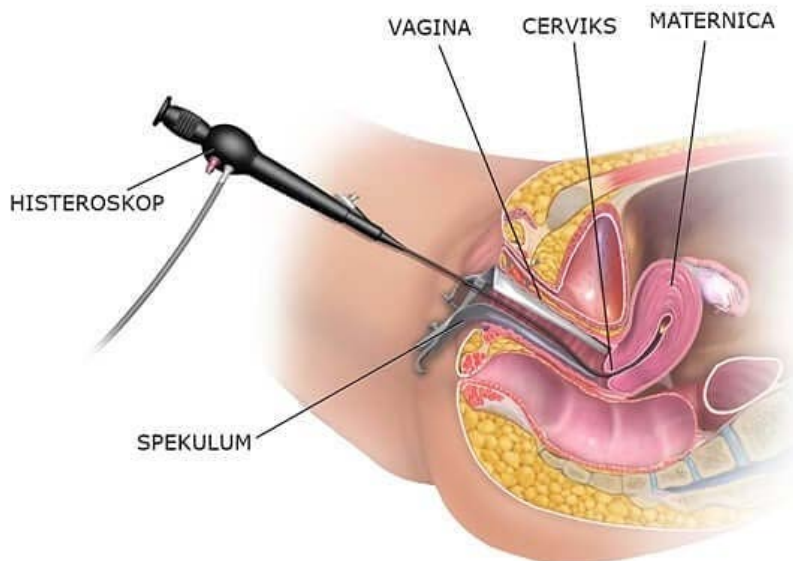
- у овој фази циклуса истмични део материце има нижи тонус па не омета видно поље
- слузница је у пролиферативној фази танка и не омета видно поље

-избегава се могућност интерференције са раном непрепознатом труноћом.

Хистероскопија може да се изводи и независно од фазе менструалног циклуса уколико је пацијенткиња припремљена оралним хормонским контрацептивима.

1.11.9.3. Предности хистероскопије

Предности хистероскопског приступа су: могућност приступа унутрашњости материце кроз физиолошке отворе као што су вагина и грлић материце, краће трајање захвата, боља прегледност оперативног поља, већа прецизност захвата, мања болност, мањи морбидитет и утрошак лекова, бржи опоравак и изостанак резова, (Слика 8).



Слика 8. Шематски приказ извођења хистероскопије

(<https://medium.com/@ivfsurrogacyin/hysteroscopy-treatment-in-india-surgery-which-is-smoothly-accomplished-without-any-hurdles-398b76699a35>)

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Циљеви ове проспективне студије су били утврдити промене на нивоу ендометријума пре и после хистероскопске полипектомије код инфертилних пацијенткиња са ендометријалним полипом као и код инфертилних пацијенткиња без ендометријалног полипа. Одређиван је:

1. Ниво $INF\gamma$, $TNF\alpha$ и гликоделина из периферне венске крви пре хистероскопске полипектомије и месец дана након полипектомије код пацијенткиња експерименталне групе и код пацијенткиња контролне групе.
2. Ниво $TNF\alpha$, $INF\gamma$ и гликоделина у испирку утеруса узетог у току хистероскопске полипектомије код пацијенткиња експерименталне групе и код пацијенткиња контролне групе.
3. Имунохистохемијски испитати део ткива полипа и део ендометријалног ткива код инфертилних пацијенткиња експерименталне групе.
4. Имунохистохемијски испитати део ендометријалног ткива код пацијенткиња контролне групе.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Истраживање је изведено у Гинеколошкој акушерској клиници Народни фронт у Београду у периоду од јануара 2013. године до маја 2013. године. Истраживање је изведено у виду проспективне студије у којем су учествовале 84 пацијенткиње. У овој клиничкој студији учествовало је 56 пацијенткиња у генеративном периоду код којих је дијагностикован ендометријални полип као узрок инфертилитета и представљале су експерименталну групу. Поред наведене групе у студији је учествовала и група од 28 пацијенткиња које су у генеративном периоду, које нису имале ендометријални полип и представљале су контролну групу.

Дијагностичко-оперативна хистероскопија извођена је у општој анестезији, у операционој сали са одговарајућом опремом и инструментима. Преоперативна припрема је обухватала комплетну дијагностику и рутинско узимање потребних анализа: цервикални и вагинални брис, брис цервикса на хламидију, микоплазму и уреоплазму, ПАПА тест, ултразвучни преглед. Одређивана је крвна група, крвна слика и биохемијске анализе уз анестезиолошки преглед и давана је сагласност за оперативно лечење. Оперативни захвати су рађени код инфертилних пацијенткиња до средине пролиферативне фазе-непосредно по завршетку менструалног крварења. Оперативна хистероскопија је извођена коришћењем ресектоскопа који користи биполарну струју. Оперативном хистероскопијом извођена је полипектомија и биопсија ендометријума.

3.1 Критеријуми за извођење експеримента

Критеријуми за укључење у експерименталну групу су биле инфертилне пацијенткиње са верификованим ендометријалним полипом у генеративном периоду. Критеријум за укључење у контролну групу су биле инфертилне пацијенткиње без верификованог ендометријалног полипа у генеративном периоду.

Критеријуми за искључење из студије за обе групе пацијенткиња је било постојање субмукозног миома, ендометриозе, карцинома ендометријума и аномалија утеруса.

Обзиром на наш општи циљ испитивања квалитета ендометријума код пацијенткиња са ендометријалним полипом као и код контролне групе пацијенткиња без ендометријалног полипа коришћене су следеће методе:

3.2. Прикупљање узорака крви из *v. cubitalis* пацијенткиња за одређивање концентрације цитокина

Узети су узорци крви пацијенткиње из *v. cubitalis*, пре увођења пацијенткиње у општу ендотрахеалну анестезију и пре операције у циљу одређивања концентрације цитокина у периферној венској крви пацијенткиње.

3.3. Одређивање концентрације цитокина у крви пацијенткиња

Одговарајућа запремина периферне венске крви пацијенткиња од 5 ml се узима свакој пацијенткињи. Крв се узима вакутаимером са хепарином и центрифугира се 10 минута. Потом је крв одвајана у (расхлађене на 0°C) епрувете (по 5 ml) за одређивање концентрације цитокина и центрифугирана (1700×g, 10 минута, на 4°C) до издвајања серума. Затим су узорци серума складиштени на -80°C до одређивања концентрација цитокина: *Glycodelin*, *INF-γ* и *TNF-α*. Матријал је био прослеђен у лабораторију Клиничког центра Крагујевац-Центар за молекуларну медицину и испитивање матичних ћелија, лабораторија за рад са хуманим материјалом. Применом ELISA методе извршена је детекција и одређивање концентрација наведених цитокина. Периферна венска крв је узета код пацијенткиња експерименталне и контролне групе пре хистероскопске операције и месец дана након операције. Одређивање концентрација цитокина *Glycodelina*, *INF-γ* и *TNF-α* у узорцима

серума је вршено методом *ELISA* (електрохемилуминесценције) уз коришћење стандардних комерцијалних китова (*Elecsys Testosterone II, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany*) на апарату *Elecsys 2010* (112). Концентрација цитокина у серуму је изражавана у ng/ml. Сензитивност есеја за цитокине је била 0.025 ng/ml. Коefицијент варијансе за интересеј је износио 3.8%, док је за интраесеј износио 5% (113).

3.4. Прикупљање узоракa испирка материчне шупљине пацијенткиња за одређивање концентрације цитокина

Узимање испирка утеруса за време операције, након увођења пацијенткиње у општу ендотрахеалну анестезију, при чему је пацијенткиња у литотомном положају припремљена по свим принципима асепсе и антисепсе за извођење хистероскопске операције. Узима се испирак утеруса ради одређивања *TNF α* , *FN γ* и гликоделина код пацијенткиња обе групе: контролне и експерименталне групе пацијенткиња. Испирак је добијен током хистероскопије тако што се у утерус убаци физиолошки раствор шприцем или посебним инструментима креираним за узимање испирка утеруса (113, 114).

3.5. Одређивање концентрације цитокина у испирку утеруса

Било је потребно убризгати 10 ml физиолошког раствора у кавум утеруса и одмах аспирирати без контаминације. Потом је центрифугирано на 2500 обртаја 10 минута. Супернатант се скупљао и чувао на температури од – 20°C, а потом је добијени материјал послат у Центар за молекуларну медицину и испитивање матичних ћелија, лабораторија за рад са хуманим материјалом.

3.6. Имунохистохемијска испитивања ткива полипа и ткива ендометријума

Након узимања полипа или ендометријума из кавума утеруса помоћу хистероскопа, добијени материјал је третиран према следећој процедури: примењена је фиксација у 4% формалдехиду (неутрални рН), дехидратација и калупљење. Након тог извршена је обрада ткива, дехидратација, испирање и импрегнација, применом ткивног процесора. Обрађено ткиво је затим укалупљено у парафинске блокове и помоћу микротоме исечено на ткивне пресеке дебљине ~5 μm . Претходно загрејани парафински исечци у термостату на +56 °C у трајању од 45 минута, су потапани у ксилол (3 пута по 5 минута) у циљу депарафинизације. Поступак рехидратације ткива обављен је испирањем у опадајућим концентрацијама етил алкохола: 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу, потом 5 минута у 96% алкохолу, 5 минута у 70% алкохолу и на крају 5 минута у дестилованој води. Добијени препарати су третирани у цитратном пуферу (рН 6.0) у микроталасној пећници 21 минут на 800 W ради демаскирања антигена. После хлађења, препарати су интензивно испрани у PBS-у три пута. Помоћу 3% H₂O₂ је блокирана активност ендogene пероксидазе, а инкубација на собној температури је трајала 15 минута. Применом комерцијалног протеинског блока (*Novocastra, UK*) блокирано је неспецифично везивање. Након инкубације од 15 минута на собној температури, препарати су три пута опрани у PBS-у (по 5 минута) (115).

У влажној комори на собној температури на препарате је наносен Normal Horse Serum разблажен у PBS-у (1:67), уз 50 минута инкубације. Препарати су испрани у PBS-у (три пута по 5 минута) и наносено је примарно антитело Mouse monoclonal anti-PV (1:1000, Sigma-Aldrich), потом су препарати одлагани у влажну комору током ноћи на собној температури. Одговарајуће секундарно (biotin-conjugated antimouse) антитело (разблажење 1:200 у PBS-у) је нанесено након инкубације и интензивно испирања у PBS-у (три пута по 5 минута) на препарате, а потом Streptavidin-Horseradish Peroxidase (инкубирана 10 минута на собној температури). У влажној комори на собној температури, након испирања 3 пута по 5 минута

у PBS-у, наношен је avidin-biotin-peroxidase комплекс (разблажење 1:50 у PBS-у) уз инкубацију од 50 минута

Након испирања препарата 3 пута по 5 минута у PBS-у, додато је 2-3 капи DAB раствора који је добијен разблаживањем 50µl DAB Chromagen-а у 1 ml одговарајућег пуфера, (Peroxidase Detection System RE 7120-K, Novocastra, UK). Реакција је праћено под микроскопом и прекинута је испирањем у PBS-у. У следећој фази препарати су испрани у дестилованој води (5 минута), а након тога контрастирани хематоксилином по Mayer-у 2 минута. Потом су препарати интензивно опрани текућом водом и остављани у дестилованој води 5 минута. По истеку времена урађен је поступак дехидратације и просветљивања препарата. Растуће концентрације алкохола су коришћене за процес дехидратације и то: 5 минута у 70% алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу и на крају 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу. Добијени препарати су по завршетку процеса дехидратације просветљени потапањем 5 минута у ксилолу (3 пута). Након завршеног поступка обојени препарати су покривени медијумом за покривање DPX (Sigma Aldrich) и покровним стаклом (13, 115).

3.7. Истраживачки поступак

Ткива ендометријума и полипа су фиксирана 24 сата у 4% пуферисаном неутралном формалину, на собној температури, за хистопатолошку и имунохистохемијску анализу. Након завршеног поступка фиксације, исечци ткива су дехидрисани, просветљени и прожети парафином у апарату за аутоматску фиксацију ткивних узорака Sacura V.I.P и укалупљени у парафинске блокове. Тако добијени парафински калупи су исечени на аутоматском, ротационом, микротому HistoRange LKB на резове дебљине 4µm, а затим су потапани у воду на 40°C и на крају стављени на стаклене микроскопске плочице.

3.8. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)

Применом методе хематоксилин-еозин (hematoxylin-eosin) по Heidenhain-у и сагласно препорукама Gurr-а изведено је бојење парафинских ткивних пресека. (116,117) Тако добијене плочице са ткивним пресецима пуферисане су у пуферу формалдехида 10 секунди, потом опране у текућој води и на крају потопљене 2 минута у Mayer-ов хематоксилин (Merck). Добијени ткивни исечци су испирани 1 минут у текућој води и обојени алкохолним еозином (Merck) у трајању 1 минут. По завршеном поступку бојења урађена је дехидратација исечака ткива како би се из њих уклонила вода. Тако припремљени исечци су потапани у серију растућих концентрација етанола и то следећим редом: 1 минут у 85% алкохолу, потом 2 пута по 50 секунди у 96% и на крају 2 пута по 50 секунди у апсолутном алкохолу. Поступак просветљавања је уследио након бојења и дехидратације када су исечци потопљени 50 секунди у мешавину ксилола и етанола у односу 1:1, а затим два пута по 50 секунди само у ксилолу. На ткивне исечке нанета је кап Канада балзама (Canada balsam, Centrohem, Србија) и исечци су прекривени покровним стаклима. Након 24-часовног сушења препарати припремљени на овај начин су анализирани под светлосним микроскопом.

3.9. Имунохистохемијска анализа експресије цитокина TNF- α , INF- γ i Glycodelina у ткиву ендометријума и полипа

Ткивни пресеци који су коришћени за имунохистохемијску анализу, претходно монтирани на адхерентне SuperFrost® плочице, загрејани су на температури од 56°C у трајању од 60 минута. Плочице са ткивним пресецима су потапане у ксилол, у циљу депарафинизације и рехидратације а потом у серију опадајућих концентрација етанола: два пута по 5 минута у апсолутном, а затим по 5 минута у 96%, 70% и на крају у 50% етанолу. Исечци ткива у циљу демаскирања антигена, су загревани у микроталасној пећници и то у лимонском пуферу (pH= 6.0) у трајању од 21. минута. Препарати су по завршеном поступку хлађења интензивно

испрани најпре у дестилованој а затим су 3 пута по 10 минута инкубирани у PBS (енгл. *Phosphate Buffered Saline*). Плочице са ткивним пресецима су потопљене у ледено хладном ацетону на температури 4°C у трајању од 10 минута у циљу фиксације и пермеабилитације ткивних исечака. Ткивни исечци су након истека инкубације испрани у PBS, а потом је у циљу да се блокира активност ендogene пероксидазе на њих је апликовано неколико капи Hydrogen Peroxide Block-а. Тако добијени препарати су на собној температури по истеку инкубације од 10 минута два пута опрани у PBS, а онда је на њих апликован неколико капи Protein Block-а који је после 10 минута инкубације испран једном у PBS. Ткивни исечци су по завршеном поступку испирања, инкубирани са примарним антителима преко ноћи у влажној комори на температури од 4 °C. У току овог поступка су коришћена одговарајућа мишја моноклонска и одговарајућа зечја поликлонска антитела која су у одговарајућем разблажењу растворена у PBS-у са 1% BSA (Табела 1).

Табела 1. Основне карактеристике и разблажења коришћених примарних антитела за цитокине

Антитело	Порекло и врста	Произвођач	Каталoшки број	Разблажење
TNF- α	Mouse	Abcam	Ab8348	1:200 (ICC)
	monoclonal (2C8)			1:1000 (ELISA)
INF- γ	Rabbit	Abcam	Ab9657	1:200
	polyclonal			1:1000
Glycodelin	Mouse	Abcam	Ab17247	1:200
	monoclonal (001-13)			1:1000

Ткивни исечци су по истеку инкубације испрани у PBS а затим су за визуелизацију антигена коришћени одговарајући комерцијални детекциони китови.

Ткивни исечци су инкубирани са одговарајућим секундарним антителима на собној температури и у влажној комори за детекцију антигена које засновано на примени моноклонских мишјих антитела. Препарати су, по истеку инкубације опрани у PBS а онда је на ткивне исечке апликована Streptavidin Peroxidase-a. Троструко испирање је уследило по истеку инкубације од 30 минута, а потом је на ткивне исечке нанет DAB супстрат. Препарати су по развијању браон боје испрани три пута у дестилованој води и обојени хематоксилином по Мауер-у, а потом интензивно опрани текућом водом. Тако добијени препарати су покривени глицеролом и на крају покровном љуспицом.

За детекцију антигена засновано на примени зечјих поликлонских антитела коришћен је Rabbit specific HRP-AEC Detection IHC Kit. На ткивне исечке је нанета кап Rabbit Specific HRP conjugate. Препарати су након периода инкубације од 45 минута испрани у PBS, а потом је апликован AEC Single Solution. Препарати су по развијању црвене боје испрани у дестилованој води, а потом обојени хематоксилином и интензивно опрани текућом водом. Тако добијени препарати су покривени глицеролом и покровном љуспицом.

Припремљени ткивни исечци су након 24-часовног сушења, анализирани светлосним микроскопом. Препарате су независно анализирала два истраживача.

Према стандардним пропозицијама *UK NEQAS* (UK National External Quality Assessment Scheme for Immunocytochemistry) изведена су сва имунохистохемијска бојења уз контролу квалитета и специфичности бојења, а применом позитивних и негативних контрола (115). Као позитивна контрола за тестирање специфичности примарних антитела коришћени су ткивни узорци за које се сигурно зна да исказују испитиване антигене: исечци ткива плаценте (за *Glycodelin*) и лимфног чвора (за *TNF-α* и *INF-γ*). Третирани су на исти начин као и испитивани узорци у овом истраживању. Као негативна контрола у току имунохистохемијског бојења послужили су узорци ткива третирани индиферентним пуфером који нема афинитет везивања за анализирани антигене.

Бојењем је добијена различита експресија епителних ћелија ендометријума пропорционална везивању боје за те ћелије. Семиквантативно смо одредили скор: 0 (0%) – нема сигнала, 1 (1-10%) – слаб сигнал, 2 (11-50%) – умерен сигнал, 3 (51-100%) – висок сигнал.

3.10. Снага студије и величина узорка

На основу података о вредностима серумске концентрације цитокина *IL-10*, публикованих у студији сличног дизајна, израчуна је величина узорка. Прорачун је сачињен коришћењем одговарајућег рачунарског програма уз вероватноћу α грешке од 0,05, снагу студије од 0,8, величину ефекта од 0,80 који показује статистички значајну корелацију између серумског нива *IL-10* код пацијената са колоректалним карциномом и прогресије болести (група пацијената са узрапредовалом болешћу има веће серумске вредности *IL-10*), са двосмерним статистичким тестирањем нулте хипотезе, *Mann-Whitney-евим* тестом. Имајући у виду горе наведене параметре, величина узорка је прорачуната на минимално 50 испитаника.

3.11. Статистичка обрада података

Коришћењем софтверског пакета IBM SPSS Statistics 20 анализирани су подаци. Резултати су груписани и приказани, табеларно и графички. Методе дескриптивне статистике су коришћене за утврђивање мера централне тенденције и варијабилитета. Резултати су приказани као средње вредности (енгл. mean), стандардне грешке (енгл. standard error), медијане (енгл. med), перцентили (енгл. percentiles), минимум, максимум и проценти (118,119). Прво смо испитали да ли добијене вредности имају нормалну расподелу. Унутар група нормалност расподеле анализирана је *Kolmogorov-Smirnov-им* и *Shapiro-Wilk-*

овим тестовима. Код вредности које су имале нормалну расподелу користили смо *Student's-ov t* тест и упарени *t* тест, а вредности које нису имале нормалну расподелу, користили смо непараметријски *Mann-Whitney-ев* и *Wilcoxon-ов* тест. Интензитет и смер повезаности између варијабли су одређивани *Pirson-овим* и *Spirman-овим* коефицијентом корелације. Да ли неко обележје може да буде маркер за неку појаву и за приказ односа сензитивности и специфичности коришћена је крива оперативне карактеристике примаоца (*Receiver operating characteristic curve*: Значај концентрација цитокина у серуму процену тежине болести *ROC curve*). Све статистичке анализе у овом раду су урађене са интервалом поверења од 95%. Уколико је ниво вероватноће нулте хипотезе <5%, односно уколико је значајност теста $p < 0,05$. резултати статистичке анализе су прихваћени као статистички значајни (77).

4. Резултати истраживања

4.1 Анализа концентрације цитокина добијене ELISA методом

У овом поглављу биће представљени резултати експеримента обрађени статистички кроз табеле и графиконе. Обрађена је експериментална група пацијенткиња са полипом ендометријума и контролна група пацијенткиња без полипа ендометријума. Пацијенткиње експерименталне и контролне групе су инфертилне пацијенткиње. Праћене су вредности цитокина *TNF – α*, *INF – γ* и *Glycodelina* у испирку утеруса, серуму пре интервенције и серуму после интервенције.

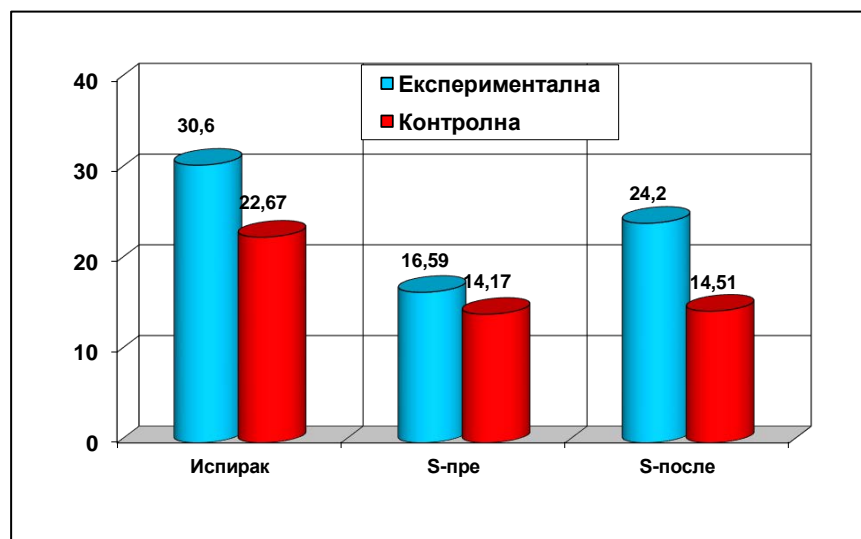
4.1.1. Анализа концентрације вредности *TNF – α* добијене ELISA методом

Табела 2. Вредности *TNF – α* зависно од групе

Експериментална група	N	SV	SD	Minimum	Maximum
TNF у испирку	56	30.60	3.00	24.43	41.81
TNF у серуму пре интервенције	56	16.59	7.03	10.48	46.66
TNF у серуму после интервенције	56	24.20	12.19	13.57	82.14
Контролна група					
TNF у испирку	26	22.67	5.41	15.31	34.61
TNF у серуму пре интервенције	26	14.17	8.23	6.70	44.13
TNF у серуму после интервенције	26	14.51	11.09	4.12	42.56

Легенда: N – број пацијенткиња
SV – средња вредност
SD – стандардна девијација
Minimum – мнимална измерена вредност
Maksimum – максимална измерена вредност

Графикон 1. Вредности $TNF-\alpha$ зависно од групе



Табела 2. и графикон 1. приказују вредности $TNF-\alpha$ у серуму пацијенткиња пре и после хистероскопије, као и у испирку кавума утеруса током хистероскопије, и то у експерименталној и у контролној групи. Како је у табели и графикону приказано, вредности $TNF-\alpha$ код пацијенткиња са полипом ендометријума (експериментална група) биле су више у односу на вредности код пацијенткиња које нису имале ендометријални полип (контролна група), и то у сва три узорка, тј. како у испирку, тако и у серуму пре односно серуму после хистероскопије. Такође, вредности $TNF-\alpha$ у испирку кавума утеруса, биле су више у односу на вредности у серуму, и то како у експерименталној тако и контролној групи. Запажа се да су вредности $TNF-\alpha$ у серуму пацијенткиња из експерименталне групе, након уклањања полипа порасле у односу на вредности пре интервенције-хистероскопије. Исти је случај и у контролној групи, односно и у овој групи је дошло до пораста вредности $TNF-\alpha$ у серуму пацијенткиња након хистероскопије, међутим тај пораст је био врло мали, а и знатно мањи него у експерименталној групи.

Статистичком обрадом података, приказаних у табели 2. и графикону 1, показано је да постоји статистички значајна разлика вредности $TNF-\alpha$ у испирку кавума утеруса, код пацијенткиња из експерименталне групе ($p < 0.001$). Такође, серумске вредности $TNF-\alpha$, код пацијенткиња из експерименталне групе, показују статистички значајну разлику, и то како пре интервенције (хистероскопије) ($p < 0.001$), тако и након интервенције ($p < 0.001$). У

контролној групи, вредности TNF- α показују статистички значајну разлику, како у испирку кавума утеруса ($p < 0.001$), тако и у серуму пацијенткиња пре хистероскопије ($p < 0.001$), односно у серуму пацијенткиња после хистероскопије ($p < 0.001$).

У експерименталној групи, анализом варијансе показано је постојање статистички значајне разлике између вредности TNF- α детектованих у испирку кавума утеруса, серуму пацијенткиња пре интервенције и серуму пацијенткиња после интервенције ($p < 0.001$). У истој групи пацијенткиња, применом т-пар теста показано је постојање статистички значајне разлике између вредности TNF- α детектованих у испирку кавума утеруса и серуму пацијенткиња пре интервенције ($p < 0.001$), као и између вредности TNF- α детектованих у испирку кавума утеруса и серуму пацијенткиња после интервенције ($p < 0.001$), док су серумске вредности TNF- α пре интервенције биле статистички значајно мање у односу на серумске вредности после интервенције ($p < 0.001$).

У контролној групи, анализом варијансе показано је постојање статистички значајне разлике између вредности TNF- α детектованих у испирку кавума утеруса, серуму пацијенткиња пре хистероскопије и серуму пацијенткиња после интервенције ($p < 0.01$). У истој групи пацијенткиња, применом т-пар теста показано је постојање статистички значајне разлике између вредности TNF- α детектованих у испирку кавума утеруса и серуму пацијенткиња пре хистероскопије ($p < 0.001$), као и између вредности TNF- α детектованих у испирку кавума утеруса и серуму пацијенткиња после хистероскопије ($p < 0.01$), док се серумске вредности TNF- α пре хистероскопије нису статистички значајно разликовале од серумских вредности после хистероскопије ($p > 0.05$).

У експерименталној групи детектоване су статистички значајно веће вредности TNF- α у односу на контролу, и то како у испирку кавума утеруса ($p < 0.001$), тако и у серуму после хистероскопије ($p < 0.001$). Серумске вредности TNF- α , пре хистероскопије, не показују статистички значајну разлику експерименталне и контролне групе ($p > 0.05$).

Испитивањем постојања статистичке повезаности вредности TNF- α у испирку кавума утеруса и серму пацијенткиња, показано је да у контролној групи постоји умерена,

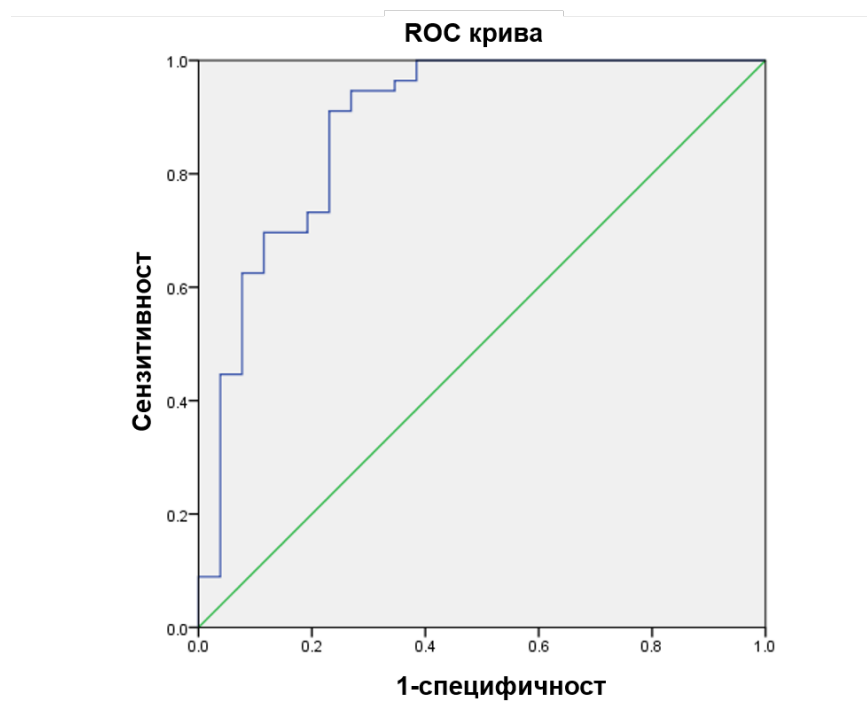
статистички значајна позитивна корелација вредности TNF- α у испирку са серумским вредностима TNF- α пре хистероскопије ($r=0.482$; $p<0.05$). Овакав статистички налаз нам имплицира да код пацијенткиња које нису имале полип, при вишим вредностима TNF- α у испирку кавума утеруса, очекујемо и веће серумске вредности TNF- α .

Табела 3. Површина испод ROC криве вредности TNF- α у испирку кавума утеруса

Површина	SE	p	95% CI
0.887	0.045	< 0.001	0.799 - 0.975

Легенда: SE – стандардна грешка
 p – вероватноћа
 95% CI – 95-процентни интервал поверења

Графикон 2. ROC крива вредности TNF- α у испирку кавума утеруса



Табела 3. и графикон 2. приказују ROC криву и вредност површине испод криве (ACU), вредности TNF- α у испирку кавума утеруса код пацијенткиња са полипом ендометријума.

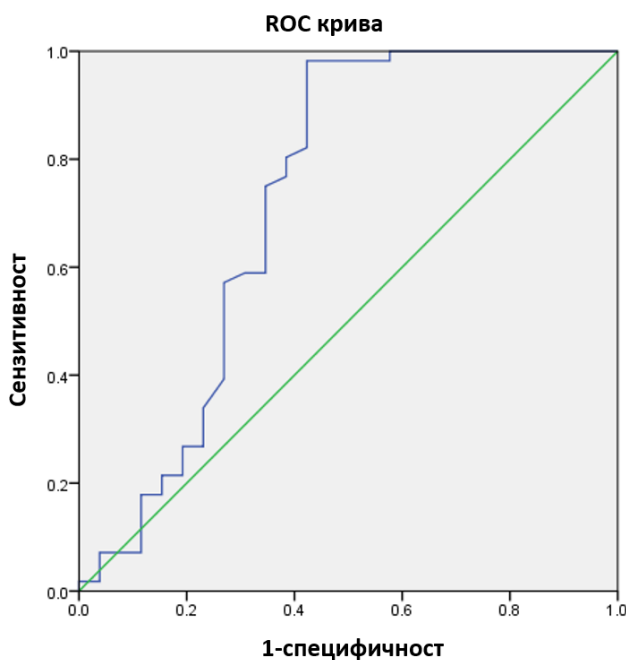
Површина испод криве је просечна пропорција тачних позитивних резултата, који се добијају равномерно изнад свих могућих пропорција лажно негативних резултата, у распону од 0 до 1. Површина испод криве је износила 0.887 ± 0.045 , са распоном 0.799 - 0.975 за 95% интервала поверења, и врло високо статистички значјно се разликовала од површине испод криве од 0.5. Добијена cutoff вредности TNF- α у испирку кавума утеруса износила је 27.305 (pg/nm/ml), док је сензитивност теста за дату cutoff вредност износила 91.1% а специфичност теста 73.1%.

Табела 4. Површина испод ROC криве вредности TNF- α у серуму пацијенткиња пре хистероскопије

Површина	SE	p	95% CI
0.725	0.073	< 0.01	0.582 - 0.868

Легенда: SE – стандардна грешка
 p – вероватноћа
 95% CI – 95-процентни интервал поверења

Графикон 3. ROC крива вредности TNF- α у серуму пацијенткиња пре хистероскопије



Табела 4. и графикон 3. приказују ROC криву и вредност површине испод криве (AUC), вредности TNF- α у серуму пре хистероскопије код пацијенткиња са полипом ендометријума. Површина испод криве је просечна пропорција тачних позитивних резултата, који се добијају равномерно изнад свих могућих пропорција лажно негативних резултата, у распону од 0 до 1. Површина испод криве је износила 0.725 ± 0.073 , са распонем 0.582 - 0.868 за 95% интервала поверења, и високо статистички значњо се разликовала од површине испод криве од 0.5. Добијена cutoff вредности TNF- α у серуму пре интервенције износила је 11.555 (pg/ng/ml), док је сензитивност теста за дату cutoff вредност износила 98.2% а специфичност теста 57.7%.

Дакле, вредности TNF- α су више када постоји полип ендометријума, и то како у испирку кавума утеруса тако и серуму. Вредности TNF- α су више у у испирку у односу на вредности у серуму. Вредности TNF- α у серуму расту након уклањања полипа. Како је вредност површине испод ROC криве (AUC), за вредности TNF- α у испирку, 0.887 указује да добијена cutoff вредност TNF- α у испирку од 27.305 има врло добру дијагностичку вредност, те уз то што је AUC врло високо статистички значајно већа у односу на AUC 0.5 указује да је ова cutoff вредност добар предиктор постојања ендометријалног полипа, и то са високом сензитивности теста и добром специфичности теста. С друге стране, како нам сезитивност теста говори о способности теста да открије болест када она заиста постоји тј. да препозна све болесне особе као болесне, а специфичност теста говори о способности теста да открије не постојање болести када она заиста не постоји тј. да препозна све здраве особе као здраве, те да је тест са високом сензитивности добар као скрининг метод, нарочито код озбиљних и тешких болести нпр. карцином, а да је тест са високом специфичности добар као тест за потврду постојања болести, можемо рећи да вредност TNF- α у испирку кавума од 27.305 и више која има виску сензитивност од 91.1% може бити добар скрининг метод за откривање постојања ендометријалног полипа.

