

Stężenie glikodeliny A w surowicy krwi i popłuczynach z jamy macicy u kobiet z hiperandrogenemią diagnozowanych z powodu niepłodności małżeńskiej

Glycodelin A concentration in blood serum and uterine cavity flushings in women with hyperandrogenemia diagnoses due to marital infertility

© GinPolMedProject 3 (21) 2011

Artykuł oryginalny/Original article

WOJCIECH SZANECKI, PIOTR SKAŁABA

Klinika Endokrynologii Ginekologicznej Katedry Ginekologii i Położnictwa Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach,
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Piotr Skałba

Adres do korespondencji/Address for correspondence:

Klinika Endokrynologii Ginekologicznej Katedry Ginekologii i Położnictwa Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
ul. Medyków 14, 40-752 Katowice,
tel. +48 32 789 43 51, email: szaneckiwojciech@yahoo.co.uk

Statystyka/Statistic

Liczba słów/Word count	1898/2292
Tabele/Tables	4
Ryciny/Figures	1
Piśmiennictwo/References	19

Received: 13.01.2011

Accepted: 15.04.2011

Published: 14.09.2011

Praca statutowa – Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Streszczenie

Wstęp. Glikodelina A (GdA) jest glikoproteiną szeroko rozpowszechnioną w świecie zwierząt, roślin i bakterii. Trzon białkowy zbudowany jest z 180 aminokwasów, glikozylacja niektórych aminokwasów zapewnia GdA unikatowe właściwości biologiczne. U kobiet najważniejszym źródłem GdA jest endometrium. GdA posiada właściwości immunosupresyjne i jest uznanym markerem receptywności endometrium. Badanie receptywności endometrium należy do schematu diagnostycznego w niepłodności.

Cel pracy. Ocena przydatności GdA jako markera receptywności endometrium na podstawie analizy zmian stężeń GdA w surowicy krwi i popłuczynach z jamy macicy u kobiet z hiperandrogenemią diagnozowanych z powodu niepłodności. *Material i metody.* Do badań włączono 69 kobiet diagnozowanych z powodu niepłodności małżeńskiej, które podzielono na 3 grupy. Kryterium podziału stanowiła aktywność jajników wg zmodyfikowanej skali Hooglanda. Grupę badaną stanowiły pacjentki z hiperandrogenemią a grupy porównawcze stanowiły grupa owulacyjna („o”) i grupa z niewydolnością ciała żółtego („ncz”).

Wyniki. Najmniejsze stężenia GdA we krwi oraz w popłuczynach z jamy macicy w fazie przedmiesiączkowej odnotowano u pacjentek z hiperandrogenemią. Średnie stężenie GdA we krwi w fazie przedmiesiączkowej oraz średnie stężenie GdA w popłuczynach z jamy macicy dodatkowo korelowały ze średnim stężeniem 17-β-estradolu w okresie okołowoulacyjnym, oraz progesteronem w fazie przedmiesiączkowej, a ujemnie ze średnim stężeniem całkowitego testosteronu we krwi.

Wnioski. Wyniki dowodzą, że aktywność jajników zasadniczo wpływa na wydzielanie GdA i tym samym na receptywność endometrium. Hiperandrogenemia i insulinooporność tkankowa wpływają wieloczynnikowo na wydzielanie GdA i zmniejszają receptywność endometrium.

Słowa kluczowe: niepłodność żeńska, błona śluzowa macicy, markery biologiczne, białko genu PAEP, glikodelina A.

Summary

Introduction. Glycodelin A (GdA) is a glycoprotein widely spread in the world of animals, plants and bacteria. Protein backbone is made of 180 amino acids, and a glycosylation of some amino acids ensures GdA unique biological properties. In case of women, the main source of GdA

is an endometrium and a decidua. GdA has contraceptive and immunosuppressive properties, and is the recognized marker of endometrial receptivity. Screening of endometrial receptivity is included in the diagnostic procedure of infertility.

Aim. The aim of this study is the evaluation of GdA usefulness as an endometrial receptivity marker, on the basis of the analysis of GdA concentration changes in a serum and endometrial flushings, in case of women diagnosed in accordance with an infertility.

Material and methods. It was assumed that the research should include all patients diagnosed because of the marital infertility, defined as the ineffectiveness of regular maternal efforts within the period of one year without using any contraception methods, independently from the very first diagnosed cause. It was planned to conduct a multiple determination of GdA in a serum during a menstruation period and a single one in endometrial flushings in the middle of a premenstrual phase. It was agreed that due to research protocol, including invasive elements, healthy women will not take part in the research. It was also agreed that received results of GdA determination will be referred to the activity of ovaries, determined on the basis of modified Hoogland's scale. 69 patients with diagnosed infertility took part in the research, they were divided in 3 groups according to a hormonal ovarian activity based on the modified Hoogland's scale: ovulatory ("o"), corpus luteum insufficiency ("ncz"), hyperandrogenemia ("ha").

Results. The lowest concentrations of GdA in serum and endometrial flushings were noted in case of hyperandrogenemic patients ("ha"). Average GdA concentrations in serum in a premenstrual phase and average GdA concentration in endometrial flushings positively correlated with an average 17- β -estradiol concentration in a periovulatory phase and a progesterone concentration in a premenstrual phase, and a negative correlation with an average concentration of a total testosterone in blood. Concentration of GdA in endometrial flushings was referred to the concentration of a total protein and was presented as the GdA/TP coefficient. Its value greater than 0,0625 gives the sensitivity of 53%, whereas the value greater than 0,03125 gives the specificity of 87,5%. Effectiveness of the test for both values of coefficients amounts to 60,87%. For GdA concentrations in blood on the third day of a cycle and in a premenstrual phase, the effectiveness of the test respectively amounts to 58,62% and 57,31%.

Conclusions. Determination of GdA in serum and endometrial flushings is a good marker of endometrial receptivity in case of women examined because of their infertility. Evaluation of the concentrations of GdA in endometrial flushings has a better diagnostic effectiveness of the test than a measurement in blood. The activity of ovaries significantly influences the secretion of GdA, and ipso facto, an endometrial receptivity. Hyperandrogenemia and insulin resistance influence a GdA secretion in multifactor manner and reduce endometrial receptivity.

Key words:- infertility, endometrium, biological markers, PAEP protein, glycodelin A.

