МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ

КАТЕДРА “АКУШЕРСТВО И ГИНЕКОЛОГОГИЯ”

СБАЛАГ ‘’Майчин дом’’ - СОФИЯ

д-р Димитър Илианов Митев

Д И С Е Р Т А Ц И Я

2023 г.

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ

КАТЕДРА “АКУШЕРСТВО И ГИНЕКОЛОГИЯ”

д-р Димитър Илианов Митев

Съдово-ендотелни растежни фактори и Фибронектин при патология на ендометриума

Дисертация

За присъждане на образователна и научна степен „доктор”

Научна специалност „Акушерство и гинекология” (03.01.45)

Научен ръководител: доц. д-р Румен Димитров, д.м.

София, 2023 г.

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ…… 4

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР…… 6

1. Ендометриален карцином..... 7

2. Съдово-ендотелен растежен фактор (VEGF) и ангиогенеза..... 15

3. Фибронектин и злокачествени гинекологични заболявания..... 30

4. Изводи от литературен обзор..... 35

III. ЦЕЛ…… 37

IV. ЗАДАЧИ…… 38

V. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ…… 39

1. Материал..... 39

2. Методи..... 42

VI. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ…… 62

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ…… 86

VIII. ИЗВОДИ…… 87

IX. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД…… 89

X. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД…… 90

XI. ПРИЛОЖЕНИЯ…… 91

XII. БИБЛИОГРАФИЯ…… 92

СЪКРАЩЕНИЯ

ЕК – Ендометриален карцином

ПРМ – Последна редовна менструация

Fnc - Фибронектин

ХЗТ – Хормоно-заместителна терапия

VEGF - Съдово-ендотелен растежен фактор (VEGF)

FGF - Фибробластен растежен фактор

PLGF - Плацентарен растежен фактор

EGF - Епидермален растежен фактор

TGF - α - Трансформиращ растежен фактор α

TGF - β - Трансформиращ растежен фактор β

PD-GF - Тромбоцитно-извлечен растежен фактор

PD-ECGF - Тромбоцитно-извлечен ендотелиално клетъчен растежен фактор

HGF - Хепатоцитен растежен фактор

EGF – Епидермален растежен фактор

TNF – Тумор-некротизиращ фактор

IL-8 – Интерлевкин - 8

IL-1 – Интерлевкин - 1

ФАК – Фокална адхезионна киназа

MVD – Микросъдова плътност

NGAL – Неутрофилен гелатиназо-асоцииран липокалин

I. ВЪВЕДЕНИЕ

В съвременния свят ракът на ендометриума е най-честото злокачествено гинекологично заболяване и е четвъртият най-разпространен злокачествен тумор в женската популация.

Най-висока заболеваемост има в САЩ и Канада. Коригираната за възраст заболеваемост в САЩ е 23.3 случая на 100 000 жени годишно. Други региони с коригирана за възраст заболеваемост над 10 случая на 100 000 включват Европа, Австралия и Нова Зеландия, южната част на Южна Америка и Тихоокеанските островни държави. Ниски честоти се срещат в Африка (Уганда 3.3 на 100 000) и Азия (Китай 3.8 на 100 000). Коригираната за възраст заболеваемост в Полша е 13.7 на 100 000 жени годишно.

Заболяват преимуществено жени в пери- и постменопаузална възраст. Налице е подчертана възрастова зависимост - честотата му нараства при жени над 60 годишна възраст и е значително по-ниска при такива под 40 години. В днешно време е налице постоянен прогрес в диагностичните и терапевтични възможности, с които разполага медицината, но за съжаление броят на раковите заболявания и смъртността от тях не спира да се увеличава.

Различават се два вида карцином на ендометриума – тип I и тип II. Първият е известен като естроген-зависим и се среща преимуществено при пре- и перименопаузални жени. Добре диференциран е и има по-добра прогноза. Може да се развие от предшестваща ендометриална хиперплазия. Тип II е естроген-независим. Засяга постменопаузални жени, има по-агресивно протичане и е с по-лоша прогноза от тип I. Възниква най-често на базата на атрофичен ендометриум.

Рискови фактори за развитие на ендометриален карцином са: ранно менархе, късна менопауза, наднормено тегло, диабет, напреднала възраст, менструални нарушения, синдром на поликистозни яйчници, нулипаритет, ХЗТ, естрогенпродуциращи тумори и други.

През последното десетилетие е налице тенденция да се търсят и оценяват различни биомаркери с оглед оптимизиране на терапията и евентуално определяне на изхода от малигнените заболявания, като това важи и за карцинома на ендометриума.

Циркулиращите различни ангиогенни фактори в серума биха могли да дадат отговор на редица въпроси, свързани с този вид патология. Множество ангиогенни фактори участват в този процес, като един от тях е особено значим – съдово-ендотелният растежен фактор (VEGF).

Фибронектинът е гликопротеин, който принадлежи към извънклетъчния матрикс. Има високо молекулно тегло и показва голямо разнообразие от функции: адхезия между клетките, организация на цитоскелета, онкогенна трансформация и др.

Различават се два основни вида - клетъчен и плазмен, които имат сходни физични и химични характеристики, но се различават по биологичната си активност и по ефекта върху трансформираните клетки.

Преобладават проучванията върху съдово-ендотелния растежен фактор (VEGF) в тъканни култури при жени със злокачествена ендометриална патология.

В настоящата дисертация са представени резултатите от изследвания, свързани с определяне нивата на съдово-ендотелния растежен фактор - А (VEGF-A) и Фибронектин в серума на жени с ендометриален карцином, бенигнена патология на ендометриума /ендометриален полип/ и здрави контроли.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Ендометриален карцином

Ракът на ендометриума е най-честото злокачествено заболяване на женския генитален тракт, като в България годишно заболяват приблизително 30 на 100 000 жени (Национален раков регистър).

Заболяването е рядко преди 40 годишна възраст и преди менопаузата [1].

Точната причина за възникването на ендометриалния карцином не е изяснена [2].

За възникването на повечето ендометриални ендометроидни карциноми значение се отдава на непрекъснатата ендометриална пролиферация, която се обуславя от постоянната естрогенна стимулация без противопоставяне на прогестеронова такава, често предшествана от различните форми на ендометриална хиперплазия (ЕХ). Образувалите се атипични премалигнени лезии - ендометриална интраепителна неоплазия (EIN), могат да претърпят трансформация до ендометроиден карцином, със съответната степен на стромална и/или миометрална инвазия. Предвид общо известната хормонална етиология ендометриалните ендометроидни карциноми нерядко експресират естрогенни и прогестеронови рецептори [3], [4].

Други коментирани етиологични фактори за възникването на ендометриалния карцином са инсулиновата резистентност, затлъстяването, хиперандрогенемията, наследствени мутации засягащи BRCA-1 и BRCA-2 гените и други.

Хиперинсулинемията и наднорменото тегло, асоцииращи се със захарен диабет тип II, са причина за ниски нива на свързващия половите хормони глобулин (SHBG) и по-високи такива на свободно циркулиращи естрогени [5].

В проведено голямо проучване според Papaioannou и сътр. се установява, че при захарен диабет тип I рискът от развитие на ендометриален карцином е по-висок отколкото при захарен диабет тип II [6].

Известен факт е, че при млади жени с поликистозна болест на яйчниците (PCOS) съществува повишена андрогенна продукция, свързана с трансформация на тези хормони до естроген в мастната тъкан, което води до състояние на персистиращо високи естрогенни нива [6]. Подобна хиперестрогенемия се наблюдава и при жени в постменопауза, където андрогените, произведени от яйчниците и надбъбречните жлези, се превръщат в естрогени в мастната тъкан и могат да доведат до ендометриална стимулация и хиперплазия [7].

Противоречиво и все още дискутабилно е участието на мутациите на BRCA-1 и/или BRCA-2 като рисков фактор за възникването на ендометриалния карцином. Понастоящем се обсъжда повишен риск за развитието на неоплазми с епителен произход (ендосалпингс, ендометриум, ендоцервикс), асоциирани с BRCA [8].

Приблизително 5-10 % от ЕК имат фамилна предиспозиция, която се асоциира с наследствен неполипозен колоректален карцином (HNPCC), като при тези жени има 42 % риск за развитие на ЕК и 30% риск за развитие на колоректален карцином [9].

Възникването на карцинома на ендометриума се характеризира с възможност за собствен контрол върху сигналите за растеж, нечувствителност към инхибиране на растежа, избягване на апоптозата, ангиогенеза, инвазия и метастазиране [10].

Различават се следните хистологични варианти на ендометриалния карцином:

1. Ендометроиден карцином (обикновен ендометриален)
2. Ендометриален карцином с плоскоклетъчна сквамозна диференциация

- Бенигнена сквамозна диференциация в бенигнен ендометриум
- Малигнена сквамозна диференциация в бенигнен ендометриум
- Бенигнена и малигнена диференциация и ЕК

3. Ендометриален карцином с муцинозна диференциация (муцинозен аденокарцином)
4. Светлоклетъчен карцином
5. Папиларен серозен карцином
6. Недиференциран карцином

Според грейдинга ендометриалният карцином се дели на: високо диференциран (G1), умерено диференциран (G2) и ниско диференциран (G3). Ниската диференциация се асоциира с по-лоша прогноза.

Възможни са следните пътища на разпространение и метастазиране на това заболяване:

- Лимфен път – към лумбо-аорталните, ингвиналните и тазовите лимфни възли
- Хематогенен път – метастази в черен дроб, бял дроб и кости
- Повърхностно – по лигавицата на маточната кухина към маточната шийка
- Проникване в дълбочина през миометриума към серозата на матката
- Имплантация на ексфолиирани туморни клетки [11]

Анализ на прогностичните фактори, характеризиращи туморния растеж, степента на пролиферация, инвазивния и метастатичен потенциал позволява индивидуализиране на подхода към болните с ендометриален карцином. Наличието на първичен тумор, състоянието на регионалните лимфни възли, хистологичния тип и грейдинг, хормоналният рецепторен статус и възрастта са най-важните критерии,

определящи необходимостта от допълнителна терапия, риска от рецидив и преживяемостта [12,13].

В клиничната практика прогностичните фактори се разделят на основни и допълнителни. Основните са TNM – статус, морфология, стероидни хормонални рецептори, възраст и менопауза. Допълнителните са: далечни метастази, пролиферация, рецептори за растежни фактори, онкогени и тумор-асоциирани антигени [Горчев Гр; Предрак и рак на ендометриума 1999 г.].

Горчев и сътрудници разграничават три отделни групи с различна прогноза на болестта, като обобщават прогностичните фактори при ендометриален карцином: перитонеална цитология, степен на диференциация, засягане на цервикс или истмус, пелвични и парааортални метастази, аднексиални метастази, хистологичен тип, рецепторен статус, далечни метастази.

1. Първа група – добра прогноза

- Карциномът засяга само ендометриума или повърхностно миометриума
- Високо или умерено диференциран
- Има положителни естрогенови и прогестеронови рецептори
- Без инвазия на цервикс и истмус
- Отрицателна перитонеална цитология
- Липса на метастази в пелвични и парааортални лимфни възли

2. Втора група – съмнителна прогноза

- Инвазивен карцином, достигащ ½ от миометриума
- Умерено или ниско диференциран
- Наличие на отрицателни или слабо положителни естрогенови и прогестеронови рецептори
- Засягане на цервикса

- Отрицателна перитонеална цитология
- Липса на метастази в пелвични лимфни възли

3. Трета група – лоша прогноза

- Ендометриален карцином, инфилтриращ целия миометриум
- Ниско диференциран или имащ характеристика на светлоклетъчен или аденосквамозен карцином
- Задължителна липса на естрогенови и прогестеронови рецептори
- Положителна перитонеална цитология
- Засягане на цервикс и истмус
- Наличие на метастази в пелвични и евентуално парааортални лимфни възли

FIGO формулира тристепенна оценка на жлезистия компонент на ендометриалния карцином:

Степен 1: ≤ 5% солиден неплоскоклетъчен растеж

Степен 2: 6 - 50% солиден неплоскоклетъчен растеж

Степен 3: > 50% солиден неплоскоклетъчен растеж, увеличаване с 1 степен, когато има забележим ядрен атипизъм [14].

На базата на двоичната система ендометроидните карциноми се класифицират на такива с по-малко от 50% солиден компонент и липса на изразен ядрен атипизъм (нискостепенни), и такива с повече от 50% солиден компонент и/или изразен ядрен атипизъм (високостепенни) с ендометроидна, серозна, светлоклетъчна или недиференцирана компонента [15].

Тип 1, нискостепенните ендометриални ендометроидни карциноми с по-малко от 50% инвазия на миометриума имат благоприятна прогноза, приближаваща се до 100% 5-годишна преживяемост. Нискостепенните ендометроидни карциноми с повече от 50% инвазия на миометриума и високостепенният рак на ендометриума имат много по-лоши прогнози с по-висок брой метастази в лимфните възли и рецидиви след лечение [14]. Използвайки бинарното степенуване, ендометроидните карциноми, класифицирани като високо степенни на базата на 2 или повече архитектурни характеристики, които включват повече от 50% солиден модел на растеж без разлика между плоскоклетъчна или неплоскоклетъчна диференциация, дифузен инфилтративен растеж и/или туморна некроза, бяха свързани с едва 46% 5-годишна преживяемост в сравнение с 93% 5-годишна преживяемост при пациентки с нискостепенен ендометроиден карцином [15]. Агресивно злокачествените високостепенни ендометроидни карциноми с такава лоша прогноза са по-подобни на тип 2 високостепенни неендометроидни хистотипове, отколкото на нискостепенните ендометроидни карциноми [16].

Най-разпространените неендометроидни тип 2 карциноми на ендометриума са серозни, недиференцирани и светлоклетъчни карциноми. Същите като цяло са свързани със значително по-ниска 5-годишна преживяемост в сравнение с високостепенните ендометриоидни карциноми [3, 17]. Независимо дали са ограничени или разпространени извън маточното тяло, когато са диагностицирани, светлоклетъчните карциноми се свързват с по-висока 5-годишна преживяемост от серозните карциноми; въпреки това, заедно, ендометриалните серозни и светлоклетъчни тип 2 карциноми са свързани със значително по-ниска преживяемост от високостепенния ендометриоиден карцином [18].

Освен доказаните прогностични фактори за рака на ендометриума като хистологичен вариант, стадий, дълбочина на миометрална инвазия и метастази в тазовите лимфни възли, ангиогенезата също е свързана с преживяемостта [19] и

може да представлява евентуален прогностичен фактор. Тя има ключова роля за прогресивния туморен растеж и развитието на метастази [20]. Инициацията на ангиогенезата е строго регулирана от баланса между проангиогенни и анти-ангиогенни молекули и е ориентир за ранната и есенциална туморна прогресия [21,22].

Новоразвитата капилярна мрежа от съществуващи съдове се определя като неоваскуларизация. Като цяло реорганизацията на капилярните ендотелиални клетки е много бавна и отнема месеци или години при физиологичната неоваскуларизация, докато реорганизацията в яйчника и ендометриума е бърза и се случва в рамките на овариалния цикъл. Малигнената трансформация става бързо, което съответства и с ускоряването на туморния растеж [23].

Развитието на васкуларната строма е критично за туморите и за разрастването им отвъд минималния им размер, а също така е изключително важно за метастазирането. Неоваскуларизацията е есенциална за растежа и храненето на солидните тумори по-големи от 2 мм в диаметър [24]. Разпространението на стромалната васкуларизация може да осигури прогностична стойност за пациенти с разнообразни видове карциноми.

Като допълнение туморните съдове могат да осигурят полезна информация относно ангионеопластичната терапия [25,26]. Относително малко се знае за ангиогенезата при ендометриалния карцином. Последният индуцира васкуларната строма [27,28] и изглежда, че този процес е хормонално регулиран [28]. Все още обаче механизмите, отговорни за ангиогенезата при този вид неоплазми не са добре изяснени.

Неорганизираната базална мембрана на новите капилярни ендотелни клетки позволява интравазация на туморни клетки и висока плътност на микро-

съдовете в туморите, асоциирани с тяхното разпространение и инвазивност [29, 30, 31, 32, 33].

Неоваскуларизацията се изразява в разрушаване на базалната мембрана от протеинази, освободени от туморните или гостоприемни клетки, които се активират от тумор-производни ангиогенни фактори, водещи до миграция и пролиферация на ендотелни клетки и формиране на нови капиляри [34]. Ангиогенните фактори стимулират съответните стъпки на неоваскуларизация.

Различават се и са идентифицирани следните ангиогенни фактори: фибробластен растежен фактор (FGF), съдово-ендотелен растежен фактор (VEGF), плацентарен растежен фактор (PLGF), епидермален растежен фактор (EGF), трансформиращ растежен фактор (TGF)-алфа, трансформиращ растежен фактор (TGF)-бета, тромбоцитно-извлечен растежен фактор (PD-GF), тромбоцитно-извлечен ендотелиално клетъчен растежен фактор (PD-ECGF), хепатоцитен растежен фактор (HGF), тумор - некротизиращ фактор (TNF), плейотропин, пролиферин, ангиогенин, естрадиол и интерлевкин (IL) - 8 и други.

Измежду изброените, основните фактори, индуцирани от туморните клетки са: фибробластен растежен фактор (FGF), съдово-ендотелен растежен фактор (VEGF), тромбоцитно-извлечен ендотелиално клетъчен растежен фактор (PD-ECGF) и интерлевкин (IL)-8.

Туморно-клетъчните ангиогенни фактори фибробластен растежен фактор (FGF), съдово-ендотелен растежен фактор (VEGF), тромбоцитно-извлечен ендотелиално клетъчен растежен фактор (PD-ECGF), интерлевкин (IL)-8 могат да бъдат специфично експресирани във всеки тумор и да подпомагат туморния растеж и разпространение.

2. Съдово-ендотелен растежен фактор (VEGF) и ангиогенеза

Съдово-ендотелният растежен фактор (VEGF), отделян от множество тумори, допринася за туморния растеж не чрез автокринно действие в туморните клетки, а като има паракринно действие върху заобикалящите в близост микросъдове [35]. Освен това той улеснява метастазирането посредством неоваскуларизацията [36]. Експресията на съдово-ендотелния растежен фактор (VEGF) се индуцира от тромбоцитно-извлечен растежен фактор (PD-GF), трансформиращ растежен фактор (TGF)-бета, интерлевкин -1 (IL) -1, хипогликемия, хипоксия [37, 38, 39, 40, 41] и естроген [42].

Дали VEGF е принципният регулатор на ангиогенезата при ендометриален карцином или дали той играе роля в комбинация с други растежни фактори е спорно. Туморната ангиогенеза е сложен процес, който несъмнено включва варианти от стимулиращи и инхибиращи цитокини [43,44,45].

Цитокините са група протеини, които включват интерлевкини, лимфокини, тумор-некротичен фактор (TNF). Те не представляват хормонални субстанции, нямата характеристиката на растежни фактори, но се влияят от техните сигнални молекули.

Интерлевкините се продуцират предимно от Т-хелперите. Съществува класификация, която разделя цитокините на три основни типа:

- Тип 1- цитокини, които повишават клетъчния имунен отговор
- Тип 2- цитокини, които подобряват антигенния имунен отговор
- Тип 3 – проинфламаторни цитокини

Интерлевкини 6, 10 и TNF могат да имат прогностична стойност при злокачествените заболявания, включително и при ендометриалния карцином.

Комбинацията на VEGF и споменатите цитокини може евентуално да допринесе за доизясняване биологията на ендометриалния карцином [46].

Показано е например, че VEGF и FGF в комбинация могат да предизвикат потенциално синергичен ангиогенен отговор ин витро [47]. Освен това е възможна комбинация от цитокини да засилват ангиогенензата посредством регулирането на VEGF - генната експресия.

Например TNF-α и EGF показват повишена генна експресия на VEGF в култура на епидермални кератиноцити [48]. Подобно на това TGB – β е показал повишена генна експресия на VEGF в клетъчни линии при хора с карцином на белия дроб. Дали тези или други цитокини участват синергично с VEGF или регулират VEGF-генната експресия и туморната ангиогенеза ин виво остава да бъде установено. Като добавка към растежните фактори, стероидните хормони могат да предизвикат VEGF - експресия и ангиогенеза в ендометриалния карцином. Доказано е, че естрадиолът и естриолът предизвикват осемкратно повишаване на VEGF mRNA експресията в маточна тъкан от плъхове [49]. Още повече Charnock-Jones et al. доказват, че естрадиолът повишава концентрацията на VEGF mRNA и при ендометриално карциномни клетъчни линии [50]. Тези наблюдения предполагат, че естрогенната стимулация може да има индиректен стимулиращ ефект над ангиогенезата, като оказва влияние в регулацията на VEGF - генната експресия.

Васкуларният пермеабилитетен фактор, известен още като съдово-ендотелен растежен фактор VEGF, е мултифункционален гликопротеинов цитокин.

