



INSTYTUT „CENTRUM ZDROWIA MATKI POLKI”

Lekarz Shiar Agata Kassassir-Ćwiklak

**Ocena ekspresji naczyniowo-  
śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF)  
w polipach endometrialnych i prawidłowym  
endometrium**

---

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Łódź 2021

PROMOTOR

Prof. dr hab. n. med. Jacek R. Wilczyński

Dziękuję Panu Profesorowi Jackowi Wilczyńskiemu  
za poświęcony czas, cenne rady oraz ogromną  
cierpliwość.

Dziękuję Mojej Rodzinie  
za pomoc.

## SPIS TREŚCI

1. Wykaz skrótów	4
2. WSTĘP	6
2.1. Wprowadzenie	6
2.2. Epidemiologia polipów endometrialnych	6
2.3. Etiopatogeneza polipów endometrialnych	7
2.4. Histopatologia polipa endometrialnego	9
2.5. Diagnostyka polipa endometrialnego	12
2.5.1. Kliniczne objawy polipa endometrialnego	13
2.5.2. Badania obrazowe	15
2.6. Leczenie polipów endometrialnych	22
2.6.1. Histeroskopia	23
2.6.2. Leczenie hormonalne	25
2.7. Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF)	26
2.7.1. Charakterystyka	26
2.7.2. Funkcja	27
2.7.3. VEGF a endometrium	28
3. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	31
4. MATERIAŁ I METODY	32
4.1. Dobór pacjentek	32
4.2. Odczynniki	33
4.3. Analiza immunohistochemiczna ekspresji VEGF	34
4.4. Kwantyfikacja uzyskanych danych eksperymentalnych	36
4.5. Analiza statystyczna	38
5. WYNIKI	40
6. DYSKUSJA	62
7. WNIOSKI	69
8. STRESZCZENIE	70
9. ABSTRACT	72
10. SPIS TABEL	74
11. SPIS RYCIN	76
12. PIŚMIENNICTWO	79

## 1. WYKAZ SKRÓTÓW

<b>AAGL</b>	[American Association of Gynecologic Laparoscopists] - Amerykańskie Stowarzyszenie Laparoskopii Ginekologicznej
<b>ANGPT</b>	[Angiopoietin] - Angiopoetyna
<b>BCL-2</b>	[B-cell lymphoma 2] - Regulator apoptozy BCL-2
<b>bFGF</b>	[Basic fibroblast growth factor] - Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
<b>BMI</b>	[Body mass index] - Wskaźnik masy ciała
<b>BSA</b>	[Bovine serum albumin] - Roztwór surowiczej albuminy bydłowej
<b>CoCl<sub>2</sub></b>	[Oxalyl chloride] - Chlorek kobaltu
<b>COX -2</b>	[Cyclooxygenase 2] - Cyklooksygenaza typu 2
<b>DAB</b>	[3,3'-Diaminobenzidine] - 3,3-diamino-czterochlorek benzydyny
<b>D&amp;C</b>	[Dilation and curettage] - Rozszerzenie kanału szyjki i wyłżeczowanie jamy macicy
<b>EIN</b>	[Endometrial intraepithelial neoplasia] - Śródnabłonkowa neoplazja endometrium
<b>ER</b>	[Estrogen receptors] - Receptory estrogenowe
<b>ESHRE</b>	[European Society of Human Reproduction and Embryology] - Europejskie Towarzystwo Embriologii i Rozrodu Człowieka
<b>FIGO</b>	[International Federation of Gynecology and Obstetrics] - Międzynarodowa Federacja Ginekologów i Położników
<b>GIS</b>	[Gel infused sonography] - Sonohisterografia z użyciem żelu
<b>HIF-1</b>	[Hypoxia inducible factor 1] - Czynnik indukowany hipoksją typu 1
<b>HRP</b>	[Horseradish peroxidase] - Peroksydaza chrzanowa
<b>HRT</b>	[Hormone replacement therapy] - Hormonalna terapia okresu menopauzalnego
<b>IAS</b>	[Intravascular Absorption Syndrome] - Zespół absorpcji wewnątrznaczyniowej
<b>IGF-1</b>	[Insulin-like growth factor] - Insulinopodobny czynnik wzrostu typu 1
<b>IUA</b>	[Intrauterine adhesions] - Zrosty wewnątrzmaciczne
<b>IUD</b>	[Intrauterine Device] - Wkładka wewnątrzmaciczna

Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium

- IUI** [Intrauterine insemination] - Inseminacja wewnątrzmaciczna
- IQR** [Interquartile range] - Przedział międzykwartyłowy
- KGF** [Keratinocyte growth factor] - Czynn timer wzrostu keratynocytów
- LNG-IUS** [Levonorgestrel-releasing intrauterine system] - Wewnątrzmaciczny system uwalniający lewonogestrel
- NPV** [Negative Predictive Value] - Wartość predykcyjna ujemna
- PBS** [Phosphate buffered saline] - Buforowana fosforanem sól fizjologiczna
- PID** [Pelvic inflammatory disease] - Zapalenie narządów miednicy mniejszej
- PPM** [Matrix Metallo-proteinase] - Metyloproteinazy macierzowe
- PPV** [Positive Predictive Value] - Wartość predykcyjna dodatnia
- PR** [Progesteron receptors] - Receptory progesteronowe
- RCOG** [Royal College of Obstetricians and Gynaecologists] - Królewskie Stowarzyszenie Ginekologów i Położników
- SDF-1/CXCL12** [Stromal cell-derived factor- 1] - Czynn timer komórek zrębu typu 1
- SF-1** [Steroidogenic factor 1] - Steroidowy czynn timer typu 1
- SHBG** [Sex hormone binding globulin] - Glikoproteiny wiążące hormony płciowe
- SIS** [Saline infused sonography] - Sonohisterografia z użyciem roztworu soli fizjologicznej
- sVEGF** [Soluble Vascular Endothelial Growth Factor] - Rozpuszczalna forma naczyniowo-śródbłonkowego czynn timer wzrostu.
- TGFβ1** [Transforming growth factor β1] - Transformujący czynn timer wzrostu beta typ 1
- TVUS** [Transvaginal ultrasonography] - Ultrasonografia przezpochwowa
- uPA** [Urokinase-type plasminogen activator] - Aktywator plazminogenu o typie urokinazy
- VEGF** [Vascular endothelial growth factor] - Naczyniowo-śródbłonkowy czynn timer wzrostu
- VEGFR-2/KDR** [Kinase insert domain vascular endothelial growth factor receptor 2] - Receptor dla naczyniowo-śródbłonkowego czynn timer wzrostu typu 2

## 2. WSTĘP

### 2.1 Wprowadzenie

Polip endometrialny jest określany jako miejscowy rozrost tkanki endometrialnej zawierający zarówno nabłonek gruczołowy jak i komórki zrębu. Powstaje jako monoklonalny rozrost komórek zrębu endometrium z wtórnym monoklonalnym łagodnym rozrostem gruczołów endometrium. W większości przypadków w polipie nie dochodzi do zmian typowych dla cyklicznego wpływu estrogenów i progesteronu na tkankę endometrialną. Komponenta gruczołowa nie wykazuje aktywności proliferacyjnej ani sekrecyjnej [1].

Podział polipów:

- Polipy hiperplastyczne - spełniające wszystkie histologiczne kryteria
- Polipy atroficzne - w których dochodzi do zaniku nabłonka gruczołowego
- Polipy czynnościowe - które w szczególnych przypadkach reagują na zmiany hormonalne w przebiegu cyklu miesięczkowego [2].

Do czynników ryzyka wystąpienia polipa endometrialnego zalicza się wiek, otyłość oraz stosowanie leków hormonalnych [3,4]. Polipy endometrialne często przebiegają bezobjawowo, natomiast gdy pojawiają się symptomy jest to najczęściej nieprawidłowe krwawienie z dróg rodnych lub niepłodność. W około 20% mogą występować mnogie. Ryzyko współistnienia w polipie zmian rozrostowych wynosi 0,2-12,9 % [5,74].

### 2.2 Epidemiologia

Polip endometrialny jest patologią ginekologiczną, którego częstość występowania waha się od 7,8% do 34,9 % w zależności od rodzaju badania [6,56,59]. Liczba ta jest z pewnością niedoszacowana, ponieważ duża część polipów endometrialnych przebiega bezobjawowo. Polipa endometrialnego spotyka się u 1-12 % bezobjawowych pacjentek w czasie kontrolnego badania ultrasonograficznego [11,12]. Polipy endometrialne spotykane są zarówno przed jak i po menopauzie. W okresie reprodukcyjnym ryzyko wystąpienia rośnie wraz z wiekiem, natomiast nie udowodniono tej korelacji u pacjentek po menopauzie [6-9]. Grupą wiekową w której najczęściej spotykamy polipy endometrialne jest przedział 40-49 rok życia [10]. Wśród pacjentek zgłaszających się do lekarza z powodu nieprawidłowego krwawienia z dróg rodnych w okresie przedmenopauzalnym aż u 10-40 % przyczyną tych

dolegliwości jest polip endometrialny [6,8,13]. Udowodniono, że występowanie polipa endometrialnego ma wpływ na płodność. Badania podają różną częstość występowania polipa endometrialnego wśród pacjentek zmagających się z problemem zajścia w ciążę - można przyjąć, że zakres ten wynosi 1,9-24% [14]. Analizując przypadki pacjentek poddanych technikom wspomaganego rozrodu, spośród tych z nawracającymi niepowodzeniami implantacji w 16,7 % przypadków przyczyną jest występowanie polipa endometrialnego [15]. Polipy są najczęstszą zmianą patologiczną endometrium i w większości przypadków nie współtowarzyszą im inne patologie endometrium [11]. W badaniach Mossy i wsp. ryzyko wystąpienia transformacji nowotworowej w polipie endometrialnym u pacjentek objawowych wynosi 2,84% [74]. Karakaya i wsp. podaje współwystępowanie w polipie endometrialnym raka endometrium na poziomie 9% w grupie pacjentek po menopauzie [16].

### **2.3 Etiopatogeneza**

Patogeneza powstawania polipów endometrialnych nie jest do dnia dzisiejszego jasno wyjaśniona [17]. W piśmiennictwie spotyka się kilka teorii co do etiologii tych zmian.

Pierwsza z nich wiąże ten miejscowy rozrost tkanki endometrialnej z obecnością zwiększonej liczby receptorów estrogenowych a w konsekwencji nasiloną stymulacją estrogenową. Koncentracja receptorów estrogenowych (ER) w komórkach gruczołowych jest znacznie wyższa niż w pozostałych obszarach endometrium - dochodzi głównie do zwiększenia obecności receptorów typu alfa (ER- $\alpha$ ). Dodatkowo w tych samych komórkach nabłonka gruczołowego pokrywającego polip ekspresja receptorów progesteronowych (PR) również jest podwyższona [18,19]. Natomiast gdyby przeanalizować obecność receptorów dla hormonów płciowych w komórkach zrębu zaobserwowano znacznie obniżoną liczbę ER i PR [20]. Może to dowodzić, że w zrębie polipa nie dochodzi do zmian hormonalnych obserwowanych w pozostałym, prawidłowym endometrium.

Wpływ stymulacji hormonalnej dotyczy zarówno hormonów endogennych jak i egzogennych. Szczególną grupę pacjentek stanowią kobiety leczone z powodu raka piersi preparatami selektywnych modulatorów receptora estrogenowego np. Tamoxifenem, u których częściej niż w populacji ogólnej spotyka się polipy endometrialne [21-23]. Wykazano, iż wystąpienie polipa u takich pacjentek wzrasta nawet o 30-60% w czasie tej terapii [9,25-27]. Tamoxifen w macicy pobudza receptory estrogenowe. Zwiększa poprzez to ryzyko pojawienia się nie tylko polipa endometrialnego ale również rozrostu endometrium i raka endometrium. Polipy powstające u pacjentek stosujących Tamoxifen różnią się od

polipów występujących u innych pacjentek - w tym przypadku spotykamy zmniejszoną liczbę ER i zwiększoną liczbę PR [23]. W polipach powiązanych z Tamoxifenem zmniejsza się również liczba komórek odpowiedzialnych za apoptozę, co w powiązaniu ze stymulacją hormonalną umożliwia niekontrolowany wzrost polipa [28-31]. Podobny wpływ na występowanie polipów endometrialnych spotyka się u kobiet stosujących hormonalną terapię w okresie około- i po menopauzalnym. Występuje u nich zwiększone ryzyko powstania polipa endometrialnego [18,32,33]. Związane jest to z ciągłą stymulacją hormonalną, głównie estrogenową. Co ciekawe, stosowanie terapii gestagenowej preparatami o silnym działaniu antyestrogenowym oraz zastosowanie doustnej antykoncepcji dwuskładnikowej zmniejsza ryzyko wystąpienia polipa endometrialnego [32,34].

Chromosomalna analiza zrębu polipa endometrialnego pokazała w większości przypadków klonalną translokację w regionach 6p21-22, 12q13-15 lub 7q22 [24]. Może to tłumaczyć genetyczne predyspozycje do powstawania polipów endometrialnych. Mutacje w genie *HMGIC* zlokalizowanym w chromosomie 12 spotykane w polipach endometrialnych są również odpowiedzialne za powstawanie mięśniaków macicy, tłuszczaków, gruczolaków jak i przewlekłych chłoniaków płuc [35].

Kolejna teoria dotycząca etiopatogenezy polipa wiąże go z występowaniem lokalnego przewlekłego zapalenia w tkance endometrialnej. Duży udział w tym procesie przypisuje się komórkom tuczny. To one uwalniając cytokiny i czynniki wzrostu inicjują i kontrolują proces zapalny. Ilość aktywnych komórek tucznych w zrębie polipa jest siedmiokrotnie wyższa niż w pozostałych obszarach endometrium [36]. Kluczowym enzymem biorącym udział w tym procesie jest cyklooksygenaza-2 (COX-2). Jej ekspresja jest znacząco wyższa w komórkach polipów endometrialnych w porównaniu z prawidłowym endometrium [37,38]. Inni autorzy [39-41] sugerują również możliwą rolę w tworzeniu polipa endometrialnego innych czynników tj. białka p63, cytochromu p450 oraz steroidogennego czynnika-1 (SF-1). Same komórki tuczne po aktywacji mają też zdolność do uwalniania czynników zwiększających liczbę oraz gęstość naczyń krwionośnych. Potwierdzeniem tej teorii jest zwiększona ekspresja czynników pro-angiogennych takich jak naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) lub zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF). Oba czynniki działają na angiogenezę poprzez stymulację migracji komórek śródbłonka naczyniowego. Oba mogą wykazywać zwiększoną ekspresję w komórkach polipa endometrialnego [42,199].

Ważnym elementem w prawidłowym funkcjonowaniu endometrium jest równowaga pomiędzy aktywnością mitotyczną a apoptozą, w której uczestniczą zarówno komórki układu odpornościowego jak i hormony, interleukiny, cytokiny oraz białka. Jednymi z markerów



tych zmian są białka z grupy Bcl-2 (inhibitor apoptozy) oraz Ki67 (marker komórkowej proliferacji) [43]. Analiza ekspresji Bcl-2 zarówno w komórkach gruczołowych jak i komórkach zrębu polipa pokazała znaczny wzrost ekspresji Bcl-2 w fazie proliferacyjnej. Wyjaśniałoby to niezrównoważony apoptozą, miejscowy wzrost komórek prowadzący do powstania polipa, niepodlegający zmianom hormonalnym. Analiza Ki67 pokazała wyraźnie zwiększoną ekspresję tego białka w komórkach gruczołowych polipa w fazie proliferacyjnej. Ekspresja Ki67 w komórkach zrębu była wyższa w fazie wydzielniczej [43]. Dowodzi to zwiększonej proliferacji komórek obu składowych polipa w porównaniu z komórkami prawidłowego endometrium.

Wśród czynników ryzyka pojawienia się polipa endometrialnego podaje się wiek, nadciśnienie tętnicze oraz otyłość jako źródło konwersji obwodowej hormonów płciowych [3,4]. Naukowcy w ostatnim czasie zwracają uwagę na podwyższony współczynnik BMI, ponieważ otyłość stała się chorobą cywilizacyjną. Otyłość charakteryzuje się obniżonym poziomem SHBG, zwiększoną obwodową aromatyzacją androgenów do estrogenów w tkance tłuszczowej oraz względnym hiperandrogenizmem funkcjonalnym. Dodatkowo podwyższone w krwi markery zapalne takie jak białko ostrej fazy i cytokiny mogą mieć bezpośredni wpływ na endometrium i powstawanie zmian w jego obrębie. Udowodniono podwyższony poziom tych samych cytokin zarówno u pacjentek z polipami endometrialnymi jak i u pacjentek otyłych [44].

Analiza badań, które ukazały się w przeciągu ostatnich lat poprowadziła do wysnucia teorii, że być może mamy do czynienia z dwiema głównymi przyczynami powstawania polipów endometrialnych. Pierwszy rodzaj stanowiłyby polipy powstałe wskutek stymulacji hormonalnej, drugi typ obejmowałby te, w których dochodzi do nadmiernej reakcji zapalnej i w efekcie wyrzutu wielu czynników proangiogennych, cytokin i białek regulatorowych. Ta dwoistość mogłaby tłumaczyć zarówno różny wzrost polipów, zróżnicowanie objawów jak i potencjalną zdolność do współistnienia z innymi patologiami endometrium tj. rozrostem lub rakiem endometrium.

## **2.4 Histopatologia polipa endometrialnego**

Polip endometrialny jest z definicji zmianą rosnącą do światła jamy macicy powstałą na skutek rozrostu zarówno tkanki gruczołowej, zrębu tkankowego oraz naczyń krwionośnych [1]. Makroskopowo opisuje się je jako okrągłe, gładkie uszypułowane zmiany zajmujące jamę macicy ale mogące również „wyrastać” przez ujście szyjki macicy do światła pochwy.

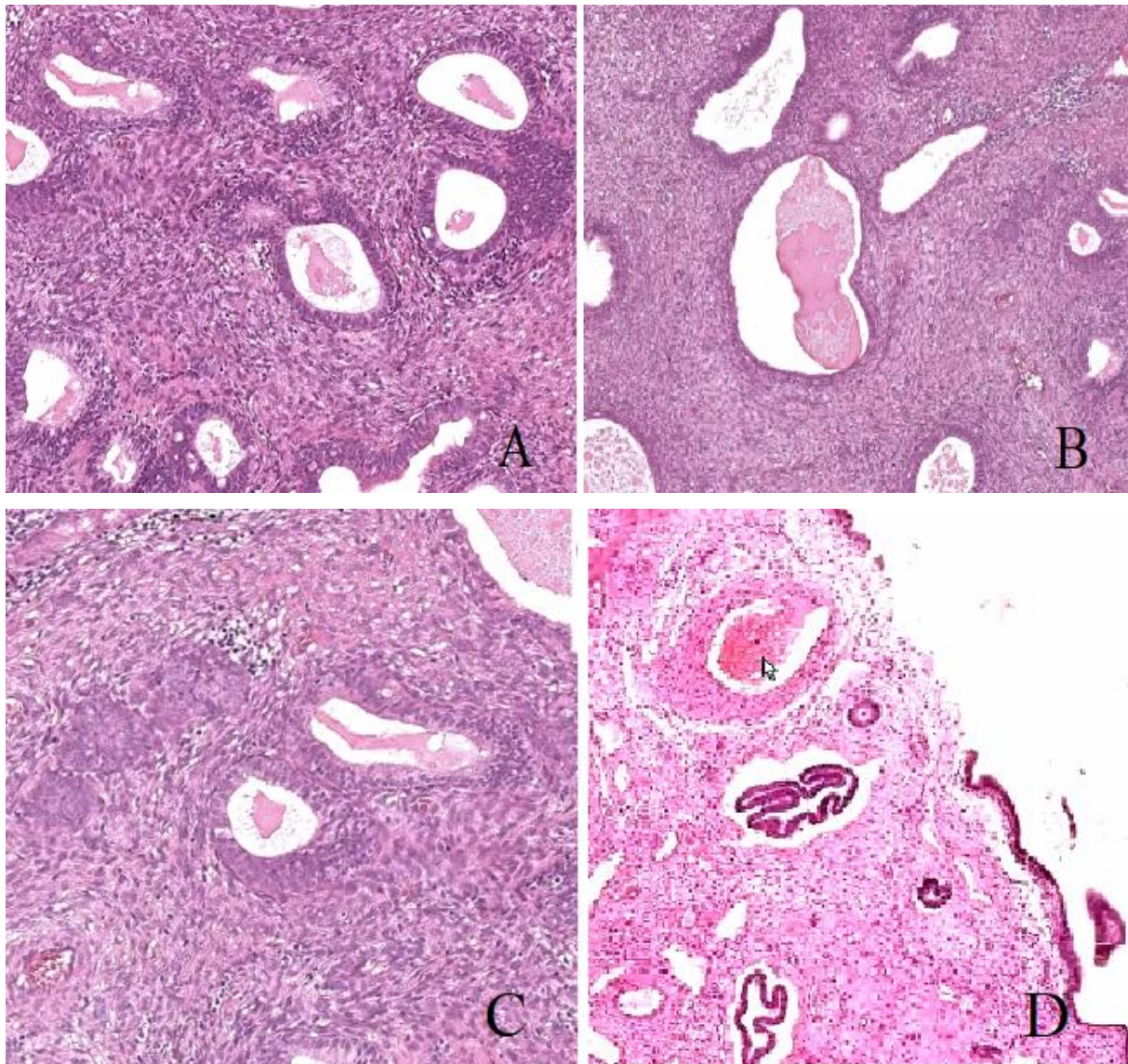
Szypuła polipa endometrialnego najczęściej jest wyraźnie odgraniczona, ale spotykamy również tzw. „polipy siedzące” z szeroką podstawą [2]. Na powierzchni polipa można spotkać niewielkie torbiele oraz rzadko ogniska martwicy. Te ostatnie zmiany częściej spotyka się w przypadku współistnienia z polipem endometrialnym innych patologii endometrium - zwłaszcza raka błony śluzowej macicy. Do postawienia rozpoznania wymagany jest choć jeden fragment polipa zawierający nabłonek powierzchni światła jamy macicy. Histopatologiczne rozpoznanie opiera się na stwierdzeniu minimum dwóch z trzech szczególnych histologicznych cech polipa endometrialnego. Do tych cech należą :

- (1) nieregularny kształt i zniekształcenie gruczołów
- (2) nadmierne włóknienie lub nadmierne osadzanie się włókien kolagenowych w zrębie
- (3) obecność grubościennych naczyń krwionośnych.

Gruczoły są poszerzone, często bardzo gęsto stłoczone, z obecnością dodatkowych połączeń międzykomórkowych [45,46]. Dodatkowo w czasie wzrostu polipa dochodzi do wydłużenia gruczołów w osi długiej co jest jego cechą charakterystyczną. W polipie endometrialnym dodatkowo można spotkać gruczoły śluzowe. W przypadku przewagi gruczołów śluzowych, przeplatanych nielicznymi gruczołami endometrialnymi zmianę taką różnicujemy z polipem szyjkowym. Głęboka warstwa endometrium, zwłaszcza w dolnej części trzonu macicy może być pomyłona z polipem endometrialnym, ponieważ zawiera zmniejszoną ilość gruczołów oraz zwiększoną ilość tkanki włóknistej w zrębie. W części polipów, zwłaszcza tych spotykanych u pacjentek starszych gruczoły są zmienione torbielowato oraz posiadają zwiotczone ściany. Zmiany składające się z poszerzonych gruczołów wyłożonych cienkim, atroficznym nabłonkiem nazywa się polipami starymi („senile polyps”).

Polipy czynnościowe spotyka się w ok. 36% przypadków. Gruczoły w ich obrębie dość trudno odróżnić od prawidłowego endometrium, ponieważ wykazują reakcję na zmiany poziomów hormonów w przebiegu cyklu miesięczkowego. Jakkolwiek zarówno funkcja proliferacyjna jak i sekrecyjna jest w nich mniej wyrażona i często „opóźniona” w stosunku do otaczającego, prawidłowego endometrium. W polipach powstałych wskutek działania leków antyestrogenowych (np. Tamoxifenu) zmiany te są z reguły nasilone, mają zwiększony współczynnik włóknienia i częściej spotyka się w nich metaplastę śluzową. W ich przypadku częściej też dochodzi do współistnienia z rozrostem endometrium lub rakiem błony śluzowej macicy [47-49].

Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium



**Rycina 1.** Histopatologiczne obrazy polipa endometrialnego (powiększenie 200x)

- (A) Widoczne zniekształcone gruczoły endometrialne o nieregularnym kształcie
- (B) Współistnienie w polipie gruczołów endometrialnych i śluzowych
- (C) Nadmierne włóknienie zrębu
- (D) Strzałką zaznaczone grubościennne naczynie krwionośne.

W przypadku współwystępowania w polipie endometrialnej neoplazji śródnabłonkowej (*EIN* - endometrial intraepithelial neoplasia) rozpoznaje się dyskretne zmiany na tle polipa. Głównie są to obszary z geograficznym rozmieszczeniem zagęszczonych nieprawidłowych gruczołów [50]. W części przypadków zmienione, poszerzone gruczoły mogą być mylnie rozpoznawane jako cechy rozrostu endometrium,

zwłaszcza gdy obejmują jednorodnie całą powierzchnię polipa. W przypadku stwierdzenia w polipie zmian o charakterze EIN należy taką zmianę różnicować z rakiem endometrium powstającym w istniejącym wcześniej polipie oraz rakiem polipowatym, gdzie nie występują prawidłowe elementy gruczołów endometrialnych i tkanki włóknistej [51]. Ryzyko wystąpienia w polipie endometrialnym rozrostu atypowego lub raka waha się od 0-12,9 % [6,52-55;60-62]. Ryzyko rośnie wraz z wiekiem pacjentki. Podejrzewa się również, że wielkość polipa ma wpływ na to ryzyko [61,62] choć niektóre badania np. Namazova i wsp. nie potwierdzają takiej korelacji [149].

Warto dodać, że diagnozę polipa endometrialnego często utrudnia rozkawałkowanie materiału biologicznego. Dlatego tak ważną rolę przykłada się do histeroskopowego usuwania zmian pod kontrolą wzroku.

## 2.5 Diagnostyka polipa endometrialnego

AAGL (American Association of Gynecologic Laparoscopists) opracowało wytyczne dotyczące podejrzenia występowania polipów endometrialnych [56]:

- (1) Ryzyko wystąpienia polipa endometrialnego rośnie wraz z wiekiem.
- (2) Najczęstszym objawem występowania polipa endometrialnego jest nieprawidłowe krwawienie z dróg rodnych.
- (3) Pacjentki cierpiące na niepłodność mają większe ryzyko wystąpienia polipa endometrialnego.
- (4) Polipy endometrialne mają zdolność resorpcji, dotyczy to 25% przypadków obejmujących polipy o niewielkich wymiarach.
- (5) Zastosowanie leków hormonalnych takich jak np. Tamoxifen predysponuje do wystąpienia polipa endometrialnego.

Wytyczne AAGL dotyczące diagnozowania polipów endometrialnych [56]:

- (1) Przepochwowe badanie ultrasonograficzne (TVUS) jest narzędziem z wyboru w przypadku diagnostyki polipów endometrialnych.
- (2) Zastosowanie narzędzi dopplerowskich podwyższa czułość i swoistość TVUS w diagnostyce polipa.
- (3) Zastosowanie wewnątrzmacicznego wlewu środka kontrastującego podwyższa czułość i swoistość TVUS w diagnostyce polipa endometrialnego.

- (4) Nie należy w przypadku pacjentek z podejrzeniem polipa endometrialnego dokonywać wyłyżeczkowania jamy macicy (D&C) bez kontroli wzroku.

### 2.5.1 Kliniczne objawy polipa endometrialnego

Najczęstszym objawem występowania polipa endometrialnego jest nieprawidłowe krwawienie z dróg rodnych. Krwawienie to ma charakter obfitych krwawień miesięczkowych lub/i krwawień międzymiesiączkowych oraz krwawień/plamień po menopauzie. W międzynarodowej nomenklaturze FIGO przyczyny nieprawidłowych krwawień z dróg rodnych (AUB - abnormal uterine bleeding) dzielimy wg klasyfikacji PALM (zaburzenia strukturalne) – COEIN (przyczyny czynnościowe) gdzie P - *polyps* - polipy, A- *adenomiosysoadenomioza*, L - *leiomyoma* - mięśniaki macicy, M - *malignancy* - zmiany nowotworowe, C - *coagulopathy* – zaburzenia krzepnięcia, O - *ovulatory dysfunction* – zaburzenia owulacji, E – *endometrial* - zaburzenia czynności endometrium, I – *iatrogenic* - przyczyny jatrogenne, N - *not otherwise classified* - przyczyny nieustalone [57].

Co ciekawe badania dowodzą, że ani lokalizacja ani wielkość ani mnogość polipów endometrialnych nie ma wpływu na ilość utraconej krwi [58,59,63]. Krwawienie jest efektem przekrwienia zrębu prowadzącego do zastoju krwi i martwicy [64]. Ten objaw spotyka się u dużego odsetka pacjentek z tą patologią endometrium - w zależności od źródła od 10 do 40% a niektóre opracowania podają aż 68% występowanie tego objawu [6,8,13]. Ryzyko wystąpienia krwawienia z dróg rodnych u pacjentek z polipem endometrialnym jest o 6% wyższe u pacjentek w okresie menopauzalnym niż w przypadku pacjentki przed menopauzą [65]. Szacuje się że od 30% do 45% przypadków krwawień po menopauzie spowodowanych jest występowaniem polipa endometrialnego [86-88].