WSTĘP

Glikodelina (GdA) jest białkiem należącym do nadrodziny lipokalin, białek powszechnie występujących w świecie zwierząt, roślin i bakterii [1]. Nazwa glikodeliny A została określona przez grupę badaczy z Helsinek pod przewodnictwem Seppali w 2002 roku [2,3]. W żeńskim układzie rozrodczym źródłem GdA są głównie endometrium i doczesna. Masa cząsteczkowa glikodeliny A wynosi 28kDa, choć w przyrodzie występuje w postaci homodimerów i wówczas ich masa wynosi około 50-60kDa [4]. Rozpoznano również gen dla GdA (PAEP), który znajduje się na długim ramieniu chromosomu 9 (9q34) [5].

Na produkcję GdA w endometrium ma wpływ aktywność wewnątrzwydzielnicza jajników. Istnieją niepodważalne dowody, że głównym stymulatorem produkcji i wydzielania GdA jest progesteron.

Rosnące stężenie GdA w fazie lutealnej związane jest z przygotowaniem się endometrium do przyjęcia zapłodnionej komórki jajowej. GdA wytwarza w endometrium sprzyjające środowisko do implantacji. Dzieje się to poprzez jej właściwości immunosupresyjne.

INTRODUCTION

Glycodelin (GdA) is a protein belonging to the superfamily of lipocalins, proteins widely occurring in the world of animals, plants, and bacteria [1]. The name of glycodelin A was given in 2002 [2,3] by a group of scientists from Helsinki headed by Seppala. In the female reproductive system the main sources of GdA are endometrium and decidua. The molecular mass of glycodelin A is 28 kDa, but it occurs in nature in the form of homodimers with molecular mass of ca. 50-60 kDa [4]. A gene for GdA (PAEP) was also identified on the long arm of chromosome 9 (9q34) [5].

GdA production in endometrium depends mostly on the endocrine activity of the ovaries. There are indubitable proofs that the principal stimulator of GdA production and secretion is progesterone.

The increasing GdA concentration in the luteal phase is associated with the endometrium preparation for accepting a fertilized egg cell. GdA, thanks to its immunosuppressive properties, produces a favourable environment for implantation in endometrium.

Hiperandrogenemia jest czynnikiem zmieniającym lokalne środowisko w macicy, co może potwierdzać zjawisko zwiększonej częstości poronień u kobiet z zespołem policystycznych jajników (PCOS) [6]. Zaburzenia metaboliczne i hormonalne współistniejące w PCOS odpowiedzialne są za nieprawidłową implantację i występowanie poronień i niepłodności pierwotnej.

CEL PRACY

Celem pracy jest ocena przydatności GdA, jako markera receptywności endometrium na podstawie analizy zmian stężeń GdA w surowicy krwi i popłuczynach z jamy macicy u kobiet z hiperandrogenemią diagnozowanych z powodu niepłodności.

MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono w okresie od 1 maja 2006 roku do 30 października 2008 roku. W tym czasie w oddziale hospitalizowano 86 pacjentek z niepłodnością.

Trzy pacjentki nie wyraziły zgody na badania, natomiast 2 pacjentki nie spełniały kryterium wieku, u 3 pacjentek obserwowano zespół niepękniętego zlutinizowanego pęcherzyka (LUF-Syndrom), a u 9 pacjentek stwierdzono nieprawidłowy kształt jamy macicy. Te pacjentki zostały wyłączone z badań. Do badań ostatecznie zakwalifikowano 69 pacjentek. U 16 z nich stwierdzono hiperandrogenemię (grupa ha). Grupy porównawcze stanowiło: 30 pacjentek z cyklem owulacyjnym (grupa o) i 23 pacjentek z niewydolnością ciała żółtego (grupa ncz) (tab.1). Pacjentki podzielono na podstawie zmodyfikowanej skali Hoogland'a [8] na 3 grupy: owulacyjną (o), z niewydolnością ciała żółtego (ncz) oraz z hiperandrogenemią (ha).

Kryteria włączenia do badań były następujące: nieskuteczne starania macierzyńskie od 1 roku, wiek od 18-35 lat, prawidłowy kształt macicy (określony na podstawie badania ginekologicznego, USG, HSG, które wykonano przed badanym cyklem), regularne miesiączkowanie (21-35 dni), brak infekcji w drogach rodnych oraz uświadomiona pisemna zgoda pacjentki.

U wszystkich kobiet przeprowadzono badanie ginekologiczne i ultrasonograficzne oraz wykonano pomiary antropometryczne. Obliczono wskaźnik masy ciała BMI, wskaźniki insulinowrażliwości QUICKI, HOMA i glukozy i insuliny (FGIR).

W 3 dniu cyklu oznaczono stężenie we krwi: glukozy, insuliny i SHBG na czczo oraz hormonów: FSH, LH, estradiolu (E2), SHBG, TSH, fT4, wolnego i całkowitego testosteronu, androstendionu, 17-OH-progesteronu, DHEA-S. Stężenie GdA we krwi oznaczono w 3, 13, 14, 15, 20, 21 i 22 dniu cyklu.

W okresie około owulacyjnym w 13, 14, 15 dniu cyklu oznaczano stężenia we krwi FSH, LH, estradiolu. W 20, 21 i 22 dniu cyklu oznaczono stężenie we krwi progesteronu. W 21-22 dniu cyklu wykonano płukanie jamy macicy w celu oznaczenia stężenia GdA i całkowitego białka w popłuczynach.

Hyperandrogenemia is a factor altering the local uterine environment, which may be confirmed by an increased miscarriage rate in women with polycystic ovarian syndrome (PCOS) [6]. Metabolic and hormonal disorders co-existing in PCOS are responsible for abnormal implantation as well as for miscarriages and primary infertility.

AIM OF THE STUDY

The aim of the study was an assessment of GdA suitability as a marker of endometrial receptivity on the basis of an analysis of GdA concentration changes in blood serum and in uterine cavity washings in women with hyperandrogenemia diagnosed due to infertility.

MATERIAL AND METHODS

The study was conducted between 1 May 2006 and 30 October 2008. Within this period, 86 patients were admitted to the hospital department due to infertility.

3 patients did not consent to participate in the study, 2 patients did not meet the age criterion, in 3 patients the luteinized unruptured follicle (LUF) syndrome was diagnosed, and in 9 patients abnormal shape of the uterine cavity was revealed. All those patients were excluded from the study. Eventually, 69 patients were qualified for the study. In 16 of them, hyperandrogenemia was diagnosed (group ha). Reference groups were: 30 patients with ovulatory cycle (group o) and 23 patients with corpus luteum insufficiency (group cli) (Table 1). The patients were classified using the modified Hoogland scale into three groups: ovulatory (o), with corpus luteum insufficiency (cli), and with hyperandrogenemia (ha).