VEGF представлява семейство с множество функции, които повлияват туморния растеж и метастазиране. То се състои от VEGF – A, B, C, D, E и F и плацентарен растежен фактор (PlGF), като VEGF-A е от решаващо значение за туморната ангиогенеза и играе ключова роля в пролиферацията, „преживяемостта“ и пермеабилитета на ендотелните клетки [51, 52, 53]. Предполага се, че други

изоформи на VEGF, като VEGF-C и VEGF-D, са по-важни при разпространяване на метастазите по лимфен път.

VEGF-C е ключов регулатор на лимфангиогенезата и важен медиатор на туморното метастазиране в лимфните възли. Генът за VEGF-C се намира в хромозома 4q34. VEGF-C се продуцира като прекурсорен протеин и се активира в извънклетъчното пространство чрез протеолиза, като се формира хомодимерен протеин с висок афинитет към VEGFR-2 и VEGFR-3. VEGF-C индуцира митогенезата, миграцията и оцеляването на ендотелните клетки. Той се експресира в сърцето, тънкото черво, плацентата, яйчника и щитовидната жлеза при възрастни [54].

VEGF-C специфично активира VEGF рецептор 3 (VEGFR-3) - тирозин киназен рецептор, експресиран на повърхността на лимфатичните ендотелни клетки, както и на други клетки, като раковите. Експресията на VEGF-C от туморните клетки на различни малигнени заболявания се свързва с увеличаване на лимфните съдове по периферията на тумора и понякога в самия тумор. Също така се смята, че оказва влияние на метастазирането в локалните лимфни възли и метастазирането в далечни органи [55].

Няколко ангиогенни и лимфангиогенни фактора са били идентифицирани и се смята, че участват във физиологичната и патологичната ангиогенеза в човешкия ендометриум [56,57]. Показано е, че са значително свръхактивирани при ендометриалните карциноми и са асоциирани с туморната ангиогенеза и изхода от заболяването [58,59,60].

Експресията на VEGF е 4 до 10 пъти по-висока в инвазивния ръб на тумора отколкото в централните части [61]. Показано е, че свръхекспресията на VEGF и рецепторите му е свързана с лоша прогноза при пациентки с ендометриални карциноми [62,63,64,65]. Циркулиращите нива на VEGF изглеждат особено полезни като прогностичен инструмент в дадени клинични подгрупи на пациентите, като

тези в ранен стадий или с отрицетелни лимфни възли, при които съвременните клинико-патологични параметри са ограничени в техния прогностичен капацитет [66, 67, 68].

Точните функции на останалите членове на семейството VEGF - VEGF-B, VEGF-E, VEGF-F и плацентарния растежен фактор (PlGF) в туморния растеж и разспространение остават спорни и неясни.

VEGF-A е ключова молекула в индукцията на ангиогенезата и васкуло-генезата. Тя причинява пролиферация, миграция и формиране на тубули при ендотелните клетки. Генът за VEGF-A се намира в хромозома 6p21.3 и се кодира от осем екзона и седем интрона. VEGF индуцира ангиогенезата при редица физио-логични и патологични състояния включително ембриогенезата, формирането на corpus luteum, туморния растеж, заздравяването на рани и компенсаторната ангиогенеза на сърцето [54,58].

Сред ангиогенните фактори съдовият ендотелен растежен фактор (VEGF)-A играе ключова роля в пролиферацията на ендотелните клетки и повишения пермеабилитет на асоциираните с тумора съдове [62,63]. VEGF се експресира от различни видове клетки, включително в ендотела на примати и гризачи. Той представлява важен регулатор на туморната ангиогенеза [25,69] и се експресира при различни човешки неоплазми [25, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77], като има две основни действия – потенциален индуктор на съдовата пропускливост и селективен ендотелиално клетъчен митоген [78,79].

Първоначално VEGF е определен като фактор, оказващ влияние само над съдовия пермеабилитет, който предизвиква и наличието на асцит при тумори [80]. След това съдово-ендотелният растежен фактор (VEGF) е бил определен като фактор, оказващ влияние на съдовия пермеабилитет, и като фактор, засилващ ендотелиалния клетъчен растеж и ангиогенезата [81].

Експресира се абнормно при множество различни тумори, които се срещат при човека, като например тумори, изхождащи от яйчника, маточната шийка, гърда, гастроинтестинален тракт, бъбрек, пикочен мехур и ЦНС [25].

Основният механизъм, чрез който VEGF индуцира ангиогенезата, се свързва с това, че той е директен ендотелиален клетъчен митоген - специфичен за васкуларните ендотелиални клетки [82]. В качеството си на потенциален медиатор в микросъдовия пермеабилитет той предизвиква екстравазация на плазмени протеини в околната строма, последваща активация на съсирваща каскада в екстраваскуларното пространство, формиране на богата на фибрин временна матрица, в която мигрират ендотелиални клетки, фибробласти и различни клетки на възпалението. В крайна сметка се сформира силно васкуларизирана тъкан [83, 84, 85, 86, 87].

Както вече беше споменато съдово-ендотелният растежен фактор (VEGF) се експресира в тъкани с остра вакуларна ендотелиална реорганизация, каквато има в репродуктивните органи като яйчници и матка, плацентата и туморите [88,89,90]. Експресията на съдово-ендотелен растежен фактор (VEGF) в овариални говежди гранулозни клетки е било индуцирано посредством естроген, което показва естроген-отговорен компонент. Добре известно е, че растежът на някои ендометриални карциноми е естроген-зависим [91]. Поради това VEGF допринася за растежа на някои естроген - зависими ендометриални карциноми.

Смята се, че именно съдово-ендотелният растежен фактор (VEGF) може да е отговорен за ранен прогрес на болестта посредством ангиогенната си активност. Молекулният механизъм на намаляването на съдово-ендотелния растежен фактор (VEGF) все още не е изяснен. Вероятно това се дължи и е свързано със загубата на чувствителност към естрогени на карциномите по време на прогресията си. VEGF - генът се асоциира с естроген, който е небходим, за да осъществи неговата

транскрипция, което показва и доказва естроген-свързаната експресия на VEGF. В допълнение ангиогенните инхибитори, по-специално ангиостатичните стероиди, не могат да бъдат ефективни за терапия при ендометриалните карциноми, при които има доказани високи нива на VEGF.

Според Ferrara et al. [58] съдовият ендотелен растежен фактор (VEGF) е ключов регулатор на физиологичната ангиогенеза по време на ембриогенезата, скелетния растеж и репродуктивните функции.

VEGF също участва в патологичната ангиогенеза, свързана с тумори, вътреочни неоваскуларни нарушения и други състояния. Биологичните ефекти на VEGF се медиират от две рецепторни тирозин кинази, VEGFR-1 (Flt-1) и VEGFR-2 (KDR).

Те се различават значително по своите свойства. В последните години се тестват различни инхибитори на VEGF при различни злокачествени заболявания. Инхибирането на VEGF също се разглежда и като стратегия за предотвратяване на ангиогенезата. Има данни, че и нормалните тъкани могат да бъдат източник на ангиогенна активност. Много молекули са положителни регулатори на ангиогенезата. Повече от десетилетие ролята на VEGF в регулирането на ангиогенезата е обект на интензивно изследване, като данни показват, че растежът и съзряването на новите съдове са много сложни и координирани процеси, изискващи последователно активиране на поредица от рецептори, но сигнализирането на VEGF често представлява критично ограничаваща скоростта стъпка във физиологичната ангиогенеза.

Ефектите на VEGF над заобикалящите микросъдове са медиирани от два трансмембранни тирозин киназни рецептори, които вече бяха споменати, с висок афинитет, VEGFR-1 (fLT-1) и VEGFR-2 (KDR). Те се експресират по съдовата повърхност на ендотела [92, 93]. Свръхекспресията на VEGF в туморните клетки усилва туморния растеж и метастазирането при някои злокачествени заболявания,

включително колоректален карцином, овариален карцином и ендометриален карцином [24].

Намаляването на VEGF посредством моноклонални антитела или редуцирането на VEGF рецептора (KDR) посредством доминантно негативна мутантна форма на рецептора [94] е показало намаляване на туморната ангиогенеза и подтискане на туморния растеж ин виво. Като допълнение за неговата важност в туморната ангиогенеза VEGF също играе съществена роля в ангиогенезата, асоциирана с разнообразие от физиологични процеси [25].

В проучването на Guidi et al. оценката на нецикличен атрофичен ендометриум показва, че активната ангиогенеза не се наблюдава и експресия на VEGF mRNA е много малка или липсва. В противовес на това е установена силна експресия на VEGF mRNA в ендометриалния карцином при същите пациенти. Техните данни, че малигнените епителни клетки при ендометриален карцином силно експресират VEGF mRNa, подкрепят откритието на Charnock – Jones et al., които установяват експресия на VEGF mRNA в три различни ендометриално карциномни клетъчни линии чрез Northern анализ [50]. В нито една от клетъчните линии не е установено наличие на ДНК от киселинния или фибробластен растежен фактор (FGF - α, FGF - β).

Авторите правят заключение, че VEGF, а не FGF са принципните ангиогенни фактори в тези клетъчни линии.

Ендометриалният карцином, както и другите солидни тумори, трябва да предизвикат разрастване на васкуларната строма в значително по-голяма степен от минималната такава [95]. Предишни проучвания са показали, че ендометриалните карциноми индуцират ангиогенна активност именно с участието на VEGF – например при използване на инжекционни васкурални техники при хистеректомирани видове Palczak и Splawinski описват „хаотична и богата васкуларна мрежа“,

представена в периферията на ендометриалния карцином и предполагат, че това е в следствие на дифузен ангиогенен фактор.

В своето проучване Guidi et al. [77] съобщават за силна експресия на VEGF mRNA и белтъци от малигнените епителни клетки във всички проби на ендометриален карцином, които са изследвали. Експресията на VEGF mRNA и белтъци е много по-голяма в сравнение с тази при доброкачествения атрофичен ендометриум. Също така те установяват експресията на VEGF рецепторната mRNA в ендотелиалните клетки на микросъдовете в стромата, която поддържа ендометриалния карцином при всички проучени случаи.

Експресията на VEGF рецепторната mRNA в туморните съдове е по-голяма в сравнение с тази в съдовете на нормалния ендометриум при същите индивиди. Тези открития предполагат, че VEGF играе важна роля в ангиогенезата, асоциирана с ендометриалния карцином.

В това проучване авторите установяват, че туморните клетки при ендометриален карцином силно експресират VEGF mRNA и протеини. Още повече ендотелните клетки от околните микросъдове силно експресират mRNA на VEGF рецепторите fLT-1 и KDR. Тези данни потвърждават и други проучвания, доказващи важната роля, която има VEGF в ангиогенезата, асоциирана с други тумори, осигурявайки безспорни доказателства, че VEGF е важен регулатор в ангиогенезата на ендометриалния карцином.

Като заключение, откакто антиангиогенните терапии са развити и тествани при пациентки с различни солидни тумори, е много важно да се определят механизмите, отговорни за регулирането на туморната ангиогенеза [96].

Допълнителни изследвания за възможните взаимодействия между VEGF и други стимулатори на ангиогенезата, също и инхибиторни субстации на

ангиогенезата, могат да осигурят основата на бъдещето развитие на специфична антинеопластична терапия, насочена към туморната ангиогенеза.

През 1971 г. Folkman предполага, че атакуването на кръвоснабдяването на тумора може да бъде ефективна терапевтична стратегия [97]. Оттогава напредък в разбирането на механизма на туморната васкуларизация доведе до антиангиогенезни стратегии, които са с добри перспективи. В тази връзка е разработено и одобрено анти-VEGF антитяло, Bevacizumab, на базата на неговата ефикасност при метастачния колоректален карцином [98].

Въпреки тези обнадеждаващи данни, съществува ограничена информация за тъканно базираните ангиогенни маркери и тяхното прогностично значение при рака на ендометриума. В малка кохорта от пациенти Sivridi et al. установяват, че VEGF е независим прогностичен фактор за жени с рак на ендометриума в I стадий [99].

Друг често използван маркер за ангиогенезата е микросъдовата плътност (MVD), който е описан от Weidner et al. Налице е висока корелация между MVD и експресията на VEGF.

Kaku et al. съобщават намалена преживяемост без прогресия и намалена обща преживяемост при пациентки с рак на ендометриума с висока микросъдова плътност [100]. След рецидив пациентките с ниска такава имат по-добра прогноза от тези с висока и по-високи нива на експресия на VEGF [101]. При пациентките в ранен стадий на заболяването се установява висока експресия на VEGF. Съществуват данни, че индексът на съдовата пролиферация, който е мярка за „активна“ ангиогенеза, може да бъде по-чувствителен маркер на ангиогенезата от MVD и също е независимо свързан с преживяемостта при пациентки с ендометриален карцином [102].

Chen et al. изследват 53 жени с ендометриален карцином и установяват, че хистологичната степен и VEGF са независими предиктори на клиничния резултат.

Според Chen et al. съдовият ендотелен растежен фактор (VEGF) може да бъде маркер за преживяемост при пациентки с ЕК.

В проучването си той изследва пациентки с карцином на ендометриума, лекувани оперативно. VEGF е бил изследван количествено чрез ензимен имуноанализ. Плътността на микросъдовете (MVD) на отстранените тумори е оценена имунохистохимично.

Chen et al. анализират връзката между MVD, VEGF и клинико- патологичните параметри, включително рисковите фактори. По-високи концентрации на VEGF и на MVD са установени при тумори с напреднал стадий на заболяването. VEGF и MVD показват положителна линейна корелация. Напреднал стадий на заболяването и свръхекспресия на VEGF са независими рискови фактори за рецидив. Наблюдавана е тенденция пациентките с първи и втори стадий на заболяването и нормалната експресия на VEGF да имат по-добра прогноза и преживяемост. VEGF има добра корелация с прогресията на заболяването и метастазите при ендометриален карцином и може също да бъде независим прогностичен фактор за преживяемостта.

Някои проучвания съобщават за намалена преживяемост при пациентки, чиито тумори имат висока микроваскуларна плътност (MVD), но други аспекти на ангиогенния фенотип на тези тумори като корелация с експресията на VEGF, липсват [103].

В последното десетилетие няколко проучвания оцениха клиничното значение на различни биологични маркери, измерени в серум и/или в тъканни проби от пациентки с ендометриален карцином с цел откриването на маркери, способни да предскажат отговора на адювантната терапия или изхода от заболяването [104-108].

В проучване Aparna A. Kamat et al. [109] оценяват клиничната значимост на MVD и експресията на VEGF-A при ендометриалния карцином. Те използват миши

модел на маточния карцином за изследване на терапевтичната ефикасност срещу VEGF с Bevacizumab сам по себе си и в комбинация с таксанова химиотерапия.

Предвид това, че VEGF упражнява директен проангиогенен ефект върху микросредата на тумора първо са анализирани ефектите на краткосрочната анти-VEGF терапия върху съдовата архитектоника. В сравнение с контролите тумор - асоциираните кръвоносни съдове от лекуваните животни били по-малко дилатирани и деформирани след терапията с Bevacizumab.

Също така са оценени дългосрочните ефекти на анти-VEGF терапията върху туморната съдова мрежа чрез анализ на MVD. Най-значимо намаление на туморния васкуларитет в сравнение с контролите се намира при туморите на мишки, третирани с комбинирана терапия Bevacizumab и Docetaxel. Освен това в сравнение с монотерапията с Docetaxel, комбинираната терапия е по-ефективна за намаляване на туморния васкуларитет. Не е установена разлика в експресията на VEGF между двете терапевтични групи. При допълнително изследване ефектите от анти-VEGF терапията върху пролиферацията на туморните клетки също се установява намаляване на последната най-значимо в групата, подложена на комбинирана терапия.

Дългосрочната терапия с Bevacizumab и особено в комбинация с Docetaxel е високо ефективна за инхибиране на туморния растеж и метастази. Тези ефекти изглежда са медиирани отчасти от инхибицията на туморния васкуларитет. Анти-VEGF терапията самостоятелно и в комбинация с таксановата химиотерапия значително намалява туморния васкуларитет, като по този начин води до инхибиране на растежа, както и намаляване на екстензивните местастази. Въпреки че лекуваните тумори показват намалена клетъчна пролиферация, вероятно случващото се е вторично, вследствие на инхибицията на ангиогенезата, защото биологични агенти като Bevacizumab, имат ограничен директен ефект върху клетъчната пролиферация, но инхибират метастатичното разпространяване на тумора [37,38]. Резултатите

предоставят важна основа за изследването на тези агенти в клинични проучвания при пациентки с ендометриален карцином.

Високата експресия на VEGF се асоциира с множество агресивни белези при рака на матката. Установено е, че неутрофилният гелатиназа-асоцииран липокалин (NGAL) също допринася за развитието и прогресирането на ендометриалния карцином.

NGAL, известен също като липокалин-2 или трансферин, е силно експресиран при различни злокачествени заболявания. NGAL може да промотира ензимната активация на матричната металпротеиназа (MMP)-9, като образува комплекс с нея, който позволява активацията и обработката на фактори от значение за ангиогенезата, като съдовият ендотелен растежен фактор (VEGF) [110]. Тогава VEGF може да промотира локалната ангиогенеза, клетъчната пролиферация, диференциацията, инвазията и миграцията. NGAL може да участва в туморогенезата и чрез NGAL - рецептор.

In vitro експресията на NGAL е свързана със степента на нивото на диференциация на тумора в ендометриално-карциномните клетъчни линии и се предполага, че може да бъде полезен маркер за ранното откриване на ендометриално-карциномни лезии. Възможно е и високите нива на експресия на NGAL да инхибират апоптозата.

Проучване върху мишки с ендометриален карцином, които са били инжектирани с аденовирус със свръхескпресия на NGAL, съобщава, че скоростта на туморната апоптоза е намаляла заедно с намаляването на свързаните с апоптоза гени. Съвременни проучвания сравняват експресията на NGAL и VEGF в различни човешки ендометриални тъканни проби с различна степен на диференциация с цел по-добро разбиране на тяхната потенциална роля в туморната патогенеза и потенциалното идентифициране на нови мишени за терапветична интервенция.
В цитираното проучване Hai Xu et al. съпоставят експресията на NGAL при пациентки с ендометриален карцином в различен стадий по FIGO и атипична хиперплазия.

За откриването на експресията на NGAL и VEGF и за да се анализира корелацията й с клиничните характеристики на карцинома, които включват стадий по FIGO, хистологичен вид, ниво на диференциация, дълбочина на инвазия в миометриума и размер на тумора, авторите използват имунохистохимия и PCR [111].

Според Hai Xu et al. ескпресията на NGAL и VEGF е значително по-висока при ЕК, отколкото при атипичната хиперплазия и е най-ниска при пролифериращия ендометриум. Положителната експресия на NGAL и VEGF според тях е свързана със стадия по FIGO, степента на диференциация и дълбочината на инвазия в миометриума. По-високата хистологична степен, стадий и дълбочина на инвазия корелират положително с по-висока експресия на NGAL и VEGF. Тази положителна корелация не зависи от възрастта на пациентките и размера на тумора.

Hai Xu et al. потвърждават подчертаната роля на NGAL и VEGF в туморогенезата. [112]

В заключение проучването посочва, че високата експресия на NGAL и VEGF е пряко свързана с развитието на ендометриалния карцином и може да се използва като важен биомаркер за ранна диагностика. Допълнителни изследвания в тази посока могат да допринесат за нови диагностични и терапевтични възможности при ендометриалния карцином. [113, 114]

Holland et al. [115] съобщават за експресия на VEGF при 100% от пробите на ендометриален карцином и при 20% от тъканните проби на атипична хиперплазия, използвайки in situ хибридизация. Освен това те не откриват такава в добро-качествена ендометриална тъкан. Имунохистохимичната експресия на VEGF в туморните проби корелира с по-висока хистологична степен, по-голяма дълбочина на инвазия в миометриума, лимфо-васкуларна инвазия, метастази в лимфните възли и по-кратка преживяемост.

Туморните кръвоносни съдове са морфологично различни от нормалните. Туморният васкуларитет е променен, което се дължи на свръхпроизводството на VEGF.

Steffanson et al. установяват, че структурните промени в туморните съдове са асоциирани с повишена честота на инвазия от туморните клетки и намалена преживяемост при пациентки с рак на ендометриума. [102]

Dobrzycka et al. изследват връзката между серумните нива на VEGF и VEGF-C при жени с ендометриален карцином преди започване на тяхното лечение [116].

Разглежданото проучване обхваща 98 пациентки. Циркулиращите VEGF и VEGF-C са определяни чрез ELISA. Авторите съобщават, че нивата на VEGF при 76 от изследваните с тип I и при 22 с тип II ендометриален карцином са значително по-високи, отколкото тези при здравите контроли ($p < 0.001$). Разликите в средните нива на VEGF-C при двата вида тумори в сравнение с контролата са сигнификантни ($p < 0.001$).