Drugim istotnym objawem obecności polipa endometrialnego jest niepłodność. Częstość występowania polipa endometrialnego u pacjentek z niepłodnością pierwotną wynosi od 3,8-38,5%, a u pacjentek z niepłodnością wtórną 1,8-17% [14,66]. W ośrodkach leczenia niepłodności, w których standardem jest wykonanie histeroskopii diagnostycznej również u pacjentek bezobjawowych i bez podejrzenia patologii w badaniu ultrasonograficznym aż u 11-45% pacjentek znajduje się nieprawidłowości w obrębie jamy macicy [15,73,75]. Polipy endometrialne stanowią wśród nich najczęstszą anomalię - spotyka się je u ok. 32% pacjentek [71,73]. Wyjaśnienia tej sytuacji upatruje się w problemach z zagnieżdżeniem zarodka w zmienionym endometrium, zmianę receptywności endometrium pokrywającego polipa [68,69], zmniejszeniem powierzchni zdolnej do zaimplantowania

zarodka oraz problemem ze swobodnym przemieszczaniem się plemników - duże polipy mogą stanowić przeszkodę mechaniczną [65]. Badania wykazały, że ani wielkość ani ilość polipów nie ma wpływu na odsetek ciąż [70]. Yanaihara i wsp. zbadali czy lokalizacja polipa wpływa na odsetek spontanicznych ciąż i poprawę płodności. I tak odsetek ciąż w przeciągu 6 miesięcy po polipektomii wynosił 57,4%, u kobiet u których polip zlokalizowany był w rogu macicy blokując ujście maciczne jajowodu, 40,3% w przypadku polipów mnogich, 28,5 % w przypadku gdy polip był zlokalizowany na ścianie tylnej, 18,8% w przypadku polipa na ścianie bocznej a 14,8 % w przypadku występowania polipa na ścianie przedniej macicy [72]. Analizy podawane w większości publikacji prowadzą do wniosków, że zmiany rozpoznane przed rozpoczęciem leczenia powinny być usunięte w trakcie histeroskopii diagnostycznej/zabiegowej. Inaczej wyglądają zalecenia dotyczące zmian, które rozpoznano *de novo* w cyklu terapeutycznym np. przy technikach wspomaganego rozrodu. Polskie Towarzystwo Medycyny Rozrodu podaje, że nie wykazano, aby polipy endometrialne o wielkości do 2 cm stwierdzone *de novo* w cyklu terapeutycznym znacząco zmniejszały szansę na ciążę. Zaleca się ich usunięcie w przypadku stwierdzenia ich obecności przed leczeniem lub w przypadku niepowodzenia leczenia [76]. Dowodzą tego badania Lassa i wsp., którzy w grupie 83 kobiet poddanych stymulacji i punkcji jajników celem pobrania oocytów w cyklu terapeutycznym rozpoznali polipy mniejsze niż 2 cm. U 49 z nich zakończono cykl z podaniem zarodka/zarodków do jamy macicy. U 34 przerwano procedurę, zarodki zamrożono i wykonano histeroskopową polipektomię. Nie zauważono statystycznie znaczących różnic w odsetku uzyskanych ciąż w obu grupach [77]. Ostateczna decyzja powinna być podjęta po przeanalizowaniu sytuacji klinicznej pacjentki, ilości oraz jakości zarodków, jej historii leczenia i wieku. Ostatnio podnosi się kwestie stanu zapalnego, który może odpowiadać za powstawanie polipa ale również uniemożliwiać prawidłowe zagnieżdżenie się zarodka [70]. W zrębie polipa produkowane są substancje takie jak metyloproteinazy macierzowe (PPM) zaburzające znacząco proces implantacji [79] czy interferon gamma, który działa toksycznie na nasienie jak również rozwijający się zarodek [80]. W polipie endometrialnym spotyka się również obniżoną ekspresję białka łożyskowego 14, czynnika odpowiedzialnego za prawidłowe rozpoznanie antygenów na powierzchni zarodka oraz niedopuszczenie do reakcji humoralnej podczas zagnieżdżania [81,82]. Glikodeina, glikoproteina, która hamuje połączenie oocyt-plemnik i aktywność komórek NK w okresie około owulacyjnym posiada bardzo niską ekspresję w ludzkim endometrium. Jej niskie poziomy ułatwiają zapłodnienie i poprawiają receptywność endometrium. W przypadku występowania polipa endometrialnego lub mięśniaków macicy poziomy tego białka są podwyższone co utrudnia proces zapłodnienia

[78]. Yu Sun i wsp. [83] udowodnili częstsze występowanie polipów endometrialnych u pacjentek z obustronną niedrożnością jajowodów. Przyczyny aż dwukrotnie częstszego współistnienia tych dwóch patologii upatruje się w podobnej, zapalnej etiopatogenezie obu chorób.

### 2.5.2 Badania obrazowe

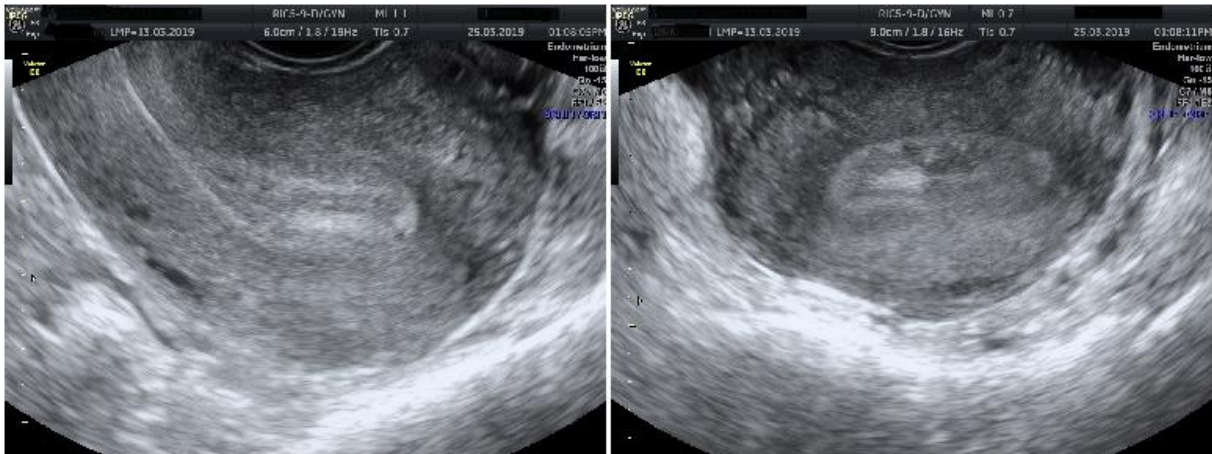
Diagnostyka obrazowa opiera się na wizualizacji polipa endometrialnego w badaniu ultrasonograficznym. Może to być zwykła ultrasonografia przezpochwowa (TVUS) lub sonohisterografia. Ultrasonografia przezpochwowa jest podstawowym narzędziem w diagnostyce ginekologicznej. Ocenia się, że dodatnia wartość predykcyjna czyli proporcja prawdziwie dodatnich wyników wśród wszystkich dodatnich wyników badania (PPV) dla TVUS w rozpoznawaniu polipa endometrialnego wynosi 75-100%, natomiast ujemna wartość predykcyjna (NPV) 87-97% [56]. Ultrasonografia przezpochwowa pozwala ocenić kształt jamy macicy oraz budowę endometrium i jego nieprawidłowości. Polipy endometrialne rozpoznaje się jako hiperechogeniczne okrągłe lub soczewkowate zmiany, o regularnym obrysie i niejednorodnej gęstości [84]. Obraz ultrasonograficzny nie jest specyficzny i można go pomylić z np. mięśniakami podśluzówkowymi [85]. Na jakość obrazowania ma wpływ kilka czynników. Najważniejszym jest faza cyklu w której przeprowadzamy badanie - wg różnych autorów badanie należy wykonywać do 10-12 dnia cyklu. Pozwala to dokładnie ocenić endometrium, które we wczesnej fazie proliferacyjnej ma uporządkowaną, charakterystyczną budowę składającą się z trzech linii - warstwy podstawnej i echa środkowego. W fazie wydzielniczej natomiast ma pogrubiałą, nieuporządkowaną strukturę, która może utrudniać rozpoznawanie zmian w obrębie endometrium [92]. Kolejnym czynnikiem są warunki anatomiczne pacjentki - pacjentki ze znaczną otyłością, z silnym tyłozgięciem macicy, po licznych zabiegach wewnątrzmacicznych, z licznymi mięśniakami macicy modelującymi przebieg endometrium stanowią wyzwanie diagnostyczne. Dodatkowe zastosowanie ultrasonografii dopplerowskiej kodowanej kolorem pozwala na lepszą ocenę charakteru zmian. Ultrasonografia z opcją kolorowego Dopplera pozwala uwidocznić charakterystyczne centralnie przebiegające naczynie/naczynia krwionośne stanowiące naczynie odżywcze tzw. „feeding vessel” [64,90,91]. Zastosowanie tej techniki zwiększa czułość badania do 97% [64]. Trudności w diagnostyce różnicowej stanowią mięśniaki podśluzówkowe, które dość często mają te same cechy ultrasonograficzne [45]. Zastosowanie kolorowego Dopplera pozwala zróżnicować obie zmiany, ponieważ naczynia

mięśniaków podśluzówkowych są liczniejsze oraz mają bardziej obwodowy przebieg, aczkolwiek ocena przepływów w obrębie uwidocznionych naczyń nie ma znaczenia w diagnostyce różnicowej ponieważ jest podobna jak w polipie endometrialnym. Niektórzy autorzy np. Lieng i wsp. [89] podejmują badania, w których przy pomocy TVUS z zastosowaniem kolorowego Dopplera i użyciem środka cieniującego podawanego dożylnie próbują różnicować zmiany łagodne tj. polipa od zmian podejrzanych o złośliwość. Wykorzystują tu ocenę przepływów w naczyniach w obrębie obserwowanych zmian. Wykazali brak różnic w unaczynieniu polipów endometrialnych i raka endometrium na podstawie oceny PI (index pulsacji), RI (index oporu), VI (index unaczynienia), FI (index przepływu), VFI (index waskularyzacji przepływu) przed podaniem środka kontrastowego. Natomiast po podaniu kontrastu wartości wszystkich w/w indeksów były niższe w grupie z rakiem endometrium. Kolejnym elementem, którym zainteresowali się badacze było zastosowanie ultrasonografii dopochwowej z zastosowaniem obrazowania 3D. Wiąże się to z koniecznością posiadania odpowiedniej głowicy, ale zwiększa czułość TVS do 100 % [89].

Kolejnym narzędziem diagnostycznym jest sonohisterografia (Saline Infused Sonography-SIS, gel installation sonography GIS) polegająca na podaniu do jamy macicy roztworu soli fizjologicznej/żelu i ocenie kształtu jamy macicy oraz zmian w niej się znajdujących (polipy, zrosty wewnątrzmaciczne etc.). W trakcie badania wyraźnie można ocenić zmiany endometrium o charakterze polipów endometrialnych, ich liczbę, lokalizację i wielkość [93,101]. Ta metoda znajduje zastosowanie zwłaszcza przy rozpoznawaniu małych zmian pominiętych w trakcie TVUS [94-97]. Dość często polipy są przypadkowym znaleziskiem w czasie diagnostyki niepłodności i wykonywania histerosalpingografii z zastosowaniem środka kontrastowego. Nie jest to zalecana metoda diagnostyki polipów endometrialnych ze względu na narażenie na promieniowanie, ryzyko nietolerancji preparatów jodowych czy dyskomfort bólowy [103]. W zależności od autora czułość SIS w diagnostyce polipów endometrialnych waha się od 75-95% [Bronz] a 85-90% [Bonilla-Musoles] a swoistość 60-90% [Bronz] a 80-95% [Bonilla-Musoles] [98-100]. Badania dowodzą zdecydowanie lepszej czułości i swoistości w rozpoznawaniu polipa endometrialnego metodą SIS w porównaniu z TVUS [102,104]. Pozwala to zmniejszyć liczbę niepotrzebnych zabiegów diagnostycznych.



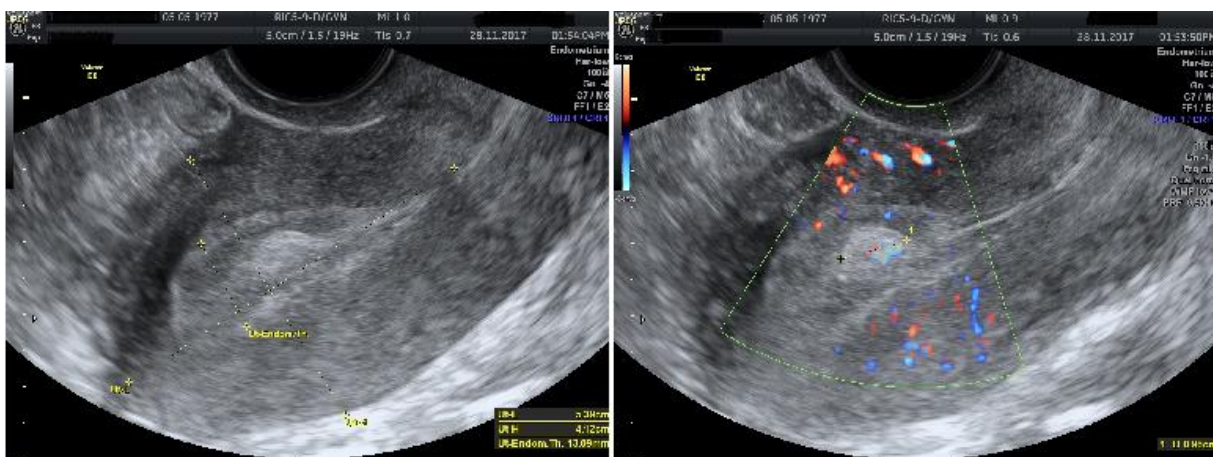
## Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium



**Rycina 2.** Obraz ultrasonograficzny polipa endometrialnego w płaszczyźnie strzałkowej oraz przekroju poprzecznym (materiał własny).

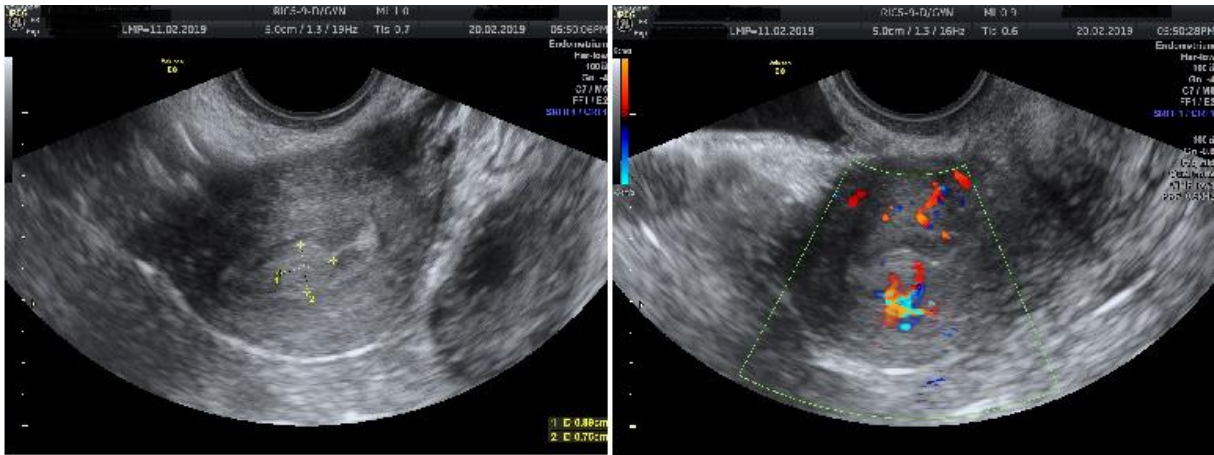


**Rycina 3.** Obraz ultrasonograficzny polipa endometrialnego wraz z charakterystycznym unaczynieniem uzyskanym w czasie badania z opcją kolorowego Dopplera (materiał własny).



**Rycina 4.** Obraz ultrasonograficzny polipa endometrialnego wraz z charakterystycznym "naczyniem odżywczym" widocznym po zastosowaniu techniki power Doppler (materiał własny).

## Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium



**Rycina 5.** Obraz ultrasonograficzny polipa endometrialnego wraz z charakterystycznym unaczynieniem uzyskany w czasie badania z opcją kolorowego Dopplera (materiał własny).



**Rycina 6.** Ultrasonograficzny obraz hiperechogenicznych zmian w jamie macicy, początkowo rozpoznanych jako polipy endometrialne, które w trakcie histeroskopii zabiegowej okazały się być mięśniakami podśluzówkowymi (materiał własny).



**Rycina 7.** Obraz 3D polipa endometrialnego (materiał własny).

Soares i wsp. porównał czułość i swoistość wszystkich w/w badań pod kątem diagnostyki polipa endometrialnego. I tak TVS posiada czułość na poziomie 75%, swoistość 96 %, histerosalpingografia posiada czułość na poziomie 50%, swoistość 82%. Najlepiej w tym zestawieniu prezentuje się SIS z czułością i swoistością na poziomie 100% [105]. Analiza badań pokazała brak różnic w czułości i swoistości pomiędzy histeroskopia diagnostyczną a SIS [93,106]. Przewagą SIS jest fakt, że pozwala ocenić również pozostałe elementy macicy jak i miednicy mniejszej - głównie drożność jajowodów u pacjentek z niepłodnością. Minusem SIS jest brak możliwości wzrokowej oceny zmiany oraz ryzyko PID i ból, jaki pacjentka odczuwa w czasie zabiegu.

Ostatnim etapem diagnostyki polipa endometrialnego jest histeroskopia diagnostyczna z ewentualną celowaną biopsją, która charakteryzuje się czułością w przedziale 58-99% a swoistością w przedziale 87-99%, PPV 21-100%, NPV 66-99% [107-109]. Dzięki miniaturyzacji sprzętu, ograniczającej traumatyzację macicy, histeroskopia jest zabiegiem możliwym do wykonania bez znieczulenia pacjentki. Pozwala ona na ocenę kształtu jamy macicy, ujść macicznych jajowodów, kanału szyjki, stwierdzenie obecności ciał obcych (najczęściej IUD) w macicy, resztek po poronieniu w skrajnych przypadkach. Ponadto zgodnie z zasadą "see and treat" pozwala na przeprowadzenie jednocześnie zabiegu diagnostyczno-leczniczego, czyli uwidocznienie oraz usunięcie zmian patologicznych w kanale szyjki i jamie macicy. Większą czułość zaobserwowano w grupie kobiet po menopauzie niż w grupie przedmenopauzalnej (97,3% vs 91,2%). Czuość histeroskopii ocenia się na wyższą niż 95%. Garuti i wsp. podają czułość histeroskopii na poziomie 95,3% [110,111], natomiast Gkrozou i wsp. w przeprowadzonej metaanalizie określili czułość metody na 97% [112]. Aż 100% czułość w swoich badaniach uzyskał Loiacono i wsp. [113]. Niewątpliwie duża czułość histeroskopii świadczy także o trafności kwalifikacji pacjentek do zabiegu histeroskopii na podstawie obrazu ultrasonograficznego. Warto zwrócić tutaj uwagę na dość dużą grupę pacjentek z niepłodnością. Mimo, iż histeroskopię diagnostyczną można wykonać już w warunkach ambulatoryjnych, jeśli nie ma uzasadnionych podejrzeń co do obecności polipa endometrialnego w przypadku pacjentek leczących się z powodu niepłodności, zarówno RCOG (Royal College of Obstetricians and Gynaecologists) jak i ESHRE (European Society of Human reproduction and Embryology) nie zalecają wykonywania histeroskopii diagnostycznej jako badania rutynowego [114].

Dias i wsp. w swojej publikacji donieśli, że sama ocena wizualna polipa w histeroskopii może pomóc w rozpoznaniu zmiany o charakterze nowotworowym [115]. Do cech podejrzanych zaliczamy hiperwaskularyzację zmiany i otaczającego endometrium,

**Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium**

obecność naczyń o nieregularnym przebiegu, obecność ognisk o charakterze martwicy lub owrzodzeń na powierzchni polipa oraz nieregularna powierzchnia samej zmiany [116]. Warto jednak podkreślić, że sama ocena makroskopowa nie zawsze daje pewność co do diagnozy. Najczęstszą wątpliwością, którą napotykać operatorzy jest rozróżnienie polipa endometrialnego od mięśniaka podśluzówkowego. Dzieje się tak w szczególności w przypadku dużych zmian oraz zmian o szerokiej podstawie które mogą, ale nie muszą odpowiadać tzw. polipom „siedzącym”. W przypadku wątpliwości lekarza wykonującego zabieg zależy zawsze rozważyć pobranie próbki i kontynuację działań po uzyskaniu rozpoznania histopatologicznego. Histeroskopia diagnostyczna jest łatwa do wykonania w warunkach ambulatoryjnych i nie ma konieczności hospitalizowania pacjentki. Wiąże się natomiast jak każdy zabieg ginekologiczny z pewnym ryzykiem powikłań takich jak krwawienie, zapalenie otrzewnej przy zastosowaniu medium płynnego oraz w skrajnym przypadku uszkodzenie ścian macicy. Jakkolwiek ryzyko tych powikłań przy odpowiednim przeszkoleniu personelu i wysokiej jakości sprzęcie jest niskie – oceniane na poziomie 0,82% [118]. Najnowsze wytyczne ACOG z 2020 roku zalecają przeprowadzenie histeroskopii diagnostycznej w warunkach ambulatoryjnych z ewentualną polipektomią w jak największym odsetku przypadków [117].

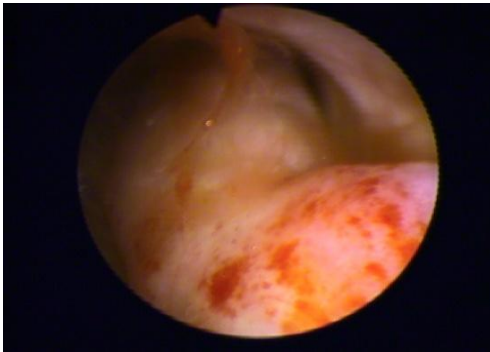
<b>Metoda diagnostyczna</b>	<b>Czułość</b>	<b>Swoistość</b>	<b>PPV</b>	<b>NPV</b>
<b>TVS</b>	75	96	75-100	87-97
<b>TVS + Doppler</b>	97	95	94-98	92-95
<b>TVS + 3D</b>	100	71-99	89-99	100
<b>SIS</b>	58-100	35-100	70-100	83-100
<b>HSG</b>	38	34	69-72	20-39
<b>Ślepa biopsja (D&amp;C)</b>	8-36	7-58	19	22
<b>Histeroskopia diagnostyczna</b>	58-99	87-99	21-100	66-99

**Tabela 1.** Wartość diagnostyczna różnych metod w obrazowaniu i rozpoznawaniu polipów endometrialnych.

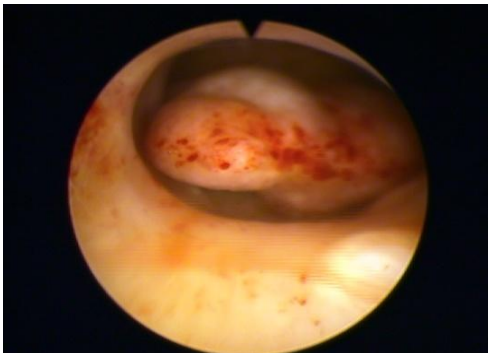
Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium



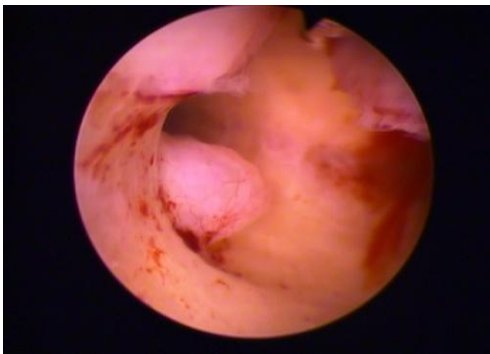
**Rycina 8.** Histeroskopowy obraz uszypułowanego polipa endometrialnego (materiał własny).



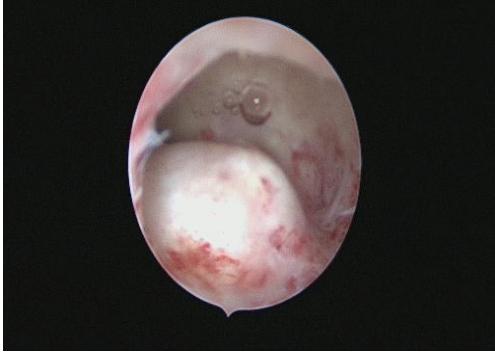
**Rycina 9.** Histeroskopowy obraz dużego polipa endometrialnego wypełniającego całą jamę macicy (materiał własny).



**Rycina 10.** Histeroskopowy obraz uszypułowanego polipa endometrialnego (materiał własny).



**Rycina 11.** Histeroskopowy obraz mnogich polipów endometrialnych (materiał własny).



**Rycina 12.** Histeroskopowy obraz okrągłej zmiany w jamie macicy, która okazała się mięśniakiem podśluzówkowym (materiał własny).

## 2.6 Leczenie polipów endometrialnych

Leczenie polipów endometrialnych można podzielić na leczenie zabiegowe i leczenie hormonalne. W niektórych przypadkach znajduje uzasadnienie zastosowanie leczenia zachowawczego, ponieważ dochodzi do samoistnej resorpcji zmiany. Dewaay wykazała, że częściej takie zjawisko spotyka się u pacjentek młodszych, bezobjawowych oraz tych których polipy mają niewielkie rozmiary [119]. Za graniczny wymiar zmiany przyjęto średnicę 10 mm. Lieng i wsp. wykazali, że aż w 27% przypadków w ich grupie badanej, obserwowanej przez rok, doszło do spontanicznej regresji zmiany [120].

Decyzja o rodzaju podjętego leczenia powinna opierać się na przesłankach dotyczących objawów pacjentki, wieku, ryzyka współistnienia zmian przed/lub nowotworowych oraz ewentualnych problemów związanych z niepłodnością [121-123].

AAGL (American Association of Gynecologic Laparoscopists) opracowało wytyczne dotyczące leczenia polipów endometrialnych [56]:

- (1) Leczenie zachowawcze można zastosować w przypadku małych i bezobjawowych zmian.
- (2) Polipektomia histeroskopowa pozostaje „złotym standardem” leczenia polipów endometrialnych.
- (3) Nie wykazano różnic w zależności od zastosowanej techniki/narzędzi w polipektomii histeroskopowej.
- (4) Pacjentki w okresie menopauzalnym należy *a priori* kwalifikować do zabiegowego usunięcia zmiany.

- (5) Histeroskopia jest metodą z wyboru i góruje nad zabiegiem histerektomii ze względu na dostępność, niską inwazyjność, niski koszt i o wiele mniejsze ryzyko wystąpienia powikłań.
- (6) Pacjentki objawowe, zmagające się z niepłodnością powinny być poddane leczeniu zabiegowemu.

### 2.6.1 Histeroskopia

Złotym standardem w leczeniu polipów endometrialnych jest histeroskopia. Usunięcie zmiany na wysokości podstawy pod kontrolą wzroku daje gwarancję braku nawrotu [9]. Przy prawidłowo wykonanym zabiegu ryzyko nawrotu po polipektomii histeroskopowej waha się w granicach 2,5-3,7% [124,125]. Takie postępowanie daje również możliwość usunięcia zmiany w całości, co jest szczególnie ważne w przypadku współistnienia w polipie innej patologii tj. rozrostu lub raka endometrialnego [126]. Metod mechanicznego usunięcia podejrzanej zmiany z jamy macicy jest kilka. Najlepsze efekty uzyskuje się przy zastosowaniu narzędzi bipolarnych. Zmiany o średnicy powyżej 20 mm, umiejscowione w dnie oraz zmiany występujące u pacjentek po menopauzie należy usuwać przy pomocy pętli resektoskopu. Natomiast zmiany małe o średnicy poniżej 20 mm, z wyraźnie odgraniczoną szypułą należy usuwać przy pomocy nożyczek histeroskopowych pod bezpośrednią kontrolą wzroku [5,127,128]. W przypadku dużych zmian niektóre ośrodki zalecają zastosowanie morcelatora histeroskopowego [129,130]. Oczywiście sam zabieg jest uzależniony od wielu czynników- jakości sprzętu, doświadczenia operatora, warunków anatomicznych, liczby i wielkości polipów [131,132]. Do najczęstszych, aczkolwiek rzadko spotykanych powikłań należą: infekcja, krwawienie, PID, uszkodzenie ścian macicy. Specyficznym powikłaniem dotyczącym histeroskopii jest IAS (Intravascular Absorption Syndrome) jako skutek wewnątrznaczyniowej absorpcji medium zastosowanego przy histeroskopii. Istnieje niewiele zgłoszonych przypadków tego zespołu [133].

W badaniach Lagana i wsp. udowodniono, że zastosowanie przed zabiegiem pochodnych gestagenów, w szczególności desogestrelu, powodowało atrofię endometrium co skutkowało lepszą widocznością i warunkami zabiegu - ułatwiając i skracając czas histeroskopii. Dodatkowo przy niewielkich skutkach ubocznych zmniejszono obfitość krwawienia po zabiegu [134]. Ryzyko wystąpienia zespołu Ashermana po polipektomii jest niskie, gdyż nie dochodzi do uszkodzenia miometrium w przeciwieństwie do klasycznego wyłyżeczkowania jamy macicy bez kontroli wzroku [135]. Nieliczne ośrodki kliniczne w

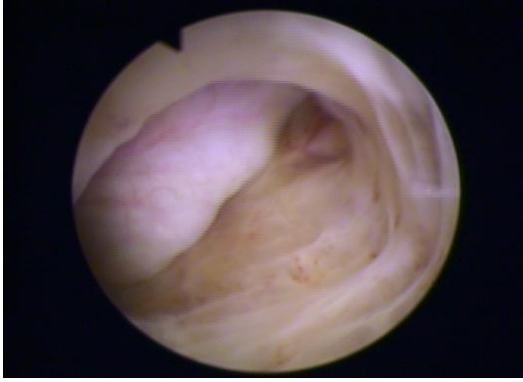
celu zapobieżenia wystąpieniu zrostów wewnątrzmacicznych (IUA-intrauterine adhesions) lub w skrajnym przypadku zespołu Ashermanna u pacjentek w wieku reprodukcyjnym zalecają stosowanie kwasu hialuronowego po zabiegu [141]. Reasumując, histeroskopowe usunięcie polipa endometrialnego pozostaje „złotym standardem” leczenia tej patologii endometrium, dodatkowo jest zabiegiem obarczonym niskim odsetkiem powikłań, powtarzalnym, względnie łatwo dostępnym i tanim [136].