The inclusion criteria were as follows: unsuccessful attempts at conceiving for 1 year, age 18-35, a normal shape of the uterus (determined in a gynaecological examination, USG, HSG, performed before the studied cycle), regular menstruation (21-35 days), absence of infections in the genital tracts, and the patient's conscious written consent.

All the women were subject to gynaecological and ultrasonographic examination and anthropometric measurements. Calculations were made of their body mass index (BMI) as well as QUICKI insulin sensitivity index, HOMA index, and fasting glucose/insulin ratio (FGIR).

On the third day of the cycle, assays were performed of blood concentration of: fasting glucose, insulin and SHBG, and of the hormones: FSH, LH, estradiol (E2), SHBG, TSH, fT4, free and total testosterone, androstenedione, 17-OH-progesterone, DHEA-S. The GdA concentration in blood was determined on day 3, 13, 14, 15, 20, 21, and 22 of the cycle.

In the periovulatory phase on day 13, 14, 15 of the cycle, blood concentration of FSH, LH, and estradiol was determined. On day 20, 21, and 22 of the cycle, progesterone concentration in blood was determined. On day 21 -22 of the cycle, uterine cavity lavage was performed in order to determine the concentration of GdA and total proteins in the washings.

Krew do badań hormonalnych pobierano z żyły odłokciowej w ilości 3 ml w danym dniu obserwacji, następnie wirowano, a uzyskaną surowicę dzielono na kilka części i zamrażano do temperatury -60°C do momentu wykonania oznaczeń.

Popłuczyny z jamy macicy pobierano przez jednorazowy sterylny cewnik inseminacyjny (Balton, Warszawa, Polska). Do macicy podawano 2ml jałowego roztworu soli fizjologicznej i następnie taką samą ilość płynu odciągano. Czynność powtarzano 5 razy. Popłuczyny wirowano i natychmiast zamrażano do temperatury -60°C i w tym stanie przechowywano je do momentu wykonania oznaczeń. Oznaczenia GdA i całkowitego białka wykonano po rozmrożeniu płynu macicznego nie później niż 30 dni od momentu pobrania.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach - (NN- 6501-32/06).

Oznaczenie GdA wykonano metodą ELISA przy użyciu zestawów firmy DRG, USA. Stężenie białka całkowitego w popłuczynach wykonano ilościową metodą z użyciem kwasu bis-cynchoninowego (BCA) zestawem firmy Sigma-Aldrich, USA.

Metodą IRMA i zestawami firmy Immunotech (Finlandia) wykonano oznaczenia FSH, LH, SHBG, PRL, insuliny, metodą RIA i zestawami firmy Immunotech wykonano oznaczenia estradiolu, testosteronu całkowitego, DHEA-S, 17-OH-progesteronu, kortyzolu, natomiast zestawami firmy DSL (Niemcy): testosteronu wolnego i androstendionu.

Uzyskane wyniki zostały statystycznie opracowane przy użyciu programu StatSoft, Inc (2008) STATISTICA wersja 7. Dla stwierdzenia rozkładu normalnego zmiennych zastosowano test Shapiro-Wilka. Stwierdzono, że zmienne nie posiadają rozkładu normalnego i dla porównań zastosowano nieparametryczne testy statystyczne. Dla oceny różnic pomiędzy grupami użyto test Kruskala-Wallisa, z następową analizą zmiennych *post-hoc*. Przyjęto poziom istotności $\leq 0,05$. Badania korelacyjne oparto na teście Spearmana.

WYNIKI

Badane grupy nie różniły się pomiędzy sobą wiekiem, czasem trwania starań macierzyńskich i wiekiem pierwszej miesiączki. Pomiar antropometryczne nie wykazały różnic pomiędzy grupami.

W grupie z hiperandrogenią (grupa h obliczone wskaźniki insulinowrażliwości (HOMA i QUICKI) odbiegały od przyjętych norm (tab.1).

W trzecim dniu cyklu nie wykazano istotnych różnic w średnich stężeniach we krwi androstendionu, DHEAS, 17-OH-progesteronu, TSH, fT4 oraz profilu kortyzolu. Średnia stężenie PRL rano była istotnie wyższa w grupie „ncz” w porównaniu do grupy „ha”, lecz mieściła się w zakresie normy.

Najwyższe średnie stężenia we krwi wolnego i całkowitego testosteronu obserwowano w 3 i 21 dniu cyklu w grupie „ha”. W tych samych dniach w grupie

Blood samples for hormone assays were collected from the basilic vein in the volume of 3 ml on the day of observation, then they were rotated and the obtained blood serum was divided into several portions and frozen to -60°C until the assay was performed.

The uterine cavity washings were collected through a disposable sterile insemination catheter (Balton, Warsaw, Poland). 2 ml of sterile physiological saline solution was supplied into the uterus and the same volume of liquid was collected back. The procedure was repeated 5 times. The washings were rotated and immediately frozen to -60°C to be stored until the assays were performed. The GdA and total protein determination was performed after the uterine fluid had been defrozen, not later than 30 days from the day of collecting.

The study was approved by the Bioethical Commission of the Silesian Medical University in Katowice - (NN-6501-32/06).

GdA was determined with the ELISA method, with sets manufactured by DRG, U.S.A. The determination of total protein in uterine washings was performed with the quantitative method with bicynchoninic acid (BCA), sets manufactured by Sigma-Aldrich, U.S.A.

The determinations of FSH, LH, SHBG, PRL, insulin were performed with the IRMA method and sets manufactured by Immunotech (Finland), the determinations of estradiol, total testosterone, DHEA-S, 17-OH-progesterone, cortisol - with sets manufactured by Immunotech (Finland), and the determinations of free testosterone and androstenedione - with sets manufactured by DSL (Germany).

The results were evaluated statistically with STATISTICA, version 7, StatSoft, Inc. (2008). For studying the normal distribution of the variables the Shapiro-Wilk test was used. The variables were found not to have normal distribution, so non-parametric statistical tests were used for the comparisons. For an assessment of differences between the groups, the Kruskal-Wallis test was used with a consecutive *post-hoc* analysis of variables. The significance level adopted was $\leq 0,05$. Correlation study was based on the Spearman test.

RESULTS

The study groups did not differ from one another with respect to age, duration of attempts at conceiving, or the age of the first menstruation. Anthropometric measurements did not reveal differences between the groups.

In the hyperandrogenemia group (group ha) the calculated indexes of insulin sensitivity (HOMA and QUICKI) deviated from the adopted norms (Table 1).

On the third day of the cycle no significant differences were discovered in the average blood concentration of androstenedione, DHEA-S, 17-OH-progesterone, TSH, fT4 and in the cortisol profile. The average morning PRL concentration was significantly higher in the „cli” group than in the „ha” group but it remained within the norm.