С друге стране, вредност површине испод ROC криве (AUC), за вредности TNF- α у серуму пре интервенције, од 0.725 указује да добијена cutoff вредност TNF- α у серуму пре интервенције од 11.555 има добру дијагностичку вредност, те уз то што је AUC високо статистички значајно већа у односу на AUC 0.5 указује да је ова cutoff вредност добар

предиктор постојања ендометријалног полипа са одличном сензитивности теста али лошом специфичности теста.

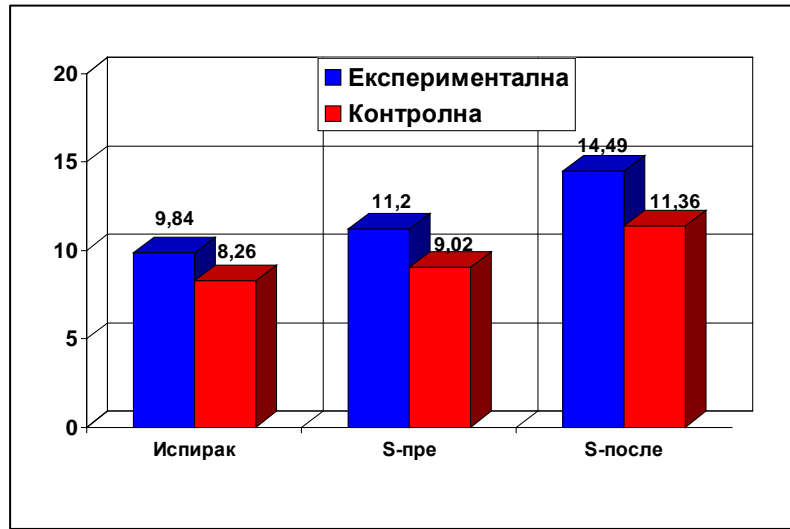
4.1.2. Анализа концентрације *INF-γ* добијене *ELISA* методом

Табела 5. Вредности *INF-γ* зависно од групе

Експериментална група	N	SV	SD	Minimum	Maximum
<i>INF</i> у испирку	56	9.84	1.45	7.90	15.06
<i>INF</i> у серуму пре интервенције	56	11.20	3.42	8.43	23.88
<i>INF</i> у серуму после интервенције	56	14.49	6.17	10.30	45.26
Контролна група					
<i>INF</i> у испирку	26	8.26	1.70	1.98	10.98
<i>INF</i> у серуму пре интервенције	26	9.02	3.50	3.14	22.42
<i>INF</i> у серуму после интервенције	26	11.36	7.38	6.84	43.72

Легенда: N – број пацијенткиња
SV – средња вредност
SD – стандардна девијација
Minimum – минимална измерена вредност
Maximum – максимална измерена вредност

Графикон 4. Вредности INF- γ зависно од групе



Табела 5. и графикон 4. приказују вредности INF- γ у серуму пацијенткиња пре и после хистероскопије, као и у испирку кавума утеруса током хистероскопије, и то у експерименталној и у контролној групи. Како је у табели и графикону приказано, вредности INF- γ код пацијенткиња са полипом ендометријума (експериментална група) биле су више у односу на вредности код пацијенткиња које нису имале ендометријални полип (контролна група), и то у сва три узорка, тј. како у испирку, тако и у серуму пре односно серуму после хистероскопије. Такође, вредности INF- γ у испирку кавума утеруса, биле су ниже у односу на вредности у серуму, и то како у експерименталној тако и контролној групи. Запажа се да су вредности INF- γ у серуму пацијенткиња из експерименталне групе, након уклањања полипа порасле у односу на вредности пре интервенције-хистероскопије. Исти је случај и у контролној групи, односно и у овој групи је дошло до пораста вредности INF- γ у серуму пацијенткиња након хистероскопије, међутим тај пораст је био мањи, а такође мањи него у експерименталној групи.

Статистичком обрадом података, приказаних у табели 5. и графикону 4, показано је да постоји статистички значајна разлика вредности INF- γ у испирку кавума утеруса, код пацијенткиња из експерименталне групе ($p < 0.001$). Такође, серумске вредности INF- γ , код пацијенткиња из експерименталне групе, показују статистички значајну разлику, и то како пре интервенције ($p < 0.001$), тако и након интервенције ($p < 0.001$). У контролној групи,

вредности INF- γ показују статистички значајну разлику, како у испирку кавума утеруса ($p < 0.001$), тако и у серуму пацијенткиња пре хистероскопије ($p < 0.001$), односно у серуму пацијенткиња после хистероскопије ($p < 0.001$).

У експерименталној групи, анализом варијансе показано је постојање статистички значајне разлике између вредности INF- γ детектованих у испирку кавума утеруса, серуму пацијенткиња пре интервенције и серуму пацијенткиња после интервенције ($p < 0.001$). У истој групи пацијенткиња, применом т-пар теста показано је постојање статистички значајне разлике између вредности INF- γ детектованих у испирку кавума утеруса и серуму пацијенткиња пре интервенције ($p < 0.05$), као и између вредности INF- γ детектованих у испирку кавума утеруса и серуму пацијенткиња после интервенције ($p < 0.001$), док су серумске вредности INF- γ пре интервенције биле статистички значајно мање у односу на серумске вредности после интервенције ($p < 0.01$).

У контролној групи, анализом варијансе није показано постојање статистички значајне разлике између вредности INF- γ детектованих у испирку кавума утеруса, серуму пацијенткиња пре хистероскопије и серуму пацијенткиња после интервенције ($p > 0.05$). У истој групи пацијенткиња, применом т-пар теста, показано је постојање статистички значајне разлике између вредности INF- γ детектованих у испирку кавума утеруса и серуму пацијенткиња после хистероскопије ($p < 0.001$), док вредности INF- γ детектованих у испирку кавума утеруса и серуму пацијенткиња пре хистероскопије не показују статистички значајну разлику ($p > 0.05$), што је случај и са серумским вредностима INF- γ пре и после хистероскопије ($p > 0.05$).

У експерименталној групи детектоване су статистички значајно веће вредности INF- γ у испирку кавума утеруса у односу на контролу ($p < 0.001$). Серумске вредности INF- γ , показују статистички значајну разлику експерименталне и контролне групе, и то како пре хистероскопије ($p < 0.01$), тако и после хистероскопије ($p < 0.05$).

Испитивањем постојања повезаности вредности INF- γ у испирку кавума утеруса и серуму пацијенткиња, показано је да у контролној групи постоји умерена, статистички значајна позитивна корелација вредности INF- γ у испирку и серумских вредности INF- γ после

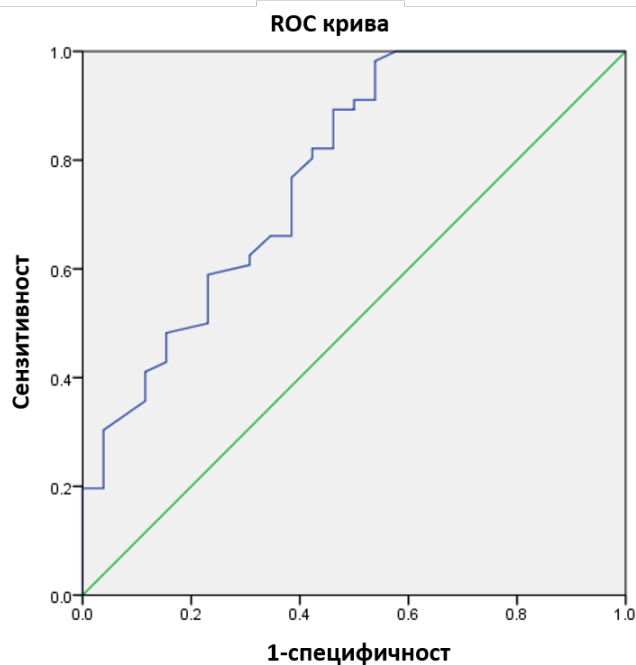
хистероскопије ($r=0.504$; $p<0.01$). Овакав статистички налаз нам имплицира да су вредности INF- γ у испирку и серуму пацијенткиња које нису имале полип, у директној вези, те тако са порастом вредностима INF- γ у серуму расту и вредности INF- γ у испирку кавума утеруса.

Табела 6. Површина испод ROC криве вредности INF- γ у испирку кавума утеруса

Површина	SE	P	95% CI
0.775	0.057	< 0.001	0.663 - 0.887

Легенда: SE – стандардна грешка
 p – вероватноћа
 95% CI – 95-процентни интервал поверења

Графикон 5. ROC крива вредности INF- γ у испирку кавума утеруса



Табела 6. и графикон 5. приказују ROC криву и вредност површине испод криве (ACU), вредности INF- γ у испирку кавума утеруса код пацијенткиња са полипом ендометријума. Површина испод криве је просечна пропорција тачних позитивних резултата, који се добијају равномерно изнад свих могућих пропорција лажно негативних резултата, у распону од 0 до 1. Површина испод криве је износила 0.775 ± 0.057 , са распоном 0.663 - 0.887 за 95%

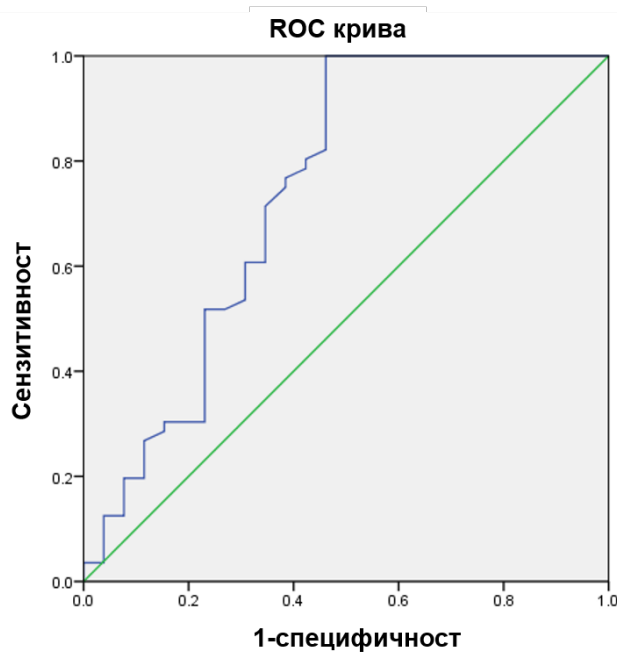
интервала поверења, и врло високо статистички значјно се разликовала од површине испод криве од 0.5. Добијена cut off вредности INF- γ у испирку кавума утеруса износила је 7.92 (pg/ng/ml), док је сензитивност теста за дату cut off вредност износила 98.2% а специфичност теста 46.2%.

Табела 7. Површина испод ROC криве вредности INF- γ у серуму пре интервенције

Површина	SE	P	95% CI
0.739	0.068	< 0.01	0.606 - 0.872

Легенда: SE – стандардна грешка
 p – вероватноћа
 95% CI – 95-процентни интервал поверења

Графикон 6. ROC крива вредности INF- γ у серуму пре интервенције



Табела 7. и графикон 6. приказују ROC криву и вредност површине испод криве (ACU), вредности INF- γ у серуму пре интервенције - хистероскопије код пацијенткиња са полипом ендометријума. Површина испод криве је просечна пропорција тачних позитивних

результата, који се добијају равномерно изнад свих могућих пропорција лажно негативних резултата, у распону од 0 до 1. Површина испод криве је износила 0.739 ± 0.073 , са распонем 0.606 - 0.872 за 95% интервала поверења, и високо статистички значајно се разликовала од површине испод криве од 0.5. Добијена cut off вредности INF- γ у серуму пре интервенције износила је 8.335 (pg/ng/ml), док је сензитивност теста за дату cut off вредност износила 100% а специфичност теста 53.8%.

Дакле, вредности INF- γ су више када постоји полип ендометријума, и то како у испирку кавума утеруса тако и серуму. Вредности INF- γ су више у серуму пацијенткиња у односу на вредности у испирку кавума утеруса, и то како код пацијенткиња код којих постоји полип, тако и код пацијенткиња код којих не постоји полип. Вредности INF- γ у серуму расту након уклањања полипа. Како је вредност површине испод ROC криве (AUC), за вредности INF- γ у испирку, 0.775 указује да добијена cutoff вредност INF- γ у испирку од 7.92 има добру дијагностичку вредност, те уз то што је AUC врло високо статистички значајно већа у односу на AUC 0.5 указује да је ова cut off вредност добар предиктор постојања ендометријалног полипа са високом сензитивности теста и врло ниском специфичности теста. С друге стране, како нам сензитивност теста говори о способности теста да открије болест када она заиста постоји тј. да препозна све болесне особе као болесне, а специфичност теста говори о способности теста да открије не постојање болести када она заиста не постоји тј. да препозна све здраве особе као здраве, те да је тест са високом сензитивности добар као скрининг метод, нарочито код озбиљних и тешких болести нпр. карцином, а да је тест са високом специфичности добар као тест за потврду постојања болести, можемо рећи да вредност INF- γ у испирку кавума од 7.92 и више која има виску сензитивност од 98.2% може бити добар скрининг метод за откривање постојања ендометријалног полипа. С друге стране, вредност површине испод ROC криве (AUC), за вредности INF- γ у серуму пре интервенције, од 0.739 указује да добијена cut off вредност INF- γ у серуму пре интервенције од 8.335 има добру дијагностичку вредност, те уз то што је AUC високо статистички значајно већа у односу на AUC 0.5 указује да је ова cut off вредност добар предиктор постојања ендометријалног полипа са одличном сензитивности теста али лошом специфичности теста.

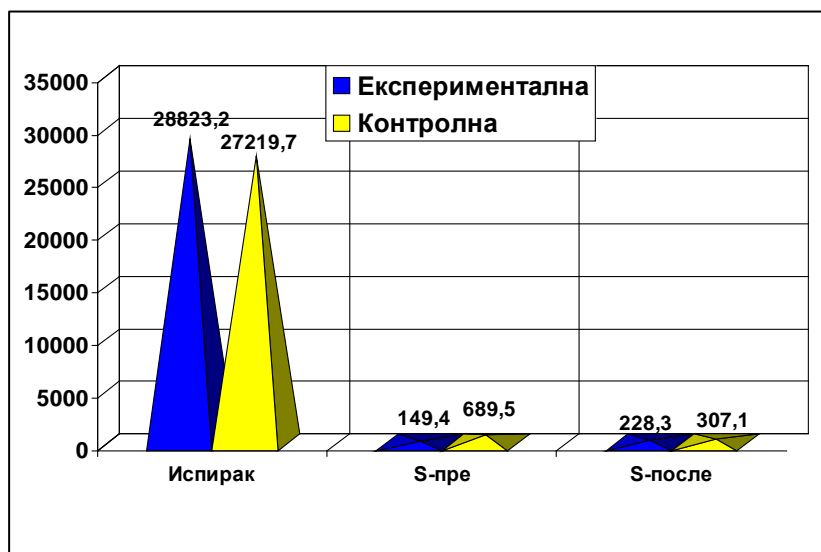
4.1.3. Анализа *Glycodelina* добијена ELISA методом

Табела 8. Вредности *Glycodelina* зависно од групе

Експериментална група	N	SV	SD	Minimum	Maximum
Glycodelin у испирку	56	28823.2	27531.6	4007.6	131403.6
Glycodelin у серуму пре интервенције	31	149.4	181.5	3.8	954.2
Glycodelin у серуму после интервенције	32	228.3	298.9	8.6	1523.0
Контролна група					
Glycodelin у испирку	10	27219.7	24172.6	290.2	84429.1
Glycodelin у серуму пре интервенције	7	689.5	877.1	18.2	2562.2
Glycodelin у серуму после интервенције	8	307.1	286.3	32.6	853.4

Легенда: N – број пацијенткиња
 SV – средња вредност
 SD – стандардна девијација
 Minimum – мнимална измерена вредност
 Maksimum – максимална измерена вредност

Графикон 7. Вредности *Glycodelina* зависно од групе



Табела 8. и графикон 7. приказују вредности Glycodelina у серуму пацијенткиња пре и после хистероскопије, као и у испирку кавума утеруса током хистероскопије, и то у експерименталној и у контролној групи. Како је у табели и графикону приказано, вредности Glycodelina код пацијенткиња са полипом ендометријума (експериментална група) биле су више у односу на вредности код пацијенткиња које нису имале ендометријални полип (контролна група), али само у узорку испирка кавума утеруса, док су серумске вредности Glycodelina биле више у контролној групи, и то како у серуму пре интервенције тако и у серму после интервенције. Такође, вредности Glycodelina у испирку кавума утеруса, биле су значајно више у односу на вредности у серуму, и то како у експерименталној тако и контролној групи. Запажа се да су вредности Glycodelina у серуму пацијенткиња из експерименталне групе, након уклањања полипа порасле у односу на вредности пре интервенције-хистероскопије, што није био случај и у контролној групи, односно и у овој групи је дошло до пада вредности Glycodelina у серуму пацијенткиња након хистероскопије.

Статистичком обрадом података, приказаних у табели 8. и графикону 7., показано је да постоји статистички значајна разлика вредности Glycodelina у испирку кавума утеруса, код пацијенткиња из експерименталне групе ($p < 0.001$). Такође, серумске вредности Glycodelina, код пацијенткиња из експерименталне групе, показују статистички значајну разлику, и то како пре интервенције ($p < 0.001$), тако и након интервенције ($p < 0.001$). У контролној групи, вредности Glycodelina показују статистички значајну разлику, како у испирку кавума утеруса ($p < 0.01$), тако и у серуму пацијенткиња после хистероскопије ($p < 0.05$), док серумске вредности Glycodelina пре хистероскопије не показују статистички значајну разлику ($p > 0.05$).

У експерименталној групи, анализом варијансе показано је постојање статистички значајне разлике између вредности Glycodelina детектованих у испирку кавума утеруса, серуму пацијенткиња пре интервенције и серуму пацијенткиња после интервенције ($p < 0.001$). У истој групи пацијенткиња, применом т-пар теста показано је постојање статистички значајне разлике између вредности Glycodelina детектованих у испирку кавума утеруса и серуму

пацијенткиња пре интервенције ($p < 0.001$), као и између вредности Glycodelina детектованих у испирку кавума утеруса и серуму пацијенткиња после интервенције ($p < 0.001$), док серумске вредности Glycodelina пре и после интервенције не показују статистички значајну разлику ($p > 0.05$).

У контролној групи, анализом варијансе показано је постојање статистички значајне разлике између вредности Glycodelina детектованих у испирку кавума утеруса, серуму пацијенткиња пре хистероскопије и серуму пацијенткиња после интервенције ($p < 0.001$). У истој групи пацијенткиња, применом т-пар теста, показано је постојање статистички значајне разлике између вредности Glycodelina детектованих у испирку кавума утеруса и серуму пацијенткиња како пре хистероскопије ($p < 0.01$) тако и после хистероскопије ($p > 0.05$). Серумске вредности Glycodelina пре и после хистероскопије не показују статистички значајну разлику ($p > 0.05$).

У експерименталној групи детектоване су веће вредности Glycodelina у испирку кавума утеруса у односу на контролу, али те вредности нису показале статистички значајну разлику ($p > 0.05$). Серумске вредности Glycodelina, не показују статистички значајну разлику експерименталне и контролне групе, и то како пре хистероскопије ($p > 0.05$), тако ни после хистероскопије ($p > 0.05$).

Испитивањем постојања повезаности вредности Glycodelina у испирку кавума утеруса и серму пацијенткиња, показано је да у експерименталној групи постоји умерена, статистички значајна позитивна корелација вредности Glycodelina у испирку и серумских вредности glycodelina пре хистероскопије ($r = 0.486$; $p < 0.01$). Овакав статистички налаз нам имплицира да код пацијенткиња са полипом ендометријума, вредности Glycodelina у испирку кавума утеруса прате вредности у серуму, те да са порастом вредности Glycodelina у испирку расту и његове вредности у серуму.

Табела 9. Површина испод ROC криве вредности Glycodelina у испирку кавума утеруса

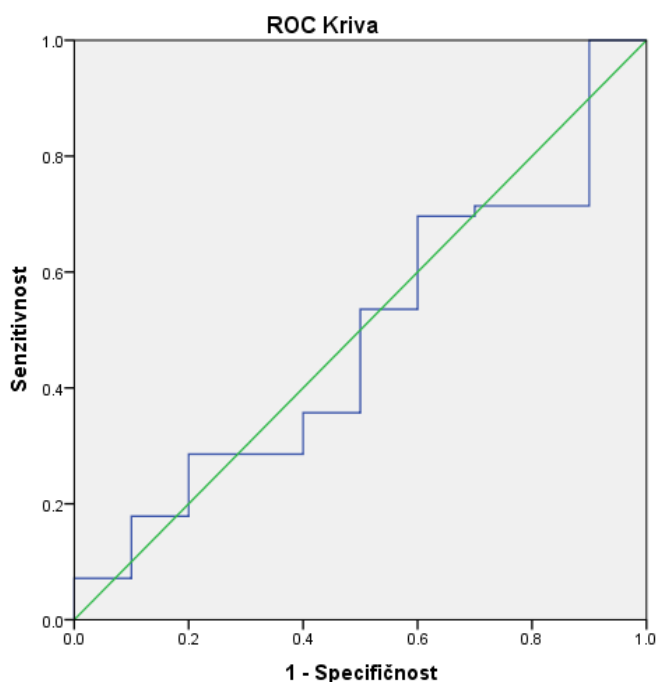
Површина	SE	p	95% CI
0.484	0.098	> 0.05	0.292 - 0.676

Легенда: SE – стандардна грешка

p – вероватноћа

95% CI – 95-процентни интервал поверења

Графикон 8. ROC крива вредности Glycodelina у испирку кавума утеруса



Табела 9. и графикон 8. приказују ROC криву и вредност површине испод криве (ACU), вредности Glycodelina у испирку кавума утеруса код пацијенткиња са полипом ендометријума. Површина испод криве је просечна пропорција тачних позитивних резултата, који се добијају равномерно изнад свих могућих пропорција лажно негативних резултата, у распону од 0 до 1. Површина испод криве је износила 0.484 ± 0.098 , са распонем 0.292 - 0.676 за 95% интервала поверења, и није се статистички значајно разликовала од површине испод криве од 0.5. Добијена cutoff вредности Glycodelina у испирку кавума утеруса од 11775.51 (pg/mol), није од значаја, јер је површина испод ROC криве мања од 0.5 те указује да тест није употребљив као скрининг метод.

Табела 10. Површина испод ROC криве вредности Glycodelina у серуму пре интервенције

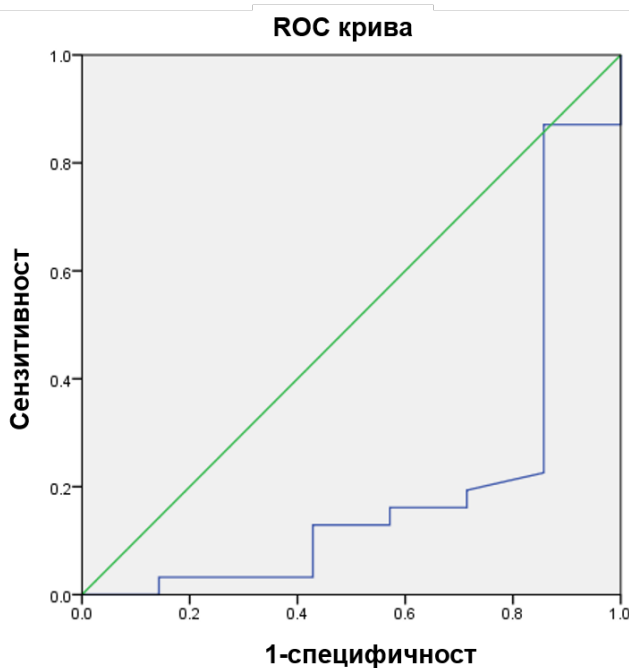
Површина	SE	p	95% CI
0.205	0.113	< 0.05	0.000 - 0.426

Легенда: SE – стандардна грешка

p – вероватноћа

95% CI – 95-процентни интервал поверења

Графикон 9. ROC крива вредности Glycodelina у серуму пре интервенције



Табела 10. и графикон 9. приказују ROC криву и вредност површине испод криве (ACU), вредности Glycodelina у серуму пре интервенције-хистероскопије код пацијенткиња са полипом ендометријума. Површина испод криве је просечна пропорција тачних позитивних резултата, који се добијају равномерно изнад свих могућих пропорција лажно негативних резултата, у распону од 0 до 1. Површина испод криве је износила 0.205 ± 0.113 , са распоном 0.000 - 0.426 за 95% интервала поверења, и статистички значајно се разликовала од површине испод криве од 0.5. Добијена cut off вредности Glycodelina у серуму пре

интервенције износила је 201.8 (pg/mol), док је сензитивност теста за дату cut off вредност износила свега 28.6%, док је специфичност теста износила 85.7%.

4.2. Анализа резултата INF- γ добијени методом имунохистохемије

У овом поглављу биће представљени резултати експресије цитокина (*TNF – α* , *INF – γ* , *Glycodelin*) у ткиву полипа и ткиву ендометријума посматрани под микроскопом под различитим увећањем.

4.2.1. Анализа експресије INF- γ

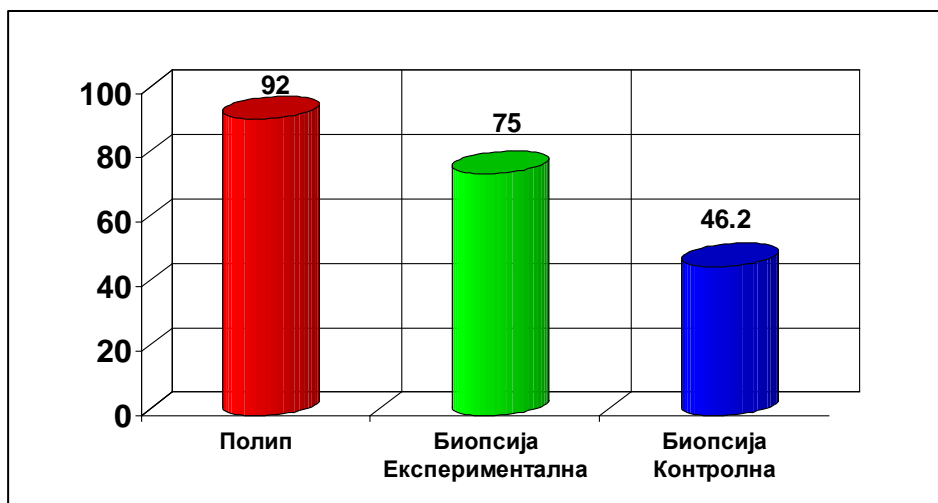
Табела 11. Имунохистохемијска експресија INF- γ зависно од групе

Експериментална група	N	%
Полип	43	92
Биопсија ендометријума	36	72
Контролна група		
Биопсија ендометријума	12	46.2

Легенда: N – број пацијенткиња

% – процентуално изражен број пацијената

Графикон 10. Имунохистохемијска експресија $INF-\gamma$ зависно од групе



Табела 11. и графикон 10. приказују (имунохистохемијску) INH експресију $INF-\gamma$ у полипу и ендометријуму пацијенткиња експерименталне групе, и ендометријуму пацијенткиња из контролне групе. Како је у табели 10. и графикону 10. приказано, експресија $INF-\gamma$ регистрована је у полипу 43 (92%) пацијенткиње експерименталне групе. У истој групи пацијенткиња, експресија $INF-\gamma$ регистрована је код 36 (72%) пацијенткиња у биоптату ендометријума, док је то био случај нешто мање од половине пацијенткиња ($N=12$; 46.2%) из контролне групе. Важно је запазити, да је највећа експресија $INF-\gamma$ забележена у експерименталној групи инфертилних пацијенткиња са ендометријалним полипом, у којој је чак код 92% пацијенткиња, имунохистохемијски регистрована експресија $INF-\gamma$ у полипу ендометријума.

Статистичком обрадом података приказаних у табели 11. и графикону 10., нађено је да је врло високо статистички значајно више пацијенткиња, из експерименталне групе, у полипу имало INH експресију $INF-\gamma$ ($\chi^2=25.920$; $p<0.001$). У истој групи пацијенткиња, у биоптату ендометријума, код високо статистички значајно већег броја пацијенткиња регистрована је INH експресија $INF-\gamma$ ($\chi^2=9.680$; $p<0.01$). У контролној групи инфертилних пацијенткиња, без присуства ендометријалног полипа, није нађена статистички значајна разлика INH експресије $INF-\gamma$ у биоптату ендометријума ($\chi^2=0.000$; $p>0.05$).

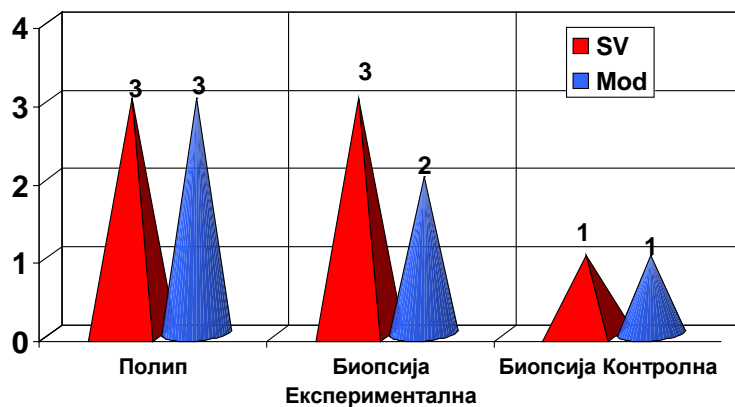
С друге стране, када смо упоредили ИИИ експресију INF- γ између полипа и биоптата ендометријума, пацијенткиња са ендометријалним полипом (експериментална група), није нађена статистички значајна разлика ИИИ експресије INF- γ ($Z=-1.941$; $p>0.05$). ИИИ експресија INF- γ у полипу експерименталне групе и биоптату контролне групе, показује врло високо стстистички значјну разлику ($\chi^2=19.599$; $p<0.001$), док између биоптата ендометријума експерименталне групе, и биоптата ендометријума контролне групе, показује статистички значајну разлику ($\chi^2=4.830$; $p<0.05$).

Табела 12. Скор ИИИ експресије INF- γ зависно од групе

Експериментална група	SV	SD	Mod
Полип	3.0	1.0	3
Биопсија ендометријума	3.0	2.0	2
Контролна група			
Биопсија ендометријума	1	0.5	1

Легенда: SV – средња вредност
SD – стандардна девијација
Mod – најчесталији појављивању

Графикон 11. Скор ИИИ експресије INF- γ зависно од групе



Табела 12. и графикон 11. приказују скор имунохистохемијске експресије интерферона гама (INF- γ) у полипу и ендометријуму пацијеткиња експерименталне групе и ендометријуму пацијеткиња из контролне групе. Како је у табели 1. и графикону 11. приказано, средња вредност скорa ИИИ експресије INF- γ у полипу и ендометријуму инфертилних пацијеткиња из експерименталне групе, би је идентичан (СВ=3), док је модална вредност, ИИИ експресије INF- γ , у полипу, била већа (Мод=3), у однос на модалну вредност (Мод=2) ИИИ експресије INF- γ , у биоптату ендометријума пацијеткиња из експерименталне група. Модална вредност, ИИИ експресије INF- γ у биоптату ендометријума, контролне групе, била је најнижа, и износила је 1. Морамо нагласити, да је средња вредност приказана заокруживањем добијене средње вредности, из разлога што скор ИИИ експресије INF- γ , претставља искључиво цео број, и може се кретати од 0 до 6.

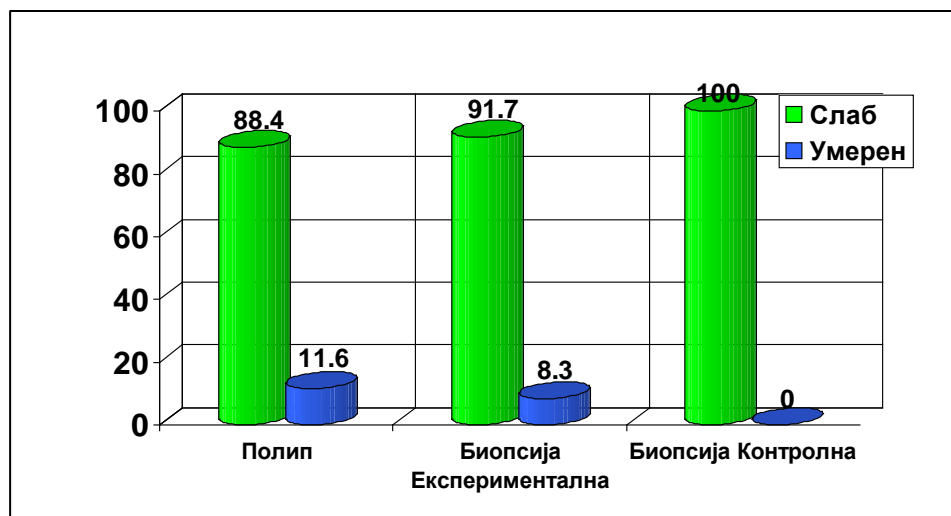
Статистичком обрадом података приказаних у табели 12. и графикону 11., нађена је статистички значајна разлика скорa ИИИ експресије INF- γ , између полипа и биоптата ендометријума, у експерименталној групи ($t=2.323$; $p<0.05$). С друге стране, скор ИИИ експресије INF- γ , у биоптату ендометријума контролне групе, био је врло високо статистички значајно нижи у односу на скор ИИИ експресије INF- γ , како у полипу, тако и у биоптату ендометријума експерименталне групе пацијеткиња ($t=-12.649$; $p<0.001$).