Niektóre ośrodki zalecają pozabiegowe zastosowanie terapii progesteronowej, która jak pokazały badania, zapobiega nawrotowi zmiany oraz powoduje wzrost poziomu hemoglobiny u pacjentek, u których polip endometrialny objawiał się nieprawidłowymi krwawieniami z dróg rodnych [137].

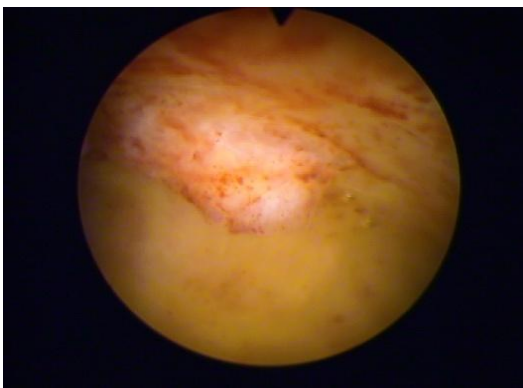
Należy pamiętać o prawidłowej kwalifikacji do zabiegu histeroskopowego. Żadne wytyczne dotyczące dobrej praktyki nie zalecają histeroskopii jako obowiązkowego narzędzia diagnostycznego w przypadku niepłodności. Natomiast w sytuacji uzasadnionego podejrzenia polipa endometrialnego, opartego na badaniach obrazowych lub/i wcześniej wykonanej histeroskopii diagnostycznej ze wskazań, wykonanie histeroskopii z równoczesową polipektomią poprawia płodność i zwiększa odsetek wystąpienia ciąży u takiej pacjentki z 43% do ok. 80% [138,139]. Dotyczy to zarówno ciąż spontanicznych jak i pacjentek poddanych następnie technikom wspomaganego rozrodu np. wykonanie polipektomii przed planowanym zabiegiem IUI zwiększa znamienne odsetek ciąż [140].

Niestety ciągle istnieją ośrodki, które nie posiadając histeroskopu zabiegowego próbują usunąć zmianę „na ślepo” podczas zabiegu wyłyżeczkowania kanału i jamy macicy. Ta technika niestety często nie usuwa zmiany lub prowadzi do fragmentacji polipa, co utrudnia a często uniemożliwia diagnozę histopatologiczną [86]. Przy zastosowaniu tego sposobu leczenia aż 50-85% polipów nie zostaje usuniętych [15]. Według innych badań tylko 8% zmian o charakterze polipa endometrialnego jest usuwanych bez kontroli wzroku [142-144]. Biorąc pod uwagę czynniki ryzyka i możliwość powikłań występujących po zabiegu łyżeczkowania (tj. krwawienie, ryzyko uszkodzenia ścian macicy, ryzyko infekcji, ryzyko którym obarczone jest znieczulenie), znacząco przewyższających korzyści płynące z tego zabiegu, nie jest on zalecany w przypadku podejrzenia polipa endometrialnego. W takich przypadkach pacjentki powinny być kierowane do ośrodków referencyjnych dysponujących odpowiednim sprzętem histeroskopowym.





**Rycina 13.** Obraz histeroskopowy uszypułowanego polipa endometrialnego wychodzącego ze ściany przedniej u 38-letniej pacjentki (materiał własny).



**Rycina 14.** Obraz histeroskopowy po usunięciu polipa u w/w pacjentki z widocznym kikutem szypuły (materiał własny)

### 2.6.2 Leczenie hormonalne

Leczenie hormonalne nie jest metodą z wyboru w przypadku polipów endometrialnych. Stosuje się ją raczej w celu zapobieżenia wystąpienia wznowy po wcześniejszym leczeniu zabiegowym. Dane dotyczące udowodnionego działania tej metody są skąpe. Sugeruje się zastosowanie wewnątrzmacicznych systemów uwalniających lewonogesterel (LING-IUS) w przypadku pacjentek leczonych terapią estrogenową lub Tamoxifenem. Działanie to ma na celu zapobieżenie wystąpienia nie tylko polipa endometrialnego ale również rozrostu endometrium [145].

Wada-Hiraike zaproponował zastosowanie dwuskładnikowej doustnej antykoncepcji jako sposobu leczenia polipów endometrialnych, które podzielił nie ze względu na wielkość czy lokalizację ale na budowę. Odsetek regresji zmian po 2-5 miesięcznym leczeniu hormonalnym był większy w przypadku polipów tzw „siedzących” niż uszypułowanych a więc tych trudniejszych technicznie do usunięcia w czasie histeroskopii [146]. Przyczyny

apoptozy komórek endometrium i spadku odsetka proliferacji w komórkach gruczołowych tego zjawiska upatruje się w przeciwzapalnym działaniu progesteronu, zwiększonym odsetku pod wpływem dwuskładnikowej antykoncepcji doustnej oraz stałych poziomów hormonów powodujących stabilizację tkanki endometrialnej [147]. Zdania dotyczące zastosowania HRT są podzielone. Niektórzy badacze podają spadek częstości występowania polipów w trakcie terapii, tłumacząc to supresyjnym działaniem na endometrium. Mittal i wsp. nie udowodnili takiego działania HRT, ponieważ w zrębie polipa obserwuje się obniżoną ekspresję receptorów progesteronowych [20,128]. Wątpliwości powoduje także leczenie hormonalne stosowane bez wcześniejszego stwierdzenia charakteru zmiany w badaniu histopatologicznym.

## **2.7 Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF)**

### **2.7.1 Charakterystyka**

Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF, vascular endothelial growth factor) został scharakteryzowany jako wiążący heparynę naczyniowy czynnik wzrostu ze szczególnym powinowactwem do komórek śródbłonkowych [150,151]. Początkowo zdefiniowano go jako czynnik przepuszczalności naczyń krwionośnych (VPF-vascular permeability factor), który powiązano z naczyniami krwionośnymi obecnymi w guzach [152]. Następnie odkryto receptory dla VEGF : VEGFR-1 /flt-1/ oraz VEGFR-2 /KDR/flk-1/. Oba receptory charakteryzują się obecnością siedmiu domen podobnych do immunoglobulin w ich częściach zewnątrzkomórkowych i dlatego zostały zarejestrowane jako nowa podrodzina receptorów kinazy tyrozynowej [153,154]. Początkowo rozpoznano VEGF typ A. Następnym krokiem było wykrycie dodatkowych czynników wzrostu należących do rodzi ny VEGF, dzielących wspólne receptory, takich jak łożyskowy czynnik wzrostu (PIGF) oraz pozostałe trzy czynniki o charakterze VEGF (VEGF B-D). VEGF-A wiąże się z receptorami VEGFR-1 (flt-1) oraz VEGFR-2 (KDR/flk-1) [155]. VEGFR-2 pośredniczy w niemal wszystkich znanych odpowiedziach komórkowych na VEGF. Funkcja VEGFR-1 jest mniej zbadana. Zakłada się, że moduluje on działanie sygnalizacji VEGFR-2. Inną funkcją VEGFR-1 może być działanie jako receptora pułapki, który ogranicza wiązanie VEGF na VEGFR-2. Trzeci opisany receptor, VEGFR-3, nie wiąże VEGF-A. Jego ligandami są VEGF-C i VEGF-D i pośredniczy on w tworzeniu sieci naczyń limfatycznych [156]. Odkryto, że VEGF jest wyrażany w przestrzennym i czasowym powiązaniu z fizjologicznymi zdarzeniami

angiogenezy *in vivo* [157,158]. VEGFR-1 jest również wytwarzany w postaci rozpuszczalnej (sVEGFR-1). Dzieje się tak dzięki alternatywnemu składaniu mRNA. Działa on jak specyficzny antagonistą o wysokim powinowactwie poprzez konkurencyjne wiązanie VEGF. [159]. Ponadto stwierdzono, że ekspresja VEGF jest nasiloną przez niedotlenienie [160] oraz że angiogeneza zapoczątkowana przez VEGF jest powiązana nie tylko ze wzrostem guzów, ale również innymi chorobami współistniejącymi z nieprawidłowym naczyniotworzeniem i nieprawidłowym gojeniem się ran [161,162].

### 2.7.2 Funkcja VEGF

Zakłada się, że VEGF jest głównym regulatorem angiogenezy i waskulogenezy. Potwierdzają to badania, które skoncentrowały się przede wszystkim na mechanizmach, za pomocą których VEGF reguluje waskulogenezę i angiogenezę podczas rozwoju embrionalnego oraz na roli VEGF w etiologii chorób związanych z nieprawidłową neowaskularyzacją.

Rolę VEGF jako centralnego regulatora waskulogenezy wykazano w badaniach, w których zastosowano technikę modyfikacji genów u myszy. Zwierzęta, którym brakuje tylko jednego z dwóch alleli VEGF giną wewnątrzmacicznie z powodu wad rozwojowych układu sercowo-naczyniowego [163-165]. Te obserwacje wskazują, że rozwój układu sercowo-naczyniowego zależy od generacji precyzyjnych gradientów stężenia VEGF oraz że zmniejszenie ilości VEGF wytwarzanego podczas rozwoju zarodka może prowadzić do zaburzenia angiogenezy prowadzącymi do śmierci zarodka. Całkowity brak genu VEGFR-2 powoduje brak wzrostu zarodka na tle braku wytworzenia się naczyń krwionośnych [166]. Zakłócenie genu kodującego receptor VEGFR-1 nie zapobiegło różnicowaniu komórek śródbłonka u zwierząt homozygotycznych, ale rozwój funkcjonalnych naczyń krwionośnych z tych komórek śródbłonka został poważnie zaburzony [167].

Osobną grupę badań stanowiły eksperymenty potwierdzające rolę VEGF w angiogenezie guzów. Wytwarzanie czynników angiogennych przez komórki nowotworowe jest niezbędne dla rozwoju guzów zwłaszcza litych [168]. VEGF przyczynia się również do rozwoju nowotworów ze względu na jego zdolność do zwiększania przepuszczalności naczyń krwionośnych. VEGF indukuje tworzenie się fenestracji w naczyniach krwionośnych i tworzenie organelli pęcherzykowo-wakuolowych, które tworzą kanały przez które może dochodzić do wynaczynienia białek krwiopochodnych. Prowadzi to do wsparcia wzrostu

komórek śródbłonka i komórek nowotworowych oraz umożliwia inwazję komórek zrębu [168,169].

Synteza VEGF jest indukowana w głównej mierze przez hipoksję. Niedotlenienie a często również hipoglikemia, są głównymi stymulatorami ekspresji VEGF-A [170,171]. Wydaje się, że produkcja innych członków rodziny VEGF, takich jak VEGF-B, VEGF-C i PlGF, nie jest w takim stopniu nasiloną tylko przez niedotlenienie, ale również przez inne czynniki. Zakłada się, że głównym regulatorem ekspresji VEGF w komórkach jest niedotlenienie, ale odpowiedź komórkowa nie byłaby prawidłowa bez współdziałania innych czynników takich jak czynnik martwicy nowotworów (TNF), czynnik wzrostu fibroblastów typu 4 (FGF-4), insulinopodobny czynnik wzrostu typu 1 (IGF-I), transformujący czynnik wzrostu beta (TGF-beta), czynnik wzrostu keratynocytów (KGF), interleukina 1b (IL-1b) i interleukina 6 (IL-6) oraz gonadotropiny [172-177]. Inne cytokiny, takie jak interleukina 10 (IL-10) i interleukina 13 (IL13) mogą hamować uwalnianie VEGF [178]. Kolejnym elementem biorącym udział w mechanizmie działania VEGF jest tlenek azotu. Tlenek azotu przyczynia się do wzrostu przepuszczalności naczyń krwionośnych a jego wytwarzanie jest regulowane przez VEGF. Wskazuje to na dodatnie sprzężenie zwrotne występuje między tymi dwoma czynnikami [179-181]. Transkrypcja mRNA VEGF jest w głównej mierze regulowana przez czynnik indukowany hipoksją typu 1 (HIF-1, hypoxia-inducible factor 1), który zawiera domenę transaktywującą [182]. Krążący VEGF wiąże się następnie z receptorami VEGF na komórkach śródbłonka uruchamiając szlak kinazy tyrozynowej [187].

### 2.7.3 VEGF a endometrium.

Endometrium jest dynamiczną tkanką, która począwszy od pokwitania aż do przekwitania podlega regularnym przemianom i różnicowaniu w odpowiedzi na wiele czynników takich jak hormony płciowe, czynniki wzrostu, cytokiny etc. Każdy cykl miesięczkowy skutkuje powstaniem układu naczyniowego, którego celem jest odżywienie proliferujących a następnie wydzielających komórek endometrium. Ten proces wymaga skoordynowanego układu regulatorowego, który obejmuje nie tylko czynniki angiogenne ale również niedotlenienie jako jeden z głównych czynników przeksztalczeń endometrium [183]. Do głównych mediatorów angiogenezy w endometrium zaliczamy śródbłonkowy czynnik wzrostu nabłonka naczyniowego (VEGF), rozpuszczalny receptor VEGF-1, angiopoetynę (ANGPT), czynnik komórek zrębu 1 (SDF-1/CXCL12) oraz interleukinę 8 [184-186]. Rolą VEGF jest stymulacja proliferacji, zwiększenie przepuszczalności śródbłonka naczyń oraz

migracja komórek śródbłonka. Część badań podaje, że najsilniejsze działanie VEGF początkowo obserwuje się tuż po zakończeniu krwawienia menstruacyjnego we wczesnej fazie proliferacyjnej. Dzieje się tak ze względu na aktywację czynnika indukowanego niedotlenieniem HIF-1 $\alpha$  [187]. HIF-1 $\alpha$  jest czynnikiem transkrypcyjnym reagującym poprzez wiązanie z elementami odpowiedzi na niedotlenienie w promotorach genów kodujących VEGF [183]. W warunkach prawidłowego natlenowania jego ekspresja jest zmniejszona. Wiedza o zróżnicowaniu ekspresji VEGF podczas cyklu miesięczkowego jest ciągle ograniczona a wyniki badań wzajemnie się wykluczają. Część badań podaje, że pik ekspresji obserwuje się podczas późnej fazy wydzielniczej i wczesnej fazy proliferacyjnej [188]. Aczkolwiek inne badania nad receptorami dla VEGF w ludzkim endometrium podają, że najwyższa ekspresja VEGF jest spotykana jednak pod koniec fazy proliferacyjnej i w pierwszej połowie fazy wydzielniczej [193]. Shifren i wsp. [189] zbiorczo podaje, że poziom VEGF rośnie 3,6-krotnie począwszy od wczesnej fazy proliferacyjnej do późnej fazy wydzielniczej. Oprócz zwiększonej ekspresji HIF-1 $\alpha$  w endometrium obserwuje się zwiększoną produkcję CoCl<sub>2</sub>, czynnika naśladującego niedotlenienie, który indukuje stan podobny do hipoksji poprzez blokowanie proteasomalnej degradacji białek HIF-1 $\alpha$ . Istnieją teorie, że ważną rolę w angiogenezie mają leukocyty wewnątrznaczyniowe, które dostarczają VEGF bezpośrednio do komórek śródbłonka. Niektóre badania podają, że ekspresja VEGF najsilniej wyrażona jest w komórkach gruczołowych endometrium, a słabiej w komórkach zrębu endometrium [190,191]. Inne natomiast podają odwrotną korelację [183,192]. Nadrzędnymi czynnikami mającymi wpływ na przekształcenia endometrium są hormony płciowe. Estrogen i jego pochodne są głównym czynnikiem kierującym tworzeniem nowego łożyska naczyniowego, promowaniem wzrostu i różnicowania komórkowego w endometrium. Okada i wsp. wykazali, że estradiol (E2) znacząco hamuje transkrypcję mRNA dla sVEGF-1 czyli czynnika antagonistycznego i hamującego działanie VEGF [194]. Oznacza to, że realny potencjał angiogeny czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego zależy od równowagi VEGF-sVEGFR-1 na poziomie lokalnym. Drugim najważniejszym hormonem steroidowym biorącym udział w cyklu miesięczkowym jest progesteron. Początkowe niewysokie poziomy progesteronu stabilizują ekspresję VEGF. Wraz ze zwiększającym się poziomem progesteronu w późnej fazie wydzielniczej dochodzi do hamowania wzrostu VEGF. Dodatkowo progesteron obniża ekspresję receptorów estrogenowych w endometrium, tym samym hamując działanie VEGF [195].

Prześlędzono również jak wygląda ekspresja VEGF w chorobach rozrostowych endometrium. Angiogeneza jest kluczowym procesem we wzroście i rozprzestrzenianiu się

nowotworów. Czynniki wzrostu, w tym VEGF pełnią główną rolę w tym procesie. Ponieważ większość zmian przed- i nowotworowych jest ściśle skorelowana z działaniem estrogenów na tkankę endometrialną przyjmuje się, że również ekspresja VEGF jest zwiększona. Badania wykazały [196], że ekspresja mRNA dla VEGF jest znacząco wyższa u pacjentek chorujących na nowotwór złośliwy endometrium jak i w grupie z rozrostem endometrium w porównaniu z grupą kontrolną z prawidłowym endometrium. Dowodzi to istotnej roli angiogenezy w rozwoju patologicznych zmian endometrium i może stanowić potencjalny biomarker prognostyczny. Co ciekawe, dochodzi głównie do wzrostu ekspresji VEGF B, który odpowiada za organizację interakcji śródbłonek-macierz i poprzez zwiększenie ekspresji uPA (aktywator plazminogenu o typie urokinazy) ułatwia degradację macierzy i rozprzestrzenianie się nieprawidłowych komórek. Badania wykazały zwiększone poziomy VEGF w surowicy pacjentek z nowotworami ginekologicznymi- tj. w raku piersi i endometrium, nie można natomiast traktować tej obserwacji jako objawu patognomicznego ponieważ podwyższone wartości VEGF obserwuje się również u pacjentek chorych z powodu zmian łagodnych takich jak mięśniaki macicy i włókniaki piersi. Dodatkowo stwierdza się zwiększoną ekspresję receptorów dla VEGF, głównie VEGFR-2/KDR w komórkach nowotworowych raka endometrium [197]. Zwiększona ekspresja VEGF nie tylko współwystępuje z rakiem endometrium, ale udowodniono również liczbową korelację między poziomem ekspresji VEGF w komórkach nowotworowych a stopniem zaawansowania nowotworu. Ekspresja VEGF jest znacząco wyższa w przypadku wyższego stadium wg FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics System), głębszej inwazji myometrium, słabszego zróżnicowania komórek oraz utraty wrażliwości na hormony [198].

Doniesień o badaniach ekspresji VEGF w polipie endometrialnym jest niewiele. Xuebing i wsp. [42] kontynuując swoje badania dotyczące receptorów dla hormonów steroidowych i ich obecności w komórkach polipa endometrialnego prześledzili ekspresję VEGF oraz TGF-beta1 w polipie endometrialnym. Wykazali, że w komórkach polipa endometrialnego ekspresja VEGF i TGF-beta1 jest znacząco wyższa niż w prawidłowym, otaczającym zmianę endometrium. Erinanca i wsp. w 2016 roku badali ekspresję VEGF oraz nestyny w polipie endometrialnym [199]. Ekspresja VEGF była statystycznie wyższa w polipie endometrialnym niż w grupie kontrolnej zawierającej prawidłowe endometrium fazy proliferacyjnej.

### **3. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY**

1. Ocena związku pomiędzy ekspresją VEGF a występowaniem polipa endometrialnego.
2. Identyfikacja typowego dla polipów wzorca ekspresji VEGF.
3. Określenie korelacji między wielkością polipa endometrialnego a ekspresją VEGF.
4. Uzyskanie informacji o ekspresji VEGF w fazie proliferacyjnej i sekrecyjnej cyklu miesięczkowego.

## 4. MATERIAŁ I METODY

### 4.1 Dobór pacjentek

Grupa badana liczyła 200 pacjentek hospitalizowanych w Klinice Ginekologii Operacyjnej i Ginekologii Onkologicznej ICZMP w latach 2011-2013. Podstawą do włączenia do badania była analiza wyników badań histopatologicznych wykonanych w Zakładzie Patomorfologii ICZMP.

Grupa badawcza (nazwana „Polipy”) liczyła 100 pacjentek, które miały wykonaną w Klinice Ginekologii Operacyjnej i Ginekologii Onkologicznej ICZMP histeroskopię zabiegową wraz z usunięciem polipa endometrialnego, potwierdzonego w badaniu histopatologicznym bez obecności innych patologii. Grupa badana zawierała zarówno pacjentki objawowe, które zgłosiły się do lekarza prowadzącego z powodu np. nieprawidłowych krwawień z dróg rodnych lub niepłodności oraz pacjentki bezobjawowe, które skierowano do szpitala z powodu nieprawidłowego obrazu ultrasonograficznego. Mediana wieku wynosiła 58 lat a przedział wiekowy 27-88 lat. Wykluczone były pacjentki, u których w preparacie histopatologicznym oprócz polipa endometrialnego rozpoznano inną patologię endometrium, pacjentki u których w samym polipie endometrialnym rozpoznano współtowarzyszącą inną patologię oraz pacjentki u których w preparacie histopatologicznym stwierdzono materiał niediagnostyczny lub brak materiału do przeprowadzenia badania. Wykluczono pacjentki z innymi patologiami narządu rodnego jak np. mięśniaki macicy, torbiele jajników etc. Pacjentki nie przyjmowały leków hormonalnych minimum 3 miesiące przed zabiegiem.

Grupa kontrolna (nazwana „Endometrium”) liczyła 100 pacjentek. Stanowiły ją pacjentki w przedziale wiekowym 21-55 lat, które w trakcie hospitalizacji w Klinice Ginekologii Operacyjnej i Ginekologii Onkologicznej ICZMP poddane były zabiegowi wyłęczekowania jamy macicy, natomiast badanie histopatologiczne nie wykazało obecności patologii endometrium- stwierdzono obecność prawidłowego endometrium fazy folikularnej (49 pacjentek) lub lutealnej (51 pacjentek). Grupę kontrolną stanowiły pacjentki skierowane do szpitala z powodu zaburzeń statyki narządu rodnego, pacjentki z nietrzymaniem moczu, pacjentki z nieprawidłowym wynikiem badania cytologicznego oraz bezobjawowe pacjentki z podejrzeniem polipa endometrialnego w badaniu ultrasonograficznym, które to podejrzenie nie potwierdziło się w trakcie histeroskopii. Mediana wieku wynosiła 45 lat. Wykluczono z



grupy kontrolnej pacjentki z innymi patologiami ginekologicznymi (min. mięśniaki macicy, guzy przydatków), pacjentki u których w preparacie histopatologicznym rozpoznano inne patologie endometrium lub stwierdzono materiał niediagnostyczny lub brak materiału do przeprowadzenia badania. Każda z pacjentek wyraziła na piśmie świadomą i dobrowolną zgodę na poddanie się zabiegowi histeroskopii zabiegowej i/lub zabiegowi wyłyżeczkowania kanału i jamy macicy. Pacjentki w trakcie hospitalizacji w Klinice Ginekologii Operacyjnej i Ginekologii Onkologicznej ICZMP miały wykonane przezpochwowe badanie ultrasonograficzne oceniające narząd rodny przy pomocy aparatu Accuvix V10, w szczególności ocenę średnicy polipa endometrialnego.

Powtórne badanie histopatologiczne zostało przeprowadzone przez wykwalifikowany personel medyczny zgodnie z procedurą obowiązującą w Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi. Badania immunohistochemiczne przeprowadzono w Instytucie Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi.

Eksperymenty przeprowadzone z użyciem materiału biologicznego pochodzącego od pacjentek zakwalifikowanych do badania otrzymały zgodę nr 50/2016 Komisji Etyki Badań Naukowych Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi.

Badanie zrealizowano w ramach grantu Młody Naukowiec ICZMP finansowanego z dotacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

## **4.2 Odczynniki**

W celu odsłonięcia i uwidocznienia antygenów w skrawkach tkanek utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie zastosowano zestaw Antigen Unmasking Solution (Vector Labs, Burlingame, US). Do detekcji VEGF wykorzystano pierwszorzędowe królicze poliklonalne przeciwciała skierowane przeciwko białku VEGF (Anti-VEGF PU483-UP BioGenex) oraz drugorzędowe końskie immunoglobuliny skierowane przeciwko rejonowi Fc przeciwciał króliczych (ImmPRESS® HRP Horse Anti-Rabbit IgG Polymer Detection Kit, Vector Labs, Burlingame, USA) w rozcieńczeniu 1:100. Do wizualizacji utworzonego kompleksu antygen-przeciwciała użyto zestawu ImmPACK DAB peroxidase substrate (Vector Labs, Burlingame, USA). Zasada oznaczenia z wykorzystaniem tego zestawu składa się z dwóch etapów – w pierwszym dochodzi do przyłączenia streptawidyny sprzężonej z peroksydazą chrzanową (HRP) do sprzężonych z biotyną przeciwciał drugorzędowych, związanych z kompleksem VEGF-przeciwciała pierwszorzędowe (wykorzystane naturalne powinowactwo biotyny do streptawidyny), w drugim etapie dochodzi do reakcji chromogenu DAB (substrat dla HRP) z peroksydazą chrzanową i utworzenia wskutek utlenienia DAB

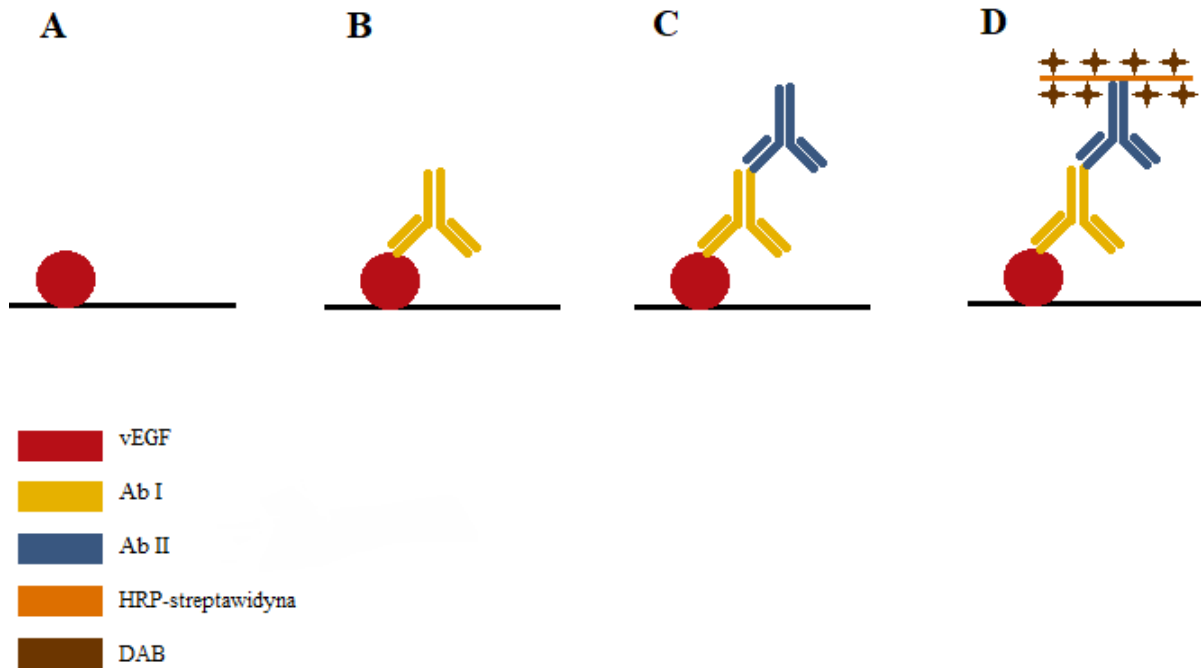
produktu końcowego o brązowym zabarwieniu. Szkiełka mikroskopowe, pokryte Poli-Lizyną, zakupiono z firmy Menzel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Odczynniki przeznaczone do utrwalenia preparatów immunohistochemicznych zakupiono z firmy DAKO (Agilent Carpinteria, Santa Clara, USA). Wodę destylowaną, rozpuszczalniki organiczne, hematoxylinę oraz pozostałe odczynniki zakupiono z firmy Merck (Darmstadt, Niemcy).