The highest average concentrations of free and total testosterone were observed on day 3 and 21 of the cycle

„ha” występowały najniższe średnie stężenia we krwi SHBG. W związku z tym średnie wartości wskaźnika wolnych androgenów (FAI) w tych dniach były najwyższe w grupie „ha” przekraczając normę (tab.2).

Stężenie GdA we krwi u kobiet z hiperandrogenemią nie zmieniało się istotnie podczas cyklu miesięczkowego i różniło się istotnie w stosunku do wartości odnotowanych w 3 dniu cyklu i w fazie przedmiesiączkowej w grupach porównawczych (tab. 3., ryc.1.).

Średnie stężenie GdA w popłuczynach z jamy macicy u pacjentek z hiperandrogenemią było istotnie niższe niż w grupach porównawczych (tab.4).

W badaniach korelacyjnych stwierdzono w grupie z hiperandrogenemią („ha”) ujemną korelację pomiędzy współczynnikiem HOMA a GdA we krwi w okresie przedmiesiączkowym przy braku podobnej korelacji w grupach porównawczych ($R=-0,70$, $p=0,04$).

Przy analizie całej populacji badanej stwierdzono ujemną korelację średniego stężenia testosteronu całkowitego we krwi do średniego stężenia GdA we krwi w 3 dniu cyklu ($R=-0,28$, $p=0,04$) i w okresie przedmiesiączkowym ($R=-0,34$, $p=0,04$). Ujemną korelację zanotowano również dla średnich współczynników FAI i GdA/TP ($R=-0,26$; $p=0,03$).

Dodatnie korelacje stwierdzono dla średniego stężenia estradiolu (c/k-E2-max) we krwi w okresie okołouwulacyjnym i średniego stężenia GdA we krwi w okresie około owulacyjnym ($R=0,26$, $p=0,04$) i przedmiesiączkowym ($R=0,39$, $p=0,04$) oraz dla średniego współczynnika GdA/TP w popłuczynach z jamy macicy ($R=0,32$, $p=0,04$). Średnie stężenie progesteronu (c/k-prog-max) we krwi w okresie przedmiesiączkowym dodatnio korelowało ze średnim stężeniem GdA we

in the „ha” group. On the same days, the „ha” group displayed the lowest average blood concentrations of SHBG. Therefore, the average values of the free androgen index (FAI) on those days were highest in the „ha” group and exceeded the norm (Table 2).

GdA blood concentration in women with hyperandrogenemia did not display significant changes during the menstrual cycle and differed significantly from the values recorded on the third day of the cycle and in the premenstrual phase in the reference groups (Table 3, Fig.1).

The average GdA concentration in uterine cavity washings was significantly lower in patients with hyperandrogenemia than in the reference groups (Table 4).

In correlative studies, a negative correlation was found in the hyperandrogenemia (ha) group between the HOMA index and GdA in blood in the premenstrual phase, with a similar correlation being absent in the reference groups ($R=0.70$, $p=0.04$).

An analysis of the whole study population revealed a negative correlation of the average blood concentration of total testosterone to the average blood concentration of GdA on the third day of the cycle ($R=0.28$, $p=0.04$) and in the premenstrual phase ($R=0.34$, $p=0.04$). A negative correlation was also discovered for the average FAI and GdA/TP indexes ($R=0.26$, $p=0.03$).

Positive correlations were found for the average blood concentration of estradiol (c/k-E2-max) in the periovulatory phase and the average blood concentration of GdA in the periovulatory ($R=0.26$, $p=0.04$) and premenstrual phase ($R=0.39$, $p=0.04$), and for the average GdA/TP index in the uterine cavity washings ($R=0.32$, $p=0.04$). The average blood concentration of progesterone (c/k-prog-max) in the premenstrual phase

Tab. 1. Parametry metaboliczne badanych pacjentek

	Norma	Grupa badana	Grupy porównawcze	
		Grupa ha (X±SD)	Grupa o (X±SD)	Grupa ncz (X±SD)
Wskaźnik glukoza/insulina	>4,5	12±5,3	16,2±12,6	18,2±11,7
Wskaźnik HOMA	<1,5	2,1±1,45	1,4±0,6	1,42±0,93
Wskaźnik Quicki	>0,357	0,353±0,03	0,369±0,03	0,376±0,04

X – średnia arytmetyczna; SD – odchylenie standardowe; ha – grupa z hiperandrogenemią; o – grupa owulacyjna; ncz – grupa z niewydolnością ciała żółtego

Tab. 1. The patient's metabolic parameters

	Norm	Test group	Reference groups	
		ha group (X±SD)	o group (X±SD)	cli group (X±SD)
Glucose/insulin index	>4,5	12±5,3	16,2±12,6	18,2±11,7
HOMA index	<1,5	2,1±1,45	1,4±0,6	1,42±0,93
QUICKI index	>0,357	0,353±0,03	0,369±0,03	0,376±0,04

X – arithmetic mean; SD – standard deviation; ha – group with hyperandrogenemia; o – ovulating group; cli – group with corpus luteum insufficiency

krwi w okresie przedmiesiączkowym ($R=0,39$, $p=0,04$) oraz średnim współczynnikiem GdA/TP w popłuczynach z jamy macicy ($R=0,45$; $p=0,04$). Podobne dodatnie korelacje stwierdzono pomiędzy średnim stężeniem GdA (c/k-GdA-max) we krwi w okresie przedmiesiączkowym a średnim współczynnikiem GdA/TP w popłuczynach z jamy macicy ($R=0,33$; $p=0,02$).

DYSKUSJA

Diagnostyka zaburzeń owulacji oraz receptywności endometrium są ważne dla postępowania lekarskiego w przypadkach niepłodności małżeńskiej. W badaniach własnych zaobserwowano typowe zmiany stężeń GdA we krwi, wysokie stężenie GdA we krwi w 3 dniu cyklu

was positively correlated with the average blood concentration of GdA in the premenstrual phase ($R=0.39$, $p=0.04$) and with the average GdA/TP index in uterine cavity washings ($R=0.45$, $p=0.04$). Similar positive correlations were discovered between the average blood concentration of GdA (c/k-GdA-max) in the premenstrual phase and the average GdA/TP index in uterine cavity washings ($R=0.33$, $p=0.02$).