Табела 13. Интензитет сигнала ИИИ експресије INF- γ зависно од групе

Експериментална група	Слаб сигнал	Умерен сигнал
	(%)	(%)
Полип	88.4	11.6
Биопсија ендометријума	91.7	8.3
Контролна група		
Биопсија ендометријума	100.0	0.0

Легенда: Интензитет сигнала: слаб сигнал, умерен сигнал

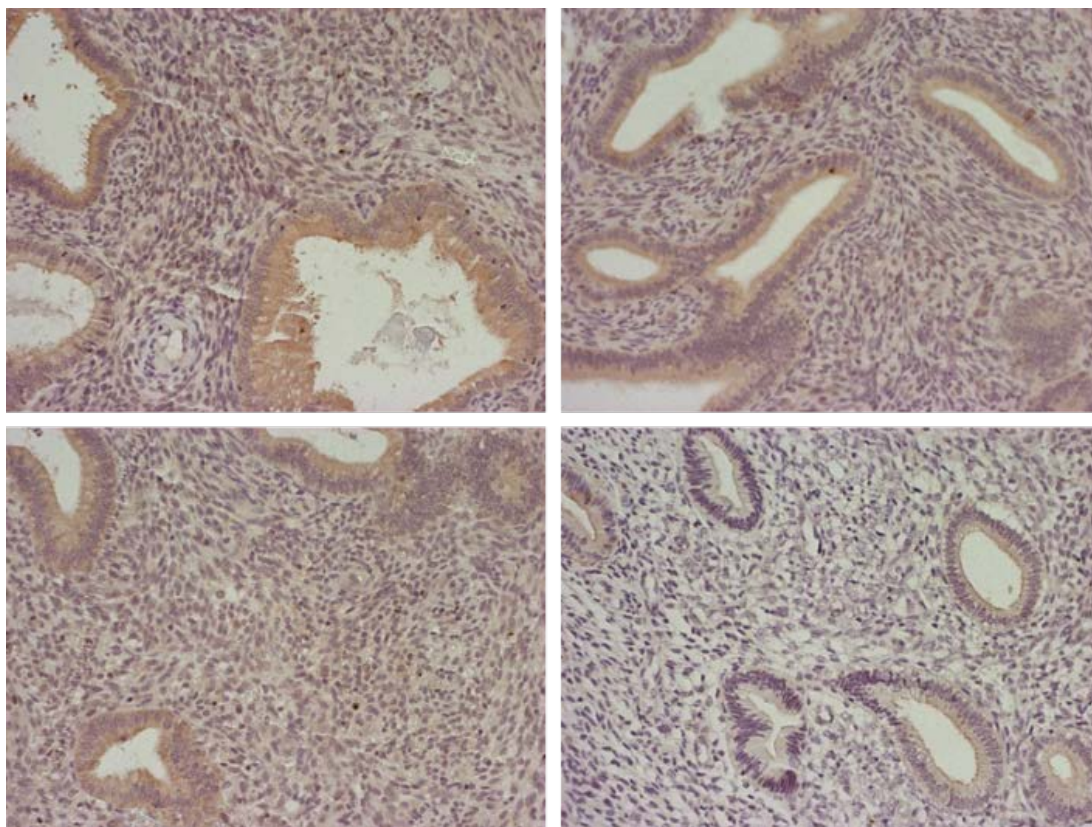
Графикон 12. Интензитет сигнала ИИИ експресије INF- γ зависно од групе



Табела 13. и графикон 12. приказују интензитет сигнала имунохистохемијске експресије интерферона гама (INF- γ) у полипу и ендометријуму пацијенткиња експерименталне групе, и ендометријуму пацијенткиња из контролне групе. Како је у табели 13. и графикону 12. приказано, како у полипу, тако и у биоптату ендометријума пацијенткиња експерименталне групе и биоптату ендометријума пацијенткиња контролне групе, највећи број њих, код којих је забележена ИИИ експримиација, показују слаб интензитет ИИИ сигнала INF- γ . Наведен је био случај и код 88,4% пацијенткиња из експерименталне групе, у полипу а у 91,7% случајева у биоптату ендометријума. У контролној групи, код свих пацијенткиња (100%), код којих је забележена експресија INF- γ , ИИИ сигнал је био слабог интензитета.

Статистичком обрадом података приказаних у табели 13. и графикону 12., нађена је врло високо статистички значајна разлика интензитета сигнала ИИИ експресије INF- γ како у полипу ($\chi^2=25.326$; $p<0.001$), тако и у и биоптата ендометријума експерименталне групе ($\chi^2=25.000$; $p<0.001$). У контролној групи, био је исти случај. Наиме, нађена је врло високо статистички значајна разлика интензитета сигнала ИИИ експресије INF- γ у биоптату ендометријума, тачније врло високо статистички значајно чешће је регистрован слаб сигнал у односу на умерени интензитет сигнала ($\chi^2=21.160$; $p<0.001$). С друге стране, дистрибуција интензитета сигнала ИИИ експресије INF- γ , није се статистички значајно разликовала између

полипа и ендометријума, у експерименталној групи ($Z = -6.447$; $p > 0.005$), нити између полипа експерименталне групе и биопсије контролне групе ($\chi^2 = 3.204$; $p > 0.05$), као ни између биопсије ендометријума експерименталне групе и биопсије ендометријума контролне групе ($\chi^2 = 2.231$; $p > 0.05$). На слици 9 је представљен микроскопски приказ интензитета сигнала ИИИ експресије $INF-\gamma$ у полипу ендометријума са увећањем од 10 пута.



Слика 9. Полип ендометријума $INF-\gamma$ (увећање 10x)

Табела 14. Корелације INF- γ у Експерименталној групи

		ИНН Скор – полип ендометријума	Експресија - биопсија ИНН ендометријума	Скор – биопсија ИНН ендометријума
ИНН Скор – биопсија ендометријума	R	0.448		
	P	0.001		
Испирак кавума ELISA	R		0.292	0.300
	P		0.05	0.05
Серум – после ELISA	R	0.297		
	P	0.05		

Легенда: r – коефицијент Spearman-ове корелације
p – вероватноћа

Табела 14. приказује корелацијску повезаност параметара ИНН експресије INF- γ и вредности INF- γ у испирку кавума утеруса и серуму пре и после полипектомије, код пацијенткиња из експерименталне групе. Како је у табели приказано, најјачу корелацију ($r=0.448$) показује скор ИНН експресије INF- γ у полипу са скором експресије INF- γ у биоптату ендометријума, ова позитивна корелацијска повезаност је врло високо статистички значајна ($p<0.001$), да код виших вредности скорa ИНН експресије INF- γ у полипу очекујемо и више вредности скорa ИНН експресије INF- γ у ендометријуму. Такође, нађена је и статистички значајна ($p<0.05$) позитивна корелацијска повезаност вредности скорa ИНН експресије INF- γ у биоптату ендометријума и вредности INF- γ у испирку кавума утеруса. С друге стране, нађена је и статистички значајна ($p<0.05$) позитивна корелацијска повезаност вредности скорa ИНН експресије INF- γ у полипу ендометријума и вредности INF- γ у серуму после полипектомије, што значи да када су више вредности скорa ИНН експресије INF- γ у ендометријалном полипу, након полипектомије очекујемо и више вредности INF- γ у серуму. Статистички значајну позитивну корелацијску повезаност показује постојање ИНН експресије INF- γ у ендометријуму са вредностима INF- γ у испирку кавума утеруса, што нам указује да када се у испирку кавума утеруса детектују више вредности INF- γ , имунохистохемијски можемо доказати постојање експресије INF- γ у ендометријуму.

У контролној групи пацијенткиња са инфертилитетом нису нађене корелацијске повезаности ИНН експресије INF- γ у полипу и биоптату ендометријума са вредностима INF- γ у серуму и испирку

кавума утеруса. У експерименталној групи, као ни у контролној групи, нису нађене статистички значајне корелацијске повезаности, других испитиваних параметара (TNF- α и Glycodelin).

4.2.2. Анализа експресије TNF- α

Табела 15. Имунохистохемијска експресија TNF- α зависно од групе

Експериментална група	N	%
Полип	11	22
Биопсија ендометријума	4	8
Контролна група		
Биопсија ендометријума	1	3.8

Легенда: N – број пацијенткиња

% – процентуално изражен број пацијената

Графикон 13. Имунохистохемијска експресија TNF- α зависно од групе



Табела 15. и графикон 13. приказују имунохистохемијску (ИНН) експресију фактора туморске некрозе алфа (TNF- α) у полипу и ендометријуму пацијенткиња експерименталне групе, и ендометријуму пацијенткиња из контролне групе. Како је у табели 15. и графикону 13. приказано, експресија TNF- α регистрована је у полипу 11 (22%) пацијенткиње експерименталне групе. У истој групи пацијенткиња, експресија TNF- α регистрована је код 4 (8%) пацијенткиња у биоптату ендометријума, док је то био случај код само једне пацијенткиње (N=1; 3.8%) из контролне групе. Важно је запазити, да вићи број пацијенткиња из експерименталне групе не показује експресију TNF- α , ито израженије у биоптату ендометријума него у полипу. Такође, експресија TNF- α је била заступљенија забележена у експерименталној групи инфертилних пацијенткиња са ендометријалним полипом, него у контролној групи инфертилних пацијенткиња без присуства ендометријалног полипа.

Статистичком обрадом података приказаних у табели 15. и графикону 13., нађено је да је врло високо статистички значајно више пацијенткиња, из експерименталне групе, у полипу није имало ИНН експресију TNF- α ($\chi^2=15.680$; $p<0.001$). У биоптату ендометријума. исте групе (експериментална) врло високо статистички значајно већи број пацијенткиња не показује ИНН експресија TNF- α ($\chi^2=31.280$; $p<0.001$). У контролној групи инфертилних пацијенткиња, без присуства ендометријалног полипа, такође је нађено врло високо статистички значајно више пацијенткиња код којих није било ИНН експресије TNF- α у биоптату ендометријума и односу на број пацијенткиња код којих је нађена ИНН експресија TNF- α у биоптату ендометријума ($\chi^2=22.154$; $p<0.001$).

С друге стране, када смо упоредили ИНН експресију TNF- α између полипа и биоптата ендометријума, пацијенткиња са ендометријалним полипом (експериментална група), нађена је статистички значајна разлика ИНН експресије TNF- α ($Z=-2.333$; $p<0.05$) Наиме, од 11 пацијенткиња код којих је, у полипу, нађена TNF- α експресија, код 8 пацијенткиња, експресија TNF- α , је била само у полипу, код 1 пацијенткиње само у биоптату ендометријума, а код 2 пацијенткиње, и у полипу и у биоптату ендометријума.

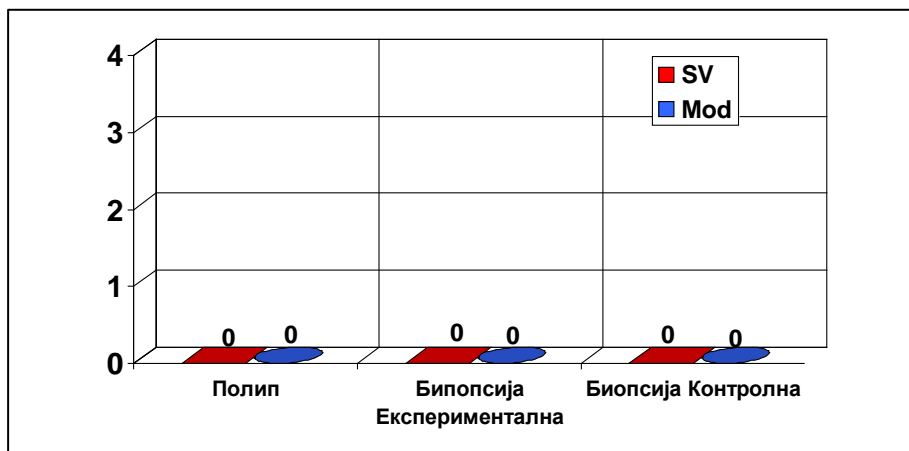
ИИИ експресија TNF- α у полипу експерименталне групе и биоптату контролне групе, показује статистички значјну разлику ($\chi^2=4.209$; $p<0.05$), док између биоптата ендометријума експерименталне групе, и биоптата ендометријума контролне групе, не показује статистички значајну разлику ($\chi^2=0.486$; $p>0.05$)

Табела 16. Скор ИИИ експресије TNF- α зависно од групе

Експериментална група	SV	SD	Mod
Полип	0	0.5	0
Биопсија ендометријума	0	0.6	0
Контролна група			
Биопсија ендометријума	0	0.5	0

Легенда: SV – средња вредност
SD – стандардна девијација
Mod – најучесталији појављивању

Графикон 14. Скор ИИИ експресије TNF- α зависно од групе



Табела 16. и графикон 14. приказују скор имунохистохемијске експресије фактора некрозе тумора (TNF- α) у полипу и ендометријуму пацијеткиња експерименталне групе, и ендометријуму пацијеткиња из контролне групе. Како је у табели 16. и графикону 14. приказано, средња вредност скорa ИИН експресије TNF- α у полипу и ендометријуму инфертилних пацијеткиња из експерименталне групе, као и биоптату ендометријум из контролне групе, је био идентичан (СВ=0). Исти случај је био и са модалном вредности, ИИН експресије TNF- α , које је била такође идентична (Мод=0). Морамо нагласити, да је средња вредност приказана заокруживањем добијене средње вредности, из разлога што скор ИИН експресије TNF- α , претставља искључиво цео број, и може се кретати од 0 до 6.

Статистичком обрадом података приказаних у табели 16. и графикону 14., није нађена статистички значајна разлика скорa ИИН експресије TNF- α , између полипа и биоптата ендометријума, у експерименталној групи ($t=0.771$; $p>0.05$).

Табела 17. Интензитет сигнала ИИН експресије TNF- α зависно од групе

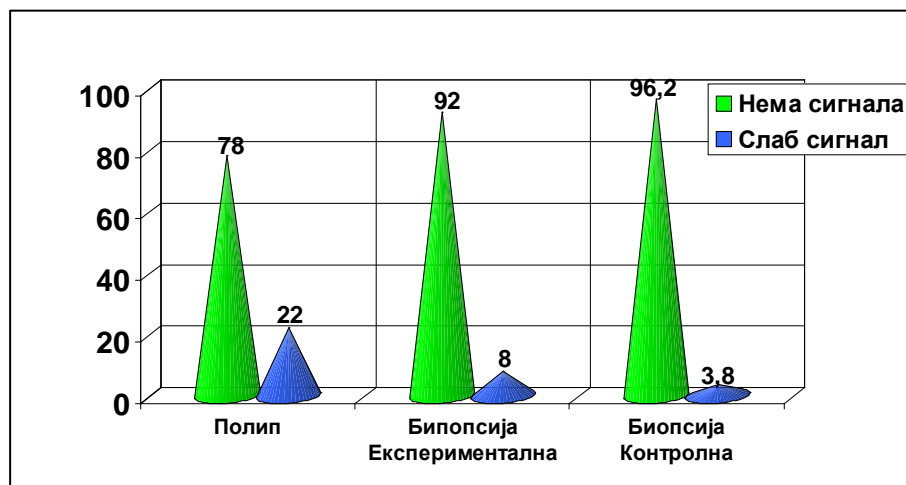
Експериментална група	Нема сигнала (%)	Слаб сигнал (%)
Полип	78	22
Биопсија ендометријума	92	8
Контролна група		
Биопсија ендометријума	96.2	3.8

Легенда: Интензитет сигнала: нема сигнала, слаб сигнал

Скор ИИН експресије TNF- α , у биоптату ендометријума контролне групе, и скор ИИН експресије TNF- α у полипу експерименталне групе се статистички значајно разликовао ($t=2.572$; $p<0.05$), мора се нагласити да је ова статистичка значајност последица чињенице да је у контролној групи (N=26) забележен само један узорак биоптата ендометријума са скором који је износио 1. Скор ИИН експресије TNF- α , у биоптату ендометријума контролне

групе, и скор ИИИ експресије TNF- α у биоптату ендометријума експерименталне групе се није статистички значајно разликовао ($t=1.405$; $p>0.05$).

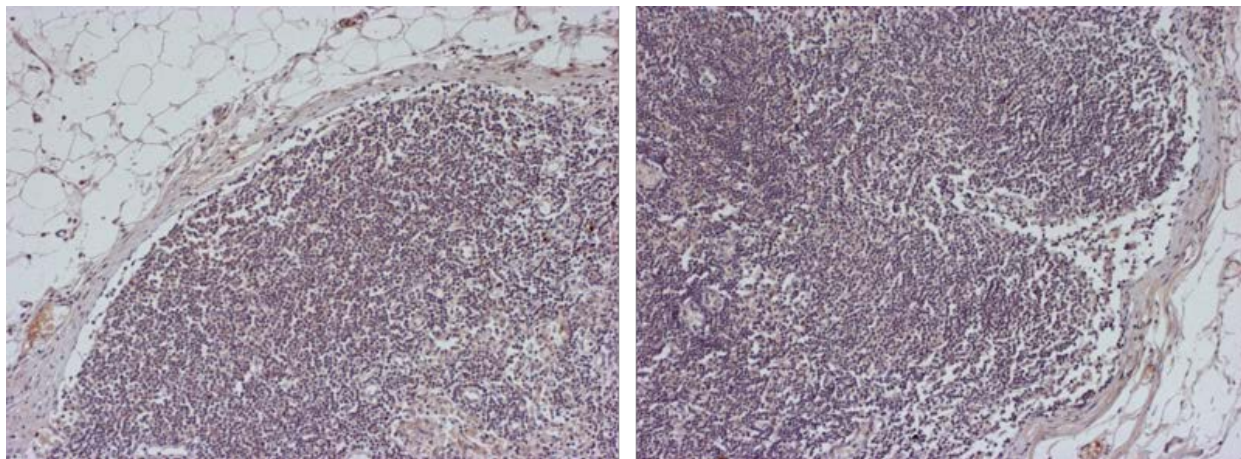
Графикон 15. Интензитет сигнала ИИИ експресије TNF- α зависно од групе



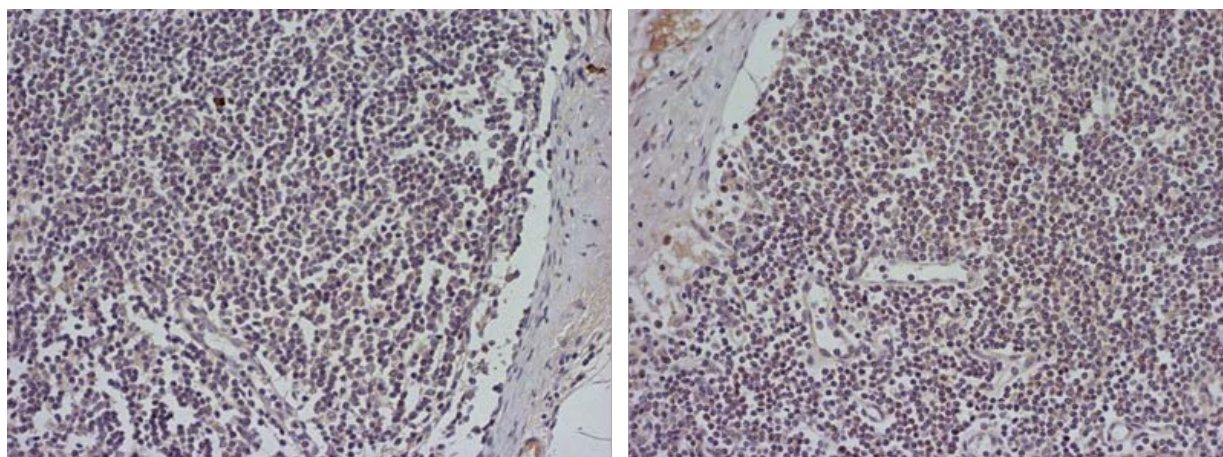
Табела 17. и графикон 15. приказују интензитет сигнала имунохистохемијске експресије фактора туморске некрозе алфа (TNF- α) у полипу и ендометријуму пацијеткиња експерименталне групе, и ендометријуму пацијеткиња из контролне групе. Како је у табели и графикону приказано, како у полипу, тако и у биоптату ендометријума пацијеткиња експерименталне групе и биоптату ендометријума пацијеткиња контролне групе, код највећег броја њих, није забележен ИИИ сигнал експресије TNF- α . Наведено је био случај и код 78% пацијеткиња у полипу, и 92% случајева у биоптату ендометријума, експерименталне групе. У контролној групи, код само 3.8% пацијеткиња забележен је слаб интензитет ИИИ сигнала експресија TNF- α .

Статистичком обрадом података приказаних у табели 17. и графикону 15., нађена је врло високо статистички значајна разлика интензитета сигнала ИИИ експресије ИИИ како у полипу ($\chi^2=15.680$; $p<0.001$), тако и у и биоптата ендометријума експерименталне групе ($\chi^2=35.280$; $p<0.001$). У контролној групи, био је исти случај. Наиме, нађена је врло високо статистички значајна разлика интензитета сигнала ИИИ експресије TNF- α у биоптату

ендометријума, тачније врло високо статистички значајно чешће није регистрован сигнал у односу на слаб интензитет сигнала ($\chi^2=25.154$; $p<0.001$). С друге стране, дистрибуција интензитета сигнала ИИИ експресије TNF- α , се статистички значајно разликовала између полипа и ендометријума, у експерименталној групи ($Z= -2.333$; $p>0.05$). С друге стране, интензитет ИИИ експресија TNF- α у полипу експерименталне групе и биоптату контролне групе, показује статистички значјну разлику ($\chi^2=4.209$; $p<0.05$), док између биоптата ендометријума експерименталне групе, и биоптата ендометријума контролне групе, не показује статистички значајну разлику интензитета сигнала ИИИ експресије TNF- α ($\chi^2=0.486$; $p>0.05$). На слици 10. и слици 11. су представљени микроскопски прикази интензитета сигнала ИИИ експресије TNF- α у ендометријуму контролне групе са увећањем од 100 пута и 200 пута, респективно.



Слика10. Контрола ендометријума TNF- α (увећање 100x)



Слика11. Контрола ендометријума TNF- α (увећање 200x)

4.2.3. Анализа експресије Glycodelina

Табела 18. Имунохистохемијска експресија Glycodelina зависно од групе

Експериментална група	N	%
Полип	9	18
Биопсија ендометријума	1	2
Контролна група		
Биопсија ендометријума	1	3.8

Легенда: N – број пацијенткиња

% – процентуално изражен број пацијената

Графикон 16. Имунохистохемијска експресија Glycodelina зависно од групе



Табела 18. и графикон 16. приказују имунохистохемијску (ИИИ) експресију фактора Glycodelina у полипу и ендометријуму пацијеткиња експерименталне групе, и ендометријуму пацијенткиња из контролне групе. Како је у табели 18. и графикону 16. приказано,

експресија Glycodelina регистрована је у полипу 9 (18%) пацијенткиње експерименталне групе. У истој групи пацијенткиња, експресија Glycodelina регистрована је код само једне пацијенткиња (2%) у биоптату ендометријума, што је био случај и код само једне пацијенткиње (N=1; 3.8%) из контролне групе. Важно је запазити, да већи број пацијенткиња из експерименталне групе не показује експресију Glycodelina, и то израженије у биоптату ендометријума него у полипу.

Статистичком обрадом података приказаних у табели 18., и графикону 16., нађено је да врло високо статистички значајно више пацијенткиња, из експерименталне групе, у полипу није имало ИНН експресију Glycodelina ($\chi^2=20.480$; $p<0.001$). У биоптату ендометријума. исте групе (експериментална) врло високо статистички значајно већи број пацијенткиња не показује ИНН експресија Glycodelina ($\chi^2=46.080$; $p<0.001$). У контролној групи инфертилних пацијенткиња, без присуства ендометријалног полипа, такође је нађено врло високо статистички значајно више пацијенткиња код којих није било ИНН експресије Glycodelina у биоптату ендометријума и односу на број пацијенткиња код којих је нађена ИНН експресија Glycodelina у биоптату ендометријума ($\chi^2=22.154$; $p<0.001$).

С друге стране, када смо упоредили ИНН експресију Glycodelina између полипа и биоптата ендометријума, пацијенткиња са ендометријалним полипом (експериментална група), нађена је статистички значајна разлика ИНН експресије Glycodelina ($Z=-2.530$; $p<0.05$). Наиме, од 10 пацијенткиња код којих је, у полипу и ендометријуму, нађена експресија Glycodelina, код 9 пацијенткиња, експресија Glycodelina, је била само у полипу, а код 1 пацијенткиње само у биоптату ендометријума.

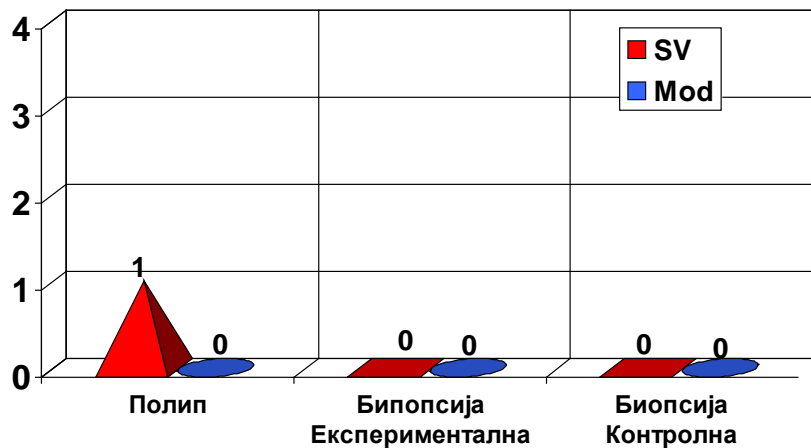
ИНН експресија Glycodelina у полипу експерименталне групе и биоптату контролне групе, не показује статистички значјну разлику ($Z=-1.720$; $p>0.05$). Исти случај је био и између биоптата ендометријума експерименталне групе, и биоптата ендометријума контролне групе, који не показују статистички значајну разлику ИНН експресије Glycodelina ($Z=-0.474$; $p>0.05$)

Табела 19. Скор ИНН експресије Glycodelina зависно од групе

Експериментална група	SV	SD	Mod
Полип	1	2	0
Биопсија ендометријума	0	0	0
Контролна група			
Биопсија ендометријума	0	0	0

Легенда: SV – средња вредност
 SD – стандардна девијација
 Mod – најчесталији појављивању

Графикон 17. Скор ИНН експресије Glycodelina зависно од групе



Табела 19. и графикон 17. приказују скор имунохистохемијске експресије Glycodelina у полипу и ендометријуму пацијенткиња експерименталне групе, и ендометријуму пацијенткиња из контролне групе. Како је у табели 19. и графикону 17. приказано, средња вредност скора ИНН експресије Glycodelina у полипу је износила 1, док је најчесталија вредност (Мод) била 0. Потребно је нагласити да је од 9 пацијенткиња код којих је полип показивао експресију Glycodelina, њих 3 имало скор ИНН експресије 2, по једна пацијенткиња су имале скор 3 и 6, а по две пацијенткиње су имале скор 4 и 5. С друге стране, само једна пацијенткиња, из експерименталне групе, код које је забележена ИНН експресија Glycodelina у биоптату ендометријума, имала је скор 1, што је био случај и са

једном пацијенткињом из контролне група. И у контролној групи и у случају биоптата ендометријума експерименталне групе. модална вредност скорa експресије Glycodelina, износила је 0.

Статистичком обрадом података приказаних у табели 19. и графикону 17., нађена је високо статистички значајна разлика скорa ИНН експресије Glycodelina, између полипа и биоптата ендометријума, у експерименталној групи ($t=2.898$; $p<0.01$).

Скор ИНН експресије Glycodelina, у биоптату ендометријума контролне групе, и скор ИНН експресије Glycodelina у полипу експерименталне групе се високо статистички значајно разликовао ($t=2.899$; $p<0.01$).

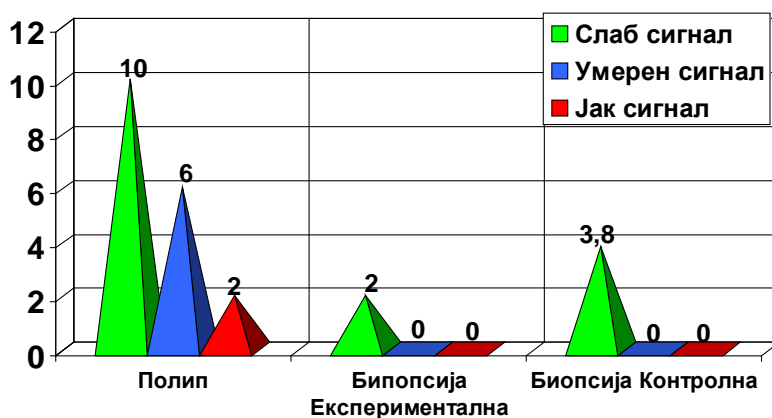
Скор ИНН експресије Glycodelina, у биоптату ендометријума контролне групе, и скор ИНН експресије Glycodelina у биоптату ендометријума експерименталне групе се није статистички значајно разликовао ($t=-0.479$; $p>0.05$).

Табела 20. Интензитет сигнала ИНН експресије Glycodelina зависно од групе

Експериментална група	Слаб сигнал (%)	Умерен сигнал (%)	Јак сигнал (%)
Полип	10	6	2
Биопсија ендометријума	2	0	0
Контролна група			
Биопсија ендометријума	3.8	0	0

Легенда: Интензитет сигнала: слаб сигнал, умерен сигнал, јак сигнал.

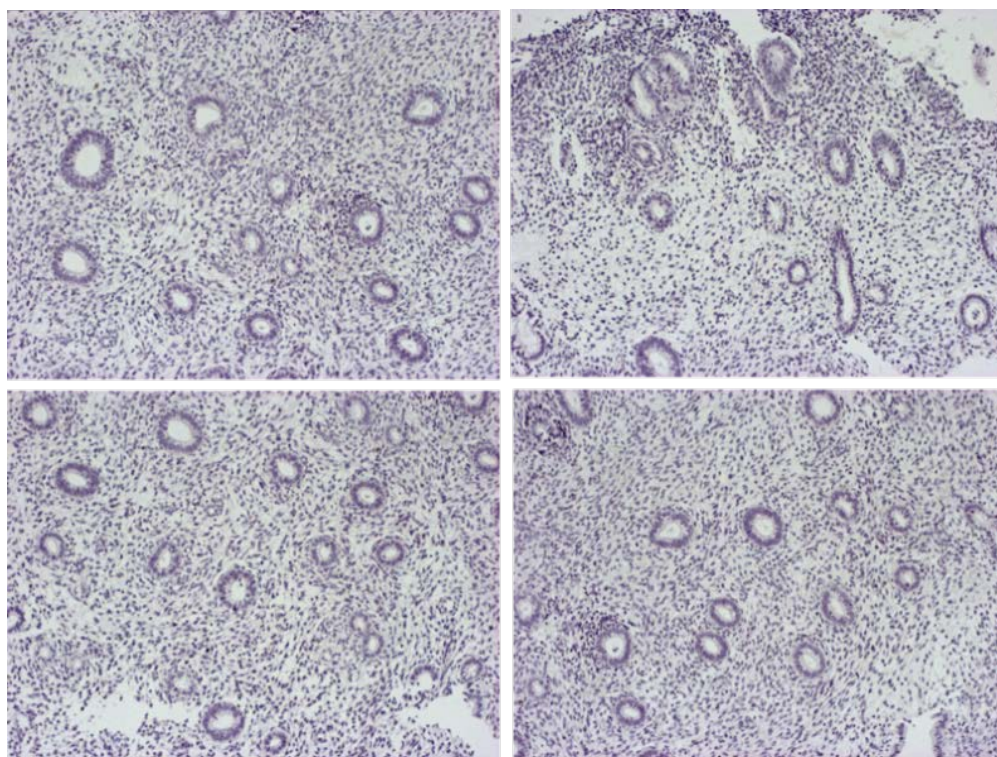
Графикон 18. Интензитет сигнала ИНН експресије Glycodelina зависно од групе



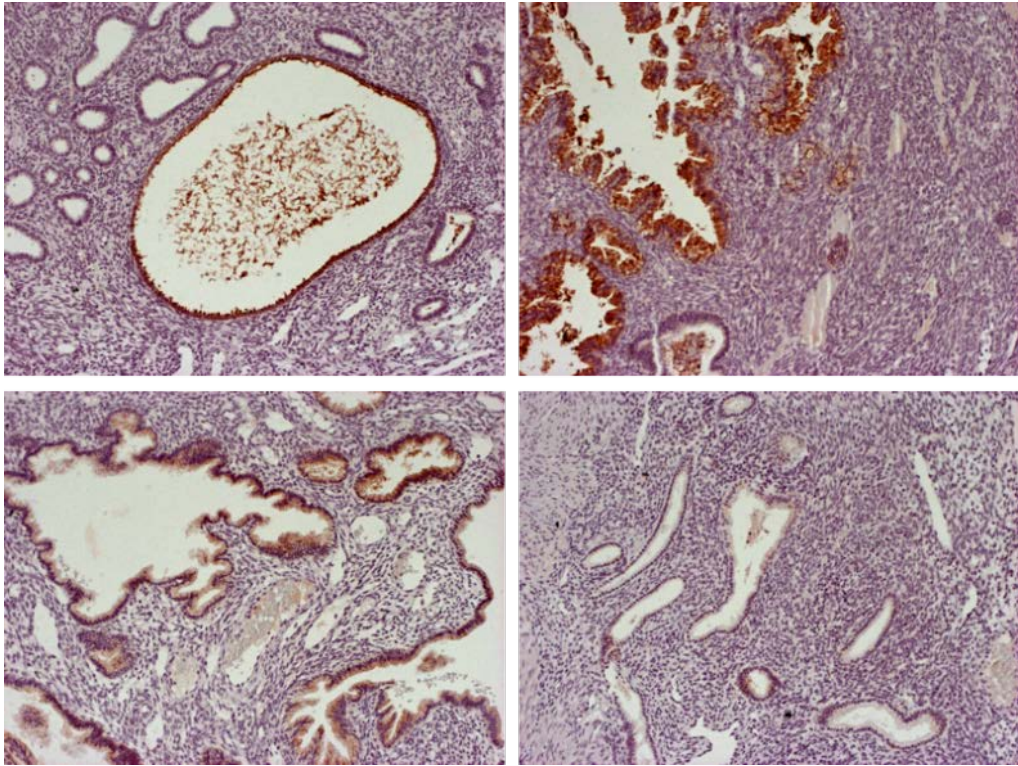
Табела 20. и графикон 18. приказују интензитет сигнала имунохистохемијске експресије Glycodelina у полипу и ендометријуму пацијенткиња експерименталне групе, и ендометријуму пацијенткиња из контролне групе. Како је у табели 20. и графикону 18. приказано, како у полипу, тако и у биоптату ендометријума пацијенткиња експерименталне групе и биоптату ендометријума пацијенткиња контролне групе, код највећег броја њих, није забележен ИНН сигнал експресије Glycodelina. У полипу експерименталне групе, код пацијенткиња које су поазале експресију Glycodelina, слаб сигнал је забележен код 5 (10%) пацијенткиња, умерен код 3 (6%) и јак сигнал забележен је код једне пацијенткиње (2%). У биоптату ендометријума експерименталне групе, смо код једне пацијенткиње забележен је слаб сигнал ИНН експресије Glycodelina, што је био случај и у контролној групи.