#### **4.3 Analiza immunohistochemiczna ekspresji VEGF**

Próbki tkanek uzyskane w trakcie histeroskopii zabiegowej lub wyłyżeczkowania jamy macicy utrwalono w 10% roztworze formaldehydu przez 12 godzin a następnie umieszczono je w bloczku parafinowym. Za pomocą mikrotomu rotacyjnego Accu-Cut SMR 200 (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) bloczki pocięto na mikroskrawki (4µm), które umieszczono na szkiełkach mikroskopowych. Przed wykonaniem barwienia preparatów przeciwciałami anti-VEGF szkiełka przepłukano ksylenem (3-krotnie po 5 min) w celu usunięcia parafiny a następnie przepłukano w 100 % etanolu dwukrotnie po 10 min, 95% etanolu dwukrotnie po 10 min, oraz przez minutę w wodzie destylowanej, aby uwodnić preparat. W celu potwierdzenia rozpoznania oraz wykluczenia innych patologii endometrium, preparaty wybarwiono hematoksyną i eozyną (H+E) a następnie dokonano powtórnej oceny mikroskopowej. Celem odsłonięcia i uwidocznienia antygenów na powierzchni preparatu użyto zestawu Antigen Unmasking Solution (Vector Labs, Burlingame, US). Preparaty inkubowano w temperaturze 120°C przez 1 min z odczynnikiem zawierającym kwas cytrynowy a następnie przepłukano dwukrotnie PBS przez 5 minut. Inaktywacji wewnątrzkomórkowej peroksydazy dokonano poprzez inkubację preparatów ze 3% roztworem nadtlenu wodoru (przygotowanym każdorazowo przed barwieniem) przez 20 min w temperaturze pokojowej a następnie szkiełka przepłukano trzykrotnie PBS. W celu zablokowania niespecyficznego wiązania przeciwciał, preparaty przepłukano przez 20 min roztworem surowiczej albuminy bydlęcej (BSA). Inkubacje z pierwszorzędowymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko ludzkiemu antygenowi VEGF (Anti-VEGF PU483-UP BioGenex ) przeprowadzono przez 30 minut w temperaturze pokojowej a następnie przemyto próbki trzykrotnie w PBS w celu usunięcia niezwiązanych przeciwciał. W przypadku kontroli negatywnej, nie zastosowano przeciwciał pierwszorzędowych. Inkubację z drugorzędowymi przeciwciałami przeprowadzono przez 30 min w temperaturze pokojowej, po czym przeprowadzono trzykrotne płukanie preparatów w PBS. Następnie na preparaty nałożono roztwór streptawidyny kowalencyjnie sprzężonej z enzymem peroksydazy chrzanowej oraz substrat dla HRP 3,3-diamino-czterochlorkiem benzydyny (ImmPack DAB

peroksidase substrate, Vector Lab), aż do uzyskania brązowego zabarwienia preparatów (okresowo sprawdzano skuteczność detekcji pod mikroskopem). Ostatnim etapem barwienia immunohistochemicznego było dodanie hematoksyliny w celu wizualizacji tła (niespecyficzne wiązanie) a następnie trzykrotne przepłukanie roztworem PBS. W celu przygotowania preparatów do oceny mikroskopowej najpierw szkiełka przepłukano wodą destylowaną a następnie uwodniono poprzez płukanie kolejno w 95% etanolu (dwukrotnie po 10 sekund), 100% etanolu (dwukrotnie po 10 sekund) i ksylenie (dwukrotnie po 10 sekund). Preparaty pokryto preparatem utrwalającym i poddano analizie mikroskopowej. Zastosowano mikroskop odwrócony AxioObserved D1 uzbrojonego w kamerę AxioCam HRm (Carl Zeiss, Niemcy). Do analizy ilościowej wykorzystano oprogramowanie Axio Vision ver. 4.8 (Carl Zeiss, Oberkochen, Niemcy). Analiza mikroskopowa została przeprowadzona niezależnie przez dwóch wykwalifikowanych pracowników. Miejsca barwienia VEGF oceniono na podstawie parametrów odcięcia dotyczących odcienia, nasycenia i jasności barwienia. Dla każdego wybranego pola preparatu dobierano optymalne oświetlenie oraz ostrość obrazu. Zastosowano 400-krotne powiększenie mikroskopowe. Regiony uznane za pozytywnie wybarwione odniesiono procentowo do powierzchni całego obrazu. Aby ocena wyników mikroskopowych była reprezentacyjna dla danej próbki, analizowano dziesięć losowo wybranych pól mikroskopowych (dla każdej niezależnej próbki), a następnie średnią z tych pól uznano za wynik ostateczny. We wszystkich przeanalizowanych preparatach po wybraniu obrazów do analizy zastosowano te same poziomy odcięcia tła (niespecyficzne wiązanie przeciwciał).

## Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium



**Rycina 15.** Etapy detekcji immunohistochemicznej ekspresji VEGF

- (A) Powierzchnia endometrium z czynnikiem wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF)
- (B) Wiązanie pierwszorzędowych przeciwciał króliczych (Ab I) skierowanych przeciwko C-końcowi antygenowi VEGF
- (C) Łączenie drugorzędowych przeciwciał końskich (Ab II) z przeciwciałami pierwszorzędowymi przy udziale biotyny
- (D) Reakcja streptawidyny sprzężonej z peroksydazą chrzanową (HRP-streptawidyna) z biotyną sprzężoną z przeciwciałami drugorzędowymi a następnie reakcja enzymatyczna peroksydazy chrzanowej z 3,3-diamino-czterochlorkiem benzydyny (DAB) dająca w efekcie brązowe zabarwienie miejsc z obecnym antygenem VEGF.

### 4.4 Kwantyfikacja uzyskanych danych eksperymentalnych

Pola mikroskopowe wybrane do oceny poddano analizie jakościowej z zastosowaniem popularnego systemu punktacji opierającego się na ocenie odsetka komórek pozytywnie wybarwionych oraz ocenie intensywności barwienia. Ocena ekspresji VEGF dokonano wg przedstawionych poniżej systemów.

Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium

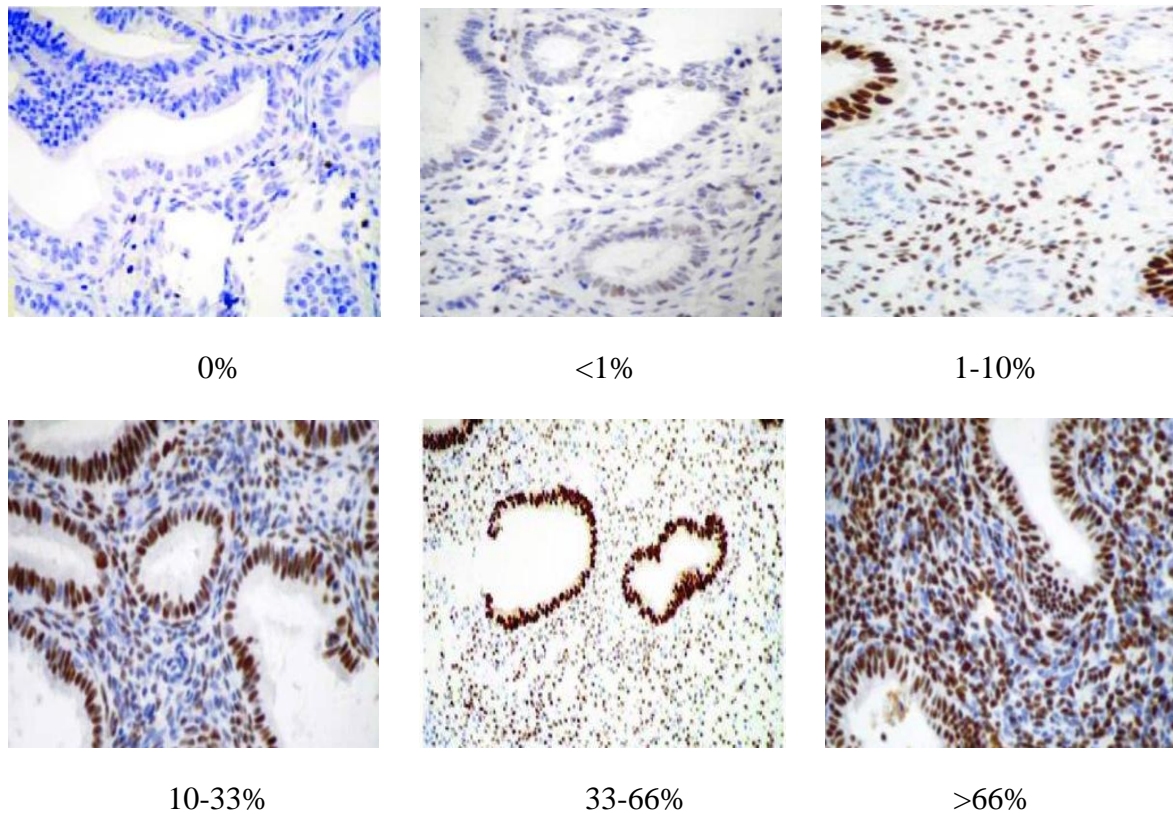
Punktacja [0-5]	Odsetek komórek pozytywnie wybarwionych
0	Brak ekspresji VEGF
1	<1 % komórek pozytywnie wybarwionych
2	1-10 % komórek pozytywnie wybarwionych
3	10-33 % komórek pozytywnie wybarwionych
4	33-66 % komórek pozytywnie wybarwionych
5	>66 % komórek pozytywnie wybarwionych

**Tabela 2.** System oceniający odsetek komórek VEGF-pozytywnych.

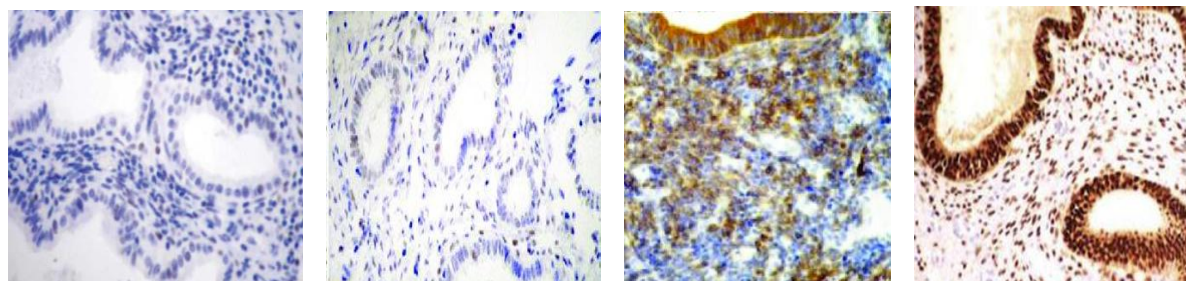
Punktacja [0-3]	Intensywność świecenia
0	Brak wybarwienia
1	Słabe wybarwienie większości komórek
2	Umiarkowane wybarwienie większości komórek
3	Silne wybarwienie większości komórek

**Tabela 3.** System oceniający intensywność świecenia komórek VEGF-pozytywnych (intensity index).

## Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium



**Rycina 16.** Obrazy histopatologiczne poddane ocenie mikroskopowej oceniającej odsetek VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek (powiększenie 400x) (materiał własny).



**Rycina 17.** Obrazy histopatologiczne poddane ocenie mikroskopowej oceniającej intensywność świecenia komórek VEGF-pozytywnych (powiększenie 400x) (materiał własny).

### 4.5 Analiza statystyczna

Analizy statystycznej obejmującej wszystkie testy oraz wykresy wykonano za pomocą pakietu statystycznego Statistica wersja 12.5 (Statsoft, Dell Software) na licencji uczelnianej dla Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Analizę przeprowadzono w Zakładzie Biostatystyki i Medycyny Translacyjnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

## Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium

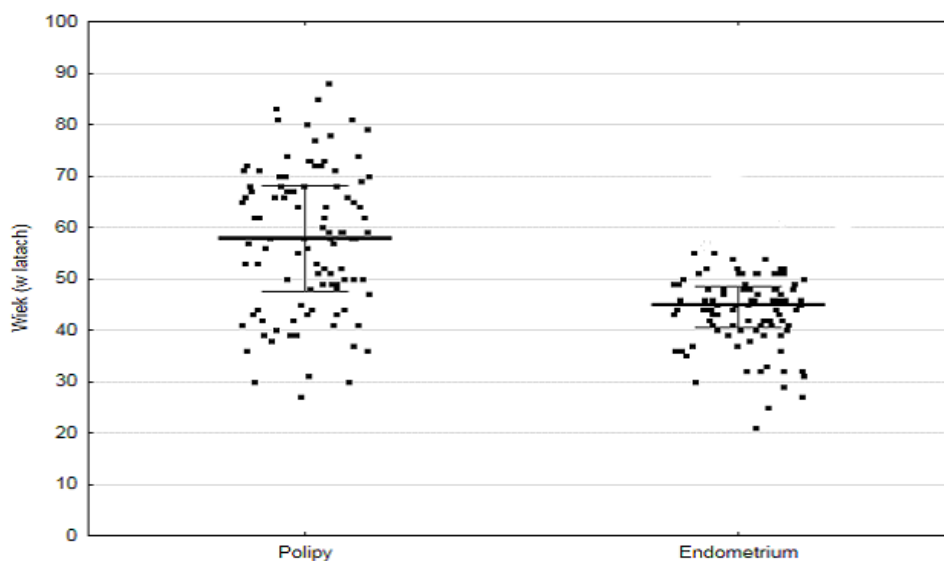
Przy użyciu testu Shapiro-Wilka oceniono czy nasza próba badawcza pochodzi z populacji o normalnym rozkładzie. Równość wariancji w poszczególnych próbach oceniono testem Levine'a. Do oceny różnic w ekspresji VEGF pomiędzy grupą badaną (z rozpoznaniem polipem endometrialnym) a grupą kontrolną (bez patologii endometrium) oraz różnicy pomiędzy ekspresją VEGF w grupie z prawidłowym endometrium w fazie proliferacyjnej i w fazie lutealnej zastosowano nieparametryczny test W Manna-Whitneya. Dane zostały zaprezentowane jako mediany i rozstęp kwartalny (IQR) (lower quartile-LQ-25% dolnych kwartyli, upper quartile-UQ-75% kwartyli). Aby skorelować ze sobą dane zmienne i nieposiadające rozkładu normalnego (np. związek z wiekiem pacjentek lub fazą cyklu a ekspresją VEGF) użyto korelacji Spearmana ( $r$ ). Po przeprowadzeniu analizy wariancji przeprowadziliśmy test *ad hoc* (Kruskala-Wallis), gdy testy statystyczne wykazały brak jednorodności wariancji. Założyliśmy wyniki za statystycznie istotne gdy  $p$  (poziom istotności)  $< 0.05$ . Zgodnie z zakresami ustalonymi przez Cohena, przyjęto silną korelację pomiędzy badanymi zmiennymi dla  $r > 0.5$ , umiarkowaną dla  $r \{0.3; 0.5\}$  a korelację słabą dla  $r < 0.3$ .

## 5. WYNIKI

Grupa badana liczyła 200 osób, mediana wieku w momencie badania 48 lat. Do podgrup „Polipy” oraz „Endometrium” zostało zaliczone po 100 osób, mediany wieku w momencie badania wynosiły odpowiednio 58 i 45 lat.

	Grupa: Wszyscy N = 200		Grupa: Polipy N = 100		Grupa: Endometrium N = 100		p (testu UMW)
	Me (IQR)	Min- Max	Me (IQR)	Min- Max	Me (IQR)	Min- Max	
Wiek [lata]	48 (42 – 58)	21 - 88	58 (47,5 – 68)	27 - 88	45 (40 – 47,5)	21 - 55	< 0,0001

**Tabela 4.** Charakterystyka wiekowa grupy badanej.



**Rycina 18.** Porównanie wieku pomiędzy grupami „Polipy” i „Endometrium”.

Grupy istotnie statystycznie różnią się wiekiem (test U-Manna-Whitneya  $p < 0,0001$ ).

Pacjentki z rozpoznaniem polipem endometrialnym były znamienne statystycznie starsze (mediana wieku [Me]=58; zakres międzykwartyłowy [IQR] 47,5-58) niż pacjentki z prawidłowym endometrium (Me=45; IQR 40-47,5) ( $p < 0,0001$ )

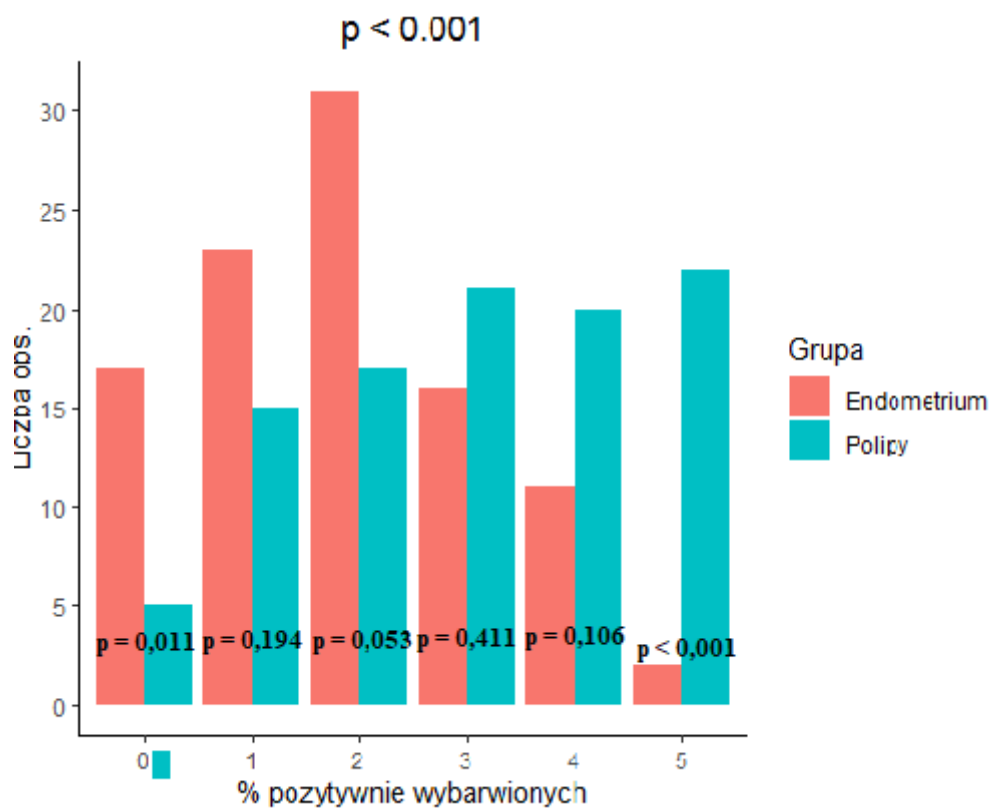


Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium

Analiza grupy badanej oraz grupy kontrolnej z uwzględnieniem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek.

Odsetek pozytywnie wybarwionych [0 - 5]	Polipy	Endometrium	<i>p</i>
0	5	17	0.011
1	15	23	0.194
2	17	31	0.053
3	21	16	0.411
4	20	11	0.106
5	22	2	< 0.001
Razem	100	100	200

**Tabela 5.** Rozkład liczebności poszczególnych odsetków komórek pozytywnie wybarwionych w badanych grupach.



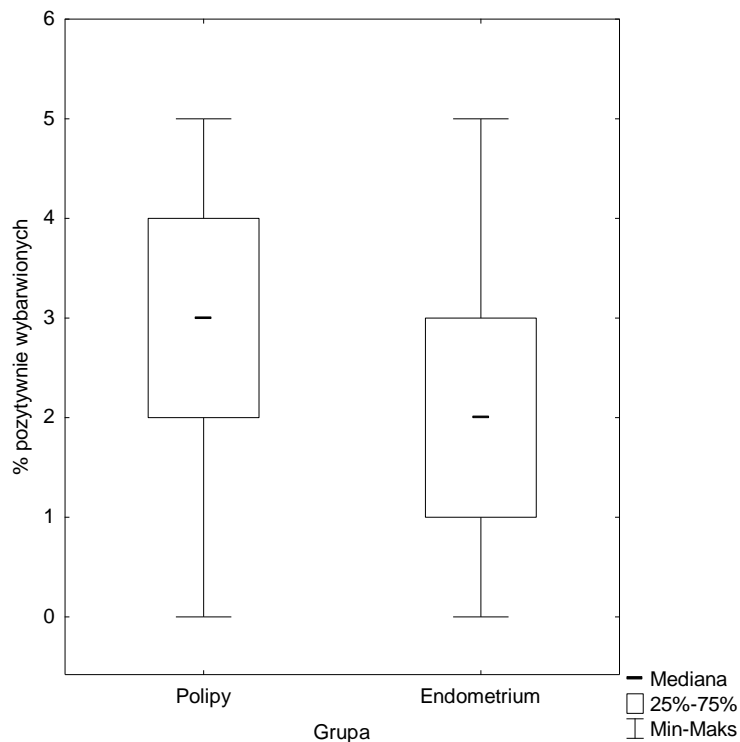
**Rycina 19.** Porównanie odsetka VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek w obu badanych grupach.

Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium

	Grupa: Wszyscy N=200		Grupa: Polipy N=100		Grupa: Endometrium prawidłowe N=100		P Test UMW
	ME ( IQR)	Min- Max	ME ( IQR)	Min- Max	ME ( IQR)	Min- Max	
Odsetek komórek VEGF-pozytywnie wybarwionych	2 (1 – 4)	0 - 5	3( 2 – 4)	0 - 5	2 (1 – 3)	0 - 5	< 0,0001

**Tabela 6.** Charakterystyka grupy badanej z uwzględnieniem odsetka VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek

Odsetek VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek istotnie różni się pomiędzy grupami (test U-Manna-Whitneya  $p < 0,0001$ ).



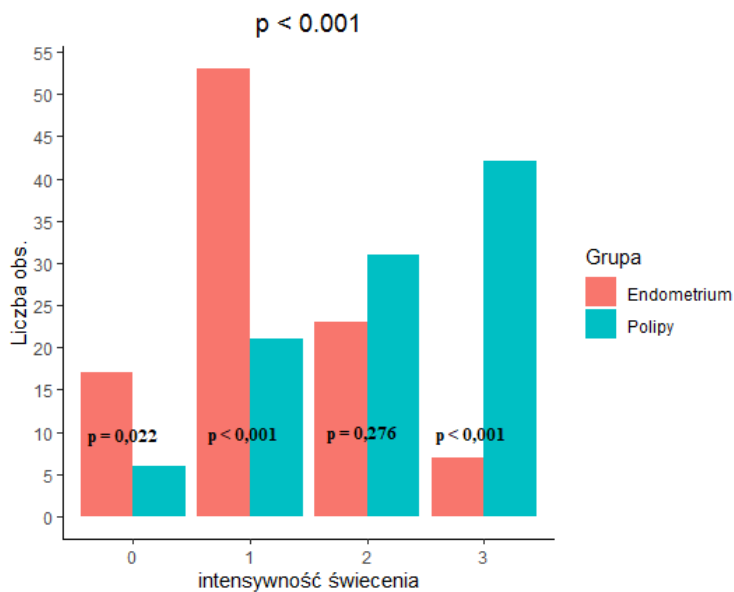
**Rycina 20.** Odsetek VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek w obu badanych grupach z uwzględnieniem mediany

Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium

Analiza grupy badanej oraz grupy kontrolnej z uwzględnieniem intensywności świecenia VEGF- pozytywnie wybarwionych komórek.

Intensywność świecenia [0 - 3]	Polipy endometrialne	Endometrium prawidłowe	p
0	6	17	0.062
1	21	53	< 0.001
2	31	23	0.276
3	42	7	< 0.001
Razem	100	100	200

**Tabela 7.** Zgodność rozkładu w zakresie poszczególnych kategorii intensywności świecenia w grupie polipy i endometrium prawidłowe.



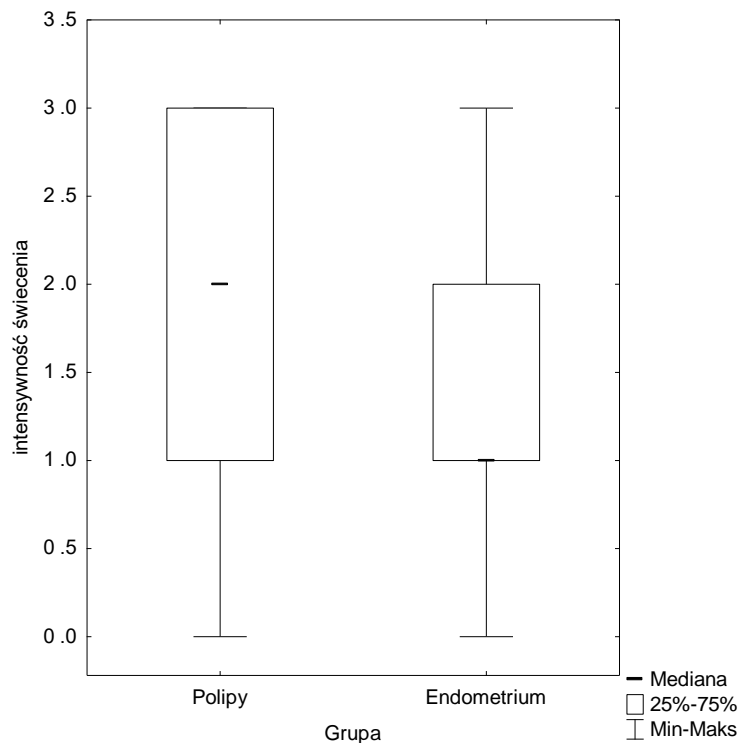
**Rycina 21.** Porównanie intensywności świecenia komórek VEGF-pozytywnych w obu badanych grupach.

Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium

	Grupa: Wszyscy N = 200		Grupa: Polipy N = 100		Grupa: Endometrium prawidłowe N = 100		p (test UMW)
	Me (IQR)	Min-Max	Me (IQR)	Min-Max	Me (IQR)	Min-Max	
Intensywność świecenia komórek VEGF- pozytywnych	2 (1 – 2)	0 - 3	2 (1 -3 )	0 - 3	1 (1 – 2)	0 - 3	< 0,0001

**Tabela 8.** Charakterystyka grupy badanej z uwzględnieniem intensywności świecenia VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek

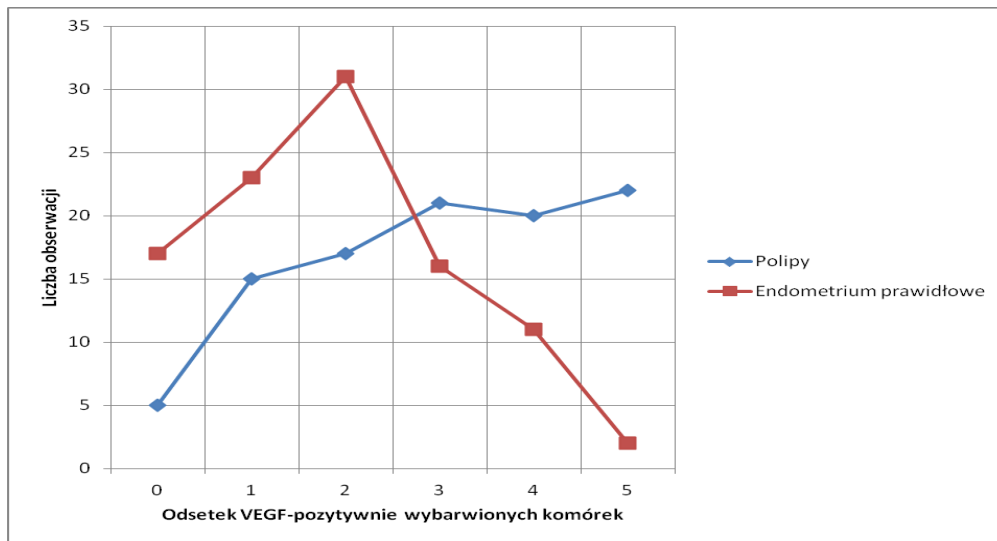
Intensywność świecenia istotnie statystycznie różni się pomiędzy grupami (test U-Manna-Whitneya  $p < 0,0001$ ).



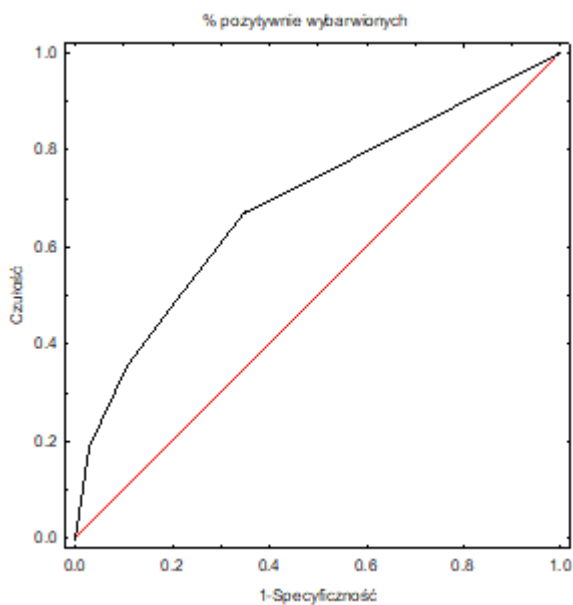
**Rycina 22.** Intensywność świecenia VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek w obu badanych grupach z uwzględnieniem mediany

## Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium

Określenie typowego dla polipów wzorca ekspresji VEGF.