DISCUSSION

Diagnosing ovulation disorders and endometrial receptivity is important for medical procedures in case of marital infertility. The authors' own studies revealed typical changes of GdA concentration in blood, a high

Tab. 2. Średnie stężeń we krwi całkowitego i wolnego testosteronu, SHBG oraz średnie wartości współczynnika FAI w przebiegu cyklu miesięczkowego u badanych pacjentek

		Grupa badana	Grupy porównawcze	
		Grupa ha (X±SD)	Grupa o (X±SD)	Grupa ncz (X±SD)
3 dzień cyklu	Testosteron całkowity (nmol/l)	2,8±1,6	2,2±0,9	1,6±0,6
		p=NS		
		p=0,007		p=0,007
	SHBG (nmol/l)	35,7±23,8	56,2±17,5	60,1±23,4
		p=0,04		
		p=0,01		p=0,01
	FAI	10,7±9,5	4,4±3,1	3,8±4,2
		p=0,01		
		p=0,004		p=0,004
	Testosteron wolny (pg/ml)	3,5±2,2	2,5±1,8	2,7±1,9
		p=0,003		
		p=0,005		p=0,005
21 dzień cyklu	Testosteron całkowity (nmol/l)	3,6±2,3	2,3±1,7	1,8±1,9
		p=0,04		
		p=0,006		p=0,006
	SHBG (nmol/l)	73±66,9	94,8±77,6	101,1±77,9
		p=NS		
	FAI	11,8±17,1	4,3±2,9	4,4±3,2
		p=0,03		
		p=0,004		p=0,004

X – średnia arytmetyczna; SD – odchylenie standardowe; o – grupa owulacyjna; ncz – grupa z niewydolnością ciała żółtego; ha – grupa z hiperandrogenią; *post-hoc*, p=NS- brak znaczącości statystycznej

i najniższe stężenie w okresie okołouwulacyjnym. W fazie przedmiesiączkowej stężenia GdA we krwi znacznie wzrastały w grupach porównawczych, natomiast u pacjentek z hiperandrogenią były niskie. Wysokie stężenia GdA na początku cyklu można wytłumaczyć jej długim okresem półtrwania oraz obecnością GdA w warstwach komórek przyodstawnych, nie złuszczających się przy miesiączce [9]. W okresie okołouwulacyjnym stężenie GdA we krwi było istotnie niższe w grupach porównawczych. Zwiększone wydzielanie GdA w okresie okołouwulacyjnym wiąże się z niepowodzeniami zapłodnienia, co zostało wykazane w badaniach Lindharda i wsp. [10].

GdA concentration in blood on the third day of the cycle and its lowest concentration in the periovulatory phase. In the premenstrual phase, the GdA concentrations in blood increased substantially in the reference groups but they were low in patients with hyperandrogenemia. High GdA concentrations at the beginning of the cycle may be explained by its long half-life period and the presence of GdA in the layers of parabasal cells, not exfoliating during menstruation [9]. In the periovulatory phase, the GdA concentration in blood was significantly lower in the reference groups. Increased secretion of GdA in the periovulatory phase is associated with fertilization disorders, which was demonstrated in the studies conducted by Lindhard et al. [10]

Tab. 2. The average blood concentration of total and free testosterone, SHBG, and the average value of FAI index in the course of a menstrual cycle in the study patients

		Test group	Reference groups	
		ha group (X±SD)	o group (X±SD)	cli group (X±SD)
3rd day of the cycle	Total testosterone (nmol/l)	2,8±1,6	2,2±0,9	1,6±0,6
		p=NS		
		p=0,007		p=0,007
				p=NS
	SHBG (nmol/l)	35,7±23,8	56,2±17,5	60,1±23,4
		p=0,04		
		p=0,01		p=0,01
				p=NS
	FAI	10,7±9,5	4,4±3,1	3,8±4,2
		p=0,01		
		p=0,004		p=0,004
				p=NS
Free testosterone (pg/ml)	3,5±2,2	2,5±1,8	2,7±1,9	
	p=0,003			
	p=0,005		p=0,005	
			p=NS	
21st day of the cycle	Total testosterone (nmol/l)	3,6±2,3	2,3±1,7	1,8±1,9
		p=0,04		
		p=0,006		p=0,006
				p=NS
	SHBG (nmol/l)	73±66,9	94,8±77,6	101,1±77,9
		p=NS		
	FAI	11,8±17,1	4,3±2,9	4,4±3,2
		p=0,03		
		p=0,004		p=0,004
				p=NS

X – arithmetic mean; SD – standard deviation; o – ovulating group; cli – group with corpus luteum insufficiency; ha – group with hyperandrogenemia; statistical significance – a *post-hoc* test; p=NS – statistically non-significant

W grupach porównawczych wykazano istotną różnicę stężeń GdA pomiędzy krwią a popłuczynami jamy macicy w okresie przedmiesiączkowym, co dowodzi, że głównym źródłem GdA w trakcie cyklu miesiączkowego jest endometrium. W badaniach własnych GdA w popłuczynach koreluje ze stężeniem GdA we krwi; badania innych autorów prezentują rozbieżne wyniki na ten temat [9,11].

W badaniach Li i wsp. [12] wykazano zależność stężenia 17-β-estradolu we krwi w fazie proliferacyjnej do stężenia GdA we krwi w fazie przedmiesiączkowej, a w badaniach Waites i wsp. [13] zależność 17-β-estradolu we krwi w fazie pomiesiączkowej do ekspresji GdA w samym endometrium. W badaniach wła-

In the reference groups, a significant difference of GdA concentrations was discovered between blood and uterine cavity washings in the premenstrual phase, which proves that the main GdA source in the menstrual cycle is endometrium. In the authors' own study, GdA in the washings correlated with GdA concentration in blood; other authors' studies present divergent results on this subject [9,11].

Li et al. [12] demonstrated the dependence between the blood concentration of 17-β-estradiol in the proliferative phase and the blood concentration of GdA in the premenstrual phase, and Waites et al. [13] described the dependence of blood concentration of 17-β-estradiol in the postmenstrual phase to GdA expression

Tab. 3. Średnie stężenie glikodeliny (c/k-GdA) we krwi u kobiet w przebiegu cyklu miesiączkowego w ng/ml

Grupy Faza cyklu	Grupa badana	Grupy porównawcze		Znamiennosc statystyczna
	Grupa ha (X±SD)	Grupa o (X±SD)	Grupa ncz (X±SD)	
3 dzień cyklu	10,9±7,7	18,1±21,4	16±13,8	p=NS
13 dzień cyklu	5,6±11,5	7,5±13,2	3,9±2,2	p=NS
14 dzień cyklu	2,9±1,9	5±4,9	3,4±2,5	p=NS
15 dzień cyklu	2,5±1,8	4,5±3,4	3,1±1,9	p=NS
faza okołoolowulacyjna c/k-GdA-max	5,9±11,4	8±13	4,3±2,5	p=NS
20 dzień cyklu	1,9±1,6	4,9±5,3	5,7±5,8	p=0,0051*
21 dzień cyklu	3,4±4,7	7,6±13,2	8,7±10,9	p=0,023*
22 dzień cyklu	2,8±3,3	17,7±38,9	12,8±12,8	p=0,0002*
faza przedmiesiączkowa c/k-GdA-max	4,4±5	18±38,7	13,8±14,6	p=0,009*