Резултатите показват още, че серумните концентрации на VEGF силно корелират с напреднал стадий на заболяването по FIGO при тип II рак на ендометриума ($p < 0.001$), а също така, че предоперативните нива на VEGF-C корелират с напреднал стадий и при тип I ендометриален карцином ($p < 0.05$). Според авторския колектив стойността на лонгитудиналното измерване на използваните маркери тепърва трябва да се оцени.

Авторите разпределят пробите както следва: 76 случая на тип I (ендометроидни ендометриални карциноми) и 22 случая на тип II, от които 19 серозни и 3 светлоклетъчни карциноми. Използваните контроли са 30. От пациентките с тип I ендометриален карцином 43 са класифицирани в стадий I, 24 в стадий II и 9 в стадий III на болестта. Тип II са класифицирани като: 5 случая в стадий I, 10 в стадий II и 7 в стадий III. Групирането на пробите съобразно грейдинга е представено в табл.1.

Резултатите от изследването показват, че нивата на VEGF и VEGF-C са значително повишени при ендометриалния карцином в сравнение с нивата при здравите контроли, а също и че серумните концентрации на VEGF корелират значително с напреднал FIGO стадий при тип II ендометриален карцином ($p < 0.001$), но не корелират с FIGO стадия при тип I тумори. При пациентки с тип I ендометриален карцином предтерапевтичните нива на VEGF-C корелират с FIGO стадия ($p < 0.05$), но не корелират със стадия при тип II карцинома.

Таблица 1. Пациентки и туморни характеристики

Характеристики	**Пациентки n (%)**	
	Тип I	**Тип II**
	76 (77.6)	22 (22.4)
Възраст		
≤ 60 г.	45 (59.2)	3 (13.6)
> 60 г.	31 (40.8)	19 (86.4)
Стадий		
I	43 (56.6)	5 (22.7)
II	24 (31.6)	10 (45.5)
III	9 (11.8)	7 (31.8)
Хистологична степен		
G1	41 (53.9)	-
G2	21 (27.7)	-
G3	14 (18.4)	22 100)

* Резултати от проучване на Dobrzycka B. et al.

Авторите на проучването посочват, че въпреки не напълно еднородните резултати от различни изследвания, все пак са налице убедителни данни, че нивата на VEGF и VEGF-C имат прогностично значение [116].

Трябва да се отбележи и фактът, че за ендометриалния карцином преобладават изследванията на VEGF в тъканни култури, а данните от такива в серум/плазма са единични. В този смисъл информацията от тези проучвания не може да бъде екстраполирана директно върху циркулиращите нива на VEGF при ендометриалния карцином.

Базирайки се на тези данни и предвид горепосоченото, беше определена целта на настоящия дисертационен труд.

Saito et al. [117] изследват ролята на ангиогенните фактори в нормален ендометриум и при ендометриалния карцином, и доказват, че тъканната експресия на VEGF е разпознаваема във всички фази, но не корелира с хистологичния тип.

Съществуват и други изолирани проучвания, например това на Fujimoto et al.,[118] които съобщават, че нивата на VEGF са значително по-високи в нормален ендометриум отколкото в ендометриален карцином. Така също нивата са обратно пропорционални на хистологичния тип, степента на инвазия на миометриума и клиничния стадий на заболяването.

Giatromanolaki et al. [98] пък не откриват асоциация между експресията на VEGF, хистологичния вид и стадия на болестта.

В заключение Dobrzycka et al. обобщават, че предоперативните нива на VEGF и VEGF-C са значително по-високи при жените с ендометриален карцином в сравнение с контролите и че стадият е независим рисков фактор. Тип I туморите в напреднал стадий не показват по-високи нива на VEGF с нарастване на стадия за разлика от тип II, а това, че концентрациите на VEGF-C са по-високи при ендометриалния карцином тип I в напреднал стадий предполага ролята му за прогресията на заболяването [116].

Ролята на лонгитудиналното проследяване на използваните маркери обаче предстои да бъде определена. Това проучване може да послужи като модел за аналогични изследвания и у нас, с включване и на допълнителни предполагаеми маркери при диагностицирането на ендометриалния карцином и определяне на прогнозата му.

Такъв допълнителен маркер може да бъде Фибронектинът (Fnc).

3. Фибронектин и злокачествени гинекологични заболявания

Фибронектинът е гликопротеин, който принадлежи към извънклетъчния матрикс. Той има високо молекулно тегло и показва голямо разнообразие от функции: адхезия между клетките, организация на цитоскелета, онкогенна трансформация и др. Описан е за първи път през 1948 година [119].

През 1975 г. Ruoslahti и Vaheri също откриват голям мултидомейн гликопротеин върху повърхност на фибробласти, който е наречен „повърхностен фибронектин“ [120].

Има две различни форми на Фибронектин (Fnc) - разтворима форма (плазмен Fnc) и неразтворима форма (клетъчен Fnc).

Разтворимата форма съществува в околоплодната течност, в цереброспиналната течност, в синовиалната течност и в базалните мембрани на клетките.

Клетъчният Fnc се намира във фибробластите, чернодробните клетки и ендотелните клетки. Генът FBN се намира в хромозоми 2 или 11.

Двата основни вида Fnc имат сходни физични и химични характеристики, но се различават по биологичната си активност и по ефекта върху трансформираните клетки. Основно се изследва плазмената му форма.

Напоследък е налице повишен интерес към нивата на Фибронектина поради откритата връзка със злокачествените клетки.

Установява се, че добавянето на Фибронектин от нормална към туморна клетка предизвиква изменения във физиологията на последната.

Доказана е липсата на Фибронектин при злокачествените клетки in vitro, поради което се коментира ролята му по отношение на метастазирането.

Фибронектинът присъства в множество типове клетки и е изключително важен за гръбначните организми, което е доказано от Gorge et al. през 1993 г. в проучване, което установява, че инактивирането на гена за Фибронектин предизвиква ранна ембрионална смърт на мишки [121].

Въпреки че Fnc е изучаван повече от две десетилетия, тази забележително сложна молекула все още е обект на научен интерес, като например намирането на нови интегрин- и хепарин-свързващи места (Mostafavi-Pour et al., 2001; Liao et al., 2002) или дори нова форма на молекулата [122], която медиира определена вирусна инфекция (Liu и Collodi, 2002).

Фибронектинът обикновено съществува като димер, съставен от две почти идентични субединици. Всеки мономер се състои от три типа повтарящи се единици: тип I, тип II и тип III. И трите типа повторение на Fnc се срещат и в други молекули, което предполага, че той еволюира чрез разбъркване на екзони [123].

Fnc има изключително голямо разнообразие от функции – освен свързването с клетъчните повърхности чрез интегрини, той се свързва и с редица биологично важни молекули, които включват хепарин, колаген/желатин и фибрин. Тези взаимодействия се медиират от няколко различни структурни и функционални домена, които са дефинирани чрез протеолитична фрагментация или анализи на рекомбинантна ДНК.

Grammatikakis et al. изследват плазмените нива на Fnc при пациентки с гинекологични ракови заболявания и при здрави жени. [124]

Изследването е проведено между 1998 и 2003 г., като в него участват 100 жени с хистологично диагностициран рак, изхождащ от гениталния тракт (20 случая с рак на шийката на матката, 20 случая с рак на яйчниците, 20 случая с рак на ендометриума и 40 случая с рак на гърдата) и 100 здрави жени - контроли. Използваният метод е радиална имунодифузия. Средната възраст на болните е 42,08 години (33 до 77 години), а на контролната група жени без заболяване е 41,1 години (32 до 65 години). Авторите на това проучване констатират, че плазмените нива на Fnc в групата с гинекологични карциноми са значително повишени в сравнение с контролната група. Също така се установява, че плазмените нива на Fnc са по-високи при злокачествени заболявания на гърдата и шийката на матката в сравнение с рак на яйчниците и ендометриума. Съществен въпрос през последните години е дали стойностите на Fnc могат да бъдат надежден маркер за карцином от гинекологичен произход.[124]

По отношение на връзката между Fnc и гинекологичните злокачествени заболявания се съобщава, че може да има положителна връзка между извънклетъчната молекула и тези злокачествени заболявания, така че плазмените нива на Fnc могат да служат като потенциален диагностичен маркер.

В миграцията на раковите клетки участват различни фактори, като интегрини, както и епидермален растежен фактор (EGF) в случаите на рак на шийката на матката [118-127]. Освен това естрадиол, естриол, прогестерон, медроксипрогестерон ацетат, даназол, EGF, трансформиращ растежен фактор-α (TGF-α) и TGF-β могат да играят роля в подвижността на раковите клетки на ендометриума и перитонеалната туморна клетъчна инвазия. Съобщава се и за повишени плазмени нива на Fnc и в случаите с рак на гърдата.

Ricciardelli и Rodgers описват повишени нива на Fnc при жени с рак на яйчниците [125]. Освен това Tan et al. установяват, че повишената миграция на ракови клетки при аденокарцином на ендометриума може да бъде свързана с Fnc [126]. Що се отнася до патогенезата на миграцията на раковите клетки на яйчниците, изглежда, че раковите клетки мигрират в перитонеума през интегрините, които взаимодействат с протеините на извънклетъчния матрикс, напр. Fnc. Според Grammatikakis et al. при жени с рак на яйчниците нивата на Fnc са повишени, макар и незначително.

Goldberg et al. [127] и Moro et al. [128] съобщават, че интегрините и EGF усилват взаимодействието между раковите клетки и извънклетъчните протеини, напр. Fnc. Резултатът е повишена подвижност и миграция на злокачествени клетки. Това е подкрепено и от Pichard et al., които изследват ролята на EGF и неговия рецептор (EGFR) в патогенезата на миграцията на ракови клетки [129].

Освен това Mitra et al. описват намалена миграция на ракови клетки след прилагане на антитела срещу интегрин, който е най-честият Fnc-рецептор [130].

Hauck et al. съобщават, че инхибиторите на фокална адхезионна киназа (ФАК) намаляват миграцията на ракови клетки [131]. ФАК се намира в раковите клетки и играе важна роля във взаимодействието между злокачествените клетки и извънклетъчните протеини, като Fnc.

Предполага се, че Fnc не само взаимодейства с първичния тумор, за да метастазира, но също така подготвя далечната тъкан, за да я превърне във възприемчива метастатична ниша за растежа на нови тумори. Туморните клетки също могат да индуцират свръхекспресия на FN в други видове клетки около тумора, за да произведат микросреда, подготвена за метастазиране и инвазия [132].

Установено е, че тумор-асоциираните мезотелиални клетки в модел на овариалния карцином проявяват свръхекспресия на Fnc, което позволява метастазирането на раковите клетки [133]. Доказано е, че Fnc достига това свое действие чрез индукция на епително мезинхимния преход (ЕМП), като се различават ЕМП – зависими и независими пътища.

При пациенти с плоскоклетъчен езофагеален карцином е налице подчертана зависимост между увеличената стромална експресия на Fnc и лимфните метастази, по-лоша обща преживяемост и по-кратко преживяване без прогресия [134].

В проучване, обхващащо 110 жени с първичен карцином на млечната жлеза, се установява корелация между размера на тумора, степента на инвазия и развитието на далечни метастази [135].

Съществуват данни за доказана висока експресия на Фибронектин при напреднал стадий на карцином на панкреаса [136].

Серумните нива на Fnc показват пряка зависимост и с протичането на острата лимфобластна левкемия [137].

При жени с рак на шийката на матката плазмените нива на Fnc са по-високи, отколкото при здравите контроли. Връзката между рака на ендометриума и адхезионните молекули, като Fnc, е проучвана от редица изследователи, които смятат, че много различни хормони и други фактори участват в развитието на миграцията на раковите клетки във връзка с извънклетъчните вещества [138, 139].

Ueda et al. описват намалено взаимодействие на ракови клетки на ендометриума с Fnc при използване на медроксипрогестерон ацетат и Даназол, което води до миграция на ракови клетки и инхибиране на инвазията [140], т.е. намаляващият ефект на прогестерона върху миграцията и инвазията на раковите клетки изглежда се индуцира от намалените нива на адхезионни извънклетъчни молекули, като интегрини и Fnc.

Проучвания на човешкия геном показват, че прогестеронът инхибира ефекта на ядрения фактор kB (NF-kB), който се характеризира със силна антипролиферативна активност.

Според Grammatikakis et al. плазмените нива на Fnc могат да представляват потенциален диагностичен маркер [124].

Според Qiao и Rong Lu свръхекспресията на Фибронектин в туморната микросреда очертава бъдещи тенденции за индиректното му използване като ориентир в образната диагностика на злокачествените заболявания и разработването на нови медикаменти за таргетна терапия, базирано на голямото разнообразие от интегринови рецептори [141].

Нашето проучване също потвърждава необходимостта от по-нататъшни изследвания с по-големи групи пациенти, които да отговорят на въпроса дали Фибронектинът (Fnc) може да бъде потенциален диагностичен маркер за злокачествени заболявания от гинекологично естество. Поради тази причина беше формулирана и една от задачите в нашето проучване.

4. Изводи от литературния обзор

- Нарастващата честота на карцинома на ендометриума в световен мащаб, включително и в България, обуславят значимостта на заболяването и необходимостта от търсенето на биомаркери с оглед оптимизиране на ранната диагноза и лечение
- Редица съвременни изследвания доказват съществената роля на ангиогенезата като допълнителен прогностичен фактор по отношение на прогнозата при злокачествените гинекологични заболявания, наред с известните до момента

- Съдово-ендотелният растежен фактор (VEGF) е един от съвременните биомаркери, който, изследван в тъканни култури или серум, би могъл да подпомогне разширяване познанията за възникването на ендометриалния карцином
- Редица автори разглеждат съдово-ендотелния растежен фактор (VEGF) и като възможен прогностичен фактор
- Налице е тенденция за дефинирането на Фибронектин като водещ глико-протеин в развитието на злокачествените заболявания
- Редица проучвания посочват евентуалната положителна връзка между извънклетъчната молекула и злокачествените клетки, поради което плазмените нива на Фибронектин могат да служат като съществен потенциален маркер
- Преобладаващите изследвания на VEGF и Фибронектин при жени с ендометриален карцином са в тъканни култури. Съществуват единични проучвания върху нивата на тези биомаркери в серум. Предвид направения задълбочен анализ на съществуващите до момента данни, се оформи идеята да бъдат извършени допълнителни изследвания, които да потвърдят или отхвърлят известната до сега информация

III. ЦЕЛ

Целта на настоящия дисератационен труд е да се изследват серумните нива на VEGF-A и Фибронектин при пациентки с малигнена патология на ендометриума и да се съпоставят с тези при жени с бенигнена такава и при здрави контроли.

IV. ЗАДАЧИ

1. Да се определят нивата на VEGF-A при пациентки с малигнена и бенигнена патология на ендометриума и при здрави контроли
2. Да се определят нивата на Фибронектин при пациентки с малигнена и бенигнена патология на ендометриума и при здрави контроли
3. Да се съпоставят нивата на VEGF-A и Фибронектин при жени с карцином на ендометриума в зависимост от стадия на заболяването
4. Да се съпоставят нивата на VEGF-A и Фибронектин при жени с карцином на ендометриума в зависимост от хистологичния вариант и степента на диференциация
5. Да се установи съществува ли корелация между възрастта на изследваните пациентки с карцином на ендометриума и нивата на VEGF-A и Фибронектин
6. Да се съпоставят нивата на VEGF-A и Фибронектин при жени с ендометриален карцином една спрямо друга
7. Да се определи евентуалното прогностично значение на VEGF-A и Фибронектина при жени с ендометриален карцином

V. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. МАТЕРИАЛ

За определяне нивата на Фибронектин и съдово-ендотелен растежен фактор (VEGF-A) в периода 19.05.2020 г. – 05.10.2021 г. беше взет биологичен материал – серум по предварително стандартизирани критерии от общо 211 пациентки на възраст между 30 и 87 години, като всички са пациентки на Първа и Втора гинекологични клиники към СБАЛАГ „Майчин дом“ - София.

При подбора на случаите бяха приложени следните включващи критерии:

1. Жени с абнормни кръвотечения във фертилна, пре-, пери- и пост-менопаузална възраст

2. Безсимптомни жени със случайно установена ултразвукова находка, суспектна за патология на ендометриума

3. Симптоматични пациентки с УЗ - данни за патология на ендометриума

4. Хистологично доказан карцином на ендометриума

5. Отсъствие на други доброкачествени и злокачествени заболявания от генитален и екстрагенитален произход

6. Възраст над 30 години

При подбора на случаите бяха приложени следните изключващи критерии:

1. Доброкачествени заболявания на миометриума като миома на матката и аденомиоза

2. Други малигнени хистологични варианти освен ендометриален карцином

3. Бенигнени и малигнени формации с яйчников произход

4. Анамнеза и/или обективни данни за неоплазия в активна форма или ремисия с екстрагенитален произход

5. Ситемни заболявания (автоимунни, чернодробни, бъбречни и др.)

От взетите общо 211 проби отпаднаха 29, вследствие на изключващите критерии, които бяха заложени в нашето проучване. Останалите проби бяха разпределени в три групи – 50 броя проби от пациентки с хистологично доказан ендометриален карцином, 50 броя проби от пациентки с хистологично доказан ендометриален полип и 50 броя проби от здрави контроли.

Пробите от здрави контроли бяха взети от жени без съпътстващи заболявания и без данни за ендометриална и друга генитална патология, съобразени с включващите и изключващите критерии, заложени в дисертационния труд - общо 82 проби, като в проучването на анализ бяха подложени 50 броя, а другите 32 не бяха включени, поради ограничената вместимост на китовете и поради това, че при част от пациентките липсата на ендметриална патология не беше изключена хистологично (пациентки след диагностична лапароскопия, пластика на влагалище, оперативни интервенции при инконтиненция – Burch, ММК).

Контролните проби в нашето проучване бяха разпределени както следва: хистероскопия – 24 % (12 пациентки), сепарирано пробно абразио - 32 % (16 пациентки) и вагинална хистеректомия – 44% (22 пациентки). (фиг.1)



Фиг.1 Разпределение на контролните проби

Преди вземането на биологичния материал на всяка пациентка в проучването беше попълнен фиш – анкетна карта, предварително изготвен формуляр за уточняване на диагноза, ръст, тегло, възраст, кръвно налягане, вредни навици, образование, месторабота, менархе, последна редовна менструация, брой бременности, придружаващи заболявания, предшестващи оперативни интервенции, фамилна анамнеза, резултат от хистологично изследване на ендометриума. Всяка пациентка в проучването попълни информирано съгласие за изследване на кръв и кръвни продукти по образец, с което декларира волята си за участие.

Всички проби бяха обработени и изследвани при строго спазване на всички правила в Клинична лаборатория и клинична фармакология на УМБАЛ „Александровска“ ЕАД – София.