**Rycina 23.** Porównanie liczebności określonych stopni wybarwienia komórek VEGF-pozytywnych w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej

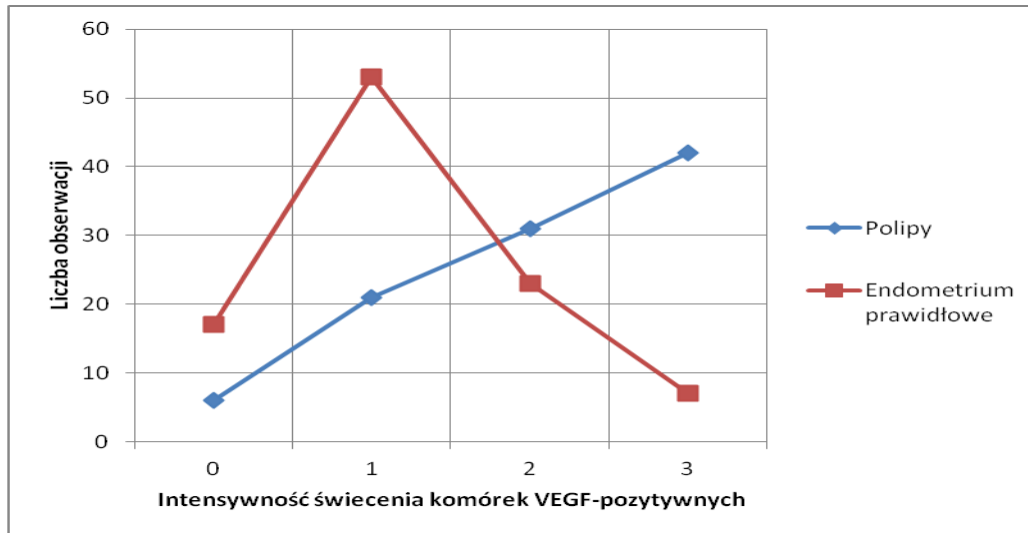


**Rycina 24.** Krzywa AUC pokazująca czułość i swoistość parametru [%] komórek VEGF-pozytywnych w różnicowaniu między polipami a endometrium niezmienionym dla punktu odcięcia 4

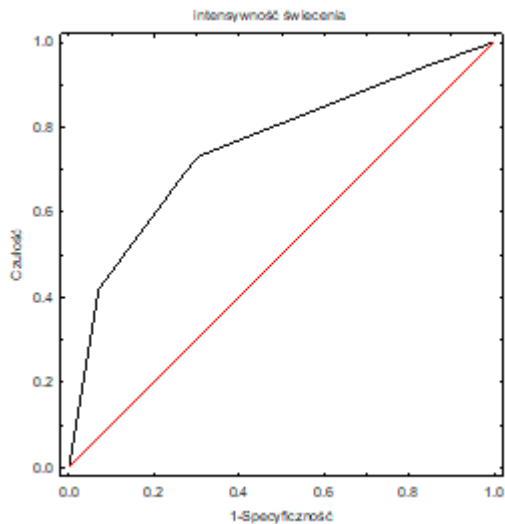
Dla punktu odcięcia 4 tj odsetka VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek w przedziale 33-66 % :

- czułość: 69% (95%CI 57.71%-78.27%)
- swoistość: 65% (95% CI 56.94%-74.42).
- wskaźnik mocy diagnostycznej AUC dla tego parametru wynosi 0,68

## Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium



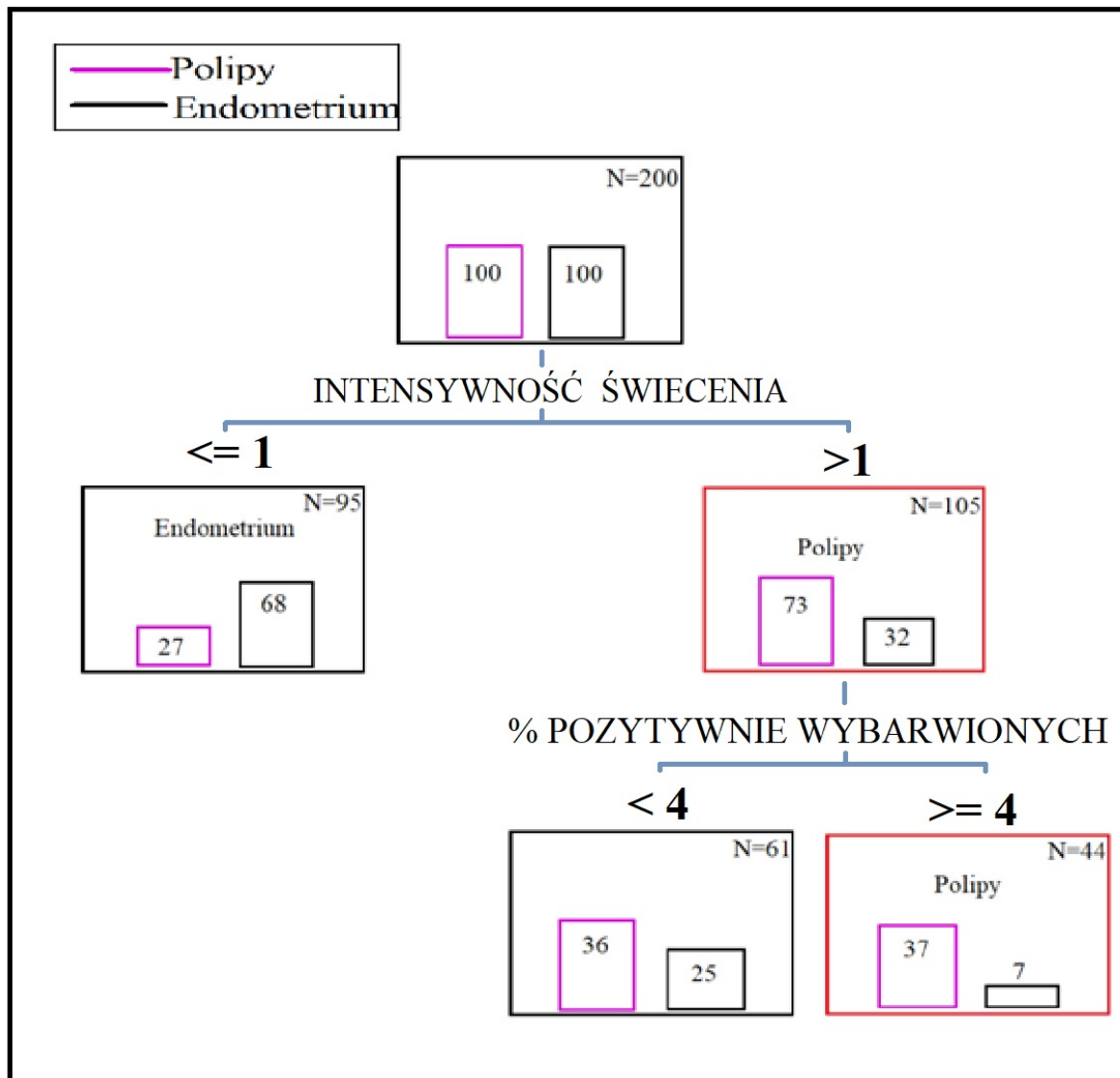
**Rycina 25** Porównanie liczebności określonych progów intensywności świecenia komórek VEGF-pozytywnych w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.



**Rycina 26.** Krzywa AUC pokazująca czułość i swoistość parametru intensywność świecenia komórek VEGF-pozytywnych w różnicowaniu między polipami a endometrium niezmiennym dla punktu odcięcia 2

Dla punktu odcięcia 2 tj. umiarkowanego wybarwienia większości komórek VEGF-pozytywnych wartości parametru wynoszą odpowiednio:

- czułość: 73% (95% CI 63.04%-81.16%)
- swoistość: 70% (95% CI 59.89%-78.55%)
- Wskaźnik mocy diagnostycznej AUC dla tego parametru wynosi 0,75



**Rycina 27.** Drzewo decyzyjne określające zgodność kwalifikacji dla wzorca ekspresji VEGF w polipie endometrialnym

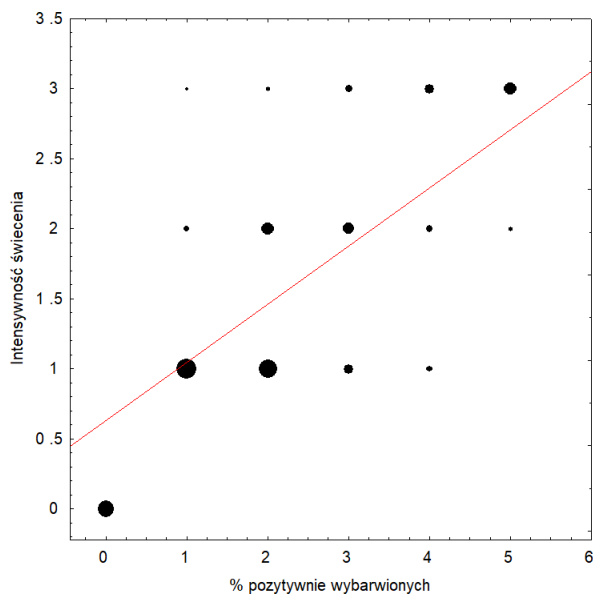
Wzorec ekspresji w naszym badaniu VEGF w komórkach polipa endometrialnego to **Intensywność świecenia powyżej 2 (tj. umiarkowane wybarwienie komórek VEGF-pozytywnie wybarwionych) oraz odsetek wybarwionych komórek min 4 (tj. powyżej 33% VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek).**

Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium

	Odsetek pozytywnie wybarwionych komórek [0 - 5]						
Intensywność świecenia	0	1	2	3	4	5	Wiersz
0	22	0	0	0	1	0	23
1	0	27	25	13	8	1	74
2	0	7	17	15	9	6	54
3	0	4	6	9	13	17	49
Ogół	22	38	48	37	31	24	200

**Tabela 9.** Korelacja pomiędzy odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych ogółem w całej grupie badanej (n=200).

Korelacja Spearmana ( $R = 0,63$   $p < 0,0001$ ). Silna dodatnia korelacja pomiędzy procentem VEGF-pozytywnie wybarwionych a intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych.



**Rycina 28.** Korelacja pomiędzy procentem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych ogółem w całej badanej grupie (n=200).



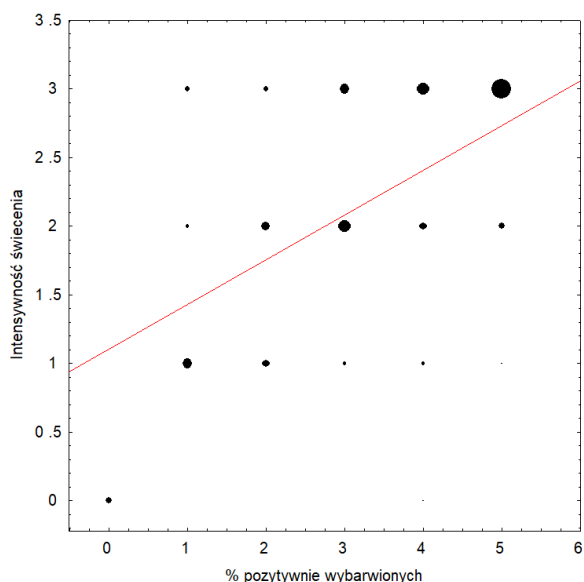
Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium

Analiza grupy pacjentek z polipami endometrialnymi.

Intensywność świecenia w grupie polipów endometrialnych [0 - 3]	Odsetek pozytywnie wybarwionych komórek w grupie polipów endometrialnych [0 - 5]						Wiersz
	0	1	2	3	4	5	
0	5	0	0	0	1	0	6
1	0	8	6	3	3	1	21
2	0	3	7	10	6	5	31
3	0	4	4	8	10	16	42
Ogół	5	15	17	21	20	22	100

**Tabela 10.** Korelacja pomiędzy odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych w grupie polipów endometrialnych (n=100).

$R = 0,49$ ,  $p < 0,0001$ . Silna dodatnia korelacja pomiędzy procentem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a intensywnością świecenia VEGF-pozytywnych komórek w grupie polipów endometrialnych.



**Rycina 29.** Korelacja pomiędzy odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a intensywnością świecenia VEGF-pozytywnych komórek w grupie polipów endometrialnych.

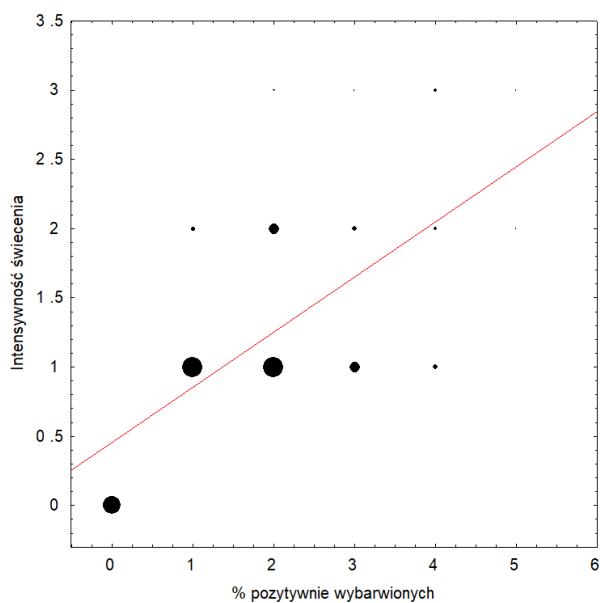
Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium

Analiza grupy kontrolnej (z prawidłowym endometrium).

	Odsetek pozytywnie wybarwionych komórek w grupie prawidłowego endometrium [0 - 5]						
Intensywność świecenia komórek prawidłowego endometrium [0 - 3]	0	1	2	3	4	5	Wiersz
0	17	0	0	0	0	0	17
1	0	19	19	10	5	0	53
2	0	4	10	5	3	1	23
3	0	0	2	1	2	1	7
Ogół	17	23	31	16	11	2	100

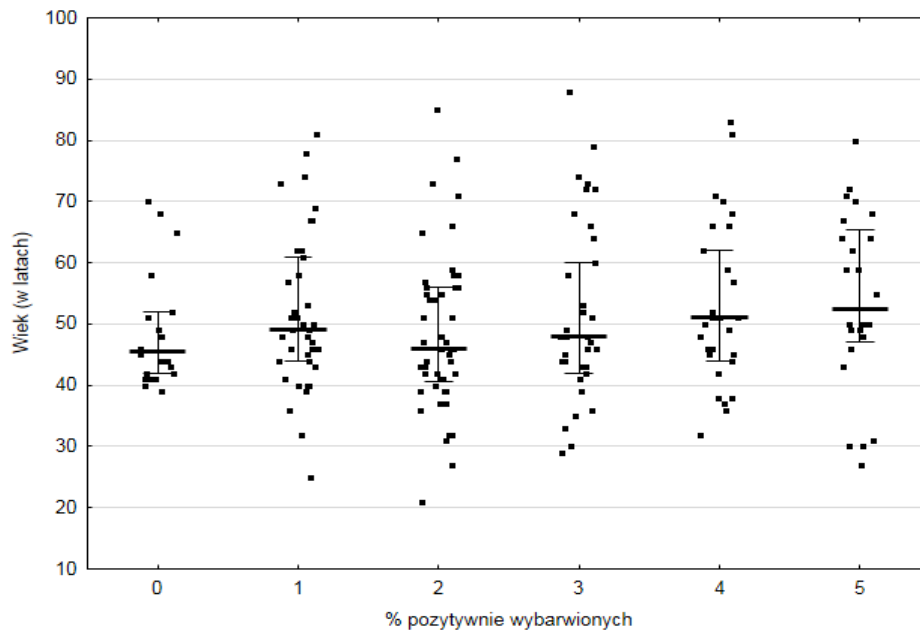
**Tabela 11.** Korelacja pomiędzy odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych w grupie prawidłowego endometrium (n=100).

$R = 0,64$ ,  $p < 0,0001$ . Silna dodatnia korelacja pomiędzy procentem VEGF-pozytywnie wybarwionych a intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych w grupie prawidłowego endometrium.



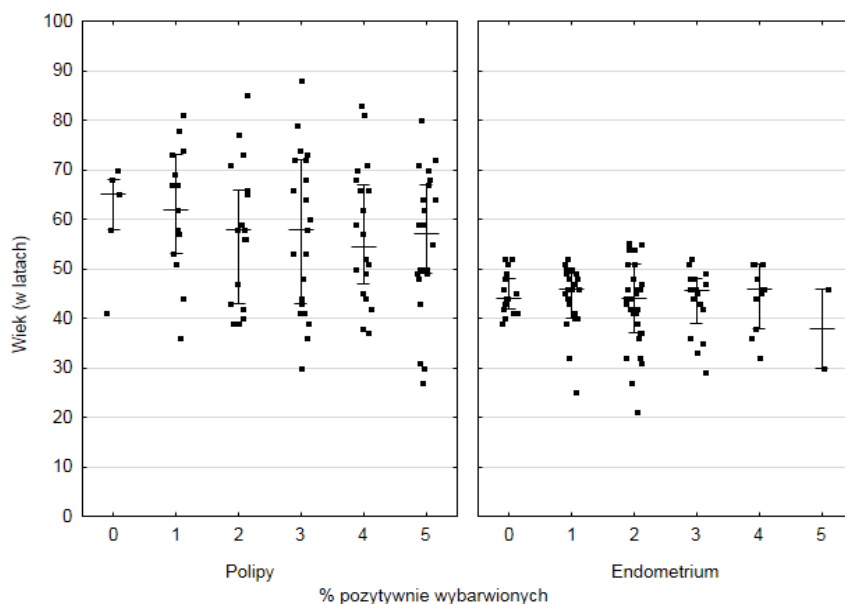
**Rycina 30.** Korelacja pomiędzy odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych w grupie z prawidłowym endometrium.

Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium



**Rycina 31.** Zależność między wiekiem a odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek w całej badanej grupie (n=200).

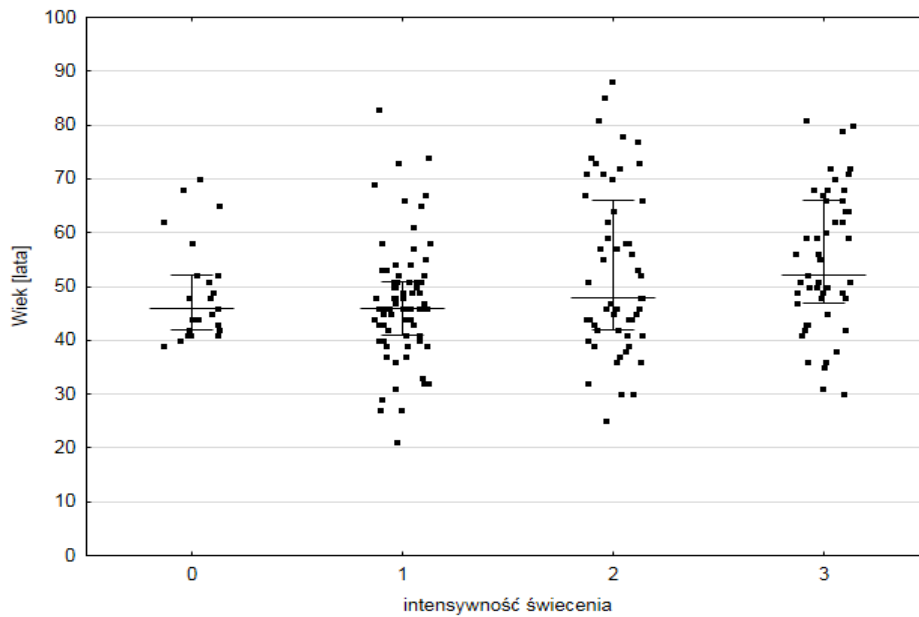
$R = 0,11$   $p = 0,1299$ .



**Rycina 32.** Zależność pomiędzy wiekiem a odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek w obu badanych grupach.

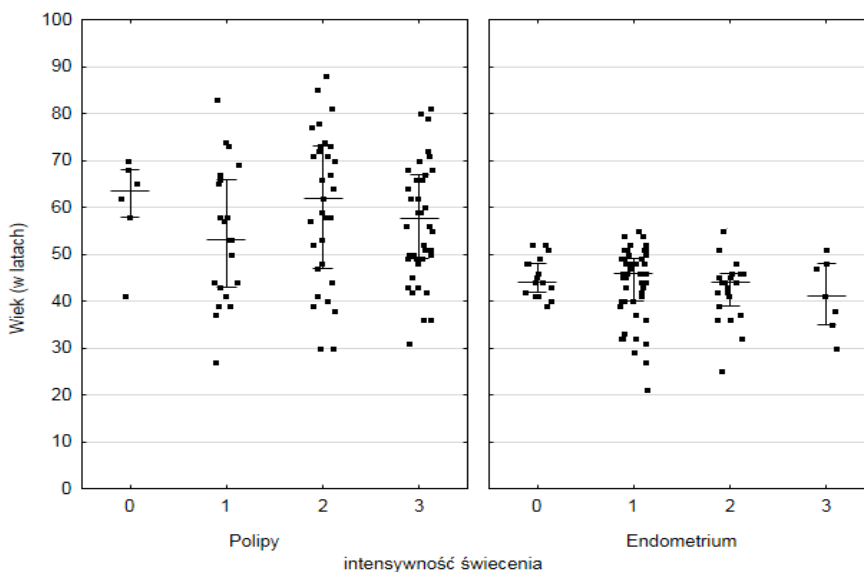
Polipy:  $R = -0,12$   $p = 0,2277$ . Endometrium:  $R = -0,05$   $p = 0,5678$ .

## Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium



**Rycina 33.** Zależność pomiędzy wiekiem a intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych w całej badanej grupie.

$$R = 0,21 \quad p < 0,0234.$$



**Rycina 34.** Zależność pomiędzy wiekiem a intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych w obu badanych grupach.

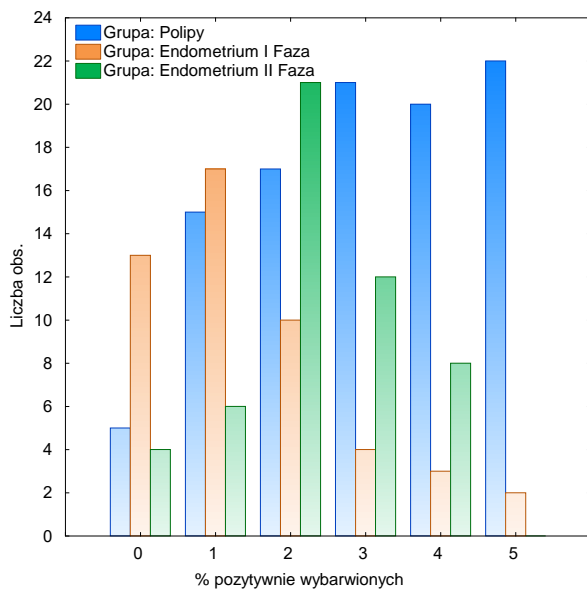
$$\text{Polipy: } R = 0,00 \quad p = 0,9877. \quad \text{Endometrium: } R = -0,11 \quad p = 0,2710.$$

Nie wykazano istotnych statystycznie korelacji pomiędzy wiekiem a procentem pozytywnie wybarwionych w całej grupie badanej, jak i w podgrupach. Znaleziono istotną statystycznie, słabą dodatnią korelację pomiędzy wiekiem a intensywnością wybarwiania w całej grupie

## Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium

badanej ( $R = 0,21$   $p < 0,0001$ ). Takiej korelacji nie odnotowano w podgrupach endometrium i polipy.

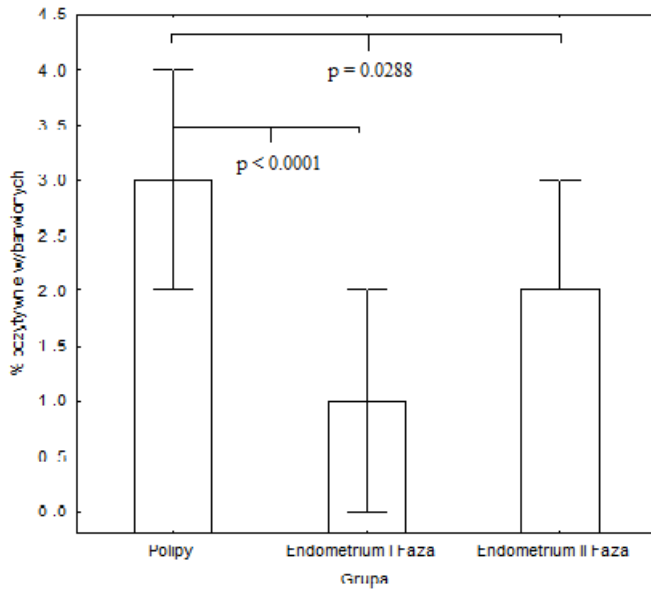
Porównanie grupy badanej z grupa kontrolną w zależności od fazy cyklu (faza I i faza II) biorąc pod uwagę odsetek VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek



**Rycina 35.** Porównanie liczebności określonych stopni wybarwienia komórek VEGF-pozytywnych w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej z uwzględnieniem fazy cyklu.

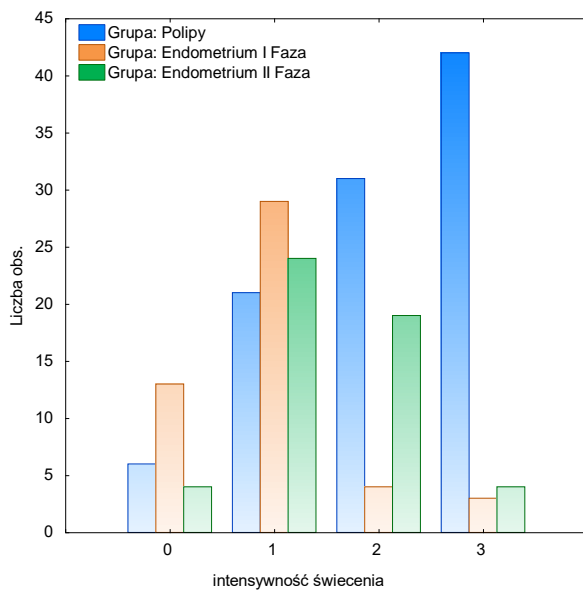
Odsetek VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek istotnie różni się pomiędzy grupami i tak w przypadku porównania grup polipy endometrialne vs endometrium I fazy  $p < 0.0001$  natomiast w przypadku porównania grup polipy endometrialne vs endometrium II fazy  $p = 0.0288$

Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium



**Rycina 36.** Odsetek komórek VEGF-pozytywnych w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej z uwzględnieniem fazy cyklu.

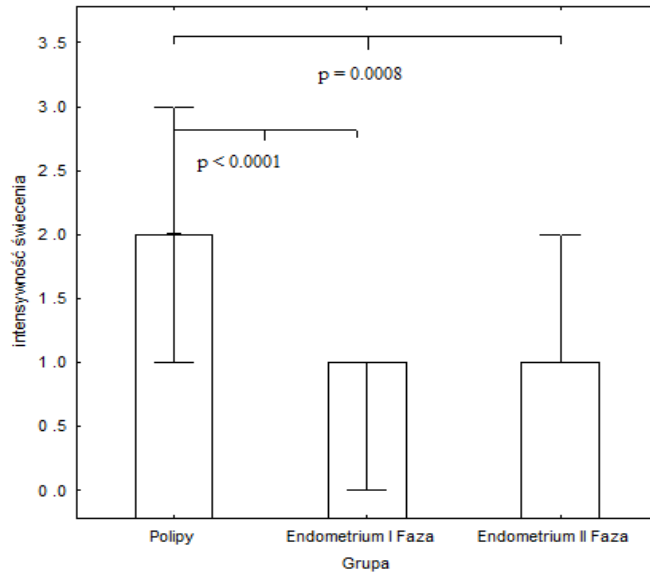
Porównanie grupy badanej z grupa kontrolną w zależności od fazy cyklu ( faza I i faza II) biorąc pod uwagę intensywność świecenia komórek VEGF-pozytywnych.



**Rycina 37.** Porównanie liczebności określonych prógów intensywności świecenia komórek VEGF-pozytywnych w grupie badanej oraz grupie kontrolnej z uwzględnieniem fazy cyklu.

Intensywność świecenia komórek VEGF-pozytywnych istotnie różni się pomiędzy grupami i tak w przypadku porównania grup polipy endometrialne vs endometrium I fazy  $p < 0.0001$  natomiast w przypadku porównania grup polipy endometrialne vs endometrium II fazy  $p = 0.0008$

Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium



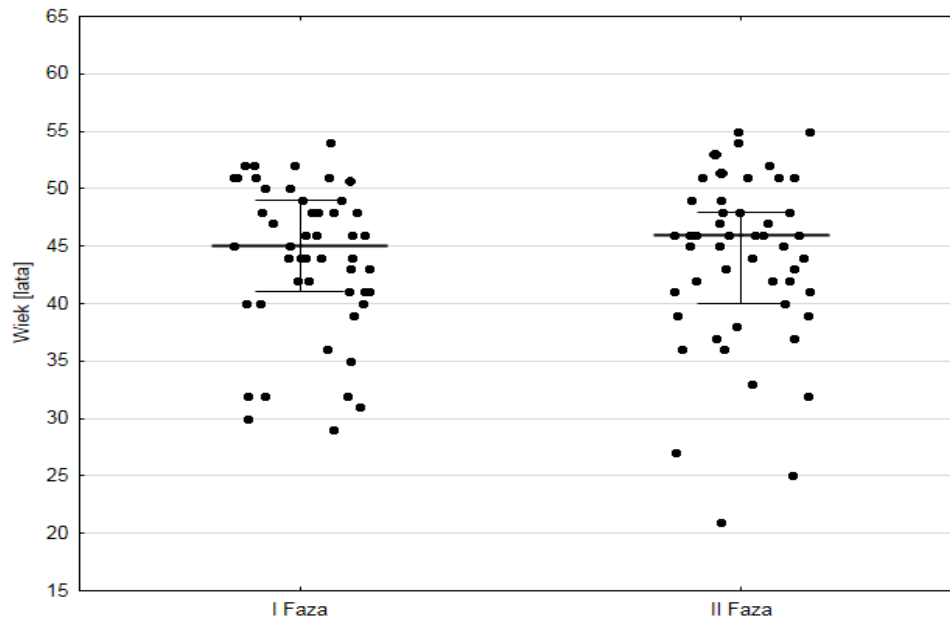
**Rycina 38.** Intensywność świecenia komórek VEGF-pozytywnych w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej z uwzględnieniem fazy cyklu.

Analiza grupy kontrolnej z uwzględnieniem fazy cyklu.