Статистичком обрадом података приказаних у табели 20. и графикону 18., нађена је врло високо статистички значајна разлика интензитета сигнала ИНН експресије Glycodelina како у полипу ($\chi^2=87.280$; $p<0.001$), тако и у биоптату ендометријума експерименталне групе ($\chi^2=46.080$; $p<0.001$). У контролној групи, био је исти случај. Наинме, нађена је врло високо статистички значајна разлика интензитета сигнала ИНН експресије Glycodelina у биоптату ендометријума, тачније врло високо статистички значајно чешће није регистрован сигнал у односу на слаб интензитет сигнала ($\chi^2=22.154$; $p<0.001$). С друге стране, дистрибуција интензитета сигнала ИНН експресије Glycodelina, се статистички значајно разликовала између полипа и биоптата ендометријума, у експерименталној групи ($Z= -2.511$; $p<0.05$).

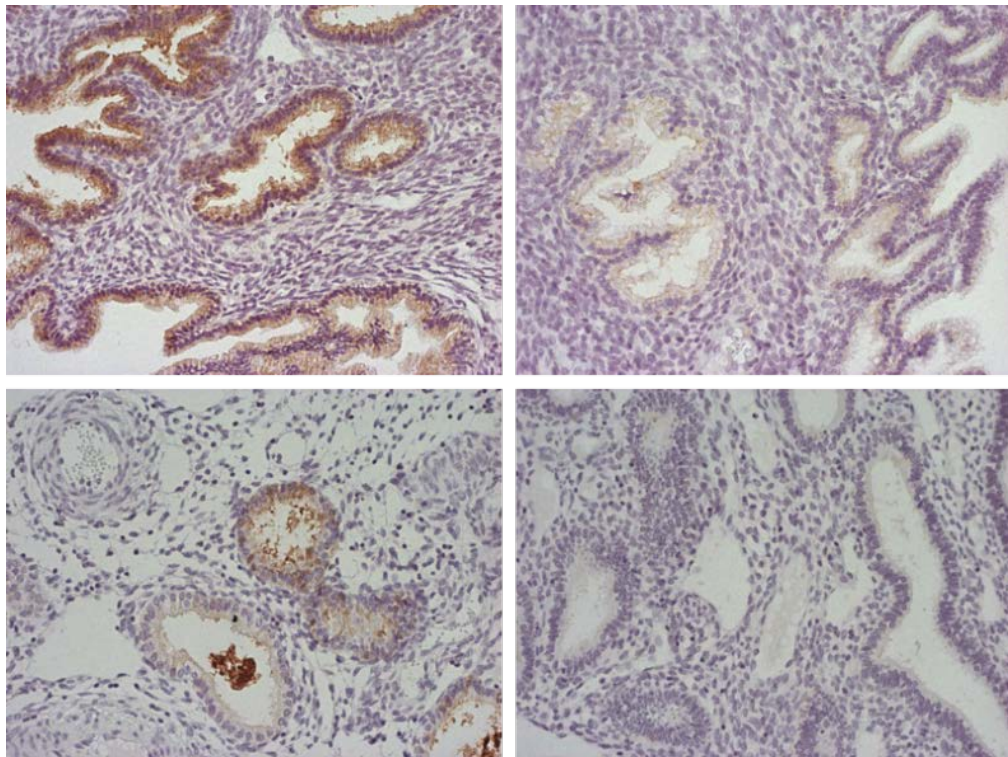
Интензитет сигнала ИИИ експресија Glycodelina у полипу експерименталне групе и биоптату контролне групе, не показује статистички значајну разлику ($Z=-1.753$; $p>0.05$). Интензитет сигнала ИИИ експресије Glycodelina, између биоптата ендометријума експерименталне групе, и биоптата ендометријума контролне групе, не показује статистички значајну разлику ($Z=0.474$; $p>0.05$). На слици 12. је представљен микроскопски приказ интензитета сигнала ИИИ експресије Glycodelina у биопсији ендометријума контролне групе са увећањем од 10 пута. На слици 13. и слици 14. су представљени микроскопски прикази интензитета сигнала ИИИ експресије Glycodelina у полипу ендометријума експерименталне групе са увећањем од 10 пута и 20 пута, респективно.



Слика12. Биопсија ендометријума Glycodelin

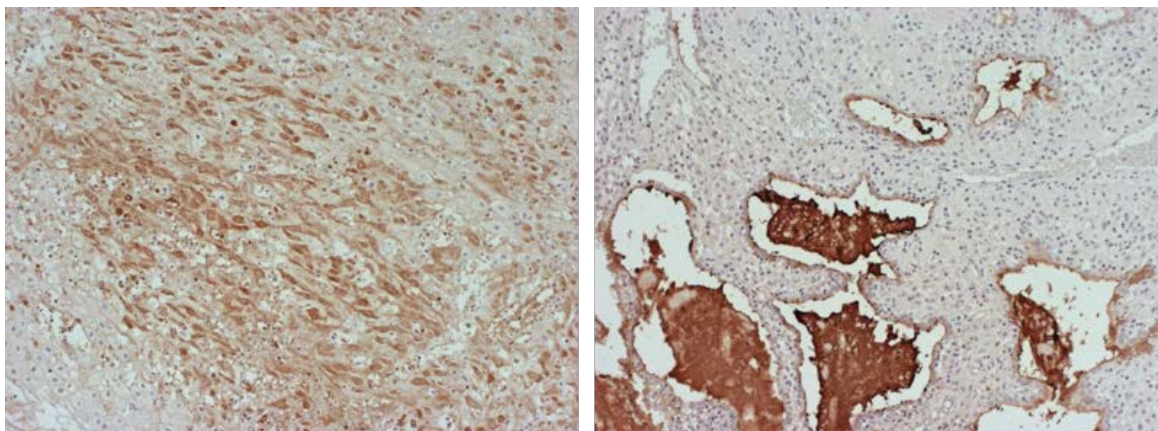


Слика 13. Полип ендометријума Glucodelin (увећање 10x)

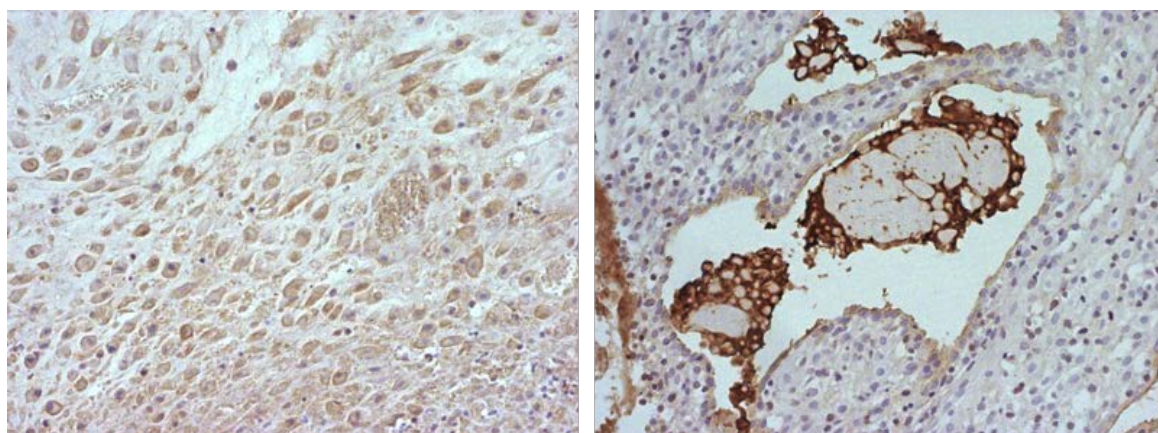


Слика 14. Полип ендометријума Glucodelin (увећање 20x)

На слици 15. и слици 16. су представљени микроскопски прикази интензитета сигнала ИИИ експресије Glycodelin у ендометријуму контролне групе са увећањем од 100 пута и 200 пута, респективно.



Слика15. Контрола ендометријума Glycodelin (увећање 100x)



Слика16. Контрола ендометријума Glycodelin (увећање 200x)

5. ДИСКУСИЈА

У овој дисертацији доказали смо да су вредности TNF- α у испирку експерименталне групе веће него у серуму и пре и после интервенције. Код пацијенткиња контролне групе вредности TNF- α у испирку веће него у серуму и пре и после интервенције. После уклањања полипа код пацијенткиња експерименталне групе вредности TNF- α у серуму су веће него пре уклањања. Такође код пацијенткиња вредности TNF- α у серуму су веће после интервенције него пре интервенције.

Резултати истраживања у оквиру ове дисертације доказали су да су вредности INF- γ код пацијенткиња експерименталне групе веће и у испирку и у серуму и у биоптату полипа ендометријума него код пацијенткиња контролне групе.

У овом раду је показано да су вредности Glycodelina код пацијенткиња са полипом ендометријума биле више у односу на пацијенткиње које нису имале полип, али само у испирку кавума утеруса. У серуму пацијенткиња које нису имале полип ендометријума, вредности Glycodelina су биле више и пре и после интервенције. Код пацијенткиња без полипа ендометријума вредности Glycodelina у серуму су значајно биле ниже након интервенције.

Досадашња истраживања углавном су била фокусирана на улогу цитокина у штетним аспектима аутоимуности, било да је реч о иницијацији, одржавању болести или деструкцији ткива. Међутим велики број цитокина је укључен у смањење регулације развоја болести. Због пијелотропног дејства цитокина није једноставно одредити улогу сваког појединачног цитокина у болести. Овај парадокс је добро илустрован ефектима INF γ .

Локално повишене концентрације INF γ у ткиву зглобова говоре у прилог погоршању колагеном индукованог артритриса, али повишене системске концентрације INF γ говоре у прилог побољшању стања. Концентрација TNF- α је значајно већа након полипектомије, а лучење достиже врхунац у секреторној фази.

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 током различитих фаза менструалног циклуса. Неуспех имплантације је главни разлог неплодности код здравих жена. Неадекватна рецептивност материце је узрок скоро две трећине неуспелих покушаја имплантације, а неадекватан, тј некавалитетан ембрион је одговоран за једну трећину.

5.1 TNF- α (ELISA)

Из досадашњих резултата може се закључити да су вредности TNF- α код пацијенткиња са полипом ендометријума биле више у односу на пацијенткиње које нису имале полип ендометријума, и то у сва три узорка (испирак утеруса, серум пре и серум после хистероскопије). Такође, вредности TNF- α у испирку кавума утеруса биле су више у односу на вредности у серуму и то код пацијенткиња и са полипом ендометријума као и код пацијенткиња без полипа ендометријума. Након уклањања полипа вредности TNF- α у серуму пацијенткиња су порасле у односу на вредност TNF- α у серуму истих пацијенткиња пре интервенције. У групи пацијенткиња без полипа ендометријума вредности TNF- α у серуму су порасле након интервенције. Добијени резултати су показали да код пацијенткиња које нису имале полип ендометријума са порастом вредности TNF- α у испирку утеруса очекујемо и веће вредности TNF- α у серуму. Код пацијенткиња са полипом ендометријума вредности TNF- α су више у испирку утеруса у односу на вредности у серуму. Вредности TNF- α у серуму пацијенткиња са полипом ендометријума расту након уклањања полипа. Како је код ових пацијенткиња висока сензитивност и специфичност теста можемо рећи да вредност TNF- α у испирку кавума утеруса може бити добар скрининг метод за откривање постојања ендометријалног полипа.

Како одређивање вредности TNF- α у серуму пацијенткиња код којих се сумња на постојање ендометријалног полипа пледира за могући скрининг тест, на основу добијених резултата пре

свега статистички значајне динамике кретања вредности TNF- α , пре и након интервенције, као и односа вредности у испирку и серуму, односно односа према контролној групи тј. пацијенткињама које немају ендометријални полип, а посебно на основу података добијених ROC анализом, можемо рећи да вредност TNF- α од 11.555 и већа представља могући добар скрининг метод за откривање пацијенткиња са ендометријалом полипом. У радовима других аутора је показано да је највећа концентрација TNF- α (применом ELISA теста) у пролиферативној и касној секреторној фази (46). У овом раду је такође показано да високе концентрације TNF- α у серуму и испирку утеруса код постменопаузалних жена зависе и од присуства неког патолошког процеса на утерусу нпр. пролапса утеруса или дисплазије грлића (46). Ови резултати се поклапају са резултатима нашег експеримента где смо добили да су концентрације TNF- α код пацијенткиња са полипом више у испирку него у серуму истих пацијенткиња. Након уклањања полипа вредности TNF- α у серуму су више него пре интервенције. Такође, наш експеримент је показао да су вредности концентрација TNF- α у испирку пацијенткиња са полипом више него у испирку пацијенткиња без полипа, што се поклапа са радовима других аутора (48, 64).

5.2 INF- γ (ELISA)

Резултати добијени у овом раду за INF- γ код пацијенткиња са полипом ендометријума су показали да су вредности биле више у односу на пацијенткиње које нису имале полип ендометријума и то у сва три узорка. Вредности INF- γ у испирку кавума утеруса биле су ниже у односу на вредности у серуму и код пацијенткиња са полипом ендометријума тако и код пацијенткиња без полипа ендометријума. Вредности INF- γ у серуму пацијенткиња са полипом ендометријума након уклањања полипа су порасле. У групи пацијенткиња без полипа ендометријума такође је дошло до пораста вредности INF- γ у серуму након интервенције. Тај пораст је био мањи него у групи пацијенткиња са полипом ендометријума.

Испитивањем паралелизма, односно постојања повезаности вредности INF- γ у испирку кавума утеруса са вредностима у серуму, као и постојања повезаности вредности INF- γ у

серуму пре и након хистероскопије, нађено је да код пацијенткиња које нису имале полип ендометријума (контролна група) постоји умерена, високо статистички значајна позитивна корелацијска повезаност вредности INF- γ у испирку кавума утеруса и вредности INF- γ у серуму истих пацијенткиња, после хистероскопије ($r=0.504$; $p<0.01$), што нам имплицира да код пацијенткиња које немају полип вредности INF- γ у испирку и у серуму су у директној вези те са порастом вредности INF- γ у серуму расту и вредности INF- γ у испирку кавума.

Како одређивање вредности INF- γ у серуму пацијенткиња код којих се сумња на постојање ендометријалног полипа пледира за могући скрининг тест, на основу добијених резултата пре свега статистички значајне динамике кретања вредности INF- γ , пре и након интервенције, као и односа вредности у испирку и серуму, односно односа према контролној групи тј. пацијенткињама које немају ендометријални полип, а посебно на основу података добијених ROC анализом, можемо рећи да вредност INF- γ од 8.335 и већа представља моћићи добар скрининг метод за откривање пацијенткиња са ендометријалним полипом. Интересантно би било видети какву предикцију постојања ендометријалног полипа дају здружено вредности INF- γ и TNF- α што није било могуће учинити у овом раду јер за такву анализу потребан је другачији дизајн истраживања. Резултати нашег експеримента ELISA методом су показали да су концентрације INF- γ више код пацијенткиња са полипом ендометријума и то у сва три узорка него код пацијенткиња без полипа ендометријума. Ови резултати се поклапају са резултатима Mollo-a и сарадника, који су показали да су концентрације INF- γ више код пацијенткиња са полипом ендометријума у серуму и испирку у односу на пацијенткиње без патологије ендометријума (86).

5.3 Glycodelin (ELISA)

У овом раду је показано да су вредности Glycodelina код пацијенткиња са полипом ендометријума биле више у односу на пацијенткиње које нису имале полип ендометријума, али само у испирку кавума утеруса. Вредности Glycodelina у серуму пацијенткиња које нису

имале полип ендометријума су биле више и пре и након интервенције. Након уклањања полипа ендометријума вредности Glycodelina код пацијенткиња са полипом ендометријума су порасле у односу на вредности пре интервенције. Код пацијенткиња без полипа ендометријума вредности Glycodelina у серуму значајно су пале након интервенције. Концентрације Glycodelina у плазми су знатно повећане код пацијенткиња са полипима у поређењу са контролном групом и то је доказано у раду *Ben-Nagi* и сарадника (75). У тој студији показано је да су пацијенткиње у фази око овулације са полипима и миомима производиле повишене концентрације Glycodelina (76, 78). У студији *Cui* -а и сарадника уочено је да постоји веза између концентрације Glycodelina у серуму и испирку код пацијенткиња са аденокарциномом ендометријума (68).

Испитивањем паралелизма, односно постојања повезаности вредности Glycodelina у испирку кавума утеруса са вредностима у серуму, као и постојања повезаности вредности Glycodelina у серуму пре и након хистероскопије, нађено је да код пацијенткиња које су имале полип ендометријума (експериментална група) постоји умерена, високо статистички значајна позитивна корелацијска повезаност вредности Glycodelina у испирку кавума утеруса и вредности Glycodelina у серуму истих пацијенткиња, пре хистероскопије ($r=0.486$; $p<0.01$), што нам имплицира да код пацијенткиња које имају полип вредности Glycodelina у испирку прате вредности у серуму, те са порастом вредности Glycodelina у испирку расту и његове серумске вредности.

Вредности Glycodelina су знатно ниже у серуму пацијенткиња у односу на вредности у испирку кавума утеруса, и то како код пацијенткиња код којих постоји полип, тако и код пацијенткиња код којих не постоји полип. Вредности Glycodelina у серуму опадају након уклањања полипа. Како је вредност површине испод ROC криве (AUC), за вредности Glycodelina у испирку, мања од 0.5 и да није статистички значајна указује да добијена cutoff вредност Glycodelina у испирку нема никакву дијагностичку вредност, те да не постоји предикторска способност овог теста у циљу откривања полипа ендометријума.

С друге стране, вредност површине испод ROC криве (AUC), за вредности Glycodelina у серуму пре интервенције, од 0.205 која је такође мања од 0.5 али је статистички значајна указује да добијена cutoff вредност Glycodelina у серуму пре интервенције од 201.8 има врло добру инверзну предикторску вредност.

Како одређивање вредности Glycodelina у серуму пацијенткиња код којих се сумња на постојање ендометријалног полипа пледира за могући скрининг тест, на основу добијених резултата пре свега статистички значајне динамике кретања вредности Glycodelina, пре и након интервенције, као и односа вредности у испирку и серуму, односно односа према контролној групи тј. Пацијенткињама које немају ендометријални полип, а посебно на основу података добијених ROC анализом, можемо рећи да вредност Glycodelina од 201.8 и мање представља могући добар метод за откривање пацијенткиња које немају ендометријални полип, па је зато и наведено да има инверзну предикцију постојања полипа ендометријума.

5.4 INF- γ (IHH)

Имунохистохемијском методом експресија INF- γ је регистрована у полипу код 92% пацијенткиња експерименталне групе, а код 72% пацијенткиња у биоптату ендометријума. Док је код контролне групе експресија INF- γ у биоптату ендометријума регистрована код 46,2% пацијенткиња.

Скор експресије INF- γ у биоптату ендометријума контролне групе је значајно нижи у односу на скор експресије INF- γ и у полипу и у биоптату експерименталне групе. Тако да дистрибуција интензитета сигнала експресије INF- γ није значајно различита између полипа и ткива ендометријума у експерименталној групи као ни између полипа експерименталне групе и биоптата контролне групе.

Такође је нађена значајна позитивна корелација повишених вредности скорa експерименталне групе INF- γ у биоптату ендометријума и вредности INF- γ у испирку кавума утеруса. Позитивна корелацијска повезаност вредности скорa експресије INF- γ у полипу и вредности INF- γ у серуму после полипектомије значи да када су више вредности скорa експресије INF- γ у ендометријалном полипу - након полипектомије очекујемо и више вредности INF- γ у серуму. Када се у испирку кавума утеруса детектују имунохистохемијски више вредности INF- γ можемо доказати постојање експресије INF- γ у ендометријуму.

У контролној групи пацијенткиња са инфертилитетом нису нађене корелацијске повезаности имунохистохемијске експресије INF- γ у полипу и биоптату ендометријума са вредностима INF- γ у серуму и испирку кавума утеруса. Овако добијени резултати се поклапају са резултатима других аутора који су проучавали експресију интрацелуларних адхезионих молекула у ендометријуму регулисану INF- γ (87).

5.5 TNF- α (ИИИ)

Експресија TNF- α регистрована је у полипу код 22% пацијенткиња експерименталне групе. У истој групи пацијенткиња, експресија TNF- α регистрована је код 8% пацијенткиња у биоптату ендометријума, док је код само 3,8% пацијенткиња из контролне групе.

Нађена је врло високо статистички значајна разлика интензитета сигнала ИИИ експресије како у полипу тако и у биоптату ендометријума експерименталне групе. У контролној групи, био је исти случај. Наиме, нађена је врло високо статистички значајна разлика интензитета сигнала ИИИ експресије TNF- α у биоптату ендометријума, тачније врло високо статистички значајно чешће није регистрован сигнал у односу на слаб интензитет сигнала. Са друге стране, дистрибуција интензитета сигнала ИИИ експресије TNF- α , се значајно разликовала између полипа и биоптата ендометријума истих пацијенткиња, у експерименталној групи. Интензитет ИИИ експресије TNF- α у полипу експерименталне групе и биоптату контролне групе, показује значајну разлику док између биоптата

ендометријума експерименталне групе, и биоптата ендометријума контролне групе, не показује значајну разлику интензитета сигнала ИИИ експресије TNF- α .

5.6 Glycodelina (ИИИ)

Експресија Glycodelina регистрована је у полипу код 18% пацијенткиња експерименталне групе. У истој групи пацијенткиња, експресија Glycodelina регистрована је код 2% пацијенткиња. Важно је запазити, да већи број пацијенткиња из експерименталне групе не показује експресију Glycodelina, и то израженије у биоптату ендометријума него у полипу. Нађена је високо статистички значајна разлика скорa ИИИ експресије Glycodelina, између полипа и биоптата ендометријума, у експерименталној групи. У својој студији *Bentin-Ley* са сарадницима је показао да је концентрација Glycodelina у плазми највећа петог дана после овулације (120). У истој студији је показана већа експресија Glycodelina на крају лутеалне фазе. Ова студија као и низ других студија показују и потврђују да је експресија Glycodelina највиша дванестог дана после овулације (66, 69, 70-74). Слаба експресија Glycodelina у резултатима у овој студији, добијених методом ИИИ, се може објаснити тиме што је експеримент изведен у фоликуларној фази циклуса, што је један од предуслова за адекватан оперативни рад током хистероскопске полипектомије.

6. ЗАКЉУЧАК

- Ендометријални полип може бити један од узрока неплодности жена, јер својим присуством мења квалитет ендометријума тј утиче на интензитет експресије различитих цитокина у ткиву.
- Наша студија је доказала промене у концентрацијама испитиваних цитокина: TNF- α , INF- γ и Glycodelina у испирку утеруса и у серуму пре и после хистероскопске полипектомије.
- Вредности цитокина TNF- α су статистички значајно веће у испирку утеруса и у серуму код пацијенткиња експерименталне групе (пацијенткиња са полипом ендометријума) у односу на пацијенткиње контролне групе (пацијенткиње без полипа ендометријума).
- Вредности цитокина TNF- α су веће у испирку утеруса експерименталне групе у односу на оне у серуму код пацијенткиња контролне групе.
- Вредности цитокина TNF- α у серуму расту након уклањања ендометријалног полипа експерименталне групе.
- Вредности цитокина TNF- α у испирку утеруса експерименталне групе су статистички значајно веће у односу на вредности у контролној групи пацијенткиња.
- Вредности цитокина TNF- α у серуму пацијенткиња експерименталне групе су статистички значајно веће у односу на вредности у испирку утеруса пацијенткиња контролне групе.
- Вредности цитокина TNF- α у серуму пацијенткиња експерименталне групе после хистероскопије биле су статистички значајно веће у односу на вредности у серуму пацијенткиња контролне групе после хистероскопије.
- Вредности цитокина TNF- α у испирку утеруса експерименталне групе после уклањања полипа биле су статистички значајно веће у односу на вредности у серуму пре уклањања полипа ендометријума.
- Вредности цитокина TNF- α у испирку утеруса код пацијенткиња контролне групе биле су статистички значајно веће у односу на оне у серуму после хистероскопије.

- Вредности цитокина INF- γ су статистички значајно веће у серуму код пацијенткиња експерименталне групе у односу на пацијенткиње контролне групе.
- Вредности цитокина INF- γ су статистички значајно веће у испирку утеруса код пацијенткиња експерименталне групе у односу на пацијенткиње контролне групе.
- Вредности цитокина INF- γ у испирку утеруса су статистички значајно мање него вредности у серуму како код пацијенткиња експерименталне групе тако и код пацијенткиња контролне групе.
- Вредности цитокина INF- γ у серуму пацијенткиња експерименталне групе након хистероскопије су статистички значајно веће у односу на вредности у серуму пре хистероскопије.
- Вредности цитокина INF- γ у испирку утеруса и у серуму код пацијенткиња контролне групе показују статистички значајну позитивну корелацијску повезаност што указује да са порастом вредности цитокина INF- γ у серуму расту и вредности цитокина INF- γ у испирку утеруса.
- Вредности цитокина Glycodelina код пацијенткиња експерименталне групе су статистички значајно веће у испирку утеруса у односу на ове вредности код пацијенткиња контролне групе.
- Вредности цитокина Glycodelina у серуму код пацијенткиња контролне групе биле су статистички значајно веће у односу на вредности цитокина Glycodelina у серуму пацијенткиња експерименталне групе.
- Вредности цитокина Glycodelina у испирку утеруса биле су статистички значајно веће у односу на вредности цитокина Glycodelina у серуму како код пацијенткиња експерименталне групе, тако и код пацијенткиња контролне групе.
- Вредности цитокина Glycodelina у серуму у пацијенткиња експерименталне групе су статистички значајно веће након хистероскопије у односу на вредности пре хистероскопије.
- Вредности цитокина Glycodelina у серуму пацијенткиња контролне групе су статистички значајно мање у односу на оне пре хистероскопије.

- Највећа експресија цитокина $INF-\gamma$ је у експерименталној групи пацијенткиња у полипу ендометријума.
- Модална вредност експресије цитокина $INF-\gamma$ у биоптату ендометријума контролне групе је најмања.
- Дистрибуција интензитета сигнала ИИИ експресије цитокина $TNF-\alpha$ је статистички значајно већа код пацијенткиња експерименталне групе са полипом ендометријума. Са друге стране, интензитет ИИИ експресије цитокина $TNF-\alpha$ у полипу експерименталне групе ј статистички значајно већи у односу на биоптат контролне групе.
- Скор ИИИ експресије цитокина Glycodelina, у биоптату ендометријума контролне групе је статистички значајно мањи у односу на скор ИИИ експресије цитокина Glycodelina у полипу експерименталне групе.

За дефинитивно објашњење механизма како ендометријални полип нарушава рецептивност ендометријума и изазива промене у концентрацији појединих цитокина неопходне су даље проспективне студије на још већем броју пацијената.

Код пацијенткиња експерименталне групе цитокин $TNF-\alpha$ у испирку и серуму може бити добар скрининг тест за детекцију ендометријалног полипа. Код пацијенткиња експерименталне групе цитокин $INF-\gamma$ у серуму може бити скрининг тест за детекцију ендометријалног полипа. Код пацијенткиња експерименталне групе вредности цитокина Glycodelina у серуму могу се искористити за детектовање пацијенткиња које немају полип ендометријума. Овакав приступ омогућава инверзну предикцију постојања ендометријалног полипа.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Van der Poel S. The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary on ART terminology. *Hum Reprod.* 2009 Oct 4;24(11):2683-7.
2. Huszar KG. Conception, a successful cross-talk between sperm and oocyte. How to select sperm that speaks the language? In: Radunovic N editor. *Cross talk, From cell to human.* Belgrade, Serbia: Sanimex; 2011.
3. Bassil S. Changes in endometrial thickness, width, length and pattern in predicting pregnancy outcome during ovarian stimulation in in vitro fertilization. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2001 Sep;18:258-63.
4. Tubić – Pavlović AP. Uloga doplerskih merenja kod praćenja protoka kroz krvne sudove ovarijuma i uterusa u stimulisanim ciklusima infertilnih žena. [Magistarska teza]. Niš, Srbija: Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet; 2003.
5. Ferraretti AP, Goossens V, Kupka M, Bhattacharya S, de Mouzon J, Castilla JA, Erb K, Korsak V, Nyboe Andersen A. Assisted reproductive technology in Europe, 2009: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod.* 2013 Sep; 28(9):2318–31.
6. Kupka MS, Ferraretti AP, De Mouzon J, Erb K, D'Hooghe T, Castilla JA, Calhaz-Jorge C, De Geyter C, Goossens V, Strohmer H, Kreuz-Kinderwunschzentrum SP. Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod.* 2014 Oct 10;29(10):2099-113.
7. Nygren KG, Sullivan E, Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O, Adamson GD, de Mouzon J. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) world report: assisted reproductive technology 2003. *Fertil Steril.* 2011 Jun;95(7):2209-22.
8. Popovici RM, Kao LC, Giudice LC. Discovery of new inducible genes in in vitro decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinology.* 2000 Sep 1;141(9):3510-3.
9. Giudice LC. Elucidating endometrial function in the post-genomic era. *Hum Reprod Update.* 2003 May 1;9(3):223-35.
10. Grimbizis GF, Camus M, Tarlatzis BC, Bontis JN, Devroey P. Clinical implications of uterine malformations and hysteroscopic treatment results. *Hum Reprod Update.* 2001 Mar 1;7(2):161-74.
11. Carson DD, Lagow E, Thathiah A, Al-Shami R, Farach-Carson MC, Vernon M, Yuan L, Fritz MA, Lessey B. Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Mol Hum Reprod.* 2002 Sep 1;8(9):871-9.

12. Prelević GM, Wurzbürger MI, Balint-Perić L, Nešić JS. Inhibitory effect of sandostatin on secretion of luteinising hormone and ovarian steroids in polycystic ovary syndrome. *The Lancet*. 1990 Oct 13;336(8720):900-3.
13. Vasiljević M, Proročić M, Antić N, Garalejić E, Rakić S, Tasić L, Arsić B, Maglić R. Stvaranje i lučenje steroidnih hormona iz ovarijuma u sindromu policističnih ovarijuma. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo*. 2000; 128(11-12):397-402.
14. Mardh PA, Westrom L, Ripa KT, Moller BR. Pelvic inflammatory disease: clinical etiologic and pathophysiologic studies. In: Holmes KK, Mardh PA, editors. *International perspectives on neglected sexually transmitted diseases*. Washington, DC: Hemisphere Publishing Co; 1983: 251-268.
15. Mladenović D, Bogdanović Z, Mihailović A. *Ginekologija i akušerstvo*. Beograd, Srbija: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva 8th ed.; 2008.
16. Moini A, Riazi K, Amid V, Ashrafi M, Tehraninejad E, Madani T, Owj M. Endometriosis may contribute to oocyte retrieval-induced pelvic inflammatory disease: report of eight cases {1}. *J Assist Reprod Genet*. 2005 Aug 1;22(7-8):307-9.
17. Quenby S, Bates M, Doig T, Brewster J, Lewis-Jones DI, Johnson PM, Vince G. Pre-implantation endometrial leukocytes in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 1999 Sep 1;14(9):2386-91.
18. Milin J. Reproductivni sistem. In: Milin J, Mihić N, Dobanovački D, Mikać G, editors. *Embriologija*. 2nd ed. Novi Sad: Stylos; 2000:153–8.
19. Perović M. Ženski reproductivni sistem. In: Anđelković Z, Somer L, Perović M, Avramović V, Milenkova Lj, Kostovska N, Petrović A, Ristić O, editors. *Histološka građa organa*. 1st ed. Niš: Bonafides; 2001:273–8.
20. Rančić G, Nikolić I. Ženski reproductivni sistem. In: Rančić G, Nikolić I, editors. *Praktikum za vežbe iz histologije i embriologije*. 3rd ed. Beograd: Nauka; 2000:158– 61.
21. Mescher AL. The Female Reproductive System. In: Mescher AL, editor. *Junqueira s Basic Histology*. 13th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2013:462–72.
22. Mahajan N, Kaur S, Alonso MR. Window of implantation is significantly displaced in patients with adenomyosis with previous implantation failure as determined by endometrial receptivity assay. *J Hum Reprod Sci*. 2018 Oct;11(4):353.
23. Horn LC, Schnurrbusch U, Bilek K, Hentschel B, Einkenkel J. Risk of progression in complex and atypical endometrial hyperplasia: clinicopathologic analysis in cases with and without progestogen treatment. *Int J Gynecol Cancer*. 2004 Feb 1;14(2):348-53.
24. Ordi J, Casals G, Ferrer B, Creus M, Guix C, Palacín A, Campo E, Balasch J. Uterine (CD56+) natural killer cells recruitment: association with decidual reaction rather than embryo implantation. *Am J Reprod Immunol*. 2006 May;55(5):369-77.

25. Lachapelle MH, Miron P, Hemmings R, Roy DC. Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome. *J Immunol.* 1996 May 15;156(10):4027-34.
26. Mahajan N. Endometrial receptivity array: clinical application. *J Hum Reprod Sci.* 2015 Jul;8(3):121.
27. Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, Le Shay N, Nezhat CN, Kempson R, Lessey BA, Nayak NR. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology.* 2006 Mar 1;147(3):1097-121.
28. Dominguez F, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Human endometrial receptivity: a genomic approach. *Reprod Biomed Online.* 2003 Jan 1;6(3):332-8.
29. Riesewijk A, Martín J, van Os R, Horcajadas JA, Polman J, Pellicer A, Mosselman S, Simón C. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+ 2 versus LH+ 7 by microarray technology. *MHR: Basic science of reproductive medicine.* 2003 May 1;9(5):253-64.
30. Navot D, Scott RT, Droesch K, Veeck LL, Liu HC, Rosenwaks Z. The window of embryo transfer and the efficiency of human conception in vitro. *Fertil Steril.* 1991 Jan 1;55(1):114-8.
31. Dragojević-Dikić S. *Reproduktivna endokrinologija.* Beograd, Srbija: Elit-Medica;2001.
32. Sibičić S, Radunović N, Radunović Lj. Značaj rasta i razvoja endometrijuma za nastanak trudnoće u IVF postupku. U: *Zborniku sažetaka sa II Simpozijuma Novine u humanoј reprodukciji.* 2007 Nov 30 – Dec 1; Beograd, Srbija. p. 26-31.
33. Thie M, Harrach-Ruprecht B, Sauere H, Fuchsa P, Albersa A, Denker HW. Cell adhesion to the apical pole of epithelium: a function of cell polarity. *Eur J Cell Biol.* 1995 Feb ;66:180-91.
34. Ferenczy A, Giudice LC. The Endometrial Cycle: Morphologic and Biochemical Events. In: Adashi EY, Rock JA and Rosenwaks Z, editors. *Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology.* New York: Raven Press; 1995; 1:171-94.
35. Marquardt, RM, Kim TH, Shin JH, Jeong JW. Progesterone and estrogen signaling in the endometrium: What goes wrong in endometriosis? *Int J Mol Sci.* 2019 Aug; 20(15): 3822.
36. Hong K, Choi Y. Role of estrogen and RAS signaling in repeated implantation failure. *BMB Rep.* 2018 May; 51(5): 225–229.
37. Kao LC, Germeyer A, Tulac S, Lobo S, Yang JP, Taylor RN, Osteen K, Lessey BA, Giudice LC. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology.* 2003 Jul 1;144(7):2870-81.