2. МЕТОДИ

В дисерационния труд са използвани следните методи:

1. Анамнеза

- ПРМ
- Менархе
- Менструален цикъл – характеристика
- Раждания
- Аборти
- Фамилна анамнеза
- Придружаващи заболявания
- Предшестващи оперативни интервенции
- Телесна маса
- Ръст
- Оплаквания и причина за настоящата оперативна интервенция

2. Гинекологичен преглед

- ВПО
- Влагалище
- PVCU и CC
- Ex utero
- Матка
- Аднекси и параметри
- Cavum Douglasi

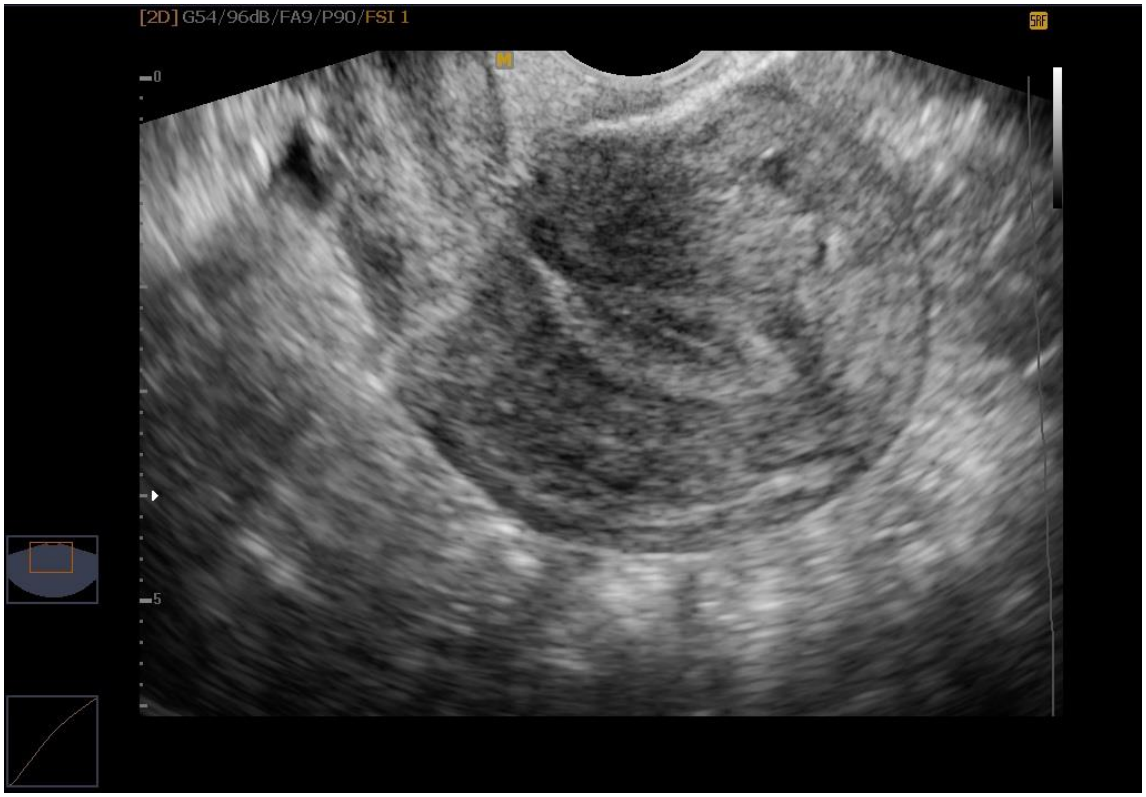
3. Лабораторни изследвания - общи

- ПКК
- Кръвна група и Rh-фактор
- Хемостаза (фибриноген и INR)
- Биохимия (кръвна захар, ASAT, ALAT, креатинин)
- Урина

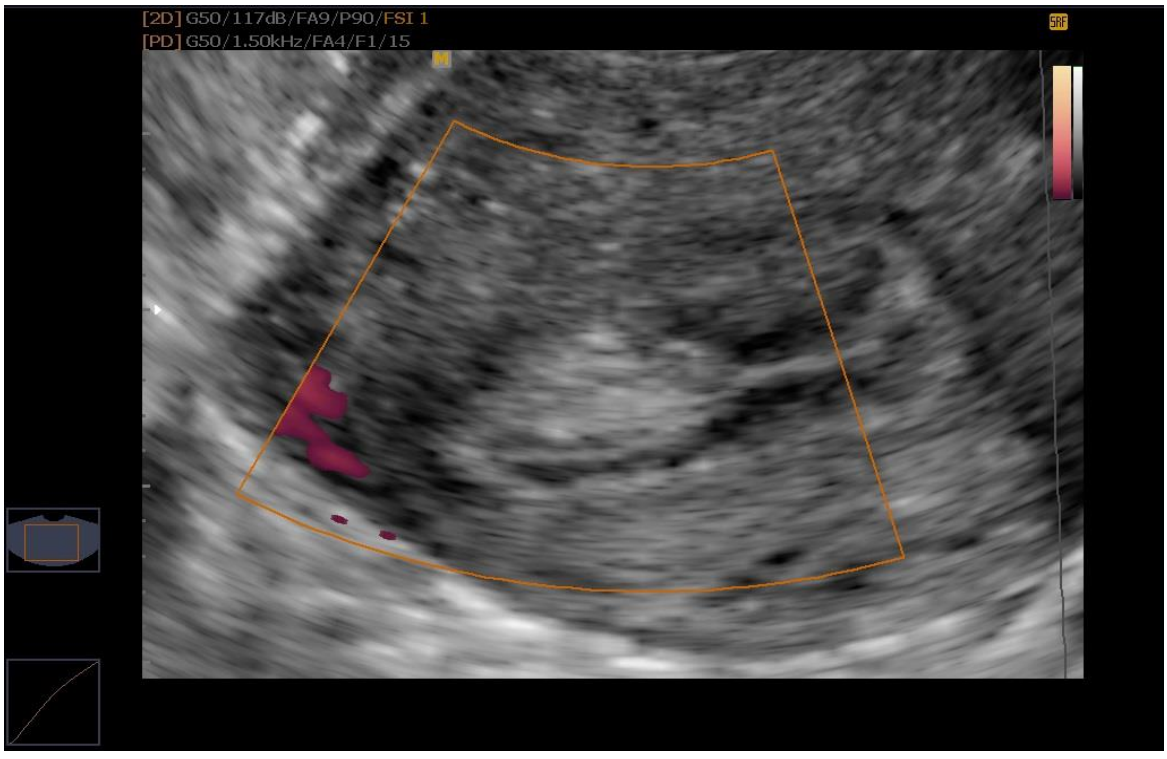
4. Образни методи – при всички пациентки беше извършено трансвагинално ехографско изследване с двуизмерна ехография на малък таз като част от цялостния гинекологичен преглед. Известно е, че ултразвукът е метод с висока чувствителност по отношение на патологията на ендометриума.

Ехофграфското изследване включва:

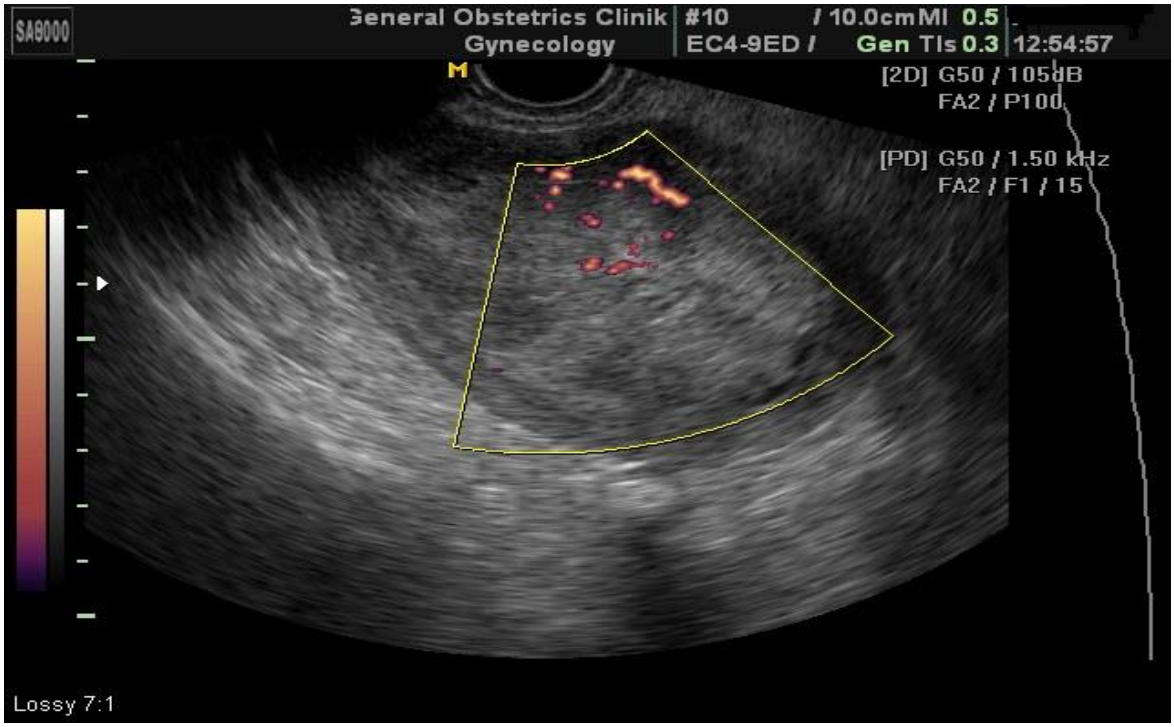
- Матка – измерване на предно-заден размер, оглед в сагитален и транзверзален план
- Измерване дебелина на ендометриума, отчитане наличие или отсъствие на фокални лезии, оценка на граници между ендометриум и миометриум
- Оглед, рамери и структура на яйчници
- Cavum Douglasi – наличие на свободна течност и абнормни находки
- Други ехографски особености



Приложение 1. Ехографско изображение на нормален ендометриум



Приложение 2. Ехографско изображение на полип на ендометриума



Приложение 3. Ехографско изображение на ендометриален карцином

5. Консултация с интернист и анестезиолог

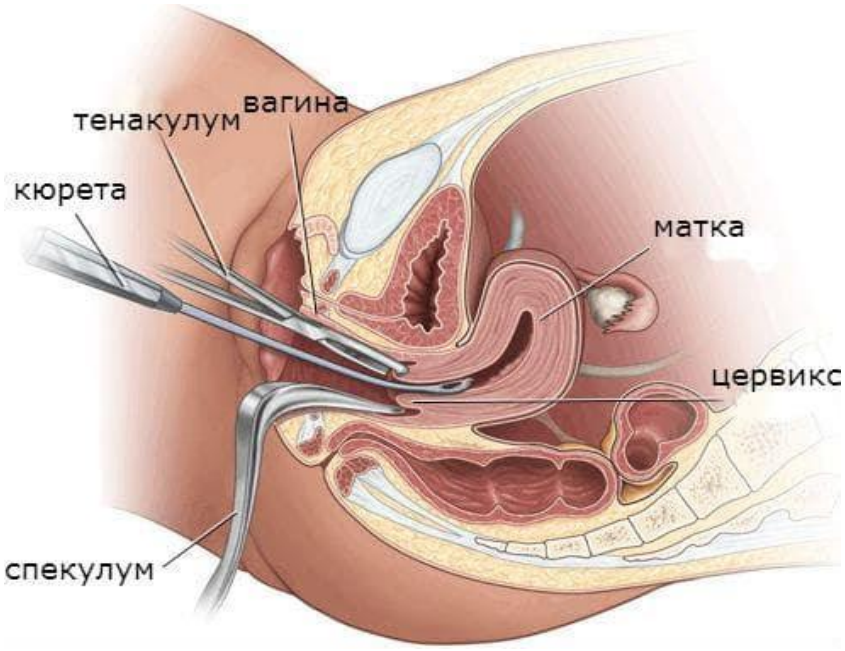
При всяка една пациентка в настоящото проучване беше извършена предоперативна консултация с интернист и анестезиолог.

6. Сепарирано пробно абразио

Наличието или отсъствието на ендометриална патология и нейния вид беше доказано чрез хистологично изследване на материал от маточната кухина, получен чрез абразио или хистероскопия.

„Златен стандарт“ за разграничаване на бенигнена и малигнена патология на ендометрума остава извършването на сепарирано пробно абразио.

При обхванатия контингент пациентки бяха спазени всички правила и техниката на описаната манипулация.

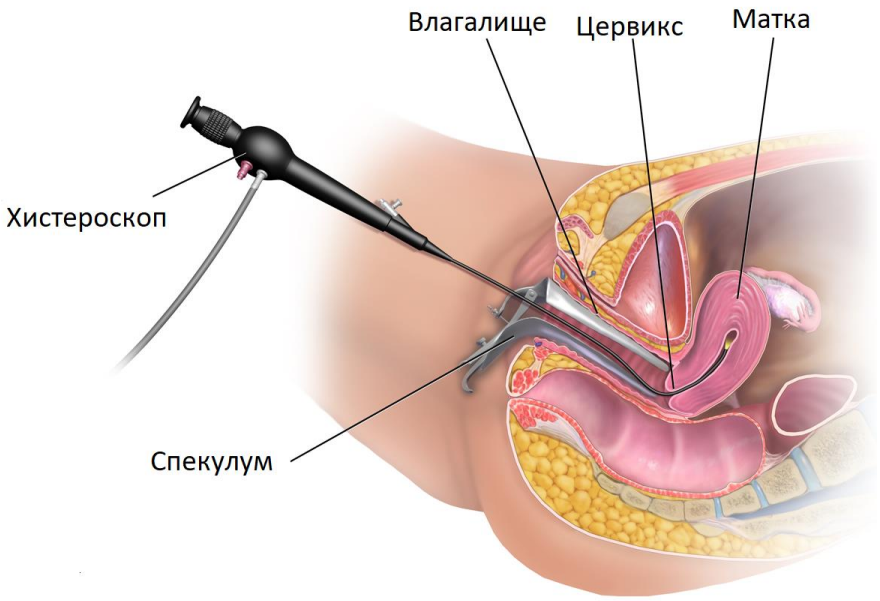


Приложение 4. Техника на извършване на сепарирано пробно абразио

7. Хистероскопия

В последните десетилетия хистероскопията е неразделна част от съвременната диагностика на ендометриалната патология. Тя бива диагностична и оперативна.

При всички изследвани пациентки с данни за фокални лезии на ендометриума беше използван именно този метод в съответствие с правилата на добрата медицинска практика.



Приложение 5. Техника на извършване на хистероскопия

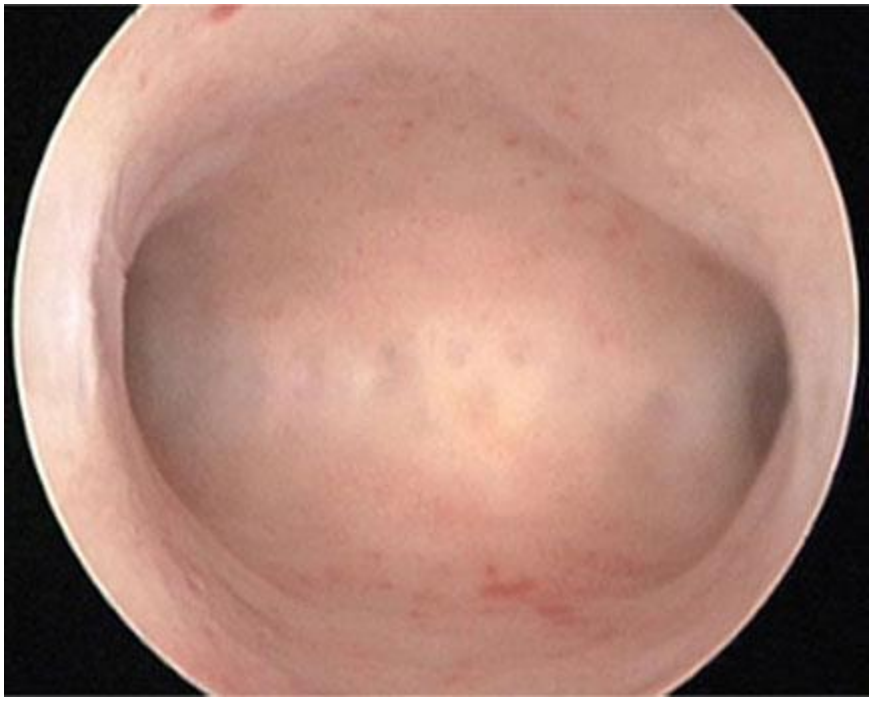


Приложение 6. Хистеро-резектоскоп Storz®

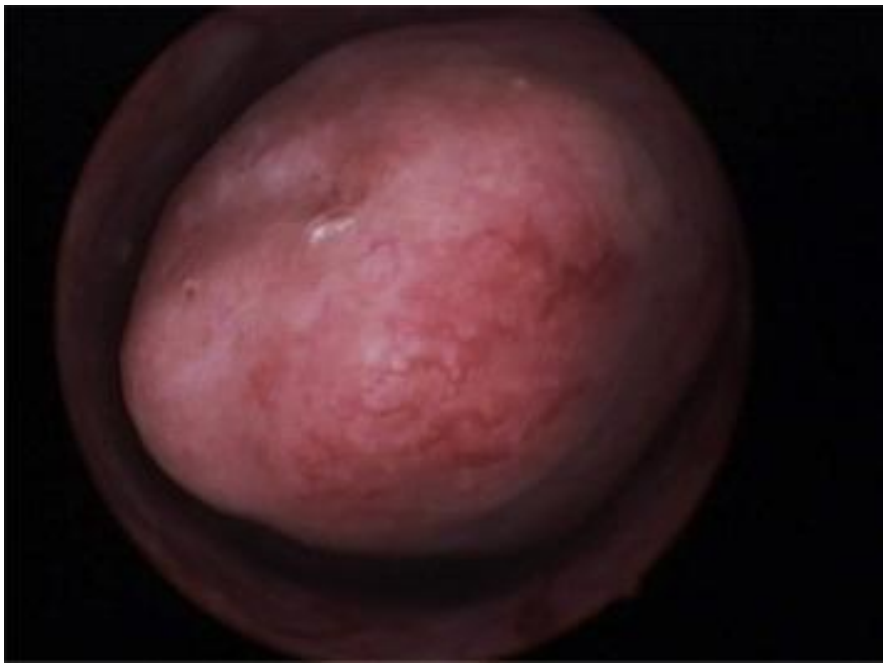
В нашето изследване за целта използвахме апаратура на Storz®.



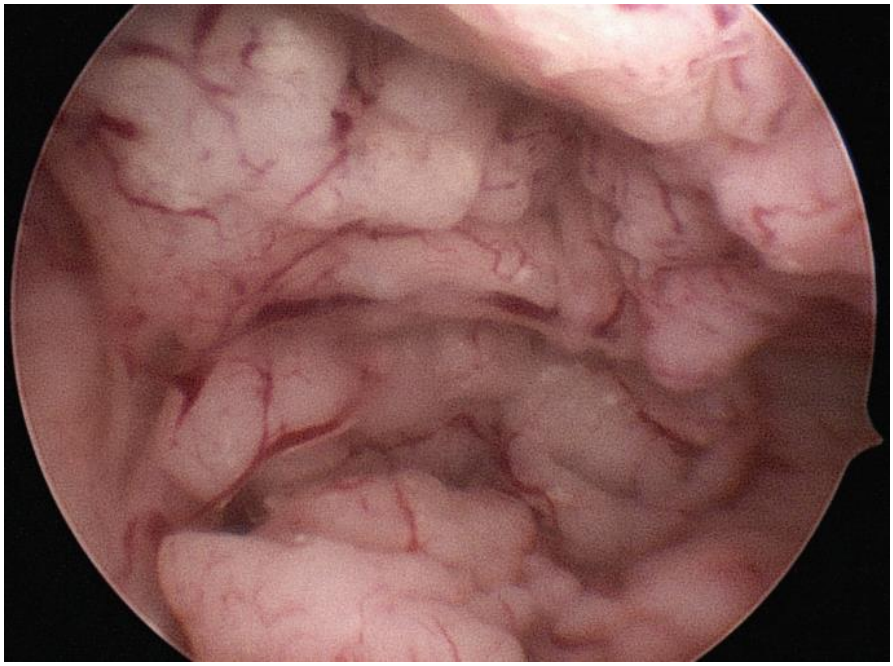
Приложение 7. Хистероскопска апаратура Storz®



Приложение 8. Хистероскопски образ при здрави пациентки



Приложение 9. Хистероскопски образ на ендометриален полип

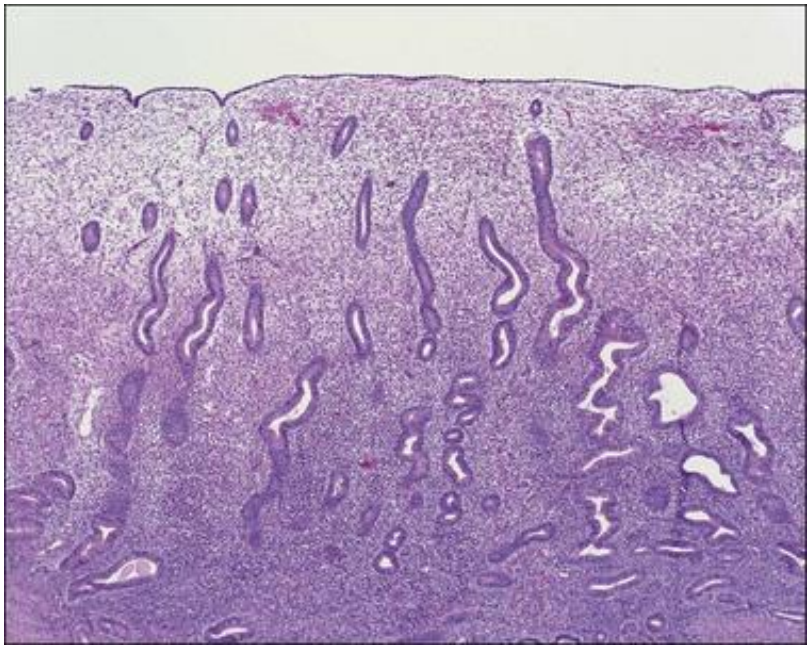


Приложение 10. Хистероскопски образ на ендометриален карцином

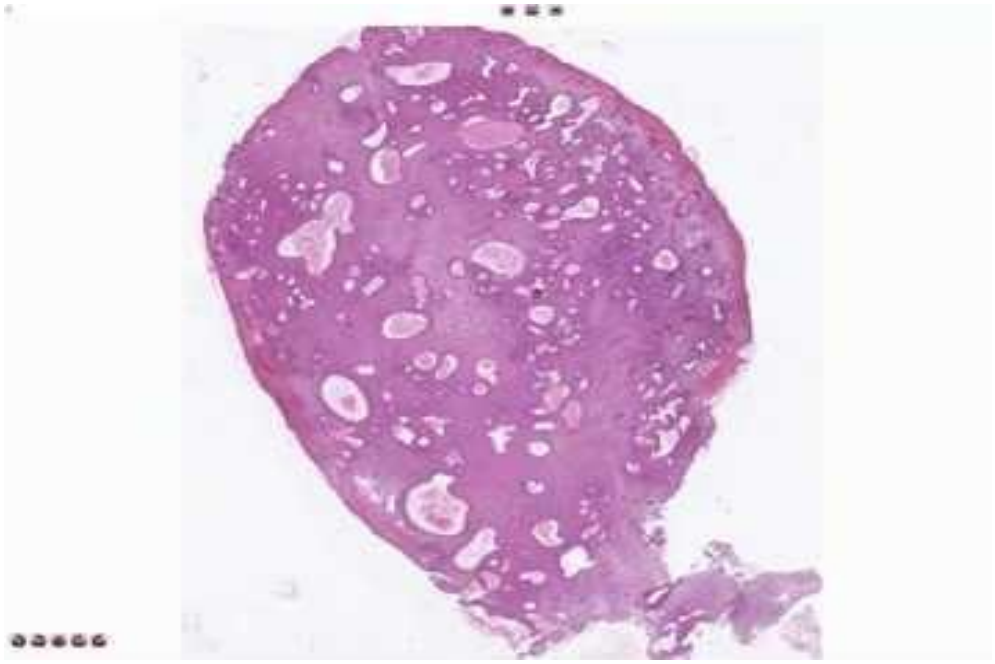
8. Хистологично изследване

При всяка една от изследваните пациентки взетият материал беше изследван хистологично за верификация на съответната диагноза в Отделение по Патоанатомия към СБАЛАГ „Майчин дом“ - София.