	Grupa: Typ Endometrium - I faza (N ważnych = 49)		Grupa: Typ Endometrium - II faza (N ważnych = 51)		P porównania testem U-Manna-Whitneya
	Me (IQR)	Min - Max	Me (IQR)	Min - Max	
Wiek [lata]	45 (41 - 48)	29 - 54	46 (40 - 48)	21 - 55	0,9862
Odsetek pozytywnie wybarwionych komórek [0 - 5]	1 (0 - 2)	0 - 5	2 (2 - 3)	0 - 4	0,0003
Intensywność świecenia komórek [0 - 3]	1 (0 - 1)	0 - 3	1 (1 - 2)	0 - 3	0,0005

**Tabela 12.** Charakterystyka grupy kontrolnej

Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium



**Rycina 39.** Rozkład wieku w grupie kontrolnej z uwzględnieniem fazy cyklu.

Grupy nie różnią się istotnie statystycznie wiekiem (p testu U-Manna-Whitneya = 0,9862).

Korelacje wieku z odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych oraz intensywnością świecenia VEGF-pozytywnych komórek okazały się być nieistotne statystycznie bez względu na fazę, w której znajdowało się endometrium

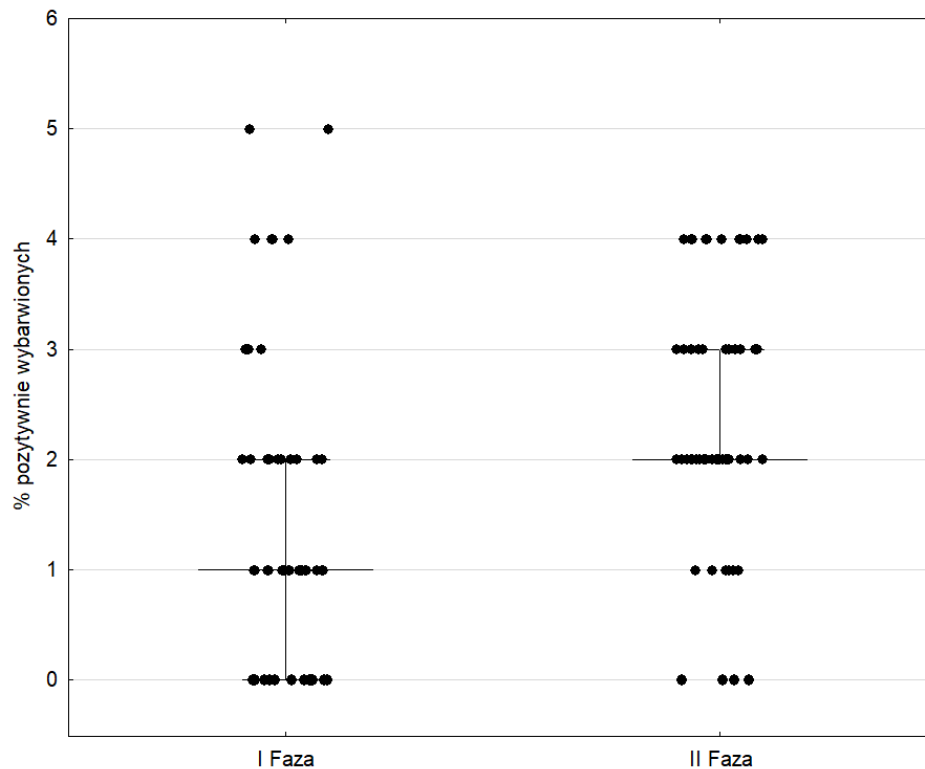
Odsetek pozytywnie wybarwionych komórek [0 - 5]	Grupa: Endometrium I faza	Grupa: Endometrium II faza	p
0	13	4	0.029
1	17	6	0.022
2	10	21	0.048
3	4	12	0.046
4	3	8	0.132
5	2	0	-
Razem	49	51	100

**Tabela 13.** Porównanie odsetka VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek w grupie kontrolnej z uwzględnieniem fazy cyklu.

U pacjentek w grupie endometrium faza II odsetek VEGF- pozytywnie wybarwionych komórek jest znamienne wyższy niż u pacjentek w grupie endometrium faza I (p testu U-Manna-Whitneya = 0,003).



Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium



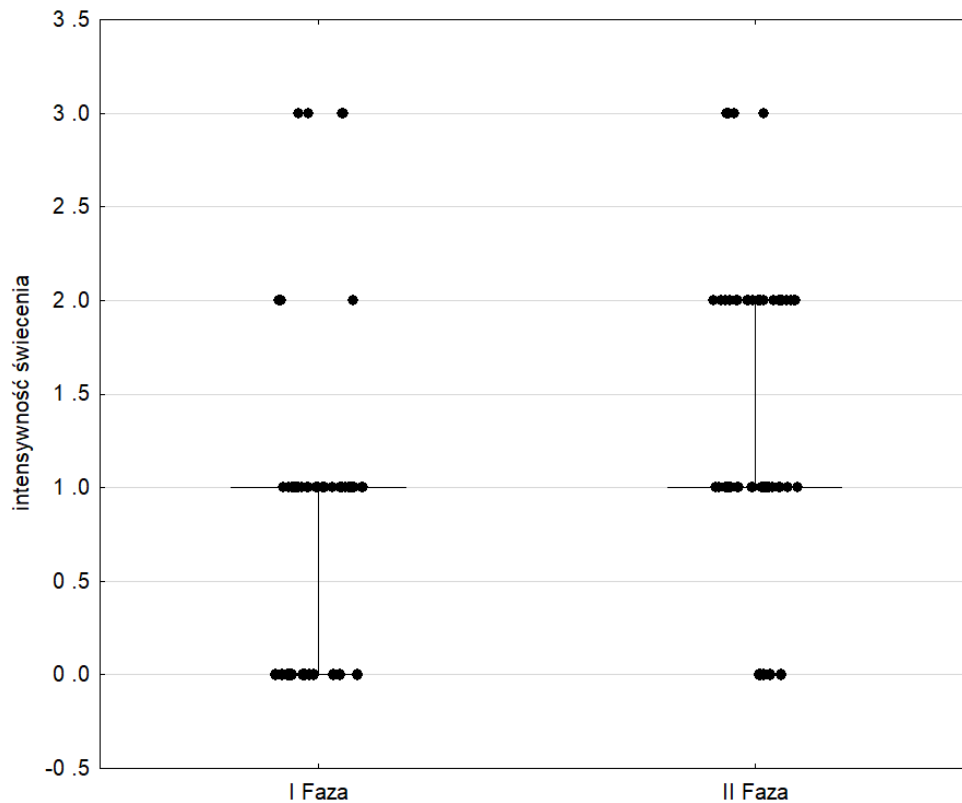
**Rycina 40.** Porównanie odsetka VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek w grupie kontrolnej z uwzględnieniem fazy cyklu.

Intensywność świecenia komórek [0 - 3]	Grupa: Endometrium faza I	Grupa: Endometrium faza II	p
0	13	4	0.029
1	29	24	0.492
2	4	19	0.002
3	3	4	0.705
Razem	49	51	100

**Tabela 14.** Porównanie intensywności świecenia VEGF-pozytywnych komórek w grupie kontrolnej z uwzględnieniem fazy cyklu.

U pacjentek z grupy endometrium faza II intensywność świecenia jest znamienne wyższa niż u pacjentek z grupy endometrium faza I (p testu U-Manna-Whitneya = 0,0005).

Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium



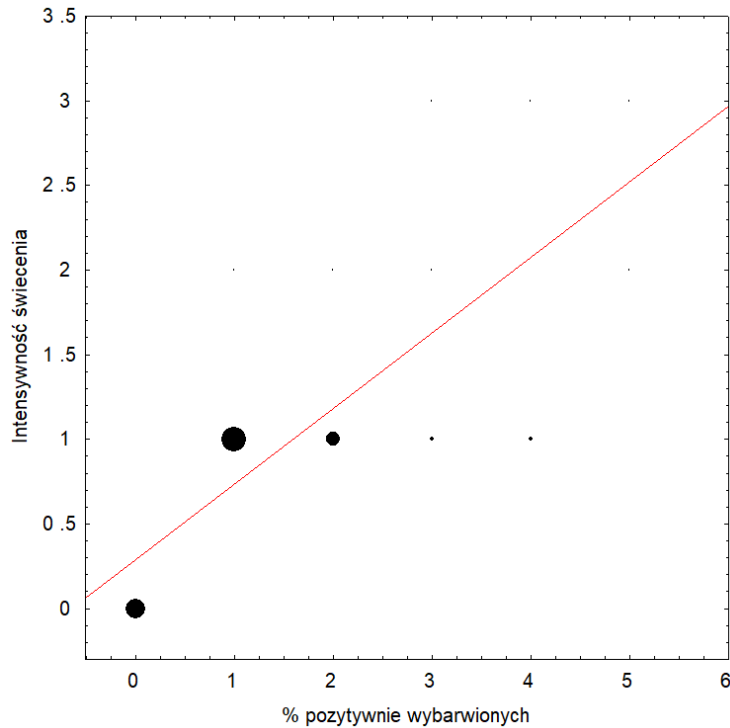
**Rycina 41.** Porównanie intensywności świecenia komórek VEGF-pozytywnych w grupie kontrolnej z uwzględnieniem fazy cyklu.

Procent wybarwionych komórek [0 – 5]	Intensywność świecenia komórek [0 – 3]			
	0	1	2	3
0	13	0	0	0
1	0	16	1	0
2	0	9	1	0
3	0	2	1	1
4	0	2	0	1
5	0	0	1	1

**Tabela 15.** Korelacja pomiędzy odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a intensywnością świecenia VEGF-pozytywnych komórek w grupie endometrium I fazy.

Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium

Wykazano bardzo wysoką dodatnią korelację pomiędzy odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a intensywnością świecenia VEGF-pozytywnych komórek ( $R = 0,84$   $p < 0,0001$ ) w grupie endometrium I fazy.



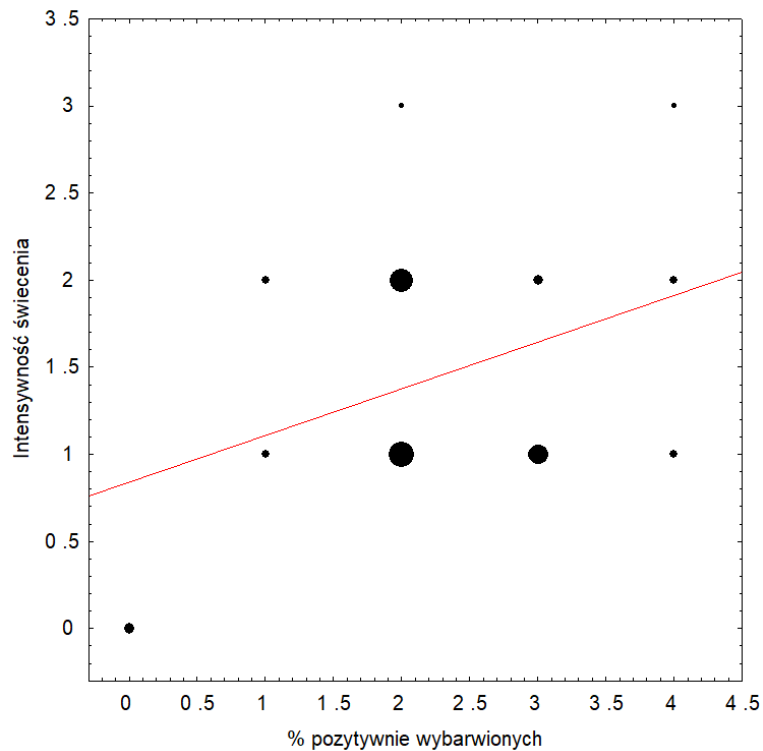
**Rycina 42.** Korelacja pomiędzy odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych w grupie endometrium I fazy.

Procent wybarwionych komórek [0 – 5]	Intensywność świecenia komórek [0 – 3]			
	0	1	2	3
0	4	0	0	0
1	0	3	3	0
2	0	10	9	2
3	0	8	4	0
4	0	3	3	2
5	0	0	0	0

**Tabela 16.** Korelacja pomiędzy odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a intensywnością świecenia VEGF-pozytywnych komórek w grupie endometrium fazy II.

Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium

Korelacja nie przekroczyła progu istotności ( $R = 0,27$   $p = 0,0550$ )



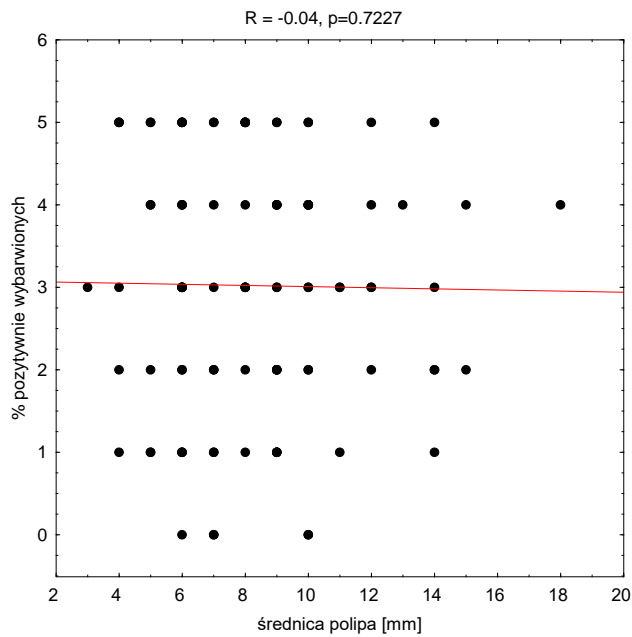
**Rycina 43.** Korelacja pomiędzy odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych w grupie endometrium II fazy

Ocena zależności pomiędzy średnicą polipa endometrialnego a ekspresją VEGF.

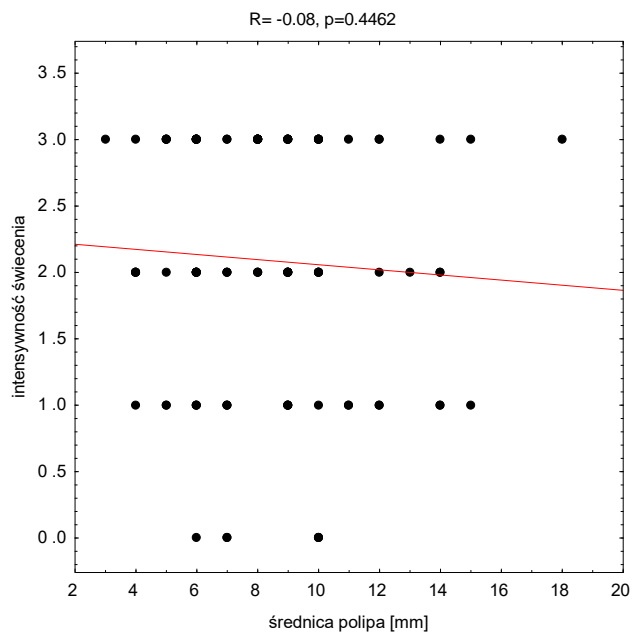
	Średnia	Min-Max	Mediana	Q1	Q3	IQR
Średnica polipa [mm]	8,34	3-18	8	6	10	4

**Tabela 17.** Charakterystyka polipów endometrialnych w grupie badanej.

## Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium



**Rycina 44.** Korelacja pomiędzy odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a średnicą polipa endometrialnego.



**Rycina 45.** Korelacja pomiędzy intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych a średnicą polipa endometrialnego.

Średnica polipa nie koreluje istotnie z odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek ( $p=0,7227$ ) ani z intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych ( $p=0,4462$ )

## 6. DYSKUSJA

Polip endometrialny stanowi jedną z najczęstszych patologii ginekologicznych. Etiopatogeneza powstawania tej zmiany do dnia dzisiejszego stanowi podstawę licznych badań, których celem jest odnalezienie czynnika odpowiedzialnego za ten miejscowy łagodny rozrost tkanki gruczołowej i zrębu endometrium. Zaproponowano kilka mechanizmów tłumaczących proces powstawania polipów. Jeden z nich bazuje na czynnikach proangiogennych czego dowodem może być typowy obraz ultrasonograficzny przy zastosowaniu opcji kodowania kolorem ukazujący charakterystyczne „naczynie odżywcze”.

Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) jest jednym z głównych czynników odpowiedzialnych za angiogenezę w organizmie człowieka. Odpowiada nie tylko za fizjologiczny rozwój sieci naczyniowej, ale liczne badania dowodzą również jego roli w powstawaniu zmian patologicznych w całym organizmie, także w obrębie endometrium. Zwiększoną ekspresję VEGF stwierdza się w wielu chorobach ginekologicznych takich jak mięśniaki macicy, endometrioza oraz w patologiach endometrium [200,201]. Wartość diagnostyczna i prognostyczna VEGF w kontekście powstawania i diagnozowania polipów endometrialnych nie została jednak ściśle określona.

W przedstawionej rozprawie doktorskiej zbadano ekspresję VEGF w polipie endometrialnym oraz spróbowano określić wzorzec ekspresji występujący w polipie w porównaniu do endometrium niezmiennego patologicznie. Spróbowano zbadać korelację pomiędzy ekspresją naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu a uśrednioną wielkością polipa. Prześledzono również ekspresję VEGF w prawidłowym endometrium analizując jej zmiany w zależności od fazy cyklu miesięczkowego.

W naszym badaniu stwierdzono istotną statystycznie różnicę w ekspresji VEGF w tkankach polipa endometrialnego w porównaniu z prawidłowym endometrium. Podobne wnioski uzyskali w 2011 Xuebing i wsp. Jako jedni z pierwszych przeanalizowali czy powstawanie polipa endometrialnego wiąże się z większą manifestacją czynników proangiogennych takich jak VEGF i transformujący czynnik wzrostu o typie beta-1 (TNF- $\beta$ 1). Kontynuowali swoje poprzednie badania gdzie ocenili ekspresję receptorów dla płciowych hormonów steroidowych w obrębie polipa endometrialnego. Poddali analizie 70 pacjentek, którym przeprowadzono histeroskopię i po wykluczeniu innych patologii oceniono ekspresję VEGF w polipie endometrialnym i prawidłowym endometrium otaczającym zmianę. Zarówno w fazie proliferacyjnej jak i w fazie sekrecyjnej immunohistochemiczna

analiza wykazała statystycznie istotną różnicę zarówno w intensywności świecenia komórek VEGF pozytywnie wybarwionych jak i odsetku komórek VEGF pozytywnie wybarwionych na korzyść polipa endometrialnego. Analiza ekspresji VEGF w przebiegu cyklu w nabłonku gruczołowym pokrywającym polipa jak również u zdrowych pacjentek pokazała zmienność cykliczną- ekspresja rosła od wczesnej fazy proliferacyjnej do fazy sekrecyjnej. Zasugerowali również, że to regulacja hormonalna - głównie estrogenowa ma wpływ na ekspresję naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu. Co za tym idzie to aromataza mająca wpływ na miejscową produkcję estrogenu może mieć decydujący wpływ na formowanie się polipa endometrialnego [42].

Podobne wnioski co w naszej pracy uzyskał Erinanc i Toprak [199]. W grupie badanej liczącej 20 pacjentek po histeroskopowym usunięciu polipa ocenili ekspresję naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu w porównaniu do prawidłowego endometrium spoza zmiany. Warto dodać, że ich grupa badana charakteryzowała się znacząco niższą średnią wieku oscylującą około 40 rż. Badacze oceniali również ekspresję nestyny jako markera dla śródbłonkowych komórek podlegających migracji. Także w tym badaniu różnica w ekspresji VEGF, jak również nestyny była statystycznie istotna na korzyść polipów endometrialnych. Etiopatologia polipów endometrialnych pozostaje niejasna. Wnioski zarówno z naszego badania jak i wyżej przytoczonych świadczą o ważnej roli w powstawaniu tej zmiany czynników wzrostu w szczególności naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu. Być może kolejnym krokiem w poznaniu patogenezы polipa endometrialnego jak również innych patologii endometrium byłaby analiza korelacji pomiędzy wystąpieniem patologii - ekspresją receptorów dla hormonów płciowych a ekspresją naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu.

Projektując eksperyment medyczny zdecydowaliśmy, że materiał histopatologiczny w grupie kontrolnej będzie pochodził od pacjentek u których nie stwierdzono żadnej patologii endometrium. W obu wyżej przytoczonych badaniach materiał porównawczy stanowiło endometrium pochodzące od pacjentek z grup badanych u których stwierdzono polipa endometrialnego. Nie można wykluczyć, że u takich pacjentek dochodzi do zaburzenia w budowie, składzie komórkowym i ekspresji cytokin prozapalnych, interleukin i czynników wzrostu w całym endometrium. Aby uniknąć potencjalnego zafałszowania wyników podjęliśmy decyzję o włączeniu do grupy kontrolnej pacjentek u których teoretycznie nie występują patologie bezpośrednio wpływające na endometrium.

W naszym badaniu w oparciu o dwa parametry oceniające ekspresję VEGF w polipach endometrialnych tj. odsetek pozytywnie wybarwionych komórek oraz intensywność

świecenia komórek, ustalono wzorzec ekspresji VEGF w polipach endometrialnych. Jest to: intensywność świecenia powyżej 2 (tj. umiarkowane lub silne wybarwienie komórek VEGF-pozytywnie wybarwionych) oraz odsetek wybarwionych komórek min 4 (tj. powyżej 33% VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek). Wskaźnik mocy diagnostycznej wynikający z naszego badania wskazuje, że to intensywność świecenia o wartości 2 jest parametrem najbardziej różnicującym tkanki polipa i prawidłowe endometrium. Test o najwyższej mocy w sensie siły dyskryminacyjnej polipa od endometrium rozpoznawałby jasność wybarwienia komórek VEGF-pozytywnych na poziomie umiarkowanej jasności wybarwienia przy jednoczesowym wybarwieniu minimum 1/3 komórek VEGF-pozytywnych. W analizowanych pracach naukowych nie wszyscy autorzy zdecydowali się określić wzorzec ekspresji VEGF w polipie endometrialnym. Erinanc i wsp. [199] ocenili typową dla polipa endometrialnego ekspresję na 3+ przy czym jest to wynik z połączonej oceny jasności wybarwienia i odsetka komórek VEGF-pozytywnych. Stosowali oni również zmienioną ostatnią skalę - odsetek pozytywnie wybarwionych komórek oceniali w 25% interwałach tj. 0 do 25%, 25-50% oraz >50%.

Analizując publikacje naukowe można dotrzeć do dwóch badań oceniających ekspresję naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu w polipie endometrialnym. Autorzy jednak skupiają się ściśle na niepłodnościowym aspekcie występowania polipów endometrialnych. W przedstawionej rozprawie doktorskiej porównano ekspresję VEGF w polipie endometrialnym do prawidłowego endometrium zarówno w fazie proliferacyjnej jak i sekretoryjnej, przy czym oceniano próbki w przebiegu całej fazy. Xiao i wsp. zbadali czy obecność polipa ma wpływ na zmiany w ekspresji czynników proangiogennych (VEGF oraz cyklooksigenazy typu 2) w grupie 60 pacjentek w ściśle określonym momencie cyklu - tzw. okienku implantacyjnym czyli ok. 6-8 dni przed wystąpieniem miesiączki [207]. Chen i wsp. w 2016 opublikowali wyniki swoich badań na grupie 80 pacjentek gdzie grupę kontrolną stanowiły kobiety z męskim czynnikiem niepłodności lub niepłodnością idiopatyczną, od których materiał do badania pobrano w połowie fazy sekretoryjnej, kiedy to dochodzi do zagnieżdżenia zarodka [208]. Co ciekawe analiza w obu ww. badaniach pokazała, że ekspresja VEGF w tkankach polipa była statystycznie znacząco niższa niż w prawidłowym endometrium. Należy jednak przypomnieć, że prawidłowe endometrium dla obu autorów to to pobrane od pacjentek w okienku implantacyjnym. Może to świadczyć o ważnej roli VEGF w procesie implantacji oraz dowodzić, że zaburzenia jego ekspresji zmniejszają receptywność endometrium, zmniejszają możliwości waskularyzacji tkanek endometrium tak potrzebnego do prawidłowej implantacji i dalszego wzrostu zarodka. Należy jednak podkreślić, że grupę



kontrolną w obu eksperymentach stanowiła ściśle wyselekcjonowana grupa pacjentek w bardzo specyficznym momencie cyklu menstruacyjnego i nie może być bezpośrednio porównywana z naszym badaniem.

Jednym z celów naszego badania było zbadanie korelacji pomiędzy ekspresją VEGF a wielkością polipa endometrialnego. Średnica polipa nie koreluje istotnie z odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek ani z intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych w tkankach polipa. Jedyne dostępne opracowania skupiają się na zbadaniu związku pomiędzy wielkością polipa a ryzykiem wystąpienia w nim rozrostu endometrium lub raka endometrialnego. Badania Namazova nie potwierdziły korelacji pomiędzy tymi dwiema zmiennymi [149]. W badaniach Oujanga ta zależność pojawia się dopiero w zaawansowanym stadium choroby, u pacjentek z naciekiem myometrium [202]. Natomiast Lasmar po analizie aż 1136 preparatów pochodzących od bezobjawowych pacjentek z rozpoznaniem i usunięciem w trakcie histeroskopii polipem endometrialnym doszedł do wniosku że dopiero średnica polipa większa niż 15 mm niesie ze sobą zwiększone ryzyko wystąpienia rozrostu endometrium [203].

Angiogeneza jest podstawą prawidłowego wzrostu, różnicowania i funkcjonowania endometrium. Mediatorem tych zmian jest naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu. W naszym badaniu prześledziliśmy zmiany w jego ekspresji w przebiegu cyklu miesięczkowego. Ekspresja VEGF była silniejsza w fazie wydzielniczej w porównaniu do fazy proliferacyjnej co udowodniliśmy w czasie analizy statystycznej. Jedną z najwcześniejszych prac odnosząca się do zagadnienia dystrybucji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu pochodzi z 1996, gdzie Torry i wsp. wykryli silną immunoaktywność VEGF w komórkach gruczołowych właśnie w fazie sekrecyjnej przy niewielkim stopniu świecenia w fazie proliferacyjnej. Dodatkowo to właśnie w komórkach gruczołowych ekspresja naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu była najsilniejsza [204]. Shifren i wsp. w 1996 roku opublikowali ważne opracowanie dotyczące wpływu naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu na endometrium, efektów jego działania oraz roli w powstawaniu patologii tej tkanki. Zwrócili też uwagę na nadrzędną regulację angiogenezy kontrolowanej poprzez VEGF przez steroidowe hormony płciowe. To właśnie końcowe tętniczki będące celem działania VEGF, odżywiająca funkcjonalną warstwę endometrium są jednocześnie wysoce wrażliwe na działanie hormonów płciowych. Ekspresja naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu w przebiegu cyklu hormonalnego pokrywa się ze wzrostem poziomów hormonów płciowych – głównie estrogenu produkowanego przez komórki ziarniste w jajniku [189]. Hornung i wsp. zbadali zarówno produkcję matrycowego RNA jak i immunohistochemiczną obecność

gotowego produktu pod postacią naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu. Wzrost ekspresji VEGF zaobserwowali w późnej fazie proliferacyjnej oraz w fazie wydzielniczej. Koreluje to z wynikami naszego badania gdzie wzrost aktywności angiogennej opisanej ekspresją VEGF przypada na fazę sekrecyjną. Autorzy sugerują, że to uwalniany VEGF do światła komórek gruczołowych może stanowić jeden ze sygnałów dla rozwijającej się blastocysty oraz odpowiadać za prawidłowy rozwój trofektodermi [205]. Sugino i wsp. udowodnili w swoim badaniu że ekspresja VEGF jest większa w połowie fazy wydzielniczej w endometrium, ale również w komórkach kosmówki we wczesnej ciąży [191]. Meduri i wsp. analizując obecność naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu w endometrium skupili się na obecności receptorów dla tego białka. Przebadał endometrium pochodzące od 30 prawidłowo miesiączkujących pacjentek. I tak obecność receptora dla VEGF o typie Flt-1 w ścianach naczyń krwionośnych była znacząco wyższa w drugiej fazie cyklu niż w pierwszej. Natomiast w tkankach nabłonka gruczołowego i zrębu endometrium pik występowania Flt-1 przypadał na drugą połowę fazy sekrecyjnej i 5-8 dnia cyklu (odbudowa tkanki po złuszczeniu się w trakcie miesiączki). Co ciekawe ekspresja receptora Flk-1/KDR zwanego też VEGFR-2, uznawanego za głównego mediatora odpowiedzi komórkowej w komórkach naczyń krwionośnych obecnych w endometrium była wyższa w fazie proliferacyjnej co świadczy o silnej proliferacji kapilar powiązanej z regeneracją tkanki endometrialnej w pierwszej fazie cyklu. Ko-ekspresja obu receptorów- Flt-1 oraz Flk-1/KDR była maksymalna w połowie fazy sekrecyjnej [192,193]. Podobną analizę przeprowadził Tsung-Hsuan i wsp. W grupie liczącej 60 kobiet w wieku reprodukcyjnym zbadali ekspresję receptorów dla VEGF jak i wzór ekspresji samego VEGF w przebiegu cyklu miesięczkowego który podzielili na fazę proliferacyjną, około owulacyjną, wczesno-wydzielniczą, środkowo-wydzielniczą oraz późno-wydzielniczą. Ekspresja VEGF wzrastała od fazy proliferacyjnej do fazy późno-wydzielniczej. Natomiast ekspresja receptora Flk-1 była wysoka w przebiegu całego cyklu z nieznacznym wzrostem w fazie późno-wydzielniczej [206].

Wiele opracowań skupiło się na roli naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu w procesie implantacji jako jednego z głównych czynników odpowiedzialnych za prawidłowy jej przebieg. Hannan i wsp. przeanalizowali płyn pochodzący z jamy macicy zarówno u zdrowych kobiet jak i tych leczących się z powodu idiopatycznej niepłodności pod kątem obecności cytokin. I to właśnie poziom VEGF był znacząco zredukowany u pacjentek z niepłodnością w porównaniu do pacjentek płodnych w połowie fazy sekrecyjnej i uznany jako główny regulator prawidłowej implantacji [209]. Podobne opracowanie opublikował Boomsma i wsp. w 2009 roku, skupił się on na pacjentkach poddawanych procedurze *in vitro*.