X – średnia arytmetyczna; SD – odchylenie standardowe; Grupa o – grupa owulacyjna; Grupa ncz – grupa z niewydolnością ciała żółtego; Grupa ha – grupa z hiperandrogenemią; Znamiennosc statystyczna – test Kruskala-Wallisa; p=NS – brak znamiennosci statystycznej; * w teście *post hoc* brak istotności statystycznej pomiędzy badanymi grupami; c/k-GdA – średnie stężenie GdA we krwi; c/k-GdA-max – średnia maksymalnych stężeń GdA we krwi wybranych z oznaczeń w 3 dniach fazy okołoolowulacyjnej i przedmiesiączkowej

Tab. 3. The average glycodeilin concentration (c/k-GdA) in blood in the course of a menstrual cycle, in ng/ml

Groups Cycle phase	Test group	Reference groups		Statistical significance
	ha group (X±SD)	o group (X±SD)	cli group (X±SD)	
3 day	10,9±7,7	18,1±21,4	16±13,8	p=NS
13 day	5,6±11,5	7,5±13,2	3,9±2,2	p=NS
14 day	2,9±1,9	5±4,9	3,4±2,5	p=NS
15 day	2,5±1,8	4,5±3,4	3,1±1,9	p=NS
perioovulatory phase c/k-GdA-max	5,9±11,4	8±13	4,3±2,5	p=NS
20 day	1,9±1,6	4,9±5,3	5,7±5,8	p=0,0051*
21 day	3,4±4,7	7,6±13,2	8,7±10,9	p=0,023*
22 day	2,8±3,3	17,7±38,9	12,8±12,8	p=0,0002*
premenstrual phase c/k-GdA-max	4,4±5	18±38,7	13,8±14,6	p=0,009*

X – arithmetic mean; SD – standard deviation; o group – ovulating group; cli group – group with corpus luteum insufficiency; ha group – group with hyperandrogenemia; statistical significance – Kruskal-Wallis test; p=NS – statistically non-significant; * in the *post hoc* test lack of statistical significance between the study groups; c/k-GdA – the average GdA concentration in blood; c/k-GdA-max – the average of maximum GdA concentrations in blood selected from the determinations performed on 3 days of the perioovulatory and premenstrual phase

snych wykazano dodatnią korelację pomiędzy średnim stężeniem estradiolu we krwi w okresie okołouwulacyjnym a średnią wartością współczynnika GdA/TP w popłuczynach z jamy macicy badanych w fazie przedmiesiączkowej. Podobną dodatnią korelację stwierdzono w stosunku do średniego stężenia GdA we krwi w okresie przedmiesiączkowym a średnim stężeniem 17-β-estradiolu we krwi w okresie okołouwulacyjnym. Powyższe dane są zbieżne z rezultatami prac Li i Waites'a [12,13] i w tym aspekcie potwierdzają wpływ estrogenów na wydzielanie GdA.

in the endometrium itself. The authors' own studies revealed a positive correlation between the average estradiol concentration in blood in the periovulatory period and the average value of GdA/TP index in uterine cavity washings examined in the premenstrual phase. Similarly, a positive correlation was found with respect to the average GdA concentration in blood in the premenstrual phase and the average concentration of 17-β-estradiol in blood in the periovulatory phase. The above data are in accordance with the results obtained by Li and Waites [12,13], and in this respect confirm the effect of estrogens on GdA secretion.

Tab. 4. Średnie stężenia GdA i całkowitego białka w popłuczynach z jamy macicy

	Grupa ha (X±SD)	Grupa o (X±SD)	Grupa ncz (X±SD)	Istotność różnic
Białko całkowite TP (μg/ml)	278,7±183,1	309±256,8	201,7±163,2	p=NS
GdA (ng/ml)	10,5±16,8	106,9±165,8	47,2±70,5	p=0,0032
GdA/TP (ng/μg)	0,078±0,2	0,571±1,27	0,308±0,33	p=0,0001

X – średnia arytmetyczna; SD – odchylenie standardowe; o – grupa owulacyjna; ncz – grupa z niewydolnością ciała żółtego; ha – grupa z hiperandrogenemią; GdA/TP – stosunek stężeń GdA i całkowitego białka w popłuczynach z jamy macicy

Tab. 4. The average concentrations of GdA and total protein in uterine cavity washings

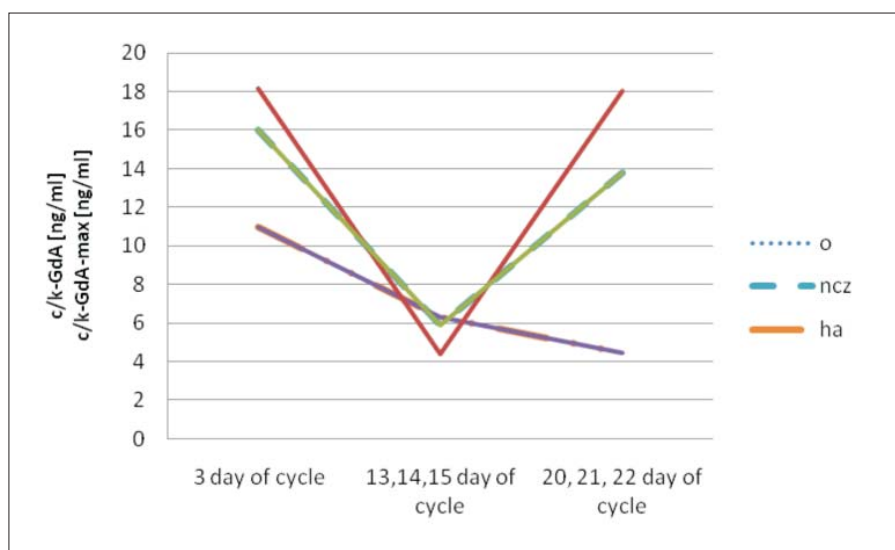
	ha group (X±SD)	o group (X±SD)	cli group (X±SD)	Significance of the differences
Total protein TP (μg/ml)	278,7±183,1	309±256,8	201,7±163,2	p=NS
GdA (ng/ml)	10,5±16,8	106,9±165,8	47,2±70,5	p=0,0032
GdA/TP (ng/μg)	0,078±0,2	0,571±1,27	0,308±0,33	p=0,0001