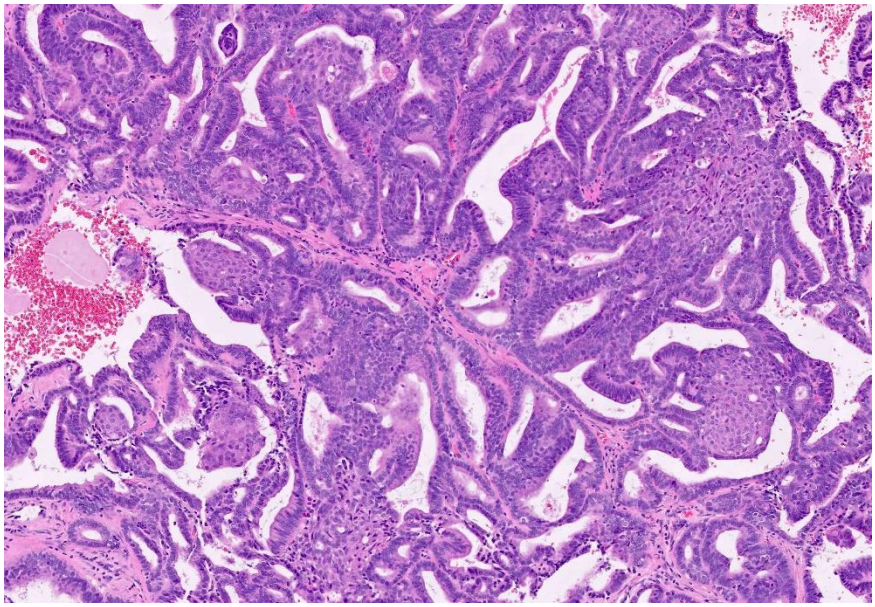
Хистологичният материал се фиксира в 10 % неутралнобуфериран формалин за минимум 24 часа. Следва рутинна обработка и оцветяване с Хематоксилин/еозин. При необходимост от парафиновите блокчета се изработват препарати за допълнителни изследвания (специални оцветявания).



Приложение 11. Хистологичен препарат на нормален ендометриум



Приложение 12. Хистологичен препарат при ендометриален полип



Приложение 13. Хистологичен препарат при ендометриален карцином

Таблица 2. Стадиране по TNM и FIGO на карцином на ендометриума

TNM		FIGO	
NM	Тяло на матката	IGO	Тяло на матката
is	Интраепителиално изменение (Carcinoma in situ)		Интраепителиално изменение (Carcinoma in situ)
1	Тумор, ограничен в тялото на матката	*	Тумор, ограничен в тялото на матката
1a	Тумор, ограничен в ендометриума, или инвазия до половината на миометриума	A*	Тумор, ограничен в ендометриума,или инвазия до половината на миометриума
1b	Тумор с инфилтрация на половинатаили повече на миометриума	B	Тумор с инфилтрация на половината или повече на миометриума
2	Туморът засяга цервикалната строма ноне излиза извън матката**	I	Туморът засяга цервикалната стромано не излиза извън матката**

3	Локална или регионална инвазия	II	Локална или регионална инвазия
3A	Инвазия на серозата, аднексите –Директна инвазия или метастази	IIA	Инвазия на серозата на матката, аднексите-директна инвазия или метастази
3B	Инвазия на влагалището или параметриумите - директна инвазия илиметастази	IIB	Инвазия на влагалището или параметриумите - директна инвазияили метастази
1, N2	Позитивни лимфни възли	IIC	Метастази в тазовите и или парааорналните лимфни възли**,****
1	Позитивни тазови лимфни възли	IIC1	Метастази в тазовите лимфни възли
2	Позитивни парааортални лимфни възли	IIC2	Метастази в парааорналните лимфни възлисъс или без метастази в тазовите лимфни Възли
4****	Инфилтрация на мускулатурата напикочния мехур или ректума	VA	Инфилтрация на мускулатурата на пикочниямехур или ректума или чревна лигавица
1	Далечни метастази	VB	Далечни метастази, абдоминални метастази или метастази в ингвиналните лимфни възли

9. Клинично-лабораторни – ELISA

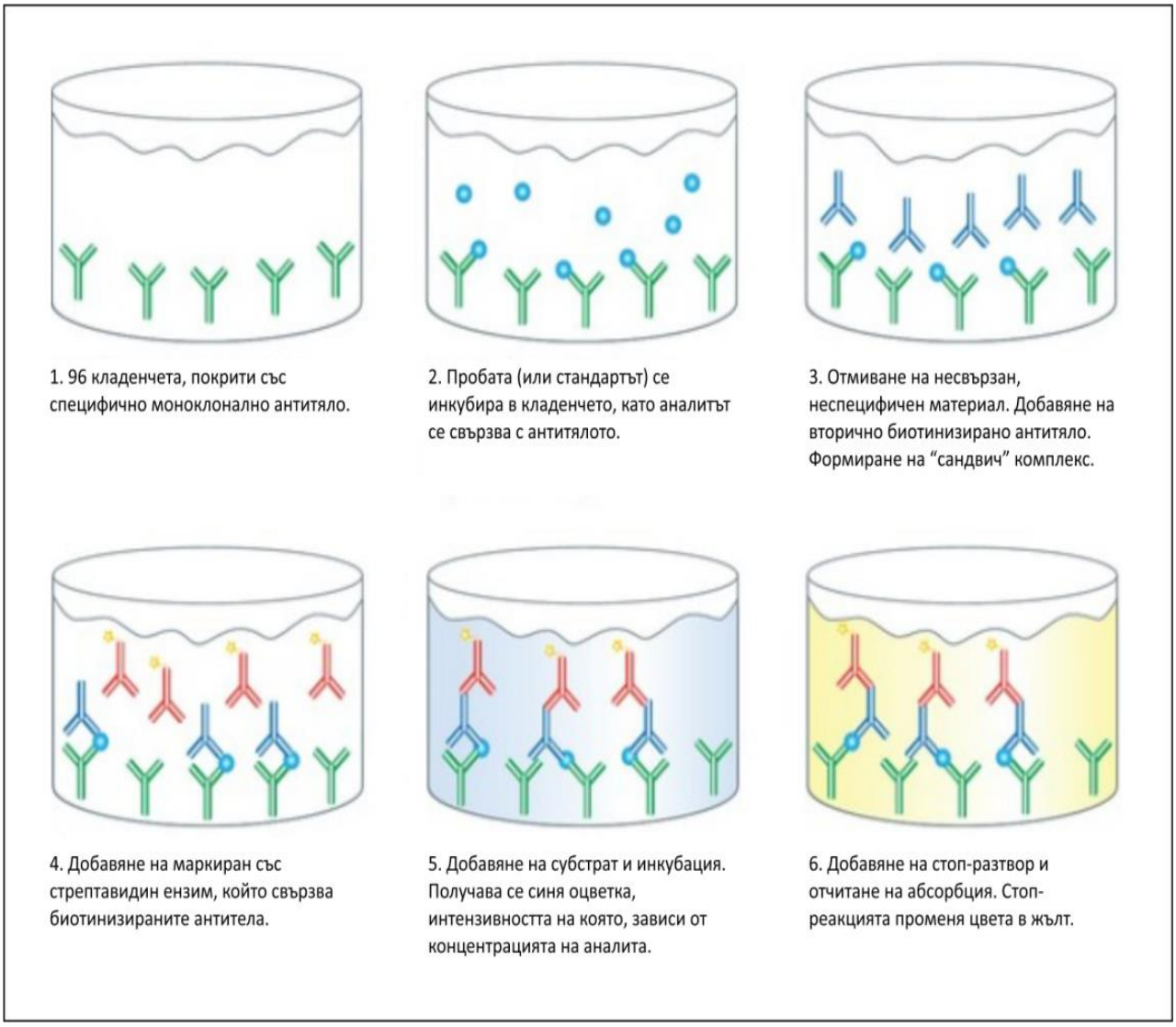
Кръвта за изследване на биомаркерите (Human Fibronectin и Human VEGF-A) беше взета при стандартизирани условия – сутрин между 07:30 и 09:00 ч., на гладно (след 12-часова хранителна пауза) от кубиталната вена във вакутейнер, съдържащ сепариращ гел.

След престой от 30 мин. на стайна температура за ретракция на съсирека, вакутейнерите бяха центрофугирани за 10 мин. при 4500 rpm за отделяне на кръвен серум.

С помощта на пипета с пластмасов накрайник за еднократно ползване серумът беше прехвърлен във вторични полипропиленови епруветки тип Eppendorf® при стриктно спазване на изискванията за отсъствие на хемолиза, липемия и иктер. Аликвотите бяха надлежно идентифицирани и съхранени при -20°C до извършване на анализа.

За определяне на Фибронектин (Fnc) и съдово-ендотелен растежен фактор (VEGF-A) беше използван ензимносвързан имуносорбентен метод (ELISA) тип „сандвич“.

Непосредствено преди всяка аналитична серия по една аликвота беше размразена до стайна температура.



Приложение 14. Схематичен модел на ELISA тип „сандвич“.
(2015 EMD Millipore Corporation©).

Таблица 3. Реагенти използвани в изследването на пробите

Реагенти:

- Antibody Coated Microtiter Strips
- Biotin Labelled Antibody Conc.
- Streptavidin-HRP Conjugate
- Master Standard
- Quality Control H
- Quality Control L
- Dilution Buffer
- Biotin-Ab Diluent
- Wash Solution Conc. (10x)
- Substrate Solution
- Stop Solution

Human Fibronectin (BioVendor®)

За определяне на Human Fibronectin в серумите беше използван кит - Human Fibronectin ELISA - BioVendor®, с производител Laboratorni Medicina a.s. - Чехия.

Всички проби бяха предварително разредени с разреждащ буфер в съотношение 1:10’000 (I. 10 µL серум + 990 µL буфер и II. 10 µL от разредка I. + 990 µL буфер).

Стандартните разтвори (калибратори) бяха приготвени на принципа на падащите разредки с калибрирани автоматични пипети.

След реконституиране на лиофилизирания стандарт, съгласно аналитичния протокол на производителя, беше получен stock-разтвор с концентрация 40 ng/mL

Fibronectin. В седем полипропиленови виалки бяха пипетирани по 225 µL разреждащ буфер, след което бяха приготвени падащите разредки посредством прехвърляне на 225 µL от предходния стандартен разтвор.

Така бяха получени стандартни разтвори (калибратори) с концентрации:

- 20
- 10
- 5
- 2.5
- 1.25
- 0.63
- 0.31 ng/mL

Преди аплицирането на калибраторите и пробите ямките бяха измити двукратно с миещ разтвор, съгласно указанията на производителя. В покритите с моноспецифични антитела кладенчета бяха пипетирани по 100 µL от стандартните разтвори (A1+2, B1+2, C1+2, D1+2, E1+2, F1+2, G1+2) и празната проба за реактиви (H1+2). В останалите кладенчета бяха аплицирани по 50 µL от предварително разредените, съгласно указанията на производителя, серумни проби + 50 µL буфер. Беше добавен по 50 µL Biotin-Conjugate във всички ямки. Плаката беше покрита с адхезивно фолио и инкубирана за един час на стайна температура в орбитален шейкър при 300 rmp.

С помощта на автоматично миещо устройство беше извършено прецизно отпипетиране на кладенчетата, последвано от шесткратно измиване с 350 µL миещ разтвор. В края на първото измиване плаката беше внимателно обърната върху дебела филтърна хартия, за да бъде отстранена цялата остатъчна течност.

С помощта на автоматична пипета тип “stepper” във всяко кладенче бяха добавени по 100 µL реактив, съдържащ Streptavidin-HRP. Последва повторна инкубация за един час на стайна температура при 300 rpm. Кладенчетата бяха

отново шесткратно измити с 350 µL миещ разтвор. Във всяко кладенче бяха пипетирани по 100 µL TMB Substrate Solution с последваща инкубация за 10 минути в тъмна камера на стайна температура, след което цветната реакция беше стопирана чрез добавяне на 100 µL стоп разтвор във всяко кладенче. Абсорбцията беше отчетена с помощта на ELISA отчитащо устройство Anthos Zenyth 3100 при 450 nm с референтен филтър 650 nm. Концентрациите бяха определени на базата на калибрационната крива в ng/mL, а резултатите умножени по фактора на раз-реждане на пробите и преизчислени в µg/mL.

Human VEGF-A (Diaclone®)

За определяне на Human VEGF-A в серумите беше използват кит – Human VEGF-A ELISA Kit, с производител Diaclone® - Франция.

Всички серуми бяха размразени до стайна температура преди извършване на анализа.

Стандартните разтвори (калибратори) бяха приготвени на принципа на падащите разредки с калибрирани автоматични пипети.

След реконституиране на лиофилизирания стандарт, съгласно аналитичния протокол на производителя, беше получен stock-разтвор с концентрация 2 ng/mL VEGF-A. В шест полипропиленови виалки бяха пипетирани по 100 µL разреждащ буфер, след което бяха приготвени падащите разредки посредством прехвърляне на 100 µL от предходния стандартен разтвор.

Така бяха получени стандартни разтвори (калибратори) с концентрации:

- 1000
- 500
- 250
- 125
- 62.5

- 31.25 pg/mL

Преди аплицирането на калибраторите и пробите, ямките бяха измити еднократно с миещ разтвор, съгласно указанията на производителя.

В покритите с моноспецифични антитела кладенчета бяха пипетирани по 100 µL от стандартните разтвори (A1+2, B1+2, C1+2, D1+2, E1+2, F1+2) и празната проба за реактиви (G1+2). В останалите кладенчета бяха аплицирани по 50 µL от серумните проби + 50 µL буфер. Плаката беше покрита с адхезивно фолио и инкубирана за два часа на стайна температура в орбитален шейкър при 300 rmp. С помощта на автоматично миещо устройство беше извършено прецизно отпипетиране на кладенчетата, последвано от трикратно измиване с 350 µL миещ разтвор. В края на първото измиване плаката беше внимателно обърната върху дебела филтърна хартия, за да бъде отстранена цялата остатъчна течност. С помощта на автоматична пипета тип “stepper” във всички ямки бяха добавени по 100 µL предварително приготвен, съгласно аналитичния протокол, Biotin Conjugate с последваща инкубация за един час при същите условия както в предходната стъпка.

Беше повторено трикратното промиване на ямките. Последва аплициране във всички ямки на 100 µL реактив, съдържащ Streptavidin-HRP. Последва повторна инкубация за един час на стайна температура при 300 rpm. Ямките бяха отново трикратно промити с 350 µL миещ разтвор. Във всяка ямка бяха пипетирани по 100 µL Substrate Solution с последваща инкубация за 25 минути в тъмна камера на стайна температура, след което цветната реакция беше стопирана чрез добавяне на 100 µL стоп разтвор във всяка ямка. Абсорбцията беше отчетена с помощта на ELISA отчитащо устройство Anthos Zenyth 3100® при 450 nm с референтен филтър 650 nm. Концентрациите бяха определени на базата на калибрационната крива в pg/mL.



Приложение 15. Отчитащо устройство Anthos Zenyth 3100®

10. Статистически методи:

В нашето проучване бяха използвани следните статистически методи:

- Дескриптивен анализ за представяне на честотното разпределение на различни демографски и клинични характеристики
- Вариационен анализ за оценка на характеристиките на централната тенденция и статистическото разсейване
- Тест на Колмогоров-Смирнов и Shapiro-Wilk за проверка на разпределението за нормалност
- T-test на Student-Fisher за установяване на статистически значими разлики при категорични променливи
- Chi-square test при прието ниво на значимост от 95%

- Коефициент на корелация на Pearson за изследване на връзката между две променливи
- Wilcoxon Signed-Ranks Test за сравняване на повтарящи се измервания
- Receiver-Operating Characteristic (ROC) криви и изчислени Area Under the Curve (AUC) за оценка на чувствителността и специфичността на лабораторните показатели
- Множествен регресионен анализ за оценка на функционалните зависимости между лабораторните показатели и други демографски и клинични параметри
- Тест на D'Agostino-Pearson
- ANOVA – тест – еднофакторен дисперсионен анализ за сравнение на средните аритметични стойности на повече от две независими извадки

Статистическата обработка на резултатите беше извършена, анализирана и онагледена чрез софтуерът SPSS v. 17.

VI. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Изборът на метод за сравняване стойностите между трите групи беше направен след тестване статистическото разпределение на двете променливи (VEGF-A и Фибронектин) за отклонение от нормалното разпределение чрез теста на D'Agostino-Pearson.

И двете променливи се отклоняваха значимо от нормалното разпределение – VEGF-A ($K2 = 84.20$, $p < 0.001$) и Фибронектин ($K2 = 57.06$, $p = 0.001$). VEGF-A показа и наличие на няколко екстремно високи стойности. Поради това за сравняването на стойностите на VEGF-A и Фибронектин между трите групи (с карцином, с полип и контролна) използвахме непараметрични тестове, които не изискват сравняваните променливи да са нормално разпределени – Kruskal-Wallis тестът бе използван за Фибронектин, а Mood's Median тестът за VEGF-A (Mood's Median тестът показва по-висока устойчивост при наличие на екстремни стойности).

Въпреки това като анализ на чувствителността беше проверено дали резултатите се потвърждават и чрез използването на дисперсионен анализ (ANOVA-тест) и се установи, че заключенията за междугруповите различия не се променят. Затова в частта Резултати представяме данните от по-устойчивите на отклонения от нормалното разпределение непараметрични тестове.

1. Резултати от изследване нивата на VEGF-A при пациентки с малигнена и бенигнена патология на ендометриума

По първа задача в нашето проучване бяха изследвани нивата на VEGF –A в серум в трите групи – група на пациентки с карцином на ендометриума – 50 броя, група с ендометриален полип – 50 броя и контролна група – 50 броя.

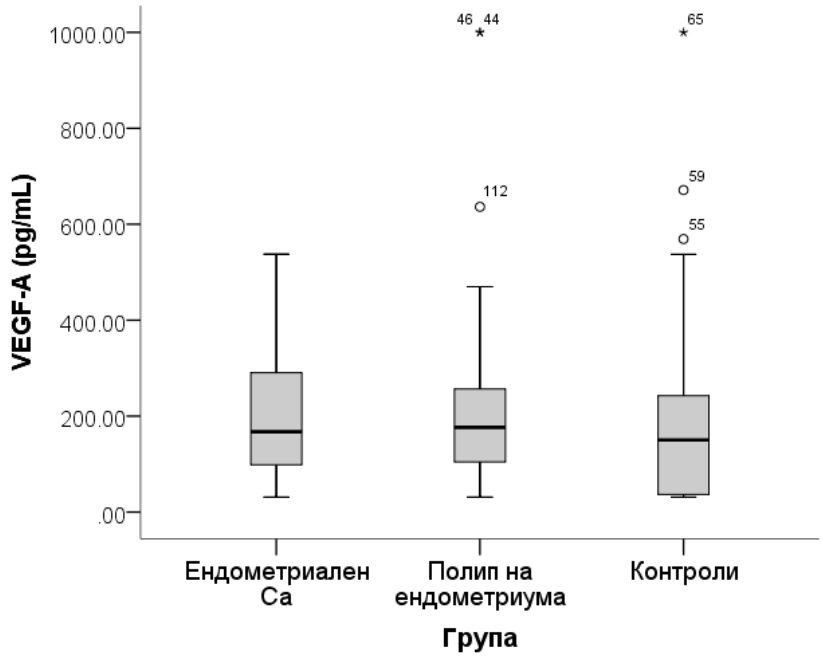
На *фиг. 2* се вижда, че променливата VEGF-A се отклонява от нормалното разпределение, което обоснова използването на непараметрични тестове за сравнение между трите групи.