38. Taylor LJ, Jackson TL, Reid JG, Duffy SR. The differential expression of oestrogen receptors, progesterone receptors, Bcl-2 and Ki67 in endometrial polyps. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2003 Sep;110(9):794-8.
39. King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update*. 2000 Jan 1;6(1):28-36.
40. Petković S. *Ginekologija*. Beograd, Srbija: Elit-Medica; 2004.
41. Šimunić V. *Reprodukcijaska endokrinologija i neplodnost. Medicinski pomognuta oplodnja, IVF*. Zagreb, Hrvatska: Školska knjiga; 2012.
42. Kurman RJ, editor. *Blaustein's pathology of the female genital tract, 5th ed*. New York: Springer-Verlag; 2002.
43. Rosai J. *Rosai and Ackerman's surgical pathology (9th ed.)* Edinburgh: Mosby; 2004.
44. Šimunić V, Ciglar S, Suchanek E, Kupešić S: *Ginekološka endokrinologija i humana reprodukcija. Knjiga predavanja: Postdiplomski kurs prve kategorije*. Zagreb, Hrvatska: Medicinski fakultet sveučilišta u Zagrebu; 2001.
45. Šimunić V. *Obrada neplodnog braka, U: Kurjak A Ginekologija i perinatologija*. Varaždinske Toplice: Tonimir 2003.
46. Von Wolff M, Classen-Linke I, Heid D, Krusche CA, Beier-Hellwig K, Karl C, Beier HM. Tumour necrosis factor- α (TNF- α) in human endometrium and uterine secretion: an evaluation by immunohistochemistry, ELISA and semiquantitative RT-PCR. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. 1999 Feb;5(2):146-52.
47. Seigel LJ, Harper ME, Wong-Staal F, Gallo RC, Nash WG, O'Brien SJ. Gene for T-cell growth factor: location on human chromosome 4q and feline chromosome B1. *Science*. 1984 Jan 13 ;223(4632):175-8.
48. Okuda K, Sakumoto R, Okamoto N, Acosta TJ, Abe H, Okada H, Sinowatz F, Skarzynski DJ. Cellular localization of genes and proteins for tumor necrosis factor- α (TNF), TNF receptor types I and II in bovine endometrium. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Dec 15; 330(1-2):41-8.
49. AkbarAN B. Interleukin-2receptor common gamma-chain signaling cytokines regulate activated T cell apoptosis in response to growth factor withdrawal: selective induction of anti-apoptotic (bcl-2, bcl-xL) but not pro-apoptotic (bax, bcl-xS) gene expression. *Eur J Immunol*. 1996 Feb;26:294-9.
50. Takeuchi H, Itoh S, Fukuda M, Yoshida K, Ishi K, Takeuchi H, Takada M. Comparasion of transvaginal sonographic appearance and endometrial histology. *Nippon Sanaka Fujinka Gakkai Zasshi*. 1991 Mar; 43(3):266-72.
51. Yuval Y, Lipitz S, Dor J, Achiron R. The relationships between endometrial thickness, and blood flow and pregnancy rates in in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1999 Apr 1;14(4):1067-71.

52. De Geyter C, Schmitter M, De Geyter M, Nieschlag E, Holzgreve W, Schneider HP. Prospective evaluation of the ultrasound appearance of the endometrium in a cohort of 1,186 infertile women. *Fertil Steril*. 2000 Jan 1;73(1):106-13.
53. Kovacs P, Matyas SZ, Boda K, Kaali SG. The effect of endometrial thickness on IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod*. 2003 Nov 1;18(11):2337-41.
54. Gonen Y, Casper RF. Sonographic determination of a possible adverse effect of clomiphene citrate on endometrial growth. *Hum Reprod*. 1990 Aug 1;5(6):670-4.
55. Okai T, Masuda H, Kawamoto E, Yano T, Mizuno M. Transvaginal sonographic assessment of the endometrium in spontaneous and induced cycles. *Asia-Oceania J Obstet Gynaecol*. 1990 Sep;16(3):239-46.
56. Kurjak A. *Ultrazvuk u ginekologiji i perinatologiji*. Zagreb, Hrvatska: Medicinska naklada; 2007.
57. Mazur M, Kurman RJ. *Diagnosis of endometrial biopsies and curettings: a practical approach*. New York: Springer Science & Business Media; 2005 Dec 27.
58. Coutifaris C, Myers ER, Guzick DS, Diamond MP, Carson SA, Legro RS, McGovern PG, Schlaff WD, Carr BR, Steinkampf MP, Silva S. Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status. *Fertil Steril*. 2004 Nov 1;82(5):1264-72.
59. American College of Obstetricians and Gynecologists. Prevention of infection after gynecologic procedures. ACOG practice bulletin no. 195. *Obstet Gynecol*. 2018 Jun;131(6):e172-89.
60. Abdelazim IA, Aboelezz A, AbdulKareem AF. Pipelle endometrial sampling versus conventional dilatation & curettage in patients with abnormal uterine bleeding. *J Turk Ger Gynecol Assoc*. 2013 Mar 1;14(1):1-5.
61. Ka H, Seo H, Choi Y, Yoo I, Han J. Endometrial response to conceptus-derived estrogen and interleukin-1 β at the time of implantation in pigs. *J Anim Sci Biotechnol*. 2018 Jun 6;9(1):44.
62. Stephenson MD, Fluker MR. Treatment of repeated unexplained in vitro fertilization failure with intravenous immunoglobulin: a randomized, placebo-controlled Canadian trial. *Fertil Steril*. 2000 Dec 1;74(6):1108-13.
63. Ubaldi F, Rienzi L, Ferrero S, Anniballo R, Iacobelli M, Cobellis L, Greco E. Low dose prednisolone administration in routine ICSI patients does not improve pregnancy and implantation rates. *Hum Reprod*. 2002 Jun 1;17(6):1544-7.
64. Montfort A, Colacios C, Levade T, Andrieu-Abadie N, Meyer N, Ségui B. The TNF paradox in cancer progression and immunotherapy. *Front Immunol* 2019 July 31; 10:1818.
65. Hsu DH, Moore KW, Spits H. Differential effects of IL-4 and IL-10 on IL-2-induced INF- γ synthesis and lymphokine-activated killer activity. *Int immunol*. 1992 May 1;4(5):563-9.

66. Koistinen H, Pasanen A, Hautala L. Glycodelin expression in endometrial carcinoma. In: Proceedings of the 107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2016 Apr 16-20; New Orleans, LA. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2016;76(14 Suppl):Abstract nr 436.
67. Dantzer R. Expression and action of cytokines in the brain: mechanisms and pathophysiological Implications. In: Ader R editor. Psychoneuroimmunology (4th edition), Vol I:271-80. Amsterdam: Elsevier Inc.;2007 Dec 1.
68. Cui J, Liu Y, Wang X. The roles of glycodelin in cancer development and progression. *Front Immunol.* 2017 Nov 29;8:1685.
69. Weber R, Meister M, Muley T, Thomas M, Sültmann H, Warth A, Winter H, Herth FJ, Schneider MA. Pathways regulating the expression of the immunomodulatory protein glycodelin in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol.* 2019 Feb 1;54(2):515-26.
70. Mandelin E, Lassus H, Seppälä M, Leminen A, Gustafsson JÅ, Cheng G, Bützow R, Koistinen R. Glycodelin in ovarian serous carcinoma: association with differentiation and survival. *Cancer Res.* 2003 Oct 1;63(19):6258-64.
71. Durand M, Koistinen R, Chirinos M, Rodríguez JL, Zambrano E, Seppälä M, Larrea F. Hormonal evaluation and midcycle detection of intrauterine glycodelin in women treated with levonorgestrel as in emergency contraception. *Contraception.* 2010 Dec 1;82(6):526-33.
72. Bersinger NA, Birkhäuser MH, Yared M, Wunder DM. Serum glycodelin pattern during the menstrual cycle in healthy young women. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2009 Nov 1;88(11):1215-21.
73. Tabbaa ZM, Zheng Y, Daftary GS. KLF11 epigenetically regulates Glycodelin-A, a marker of endometrial biology via histone-modifying chromatin mechanisms. *Reprod Sci.* 2013 Sep 23;21(3):319–328.
74. Mylonas I, Speer R, Makovitzky J, Richter DU, Briese V, Jeschke U, Friese K. Immunohistochemical analysis of steroid receptors and glycodelin A (PP14) in isolated glandular epithelial cells of normal human endometrium. *Histochem Cell Biol.* 2000 Nov 1;114(5):405-411.
75. Ben-Nagi J, Miell J, Yazbek J, Holland T, Jurkovic D. The effect of hysteroscopic polypectomy on the concentrations of endometrial implantation factors in uterine flushings. *Reprod Biomed Online.* 2009 Nov; 19(5): 737-44.
76. Ben-Nagi J, Miell J, Mavrellos D, Naftalin J, Lee C, Jurkovic D. Endometrial implantation factors in women with submucous uterine fibroids. *Reprod Biomed Online.* 2010 Nov; 21(5):610– 5.
77. Sorak M, Devic A. Analysis of Glycodelin Levels Before and After Hysteroscopic Polypectomy in Infertile Patients. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research.* 2018 Oct 29; 19(3): 247-253.

78. Lee C-L, Vijayan M, Wang X, Lam KKW, Koistinen H, Seppälä M et al. Glycodelin-A stimulates the conversion of human peripheral blood CD16(-)CD56(bright) NK cell to a decidual NK cell-like phenotype. *Hum Reprod.* 2019 Apr;34(4):689-701.
79. Ni L, Lu J. Interferon gamma in cancer immunotherapy. *Cancer Med.* 2018 Jul 23;7(9):4509-4516.
80. Kak G, Raza M, Tiwari BK. Interferon-gamma (INF- γ): exploring its implications in infectious diseases. *Biomol Concepts.* 2018 May 30;9(1):64-79.
81. Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, Williams BR, Sen GC, Silverman RH, Borden EC. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis.* 2003 Jun 1;8(3):237-49.
82. Raefsky EL, Plataniias LC, Zoumbos NC, Young NS. Studies of interferon as a regulator of hematopoietic cell proliferation. *Journal Immunology.* 1985 Oct 1;135(4):2507-12.
83. Ka H, Seo H, Choi Y, Yoo I, Han J. Endometrial response to conceptus-derived estrogen and interleukin-1 β at the time of implantation in pigs. *J Anim Sci Biotechnol.* 2018 Jun 6 ;9(1):44.
84. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher Jr CJ. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med.* 2001 Mar 8;344(10):699-709.
85. Jasper MJ, Tremellen KP, Robertson SA. Reduced expression of IL-6 and IL-1 α mRNAs in secretory phase endometrium of women with recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol.* 2007 Feb 1 ;73(1):74-84.
86. Mollo A, Stile A, Alviggi C, Granata M, De Placido G, Perrella A, d'Antonio A, Cicinelli E. Endometrial polyps in infertile patients: do high concentrations of interferon-gamma play a role?. *Fertil Steril.* 2011 Nov 1;96(5):1209-12.
87. Thomson AJ, Greer MR, Young A, Boswell F, Telfer JF, Cameron IT, Norman JE, Campbell S. Expression of intercellular adhesion molecules ICAM-1 and ICAM-2 in human endometrium: regulation by interferon- γ . *Mol Hum Reprod.* 1999 Jan 1;5(1):64-70.
88. Sheng Y, Li F, Qin Z. TNF receptor 2 makes tumor necrosis factor a friend of tumors. *Front Immunol.* 2018 May 28;9:1170.
89. Salomon BL, Leclerc M, Tosello J, Ronin E, Piaggio E, Cohen JL. Tumor necrosis factor α and regulatory T cells in oncoimmunology. *Front Immunol.* 2018 Mar 12;9:444.
90. Zhang Z, Lin G, Yan Y, Li X, Hu Y, Wang J, Yin B, Wu Y, Li Z, Yang XP. Transmembrane TNF-alpha promotes chemoresistance in breast cancer cells. *J Oncogene* 2018 Mar 21; 37:3456–3470.
91. Alvarez-Hernandez X, Liceaga J, McKay IC, Brock JH. Induction of hypoferremia and modulation of macrophage iron metabolism by tumor necrosis factor. *Lab Invest.* 1989 Sep ;61(3):319-22.

92. Butler DM, Maini RN, Feldmann M, Brennan FM. Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF- α antibody with the interleukin-1 receptor antagonist. *Eur Cytokine netw.* 1995 Jul-Dec ;6(4):225-30.
93. Yamada H, Morikawa M, Furuta I, Kato EH, Shimada S, Iwabuchi K, Minakami H. Intravenous immunoglobulin treatment in women with recurrent abortions: increased cytokine levels and reduced Th1/Th2 lymphocyte ratio in peripheral blood. *Am J Reprod Immunol.* 2003 Feb;49(2):84-9.
94. Ciebiera M, Włodarczyk M, Zgliczyńska M, Łukaszuk K, Męczekalski B, Kobierzycki C, Łoziński T, Jakiel G.. The Role of Tumor Necrosis Factor α in the Biology of Uterine Fibroids and the Related Symptoms. *Int J Mol Sci.* 2018 Dec 4;19(12).
95. Nielsen OH, Loftus Jr EV, Jess T. Safety of TNF- α inhibitors during IBD pregnancy: a systematic review. *BMC Medicine.* 2013 Dec;11(1):174.
96. Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Oct 15;89(20):9784-8.
97. Pei CZ, Kim YJ, Baek KH. Pathogenetic factors involved in recurrent pregnancy loss from multiple aspects. *Obstet Gynecol Sci.* 2019 Jul 1; 62(4):212-23.
98. Al Taweel AI, Hamed AM, Abdelrahman AMN , Hassan MNI ., Tumor Necrosis Factor-like Weak Inducer of Apoptosis: A Novel Serum Marker in Patients with Severe Alopecia. *Int J Trichology.* 2019 May-Jun;11(3):113-117.
99. Suffys P, Beyaert R, Van FR, Fiers W. TNF in combination with interferon-gamma is cytotoxic to normal, untransformed mouse and rat embryo fibroblast-like cells. *Anticancer Res.* 1989 Jan-Feb;9(1):167-71.
100. Ward DM, Cloonan SM. Mitochondrial iron in human health and disease. *ANN Rev Psychol.* 2019 Feb;81:453-482.
101. Liberman AC, Refojo D, Arzt E. Cytokine signaling/transcription factor cross-talk in T cell activation and Th1-Th2 differentiation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2003;51(6):351-65.
102. Chen JL, Lobo-Chan AM, Chan RV, Bhat P. Tumor Necrosis Factor-Alpha Inhibitory Therapy for Non-Infectious Autoimmune Uveitis. In: Garcia AR, Foster S, editors. *Advances in the Diagnosis and Management of Uveitis.* IntechOpen 2019 Apr 2. Pear reviewed chapter.
103. Jayaprakasan K, Polanski L, Sahu B, Thornton JG, Raine-Fenning N. Surgical intervention versus expectant management for endometrial polyps in subfertile women. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014 Aug 30;(8):CD009592.
104. Stern C, Chamley L, Norris H, Hale L, Baker HG. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of heparin and aspirin for women with in vitro fertilization implantation failure and antiphospholipid or antinuclear antibodies. *Fertil Steril.* 2003 Aug 1;80(2):376-83.

105. DeWaay DJ, Syrop CH, Nygaard IE, Davis WA, Van Voorhis BJ. Natural history of uterine polyps and leiomyomata. *Obstet Gynecol.* 2002 Jul 1;100(1):3-7.
106. Goldstein SR, Monteagudo A, Popiolek D, Mayberry P, Timor-Tritsch I. Evaluation of endometrial polyps. *Am J Obstet Gynecol.* 2002 Apr 1;186(4):669-74.
107. Ben-Arie A, Goldchmit C, Laviv Y, Levy R, Caspi B, Huszar M, Dgani R, Hagay Z. The malignant potential of endometrial polyps. *Eur J Obstetrics Gynecol Reprod Biol.* 2004 Aug 10;115(2):206-10.
108. Munro MG. Uterine polyps, adenomyosis, leiomyomas, and endometrial receptivity. *Fertil Steril.* 2019 Apr; 111(4):629-640.
109. Schankath AC, Fasching N, Urech-Ruh C, Hohl MK, Kubik-Huch RA. Hysterosalpingography in the workup of female infertility: indications, technique and diagnostic findings. *Insights into imaging.* 2012 Oct 1;3(5):475-83.
110. Antoniou Z, Gkali C, Chalazonitis A. Hysterosalpingography and investigation of female infertility. *Scientific Chronicles.* 2014 Jan 1; 19(3):217-25.
111. Stefanescu A, Marinescu B. Diagnostic hysteroscopy-a retrospective study of 1545 cases. *Maedica (Buchar).* 2012 Dec;7(4):309-314.
112. ELISA Guide. Abcam; 2018. Available from: <https://docs.abcam.com/pdf/kits/elisa-guide.pdf>.
113. Gelman PL, Mancilla-Herrera I, Flores-Ramos M, Takashima MS, Coronel FC, Fuentes CC, Chinchilla-Ochoa D. The cytokine profile of women with severe anxiety and depression during pregnancy. *BMC psychiatry.* 2019 Apr 3;19(1):104.
114. Arsenijević P, Đurić J, Arsenijević S, Milosavljević MZ, Mitrović S. Synchronous primary ovarian endometrioid carcinoma and poorly differentiated endometrial stromal sarcoma. *Ser J Exp Clin Res.* 2012 ;13(4):139-44.
115. Renshaw S, editor. *Immunohistochemistry and immunocytochemistry: Essential methods.* John Wiley & Sons; 2017 Feb 6.
116. Heidenhain M. Noch einmal über die Darstellung der Zentralkörper durch Eisenhämatoxylin nebst einigen allgemeinen Bemerkungen über die Hämatoxylinfarben. *Z. f. wissensch. Mikr., Bd. XIII, S. 1896;186.*
117. Gurr E. *Biological staining methods (9th edition).* Chadwell Heath: Hopkin and Williams; 1979.
118. Ho R. *Handbook of univariate and multivariate data analysis with IBM SPSS.* Boca Raton, Florida USA: Chapman and Hall/CRC; 2013 Oct 25.
119. Petrie A, Sabin C. *Medical Statistics at a Glance (3rd edition).* Oxford: Wiley Blackwell; 2009.

120. Bentin-Ley U, Lindhard A, Ravn V, Islin H, Sørensen S. Glycodelin in endometrial flushing fluid and endometrial biopsies from infertile and fertile women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011 May;156(1):60-6.

8. БИОГРАФИЈА

Др Ана (Вјештица) Девидић рођена је 05.04.1974. године у Београду, где је завршила Основну школу и Гимназију. Медицински факултет Универзитета у Београду завршила је 2000 године. Специјализацију из Гинекологије и акушерства обавила је у КБЦ Земун и ГАК Народни Фронт. Специјалистички испит из гинекологије и акушерства је положила 2006. године у Београду, а 2018. године је одбранила рад уже специјализације из Фертилитета и Стерилитета.

Завршила више едукација из специјалистичке области: Југословенску школу за патологију цервикса, вагине, вулве и колпоскопију 2005. године, Школу ултразвука из области гинекологије и акушерства 2005. године, обуку из цитологије 2006 године. Завршила школу из лапароскопије у гинеколошкој онкологији „проф. Давид Гал“, Школу перинатолошког 3D/4D ултразвука. Учесник више стручних скупова, домаћих и међународних конгреса.

Стално запослена у КБЦ Земун у Болници за Гинекологију и акушерство.

9. БИБЛИОГРАФИЈА

Радови објављени у часописима од међународног значаја

1. **Devic A**, Vasiljevic M, Sorak M, Devic A, Rudic Biljic-Erski I, Zajic G. The effect of hysteroscopic polypectomy on the concentrations of tumour necrosis factor- α (TNF- α) in uterine flushings and serum in infertile women. *Srp Arh Celok Lek.* 2019; doi:10.2298/SARH191026120D. **M23**

Радови објављени у часописима од националног значаја:

2. Sorak M, **Devic A**. Analysis of Glycodelin Levels Before and After Hysteroscopic Polypectomy in Infertile Patients. *Ser J Exp Clin Res.* 2018; 19(3): 247-253. doi: 10.1515/sjecr-2017-0001. **M51**
3. **Devic A**, Vasiljevic M, Devic A, Sorak M. Ovarian Dysgerminoma. *Ser J Exp Clin Res.* 2016 April 14; 17(1):67-70. doi: 10.1515/sjecr-2015-0043. **M51**
4. Dimitrijevic D, Vasiljevic M, Anicic R, Brankovic S, Ristic A, **Devic A**. . Recurrence rate of ovarian endometriosis in patients treated with laparoscopic surgery and postoperative suppressive therapy. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2015; 42(3):339-43. **M53**
5. **Devic A**, Vasiljevic M, Devic A. Endometrial Intraepithelial Neoplasia (EIN) in an Endometrial Polyp. *Ser J Exp Clin Res.* 2015 Dec 30; 16(4): 343-346. doi: 10.1515/sjecr-2015-0042. **M51**
6. **Dević A**, Dević A. Uticaj tibolona i hormonske supstitucione terapije na aktivnost osteokalcina kod žena u postmenopauzi. *Timočki medicinski glasnik.* 2013;38(1): 21-24.
7. Marić Krejović S, Marković Knežević D, Petrović B, **Dević A**, Knezević S. Uticaj antirosorptivne terapije na markere metaboličke aktivnosti kosti žena u postmenopauzi. *Medicinski glasnik.* 2012;45:31-49. **M52**

Зборници радова домаћих скупова

8. Stefanović T, Vasiljević M, Canović S, Perović M, Avramović LJ, Stevović G, **Dević A**, Simić A. Uloga histerosalpingografije u ispitivanju prohodnosti jajovoda kod žena sa infertilitetom tuboperitonealnog porekla. *LI Ginekološko akušerska nedelja SLD, Zbornik radova, Beograd, 2007;361-2.*
9. **Dević A**, Avramović LJ, Stefanović T, Dukić A, Jovčić N, Mijailović Borlja R. Apces miometrijuma u trudnoći. *XL VII Ginekološko akušerska nedelja SLD, Zbornik radova, Beograd, 2003;237-43.*

ПРИЛОГ

8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број -РБ:

Идентификациони број-ИБР:

Тип документације-ТД:

Монографска публикација

Тип записа-ТЗ:

Текстуални штампани материјал

Врста рада-ВР:

Докторска дисертација

Аутор-АУ:

Ана Девећ

Ментор/коментор-МН:

Др сци. мед. Марија Шорак, доцент

Наслов рада-НР:

„Нивои цитокина пре и после хистероскопске поипектомије код инфертилних пацијенткиња“

Језик публикације-ЈП:

Српски (ћирилица)

Језик извода-ЈИ:

Српски/енглески

Земља публиковања- ЗП:

Србија

Уже географско подручје-УГП:

Србија

Година-ГО:

2020

Издавач-ИЗ:

Ауторски репринт

Место и адреса-МС:	34000 Крагујевац, Србија, Светозара Марковића 69
Физичи опис рада-ФО:	Дисертација има 117 страна, садржи 7 поглавља, 16 слика, 18 графикана, 20 табела, 120 референци
Научна област-НО:	Медицина
Научна дисциплина-ДИ:	Гинекологија и акушерство
Предметна одредница/ кључне речи-ПО:	Цитокини, полип ендометријума, инфертилитет, хистероскопија
УДК	618/Медицина
Чува се-ЧУ:	У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, 34000 Крагујевац, Србија, Светозара Марковића 69

Важна напомена-МН:

Извод-ИД: Полип ендометријума је најчешће бенигна локализована пролиферација жлезда и строме ендометријума покривена епителом која се издиже изнад равни слузокоже. Најчешће се дијагностикују за време испитивиња узрока неуредног крварења из материце или неплодности.

Цитокини су биолошки активне супстанце са гласничком и регулаторном улогом у имуним и инфламаторним реакцијама. Сви цитокини се стварају и у ендометријуму. Цитокини су укључени у битне репродуктивне функције као што су овулација и имплантација.

Циљ студије је био да се утврде промене на нивоу ендометријума пре и после хистероскопске полипектомије код инфертилних пацијенткиња са ендометријалним полипом и код инфертилних пацијенткиња без ендометријалног полипа.

Код пацијенткиња са полипом ендометријума вредности експресије TNF- α су више у испирку утеруса него у серуму и пре и после хистероскопије. Након уклањања полипа вредности TNF- α су више у серуму код пацијенткиња без полипа ендометријума, него код пацијенткиња са полипом ендометријума. Код пацијенткиња са полипом ендометријума вредности TNF- α су више у испирку него у серуму и пре и после хистероскопије. Интезитет ИНН експресија TNF- α у полипу ендометријума и биоптату ендометријума пацијенткиња

без полипа показује значајну разлику, док између биоптата ендометријума пацијенткиња са полипом и биоптата ендометријума пацијенткиња без полипа, не показује значајну разлику интензитета сигнала ИНН експресија TNF- α .

Вредности експресије INF- γ код пацијенткиња са полипом су више и у испирку и у серуму и пре и после хистероскопије, него код пацијенткиња без полипа. Код пацијенткиња са полипом ендометријума вредности INF- γ су ниже у испирку него у серуму и пре и после хистероскопије. Вредности INF- γ у серуму ових пацијенткиња су више након уклањања полипа у серуму. Скор експресије INF- γ у биоптату ендометријума, код пацијенткиња без полипа, је значајно нижи у односу на скор експресије INF- γ и у полипу и у биоптату код пацијенткиња са полипом ендометријума. Када се у испирку кавума утеруса детектују више вредности INF- γ имунохистохемијски можемо доказати постојање експресије INF- γ у ендометријуму.

Вредности Glycodelina су биле више код пацијенткиња са полипом ендометријума у испирку утеруса, док су вредности Glycodelina у серуму биле више код пацијенткиња без полипа. Након хистероскопије вредности Glycodelina у серуму, код пацијенткиња са полипом ендометријума, су порасле након хистероскопије, а код пацијенткиња без полипа су вредности Glycodelina пале након хистероскопије. Већи број пацијенткиња са полипом не показује експресију Glycodelina, и то израженије у биоптату ендометријума него у полипу. Постоји значајна разлика скорa ИНН експресије Glycodelina, између полипа и биоптата ендометријума код пацијенткиња са полипом ендометријума.

Код пацијенткиња са полипом ендометријума вредност TNF- α у испирку кавуму утеруса и серуму може бити добар скрининг тест за откривање ендометријалног полипа. Код пацијенткиња са полипом ендометријума вредност INF- γ у серуму може бити скрининг тест за откривање полипа ендометријума. Код вредности Glycodelina не постоји предикторска способност теста у циљу откривања полипа ендометријума.

Датум прихватања теме од стране ННВ-ДП: 25.01.2017. г.

Датум одбране-ДО:

Чланови комисије-КО:

1. Проф. др Мирјана Варјачић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство, **председник**
2. Проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и Имунологија, **члан**
3. Проф. др Младенко Васиљевић, редовни професор Медицинског факултета у Београду за ужу научну област Гинекологија и акушерство, **члан**

8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC**

Accession number-ANO:

Identification number-INO:

Documentation type-DT: Monographic publication

Type of record-TR: Textual printed material

Contents code-CC: PhD thesis

Author-AU: Ana Dević

Menthor/co-mentor-MN: Dr. sci. med Marija Šorak, docent

Title-TI: “Cytokine levels before and after hysteroscopic polypectomy in infertile patients”

Language of text-LT: Serbian (Cyrilic)

Language of abstract: Serbian/English

Country of publication-CP: Serbia

Locality of publication-LP: Serbia

Publication year-PY: 2020

Publisher-PU: Author reprint

Publication place-PP: 34000 Kragujevac, Svetozara Markovića str. 69

Physical description-PD:	These contains 117 pages, 7 chapters, 16 images, 18 graphs, 20 tables and 120 citations
Scientific field-SF:	Medicine
Scientific discipline-SD:	Gynecology and Obstetric
Subject/key words SKW:	Cytokines, endometrial polyp, infertility, hysteroscopy
UDC	618/Medicine
Holding data:	Library of Medical faculty of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia, Svetozara Markovica str. 69

Note-N:

Abstract-AB: An endometrial polyp is the most common benign localised proliferation of endometrial glands and stroma covered with the epithelium and extending above the level of the mucosa. Endometrial polyps are usually diagnosed while examining the cause of abnormal uterine bleeding or infertility.

Cytokines are biologically active substances with a mediating and regulatory role in immune and inflammatory reactions. All cytokines are also generated in the endometrium. They are involved in important reproductive functions such as ovulation and implantation.

The aim of this study was to determine endometrial changes prior to and following hysteroscopic polypectomy in infertile female patients with endometrial polyps and in infertile female patients without endometrial polyps.

In the patients with endometrial polyps the values of TNF- α expression were higher in the uterine flushings than in the serum both prior to and following hysteroscopy. Once the polyps had been removed, serum TNF- α values were higher in the patients without endometrial polyps than in the patients with endometrial polyps. In the patients with endometrial polyps, TNF- α values were higher in the uterine flushings than in the serum both prior to and following hysteroscopy. The intensity of IHC expression of TNF- α in the endometrial polyps and endometrial biopsy specimens obtained from the patients without endometrial polyps revealed a significant difference, whereas there was no significant difference observed in the signal intensity of IHC expression of TNF- α in the biopsy specimens obtained from the patients with and without polyps.

The values of INF- γ expression were higher in the uterine flushings and serum of the patients with polyps before and after hysteroscopy in comparison to the values obtained from the patients without polyps. The values INF- γ were lower in the uterine flushings than in the serum of the

patients with endometrial polyps before and after hysteroscopy. In these patients, the serum values of INF- γ increased after the polyps had been removed. INF- γ expression score in endometrial biopsy specimens taken from the patients without endometrial polyps was significantly lower in comparison to INF- γ expression scores both in the polyps and biopsy specimens of the patients with endometrial polyps. When an analysis of uterine flushings reveals higher values of INF- γ , the immunohistochemical method is used to provide evidence for INF- γ expression in the endometrium.

The values of glycodeilin were higher in the uterine flushings of the patients with endometrial polyps, while higher values of glycodeilin were detected in the serum of the patients without polyps. The values of glycodeilin in the serum of the patients with endometrial polyps increased after hysteroscopy as opposed to the values of glycodeilin in the serum of the patients without endometrial polyps, which decreased after hysteroscopy. Glycodeilin expression was not detected in most patients, which was more obvious in the endometrial biopsy specimens than in the polyps. A significant difference in ICH scores of glycodeilin expression was observed between the polyps and endometrial biopsy specimens in the patients with endometrial polyps.

The values of TNF- α in the uterine flushings and serum of patients with endometrial polyps can be considered as a reliable screening test for the detection of endometrial polyps. In patients with endometrial polyps, the values of INF- γ in the serum can be used as a screening test for detecting endometrial polyps. The values of glycodeilin do not have a predictive capacity of a test that could help detect endometrial polyps.

Accepted by the Scientific Board on-ASB:

25.01.2017.

Defended on-DE:

Thesis defended board-DB:

(Degree/name/surname/title/faculty)

1. Prof. dr Mirjana Varjadic, Professor of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, University of Kragujevac, **president**
2. Prof. dr Ivan Jovanovic, Associate professor of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Kragujevac, **member**
3. Prof. dr Mladenko Vasiljevic, Professor of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, University of Belgrade, **member**

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, _____ Ана Девић _____, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

"Нивои цитокина пре и после хистероскопске полипектомије код инфертилних пацијенткиња"

која је одбрањена на _____ Факултету медицинских наука
Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У _____ Крагујевцу _____, _____ 2020. _____ године,

_____ Ана Девић _____
потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, _____ Ана Девећ _____,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

"Нивои цитокина пре и после хистероскопске полипектомије код инфертилних пацијенткиња"

која је одбрањена на _____ Факултету медицинских наука _____

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

у Крагујевцу, 2020. године,

Ана Девећ
потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Етички комитет

Број: 01- 4694

Дана: 29.06. 2012. године

Крагујевац

На седници Етичког комитета Медицинског факултета у Крагујевцу одржаној 29.06.2012. године донета је

ОДЛУКА

Одобрава се научно истраживање под радним називом „Ендометријална рецептивност пре и након хистероскопске холопектомије код инфертилних пацијенткиња“ главног истраживача проф. др Александра Живановића, у складу са поднетим протоколом студије број: 01-3593 од 25.05. 2012. године.

ПРЕДСЕДНИК ЕТИЧКОГ КОМИТЕТА



Проф. др Славица Ђукић Дејановић

GINEKOLOŠKO-AKUŠERSKA KLINIKA

"NARODNI FRONT"

Beograd, Kraljice Natalije 62

Del.broj: 04-24/3-1

Datum: 24.05.2012.godine

ZAPISNIK SA SASTANKA ETIČKOG ODBORA GAK „NARODNI FRONT“, BEOGRAD

Sastanak održan 24.05.2012.godine. Sastanku prisustvovali članovi Etičkog odbora: Prof.dr Branko Stanimirović, predsednik Etičkog odbora, Prof.dr Mladenko Vasiljević, zamenik predsednika Etičkog odbora, Doc.dr Snežana Rakić, član Etičkog odbora i Doc.dr Lidija Tasić, član Etičkog odbora. Doc.dr Amira Hajrić-Egić je na godišnjem odmoru, te je kontaktirana telefonom i dala saglasnost na dole navedenu odluku.