Przebadali oni płyn z jamy macicy, pobrany u 210 pacjentek tuż przed transferem zarodka pod kątem obecności ekspresji regulatorów implantacji takich jak interleukiny (m.in. IL-1beta, IL-5, IL-10), interferon gamma (IFN-gamma), czynnik martwicy nowotworów (TNF-alfa) i naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu. Wśród pacjentek u których implantacja powiodła się (detekcja przez poziom HCG) ekspresja VEGF była statystycznie znacząco wyższa [210]. Można przyjąć że prawidłowy poziom VEGF jest bezwzględnie konieczny do udanego procesu zagnieżdżenia i dalszego wzrostu jaja płodowego. Ograniczeniem naszego badania jest fakt, że badaliśmy ekspresję VEGF w przebiegu całej fazy sekrecyjnej, nie wyodrębniając z niej tzw. okienka implantacyjnego.

W znacznej części badań podkreśla się hormonalną kontrolę fizjologicznej angiogenezy która jest wymagana do prawidłowego rozwoju endometrium, koniecznego do prawidłowej implantacji. To dzięki zwiększeniu przepuszczalności naczyń krwionośnych w przebiegu cyklu dochodzi do zmiany cienkiego, słabo unaczynionego endometrium w pogrubiałą bogato odżywioną tkankę zapewniającą odpowiednie środowisko dla rozwijającej się ciąży. Wzór ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu zbadany w naszym opracowaniu jest podobny do tego uzyskanego w badaniach przeprowadzonych przez Shifren'a. Opracowanie Okady i wsp. dowiodło że leczenie preparatami estrogenowymi podnosi poziom VEGF a obniża poziom sVEGFR-1 a w konsekwencji podnosi współczynnik VEGF/sVEGFR-1 co skutkuje wzrostem i różnicowaniem endometrium w przebiegu cyklu miesięczkowego. Dodatkowo zastosowanie antagonistów receptora progesteronowego (RU-486) zmniejsza produkcję w/w czynników najprawdopodobniej poprzez zmniejszenie ilości receptorów dla estrogenu [194]. Potwierdza to teorię, że VEGF jest czynnikiem mediacyjnym działania hormonów płciowych na endometrium. Warto podkreślić że działanie VEGF nie ogranicza się tylko do wpływu na endometrium, jego regenerację i implantację ale również wpływa na przebieg owulacji a następnie funkcjonowanie ciała żółtego i jego wpływ na rozwijającą się ciążę. Czynniki wzrostu śródbłonka naczyniowego jest jednym z głównych regulatorów proliferacji komórek śródbłonkowych, angiogenezy, waskulogenezy, i przepuszczalności naczyń. Jego ekspresja jest ściśle skorelowana zarówno z fizjologicznymi przemianami endometrium koniecznymi do prawidłowej implantacji i embriogenezy jak również z patologicznymi zmianami dziejącymi się w endometrium prowadzącymi do powstawania patologii takich jak polipy endometrialne. W przedstawionej rozprawie doktorskiej udowodniono, że ekspresja VEGF jest znacząco wyższa w tkankach polipa endometrialnego w porównaniu do prawidłowego endometrium. Podjęto próbę określenia typowego wzorca ekspresji VEGF w polipie endometrialnym. Potwierdzono również

## Ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w polipach endometrialnych i prawidłowym endometrium

wcześniejsze doniesienia naukowe o wyższej ekspresji VEGF w fazie wydzielniczej w porównaniu do fazy proliferacyjnej. Do zalet badania zaliczyć należy włączenie dużej populacji wyselekcjonowanych pacjentek oraz próba odpowiedzi na pytanie czy istnieje korelacja pomiędzy wielkością polipa endometrialnego a ekspresją VEGF, tematem niepodejmowanym do tej pory w opracowaniach naukowych.

## 7. WNIOSKI

1. Istnieje związek pomiędzy ekspresją naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu a wystąpieniem polipa endometrialnego, co potwierdza prawdopodobną rolę tego czynnika angiogenego w patogenezie polipa endometrialnego
2. Polip endometrialny charakteryzuje się własnym wzorcem ekspresji VEGF, który jednakże ma umiarkowane znaczenie w różnicowaniu z prawidłowym endometrium.
3. Ekspresja VEGF jest niezależna od wielkości polipa endometrialnego.
4. Ekspresja naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu zależy od faz cyklu menstruacyjnego i jest najwyższa w fazie sekrecyjnej cyklu.

## 8. STRESZCZENIE

**Wprowadzenie:** Polip endometrialny jest jedną z najczęściej spotykanych patologii ginekologicznych. W zależności od badań częstość występowania waha się od 7,8 aż do 34,9 % [6,56,59]. Patogeneza powstawania polipów endometrialnych nie jest do dnia dzisiejszego jasno wyjaśniona. Jedną z teorii wiąże ten miejscowy rozrost tkanki endometrialnej ze zwiększoną ekspresją czynników proangiogennych, a w szczególności naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF).

**Cele i założenia pracy:** Ocena związku pomiędzy ekspresją VEGF a występowaniem polipa endometrialnego wraz z identyfikacją typowego dla polipów wzorca ekspresji VEGF. Ocena korelacji między wielkością polipa endometrialnego a ekspresją VEGF. Ocena różnicy w ekspresji VEGF w przebiegu cyklu miesięczkowego w prawidłowym endometrium.

**Materiały:** Przeprowadzono badanie kliniczno-kontrolne. Badaniem objęto populację 200 pacjentek hospitalizowanych w Klinice Ginekologii Operacyjnej i Ginekologii Onkologicznej ICZMP w latach 2011-2013. Grupa badawcza liczyła 100 pacjentek, zawierała pacjentki objawowe oraz pacjentki bezobjawowe, które skierowano do szpitala z powodu nieprawidłowego obrazu ultrasonograficznego. Pacjentki miały wykonaną histeroskopię zabiegową wraz z usunięciem polipa endometrialnego. Wykluczone zostały pacjentki u których w preparacie histopatologicznym oprócz polipa endometrialnego rozpoznano inną patologię endometrium, pacjentki u których w samym polipie endometrialnym rozpoznano współtowarzyszącą inną patologię. Wykluczono pacjentki z innymi patologiami narządu rodowego. Grupa kontrolna liczyła 100 pacjentek. Stanowiły ją pacjentki, które w trakcie hospitalizacji w Klinice Ginekologii Operacyjnej i Ginekologii Onkologicznej ICZMP poddane były zabiegowi wyłyżeczkowania jamy macicy, natomiast badanie histopatologiczne nie wykazało obecności patologii endometrium- stwierdzono obecność prawidłowego endometrium fazy folikularnej (49 pacjentek) lub lutealnej (51 pacjentek). Grupę kontrolną stanowiły pacjentki skierowane do szpitala z powodu zaburzeń statyki narządu rodowego, pacjentki z nietrzymaniem moczu, pacjentki zmagające się z problemem niepłodności które w przeciągu ostatnich 3 miesięcy nie przyjmowały leków hormonalnych oraz bezobjawowe pacjentki z podejrzeniem polipa endometrialnego w badaniu ultrasonograficznym, które to podejrzenie nie potwierdziło się w trakcie histeroskopii.

**Metody:** Do analizy immunohistochemicznej do detekcji VEGF zastosowano pierwszorzędowe poliklonalne przeciwciała królicze (Anti-VEGF PU483-UP BioGenex), oraz drugorzędowe końskie immunoglobuliny (ImmPRESS® HRP Horse Anti-Rabbit IgG Polymer Detection Kit, Vector Labs, Burlingame, USA) w rozcieńczeniu 1:100. Do wizualizacji utworzonego kompleksu antygen-przeciwciała użyto zestawu ImmPACK DAB peroxidase substrate (Vector Labs, Burlingame, USA). Próbki endometrium utrwalone w 10% roztworze formaldehydu zostały zatopione w parafinie a następnie zostały pocięte na mikroskrawki (4 µm) przy użyciu mikrotomu rotacyjnego Accu-Cut SMR 200. Obrazy uzyskane w analizie immunohistochemicznej poddano analizie ilościowej, stosując półilościowy system punktacji.

**Wnioski:** Istnieje związek pomiędzy ekspresją naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) a wystąpieniem polipa endometrialnego co potwierdza prawdopodobną rolę tego czynnika angiogennego w patogenezie polipa endometrialnego. Polip endometrialny charakteryzuje się własnym wzorcem ekspresji VEGF, który jednakże ma umiarkowane znaczenie w różnicowaniu z prawidłowym endometrium Ekspresja VEGF jest niezależna od wielkości polipa endometrialnego. Ekspresja naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu zależy od faz cyklu menstruacyjnego i jest najwyższa w fazie sekrecyjnej cyklu.

## 9. ABSTRACT

**Introduction:** Endometrial polyp is one of the most common gynecological pathologies. Depending on the research, the incidence ranges from 7.8 to 34.9% [6,56,59]. The pathogenesis of endometrial polyp formation has not been clearly defined. One theory links this local proliferation of endometrial tissue with increased expression of proangiogenic factors and in particular vascular endothelial growth factor (VEGF).

**Purpose:** The objective of this study is to determine the relationship between VEGF expression and the occurrence of an endometrial polyp along with the identification of a pattern of VEGF expression typical for polyps. Additionally, the study aimed to evaluate the correlation between the size of the endometrial polyp and VEGF expression. The next goal of the work is to study the difference in VEGF expression in normal endometrium during the menstrual cycle.

**Materials:** A case-control study was conducted. The study included a population of 200 patients hospitalized in the Department of Surgical Gynecology and Oncological Gynecology of the Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute in Lodz in the years 2011-2013. The research group consisted of 100 patients, including both symptomatic and asymptomatic patients who were referred to the hospital due to an abnormal ultrasound image. These patients had a surgical hysteroscopy with endometrial polyp removal, confirmed in histopathological examination without the presence of other pathologies. Excluded were patients who, in addition to the endometrial polyp, were diagnosed with a different pathology of the endometrium in the histopathological specimen, patients who had a concomitant pathology found in the endometrial polyp itself, and patients with other gynecological diseases. The control group consisted of 100 patients who underwent curettage of the uterine cavity during hospitalization at the Department of Surgical Gynecology and Oncological Gynecology, while the histopathological examination did not reveal the presence of endometrial pathology - normal follicular phase (49 patients) or luteal phase (51 patients) endometrium was found. Patients with other pathologies of the endometrium or insufficient material or lack of material for examination were excluded from the control group. The control group consisted patients referred to the hospital due to prolapse of the reproductive organ, urinary incontinence, patients with infertility problems who had not taken hormonal



drugs within the last 3 months and asymptomatic patients with suspected endometrial polyp in an ultrasound examination, which is not confirmed during hysteroscopy.

**Methods:** For immunohistochemical analysis were used: primary polyclonal rabbit antibodies (Anti-VEGF PU483-UP BioGenex) and secondary immunoglobulins (ImmPRESS® HRP Horse Anti-Rabbit IgG Polymer Detection Kit, Vector Labs, Burlingame, USA) at a 1: 100 dilution. The ImmPACK DAB peroxidase substrate kit (Vector Labs, Burlingame, USA) was used to visualize the formed antigen-antibody complex. Endometrial specimens fixed in 10% formaldehyde were embedded in paraffin and then cut into micro sections (4 µm) using an Accu-Cut SMR 200 rotating microtome. Images obtained in immunohistochemical analysis were subjected to quantitative analysis using a semi-quantitative scoring system.

**Conclusions:** There is a relationship between the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and the occurrence of the endometrial polyp, which confirms the likely role of this angiogenic factor in the pathogenesis of the endometrial polyp. The endometrial polyp is characterized by its own VEGF expression pattern, which is not so relevant in differentiating from normal endometrium VEGF expression is independent of the size of the endometrial polyp. Vascular endothelial growth factor expression depends on the phases of the menstrual cycle and is highest in the secretory phase of the cycle.

## 10. SPIS TABEL

**Tabela 1.** Wartość diagnostyczna różnych metod w obrazowaniu i rozpoznawaniu polipów endometrialnych.

**Tabela 2.** System oceniający odsetek komórek VEGF-pozytywnych.

**Tabela 3.** System oceniający intensywność świecenia komórek VEGF-pozytywnych (intensity index).

**Tabela 4.** Charakterystyka wiekowa grupy badanej.

**Tabela 5.** Rozkład liczebności poszczególnych odsetków komórek pozytywnie wybarwionych w badanych grupach.

**Tabela 6.** Charakterystyka grupy badanej z uwzględnieniem odsetka VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek

**Tabela 7.** Zgodność rozkładu w zakresie poszczególnych kategorii intensywności świecenia w grupie polipy i endometrium prawidłowe.

**Tabela 8.** Charakterystyka grupy badanej z uwzględnieniem intensywności świecenia VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek

**Tabela 9.** Korelacja pomiędzy odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych ogółem w całej grupie badanej (n=200).

**Tabela 10.** Korelacja pomiędzy odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych w grupie polipów endometrialnych (n=100).

**Tabela 11.** Korelacja pomiędzy odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych w grupie prawidłowego endometrium (n=100).

**Tabela 12.** Charakterystyka grupy kontrolnej

**Tabela 13.** Porównanie odsetka VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek w grupie kontrolnej z uwzględnieniem fazy cyklu.

**Tabela 14.** Porównanie intensywności świecenia VEGF-pozytywnych komórek w grupie kontrolnej z uwzględnieniem fazy cyklu.

**Tabela 15.** Korelacja pomiędzy odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a intensywnością świecenia VEGF-pozytywnych komórek w grupie endometrium I fazy.

**Tabela 16.** Korelacja pomiędzy odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a intensywnością świecenia VEGF-pozytywnych komórek w grupie endometrium fazy II

**Tabela 17.** Charakterystyka polipów endometrialnych w grupie badanej.

## 11. SPIS RYCIN

**Rycina 1.** Histopatologiczne obrazy polipa endometrialnego (powiększenie 200x)

**Rycina 2.** Obraz ultrasonograficzny polipa endometrialnego w płaszczyźnie strzałkowej oraz przekroju poprzecznym (materiał własny).

**Rycina 3.** Obraz ultrasonograficzny polipa endometrialnego wraz z charakterystycznym unaczynieniem uzyskanym w czasie badania z opcją kolorowego dopplera (materiał własny).

**Rycina 4.** Obraz ultrasonograficzny polipa endometrialnego wraz z charakterystycznym "naczyniem odżywczym" widocznym po zastosowaniu techniki power doppler (materiał własny).

**Rycina 5.** Obraz ultrasonograficzny polipa endometrialnego wraz z charakterystycznym unaczynieniem uzyskanym w czasie badania z opcją kolorowego dopplera (materiał własny).

**Rycina 6.** Ultrasonograficzny obraz hiperechogenicznych zmian w jamie macicy, początkowo rozpoznanych jako polipy endometrialne, które w trakcie histeroskopii zabiegowej okazały się być mięśniakami podśluzówkowymi (materiał własny).

**Rycina 7.** Obraz 3D polipa endometrialnego (materiał własny).

**Rycina 8.** Histeroskopowy obraz uszypułowanego polipa endometrialnego (materiał własny).

**Rycina 9.** Histeroskopowy obraz dużego polipa endometrialnego wypełniającego całą jamę macicy (materiał własny).

**Rycina 10.** Histeroskopowy obraz uszypułowanego polipa endometrialnego (materiał własny).

**Rycina 11.** Histeroskopowy obraz mnogich polipów endometrialnych (materiał własny).

**Rycina 12.** Histeroskopowy obraz okrągłej zmiany w jamie macicy, która okazała się mięśniakiem podśluzówkowym (materiał własny).

**Rycina 13.** Obraz histeroskopowy uszypułowanego polipa endometrialnego wychodzącego ze ściany przedniej u 38-letniej pacjentki (materiał własny).

**Rycina 14.** Obraz histeroskopowy po usunięciu polipa u w/w pacjentki z widocznym kukutem szypuły (materiał własny)

**Rycina 15.** Etapy detekcji immunohistochemicznej ekspresji VEGF

**Rycina 16.** Obrazy histopatologiczne poddane ocenie mikroskopowej oceniającej odsetek VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek (powiększenie 400x) (materiał własny).

**Rycina 17.** Obrazy histopatologiczne poddane ocenie mikroskopowej oceniającej intensywność świecenia komórek VEGF-pozytywnych (powiększenie 400x) (materiał własny).

**Rycina 18.** Porównanie wieku pomiędzy grupami „polipy” i „endometrium”.

**Rycina 19.** Porównanie odsetka VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek w obu badanych grupach.

**Rycina 20.** Odsetek VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek w obu badanych grupach z uwzględnieniem mediany

**Rycina 21.** Porównanie intensywności świecenia komórek VEGF-pozytywnych w obu badanych grupach.

**Rycina 22.** Intensywność świecenia VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek w obu badanych grupach z uwzględnieniem mediany

**Rycina 23.** Porównanie liczebności określonych stopni wybarwienia komórek VEGF-pozytywnych w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej

**Rycina 24.** Krzywa AUC pokazująca czułość i swoistość parametru [%] komórek VEGF-pozytywnych w różnicowaniu między polipami a endometrium niezmiennym

**Rycina 25.** Porównanie liczebności określonych progów intensywności świecenia komórek VEGF-pozytywnych w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.

**Rycina 26.** Krzywa auc pokazująca czułość i swoistość parametru intensywność świecenia komórek VEGF-pozytywnych w różnicowaniu między polipami a endometrium niezmiennym

**Rycina 27.** Drzewo decyzyjne określające zgodność kwalifikacji dla wzorca ekspresji VEGF w polipie endometrialnym

**Rycina 28.** Korelacja pomiędzy procentem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych ogółem w całej badanej grupie (n=200).

**Rycina 29.** Korelacja pomiędzy odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a intensywnością świecenia VEGF-pozytywnych komórek w grupie polipów endometrialnych.

**Rycina 30.** Korelacja pomiędzy odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych w grupie z prawidłowym endometrium.

**Rycina 31.** Zależność między wiekiem a odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek w całej badanej grupie (n=200).

**Rycina 32.** Zależność pomiędzy wiekiem a odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek w obu badanych grupach.

**Rycina 33.** Zależność pomiędzy wiekiem a intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych w całej badanej grupie.

**Rycina 34.** Zależność pomiędzy wiekiem a intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych w obu badanych grupach.

**Rycina 35.** Porównanie liczebności określonych stopni wybarwienia komórek VEGF-pozytywnych w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej z uwzględnieniem fazy cyklu.

**Rycina 36.** Odsetek komórek VEGF-pozytywnych w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej z uwzględnieniem fazy cyklu.

**Rycina 37.** Porównanie liczebności określonych prógów intensywności świecenia komórek VEGF-pozytywnych w grupie badanej oraz grupie kontrolnej z uwzględnieniem fazy cyklu.

**Rycina 38.** Intensywność świecenia komórek VEGF-pozytywnych w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej z uwzględnieniem fazy cyklu.

**Rycina 39.** Rozkład wieku w grupie kontrolnej z uwzględnieniem fazy cyklu.

**Rycina 40.** Porównanie odsetka VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek w grupie kontrolnej z uwzględnieniem fazy cyklu.

**Rycina 41.** Porównanie intensywności świecenia komórek VEGF-pozytywnych w grupie kontrolnej z uwzględnieniem fazy cyklu.

**Rycina 42.** Korelacja pomiędzy odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych w grupie endometrium I fazy.

**Rycina 43.** Korelacja pomiędzy odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych w grupie endometrium II fazy

**Rycina 44.** Korelacja pomiędzy odsetkiem VEGF-pozytywnie wybarwionych komórek a średnicą polipa endometrialnego.

**Rycina 45.** Korelacja pomiędzy intensywnością świecenia komórek VEGF-pozytywnych a średnicą polipa endometrialnego.

## 12. PIŚMIENNICTWO

1. Robboy S, Bentley R, et al. Robboy's Pathology of the Female Reproductive Tract. Churchill Livingstone, 2008 (2):361-364
2. Sajdak S. et al. Histeroskopia. Urban&Partner. 2000: 51-55
3. Onalan R, Onalan G, Tonguc E, et al. Body Mass Index Is an Independent Risk Factor for the Development of Endometrial Polyps in Patients Undergoing in Vitro Fertilization Fertil Steril. 2009;91(4): 1056-60.
4. Cohen I. Endometrial Pathologies Associated With Postmenopausal Tamoxifen Treatment. Gynecol Oncol. 2004;94(2): 256-66
5. Lieng M, Istre O, Qvigstad E, et al. Treatment of Endometrial Polyps: A Systematic Review. Acta Obstet Gynecol Scand. 2010;89(8): 992-1002.
6. Anastasiadis P, Koutlaki NG, Skaphida G, et al. Endometrial Polyps: Prevalence, Detection, and Malignant Potential in Women With Abnormal Uterine Bleeding. Eur J Gynaecol Oncol. 2000;21(2): 180-3.
7. Vilodre L, Bertat R, Petters R, et al. Cervical Polyp as Risk Factor for Hysteroscopically Diagnosed Endometrial Polyps. Gynecol Obstet Invest. 1997;44(3): 191-5.
8. Nagele F, O'Connor H, Davies A, et al. 2500 Outpatient Diagnostic Hysteroscopies. Obstet Gynecol. 1996;88(1): 87-92.
9. Reslová T, Tosner J, Resl M Endometrial Polyps. A Clinical Study of 245 Cases. Arch Gynecol Obstet. 1999;262(3-4): 133-9.
10. Hamani Y, Eldar I, Sela H, et al. The Clinical Significance of Small Endometrial Polyps. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2013 Oct;170(2): 497-500.
11. Chaudhry S, Reinhold C, Guermazi A, et al. Benign and Malignant Diseases of the Endometrium Top Magn Reson Imaging. 2003 Aug;14(4): 339-57,
12. Peterson W, Novak WR, Endometrial Polyps. Obstet Gynecol. 1956 Jul;8(1): 40-9.
13. Clevenger-Hoeft M, Syrop CH, Stoval IW, et al. Sonohysterography in Premenopausal Women With and Without Abnormal Bleeding Obstet Gynecol. 1999Oct;94(4): 516-20.
14. Valle RF. Hysteroscopy for Gynecologic Diagnosis. Clin Obstet Gynecol. 1983 Jun;26(2): 253-76

15. Fatemi HM, Kasius JC, Timmermans A, et al. Prevalence of Unsuspected Uterine Cavity Abnormalities Diagnosed by Office Hysteroscopy Prior to in Vitro Fertilization Hum Reprod. 2010 Aug;25(8): 1959-65
16. Karakaya BK, Ozkan N, Kansu-Celik H. Malignancy risk of endometria polyps among geriatric women. Int J Gerontol. 2018;12(3): 215-217
17. Indraccolo U, Di Iorio R, Matteo M, et al. The pathogenesis of endometrial polyps: a systematic semi-quantitative review. Eur J Gynaecol Oncol 2013;34(1): 5-22
18. Inceboz US, Nese N, Uyar Y, et al. Hormone receptor expressions and proliferation markers in postmenopausal endometrial polyps. Gynecol Obstet Invest. 2006;61(1): 24-8.
19. Lopes RG, Baracat E, Cavalcanti de Albuquerque Neto L, et al. Analysis of estrogen- and progesterone-receptor expression in endometrial polyps. J Minim Invasive Gynecol. May-Jun 2007;14(3): 300-3.
20. Mittal K , Schwartz L, Goswami S, et al. Estrogen and progesterone receptor expression in endometrial polyps. Int J Gynecol Pathol. 1996 Oct;15(4): 345-8.
21. Schlesinger C , Kamoi S, Ascher S M, et al. Endometrial polyps: a comparison study of patients receiving tamoxifen with two control groups. Int J Gynecol Pathol. 1998 Oct;17(4): 302-11.
22. Vosse M, Renard F, Coibion M, et al. Endometrial disorders in 406 breast cancer patients on tamoxifen: the case for less intensive monitoring. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2002 Feb 10;101(1): 58-63.
23. Taylorb LJ, Duffyb SR, O'Donovanc PJ, et al. Does tamoxifen therapy affect the hormone receptor expression and cell proliferation indices of endometrial polyps?: An immunohistochemical comparison of endometrial polyps from postmenopausal women exposed and not exposed to tamoxifen. Maturitas 2006 Jun20;54(3): 252-259
24. Dal Cin P, Vanni R, Marras S, et al. Four cytogenetic subgroups can be identified in endometrial polyps. Cancer Res. 1995 Apr 1;55(7): 1565-8.
25. Hann LE, Bach AM, Francis SM, et al. Sonohysterography for evaluation of the endometrium in women treated with tamoxifen. AJR Am J Roentgenol. 2001;177: 337-342.
26. Cain J, Elmasri W, Gregory T. Chapter 41: gynecology. In: Brunicardi FC, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Matthews JB, Pollock RE, editors. Schwartz's principles of surgery. 9th ed. Columbus, OH: McGraw-Hill Professional.



27. Exacoustos C, Zupi E, Cangi B, et al. Endometrial evaluation in postmenopausal breast cancer patients receiving tamoxifen: an ultrasound, color flow Doppler, hysteroscopic and histological study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1995;6: 435–442.
28. Deligdisch L, Kalir T, Coh CJ, et al. Endometrial Histopathology in 700 Patients Treated with Tamoxifen for Breast Cancer. *Gynecologic Oncology.* 78(2): 181-186
29. Neven P, De Muylder X, VanBelle Y. Tamoxifen-induced endometria polyp. *N Engl J Med.* 1997;336: 1389-90
30. Ramondetta LM, Sherwood JB, Dunton CJ, et al. Endometrial cancer in polyps associated with tamoxifen use. *Am J Obstet Gynecol.* 1999 Feb;180(2 Pt 1): 340-1
31. Gokmen Karasu A, Sonmez F, Aydin S, Survivin Expression in Simple Endometrial Polyps and Tamoxifen-associated Endometrial Polyps. *Int J Gynecol Pathol.* 2018 Jan;37(1):27-31.
32. Dreisler E, Sorensen S, Lose G, et al. Endometrial polyps and associated factors in Danish women aged 36–74 years. *Am J Obstet Gynecol.* 2009;200: e1–e6.
33. Maia H Jr, Barbosa IC, Marques D, et al. Hysteroscopy and transvaginal sonography in menopausal women receiving hormone replacement therapy. *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 1996;4: 13–18
34. Oguz S, Sargin A, Kelekci S. The role of hormone replacement therapy in endometrial polyp formation. *Maturitas.* 2005;50: 231–236
35. Bol S, Wanschura S, Thode B, et al. An endometrial polyp with a rearrangement of HMGI-C underlying a complex cytogenetic rearrangement involving chromosomes 2 and 12. *Cancer Genetics and Cytogenetics;* 1996 Aug;90(1): 88-90
36. Al-Jefout M, Black K, Schulke L, et al. Novel finding of high density of activated mast cells in endometrial polyps. *Reproductive endocrinology.* 2009 Sep;92(3): 1104-06.
37. Erdemoglu E, Güney M, Karahan N, et al. Expression of cyclooxygenase-2, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in premenopausal and postmenopausal endometrial polyps. *Maturitas.* 2008 Mar 20;59(3): 268-74.
38. Faloppa CC, Baiocchi G, Cunha IW, et al. NF-kappaB and COX-2 expression in nonmalignant endometrial lesions and cancer. *Am J Clin Pathol.* 2014 Feb;141(2): 196-203.
39. Su T, Sui L. Expression and significance of p63, aromatase P450 and steroidogenic factor-1 in endometrial polyp. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2014;49: 604–8.

40. Abrão F, Pereira Modotti W, Spadoto-Dias D, et al. Concomitant p53 and PTEN immunoexpression to predict the risk of malignancy in endometrial polyps. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Sep; 97(38):.
41. Stewart CJ, Bharat C, Crook M, et al. p16 immunoreactivity in endometrial stromal cells: stromal p16 expression characterises but is not specific for endometrial polyps. *Pathology*. 2015 Feb;47(2): 112-7.
42. Peng Xuebing Li TinChiu, Xia Enlan, et al. Is endometrial polyp formation associated with increased expression of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta1? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011 Nov;159(1): 198-203.
43. Taylor LJ, Jackson TL, Reid JG, et al. The differential expression of oestrogen receptors, progesterone receptors, Bcl-2 and Ki67 in endometrial polyps. *BJOG*. 2003 Sep;110(9): 794-8.
44. Inagaki N, Ung L, Otani T, et al. Uterine cavity matrix metalloproteinases and cytokines in patients with leiomyoma, adenomyosis or endometrial polyp. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003 Dec 10;111(2): 197-203.
45. Nogueira AA, Candido-dos-Reis F, Rosa e Silva J.C. Endometrial Polyps: A Review. *Journal of Gynecologic Surgery* 2007 Sep; 23(3): 111-116
46. Babacan A, Gun I, Kizilaslan C, et al. Comparison of transvaginal ultrasonography and hysteroscopy in the diagnosis of uterine pathologies. *Int J Clin Exp Med*. 2014; 7(3): 764–769.
47. Berlière M, Radikov G, Galant C, et al. Identification of women at high risk of developing endometrial cancer on tamoxifen. *Eur J Cancer*. 2000 ;36 Suppl 4:S35-6.
48. Goldstein SR. Sonography in postmenopausal bleeding. *J Ultrasound Med*. 2012 Feb;31(2): 333-6.
49. Goldstein SR. Selective estrogen receptor modulators: a new category of therapeutic agents for extending the health of postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol*. 1998 Dec;179(6 Pt 1): 1479-84.
50. Carlson JW, Mutter GL. Endometrial intraepithelial neoplasia is associated with polyps and frequently has metaplastic change. *Histopathology*. 2008 Sep;53(3):325-32
51. Naaman Y, Diment J, Perlman S, et al. Can malignant potential of endometrial polyps be determined by incorporating the endometrial intraepithelial neoplasia (EIN) classification? *Gynecol Oncol*. 2015 Feb;136(2): 254-7.
52. Bakour SH, Khan KS, Gupta JK. The risk of premalignant and malignant pathology in endometrial polyps. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2000;79: 317–320.