Също така в контролната група и групата с полип разпределението на показателя е изместено към по-ниски стойности.



Фиг 2. Разпределение на стойностите на VEGF-A в трите групи

По отношение на VEGF-A Mood's Median тестът не беше значим за междугрупови различия (1.44, df = 2, p = 0.487), като не показа наличието на значими различия в стойностите между контролната група (средна 189.67, медиана 150.34 pg/mL) и групите с карцином (средна 204.30, медиана 167.57 pg/mL) и полип (средна 224.39, медиана 176.41 pg/mL) (фиг 3).



Фиг 3. Сравнение на стойностите на VEGF-A между трите групи

Обсъждане на резултати по задача 1

Трябва да се отбележи, че от направената разширена литературна справка за нивата на VEGF при ендометриален карцином преобладават изследванията на фактора в тъканни култури, а данните от такива в серум са единични.

Едно от най-значимите проучвания над серумните нива на VEGF е на Dobrzycka et al., които изследват връзката между нивата на VEGF и VEGF-C при жени с ендометриален карцином преди стартиране на лечение.

Техният труд обхваща контингент от 98 пациентки, при които циркулиращите серумни нива на VEGF и VEGF-C са определяни чрез ELISA – ензимно свързан имуносорбентен анализ. Авторите съобщават, че нивата на VEGF при 76 от изследваните с тип I и при 22 с тип II ендометриален карцином са значително по-високи, отколкото тези при здравите контроли ($p < 0.001$). Разликите

в средните нива на VEGF-C при двата вида тумори в сравнение с контролата са сигнификантни ($p < 0.001$).

Резултатите от изследването показват, че нивата на VEGF и VEGF-C са значително повишени при ендометриалния карцином в сравнение с нивата при здравите контроли.

Авторите на проучването посочват, че въпреки ненапълно еднородните резултати от различни проведени изследвания все пак са налице убедителни данни, че нивата на VEGF и VEGF-C имат прогностично значение.

В нашето проучване при изследването нивата на VEGF-A в трите групи не се установяват статистически значими разлики в нивата на VEGF-A в серума на изследваните пациентки.

Нивата на VEGF-A в серум показват повишение в групата на жени с ендометриален карцином в сравнение с останалите две групи, което обаче не показва достатъчна статистическа значимост.

Предвид съществуващите сравнително малко на брой и ненапълно еднородни резултати относно прогностичното значение на нивата VEGF-A в серум нашето проучване затвърди тези данни.

Извод:

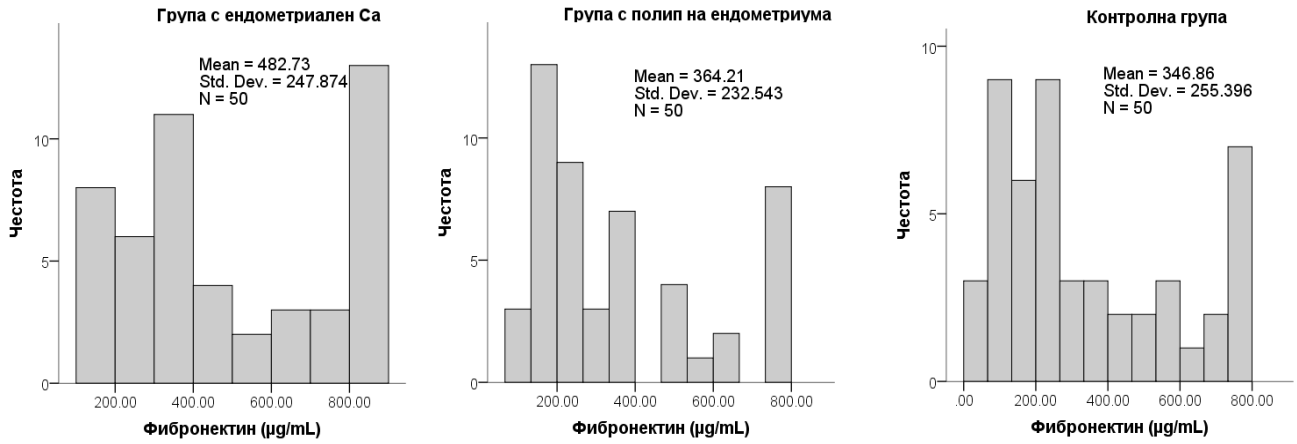
Настоящото проучване, подобно на други такива, установи повишени серумни нива на VEGF при жени с ендометриален карцином в сравнение с останалите две групи, но не установи достатъчна статистическа значимост

2. Резултати от изследване на Фибронектин при пациентки с малигнена и бенигнена патология на ендометриума

По втора задача в текущото проучване бяха изследвани нивата на Фибронектин в серум в трите групи – група на пациентки с карцином на ендометриума – 50 броя, група с ендометриален полип- 50 броя и контролна група – 50 броя.

На *фиг. 4* се вижда, че променливата Фибронектин се отклонява от нормалното разпределение, което обоснова използването на непараметрични тестове за сравняване между трите групи.

Също така в контролната група и групата с полип разпределението на показателя е изместено към по-ниски стойности.

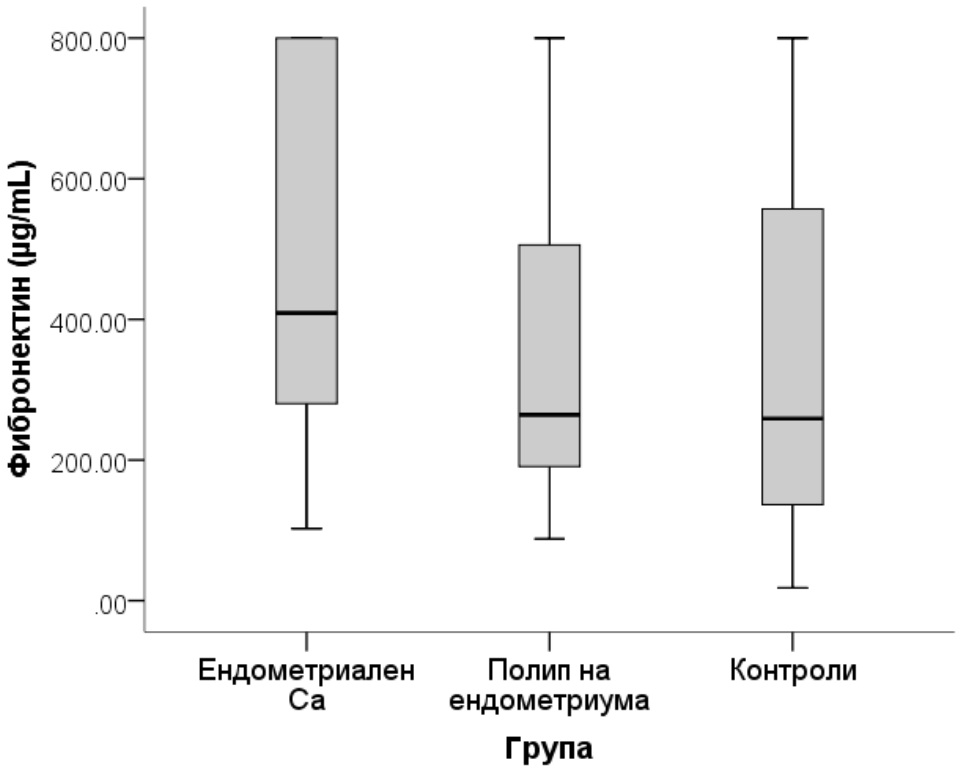


Фиг 4. Разпределение на стойностите на фибронектин в трите групи

Тестът на Kruskal-Wallis беше значим за междугрупови различия (10.11, df = 2, p = 0.006), като показа, че стойностите на Фибронектин в групата с карцином (средна 482.73, медиана 409.12 µg/mL) са статистически значимо по-високи (p = 0.008) отколкото в контролната група (средна 346.86, медиана 258.87 µg/mL).

Стойностите на Фибронектин в групата с полип (средна 364.21, медиана 264.25 µg/mL) обаче не се различават значимо от тези в контролната група (p = 1.000) (фиг. 5).

Разликата в стойностите между групите с карцином и с полип почти достига статистическа значимост (p = 0.054).



Фиг 5. Сравнение на стойностите на Фибронектин между трите групи

Обсъждане на резултати по задача 2

При направената разширена литературна справка за нивата на Фибронектин в серум при жени с ендометриален карцином се установи, че има единични такива данни.

В своето проучване Grammatikakis et al. изследват плазмените нива на Fnc при пациентки с гинекологични ракови заболявания и при здрави жени.

Изследването е проведено между 1998 и 2003 г., като в него участват 100 жени с хистологично диагностициран рак, изхождащ от гениталния тракт (20 случая с рак

на шийката на матката, 20 случая с рак на яйчниците, 20 случая с рак на ендометриума и 40 случая с рак на гърдата) и 100 здрави жени - контроли.

Авторите съобщават, че плазмените нива на Фибронектин в групата с гинекологични карциноми са значително повишени в сравнение с контролната група. Също така се установява, че плазмените нива на Фибронектин са по-високи при злокачествени заболявания на гърдата и шийката на матката в сравнение с рак на яйчниците и на ендометриума.

През последните години съществен въпрос остава дали стойностите на Фибронектин могат да се окажат надежден маркер за карцином от гинекологичен произход, в частност и за ендометриалния карцином.

Нашите резултати се доближават и потвърждават тези от други проучвания, особено касаещите съпоставката на стойностите на Фибронектин между групата с карцином и контролната група.

Извод:

Съпоставяйки резултатите от настоящото проучване с тези на други автори установихме, че са налице повишени нива на Фибронектин в серума на жени с ендометриален карцином в сравнение с останалите две групи, което показва статистическа значимост.

3. Резултати от съпоставка нивата на VEGF-A и Фибронектин в зависимост от стадия

По задача три в нашето проучване бяха изследвани серумните нива на VEGF-A и Фибронектин в зависимост от стадия на заболяването.

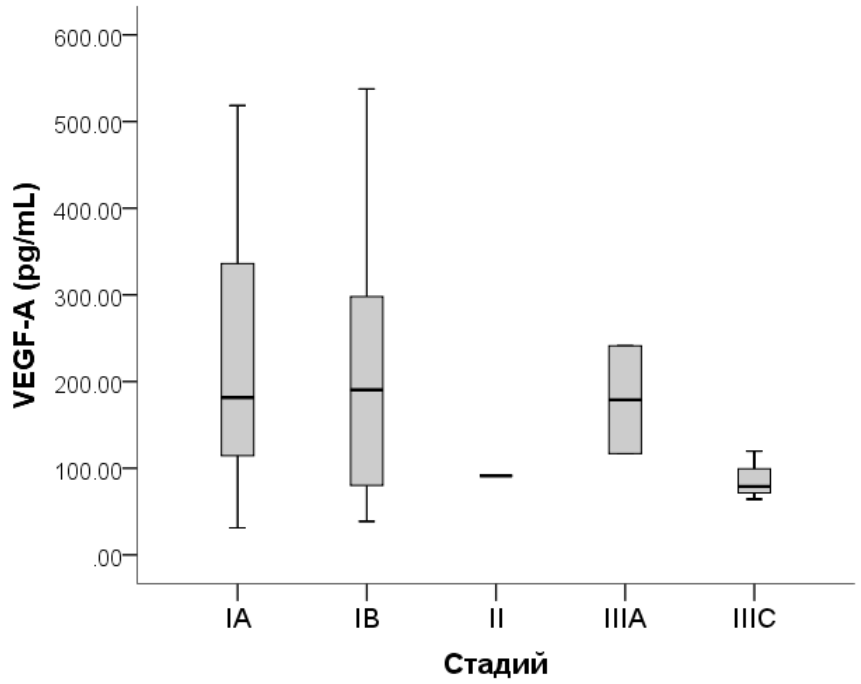
Всички пациентки с ендометриален карцином в пручването са оперирани и имат постоперативно стадиране на база хистологичния резултат.

Жените с еднометриален карцином бяха разпределени както следва – 28 пациентки в стадий I A (56%), 16 пациентки в стадий I B (32%) , 1 пациентка в стадий II (2%), 2 пациентки в стадий III A (4%) и 3 пациентки в стадий III C (6%). (фиг.6)



Фиг 6. Процентно разпределение на пациентките с ендометриален карцином в зависимост от стадия

По отношение на VEGF-A Mood's Median тестът не беше значим за междугрупови различия (3.23, df = 3, p = 0.357), като показа, че стойностите на VEGF-A не се различават значимо между пациентките в стадий IA (средна 221.06, медиана 181.62 pg/mL), IB (средна 207.08, медиана 190.39 pg/mL), IIIA (средна 179.02, медиана 179.02 pg/mL) и IIIC (средна 87.61, медиана 79.01 pg/mL). (фиг. 7).

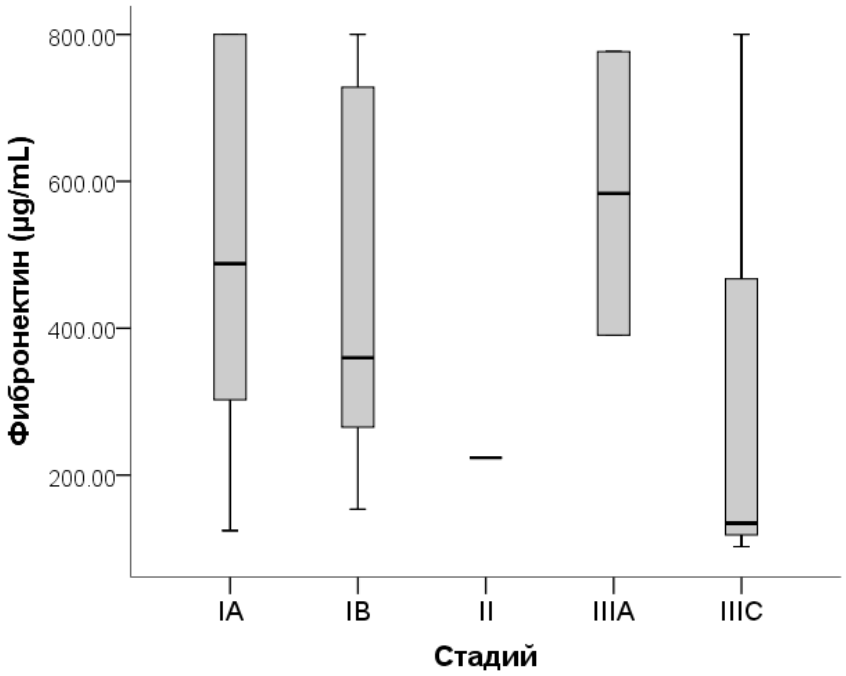


Фиг 7. Сравнение на стойностите на VEGF-A по стадий

Тестът на Kruskal-Wallis не беше значим за междугрупови различия (2.44, df = 3, p = 0.486), като показа, че стойностите на Фибронектин не се различават значимо между пациентките в стадий IA (средна 518.39, медиана 487.82 µg/mL), IB (средна 449.60, медиана 359.88 µg/mL), IIIA (средна 583.65, медиана 583.65 µg/mL) и IIIC (средна 345.66, медиана 134.50 µg/mL).

Предвид малкия брой случаи в някои от групите, макар и визуално средните стойности между групите да се отличават, няма статистически значимо различие между тях. (фиг. 8)

От последващите анализи е изключен единичен случай поради ниска статистическа мощност – единствената пациентка в стадий II.



Фиг 8. Сравнение на стойностите на Фибронектин по стадии

Обсъждане на резултати по задача 3

На база на анализираните литературни източници се оформиха две тенденции – според някои автори (Giatromanolaki et al.) стадият на заболяването е независим рисков фактор, докато други смятат, че високите серумни нива на VEGF при ендометриален карцином съответстват на напреднал стадий на заболяването.

В проучването на Dobrzycka et al. относно серумните нива на VEGF при жени с ендометриален карцином в зависимост от стадия се анализира връзката между стойностите на маркера и стадия на заболяването.

Резултатите от тяхното изследване показват, че серумните концентрации на VEGF силно корелират с напреднал стадий на заболяването по FIGO при тип II рак на ендометриума ($p < 0.001$), а също така, че предоперативните нива на VEGF-C

корелират с напреднал стадий и при тип I ендометриален карцином ($p < 0.05$). Според авторския колектив стойността на лонгитудиналното измерване на използваните маркери тепърва трябва да се оцени и да бъдат направени допълнителни изследвания.

Нашите резултати по тази задача съвпадат с тези на други автори, които посочват, че стадият е независим рисков фактор.

Стойностите на VEGF в отделните стадии не показаха статистически значими отклонения.

Не се констатираха значими отклонения и в стойностите на Фибронектин в различните стадии на заболяването.

Извод:

В стадий I A, I B, III A и III C при пациентки с карцином на ендометриума не се установиха различия в серумните нива на VEGF. Серумните нива на Фибронектин също не корелират със стадия на заболяването.

4. Резултати от съпоставката нивата на VEGF-A и Фибронектин при жени с карцином на ендометриума в зависимост от хистологичния вариант и степента на диференциация

По задача четири в нашето проучване бяха съпоставени серумните нива на VEGF-A и Фибронектин в зависимост от хистологичния вариант и степента на диференциация на ендометриалния карцином.

По отношение на хистологичния вариант жените с еднометриален карцином бяха разпределени, както следва – 28 пациентки с ендометроиден карцином

(56%), 19 пациентки със смесен карцином (38%) и 3 пациентки със светлоклетъчен карцином (6%). (фиг.9).



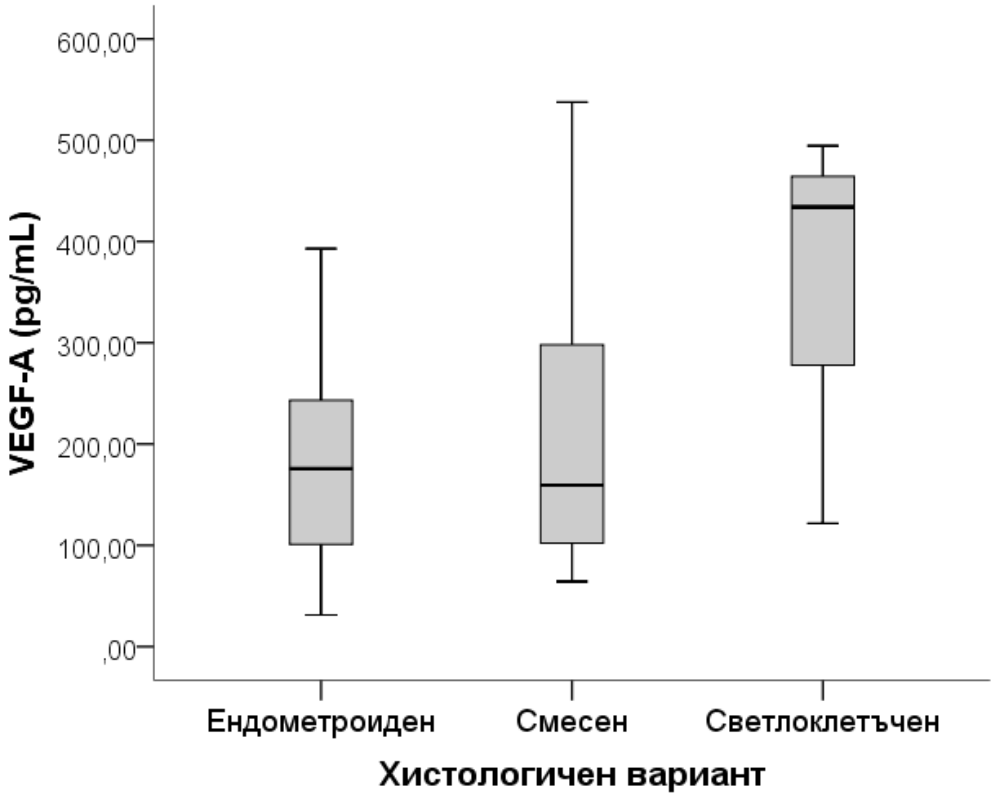
Фиг 9. Процентно разпределение на пациентките с ендометриален карцином според хистологичния вариант

Според степента на диференциация жените с еднометриален карцином бяха разпределени както следва – 12 пациентки с високодиференциран карцином (24%), 33 пациентки с умеренодиференциран карцином (66%) и 5 пациентки с нискодиференциран карцином (10%). (фиг. 10).