DNEVNI RED SASTANKA:

Molba Dr Ane Dević, specijaliste ginekologije i akušerstva iz KBC Zemun, da joj se omogući sprovođenje ispitivanja kod infertilnih pacijentkinja, a u cilju izrade doktorske disertacije, sa temom: *"Endometrijalna peceptivnost pre i nakon histeroskopske polipektomije kod infertilnih pacijentkinja"*.

Za ispitivanje vrednosti predviđenih parametara od pacijentkinja bi bilo uzimano 5 ml periferne venske krvi, ispirak uterusa i deo polipa i endometrijuma.

Uz molbu Dr Dević je priložila protokol i nacrt istraživanja, dokumenta o obezbeđenju informisanog pristanka pacijenata i davanja pismene saglasnosti za učestvovanje u ispitivanju, te izjave o ne postojanju bilo kakvih nadoknada pacijentima, za učestvovanje u studiji. Takođe je pribavila pismenu saglasnost direktora klinike Prof.dr Dušana Stanojevića da se ispitivanje može sprovesti na klinici.

Mentor istraživanja je Prof.dr Marija Šorak, sa Medicinskog fakulteta u Kragujevcu, a komentor Prof.dr Mladenko Vasiljević, iz naše klinike.

Članovi Etičkog odbora su doneli ODLUKU da se odobri sprovođenje istraživanja, pošto sa etičkog aspekta gledano nema prepreka njegovom izvođenju.

Beograd, 24.05.2012.godine

Prof.dr Branko Stanimirović
Predsednik Etičkog odbora



Радови који су били услов за пријаву завршне докторске дисертације

Радови објављени у часописима од међународног значаја

1. **Devic A**, Vasiljevic M, Sorak M, Devic A, Rudic Biljic-Erski I, Zajic G. The effect of hysteroscopic polypectomy on the concentrations of tumour necrosis factor- α (TNF- α) in uterine flushings and serum in infertile women. *Srp Arh Celok Lek.* 2019; doi:10.2298/SARH191026120D. **M23**

Радови објављени у часописима од националног значаја:

2. Sorak M, **Devic A**. Analysis of Glycodelin Levels Before and After Hysteroscopic Polypectomy in Infertile Patients. *Ser J Exp Clin Res.* 2018; 19(3): 247-253. doi: 10.1515/sjecr-2017-0001. **M51**

3. **Devic A**, Vasiljevic M, Devic A, Sorak M. Ovarian Dysgerminoma. *Ser J Exp Clin Res.* 2016 April 14; 7(1):67-70. doi: 10.1515/sjecr-2015-0043. **M51**



СРПСКИ АРХИВ
ЗА ЦЕЛОКУПНО ЛЕКАРСТВО
SERBIAN ARCHIVES
OF MEDICINE

Address: 1 Kraljice Natalije Street, Belgrade 11000, Serbia

+381 11 4092 776, Fax: +381 11 3348 653

E-mail: office@srpskiarhiv.rs, Web address: www.srpskiarhiv.rs

Paper Accepted*

ISSN Online 2406-0895

Original Article / Оригинални рад

Ana Dević^{1,†}, Mladenko Vasiljević^{2,3}, Marija Šorak⁴, Aleksandar Dević¹, Ivana Rudić-Biljić-Erski³, Goran Zajić⁵

The effect of hysteroscopic polypectomy on the concentrations of tumour necrosis factor- α (TNF- α) in uterine flushings and serum in infertile women

Ефекат хистероскопске полипектомије на концентрацију фактора туморске некрозе- α (TNF- α) у испирку материце и серуму код инфертилних жена

¹Zemun Clinical Center, Department of Gynecology and Obstetrics, Belgrade, Serbia

²University of Belgrade, Faculty of Medicine, Belgrade, Serbia

³Narodni Front Clinic of Gynecology and Obstetrics, Belgrade, Serbia

⁴University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Clinic of Gynecology and Obstetrics,

⁵ICT College of Applied Studies, Belgrade, Serbia

Received: October 26, 2019

Revised: November 12, 2019

Accepted: November 22, 2019

Online First: November 23, 2019

DOI: <https://doi.org/10.2298/SARH191026120D>

* **Accepted papers** are articles in press that have gone through due peer review process and have been accepted for publication by the Editorial Board of the *Serbian Archives of Medicine*. They have not yet been copy edited and/or formatted in the publication house style, and the text may be changed before the final publication.

Although accepted papers do not yet have all the accompanying bibliographic details available, they can already be cited using the year of online publication and the DOI, as follows: the author's last name and initial of the first name, article title, journal title, online first publication month and year, and the DOI; e.g.: Petrović P, Jovanović J. The title of the article. Srp Arh Celok Lek. Online First, February 2017.

When the final article is assigned to volumes/issues of the journal, the Article in Press version will be removed and the final version will appear in the associated published volumes/issues of the journal.

The date the article was made available online first will be carried over.

†Correspondence to:

Ana DEVIĆ

Ibarski put 6g

11000 Belgrade, Serbia

Email: anavjestica@gmail.com

The effect of hysteroscopic polypectomy on the concentrations of tumour necrosis factor- α (TNF- α) in uterine flushings and serum in infertile women

Ефекат хистероскопске полипектомије на концентрацију фактора туморске некрозе- α (TNF- α) у испирку материце и серуму код инфертилних жена

SUMMARY

Introduction/Objective The aim of this paper is to present changes of tumour necrosis factor- α (TNF- α) levels in uterine flushings and serum of infertile female patients before and after hysteroscopic polypectomy.

Methods A total of 82 infertile female patients were included in the study. The patients were divided into two groups. The first group was the experimental group and comprised 56 infertile women with endometrial polyps, whereas the second group was the control group of 26 infertile women who were not diagnosed with endometrial polyps.

Results The results of this research primarily suggest that TNF- α concentration obtained from uterine flushings and serum of infertile patients diagnosed with endometrial polyps differed before and after a surgical procedure. In the control group of patients, there was no significant difference observed regarding TNF- α concentrations in serum and uterine flushings of women without endometrial polyps. A comparison between these two groups revealed differences in TNF- α concentrations both in venous blood and uterine flushings. These differences were considered statistically significant.

Conclusion Endometrial polyps are one of the causes of higher TNF- α levels both in uterine flushings and serum.

Keywords: cytokines, TNF- α , endometrial polyp, uterine flushings, serum.

САЖЕТАК

Увод/циљ Циљ овог рада је да прикаже промене нивоа фактора туморске некрозе - α (TNF- α) у испирку утеруса и серуму инфертилних пацијенткиња пре и после хистероскопске полипектомије.

Метод Студија је обухватала 82 инфертилне пацијенткиње. Пацијенткиње су биле подељене у две групе. Прва група је била експериментална група коју је сачињавало 56 инфертилних пацијенткиња са ендометријалним полипом. Друга група је била контролна група коју је сачињавало 26 инфертилних жена без ендометријалног полипа.

Резултати Резултати овог истраживања примарно указују да се концентрације TNF- α у серуму и у испирку утеруса инфертилних жена са ендометријалним полипом разликују пре и после хистероскопске полипектомије. У контролној групи, нису уочене значајне разлике у концентрацијама TNF- α у испирку утеруса и серуму пацијенткиња без ендометријалног полипа. Поређењем ове две групе уочена је статистички значајна разлика у нивоима TNF- α у испирку утеруса и серуму пацијенткиња.

Закључак Ендометријални полипи су један од узрока повећаних нивоа TNF- α у испирку утеруса и серуму пацијенткиња.

Кључне речи: цитокини, TNF- α , ендометријални полип, испирак утеруса, серум.

INTRODUCTION

Endometrial polyps are benign localized overgrowth of endometrial tissue, composed of glands, stroma, and blood vessels covered by epithelium. They develop once the endometrium becomes hypertrophic, which is a consequence of oestrogen stimulation [1, 2, 3]. They are diagnosed based on hysteroscopic, sonographic or hysterosonographic findings, after a polyp, which can vary in size, has been detected in the uterine cavity [4]. There is a large group of protein molecules that mediate and regulate intercellular communication both

in physiological and pathological conditions and these are called cytokines [5, 6, 7].

Cytokines are produced by different cells that induce chemotaxis, activation, proliferation, and differentiation of other cells. The endometrial tissue also produces cytokines. Cytokines have a significant role in the relationship between the decidua and the embryo during implantation [8, 9]. The most important physiological functions of cytokines include regulating cell growth and humoral immune response, regulation of hematopoiesis, controlling cell proliferation and differentiation, and wound healing [10–13]. Cytokines can act locally or systemically [14]. Cellular response to most cytokines is followed by gene expression, which results in the target cell gaining some new functions and can sometimes lead to cell proliferation [15]. Tumour necrosis factor- α (TNF α) belongs to the family of cytokines that are considered the most versatile. Not only does TNF α play a prominent role in the synthesis of DNA in the early stage of proliferation, but it also contributes to cell differentiation and tissue remodeling. This is essential in terms of embryonic attachment [16].

The aim of this paper is to present changes of tumour necrosis factor- α (TNF- α) levels in serum and uterine flushings of infertile female patients before and after hysteroscopic polypectomy.

METHODS

This was an open cross-sectional study, which included 82 infertile female patients aged 22–42 years. The patients were divided into two groups. Firstly, the experimental group comprised 56 infertile women who were diagnosed with endometrial polyps, whereas the second group was the control group of 26 infertile women who were not diagnosed with endometrial polyps. The study was conducted at the Obstetrics and Gynecology Clinic “Narodni front” in Belgrade and the Centre for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac between May 2012 and November

2013. The inclusion criteria were: a history of infertility (≥ 1 year), age (22–42 years), and regular menstrual cycles, not taking hormonal contraceptives or hormonal medications that could affect the endometrium for the last six months, an endometrial polyp detected by either two-dimensional (2D) ultrasound or saline infusion sonohysterography, no other endometrial pathology observed by a transvaginal ultrasound. The exclusion criteria for both groups of participants were presence of submucous myomas, endometriosis, endometrial cancer, uterine anomalies, history of uterus and fallopian tubes surgery, history of ovulation induction failure, age > 42 years. Furthermore, the research was approved by the Ethical Board of the Obstetrics and Gynecology Clinic “Narodni front” on 24th May, 2012; ref. No.: 04-24/3-1. The diagnosis of polyps was threefold. They were diagnosed by 2D transvaginal ultrasound examinations conducted in the first stage of the cycle, by hysterosonographic examinations, or during hysteroscopy itself. After the intervention, all patients were followed up for one month by taking the samples of peripheral venous blood and determining the levels of the same cytokines. [17] An ultrasound check-up was also performed. Hysteroscopy was performed in a fully equipped operating room using completely adapted instruments. The patients were under general anesthesia during hysteroscopy. Preoperative preparation involved complete diagnostics and routine tests: cervical and vaginal swabs; swabs for chlamydia, ureaplasma, and mycoplasma; Pap smear; 2D ultrasound; blood typing; hematology and biochemical analyses; preoperative assessment by an internist and an anesthetist; giving an informed consent for surgical treatment. The patients underwent surgical procedures prior to the mid-proliferative stage of the cycle, soon after menstrual bleeding had ceased. Hysteroscopy can be performed regardless of the phase of the cycle, providing the patients have been prepared by taking oral hormonal contraceptives. Diagnostic hysteroscopy was performed in the control group of infertile women to detect any pathological changes in the uterine cavity that could cause infertility. Endometrial biopsy was

performed in patients with normal hysteroscopic findings. The endometrial samples were histopathologically examined to detect any abnormalities of the endometrium. During diagnostic hysteroscopy, saline is used for uterine distension, which enables the uterine cavity to be visually examined with 30-degree angle lens. In this way, uterine horns, the fundus, anterior and posterior uterine walls, and the lateral sides of the uterus are visualized. At the level of the intrauterine horns, the hysteroscope allows a panoramic view of the uterine cavity, followed by the visualization of the cervical canal. Due to the muscular structure of uterine walls, the distension pressure of ≥ 40 mm Hg is required. Operative hysteroscopy was performed in the experimental group by using an operative continuous flow hysteroscope with a resectoscope that uses bipolar electrical current. The resectoscope has a cutting loop electrode, which is used for removing endometrial polyps. The procedure for determining the concentrations of TNF- α in uterine flushings was as follows: a Cusco's speculum was inserted once the patient was placed in the lithotomy position, which enabled the visualization of the cervix. After the cervix had been flushed with sterile saline, a pediatric 8F Foley catheter was placed through the cervical canal and into the uterine cavity. Then, 10 ml of sterile saline was injected through the catheter and immediately aspirated without contamination. Uterine flushings were centrifuged at 2,500 x g for 10 minutes and the supernatant was aspirated and stored at -20° C. Afterwards, the ELISA method was used to detect TNF- α and determine its concentration. This was conducted at the Centre for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac. When it comes to measuring serum TNF- α concentrations in the experimental group of patients, ~5 ml of peripheral venous blood was sampled one month before and one month after hysteroscopic surgery. The blood samples were collected into heparinized vacuum tubes and centrifuged at 2,500 x g for 10 minutes. The supernatant was aspirated and stored at -20° C. Again, the ELISA method was used to detect TNF- α and determine its

concentration. Sample size calculation was performed by using a formula for computing a large sample implemented in the PASS software 11.0. Descriptive and analytical statistics were used to process the obtained data. Descriptive methods included absolute and relative numbers, measures of central tendency (mean, median), and measures of dispersion (standard deviation, inverse variance). Analytical statistics methods involved comparison tests (parametric, non-parametric). All results were analyzed using SPSS 22.0 software package. The obtained results were compared to previously reported data. Finally, the conclusions were reached by analyzing and interpreting these results.

RESULTS

The study included 56 patients with polyposis (68.3%) and 26 patients without polyposis (31.7%). The age interval was 22 to 42 years. The mean age in the group of patients diagnosed with polyposis was 35.2 ± 5.1 , while the mean age in the group of patients without polyposis was 33.2 ± 4.9 years. No significant difference was observed regarding the age ($p = 0.061$). In the group of patients diagnosed with polyposis, there were 32 patients with primary infertility (57.1%); while in the group of patients without polyposis, there were 17 patients with primary infertility (65.4%). The statistical analysis revealed no significant differences between the two groups observed regarding primary infertility ($p = 0.479$). The serum concentrations of TNF- α before hysteroscopic polypectomy were significantly lower in the experimental group of patients than the serum concentrations of TNF- α detected after hysteroscopic polypectomy in the same patients. There was a statistically significant difference in the serum concentrations of TNF- α in infertile patients before and after hysteroscopic polypectomy ($p < 0.005$). This is shown in Table 1 and Figure 1.

The serum concentrations of TNF- α before hysteroscopic polypectomy were higher in the control group of infertile patients than the serum concentrations of TNF- α detected after

hysteroscopic polypectomy in the same patients. However, this difference was not statistically significant ($p > 0.005$). This is shown in Table 2 and Figure 2.

The serum concentrations of TNF- α before hysteroscopic polypectomy were higher in the experimental group of infertile patients than the concentrations of TNF- α detected in uterine flushings of the same patients. The difference was statistically significant ($p < 0.005$). This is shown in Table 3 and Figure 3.

The serum concentrations of TNF- α before hysteroscopy were lower in the control group of infertile patients than the concentrations of TNF- α detected in uterine flushings of the same patients. The difference was not statistically significant ($p > 0.005$). This is shown in Table 4 and Figure 4.

The correlation between the TNF- α concentrations detected in all three samples retrieved from the experimental group of patients was examined. The peak values show the sample self-correlation. The correlation values between the samples indicate that there is not a correlation between the detected concentration values of TNF- α . In clinical terms, this means that polyps are associated with endometrial changes even after they have been removed. However, this does not indicate a correlation with serum either before or after polypectomy. This is shown in Table 5 and Figure 5.

The correlation between TNF- α concentrations in all three samples retrieved from the control group of patients was examined. The peak values show the sample self-correlation. The correlation values between the samples indicate that there is a correlation between the detected concentration values of TNF- α , which shows that the detected values are in accordance with similar statistical distributions. In clinical terms, this means that post-hysteroscopy concentration values of TNF- α in the endometrium and serum show a correlating distribution. The obtained results show a correlation between uterine flushings

and serum prior to hysteroscopy. There is also a high correlation between uterine flushings and serum after hysteroscopy. This is shown in Table 6 and Figure 6.

DISCUSSION

Endometrial polyps are among the factors that are linked to certain conditions including infertility and pregnancy loss in the early stages. The frequency of polyps in overall female population is 9–25% [18]. Even though polyps are asymptomatic in many cases, they can result in menstrual cycle disorders (e.g. intermenstrual bleeding). It has been proved that endometrial polyps can lead to infertility and early pregnancy loss. Nevertheless, the pathophysiological processes related to infertility caused by polyps have not been completely elucidated yet. It is believed that polyps may be the cause of abnormal bleeding, thus affecting the endometrial environment or they can have a negative impact on implantation conditions [19, 20]. It is assumed that infertility can be caused by a polyp of 1 cm in diameter. Uterine cavity assessment and endometrial polyp removal are routinely performed in infertile women. There has been evidence suggesting that hysteroscopic polypectomy resulted in increased pregnancy rates in infertile patients who had undergone the surgical procedure [21]. The human endometrium produces cytokines that act as important mediators between the embryo and decidua in the process of implantation. TNF- α belongs to the family of cytokines that are considered to be the most versatile. Not only does TNF α play a prominent role in the synthesis of DNA in the early stage of proliferation, but it also contributes to cell differentiation and tissue remodeling. [22]. Furthermore, TNF- α facilitates apoptotic processes, which initiates menstrual bleeding [23, 24]. In spite of infertility being perceived as a possible consequence of endometrial polyps, the fact is that the influence of endometrial polyps on endometrial implantation factors has not been sufficiently investigated yet. Based on the samples obtained before and after hysteroscopic polypectomy, the present

study has shown that endometrial polyps found inside the uterine cavity affect TNF- α concentrations in both uterine flushings and serum of infertile women. The TNF- α concentrations obtained from the serum after hysteroscopic polypectomy were significantly higher in comparison to the serum concentrations of TNF- α before hysteroscopic polypectomy. These results are in line with previously reported findings of other authors [8]. The authors were able to prove that TNF- α secretion increased during the menstrual cycle after polypectomy had been performed and that it reached its peak during the mid-luteal menstrual cycle phase. TNF- α has multiple functions and its varying concentrations in different phases of the cycle suggest that it has an impact on the endometrium and has a complex role in the preimplantation of the embryo, which is a prerequisite for a successful implantation [22]. This is why it is important to follow up TNF- α concentrations after polypectomy. Apart from fostering DNA synthesis, TNF- α also improves cell differentiation and endometrial tissue remodeling. This is critical for a successful implantation. Abnormal TNF- α expression may further aggravate infertility linked to polyps and cause pregnancy loss in the early stages. Moreover, the mechanism behind a lower TNF- α synthesis caused by endometrial polyps is still not evident. What differentiates endometrial polyps from the surrounding endometrium is a massive fibrous stroma along with thick-walled dilated blood vessels. Such abnormal endometrial architecture can affect implantation regulators, i.e. it can result in their impaired secretion [25, 26]. It is important to point out that in the stromal component of endometrial polyps there is a lower number of hormone receptors. Therefore, the glands and stroma of polyps do not respond to progesterone stimulation, which may be the cause of abnormal secretion of progesterone in the endometrium [27, 28, 29]. A study that measured TNF- α concentration in uterine flushings of 12 patients before and after hysteroscopic polypectomy showed an increase in TNF- α concentrations after polyp removal with TNF- α values reaching the peak in the mid-luteal menstrual cycle phase [25]. These

results are in line with previously reported findings by other authors [22]. There is a limited number of foreign publications dealing with this subject. No studies examining TNF- α concentration in uterine flushings and serum of infertile women with and without endometrial polyps have been published in Serbia. Similarly, no studies examining the effect of polypectomy in relation to TNF- α concentration in uterine flushings and serum have been published in Serbia. The limitation of the previously reported studies including the present study is the small sample size.

CONCLUSION

TNF- α values in uterine flushings and serum before a surgical procedure were significantly higher in patients diagnosed with endometrial polyps in comparison to the TNF- α values obtained from women who were not diagnosed with endometrial polyps. TNF- α concentration in uterine flushings and serum of women diagnosed with endometrial polyps were significantly lower after surgery. TNF- α concentration in the group of women without endometrial polyps, i.e. the control group, were not significantly different before and after hysteroscopy. Furthermore, no significant difference was observed in the serum TNF- α concentrations in infertile patients who had undergone hysteroscopy in comparison to the infertile women who had no endometrial polyps.

Conflict of interest: None declared.

REFERENCES

1. Shokeir TA, Shalan HM, El-Shafei MM. Significance of endometrial polyps detected hysteroscopically in eumenorrheic infertile women. *J Obstet Gynaecol Res.* [Internet] 2004 April [Cited 2019 Nov 11]; 30(2):84-9. Available from: <http://https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15009608>, DOI: [10.1111/j.1447-0756.2003.00163.x](https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2003.00163.x).
2. Ciebiera M, Włodarczyk M, Zgliczyńska M, Łukaszuk K, Męczekalski B, Kobierzycki C, et al. The Role of Tumor Necrosis Factor α in the Biology of Uterine Fibroids and the Related Symptoms. *Int J Mol Sci.* [Internet] 2018 Dec 4 [Cited 2019 Nov 11];19(12). Available from : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30518097> DOI:10.3390/ijms19123869.
3. Ciebiera M, Włodarczyk M, Wrzosek M, Wojtyła C, Błażej M, Nowicka G, et al. TNF- α serum levels are elevated in women with clinically symptomatic uterine fibroids. *Int J Immunopathol Pharmacol.* [Internet] 2018 Jan-Dec [Cited 2019 Nov 11]; 32:2058738418779461. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29809057> DOI: [10.1177/2058738418779461](https://doi.org/10.1177/2058738418779461).
4. Wethington SL, Herzog TJ, Burke WM, Sun X, Lerner JP, Lewin SN, et al. Risk and predictors of malignancy in women with endometrial polyps. *Ann Surg Oncol.* [Internet] 2011 Dec [Cited 2019 Nov 11];18(13): 3819–23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21701931> DOI: [10.1245/s10434-011-1815-z](https://doi.org/10.1245/s10434-011-1815-z).
5. [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.* [Internet] 2003 Dec 10 [Cited 2019 Nov 11];111(2): 197-203. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14597251> DOI: [10.1016/s0301-2115\(03\)00244-6](https://doi.org/10.1016/s0301-2115(03)00244-6).

6. Davizon-Castillo P, McMahon B, Aguila S, Bark D, Ashworth K, Allawzi A, et al. TNF- α -driven inflammation and mitochondrial dysfunction define the platelet hyperreactivity of aging. *J Blood*. [Internet] 2019 July 16 [Cited 2019 Nov 11]; 134 (9): 727–740. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article-abstract/134/9/727/260784/TNF-driven-inflammation-and-mitochondrial> DOI: [10.1182/blood.2019000200](https://doi.org/10.1182/blood.2019000200).
7. Koelink PJ, Bloemendaal FM, Li B, Westera L, Vogels EW, van Roest M, et al. Anti-TNF therapy in IBD exerts its therapeutic effect through macrophage IL-10 signalling. *J Gut*. [Internet] 2019 Sep 10 [Cited 2019 Nov 11]:gutjnl-2019. Available from: <https://gut.bmj.com/content/early/2019/09/20/gutjnl-2019-318264> DOI: [10.1136/gutjnl-2019-318264](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318264).
8. von Wolff M, Classen-Linke I, Heid D, Krusche CA, Beier-Hellwig K, Karl C, et al. Tumour necrosis factor- α (TNF- α) in human endometrium and uterine secretion: an evaluation by immunohistochemistry, ELISA and semiquantitative RT-PCR. *Mol Hum Reprod*. [Internet] 1999 Feb [Cited 2019 Nov 11]; 5(2):146-52. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10065870> DOI: [10.1093/molehr/5.2.146](https://doi.org/10.1093/molehr/5.2.146).
9. Uckan K, Sahin HG. Serum amyloid A, procalcitonin, highly sensitive C reactive protein and tumor necrosis factor alpha levels and acute inflammatory response in patients with hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count (HELLP) and eclampsia. *J Obstet Gynaecol Res*. [Internet] 2018 Mar [Cited 2019 Nov 11];44(3):440-447. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29345041> DOI: [10.1111/jog.13532](https://doi.org/10.1111/jog.13532).
10. Sheng Y, Li F, Qin Z. TNF Receptor 2 Makes Tumor Necrosis Factor a Friend of Tumors. *Front Immunol*. [Internet] 2018 May 28 [Cited 2019 Nov 11]; 9:1170. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5985372/> DOI: [10.3389/fimmu.2018.01170](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01170).

11. Zhang Z, [Lin G](#), Yan Y, Li X, Hu Y, Wang J, et al. Transmembrane TNF- α promotes chemoresistance in breast cancer cells. *J Oncogene*. [Internet] 2018 Mar 21 [Cited 2019 Nov 11]; 37:3456–3470. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41388-018-0221-4> DOI [10.1038/s41388-018-0221-4](https://doi.org/10.1038/s41388-018-0221-4).
12. Chen JL, Lobo-Chan AM, Chan RVP, Bhat P. Tumor Necrosis Factor-Alpha Inhibitory Therapy for Non-Infectious Autoimmune Uveitis. In: Rodriguez-Garcia A, Foster CS, editors. *Advances in the Diagnosis and Management of Uveitis* [Internet]. IntechOpen. 2019 Apr 2 [Cited 2019 Nov 11]. Peer reviewed chapter. Available from: <https://www.intechopen.com/books/advances-in-the-diagnosis-and-management-of-uveitis/tumor-necrosis-factor-alpha-inhibitory-therapy-for-non-infectious-autoimmune-uveitis> DOI: 10.5772/intechopen.82800.
13. Montfort A, Colacios C, Levade T, Andrieu-Abadie N, Meyer N, Ségui B. The TNF paradox in cancer progression and immunotherapy. *Front Immunol*. [Internet] 2019 July 31 [Cited 2019 Nov 11], 10:1818. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01818/full> DOI: 10.3389/fimmu.2019.01818.
14. Popescu M, Cabrera-Martinez B, Winslow GM. TNF- α Contributes to Lymphoid Tissue Disorganization and Germinal Center B Cell Suppression during Intracellular Bacterial Infection. *J Immunol*. [Internet] 2019 Nov 1 [Cited 2019 Nov 11]; 203(0):2415-2424. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31570507> DOI: 10.4049/jimmunol.1900484.
15. Okuda K, Sakumoto R, Okamoto N, Acosta TJ, Abe H, Okada H, et al. Cellular localization of genes and proteins for tumor necrosis factor- α (TNF), TNF receptor types I and II in bovine endometrium. *Mol Cell Endocrinol*. [Internet] 2010 Dec 15 [Cited 2019

Nov 11]; 330(1-2):41-8. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20705117> DOI: 10.1016/j.mce.2010.07.025.

16. Pei CZ, Kim YJ, Baek KH. Pathogenetic factors involved in recurrent pregnancy loss from multiple aspects. *Obstet Gynecol Sci.* [Internet] 2019 Jul 1 [Cited 2019 Nov 11]; 62(4):212-23. Available from:

<https://ogscience.org/DOIx.php?id=10.5468/ogs.2019.62.4.212> DOI:

10.5468/ogs.2019.62.4.212.

17. Sorak M, Devic A. Analysis of Glycodelin Levels Before and After Hysteroscopic Polypectomy in Infertile Patients. *SeR J Exp Clin Res.* [Internet] 2018 Oct 29 [Cited 2019 Nov 11], 19(3): 247-253. Available from:

<https://content.sciendo.com/view/journals/sjecr/19/3/article-p247.xml> DOI:

10.1515/sjecr-2017-0001.

18. [Rackow](#) BW, [Jorgensen](#) E, [Taylor](#) HS. Endometrial polyps affect uterine receptivity. *Fertil Steril.* [Internet] 2011 Jun 30 [Cited 2019 Nov 11]; 95(8): 2690–2. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21269620> DOI: 10.1016/j.fertnstert.2010.12.034.

19. McGurgan P, Taylor LJ, Duffy SR, O'Donovan PJ. Are endometrial polyps from premenopausal women similar to post-menopausal women? An immunohistochemical comparison of endometrial polyps from pre- and post-menopausal women. *Maturitas.* [Internet] 2006 Jun 20 [Cited 2019 Nov 11]; 54(3): 277-84. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16414216> DOI: 10.1016/j.maturitas.2005.12.003.

20. Ben-Nagi J, Miell J, Mavrellos D, Naftalin J, Lee C, Jurkovic D. Endometrial implantation factors in women with submucous uterine fibroids. *Reprod Biomed Online.* [Internet] 2010 Nov [Cited 2019 Nov 11]; 21(5):610–5. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20880745> DOI: 10.1016/j.rbmo.2010.06.039.

21. 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.* [Internet] 2008 May [Cited 2019 Nov 11]; 277(5): 395-9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17851673> DOI: 10.1007/s00404-007-0460-z.
22. von Wolff M, Thaler CJ, Strowitzki T, Broome J, Stolz W, Tabibzadeh S. Regulated expression of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion. *Mol Hum Reprod.* [Internet] 2000 Jul [Cited 2019 Nov 11]; 6(7):627-34. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10871650> DOI: 10.1093/molehr/6.7.627.
23. Almeida A, Correla-da-Silva G, Cepa M, Bell SC, Teixeira NA. Synergistic induction of apoptosis in primary rat decidual cells by INF- gamma and TNF. *Mol Reprod Dev.* [Internet] 2007 Mar [Cited 2019 Nov 11];74(3): 371-7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16967500> DOI: 10.1002/mrd20524.
24. Al Taweel AI, Hamed AM, Abdelrahman AMN , Hassan MNI ., Tumor Necrosis Factor-like Weak Inducer of Apoptosis: A Novel Serum Marker in Patients with Severe Alopecia. *Int J Trichol.* [Internet] 2019 May-Jun [Cited 2019 Nov 11];11(3):113-117. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31360039> DOI: 10.4103/ijt.ijt_9_19.
25. Ben-Nagi J, Miell J, Yazbek J, Holland T, Jurkovic D. The effect of hysteroscopic polypectomy on the concentrations of endometrial implantation factors in uterine flushings. *Reprod Biomed Online.* [Internet] 2009 Nov [Cited 2019 Nov 11]; 19(5): 737-44. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20021724> DOI: 10.1016/j.rbmo.2009.06.011.
26. La Vignera S, Condorelli R, Bellanca S, La Rosa B, Mousavi A, Busa B, et al. Obesity is associated with a higher level of pro-inflammatory cytokines in follicular fluid of woman

undergoing medically assisted procreation (PMA) programs. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. [Internet] 2011 Mar [Cited 2019 Nov 11]; 15: 267-73. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21528772> PMID: 21528772.

27. Nathani F, Clark TJ. Uterine polypectomy in the management of abnormal uterine bleeding: A systematic review. *J Minim Invasive Gynecol*. [Internet] 2006 Jul-Aug [Cited 2019 Nov 11]; 13(4): 260-8. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16825064> DOI:10.1016/j.imig2006.03.015.

28. Uglietti A, Buggio L, Farella M, Chiaffarino F, Dridi D, Vercellini P, et al. The risk of malignancy in uterine polyps: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. [Internet] 2019 Jun [Cited 2019 Nov 11]; 237:48-56. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31009859> DOI: 10.1016/j.ejogrb.2019.04.009.

29. Munro MG. Uterine polyps, adenomyosis, leiomyomas, and endometrial receptivity. *Fertil Steril*. [Internet] 2019 Apr [Cited 2019 Nov 11]; 111(4):629-640. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30929720> DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.02.008.