53. Lieng M, Qvigstad E, Sandvik L, et al. Hysteroscopic resection of symptomatic and asymptomatic endometrial polyps. *J Minim Invasive Gynecol.* 2007;14: 189–194.
54. Savelli L, De Iaco P, Santini D, et al. Histopathologic features and risk factors for benignity, hyperplasia, and cancer in endometrial polyps. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188: 927–931.
55. Hileeto D, Fadare O, Martel M, et al. Age dependent association of endometrial polyps with increased risk of cancer involvement. *World J Surg Oncol.* 2005;3: 8.
56. AAGL Practice Report: Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Endometrial Polyps. *J Minim Invasive Gynecol.* Jan-Feb 2012;19(1): 3-10.
57. Munro MG, Critchley HO, Broder MS, et al. FIGO classification system (PALM-COEIN) for causes of abnormal uterine bleeding in nonpregnant women of reproductive age. FIGO Working Group on Menstrual Disorders. *Int J Gynaecol Obstet.* 2011 Apr;113(1): 3-13
58. Hassa H, Tekin B, Senses T, et al. Are the site, diameter, and number of endometrial polyps related with symptomatology? *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194: 718–721.
59. Dreisler E, Stampe Sorensen S, Ibsen P H, et al. Prevalence of endometrial polyps and abnormal uterine bleeding in a Danish population aged 20-74 years. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009 Jan;33(1): 102-8.
60. Papadia A, Gerbaldo D, Fulcheri E, et al. The risk of premalignant and malignant pathology in endometrial polyps: should every polyp be resected? *Minerva Ginecol.* 2007;59:117–124.
61. Ben-Arie A, Goldchmit C, Laviv Y, et al. The malignant potential of endometrial polyps. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004;115: 206–210.
62. Ferrazzi E, Zupi E, Leone FP, et al. How often are endometrial polyps malignant in asymptomatic postmenopausal women? A multicenter study. *Am J Obstet Gynecol.* 2009;200: 235–235
63. Dreisler E, Sorensen SS, Lose G, et al. Endometrial polyps and associated factors in Danish women aged 36-74 years. *Am J Obstet Gynecol.* 2009 Feb;200(2): 147.
64. Jakab A, Ovári L, Juhász B, et al. Detection of feeding artery improves the ultrasound diagnosis of endometrial polyps in asymptomatic patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005 Mar 1;119(1): 103-7.
65. Salim S, Won H, Nesbitt-Hawes E, et al. Diagnosis and management of endometrial polyps: a critical review of the literature. *J Minim Invasive Gynecol.* 2011;18(5): 569-81.

66. Shokeir T, Shalan H, El-Shafei M, et al. Significance of endometrial polyps detected hysteroscopically in eumenorrhoeic infertile women. *J Obstet Gynaecol Res.* 2004 Apr;30(2): 84-9.
67. Alansari LM, Wardle P. Endometrial polyps and subfertility. *Hum Fertil* 2012; 15(3): 129–133
68. Munro M. Uterine polyps, adenomyosis, leiomyomas, and endometrial receptivity. *Fertil Steril.* 2019 Apr;111(4): 629-640.
69. Bosteels J, Kasius J, Weyers S, et al. Hysteroscopy for treating subfertility associated with suspected major uterine cavity abnormalities. *The Cochrane Database of Systematic Review* 2015
70. Rackow BW, Jorgensen E, Taylor HS. Endometrial polyps affect uterine receptivity. *Fertil Steril* 2011; 95(8): 2690–2692.
71. Chami A, Saridogan E. Endometrial Polyps and Subfertility. *J Obstet Gynaecol India.* 2017 Feb;67(1): 9-14.
72. Yanaihara A, Yorimitsu T, Motoyama H, et al. Location of endometrial polyp and pregnancy rate in infertility patients. *Fertil Steril.* 2008;90(1): 180–182.
73. Hinckley MD, Milki AA. 1000 office-based hysteroscopies prior to in vitro fertilization: feasibility and findings. *JSLs.* 2004;8: 103–107.
74. Mossa B, Torcia F, Avenoso F, et al. Occurrence of malignancy in endometrial polyps during postmenopause. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2010;31(2): 165-8.
75. Makrakis E, Hassiakos D, Stathis D, et al. Hysteroscopy in women with implantation failures after in vitro fertilization: findings and effect on subsequent pregnancy rates. *J Minim Invasive Gynecol.* 2009; 16: 181–187.
76. Algorytmy diagnostyczno-lecznicze w zastosowaniu do niepłodności pod redakcją prof. dr hab. n. med. Sławomira Wołczyńskiego, dr n. med. Michała Radwana. 2007.
77. Lass A, Williams G, Abusheikha N, et al. The effect of endometrial polyps on outcomes of in vitro fertilization (IVF) cycles. *J Assist Reprod Genet.* 1999;16: 410–415.
78. Richlin S, Ramachandran S, Shanti A, et al. Glycodelin levels in uterine flushings and in plasma of patients with leiomyomas and polyps: implications and implantation. *Hum Reprod.* 2002;17: 2742–2747
79. Jokimaa V, Oksjoki S, Kujari H, et al. Altered expression of genes involved in the production and degradation of endometrial extracellular matrix in patients with

- unexplained infertility and recurrent miscarriages. *Mol Hum Reprod* 2002; 8(12): 1111–1116.
80. Seaward AV, Burke S, Croy B, et al. Interferon gamma contributes to preimplantation embryonic development and to implantation site structure in NOD mice. *Hum Reprod* . 2010 Nov;25(11): 2829-39.
  81. Afifi K, Anand S, Nallapeta S, et al. Management of endometrial polyps in subfertile women: a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010; 151(2): 117–121.
  82. Nijkang NP, Anderson L, Markham R, et al. Endometrial polyps: Pathogenesis, sequelae and treatment. *SAGE Open Med*. 2019 May 2;7: 205.
  83. Yu Sun, Jing Zhang, Wenpei Bai, et al. Higher Prevalence of Endometrial Polyps in Patients with Fallopian Tube Obstruction: A Case-control Study. *J Minim Invasive Gynecol*. Jul-Aug 2019;26(5): 935-940.
  84. LaTorre R, De Felice C, De Angelis C, et al. Transvaginal sonographic evaluation of endometrial polyps: a comparison with two dimensional and three dimensional contrast sonography. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1999; 26(3–4): 171–173.
  85. Bernard JP, Rizk E, Camatte S, et al. Saline contrast sonohysterography in the preoperative assessment of benign intrauterine disorders. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2001;17: 145–149.
  86. Hamou J. Hysteroscopy and microhysteroscopy. *Acta Eur Fertil*. 1981; 12: 29
  87. Tariq M, Idrees R, Raheem A. Spectrum of Histopathological Findings in Postmenopausal Bleeding. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2015 Nov;25(11): 794-7.
  88. Kebaili S, Dhouib M, Chaabane K, et al. Exploration of post-menopausal uterine bleeding. Hysteroscopy-histology correlation in 94 cases. *Sante*. 2010;20(2): 99-104.
  89. Lieng M, Qvigstad, Dahl G F, et al. Flow differences between endometrial polyps and cancer: a prospective study using intravenous contrast-enhanced transvaginal color flow Doppler and three-dimensional power Doppler ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008 Dec;32(7): 935-40.
  90. Alcázar JL, Castillo G, Mínguez JA, et al. Endometrial blood flow mapping using transvaginal power Doppler sonography in women with postmenopausal bleeding and thickened endometrium *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2003 Jun;21(6): 583-8.
  91. Fleischer A, Shappell H, Color Doppler sonohysterography of endometrial polyps and submucosal fibroids. *J Ultrasound Med*. 2003 Jun;22(6): 601-4.

92. Pietryga M, Brązert J, et al, Podstawy praktycznej ultrasonografii w ginekologii i położnictwie. Exemplum 2009: 85-86.
93. Schwarzler P, Concin H, Bosch H, et al. An evaluation of sonohysterography and diagnostic hysteroscopy for the assessment of intrauterine pathology. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998; 11(5): 337–342.
94. Jansen FW, de Kroon CD, van Dongen H, et al. Diagnostic hysteroscopy and saline infusion sonography: prediction of intrauterine polyps and myomas. *J Minim Invasive Gynecol*. 2006;13: 320–324.
95. Syrop CH, Sahakian V. Transvaginal sonographic detection of endometrial polyps with fluid contrast augmentation. *Obstet Gynecol*. 1992;79: 1041–1043.
96. Guven M, Bese T, Demirkiran F, et al. Comparison of hydrosoneography and transvaginal ultrasonography in the detection of intracavitary pathologies in women with abnormal uterine bleeding. *Int J Gynecol Cancer*. 2004;14: 57–63.
97. Dijkhuizen F, De Vries LD, Mol BW, et al. Comparison of transvaginal ultrasonography and saline infusion sonography for the detection of intracavitary abnormalities in premenopausal women. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2000;15: 372–376.
98. Bronz L , Drehe E, Almendral A, Guideline for the diagnosis of postmenopausal bleeding. PMPB Working Group of the SGGG. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* . 2000;40(2): 71-9
99. Bronz L. Hysteroscopy in the assessment of postmenopausal bleeding. *Contrib Gynecol Obstet*. 2000;20: 51-9.
100. Bonilla-Musoles F, Raga F, Osborne N G, et al. Three-dimensional hysterosonography for the study of endometrial tumors: comparison with conventional transvaginal sonography, hysterosalpingography, and hysteroscopy. *Gynecol Oncol*. 1997 May;65(2): 245-52.
101. Luczyński K, Suchocki S, Szymczyk A, Sonohysterography in the diagnosis of endometrial abnormalities. *Ginekol Pol*. 1998 May;69(5): 263-8.
102. Fadl SA, Sabry AS , Hippe D, et al. Diagnosing Polyps on Transvaginal Sonography: Is Sonohysterography Always Necessary? *Ultrasound Q*. 2018 Dec;34(4): 272-277.
103. Preutthipan S, Linasmita V. A prospective comparative study between hysterosalpingography and hysteroscopy in the detection of intrauterine pathology in patients with infertility. *J Obstet Gynaecol Res*. 2003; 29: 33–37.

104. Sabry AS, Fadl SA, Szmigielski W, et al. Diagnostic value of three-dimensional saline infusion sonohysterography in the evaluation of the uterus and uterine cavity lesions. *Pol J Radiol.* 2018 Nov 30;83: e482-e490.
105. Soares SR, Barbosa dos Reis M, Camargos A F, et al. Diagnostic accuracy of sonohysterography, transvaginal sonography, and hysterosalpingography in patients with uterine cavity diseases. *Fertil Steril.* 2000 Feb;73(2): 406-11.
106. Widrich T, Bradley LD, Mitchinson AR, et al. Comparison of saline infusion sonography with office hysteroscopy for the evaluation of the endometrium. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;174: 1327–1334.
107. Makris N, Skartados N, Kalmantis K, et al. Evaluation of abnormal uterine bleeding by transvaginal 3-D hysterosonography and diagnostic hysteroscopy. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2007;28: 39–42.
108. Birinyi L, Darago P, Tęoręok P, et al. Predictive value of hysteroscopic examination in intrauterine abnormalities. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004;115:75–79.
109. Lo KW, Yuen PM. The role of outpatient diagnostic hysteroscopy in identifying anatomic pathology and histopathology in the endometrial cavity. *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 2000;7: 381–385.
110. Prevalence and predictors of atypical histology in endometrial polyps removed by hysteroscopy: A secondary analysis from the SICMIG hysteroscopy trial. For the Italian School of Minimally Invasive Gynecological Surgery (SiCMiG) Hysteroscopists Group. *Facts Views Vis Obgyn.* 2019 Jun;11(2): 127-134.
111. Garuti G, Sambruni I, Colonnelli M, et al. Accuracy of hysteroscopy in predicting histopathology of endometrium in 1500 women. *J Am Assoc Gynecol Laparoscopists,* 2001; 8 (2): 207–213.
112. Gkrozou F, Dimakopoulos G, Vrekoussis T, et al. Hysteroscopy in women with abnormal uterine bleeding: a meta-analysis on four major endometrial pathologies. *Arch Gynecol Obstetrics,* 2015; 291 (6): 1347–1354.
113. Loiacono RM, Trojano G, Del Gaudio N, et al. Hysteroscopy as a valid tool for endometrial pathology in patients with postmenopausal bleeding or asymptomatic patients with a thickened endometrium: hysteroscopic and histological results. *Gynecol Obstet Invest,* 2015; 79 (3): 210–216.
114. O'Flynn N. Assessment and treatment for people with fertility problems: NICE guideline. *Br J Gen Pract.* 2014;64(618): 50-51.

115. Flávia DS, Bueloni-Dias F, et al. Usefulness of clinical, ultrasonographic, hysteroscopic, and immunohistochemical parameters in differentiating endometrial polyps from endometrial cancer. *J Minim Invasive Gynecol*, 2014;21(2): 269-302.
116. Yeh Giin Ngoa, Hung-Chun Fub, Li-ChingChu. Specific hysteroscopic findings can efficiently distinguish the differences between malignant and benign endometrial polyps. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 2020, 59(1): 85-90.
117. ACOG Committee Opinion Summary, Number 800 The Use of Hysteroscopy for the Diagnosis and Treatment of Intrauterine Pathology *Obstetrics & Gynecology*. 2020;135(3): 754-756.
118. Bosteels J, Steffi van Wessel S. Hysteroscopy for treating subfertility associated with suspected major uterine cavity abnormalities. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018 Dec; 2018(12).
119. DeWaay DJ, Syrop CH, Nygaard IE, et al. Natural history of uterine polyps and leiomyomata. *Obstet Gynecol* 2002; 100(1): 3–7.
120. Leing M, Istre O, Sandvik L, et al. Prevalence 1-year regression rate, and clinical significance of asymptomatic endometrial polyps: cross-sectional study. *J Minim Invasive Gynecol*. 2009;16: 465–471.
121. Brooks PG, Loffer FD, Serden SP. Resectoscopic removal of symptomatic intrauterine lesions. *J Reprod Med*. 1989;34: 435–437.
122. Nathani F, Clark TJ. Uterine polypectomy in the management of abnormal uterine bleeding: a systematic review. *J Minim Invasive Gynecol*. 2006;13: 260–268.
123. Antunes A Jr, Costa-Paiva L, Arthuso M, et al. Endometrial polyps in pre- and postmenopausal women: factors associated with malignancy. *Maturitas*. 2007;57: 415–421
124. Preutthipan S, Herabutya Y. Hysteroscopic polypectomy in 240 premenopausal and postmenopausal women. *Fertil Steril*. 2005;83: 705–709.
125. Henriquez DD, van Dongen H, Wolterbeek R, et al. Polypectomy in premenopausal women with abnormal uterine bleeding: effectiveness of hysteroscopic removal. *J Minim Invasive Gynecol*. 2007; 14:59–63.
126. Machtinger R, Korach J, Padoa A, et al. Transvaginal ultrasound and diagnostic hysteroscopy as a predictor of endometrial polyps: risk factors for premalignancy and malignancy. *Int J Gynecol Cancer*. 2005; 15: 325–328.
127. Golan A, Sagiv R, Berar M, et al. Bipolar electrical energy in physiologic solution: a revolution in operative hysteroscopy. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*. 2001;8: 252–258.



128. Vilos GA. Intrauterine surgery using a new coaxial bipolar electrode in normal saline solution (Versapoint): a pilot study. *Fertil Steril*. 1999; 72: 740–743.
129. Emanuel MH, Wamsteker K. The Intra Uterine Morcellator: a new hysteroscopic operating technique to remove intrauterine polyps and myomas. *J Minim Invasive Gynecol*. 2005;12: 62–66.
130. van Dongen H, Emanuel MH, Wolterbeek R, et al. Hysteroscopic morcellator for removal of intrauterine polyps and myomas: a randomized controlled pilot study among residents in training. *J Minim Invasive Gynecol*. 2008;15: 466–471.
131. Muzii L, Bellati F, Pernice M, et al. Resectoscopic versus bipolar electrode excision of endometrial polyps: a randomized study. *Fertil Steril* 2007; 87(4): 909–917.
132. Tjarks M, Van Voorhis BJ. Treatment of endometrial polyps. *Obstet Gynecol* 2000; 96(6): 886–889.
133. Kim JY, Chae M, Lee J. Operative hysteroscopy intravascular absorption syndrome caused by massive absorption of 0.9% saline as the distention/irrigation medium. *Korean J Anesthesiol*. 2013;65(6 Suppl):vS44-S46.
134. Lagana AS, Palmara V, Granese R, et al. Desogestrel versus danazol as preoperative treatment for hysteroscopic surgery: a prospective, randomized evaluation. *Gynecol Endocrinol* 2014; 30(11): 794–797.
135. Deans R, Abbott J. Review of intrauterine adhesions. *J Minim Invasive Gynecol*. 2010;17: 555–569.
136. Kanthi J, Remadevi C, Sumathy S, et al. Clinical study of endometrial polyp and role of diagnostic hysteroscopy and blind avulsion of polyp. *J Clin Diagn Res* 2016; 10(6): QC01-14.
137. Li F, Wei S, Yang S, et al. Post hysteroscopic progesterone hormone therapy in the treatment of endometrial polyps. *Pak J Med Sci* 2018; 34(5): 1267–1271.
138. Spiewankiewicz B, Stelmachow J, Sawicki W, et al. The effectiveness of hysteroscopic polypectomy in cases of female infertility. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2003;30: 23–25.
139. Valle RF. Therapeutic hysteroscopy in infertility. *Int J Fertil*. 1984;29: 143–148.
140. Perez-Medina T, Bajo-Arenas J, Salazar F, et al. Endometrial polyps and their implication in the pregnancy rates of patients undergoing intrauterine insemination: a prospective, randomized study. *Hum Reprod*. 2005;20: 1632–1635.
141. Zheng F, Xin X, He F, Liu J, Cui Y. Meta-analysis on the use of hyaluronic acid gel to prevent intrauterine adhesion after intrauterine operations. *Exp Ther Med*. 2020;19(4): 2672-2678.

142. Moghal N. Diagnostic value of endometrial curettage in abnormal uterine bleeding—a histopathological study. *J Pak Med Assoc.* 1997; 47: 295–299.
143. Gebauer G, Hafner A, Siebzehnrübl E, et al. Role of hysteroscopy in detection and extraction of endometrial polyps: Results of a prospective study. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184:59–63.
144. Loffer FD. Hysteroscopy with selective endometrial sampling compared with D&C for abnormal uterine bleeding: the value of a negative hysteroscopic view. *Obstet Gynecol.* 1989;73: 16–20.
145. Chan SS, Tam WH, Yeo W, et al. A randomised controlled trial of prophylactic levonorgestrel intrauterine system in tamoxifen-treated women. *BJOG* 2007; 114(12): 1510–1515.
146. Wada-Hiraike O, Osuga Y, Hiroi H, et al. Sessile polyps and pedunculated polyps respond differently to oral contraceptives. *Gynecol Endocrinol.* 2011 May;27(5): 351-5.
147. Meresman GF, Auge L, Baranao RI, et al. Oral contraceptives suppress cell proliferation and enhance apoptosis of eutopic endometrial tissue from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 77(6): 1141–1147.
148. Mittal K, Da Costa D, Endometrial hyperplasia and carcinoma in endometrial polyps: clinicopathologic and follow-up findings. *Int J Gynecol Pathol.* 2008 Jan;27(1): 45-8.
149. Namazov A, Gemer O, Ben-Arie A, et al. Endometrial Polyp Size and the Risk of Malignancy in Asymptomatic Postmenopausal Women. *J Obstet Gynaecol Can.* 2019 Jul;41(7): 912-915.
150. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999 Jan;13(1): 9-22.
151. Gospodarowicz D, Abraham J A, Schilling J, et al. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *PNAS* October 1, 1989 86 (19): 7311-7315.
152. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science.* 1989 Dec 8;246(4935): 1309-12.
153. de Vries C, Escobedo JA, Ueno et al. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science.* 1992 Feb 21;255(5047): 989-91.
154. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME et al. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Sep 30;187(3): 1579-86.

155. Stuttfeld E, Ballmer-Hofer K, Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life*. 2009 Sep;61(9): 915-22.
156. Ferrara N, Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol*. 2002 Dec;29(6 Suppl 16): 10-4.
157. Jakeman LB, Armanini M, Phillips H S, et al. Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology*. 1993 Aug;133(2): 848-59.
158. Shweiki D, Itin A, Neufeld et al. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest*. 1993 May;91(5): 2235-43.
159. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2006; 39: 469–478.
160. Shweiki D, Itin A, Soffer D, et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992 Oct 29;359(6398): 843-5.
161. Adamis AP, Miller J W, Bernal M T, et al. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*. 1994 Oct 15;118(4): 445-50.
162. Brown LF, Yeo KT, Berse B, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med*. 1992 Nov 1;176(5): 1375-9.
163. Ferrara N, Carver-Moore K, H Chen, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996 Apr 4;380(6573): 439-42.
164. Greenway MJ, Alexander MD, Ennis S, et al. A novel candidate region for ALS on chromosome 14q11.2. *Neurology*. 2004 Nov 23;63(10): 1936-8.
165. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996 Apr 4;380(6573): 435-9.
166. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi T P, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995 Jul 6;376(6535): 62-6.
167. Fong G H, Rossant J, Gertsenstein M, et al. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995 Jul 6;376(6535):66-70.
168. Chekhonin VP, Shein SA, Korchagina AA et al. VEGF in tumor progression and targeted therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2013 May;13(4):423-43.

169. Esser, S, Wolburg, K., Wolburg, H., et al. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J. Cell Biol.* 1998; 140: 947– 959.
170. Arjamaa O, Aaltonen V, Piippo N et al. Hypoxia and inflammation in the release of VEGF and interleukins from human retinal pigment epithelial cells. *Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2017 Sep;255(9): 1757-1762.
171. Ziemer LS, Koch CJ, Maity A et al. Hypoxia and VEGF mRNA expression in human tumors. *Neoplasia.* 2001 Nov-Dec;3(6): 500-8.
172. Deroanne CF, Hajitou A, Calberg-Bacq CM, et al. Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.* 1997 Dec 15;57(24): 5590-7.
173. Onimaru M, Yonemitsu Y, Fujii T, et al. vEGF-C regulates lymphangiogenesis and capillary stability by regulation of PDGF-B. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 Nov;297(5): 1685-96.
174. Nakagawa T, Lan HY, Zhu HJ et al. Differential regulation of VEGF by TGF-beta and hypoxia in rat proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004 Oct;287(4): 658-64.
175. Goad, D. L., Rubin, J., Wang, et al. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 1996;137: 2262– 2268.
176. Li J, Perrella MA, Tsai JC, et al. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1995; 270:308– 312.
177. Cohen T, Nahari D, Cerem-Weiss, et al. Interleukin-6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 1996;27:736– 741.
178. Matsumoto K, Ohi H, Kanmatsuse K, et al. Interleukin 10 and interleukin 13 synergize to inhibit vascular permeability factor release by peripheral blood mononuclear cells from patients with lipoid nephrosis. *Nephron* 1997;77:212– 218.
179. Iyer AK, Ramesh V, Castro CA, et al. Nitric oxide mediates bleomycin-induced angiogenesis and pulmonary fibrosis via regulation of VEGF. *J Cell Biochem.* 2015 Nov;116(11): 2484-93.
180. Mei K, Cai XH, Du L, et al. Effect of nitric oxide derived from endothelial nitric oxide on angiogenesis. *Chin J Cancer.* 2010 Jan;29(1): 32-7.

181. Dulak J, Józkowicz A, Dembinska-Kiec A, et al. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Mar;20(3): 659-66.
182. Zimna A, Kurpisz M. Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *Biomed Res Int.* 2015.
183. Okada H, Tsuzuki T, Shindoh H et al. Regulation of decidualization and angiogenesis in the human endometrium: mini review. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014 May;40(5): 1180-7.
184. Koga K, Osuga Y, Tsutsumi O, et al. Demonstration of angiogenin in human endometrium and its enhanced expression in endometrial tissues in the secretory phase and the decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5609–5614.
185. Harada M, Osuga Y, Hirota Y, et al. Mechanical stretch stimulates interleukin-8 production in endometrial stromal cells: Possible implications in endometrium-related events. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 1144–1148.
186. Lockwood CJ, Kumar P, Krikun G, et al. Effects of thrombin, hypoxia, and steroids on interleukin-8 expression in decidualized human endometrial stromal cells: Implications for long-term progestin-only contraceptive-induced bleeding. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1467–1475.
187. Tsuzuki T, Okada H, Cho H, et al. Hypoxic stress simultaneously stimulates vascular endothelial growth factor via hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and inhibits stromal cell-derived factor-1 in human endometrial stromal cells. *Hum Reprod* 2012; 27: 523–530.
188. Critchley HO, Osei J, Henderson TA, et al. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression in human endometrium and its regulation by prostaglandin E-series prostanoid receptor 2 (EP2). *Endocrinology* 2006; 147: 744–753.
189. Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, et al. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Aug;81(8): 3112-8.
190. Dong Q, Cheng Z. Functions of VEGF In female reproductive system chinese science bulletin 2003 48: 217-22.
191. Sugino K, Kashida, Karube-Harada A. Expression of vascular endothelial factor VEGF and its receptors In human endometrium throughout the menstrual cycle and In Early pregnancy *Reproduction* 2002;123: 379-87.

192. Herve MA, Meduri G, Petit G, et al. Regulation of the vascular endothelial growth factor vegf receptor Flk-1/KDR by estradiol through vegf In uterus. *J endocrinol* 2006;188: 91-9.
193. Meduri G, Bausero P, Perrot-Applanat M, Expression of vascular endothelial growth factor receptors in the human endometrium: modulation during the menstrual cycle. *Biol Reprod.* 2000 Feb;62(2):439-47.
194. Okada H, Tsutsumi A, Imai M, et al. Estrogen and selective estrogen receptor modulators regulate vascular endothelial growth factor and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 in human endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 2010; 93: 2680–2686.
195. Okada H, Okamoto R, Tsuzuki T, et al. Progestins inhibit estradiol-induced vascular endothelial growth factor and stromal cell-derived factor 1 in human endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 2011; 96: 786–791.
196. Korom pelis P, Piperi C, Adamopoulos C, et al. Expression of vascular endothelial factor-A gelatinases (MMP-2 MMP-9) and TIMP-1 un uterine leiomyomas *Clin Chem Lab Med.* 2015;53: 1415-24.
197. Koukourakis M , Limberis V, Tentes I. Serum VEGF levels and tissue activation of VEGFR2/KDR receptors in patients with breast and gynecologic cancer. *Cytokine.* 2011 Mar;53(3): 370-5.
198. Gerstein ES, Gritsaenko EV, Shcherbakov, et al. Vascular endothelial growth factor and plasminogen activators in endometrial carcinoma and hyperplasia. *MEVopr Onkol.* 2003;49(6): 725-9.
199. Erinanc H, Toprak E. Increased expression of nestin and VEGF in endometrial polyps: an immunohistochemical study. *Int J Clin Exp Pathol* 2016;9(7): 7458-7463.
200. Hongying Dai, Zhao Shuping, Lin Xu, et al. Expression of Efp, VEGF and bFGF in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue. *Oncology reports.* 2010; 23(3): 795-799.
201. Gerstein ES, Gritsaenko EV, Shcherbakov ME et al. Vascular endothelial growth factor and plasminogen activators in endometrial carcinoma and hyperplasia. *Vopr Onkol.* 2003;49(6): 725-9.
202. Ouyang C, Frimer M, Hou L, et al. Malignant Endometrial Polyps in Uterine Serous Carcinoma: The Prognostic Value of Polyp Size and Lymphovascular Invasion *Int J Gynecol Cancer.* 2018 Mar;28(3): 524-528.

203. Lasmar B, Lasmar P. Endometrial polyp size and polyp hyperplasia. *Int J Gynaecol Obstet.* 2013 Dec;123(3): 236-9.
204. Torry DS, Holt VJ, Keenan JA, et al. Vascular endothelial growth factor expression in cycling human endometrium. *Fertil Steril.* 1996 Jul;66(1):72-80
205. Hornung D, Lebovic D I, Shifren J L, et al. Vectorial secretion of vascular endothelial growth factor by polarized human endometrial epithelial cells. *Fertil Steril.* 1998 May;69(5): 909-15.
206. Tsung-Hsuan L, Vlahos N, et al. Expression Patterns of VEGF and Flk-1 in Human Endometrium during the Menstrual Cycle *J Reprod Infertil.* Jan-Mar 2015;16(1): 3-9.
207. Xiao Y, Peng X, et al. The expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in the endometrium during the peri-implantation period in women with and without polyps. *Hum Fertil.* 2014 Mar;17(1):67-71.
208. Chen Y, Fang R, Expression of vascular endothelial growth factor and insulin-like growth factor-1 in endometria polyps and their clinical significance. *Int J Clin Exp Med.* 2016;9(12): 23591-23597.
209. Hannan NJ, Paiva P, Meehan K L, et al. Analysis of fertility-related soluble mediators in human uterine fluid identifies VEGF as a key regulator of embryo implantation *Endocrinology.* 2011 Dec;152(12): 4948-56.
210. Boomsma CM, Kavelaars A, Eijkemans MJ, et al Endometrial secretion analysis identifies a cytokine profile predictive of pregnancy in IVF. *Hum Reprod.* 2009 Jun;24(6): 1427-35.