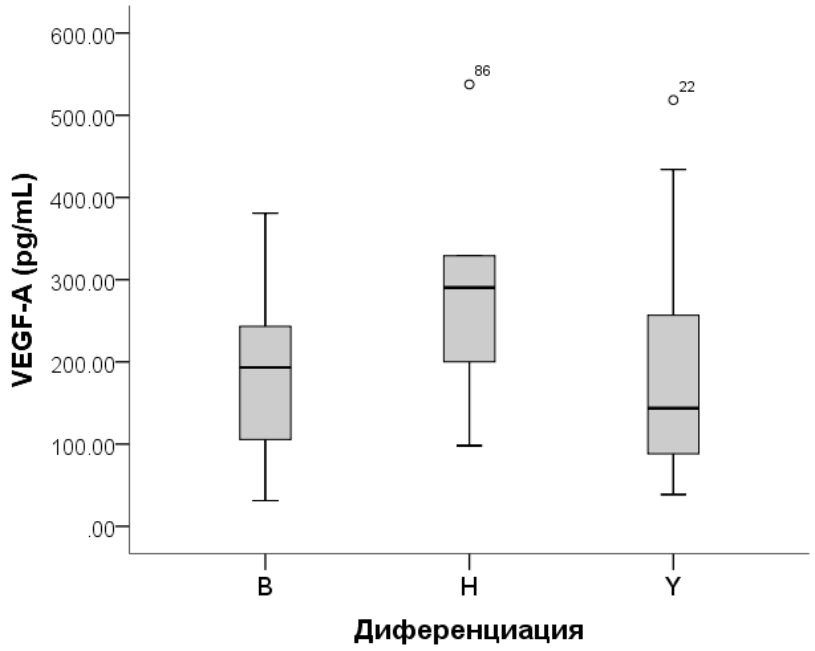
Фиг 10. Процентно разпределение на пациентките с ендометриален карцином по степен на диференциация

По отношение на VEGF-A Mood's Median тестът не беше значим за между-групови различия, като се установи, че нямаше значими различия по хистологичен вариант (0.40, df = 2, p = 0.818) между ендометроиден (средна 186.22, медиана 175.80 pg/mL), смесен (средна 213.57, медиана 159.35 pg/mL) и светлоклетъчен (средна 350.07, медиана 434.02 pg/mL). (фиг. 11).



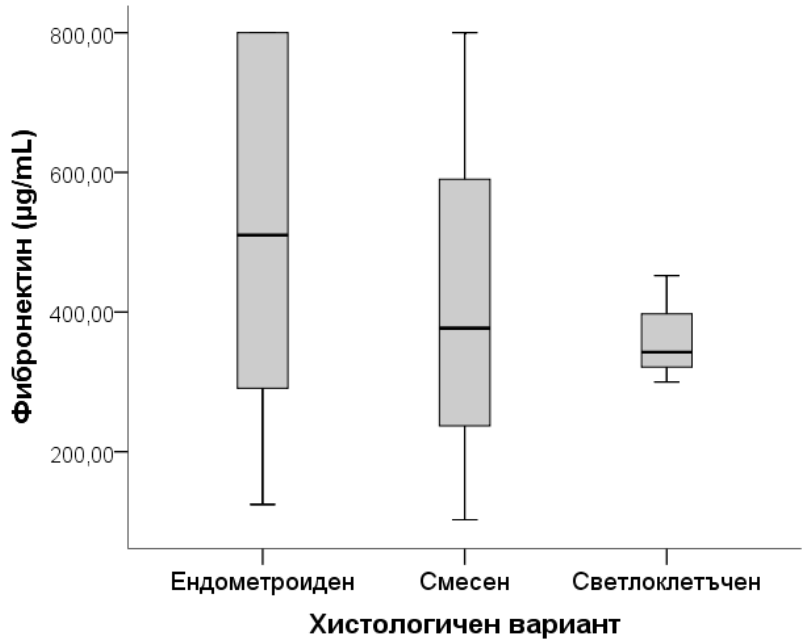
Фиг 11. Сравнение на стойностите на VEGF-A по хистологичен вариант

Не се установиха значими различия и по степен на диференциация (2.94, df = 2, p = 0.230) между високодиференциран (B) (средна 188.32, медиана 193.18 pg/mL), нискодиференциран (H) (средна 291.00, медиана 290.37 pg/mL) и умерено-диференциран (Y) (средна 189.81, медиана 143.71 pg/mL). (фиг. 12).



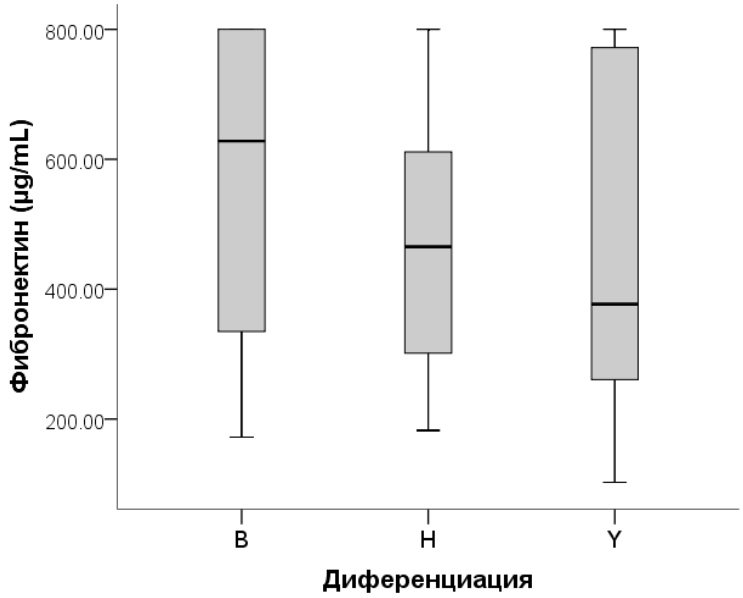
Фиг 12. Сравнение на стойностите на VEGF-A по диференциация

Тестът на Kruskal-Wallis не беше значим за междугрупови различия (2.44, df = 3, p = 0.486), като също така не се установиха значими различия по хистологичен вариант (2.07, df = 2, p = 0.356) между ендометроиден (средна 527.65, медиана 510.24 µg/mL), смесен (средна 420.81, медиана 377.04 µg/mL) и светлоклетъчен (средна 364.84, медиана 342.58 µg/mL). (фиг. 13).



Фиг 13. Сравнение на стойностите на Фибронектин по хистологичен вариант

Не се установиха значими различия и по степен на диференциация (1.70, df = 2, p = 0.428) между високодиференциран (B) (средна 566.46, медиана 628.07 µg/mL), нискодиференциран (H) (средна 472.13, медиана 465.40 µg/mL) и умеренодиференциран (Y) (средна 458.91, медиана 377.04 µg/mL). (фиг. 14)



Фиг 14. Сравнение на стойностите на Фибронектин по диференциация

От последващите анализи поради ниска статистическа мощност е изключен единичен случай на сквамозен карцином по хистологичен вариант, различаващ се от предварителната хистологична диагноза.

Обсъждане на резултати по задача 4

В проучената от нас литература бяха намерени данни за връзка между нивата на VEGF, хистологичния вариант и степента на диференциация при ендометриален карцином. Преобладаващата част от проучванията бяха върху изследване на маркера в тъканни култури. Установихме и единично такова проучване в серум.

Въз основа на оскъдните и дори липсващи данни за това ние изследвахме серумния VEGF и Фибронектин при жени с карцином на ендометриума в зависимост от хистологичния вариант и степента на диференциация на тумора.

В своето проучване Giatromanolaki et al. не откриват асоциация между експресията на VEGF и хистологичния вид.

Според друго проучване (Fujimoto et al). липсва връзка между нивата на VEGF и хистологичния тип.

Резултатите от нашето проучване потвърждават известните такива по отношение на хистологичния вариант и степента на диференциация, като показват, че не се установяват значими различия в стойностите VEGF-A и Фибронектин.

Извод:

По отношение на евентуалната корелация между нивата на VEGF в серум според хистологичния вариант и степента на диференциация нашите резултати са по-скоро в подкрепа на тези проучвания, които не установяват значима такава.

Освен описаното, ние потърсихме и евентуална закономерност между серумните нива на Фибронектин, хистологичния вариант и степента на диференциация, но такава не беше установена.

5. Резултати от съпоставката между възрастта на изследваните пациентки и нивата на VEGF-A и Фибронектин

По задача пет бяха съпоставени нивата на VEGF-A и Фибронектин според възрастта на пациентките.

Възрастовото разпределение на пациентките с ендометриален карцином е както следва – в групата 30-44г. – 2 % (една пациентка), групата 45-54г. - 12 % (6 пациентки), групата 55-64 г. -10 % (5 пациентки), групата 65-74г. – 56 % (28 пациентки) и в групата 75-86 г. – 20% (10 пациентки).(фиг.15).



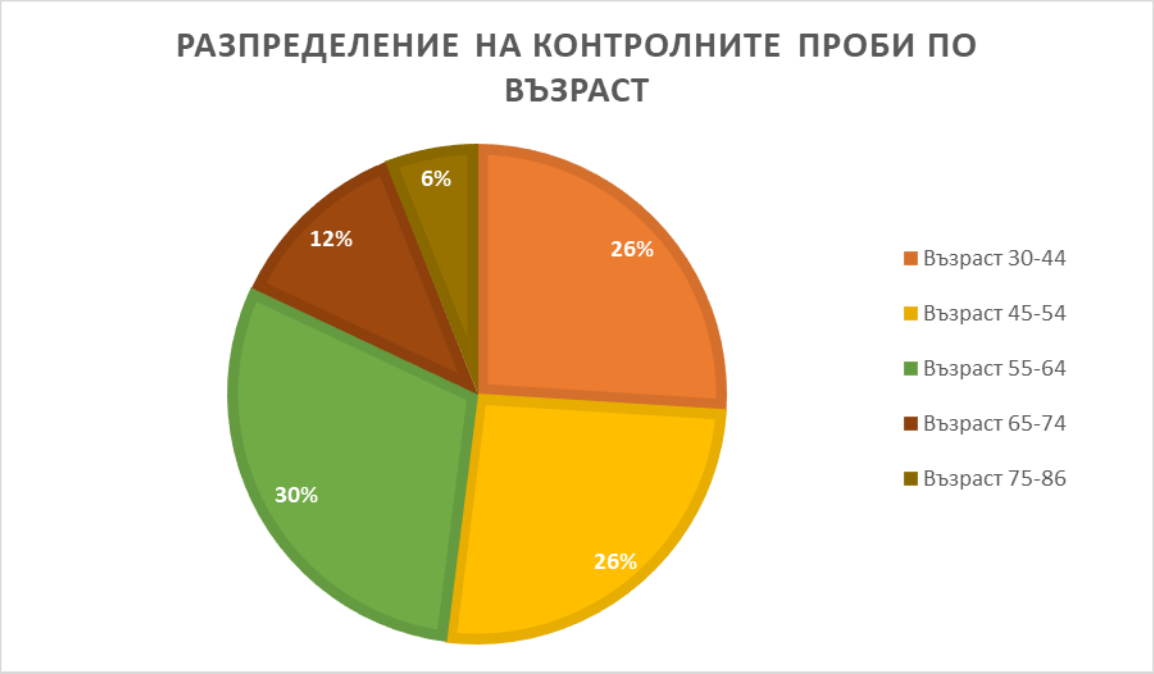
Фиг 15. Разпределение на пациентките с ендометриален карцином по възраст

Възрастовото разпределение на пациентките с ендометриален полип е както следва – в групата 30-44г. – 48 % (24 пациентки), групата 45-54г. - 24 % (12 пациентки), групата 55-64 г. -18 % (9 пациентки), групата 65-74г. – 8% (4 пациентки) и в групата 75-86 г. – 2 % (1 пациентка). (фиг.16).



Фиг 16. Разпределение на пациентките с ендометриален полип по възраст

Възрастовото разпределение на контролните проби е както следва – в групата 30-44г. – 26 % (13 пациентки), групата 45-54 г. - 26 % (13 пациентки), групата 55-64 г. -30 % (15 пациентки), групата 65-74 г . – 12 % (6 пациентки) и в групата 75-86 г. – 6 % (3 пациентки). (фиг.17).

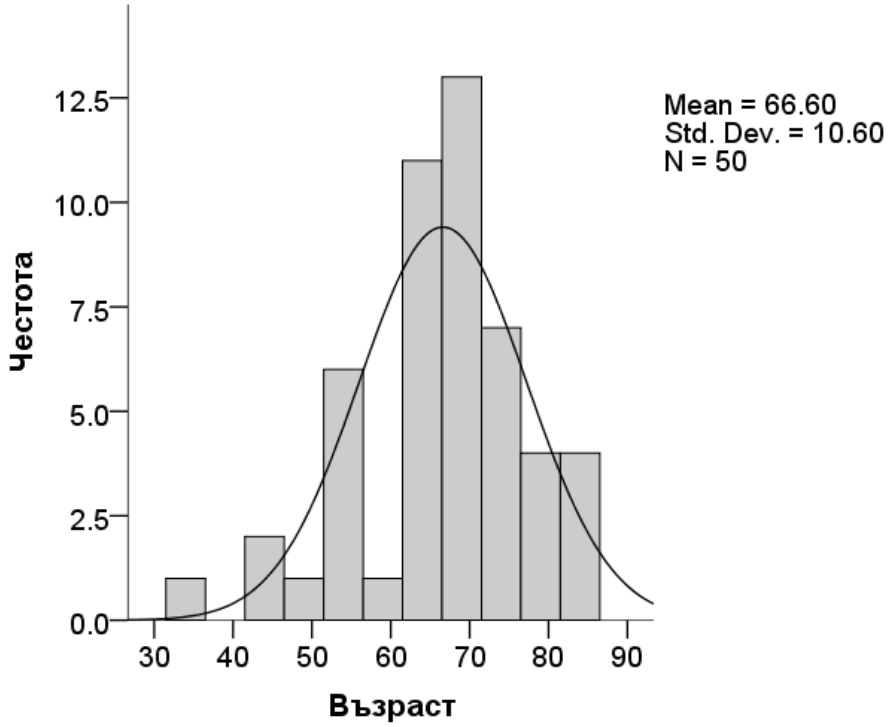


Фиг 17. Разпределение на контролните проби по възраст

Възрастта на пациентките не се отклоняваше значимо от кривата на нормалното разпределение съгласно теста на Jarque-Bera (LM = 5.51, p = 0.064). (*фиг. 18*).

Възрастта обаче не беше корелирана с нивата на VEGF-A (rho = -0.074, p = 0.610) и Фибронектин (rho = 0.078, p = 0.589).

Връзката между възрастта на пациентките и VEGF-A и Фибронектин беше оценена чрез корелационния коефициент на Спиърман.



Фиг 18. Разпределение на възрастта на пациентките

Възрастта на пациентките не се отклоняваше значимо от кривата на нормалното разпределение съгласно теста на Jarque-Bera (LM = 5.51, p = 0.064). (*фиг 18*).

Въпреки това тествахме силата на корелацията между възрастта и показателите VEGF-A и Фибронектин с помощта на теста на Спиърман поради вида на разпределението на тези показатели.

Беше установено, че възрастта не е корелирана с нивата на VEGF-A (rho = -0.074, p = 0.610) и Фибронектин (rho = 0.078, p = 0.589). Самите корелационни коефициенти бяха близо до нулеви, а стойността на p беше далеч от конвенционалната граница за значимост 0.05.

Обсъждане на резултати по задача 5

В направената справка не бяха намерени литературни източници, които да съобщават за проведени преди това изследвания, търсещи връзка между възрастта на пациентките и серумните нива на VEGF и Фибронектин при жени с ендометриален карцином. В проведеното от нас изследване се установи, че възрастта не корелира със стойностите на VEGF- A и Фибронектин.

Извод:

В проведеното от нас проучване не се установи наличие на корелация между възрастта на изследваните пациентки и серумните нива на VEGF и Фибронектин

6. Резултати от съпоставката нивата на VEGF-A и Фибронектин една спрямо друга при жени с ендометриален карцином

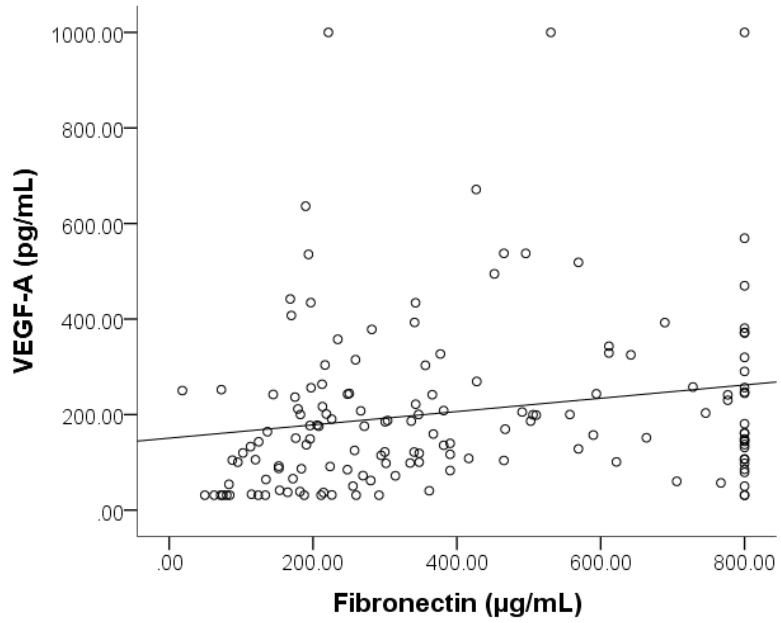
В изпълнение на тази задача сравнихме стойностите на Фибронектин и VEGF – A при пациентки с ендометриален карцином, като целта беше да установим евентуална корелация между повишените нива на VEGF- A и Фибронектин при една и съща пациентка.

Корелация между VEGF-A и Фибронектин – изчислен е корелационен коефициент на Спиърман, който показва значима позитивна корелация $\rho = 0.29$, $p < 0.001$. Установихме, че при пациентките с високи нива на Фибронектин има и високи нива на VEGF-A. (фиг.19).

Таблица 4. **. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Корелации

			Фибронектин	VEGF_A
Spearman's rho	Фибронектин	Correlation Coefficient	1.000	.288**
		Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	150	150
	VEGF_A	Correlation Coefficient	.288**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.000	.
		N	150	150



Фиг 19. Корелация между стойностите на VEGF-A и Фибронектин с добавена линия на тренда

За оценка степента на корелация между VEGF-A и Фибронектин е изчислен корелационен коефициент на Спиърман. Той показва значима позитивна корелация $\rho = 0.29$, $p < 0.001$. Съгласно конвенционалните критерии за силата на корелация, коефициент 0.29 отговаря на умерено силна корелация, като статистическата значимост е висока.

Обсъждане на резултати по задача 6

Въз основа на проучената и анализирана от нас литература до този момент не е търсена и изследвана евентуална връзка между серумните нива на VEGF и Фибронектин при жени с ендометриален карцином, съпоставяйки нивата на двата показателя един спрямо друг при една и съща пациентка.

Извод:

Получените от нас резултати по тази задача установиха наличие на значима позитивна корелация при съпоставката между нивата на VEGF-A и Фибронектин една спрямо друга в серума на жени с ендометриален карцином.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведеното проучване е от малкото такива, изследващи нивата на VEGF-A и Фибронектин в серум от пациентки с малигнена и бенигнена патология на ендометриума.

Получените резултати по отношение на VEGF-A са по-скоро в подкрепа на съществуващи научни трудове, че съдово-ендотелният растежен фактор – А може да се използва като прогностичен фактор за хода на заболяването, но са необходими допълнителни изследвания с обхващане на по-голям брой пациентки.

Собствените данни от проучването ни върху серумните нива на Фибронектина показват, че той може да бъде използван като надежден маркер за отграничаване на малигнена от бенигнена патология на ендометриума.

Настоящият дисертационен труд подкрепя съвременната тенденция за търсене на все повече биомаркери, които биха били полезни за прогнозата и лечението на пациентите с малигнени заболявания и внедряването им в рутинната практика.

VIII. ИЗВОДИ

Въз основа на получените резултати могат да бъдат направени следните изводи:

1. Липсва достатъчна статистическа значимост в нивата на VEGF-A в серум на жените с ендометрилен карцином в сравнение с останалите две групи

2. Повишеното ниво на Фибронектин в серума на жени с ендометриален карцином показва изразена статистическа значимост

3. Съпоставката на стойностите на VEGF-A и Фибронектин в зависимост от стадия при жени с карцином на ендометриума не показа значими различия в стадий I A, IB, III A и III C

4. Съпоставката в нивата на VEGF-A и Фибронектин в серум според хистологичния вариант и степента на диференциация при жени с карцином на ендометриума не показа значими различия

5. Липсва корелация между възрастта на изследваните пациентки и нивата на VEFG-A и Фибронектин в серум

6. Съпоставката между нивата на VEGF-A и Фибронектин в серум при жени с карцином на ендометриума установи значима позитивна корелация

7. Нашите резултати потвърждават възможността Фибронектинът да се използва като евентуален прогностичен фактор при пациентки с ендометриален карцином.