Table 1. Serum concentrations of TNF- α in the experimental group of patients before and after hysteroscopic polypectomy

Exp. group of patients	Mean value
Serum before hysteroscopy	15.6220 (10.48–28.06) [pg/ml]
Serum after hysteroscopy	22.7302 (13.57–40.79) [pg/ml]
t-test	Values
Hypothesis Mean difference	0
Df	110
t Stat	-6.946
P(T \leq t)	0.0001
T Critical two-tail	1.980

Figure 1. Serum concentrations of TNF- α in the experimental group of patients before and after hysteroscopic polypectomy

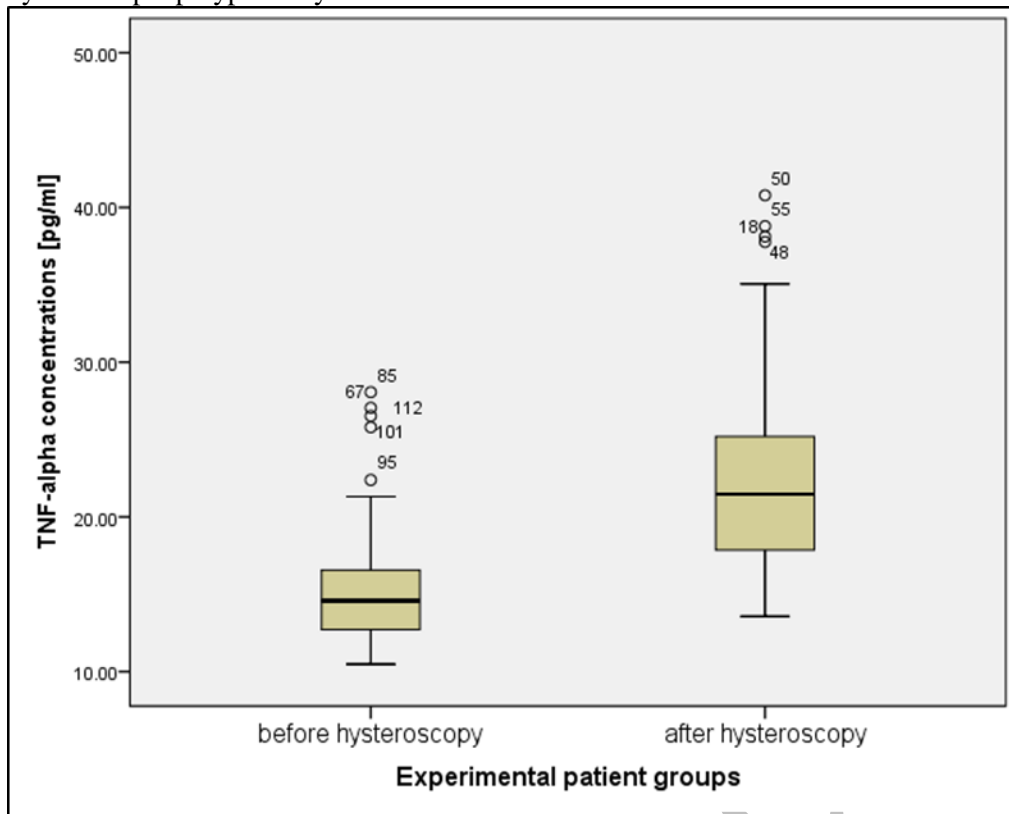


Table 2. Serum concentrations of TNF- α in the control group of infertile patients before and after hysteroscopy

Cont. group of patients	Mean value
Serum before hysteroscopy	13.5908 (6.70-29.26) [pg/ml]
Serum after hysteroscopy	14.5127 (4.12-42.56) [pg-ml]
t-TEST	Values
Hypothesis Mean difference	0
Df	110
t Stat	-0.917
P(T <=t)	0.361
T Critical two-tail	2.871

Figure 2. Serum concentrations of TNF- α in the control group of infertile patients before and after hysteroscopy

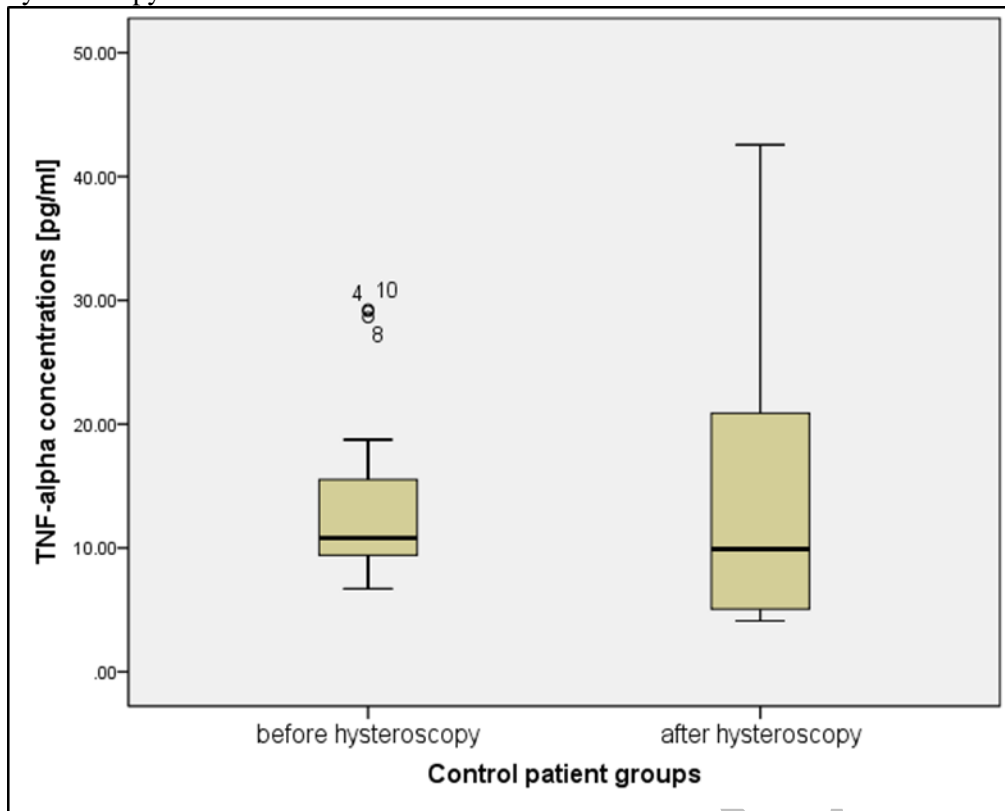


Table 3. Concentrations of TNF- α in serum and uterine flushings in the experimental group of infertile patients before hysteroscopic polypectomy

Exp. group of patients	Mean value
Serum before hysteroscopy	15.6220 (10.48-28.06) [pg/ml]
Flushings	12.6046 (6.43.43-23.81) [pg/ml]
t-TEST	Values
Hypothesis Mean difference	0
Df	110
t Stat	4.450
P(T <=t)	0.0001
T Critical two-tail	1.980

Figure 3. Concentrations of TNF- α in serum and uterine flushings in the experimental group of infertile patients before hysteroscopic polypectomy

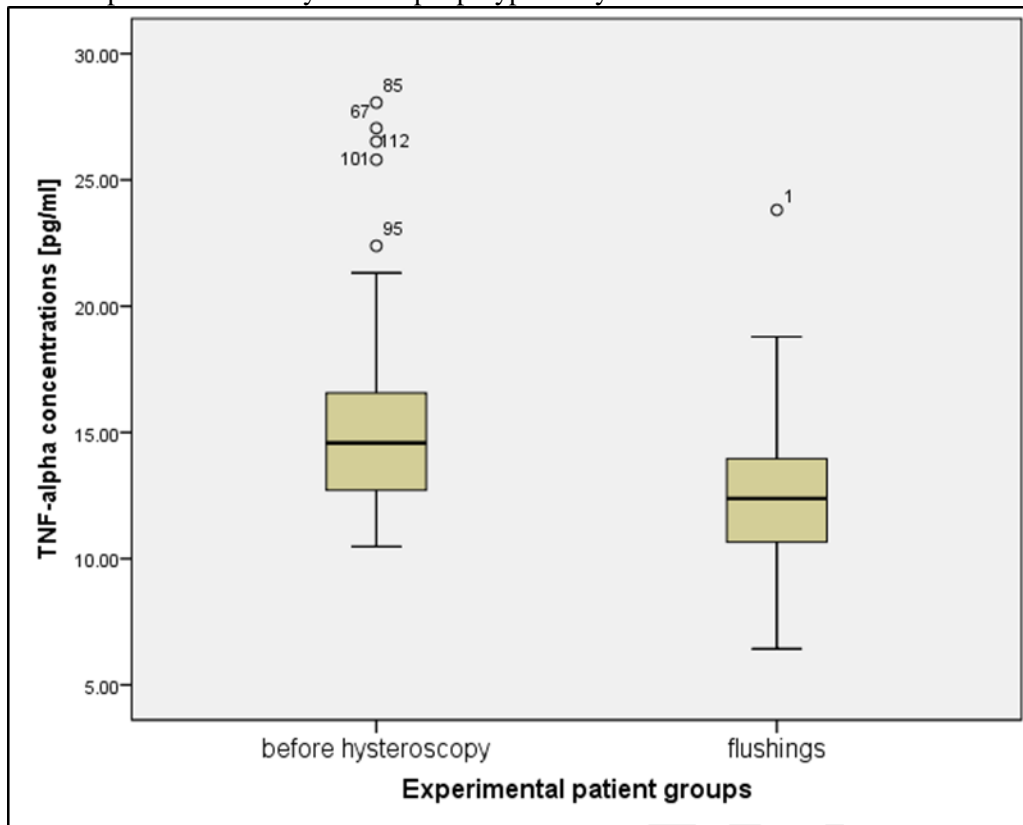


Table 4. Concentrations of TNF- α in serum and uterine flushings in the control group of infertile patients before hysteroscopy

Cont. group of patients	Mean value
Serum before hysteroscopy	13.5908 (6.70-29.26) [pg/ml]
Flushings	15.6673 (8.31-27.61) [pg/ml]
t-TEST	Values
Hypothesis Mean difference	0
Df	47
t Stat	-1.140
P(T <=t)	0.260
T Critical two-tail	2.011

Figure 4. Concentrations of TNF- α in serum and uterine flushings in the control group of infertile patients before hysteroscopy

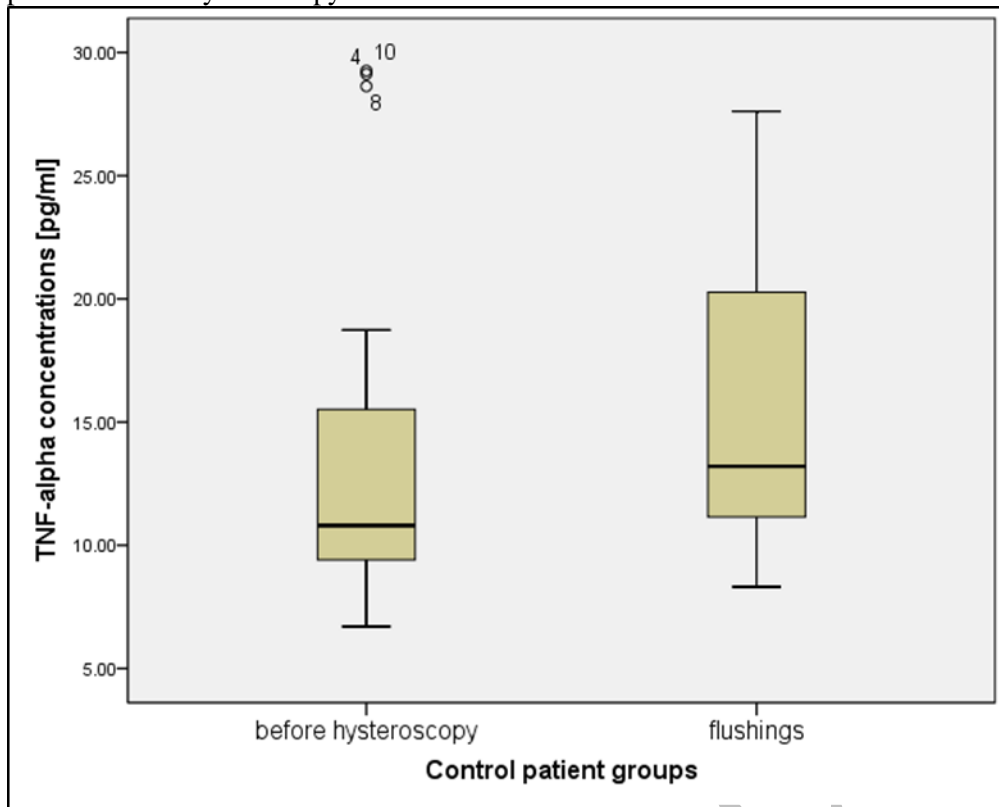


Table 5. Correlation of TNF- α concentrations in uterine flushings and serum in the experimental group of infertile patients before and after hysteroscopic polypectomy

Pearson correlations	Flushings (Exp.)	Serum before (Exp.)	Serum after(Exp.)
Flushings (Exp.)	1	-0.18	0.108
Serum before (Exp.)	-0.18	1	-0.132
Serum after(Exp.)	0.108	-0.132	1

Paper accepted

Figure 5. Correlation of TNF- α concentrations in uterine flushings and serum in the experimental group of infertile patients before and after hysteroscopic polypectomy

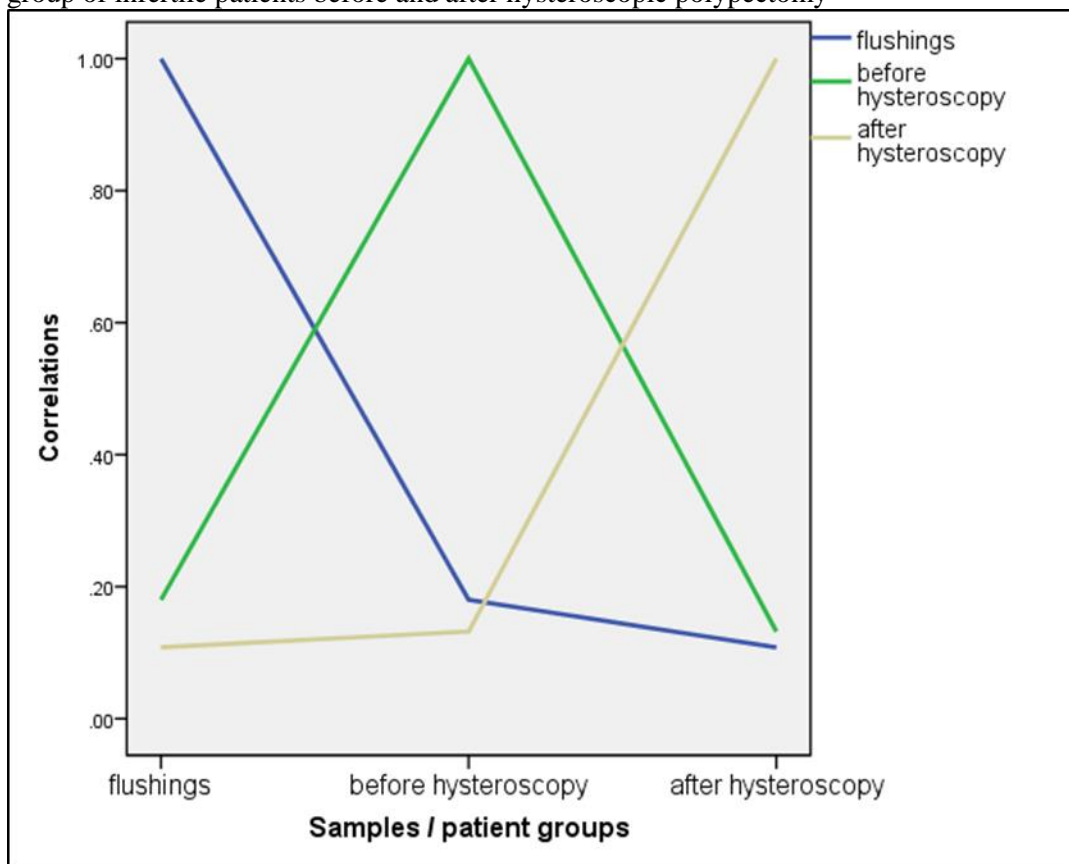
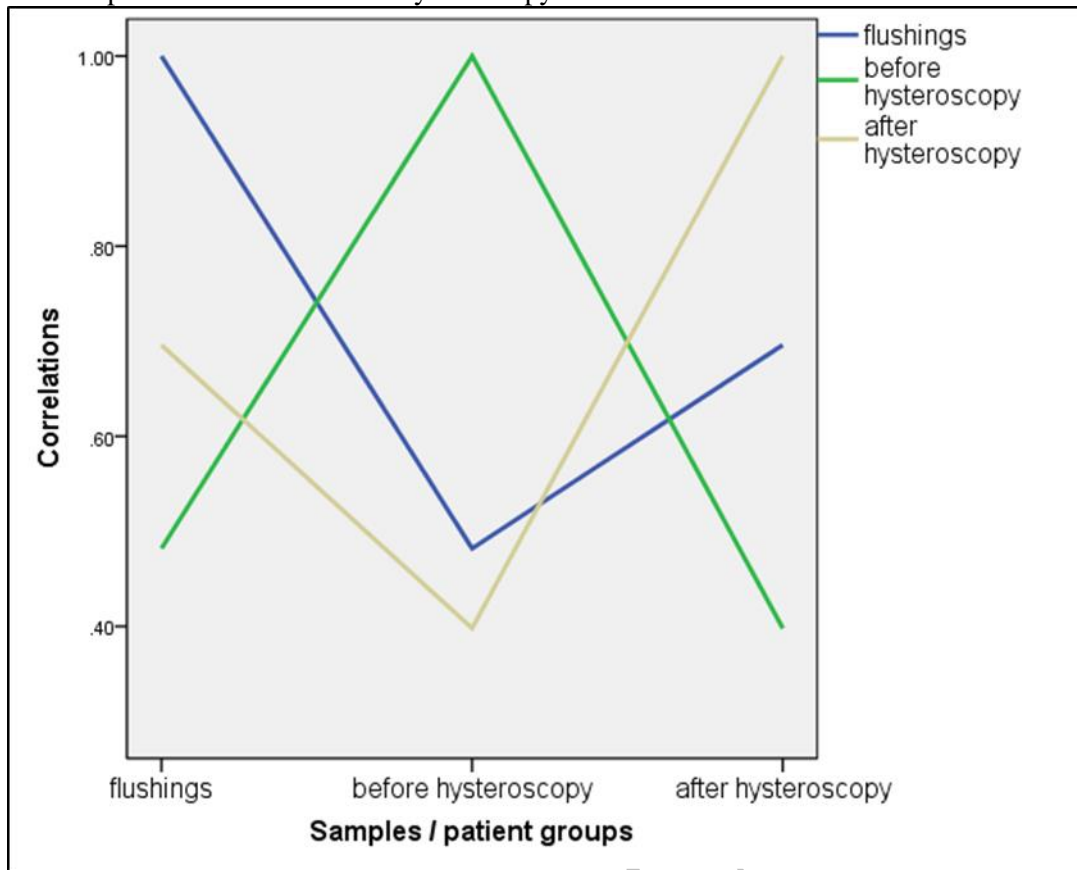


Table 6. Correlation of TNF- α concentrations in uterine flushings and serum in the control group of infertile patients before and after hysteroscopy

Pearson correlations	Flushings (Control)	Serum before (Cont.)	Serum after (Cont.)
Flushings (Cont.)	1	0.482	0.696
Serum before (Cont.)	0.482	1	0.398
Serum after (Cont.)	0.696	0.398	1

Paper accepted

Figure 6. Correlation of TNF- α concentrations in uterine flushings and serum in the control group of infertile patients before and after hysteroscopy



ANALYSIS OF GLYCODELIN LEVELS BEFORE AND AFTER HYSTEROSCOPIC POLYPECTOMY IN INFERTILE PATIENTS

Marija Sorak¹ and Ana Devic^{2*}

¹Department of Gynecology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

²Clinical Hospital Center Zemun, Hospital for Gynecology and Obstetrics, Serbia

*Authors Marija Sorak and Ana Devic contributed equally to this study

ANALIZA NIVOVA GLIKODELINA PRE I POSLE HISTEROSKOPSKE POLIPEKTOMIJE KOD INFERTILNIH PACIJENTKINJA

Marija Šorak¹ i Ana Dević^{2*}

¹Katedra za ginekologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

²Kliničko bolnički centar Zemun, Bolnica za ginekologiju i akušerstvo, Srbija

*Autori Marija Šorak i Ana Dević su podjednako učestvovali u izradi ove studije

Received / Priljen: 13. 12. 2016.

Accepted / Prihvaćen: 17. 01. 2017.

ABSTRACT

Glycodelin (or placental protein 14) is a glycoprotein located in the glandular and thin epithelium of the endometrium. It is considered an important factor in the implantation process, and its traces can be found in elevated concentrations in the uterine flushing obtained at the time of implantation, while in the proliferative phase of the cycle, its levels are low. A certain concentration has been found to inhibit the binding of spermatozooids to the zona pellucida of the oocytes therefore, it effects conception. It has a role in angiogenesis and is in high concentrations in the tissues of both benign and malignant gynaecological tumours.

The aim of this study is to analyse and display the glycodelin level changes before and after hysteroscopic polypectomy in infertile patients in the uterine flushing fluid and serum. This survey covers 80 infertile patients, who were divided into two groups. The first group, the experimental group, consisted of 50 infertile patients with endometrial polyps, and a control group of 30 infertile patients without endometrial polyps was also included.

The results primarily indicate the existence of changes in glycodelin levels preoperatively in the flushing and venous blood in infertile patients with endometrial polyps compared with the levels after surgery. In the control group of patients, no significant change in the glycodelin levels was detected in the flushing and venous blood. When comparing these two groups, statistically significant differences in the glycodelin levels in the flushing and venous blood were noted. We conclude that the presence of endometrial polyps in the cavum uteri affects the increase in the glycodelin concentration in the flushing fluid and in the plasma. Increased glycodelin concentrations complicate fertilization and implantation.

Keywords: cytokine, glycodelin, endometrial polyp, flushing and serum.

SAŽETAK

Glikodelin (ili placentni protein 14) je glikoprotein koji se nalazi u glandularnom i površinskom epitelu endometrija. Smatra se da je jedan od bitnih faktora u procesu implantacije i nalazi se u povišenim koncentracijama u ispirku uterusa dobijenom u vreme implantacije, dok su u proliferativnoj fazi ciklusa njegove vrednosti niske. U određenoj koncentraciji nađeno je da inhibira vezivanje spermatozoida za zonu pelucidu ovuuma, tako da utiče i na koncepciju. Ima ulogu u angiogenezi, te se nalazi u povišenim koncentracijama u tkivu i benignih i malignih ginekoloških tumora.

Cilj ovog rada je analiza i prikaz promena nivoa glikodelina, pre i posle histeroskopske polipektomije kod infertilnih pacijentkinja, u ispirku uterusa i serumu. Istraživanje obuhvata 80 infertilnih pacijentkinja, koje su podeljene u dve grupe. Prvu grupu, eksperimentalnu, čini 50 infertilnih pacijentkinja sa polipom endometrija, a kontrolnu grupu 30 infertilnih pacijentkinja bez polipa endometrija.

Dobijeni rezultati prvenstveno ukazuju na postojanje promena nivoa glikodelina preoperativno, i u ispirku i u venskoj krvi, kod infertilnih pacijentkinja sa endometrijalnim polipom u odnosu na nivo nakon operativnog zahvata. U kontrolnoj grupi pacijentkinja nema značajnih promena nivoa glikodelina u ispirku i venskoj krvi. Poređenjem ove dve grupe prisutne su statistički značajne razlike u nivoima glikodelina i u ispirku i u venskoj krvi. Možemo zaključiti da prisustvo endometrijalnog polipa u kavumu uterusa utiče na porast koncentracije glikodelina, i u ispirku i u plazmi. Povećana koncentracija glikodelina otežava i oplodnju i implantaciju.

Ključne reči: citokin, glikodelin, endometrijalni polip, ispirak i serum.





INTRODUCTION

Infertility is a problem that affects approximately 80 million couples worldwide. It is believed that approximately 15% of the general population is affected by this problem. Endometrial polyps occur when the endometrium is hypertrophic, due to oestrogen stimulation (1). A diagnosis is based on sonographic, hysteroscopic or hysterosonographic findings, when a polyp is spotted in the cavum uteri (2).

Cytokines are a large family of protein molecules that function as a mediator and regulator of cellular communications, in both physiological and pathological conditions (3). Different cells produce a variety of cytokines, which act on the chemotaxis, activation, proliferation and differentiation of other cells. Cells that secrete the highest amounts of cytokines are leukocytes. Glycodelin (or placental protein 14) is a cytokine and is a 28kDa glycoprotein that contains 180 amino acids (4). Glycodelin is encoded by a single gene that is located in the chromosomal region 9q34; it is derived from the endometrium. It consists of a single (GalNAc β 1-4GlcNAc) oligosaccharide series and is located in the glandular and surface epithelium of the endometrium. Glycodelin is the primary product during the secretion phase of endometrial cells. Maximum levels are produced in the secretory endometrium and early pregnancy decidua. It is produced in the lumen of the endometrial glands and can be detected in circulation. The highest concentration of glycodelin is produced during the secretory phase of the endometrial cycle, while at the early proliferative phase, its concentration is low. There are strong indicators that, in conjunction with other cytokines, glycodelin represents an important factor that facilitates implantation (5). It is found in elevated concentrations in the uterine flushing obtained at the time of implantation. During conception, glycodelin levels remain elevated. Glycodelin has an immunosuppressive effect and probably has a protective role in the preservation of embryos from natural killer (NK) cell destruction. Additionally, it has been found that in certain concentrations, glycodelin inhibits the binding of sperm to the zona pellucida of the oocytes therefore, it effects conception. Recently, it has been shown that it plays a role in angiogenesis and is elevated in the tissues of both benign and malignant gynaecological tumours (6).

MATERIAL AND METHODS

The survey was conducted as a study of 80 infertile patients. The two groups of female patients were compared. The first group of patients, the experimental group, consisted of 50 infertile patients diagnosed with endometrial polyps. The second group was a control group of 30 infertile patients without endometrial polyps. The research was carried out at the Gynaecology and Obstetrics Clinic "National Front" in Belgrade, from May 2012 to November 2013, and in the Center for Molecular Medicine and Test-

ing of Stem Cells, Faculty of Medical Sciences, in Kragujevac.

This study was conducted on patients with childbearing potential (aged 20-43 years) who were diagnosed with endometrial polyps as a cause of infertility. The polyp diagnoses were determined by transvaginal ultrasound examinations during the first phase of the cycle, by hysterosonographic examinations, or during an actual hysteroscopy in patients with suspected endometrial polyps, based on anamnesis. In addition to the group who participated in the study, there was a control group of patients of the same age who were treated for infertility did not have endometrial polyps. The patients were evaluated for one month after the intervention in terms of peripheral venous blood sampling, cytokine level determinations, and control ultrasound examinations.

Diagnostic and operative hysteroscopies were performed under general anaesthesia in the operating room with appropriate equipment and instruments. The preoperative preparation included a complete diagnosis and the necessary routine analyses including cervical and vaginal smears, chlamydia, mycoplasma and ureaplasma evaluations, Pap test, ultrasound, blood typing, blood count and biochemical analysis with an anaesthetic examination and surgical treatment approval. Surgical procedures were performed in infertile patients to mid-proliferative phase immediately after menstrual bleeding.

Hysteroscopic examination and intervention-polypectomy are done during the first phase of the menstrual cycle (9). During hysteroscopy, the uterine cavity is viewed at a 30-degree angle, which allows for visualization of both mouths of the fallopian tube, fundus, anterior and posterior wall of the uterus as well as the lateral sides of the uterine cavity (10). At the height of the internal uterine mouth with the hysteroscope, a panoramic image of the uterine cavity is displayed, and the presence of any pathological findings, such as endometrial polyps (which are often observed), submucosal fibroids, septa, and adhesions, can be easily visualized. Polyps are removed with hysteroscopic graspers and hysteroscopic scissors followed by electrocoagulation of their base (11).

To determine the glycodelin (PP14) concentration in the uterus flushing during hysteroscopic polypectomy, the operation sequence was as follows: 10 ml injection of saline into the cavum uteri and immediate aspiration without contamination. Then, the flushing was centrifuged at 2500 rpm for 10 minutes. The supernatant was collected and stored at -20° C. The glycodelin concentration was determined with the ELISA method at the Center for Molecular Medicine and Testing of Stem Cells, at the Faculty of Medical Sciences in Kragujevac (15).

To determine the glycodelin (PP14) serum concentration, approximately 5 ml of peripheral venous blood was taken from patients in both groups, before hysteroscopic surgery and one month after surgery. The sample processing methodology is as follows: the blood was collected in a vacutainer with heparin and centrifuged for



10 minutes at 2500 rpm. The supernatant was collected and stored at -20 ° C. Detection and determination of the glycodelin concentration was then determined with the ELISA method (16).

The study inclusion criteria were women with endometrial polyps who were verified as 20-43 years of age and treated for primary or secondary infertility as well as infertile women without endometrial polyps of the same age (16).

Criteria for exclusion from the study for both groups of respondents were the existence of submucosal fibroids, endometriosis, endometrial cancer, uterine anomalies, and patients who had surgery on their uterus and tubes, as well as patients with a previous failed ovulation following stimulation.

Statistical data analysis was based on use of the t-test. As the sample distribution in this study (with a minimum group of 30 patients) was mildly leptokurtic and skewed, for this study, t-tests were successfully implemented, and even for similar mean values of the sample, the t-test provided more accurate results than the Wilcoxon Mann-Whitney test (17).

RESULTS

We analysed the glycodelin levels in the uterus flushing and venous blood from both test and control group patients (8). The levels of this cytokine were examined before and one month after hysteroscopic polypectomy.

Statistical analysis of the patient groups was based on testing the null hypothesis with t-tests of group differences according to the mean value and variance (7). The groups were significantly different if $p < 0.05$.

Figure 1 shows the glycodelin values in the uterine flushing from patients with endometrial polyps compared with

the control group during surgery. It can easily be seen that the glycodelin levels in the uterine flushing were significantly decreased in the control group subjects compared with the experimental group. Using the t-test and analysis of the obtained results, it can be concluded that there was a statistically significant difference ($t=1.992$; $p=0.0144$).

Analysis of the venous blood glycodelin levels in the endometrial polyp patients is shown in Figure 2. Notably, the venous blood glycodelin levels that were collected a month after hysteroscopic polypectomy were significantly lower. By applying the t-test, it can be concluded that the groups differ statistically ($t=2.01$; $p=0.00017$).

The venous blood glycodelin values in the endometrial polyp and control group patients before hysteroscopic polypectomy are shown in Figure 3. Applying a t-test leads to the conclusion that the groups differ statistically and that the glycodelin levels were significantly higher in the endometrial polyp patients ($t=1.996$; $p=0.0036$).

Figure 4 provides the venous blood glycodelin values in the control group before and one month after hysteroscopy. By applying the t-test, it can be concluded that the groups did not differ statistically, i.e., the glycodelin levels did not significantly differ in the control group before and after hysteroscopy ($t=2.048$; $p=0.851$).

The venous blood glycodelin values in patients one month after hysteroscopic polypectomy and in the control group one month after hysteroscopy are shown in Figure 5. These levels were found to not be significantly different using the t-test ($t=2.004$; $p=0.838$).

DISCUSSION

The glycodelin concentrations in the flushing and serum were significantly higher in patients with endometrial polyps in comparison with the control group. A month af-

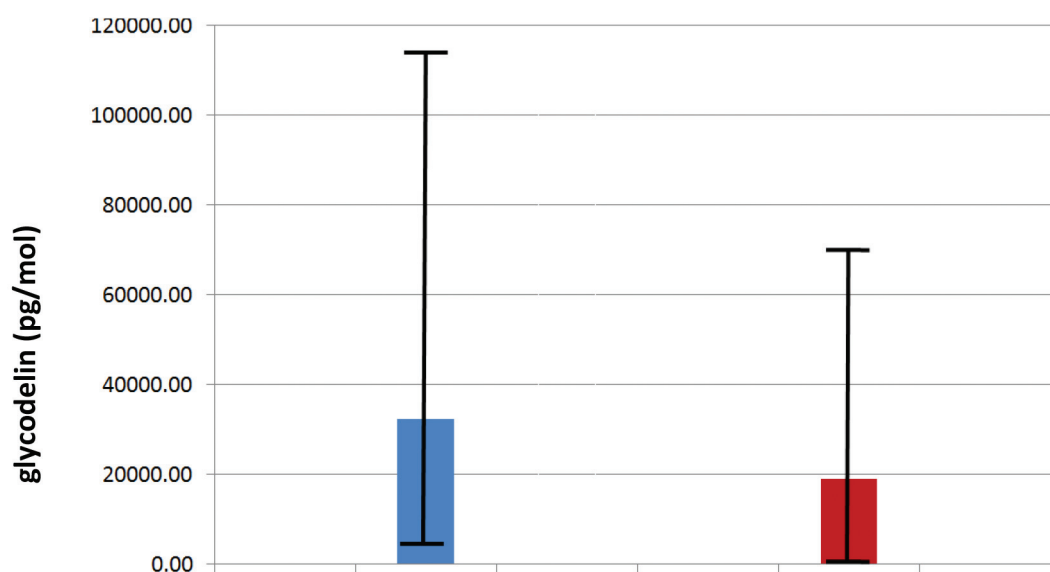


Figure 1. Glycodelin average values in the uterine flushing from patients with endometrial polyps compared with control group patients during hysteroscopy. These are the t-test parameters, the critical average values for accepting the null hypothesis.

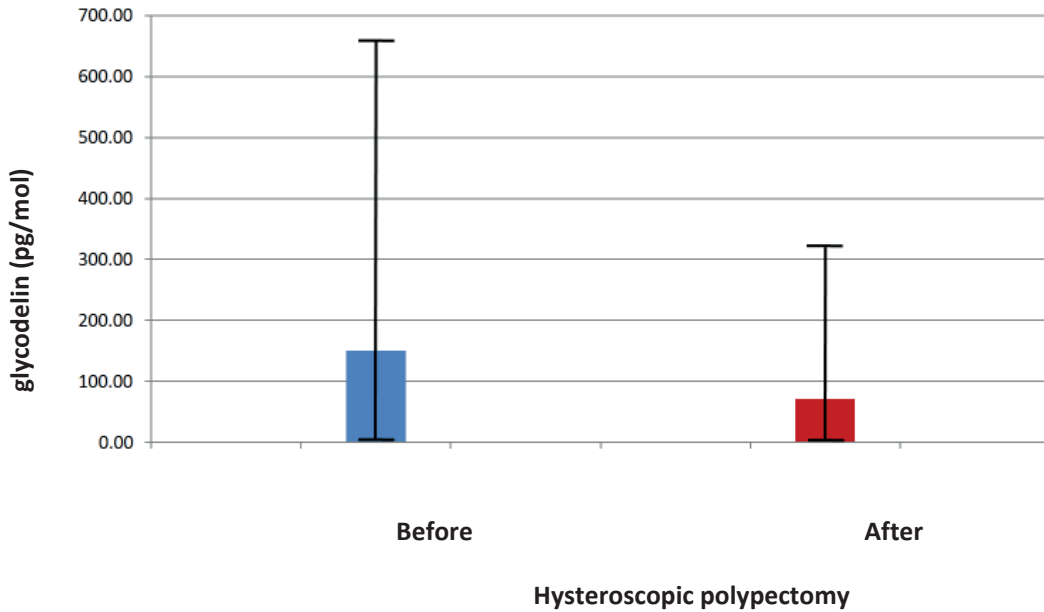


Figure 2. Venous blood glycodelin average values in patients with endometrial polyps before hysteroscopic polypectomy and one month after surgery.

ter hysteroscopic polypectomy, the serum glycodelin levels were reduced in the experimental group and reached values very similar to the those of the control group. These results were confirmed in most studies that examined glycodelin levels in the uterine flushing and plasma of infertile patients.

Endometrial polyps are common in infertile patients who are preparing for in vitro fertilization, and their presence does not affect pregnancy rates, but there is a higher risk of pregnancy loss in these patients (18, 19). Polyps are endometrial tissue growths covered with epithelium.

They have glands, stroma and blood vessels that contribute to increased glycodelin secretion in the cavum uteri (12, 13). The common assumption is that glycodelin may “leak” from blood vessels near polyps and dissolve in saline, which is used during hysteroscopy uterine flushing (14, 20). Glycodelin levels in uterus flushing fluid are then determined using ELISA measurements, and in most surveys, it was confirmed that the values were significantly higher in uterine flushing with endometrial polyp or submucosal fibroids compared with the control group (21).