X – arithmetic mean; SD – standard deviation; o – ovulating group; cli – group with corpus luteum insufficiency; ha – group with hyperandrogenemia; GdA/TP – the proportion of GdA concentration and total protein concentration in uterine cavity washings

Ryc. 1. Zmiany średnich stężeń GdA we krwi (c/k-gda i c/k-gda-max) w ng/ml w przebiegu cyklu miesięczkowego u badanych kobiet: o – grupa owulacyjna; ncz – grupa z niewydolnością ciała żółtego; ha – grupa z hiperandrogenemią; c/k-GdA – średnie stężenie GdA we krwi; c/k-GdA-max – średnia maksymalnych stężeń GdA we krwi wybranych z oznaczeń w 3 dniach fazy okołouwulacyjnej i przedmiesiączkowej

Fig. 1. Changes of the average GdA concentration in blood (c/k-GdA and c/k-GdA-max) in ng/ml in the course of a menstrual cycle in the study patients; o group – ovulating group; cli group – group with corpus luteum insufficiency; ha

group – group with hyperandrogenemia; c/k-GdA – the average GdA concentration in blood; c/k-GdA-max – the average of maximum GdA concentrations in blood selected from the determinations performed on 3 days of the periovulatory and premenstrual phase.



Wpływ progesteronu na wydzielanie GdA ma charakter genomowy. Działa on poprzez regiony PRE/GRE w promotorze genu *PAEP* [14]. Wpływ na produkcję GdA mają również szlaki progesteronowo-niezależne, tzw. czynniki transkrypcyjne- HDAC's (*Histone acetyltransferases and histone deacetylases*), których zahamowanie indukuje ekspresję genów m.in. dla GdA i tym samym wywołując zahamowanie wzrostu komórkowego, różnicowania, czy inicjację apoptozy [15]. Wykazano, że istniejący region w genie GdA dla czynnika hamującego HDAC's tzw. TSA, jest niezależny od wpływu progesteronu na syntezę GdA. Możemy więc mówić o podwójnej drodze aktywacji GdA: progesteronowej i pozaprosteronowej. W badaniach własnych wykazano, że średnie stężenie progesteronu we krwi dodatnio koreluje zarówno ze średnim stężeniem GdA we krwi w okresie przedmiesiączkowym, jak i ze średnią wartością współczynnika GdA/TP w popłuczynach z jamy macicy. Wyniki obecnych badań są zbieżne z wynikami uzyskanymi przez innych autorów i potwierdzają związek wpływu progesteronu na wydzielanie GdA [9,16].

W grupie z hiperandrogenią („ha”) zaburzenia hormonalne dotyczyły wydzielania zarówno 17- β -estradiolu, jak i progesteronu. Dodatkowo w tej grupie występowały nieprawidłowe średnie wskaźniki: HOMA i QUICKI. Insulinooporność tkankowa wpływa na wydzielanie GdA u kobiet z zespołem policystycznych jajników [17]. Terapia metforminą u tych kobiet oprócz innych korzystnych efektów, jak redukcja insulinooporności tkankowej, wywołanie owulacji, obniżenie stężenia androgenów, zwiększa również stężenie GdA we krwi [7]. Zjawisko zmniejszonej produkcji GdA zaobserwowano również u ciężarnych kobiet z PCOS [18]. Wiąże się to bezpośrednio ze złymi wynikami położniczymi. U kobiet z PCOS występuje zwiększona częstość poronień samoistnych [19]. W badaniach własnych jednoznacznie wykazano, że stężenia GdA we krwi w okresie przedmiesiączkowym są istotnie mniejsze u kobiet z hiperandrogenią. Wykazano również ujemną korelację średnich stężeń całkowitego testosteronu we krwi ze średnią wartością współczynnika GdA/TP w popłuczynach z jamy macicy. Podobną ujemną korelację wykazano ze średnim stężeniem całkowitego testosteronu a średnimi stężeniami GdA we krwi w 3 dniu cyklu i w fazie przedmiesiączkowej. Pozostają otwarte pytania: czy nadmiar androgenów bezpośrednio wpływa na produkcję endometrialnej GdA, czy dzieje się to poprzez wpływ na insulino-wrażliwość, czy też poprzez bezpośrednie hamowanie aktywności jajników lub też poprzez hamujący wpływ na wydzielanie gonadotropin.

Diagnostyka niepłodności kobiecej zakłada rozpoznanie wielu jej przyczyn. Badanie receptywności endometrium znajduje się na tej liście. Spośród wielu markerów receptywności endometrium, badanie popłuczyn na obecność GdA jest metodą prostą i bezpieczną. Zastosowanie tej metody w praktyce, pomimo kosztów,

The effect of progesterone on GdA secretion is genomic in character. It acts through PRE/GRE regions in the PAEP [14] gene promoter. Also, the production is influenced by progesterone-independent routes, the so-called transcription factors - HDAC (histone acetyltransferases and histone deacetylases), whose inhibition induces gene expression for a.o. GdA, thus inhibiting cellular growth, differentiation, or initiation of apoptosis [15]. It was demonstrated that the region existing in the GdA gene for the HDAC inhibiting factor, the so-called TSA, is independent of the effect of progesterone on GdA synthesis. Therefore, we can speak of a double route of GdA activation: a progesterone and a non-progesterone one. The authors' own studies demonstrated that the average progesterone concentration in blood correlates positively with both the average GdA concentration in blood in the premenstrual phase and the average value of GdA/TP index in uterine cavity washings. Results of the present study converge with the results obtained by other authors and confirm the association between the effect of progesterone and GdA secretion [9,16].

In the group of patients with hyperandrogenemia (ha), hormonal disorders related to the secretion of both 17- β -estradiol and progesterone. Moreover, abnormal average values of HOMA and QUICKI indexes occurred in that group. Tissue insulin resistance has an effect on GdA secretion in women with polycystic ovarian syndrome [17]. In those women, a metformin therapy - apart from having other advantageous effects, such as reducing tissue insulin resistance, inducing ovulation, lowering the concentration of androgens - also increases GdA concentration in blood [7]. The phenomenon of reduced GdA production was observed also in pregnant women with PCOS [8]. This is directly associated with unfavourable obstetrical results. Women with PCOS display a higher rate of spontaneous miscarriages [19]. The authors' own study demonstrated unequivocally that GdA concentrations in blood in the premenstrual phase are significantly lower in women with hyperandrogenemia. Also, a negative correlation was demonstrated between the average concentrations of the total testosterone in blood with the average value of GdA/TP index in uterine cavity washings. Similarly, a negative correlation was revealed between the average concentration of the total testosterone and the average GdA concentrations in blood on the third day of the cycle and in the premenstrual phase. The questions remain open if the excess of androgens has an immediate effect on the production of endometrial GdA and whether the effect is produced by influencing insulin sensitivity or by direct inhibition of ovarian activity, or by an inhibitory effect on the production of gonadotropins.