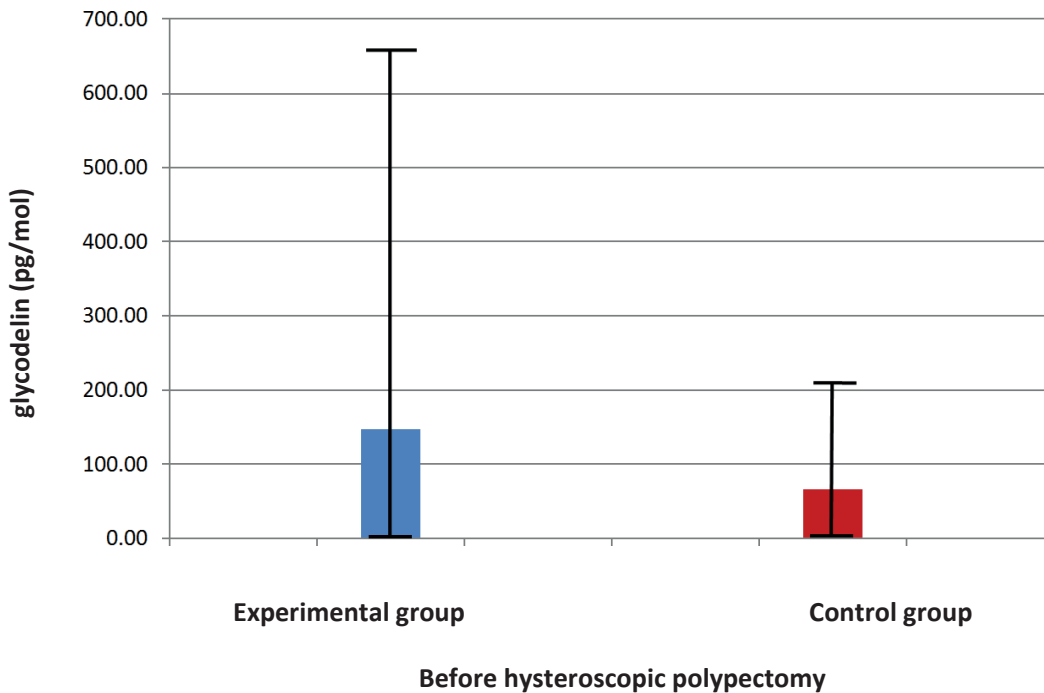


Figure 3. Venous blood glycodelin average values in the endometrial polyp and control group patients before hysteroscopic polypectomy.

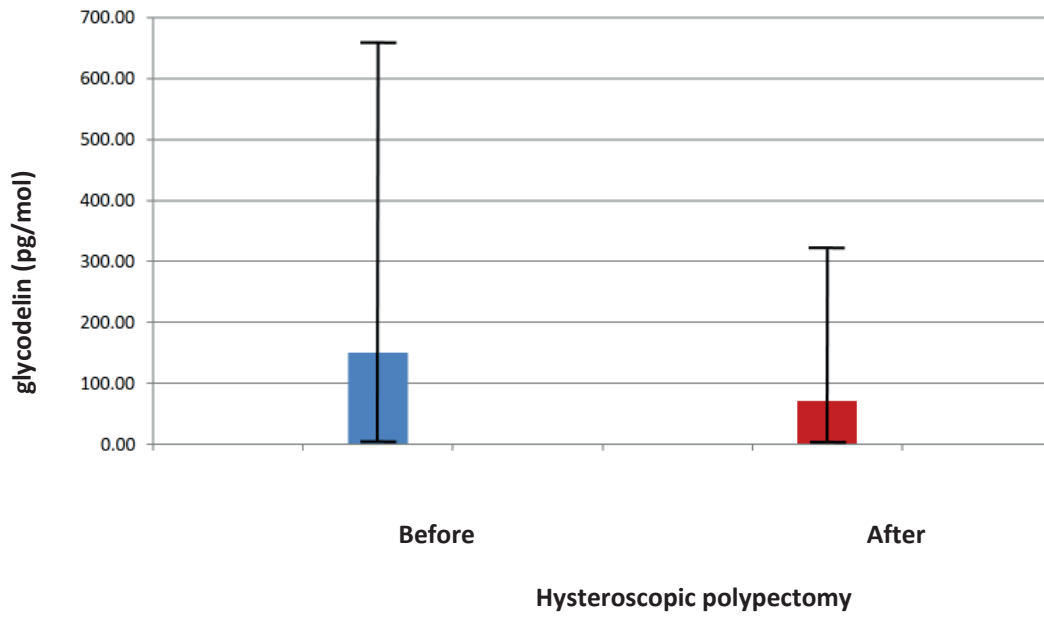


Figure 4. The venous blood glycodeilin average values in the control group patients before hysteroscopy and one month after surgery.

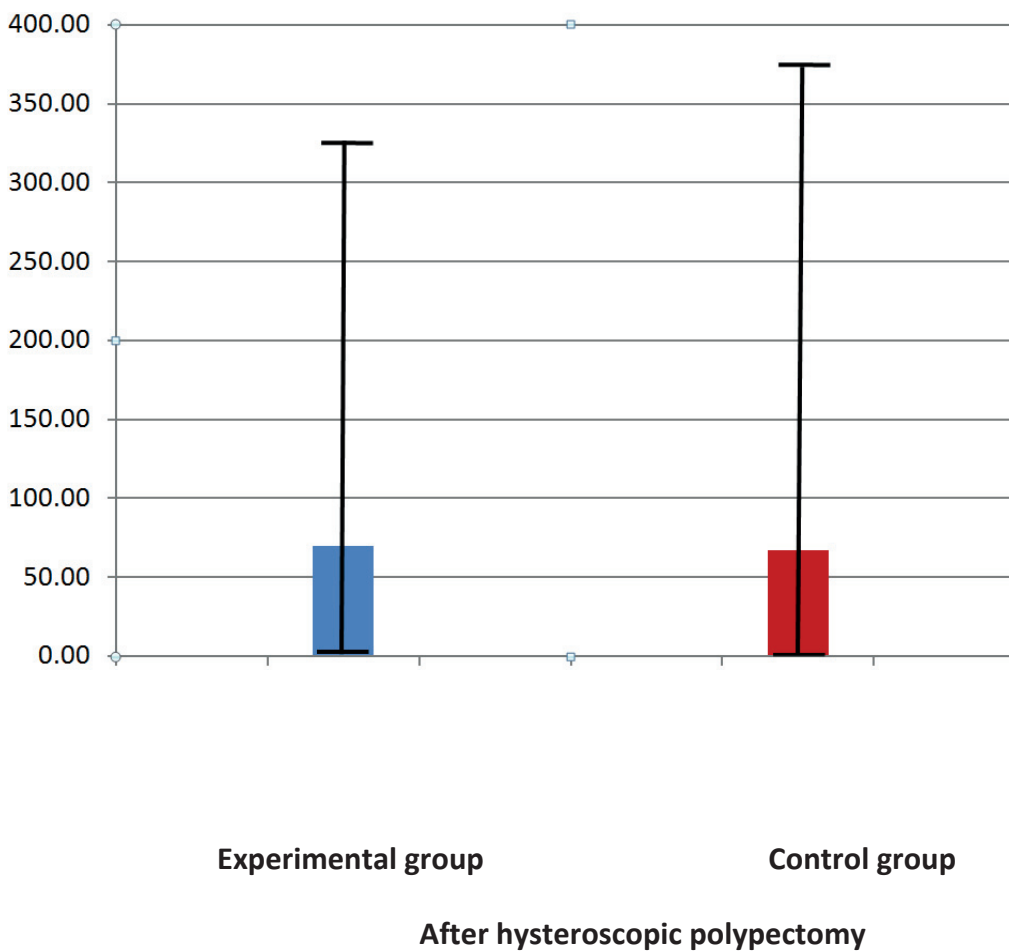


Figure 5. Venous blood glycodeilin average values in the endometrial polyp and control group patients one month after surgery.



Glycodelin contributes to polyp growth by encouraging neovascularization and thus allowing a better flow of the nutrients necessary for polyp growth. It can be detected in the circulation; therefore, in various studies, its concentration in plasma was often determined. In most of these studies, elevated glycodelin levels in the plasma of patients with endometrial polyps was observed compared with control group patients (22).

It has been proven that glycodelin inhibits sperm and oocyte binding as well as NK cell activity (23). Glycodelin values are very low in the period 6 days before and 5 days after ovulation (perioviulatory period). Thus, low glycodelin levels allow for fertilization. Then, 6 days after ovulation, glycodelin secretion increases significantly and becomes a key to the formation of a receptive endometrium and suppresses NK cell activity. The results of this study indicate that the glycodelin levels measured during the middle and late proliferative phase of the menstrual cycle were elevated when they should have been at their lowest values, or even absent; however, they significantly affected fertilization and altered endometrial receptivity in patients with endometrial polyps (20).

Changes in glycodelin concentrations are registered in the endometrium, or uterine flushing and are correlated with the values obtained in the serum of the experimental group patients. We conclude that changes in the glycodelin values can be tracked by just specifying the venous blood in patients in whom a hysteroscopic polypectomy was performed and can thus monitor the success of the operational procedures and limit possible polyp recurrences by avoiding administering complicated uterus flushings, which require preoperative preparation and general anaesthesia during a hysteroscopy.

CONCLUSION

Two groups of infertile patients were analysed, one with endometrial polyps and a second control group that did not have polyps. The glycodelin values in the uterus flushing fluid and in the venous blood before surgery were significantly higher in the patients with endometrial polyps. The uterus flushing fluid and venous blood glycodelin values in the polyp group were significantly decreased one month after surgery. The glycodelin levels in the serum of the control group patients who were detected preoperatively remained similar, even one month after surgery. Additionally, there was no significant difference in the glycodelin levels one month after surgery in a group of patients where the polyps were removed compared with the control group patients.

The results of this study clearly indicate that the glycodelin levels in infertile patients with endometrial polyps were elevated; therefore, we can safely conclude that glycodelin is a cytokine that has a crucial impact on endometrial miles and can significantly disturb homeostasis at the molecular level, thus affecting fertility.

Acknowledgement

This work was supported by the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia (Grants JP 11/14 (13-2015) "Cytokine levels before and after hysteroscopic polypectomy in infertile patients).

REFERENCES

1. Wethington SL, Herzog TJ, Burke WM, Sun X, Lerner JP, Lewin SN, Wright JD. Risk and Predictors of Malignancy in Women with Endometrial Polyps. *Annals of Surgical Oncology* 2011; 18(13): 381–2.
2. Rackow BW, Jorgensen E, Taylor HS. Endometrial polyps affect uterine receptivity. *Fertility and Sterility* 2011; 95(8): 2690–2.
3. Richlin SS, Ramachandran S, Shanti A, Murphy AA 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.
4. Bentin-Ley U, Lindhard A, Raven V, Islin H, Sorensen S. Glycodelin in endometrial flushing fluid and endometrial biopsies from infertile women. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2011; 156: 60–6.
5. M Tabbaa Z, Zheng Y and S Daftary G. KLF11 Epigenetically Regulates Glycodelin-A, a Marker of Endometrial Biology Via Histone-Modifying Chromatin Mechanisms. *Reproductive Sciences* 2013; 00 (0): 1–10.
6. 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.
7. Petrie A, Sabin C. *Medical Statistics at a Glance Workbook*, John Wiley & Sons 2012.
8. Popović BV. Handbook of univariate and multivariate data analysis with IBM SPSS, second edition, *Journal of Applied Statistics* 2015; 42 (10).
9. Lasmar BP, Lasmar RB. Endometrial polyp size and polyp hyperplasia. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 2013; 123 (3): 236–9.
10. Habibaj J, Kosova H, Bilali S, Bilali V, Qama D. Comparison between transvaginal sonography after diagnostic hysteroscopy and laparoscopic chromopertubation for the assessment of tubal patency in infertile women. *Journal of Clinical Ultrasound* 2012; 40(2): 68–73.
11. Nathani E, Clark TJ. Uterine polypectomy in the management of abnormal uterine bleeding: A systematic review. *J Minim Invasive Gynecol* 2006; 13(4): 260–8.
12. McGurgan P, Taylor LJ, Duffy SR, O'Donovan PJ. 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.



13. 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.
14. Li TC, Ling E, Dalton C, Bolton AE and Cooke ID. Concentration of endometrial PP14 in uterine flushings throughout the menstrual cycle in normal, fertile women. *Br J Obstet Gynaecol* 1993; 100: 460-4.
15. Ben-Nagi J, Miell J, Yazbek J, Holland T, Jurkovic D. The effect of hysteroscopic polypectomy on the concentrations of endometrial implantation factors in uterine flushings. *Reproductive BioMedicine Online* 2009; 19(5): 737-44.
16. Helmy S, Mavrelos D, Sawyer E, Ben-Nagi J, Koch M, Day A, Jurkovic D. Serum Human Chorionic Gonadotropin (β -hCG) Clearance Curves in Women with Successfully Expectantly Managed Tubal Ectopic Pregnancies: A Retrospective Cohort Study, *PLoS ONE* 2015 2;10(7):e0130598. Epub 2015 Jul 2. , July 2, 2015.
17. Fagerland M.W. T-tests, non-parametric tests, and large studies—a paradox of statistical practice? *BMC Medical Research Methodology* 2012;12:78, Fagerland; licensee BioMed Central Ltd. 2012. DOI: 10.1186/1471-2288-12-78©
18. KW Lam K, CN Chiu P, Cheuk-Lun L, TK Pang R, ON Leung C, Koistinen H, Seppala M, Chung Ho P and SB Yeung W. 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: 37118-27.
19. La Vignera S, Condorelli R, Bellanca S, La Rosa B, Mousavi A, Busa B, O Vicari L, Vicari E. Obesity is associated with a higher level of pro-inflammatory cytokines in follicular fluid of woman undergoing medically assisted procreation (PMA) programs. *European Review for medical and Pharmacological Sciences* 2011; 15: 267-73.
20. Richlin SS, Ramachandran S, Shanti A, Murphy AA, Parthasarathy S. Glycodelin Levels in Uterine Flushing and in Plasma of Patients with Leiomyomas and Polyps: Implications for Implantation. *Human Reproduction* 2002; 17 (10):2742-7.
21. Kurman RJ and Mazur MT (eds) *Benign diseases of the endometrium*. In *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*, 4th edn. Springer-Verlag 1994: 394–7.
22. Zhou HM, Ramachandran S, Kim JG, Raynor DB, Rock JA and Parthasarathy S. Implications in the management of pregnancy: II. Low levels of gene expression but enhanced uptake and accumulation of umbilical cord glycodelin. *Fertil Steril* 2000; 73:843-7.
23. Oehninger S, Coddington CC, Hodgen GD and Seppala M. Factors affecting fertilization: endometrial placental protein 14 reduces the capacity of human spermatozoa to bind to the human zona pellucida. *Fertil Steril* 1995; 63:377-83.

OVARIAN DYSGERMINOMA

Ana Dević¹, Mladenko Vasiljević², Aleksandar Dević¹, Marija Sorak³¹Hospital of Gynaecology and Obstetrics, Clinical Hospital Center Zemun, Zemun-Belgrade, Serbia²University of Belgrade, Medical Faculty, Clinic of Gynaecology and Obstetrics "Narodni Front", Belgrade, Serbia³University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Clinic of Gynaecology and Obstetrics, Kragujevac, Serbia

DISGERMINOM JAJNIKA

Ana Dević¹, Mladenko Vasiljević², Aleksandar Dević¹, Marija Šorak³¹Bolnica za Ginekologiju i Akušerstvo, Kliničko bolnički centar Zemun, Zemun-Beograd, Srbija²Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Ginekološko - akušerska klinika „Narodni Front“ Beograd, Srbija³Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka, Ginekološko - akušerska klinika, Kragujevac, Srbija

Received / Priljen: 18.02.2015

Accepted / Prihvaćen: 16.03.2015

ABSTRACT

Ovarian dysgerminoma (OD) is one of the most common malignant tumours of the ovarian germ cells, comprising 1-2% of all malignant ovarian tumours. It most commonly occurs between the ages of 10 and 30. The treatment is primarily surgical; however, in the advanced stages of the disease, surgical treatment is followed by chemotherapy.

We report a case of a 19-year-old female patient who was diagnosed with bilateral ovarian dysgerminoma. The patient was first operated for dysgerminoma on the left ovary and an ovariectomy was performed. A month later, she underwent surgery again because of the appearance of a residual tumour in the lodge of the removed ovary; the rest of the tumour was removed at that time. The histological finding was dysgerminoma ovarii, FIGO stage 1c. As agreed on by the consulting team, the patient returned for a follow-up ultrasound examination every three months. Nevertheless, nine months after the operation, she was diagnosed with dysgerminoma of the right ovary. Surgical treatment was performed again, and the tumour was removed. The histological finding on the second occasion was dysgerminoma ovarii, FIGO stage IIa, according to the TNM classification T2aNxMx. To preserve the reproductive capacity of the patient, the consulting team agreed to treat the patient with chemotherapy, i.e., 3 cycles of BEP [Bleomycin, Etoposide, Cisplatin (Platinum)]. Magnetic resonance imaging, ultrasound and clinical examination after the therapy were normal. The patient is monitored in regular intervals, feels good and has no signs of the disease after five years.

Keywords: dysgerminoma, malignant ovarian tumour, chemotherapy, surgical intervention

SAŽETAK

Disgerminom jajnika je jedan od najčešćih malignih tumora germinativnih ćelija jajnika. On čini 1-2% svih malignih tumora jajnika. Najčešće se javlja između 10. i 30. godine života. Lečenje je primarno hiruško. Kod uznapredovalih stadijuma bolesti nakon hiruškog lečenja primenjuje se i hemioterapija.

Prikazujemo pacijentkinju staru 19 godina koja je operisana zbog disgerminoma na oba jajnika. Pacijentkinja je prvi put operisana zbog disgerminoma na levom jajniku. Urađena je ovariektomija. Mesec dana nakon operacije zbog pojave rest tumora u loži odstranjenog jajnika urađena je ponovo operacija i odstranjen je rest tumor. HP nalaz – Dysgerminoma ovarii, stadijum FIGO 1c. Nakon toga, po odluci Konzilijuma pacijentkinja je kontrolisana ultrazvučnim pregledima na 3 meseca. Devet meseci posle ove operacije dijagnostikovano je disgerminom na desnom jajniku. Urađena je operacija i odstranjen je tumor jajnika. HP nalaz - Dysgerminoma ovarii. Stadijum bolesti FIGO IIa. Prema TNM klasifikaciji T2aNxMx. Zbog očuvanja reproduktivne sposobnosti pacijentkinje, a po odluci Konzilijuma, sprovedeno je lečenje hemioterapijom, 3 ciklusa po protokolu BEP [Bleomycin, Etoposide, Cisplatin (Platinum)]. Kontrolni pregled magnetne rezonance, ultrazvuka i klinički pregled nakon sprovedene terapije bili su uredni. Pacijentkinja je redovno kontrolisana i pet godina nakon operacije dobro se oseća i nema znakova recidiva bolesti.

Ključne reči: disgerminom, maligni tumor jajnika, hemioterapija, hiruški zahvat

ABBREVIATIONS

OD – Ovarian Dysgerminoma

UDK: 618.11-006-089 / Ser J Exp Clin Res 2016; 17 (1): 67-70

DOI: 10.1515/SJECR-2015-0043

Corresponding author: Ana Dević, MD.

Hospital of Gynaecology and Obstetrics, Clinical Hospital Center Zemun, Vukova 9, Zemun-Belgrade 11000

Telephone number: +381 63 38138 333; E-mail: dr.ana74@yahoo.com



INTRODUCTION

Ovarian dysgerminoma (OD) is one of the most common malignant tumours of ovarian germ cells. It belongs to the group of germ tumours of the ovary and arises by the malignant alteration of the primordial germ cells. In some cases, the tumour may occur on the anomalies of the genital tract, such as gonad dysplasia or testicular feminization [1]. It usually occurs in patients aged 20 to 30 years. Dysgerminomas comprise 1-2% of all malignant ovarian tumours [2] and occur bilaterally in 10-15% of all cases. In approximately 5% of patients with dysgerminomas stage Ia, microscopic metastasis can be found in the other ovary. Macroscopically, the tumours are solid with lobular structure and may reach a size of approximately 15 cm. The most common clinical symptoms are abdominal pain and the presence of a tumour mass in the abdomen [3]. The tumours usually spread through the lymphatic system into the paraaortic lymph nodes; haematogenous spread may occur in the advanced stages of the disease. Conservative surgery is the treatment of choice for unilateral encapsulated unruptured tumours, with negative retroperitoneal lymph nodes and negative swabs from the pelvic and paracolic area in order to preserve the patient's reproductive function. In advanced stages of the tumour, radical surgical procedure is followed by chemotherapy. The five-year survival rate of the disease in stage I is 80-90% [4,5].

CASE REPORT

A 19-year-old patient, nulliparous, nulligravida, menarche at the age of 14, with regular menstrual cycles at 28 days lasting for 4-5 days was admitted to the Gynaecology and Obstetrics Clinic "Narodni Front" in Belgrade for surgery because of a residual tumour in the left ovary lodge. A month prior to this admission, the patient had a laparoscopic ovariectomy performed at another hospital due to the presence of a tumour in the left ovary, which was 9x8 cm large and of predominantly solid lobular structure. The tumour was encapsulated, and the capsule was intact. The histological finding of that tumour was dysgerminoma ovarii. A month after the aforementioned laparoscopic surgery, the patient underwent a regular follow-up ultrasound examination when another cystic formation measuring 8x6 mm was diagnosed in the lodge where the left ovary was previously extracted. Magnetic resonance imaging of the left ovarian lodge revealed a tumour of a lobular structure, 8x6 mm in diameter. The uterus had normal size and structure. The right ovary was normal in size, with microcystic structure. LDH, AFP, hCG and CA-125 values were within normal limits. The paraaortic and pelvic lymph nodes were not enlarged. The patient was presented to the consulting team for malignant diseases, and the team decided that it was best to perform an exploratory laparotomy and to act upon the findings. The patient was operated with salpingectomy on the left side

and had a tumour formation of 8x6 mm in diameter with finely cystic structure removed. A biopsy was performed on the right ovary, which had a microcystic structure and a normal size. The right fallopian tube was normal. A partial resection of the omentum was performed. During the operation, no pathological findings were reported on the liver, stomach, small and large intestine, omentum and parietal peritoneum. Douglas's pouch contained approximately 10 ml of fluid. The fluid was collected for cytological analysis; swabs from the left and right subdiaphragmatic region and from the left and right paracolic region were also taken. The histological finding of the removed tumour was dysgerminoma ovarii, FIGO stage 1c. A histopathological biopsy of the right ovary and the omentum showed the tissue of ovaries and omentum without pathological changes. The cytological findings on malignant cells were negative. The patient was presented to the consulting team once again after surgery, and the team decided to have her followed up every three months, including conducting magnetic resonance imaging of the abdomen and pelvis. The follow-up results after 3 months were normal. The patient was regularly monitored by ultrasound every 3 months. Nine months after surgery, however, a follow-up ultrasound scan revealed a tumour in the upper pole of the right ovary, predominantly of a solid material with dimensions of 3x3 cm, with a unilocular cystic formation measuring 3x4 cm with transonic media. LDH values were slightly increased, while AFP, HCG and CA-125 values remained within normal limits. Magnetic resonance imaging revealed a tumour formation in the upper pole of the right ovary with a diameter 3x3 cm, multilocular, predominantly cystic structure with some solid tissue and thin partitions, as well as another unilocular cystic formation 3x4 cm that probably corresponded to follicular cysts. The patient's karyotype was normal, 46XX. Suspecting another dysgerminoma, we decided to perform the surgery once again. The patient underwent a laparotomy with the resection of ovarian tumours in total, a puncture of the cyst and a suture of the ovary. The tumour was encapsulated. The removed tumour was sent for histological analysis, and the content of the cyst was sent for cytological analysis. A peritoneal washing was collected for cytological analysis. A partial resection of the omentum was performed. No macroscopically visible secondary deposits were visible on the liver, stomach, small and large intestine, urinary bladder, omentum or parietal peritoneum. Once again, the histological finding was dysgerminoma ovarii (**Figures 1 and 2**).

However, the tumour was focally infiltrating the ovarian capsule. A lymphatic and vascular infiltration was not found. The disease was at FIGO IIa stage. According to the TNM classification, it was T2aNxMx. The cytological finding of the cyst and of the peritoneal washing for malignant cells was negative. The consulting team decided to carry out the adjuvant chemotherapy treatment in order to preserve the reproductive capacity of the patient. The patient received 3 cycles of chemotherapy with BEP [(Bleomycin, Etoposide, Cisplatin (Platinum))], according

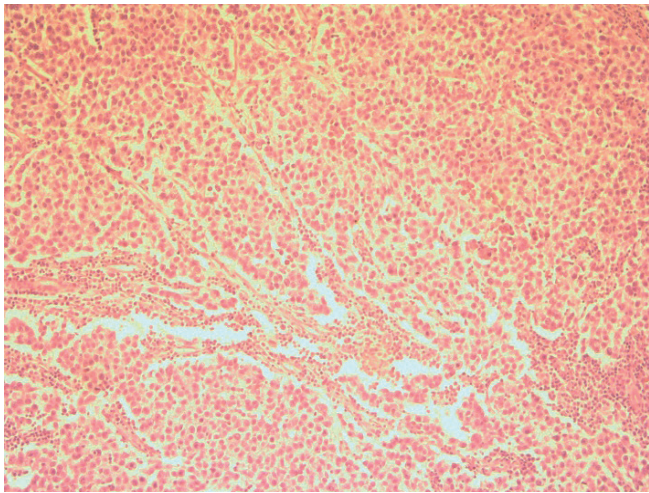


Figure 1. Dysgerminoma, 10x, haematoxylin and eosin stain

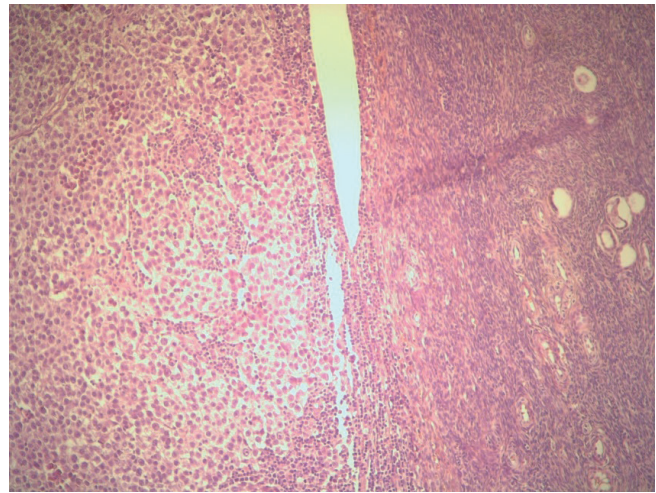


Figure 2. Dysgerminoma with ovarian tissue, 10x, haematoxylin and eosin stain

to protocol. Afterwards, she underwent a check-up magnetic resonance imaging, ultrasound and clinical examination. All findings were normal. The patient was presented to the consulting team once again, and the team decided to have her monitored every three months with magnetic resonance imaging of the pelvis and abdomen. The first follow-up imaging was uneventful, and the team decided to monitor the patient every 3 months. During the following five-year period, the patient was regularly monitored by ultrasound examination, and once a year she had magnetic resonance imaging of the abdomen and pelvis. Five years after surgery, the patient was feeling well and there was no evidence of the disease.

DISCUSSION

Dysgerminoma is the most common type of malignant germ cell tumours, comprising 1-2% of all malignant ovarian tumours. In most cases, it occurs in women between the ages of 20 and 30 [2]. Our patient was 19 years old. In approximately 5% of cases, dysgerminoma may even occur before puberty. Dysgerminoma cells originate from the primordial sexually undifferentiated embryonic gonads. This disease may be associated with pregnancy in 17% of cases; if that is the case, the tumour can be removed, and the pregnancy can be preserved[6,7]. In approximately 2% of non-pregnant women, a pregnancy test can be positive due to the creation of hCG in the isolated syncytiotrophoblast cells. The tumour most often occurs unilaterally, which makes up approximately 80-85% of all cases. However, it occurs bilaterally in 10-15% of cases, as was the case in our patient. Dysgerminomas tend to spread by the perirectal lymphatic system to lymph nodes near the aorta [8]. It can disseminate haematogenously to the lungs, liver and bones at advanced stages of the disease. The largest part of the dysgerminoma is associated with elevated levels of serum lactate dehydrogenase (LDH), which is sometimes

used as a tumour marker in monitoring the progression of the disease [9]. In our patient, the values of the tumour markers AFP, HCG and CA-125 were within normal limits, while LDH values were slightly increased. The main clinical feature of this tumour is its rapid growth. Symptoms usually persist from one month to six months before the tumour is diagnosed. The first symptoms are abdominal pain and vaginal bleeding, followed by abdominal distension and the presence of a mass in the abdomen[10]. Abdominal effusion and rupture of the tumour occur in 25% of cases. It is usually spread through the lymphatic para-aortalne in the lymph nodes, and haematogenous spread takes place in the advanced stages of the disease [8]. In our patient, there were no pathological findings on the liver, stomach, small and large intestine, omentum or parietal peritoneum. Douglas's pouch contained approximately 10 ml of a free fluid. The cytological finding of this fluid and the swabs taken from the left and right subdiaphragmatic region and from the left and right paracolic region were negative. Dysgerminoma is composed of aggregates and large islands of uniform cells surrounded by varying amounts of connective tissue containing a small number of lymphocytes. The cells are round or oval with eosinophilic or light cytoplasm. The nucleus is circular with clear boundaries, finely granular chromatin and one or two nucleoli [10].

Considering the fact that 85% of women with ovarian dysgerminoma are younger than 30 years old, a conservative surgical treatment is highly recommended in order to preserve fertility. Conservative surgery is the treatment of choice for unilateral encapsulated unruptured tumours in stage Ia, with negative retroperitoneal lymph nodes and negative swabs from the pelvic and paracolic area and without dysgenetic gonads, in order to preserve reproductive function[3]. In more advanced stages of the disease, such as Ib and above, a radical surgical approach is advised. This includes hysterectomy with bilateral salpingo-oophorectomy, lymphadenectomy and omentectomy[4].



Commonly, in women with advanced-stage disease who insist on having children, a conservative surgical treatment may be applied with a certain risk. Our case was specific to the development of dysgerminoma on the right ovary following the ovariectomy of the left ovary due to the same disease. The second dysgerminoma was of stage IIa, according to FIGO classification. Despite the fact that it was diagnosed at an advanced stage, this patient underwent a conservative surgical procedure of the right ovary in order to remove the tumour only and to preserve childbearing capacity at the same time. Chemotherapy consisting of 3 cycles of BEP was applied after the surgical treatment. Dysgerminomas are sensitive to radiation; adjuvant chemotherapy is highly recommended whenever possible to preserve fertility. The so-called BEP protocol [(Bleomycin, Etoposide, Cisplatinum (Platinum))] is considered a gold standard and is widely accepted around the world[11,12]. The number of chemotherapy cycles is limited to 6. A concurrent chemotherapy and radiation therapy are reserved for women with stage III disease. The five-year survival rate for stage I disease is 90% and approximately 74% for stage III disease[5,13].

According to the recommendations of the European Society for Medical Oncology, the clinical follow-up of patients with ovarian tumours is performed every 3 months during the first 2 years, every 4 months in the third year, and every 6 months in years 4 and 5[14]. Our patient was monitored regularly for five years after surgery and showed no evidence of the development of the disease.

REFERENCES

1. Yoon S, Park HG, Kuk JY, Oak SA, Park JH. A case of ovarian dysgerminoma with gonadal dysgenesis in 29-year-old woman with 46,XX karyotype. *Korean J Obstet Gynecol.* 2012;55(10):772-6.
2. Smith HO, Berwick M, Verschraegen CF, Wiggins C, Lansing L, Muller CY, et al. Incidence and survival rates for female malignant germ cell tumors. *Obstet Gynecol.* 2006;107(5):1075-85.
3. Tangjitgamsol S, Hanprasertpong J, Manusirvithaya S, Wootipoom V, Thavaramara T, Buhachat R. Malignant ovarian germ cell tumors: clinic-pathological presentation and survival outcomes. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2010;89(2):182-9.
4. Vicus D, Beiner M, Klachook S, Le L, Laframboise S, Mackay H. Purge dysgerminoma of the ovary 35 years on: A single institutional experiences. *GynecolOncol.* 2010;117(1):23-6.
5. Biswajit D, Patil CN, Sagar TG. Clinical presentation and outcome of pediatric ovarian germ cell tumor: A study of 40 patients. *J Pediatric Hematol Oncol.* 2010;32(2):e54-e56.
6. Boran N, Tulunay G, Callskan E, Kose ME, Haberal A. Pregnancy outcomes and menstrual function after fertility sparing surgery for pure ovarian dysgerminoma. *Arch Gynecol Obstet.* 2005;271:104-8.
7. Akhtar K, Shamshad Ahmad S, Kumar A, Afshan N. Dysgerminoma with pregnancy and viable baby: a case report. *Oman Med J.* 2011;26(3):198-200.
8. Kumar S, Shah JP, Bryant CS, Imudia AN, Cote ML, Ali-Fehmi R, et al. "The prevalence and prognostic impact of lymph node metastasis in malignant germ cell tumors of the ovary," *GynecolOncol.* 2008; 110(2): 125-32.
9. Radhakrishnan S, Haq S, Lofts F, Young MPA, Barton DRJ. Ovarian dysgerminoma presenting with hypercalcaemia. *BJOG.* 2001;108(12):1302-4.
10. Lee IH, Choi CH, Hong DG, Song JY, Kim YJ, Kim KT, et al. Clinicopathologic characteristics of granulosa cell tumors of the ovary: a multicenter retrospective study. *J GynecolOncol.* 2011;22:188-95.
11. Pautier P, Gutierrez-Bonnaire M, Rey A, Sillet-Bach I, Chevrean C, Kerbrat P, et al. Combination of bleomycin, etoposide, and cisplatin for the treatment of advanced ovarian granulosa cell tumors. *Int J Gynecol Cancer.* 2008;18:446-52.
12. Talukadar S, Kumar S, Bhatla N, Mathur S, Thulkar S, Kumar L. Neo-adjuvant chemotherapy in the treatment of advanced malignant germ cell tumors of ovary. *Gynecol Oncol.* 2014;132:28.
13. Zanetta G, Bonazzi C, Cantu M, Binidagger S, Locatelli A, Bratina G, et al. Survival and reproductive function after treatment of malignant germ cell ovarian tumors. *J ClinOncol.* 2001;19(4):1015-20.
14. Colombo N, Peiretti M, Garbi A, Garinelli S, Marini C, Sessa C. Non-epithelial ovarian cancer: ESMO clinical practice guidelines. *Ann Oncol.* 2012;23(7):20-6.