In diagnosing female infertility, an assumption is made to diagnose its numerous causes. The examination of endometrial receptivity is on the list, too. Among various markers of endometrial receptivity, testing uterine cavity washings for GdA presence is a simple and

może być przydatne również w procesach terapeutycznych np. w technikach rozrodu wspomaganego. W badaniach Jakubowicz i wsp. [18] stężenie GdA we krwi u ciężarnych kobiet z zespołem policystycznych jajników było istotnie mniejsze w porównaniu do grupy kobiet zdrowych, natomiast terapia metforminą u tych pacjentek związana była ze wzrostem stężenia GdA we krwi w fazie przedmiesiączkowej, czyli w okresie trwania tzw. „okienka implantacyjnego”, przełomowego momentu dla procesu rozrodczego [7].

Podsumowując, GdA jest białkiem endometrialnym o dużym znaczeniu dla rozrodczości. Przedstawione badania w większości zgodne z wynikami innych autorów wskazują, iż GdA jest istotnym markerem receptywności endometrium. Hiperandrogenemia obniża wydzielanie tego białka przez komórki endometrium.

WNIOSKI

1. Aktywność jajników zasadniczo wpływa na wydzielanie GdA i tym samym na receptywność endometrium.
2. Hiperandrogenemia i insulinooporność tkankowa wpływają wieloczynnikowo na wydzielania GdA i zmniejszają receptywność endometrium.

safe method. Its practical application, in spite of its costs, may be useful also in therapeutic processes, e.g. in assisted reproductive technologies. In the studies conducted by Jakubowicz et al. [18], GdA concentration in blood of pregnant women with polycystic ovarian syndrome was significantly lower than in healthy women, and a metformin therapy in those patients induced an increase of GdA concentration in blood in the premenstrual phase, that is, within the duration of the so-called „implantation window”, the decisive moment of the reproductive process [7].

To sum up, GdA is an endometrial protein of high importance for reproduction. The present study, usually in accordance with the results obtained by other authors, indicates that GdA is a significant marker of endometrial receptivity. Hyperandrogenemia reduces GdA secretion by endometrium cells.

RESULTS

1. Ovarian activity has a decisive effect on GdA secretion and, consequently, on endometrial receptivity.
2. Hyperandrogenemia and tissue insulin resistance have a multifactorial effect on GdA secretion and reduce endometrial receptivity.

Piśmiennictwo / References:

1. **Julkunen M, Seppala M, Janna OA.** Complete amino acid sequence of human placental protein 14: a progesterone-regulated uterine protein homologous to beta-lactoglobulins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:8845-8849.
2. **Seppala M, Taylor RN, Koistinen H, Koistinen R, Milgrom E.** Glycodelin: A major lipocalin protein of the reproductive axis with diverse action in cell recognition and differentiation. *Endocr Rev* 2002;23:401-430.
3. **Riittinen L, Narvanen O, Virtanen I et al.** Monoclonal antibodies against endometrial protein PP14 and their use for purification and radioimmunoassay of PP14. *J Immunol Methods* 1991;136:85-90.
4. **Joshi SG, Ebert KM, Smith RA.** Properties of He progesterone-dependent protein of the human endometrium. *J Reprod Fertil* 1980;59:287-296.
5. **Van Cong N, Vaisse C, Gross MS et al.** The human placental protein 14 (PP14) gene is located on chromosome 9q34. *Hum Genet* 1991;86:515-518.
6. **Gray RH, Wu LY.** Subfertility and risk of spontaneous abortion. *Am J Public Health* 2000;90:1452-1454.
7. **Jakubowicz D, Seppala M, Jakubowicz S, et al.** Insulin reduction with metformin increases luteal phase serum glycodelin and insulin-like-growth factor-binding protein 1 concentrations and enhances uterine vascularity and blood flow in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(3):1126-33.
8. **Hoogland HJ, Skouby SO.** Ultrasound evaluation of ovarian activity under oral contraceptive. *Contraception* 1993;47:583-590.
9. **Julkunen M, Apetr D, Seppala M et al.** Serum levels of placental protein 14 reflect ovulation in nonconceptional menstrual cycles. *Fertil Steril* 1986;45:47-50.
10. **Lindhard A, Bentin-Ley U, Ravn V et al.** Biochemical evaluation of endometrial function at the time of implantation. *Fertil Steril* 2002;78:221-233.
11. **van der Gaast MH, Macklon NS, Beier-Hellwig K et al.** The feasibility of a less invasive method to assess endometrial maturation-comparison of simultaneously obtained uterine secretion and tissue biopsy. *BJOG* 2009 Jan;116(2):304-12.
12. **Li TC, Dalton C, Bolton AE et al.** An analysis of the variation of plasma concentrations of placental protein 14 in artificial cycles. *Fertil Steril* 1992;57:776-782.
13. **Waites GT, Bell SC.** Immunohistological localization of human pregnancy-associated endometrial alpha 2-globulin (alpha 2-PEG), a glycosylated beta-lactoglobulin homologue, in the decidua and placenta during pregnancy. *J Reprod Fertil* 1989;87:291-300.
14. **Kamarainen M, Julkunen M, Seppala M.** Hinf polymorphism in the human progesterone associated endometrial protein (PAEP) gene. *Nucleic Acids Res* 1991;19:5092.
15. **Li TC, MacKenna A, Roberts R.** The techniques and complications of out-patient uterine washing in the assessment of endometrial function. *Hum Reprod* 1993 Mar; 8(3):343-6.
16. **Seppala M, Koistinen H, Koistinen R et al.** Glycosylation related action of glycodelin: gamete, cumulus cell, immune cell and clinical associations. *Hum Reprod Update* 2007;13(3):275-287.
17. **Giudice LC.** Endometrium in PCOS: Implantation and predisposition to endocrine CA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2006 Jun;20(2):235-44.
18. **Jakubowicz DJ, Essah PA, Seppälä M et al.** Reduced serum glycodelin and insulin-like growth factor-binding protein-1 in women with polycystic ovary syndrome during first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Feb;89(2):833-9.
19. **Okon MA, Laird SM, Tuckerman EM, Li TC.** Serum androgen levels in women who have recurrent miscarriages and their correlation with markers of endometrial function. *Fertil Steril* 1998 Apr;69(4):682-90.