Относно стойностите на VEGF-A е необходимо увеличаване на броя изследвани пациентки, допълнителен анализ и интерпретация на резултатите в подкрепа на оформящата се тенденция от настоящото проучване.

IX. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с оригинален характер

1. За първи път в България са изследвани VEGF-A и Фибронектин в серум при жени с малигнена и бенигнена патология на ендометриума

2. Съпоставени са нивата на VEGF-A и Фибронектин при жени с карцином на ендометриума в зависимост от стадия на заболяването

3. Съпоставени са нивата на VEGF-A и Фибронектин при жени с карцином на ендометриума в зависимост от хистологичния вариант и степента на диференциация

4. Съпоставени са нивата на VEGF-A и Фибронектин една спрямо друга при жени с ендометриален карцином

5. За първи път в България се установява евентуалното прогностично значение на серумните нива на VEGF-A и Фибронектин при жени с малигнена и бенигнена патология на ендометриума

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърждава се възможността серумните нива VEGF-A да се използват с прогностична цел, но много по-показателно е изследването му в тъканни култури.

X. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикации в научни списания

1. Митев Д., Р.Димитров, А. Николов. Биомаркери при рак на ендометриума. Акушерство и гинекология, Vol. 60 , брой 3/2021 г., стр. 24-26.
2. Митев Д., Р.Димитров , Славов С. , А. Николов. Нива на VEGF-A в серум на жени с бенигнена и малигнена патология на ендометриума. Акушерство и гинекология, Vol. 61 , брой 1 /2022г , стр. 5-9

Участия в конгреси, свързани с дисертационния труд

Митев Д., Димитров Р., Николов А. Серумен VEGF-A и Фибронектин при пациентки с ендометриален карцином.

(XV-ти Национален конгрес по Акушерство и гинекология, 24-27.03.2022, София)

Публикации в реферирани списания с IF

Kostov S., Slavchev S., Dzhnekov D., Mitev D., Yordanov A. Avascular spaces of the female pelvis – clinical applications in obstetrics and gynecology. Journal of Clinical Medicine.,2019, 8

XI. ПРИЛОЖЕНИЯ

Анкетна карта

Диагноза:

Име:

Възраст:

Ръст:

Тегло:

Кръвно налягане:

Вредни навици:

Местоживеене:

Образование:

Месторабота:

Първа менструация:

Последна менструация:

Брой бременности:

Придружаващи заболявания:

Предшестващи оперативни интервенции:

Фамилна анамненза:

Хистологичен резултат:

Стадиране:

XII. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Gallup DG, Stock RJ. Adenocarcinoma of the endometrium in women 40 years of age or younger. Obstet Gynecol 1984; 64:417–20.

2. Rose PG. Endometrial carcinoma. N Eng J Med 1996; 335:640–9.

3. Conlon N, Leitao MM, Abu-Rustum NR, Soslow RA. Grading uterine endometrioid carcinoma: a proposal that binary is best. Am J Surg Pathol. 2014 Dec;38(12):1583-7. [PubMed]

4. Lax SF. Pathology of Endometrial Carcinoma. Adv Exp Med Biol. 2017; 943:75-96. [PubMed]

5. Setiawan VW, Yang HP, Pike MC, McCann SE, Yu H, Xiang YB, Wolk A, Wentzensen N, Weiss NS, Webb PM, van den Brandt PA, van de Vijver K, Thompson PJ, Australian National Endometrial Cancer Study Group. Strom BL, Spurdle AB, Soslow RA, Shu XO, Schairer C, Sacerdote C, Rohan TE, Robien K, Risch HA, Ricceri F, Rebbeck TR, Rastogi R, Prescott J, Polidoro S, Park Y, Olson SH, Moysich KB, Miller AB, McCullough ML, Matsuno RK, Magliocco AM, Lurie G, Lu L, Lissowska J, Liang X, Lacey JV, Kolonel LN, Henderson BE, Hankinson SE, Håkansson N, Goodman MT, Gaudet MM, Garcia-Closas M, Friedenreich CM, Freudenheim JL, Doherty J, De Vivo I, Courneya KS, Cook LS, Chen C, Cerhan JR, Cai H, Brinton LA, Bernstein L, Anderson KE, Anton-Culver H, Schouten LJ, Horn-Ross PL. Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors? J Clin Oncol. 2013 Jul 10;31(20):2607-18. [PMC free article] [PubMed]

6. Papaioannou S, Tzafettas J. Anovulation with or without PCO, hyperandrogenaemia and hyperinsulinaemia as promoters of endometrial and breast cancer. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2010 Feb;24(1):19-27. [PubMed]

7. Lukanova A, Lundin E, Akhmedkhanov A, Micheli A, Rinaldi S, Zeleniuch-Jacquotte A, Lenner P, Muti P, Biessy C, Krogh V, Berrino F, Hallmans G, Riboli E, Kaaks R, Toniolo P. Circulating levels of sex steroid hormones and risk of ovarian cancer. Int J Cancer. 2003 May 01;104(5):636-42. [PubMed]

8. Casey MJ, Colanta AB. Müllerian intra-abdominal carcinomatosis in hereditary breast ovarian cancer syndrome: implications for risk-reducing surgery. Fam Cancer. 2016 Jul;15(3):371-84. [PubMed]

9. Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD, Wyllie AH, Sharp L, Burn J, et al. Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. Hum Mol Genet 1997; 6:10

10. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100:57–70.

11. Учебник по урология и гинекология за хирурзи, 2011г. Горчев, Панчев

12. Jones, H.V.W treatment of adenocarcinoma of the endometrium. Obstet. Gynecol. Surg., 1975,30,147-169

13. Kim, Y.B. – Endometrial carcinoma: Analysis of recurrence in patients treated with a strategy minimizing lymph node sampling and radiation therapy. Obstet. Gynecol., 1993,82,175,180

14. Creasman WT, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Beller U, Benedet JL, Heintz A, Ngan H, Pecorelli S. Carcinoma of the Corpus Uteri. Int J Gynaecol Obstet. 2006 Nov;95 Suppl 1:S105-S143. [PubMed]

15. Lax SF, Kurman RJ, Pizer ES, Wu L, Ronnett BM. A binary architectural grading system for uterine endometrial endometrioid carcinoma has superior reproducibility compared with FIGO grading and identifies subsets of advance-stage tumors with favorable and unfavorable prognosis. Am J Surg Pathol. 2000 Sep;24(9):1201-8. [PubMed]

16. Brinton LA, Felix AS, McMeekin DS, Creasman WT, Sherman ME, Mutch D, Cohn DE, Walker JL, Moore RG, Downs LS, Soslow RA, Zaino R. Etiologic heterogeneity in endometrial cancer: evidence from a Gynecologic Oncology Group trial. Gynecol Oncol. 2013 May;129(2):277-84. [PMC free article] [PubMed]

17. Altman AD, Ferguson SE, Atenafu EG, Köbel M, McAlpine JN, Panzarella T, Lau S, Gien LT, Gilks B, Clarke B, Cameron A, Nelson G, Han G, Samouëlian V, Ho TC, Louie K, Bernardini MQ. Canadian high risk endometrial cancer (CHREC) consortium: analyzing the clinical behavior of high risk endometrial cancers. Gynecol Oncol. 2015 Nov;139(2):268-74. [PubMed]

18. Hamilton CA, Cheung MK, Osann K, Chen L, Teng NN, Longacre TA, Powell MA, Hendrickson MR, Kapp DS, Chan JK. Uterine papillary serous and clear cell carcinomas predict for poorer survival compared to grade 3 endometrioid corpus cancers. Br J Cancer. 2006 Mar 13;94(5):642-6. [PMC free article] [PubMed]

19. Rasila KK, Burger RA, Smith H, Lee FC, Verschraegen C. Angiogenesis in gynecological oncology- mechanism of tumor progression and therapeutic targets: J Gynecol Cancer 2005;15:710 - 26.

20. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst 1990;82: 4-6.

21. Bergers G, Benjamin LE. Tumorgenesis and the angiogenic switch. Nat Rev Cancer 2003; 3:401 - 10.

22. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 1996; 86:353 - 64.

23. Denekamp J., Vascular as a target for tumor therapy, Prog. Appl. MIcrocirc.4 (1984) 28-38.

24. Folkman J., Tumor angiogenesis, Adv. Cancer Res. 43 (1985) 175-203

25. Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF et al. Distribution of VEGF in tumors: concentration in tumor blood vessels, J Exp med 1991; 174:1275-8

26. Fidler IJ, Ellis LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. Cell 1994; 79:185-8

27. Palczak R, Splawinski J. Angiogenic activity and neovascularization in adenocarcinoma of endometrium. Int J Gynecol. Obstet. 1989; 29:343 – 57

28. Jikihara H, Terada N, Yamamoto R et al. Inhibitory effect of medroxyprogesterone acetate on angiogenesis induced by human endometrial cancer. Am J Obstet Gynecol 1992;167: 207-11

29. A. Srivastava, P. Laidler, R.P. Davies, K. Horgan, L. Hughes, The prognostic signi®cance of tumor vascularity in intermedi- ate-thickness (0.76±4.0 mm thick) skin melanoma, Am. J. Pathol. 133 (1988) 419 - 423.

30. N. Weidner, J.P. Semple, W.R. Welch, J. Folkman, Tumor angiogenesis and metastasis ± correlation in invasive breast carcinoma, N. Engl. J. Med. 324 (1991) 1 - 7.

31. P. Macchiarini, G. Fontanini, M.J. Hardin, F. Squartini, G.A. Angeletti, Relation of neovascularization to metastasis of non- small-cell lung cancer, Lancet 340 (1992) 145 - 146.

32. S. Wakui, M. Furusato, T. Itoh, H. Sasaki, A. Akiyama, I. Kinoshita, K. Asano, T. Tokuda, S. Aizawa, S. Ushigome, Tumor angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study, J. Pathol. 168 (1992) 257 - 262.

33. N. Weidner, P.R. Carroll, J. Flax, W. Blumenfeld, J. Folkman, Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma, Am. J. Pathol. 143 (1993) 401 - 409.

34. Folkman, C. Haudenschild, Angiogenesis in vitro, Nature 288 (1980) 551-556.

35. R.A. Berkman, M.J. Merrill, W.C. Reinhold, W.T. Monacci, A. Saxena, W.C. Clark, J.T. Robertson, I.U. Ali, E.H. Old®eld, Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms, J. Clin. Invest. 91 (1993) 153-159.

36. R.S. Warren, H. Yuan, M.R. Matli, N.A. Gillett, N. Ferrara, Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse of experimental liver metastasis, J. Clin. Invest. 95 (1995) 1789-1797.

37. E. Brogi, T. Wu, A. Namiki, J.M. Isner, Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression I vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only, Circulation 90 (1994) 649-652.

38. J. Li, M.A. Perrella, J.-C. Tsai, S.-F. Yet, C.-M. Hsieh, M. Yoshizumi, C. Patterson, W.O. Endege, F. Zhou, M.-E. Lee, Induction of vascular endothelial growth factor gene expres- sion by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells, J. Biol. Chem. 270 (1995) 308-312.

39. D.Shweiki, M.Neeman, A.Itin, E.Keshet, Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose de®ciency in multicell spheroids: implication for tumor angiogenesis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 768-772.

40. A. Minchenko, S. Salceda, T. Bauer, J. Caro, Hypoxia regu- latory elements of the human vascular endothelial growth factor gene, Cell Mol. Biol. Res. 40 (1994) 35-39.

41. G. Finkenzeller, A. Technau, D. Marme, Hypoxia-induced transcription of the vascular endothelial growth factor gene is independent of functional AP-1 transcription factor, Biochem. Biophys. Res. Commun. 208 (1995) 432-439.

42. Folkman J, Haudenschild C., Angiogenesis in vitro, Nature 288 (1980) 551-556

43. Fidler 11, Ellis LM. The implications of angiogenesis for the biol- ogy and therapy of cancer metastasis. Cell 1994:79:185-8.

44. KIagsbrun M, D'ArnorePA. Regulators of angiogenesis. Annu Rev Physiol 1991; 53:217-39.

45. Folkman I, Shing Y. Angiogenesis. J Biol Chem 1992;267: 10931-4.

46. Димитров Т., Цитокинов профил при жени с обезитас в I-ви стадий на ендометриален карцином, оперирани чрез роботизирана и конвенционална хирургична интервенция, Плевен -2016г.

47. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent syner- gism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. Biockem Biopkys Res Comrnun 1992; 189:824-31.

48. Detmar M, BrownLF, Claf€eyKP, Ye0K-T, Kocher 0, Jackman RW, et al. Overexpression of vascular permeability factor and its receptors in psoriasis. J Exp Med 1994 180:1141-6.

49. Cullinan-Bove K, Koos R. Vascular endothelial growth hactor/ vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen

correlates with estrogen-induced in- creases in uterine capillary permeability and growth. Endocrinology 1993; 133:829-37

50. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Rajput-Williams J, Burch D, Schofield JP, Fountain SA, et al. Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. Biol Reprod 1993; 48:1120-8.

51. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med 2003; 9:669 - 76.

52. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. Nature 1997; 386:671 - 4.

53. Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. J Clin Invest 2000; 105:17 - 9.

54. Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S. Biologyofvascularendothelial growth factors. FEBS Lett 2006; 580: 2879-87.

55. Achen MG, Stacker SA. Tumor lymphangiogenesis and metasta- tic spread-new players begin to emerge. Int J Cancer 2006; 119: 1755-60.

56. Rogers PA, Donoghue JF, Walter LM, et al. Endometrial angio-genesis, vascular maturation, and lymphangiogenesis. Reprod Sci 2009; 16: 147-51.

57. Girling JE, Rogers PA. Recent advance sinendometrialangio genesis research. Angiogenesis 2005; 8: 89-99.

58. Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. Eur Cytokine Netw 2009; 20: 158-63.

59. Dai H, Zhao S, Xu L, et al. Expression of Efp, VEGF and bFGF in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue. Oncol Rep 2010; 23: 795-9.

60. Kamat AA, Merritt WM, Coffey D, et al. Clinical and biological significance of vascular endothelial growth factor in endometrial cancer. Clin Cancer Res 2007; 13: 7487-95.

61. Sivridis E. Angiogenesis and endometrial cancer. Anticancer Res 2001; 21: 4383-8.

62. BalbiG, Monteverde A, Passaro M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF): can we use it as prognostic factor in endometrial cancer? Minerva Ginecol 2006; 58: 411-5.

63. Talvensaari-Mattila A, Soini Y, Santala M. VEGF and its recep- tors (flt-1 and KDR/flk-1) as prognostic indicators in endometrial carcinoma. Tumour Biol 2005; 26: 81-7.

64. Yokoyama Y, Sato S, Futagami M, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor and its receptors in endometrial carcinoma. Gynecol Oncol 2000; 77: 413-8.

65. Shaarawy M, El-Sharkawy SA. Biomarkers of intrinsic angio- genic and anti-angiogenic activity in patients with endometrial hyperplasia and endometrial cancer. Acta Oncol 2001;40: 513-8.

66. Mazurek A, Pierzyn´ski P, Kuć P, et al. Evaluation of angiogenesis, p-53 tissue protein expression and serum VEGF in patients with endometrial cancer. Neoplasma 2004; 51: 193-7.

67. Gornall RJ, Anthony FW, Coombes EJ, et al. Investigation of women with endometrial carcinoma using serum vascular endothelial growth factor (VEGF) measurement. Int J Gynecol Cancer 2001; 11: 164-6.

68. PoonRT, FanST, WongJ.Clinical implications of circulating angio-genic factors in cancer patients. J Clin Oncol 2001; 19: 1207-25

69. Klagsbrun M, Soker S. VEGFIWF: the angiogenesis factor found? Current Biol 1993; 3: F99-702

70. Berse B, Brown LF, Van De Water L, Dvorak HF, Senger DH. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. Mol Biol Cell 1992; 3:211-20.

71. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. Narilre 1992; 359:845-8.

72. Brown LF, Berse B, lackman RW, Tognazzi K, Maiiseau El, Senger DR, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in ade- nocarcinomas of the gastrointestinal tract. Cancer Res 1993; 53:4727-35.

73. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, et al. Increased expression of vascular pertne- ability factor (vascular endothelial growth factor) and its re- ceptors in kidney and bladder carcinomas. Am J Path01 1993; 14311255-62.

74. Berkman RA, Merrill MJ, Reinhold WC, Monacci WT, Saxena A, Clark WC, et al. Expression of the vascular permeability factorlvascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. J Clin Irwest 1993; 91:153-9.

75. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi A], Dvo- rak HF, et al. Expression of vascular permeability factor (vas- cular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. Hum Path01 1995; 26:86-91.

76. Booc 0c.k CA, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, McLaren J, Barker PJ,Wright KA, et al. Expression of vascular endothe- lial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. J Nnrl Cancer lnst 1995; 87:506- 16.

77. Guidi AJ, Abu-Jawdeh C. Berse B, Jackman RW, 'Tognazzi K, Dvorak HF, et al. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. J Natl Cancer Irist 1995; 87:1237-45.

78. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, et al. 'rumor vascular permeahility factor stim- ulates endothelial cell growth and angiogenesis. J Clir7 Irzuesr 1989;84: 1470-8.

79. Corm G, Bayne ML, Soderman DD, Kwok PW, Sullivan KA, Palisi TM, et al. Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelialcell mitogen that is

homologous to platelet-derived growth factor. Proc Nut1 Acud Sci U S A 1990; 87:2628-32.

80. D.R. Senger, S.J. Galli, A.M. Dvorak, C.A. Perruzzi, V.S. Harvey, H.S. Dvorak, Tumor cell secretes a vascular perme- ability factor that promotes accumulation of ascites uid, Science 219 (1983) 983-985.

81. D.W. Leung, G. Cachianes, W.-J. Kuang, D.V. Goeddel, N. Ferrara, Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen, Science 246 (1989) 1306-1309.

82. Keck PI, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T. Feder J, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. Science 1989; 246:1309- 12.

83. Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh I, Dvorak AM. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound heal- ing. Lab Invesr 1987; 57:673-86.

84. Dvorak HF, Nagy JA, Berse B, Brown LF, Ye0 K-T, Ye0 T-K, et al. Vascular permeabilityfactor, fibrin, and the pathogenesis of tumor stroma formation. Ann N YAcud Sci 1992; 667:101-11.

85. Dvorak HF, Nagy JA, Dvorak AM. Structure of solid tumors and their vasculature: implications for therapy with mono- clonal antibodies. Cancer Cells 1991; 3:77-85.

86. Lanir N, Ciano PS, Van De Water L, McDonagh J, Dvorak AM, Dvorak HF. Macrophage migration in fibrin gel matrices. 11. Effects of clotting factor XIII,

fibronectin, and glycosaminogly- can content on cell migration. J lmmunoll988; 1402340-9.

87. Brown LF, Lanir N, McDonagh J, Czanecki K, Estrella P, Dvorak AM, et al. Fibroblast migration in fibrin gel matrices. Am J Putkoll993; 142:273-83.

88. C. Garrido, S. Saule, D. Gospodarowicz, Transcriptionalregu- lation of vascular endothelial growth factor gene expression in ovarian bovine granulosa cells, Growth Factors 8 (1993) 109-117.

89. X.F. Li, J. Gregory, A. Ahmed, Immunolocalization of vascu- lar endothelial growth factor in human endometrium, Growth Factors 11 (1994) 277-282.

90. M.R. Jackson, E.W. Carney, S.J. Lye, J.W. Knoxritchie, Loca- lization of two angiogenic growth factors (PDECGF and VEGF) in human placentae throughout gestation, Placenta 15 (1994) 341-353.

91. B.S. Hulka, W.C. Fowler, D.G. Kaufman, R.C. Grimson, B.G. Greenberg, C.J.R. Hogue, G.S. Berger, C.C. Pulliam, Estrogen and endometrial cancer: cases and two control groups from North Carolina, Am. J. Obstet. Gynecol. 137 (1980) 92-10

92. Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. J Clin Invest 2000; 105:17 9.

93. Sood AK, Fletcher MS, Zahn CM, et al. The clinical significance of tumor cell-lined vasculature in ovarian carcinoma: implications for anti-vasculogenic therapy. Cancer Biol Ther 2002; 1:661

94. Millauer B, Shawver LK. Plate KH, Risau W, Ullrich A. Gli- oblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-l mutant. Nature 1994; 367:576-9.

95. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogene- sis dependent? J Natl Cancer Insr 1990; 82:4-6.

96. Gasparini G, Harris, Al..Clinical importance of the determina- tion of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. J Cliiz Oncol 1995; 13:765-82.

97. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Thorpe PE, Brekken RA, Sivridis E, Kakolyris S, et al. Vascular endothelial growth factor/KDR activated microvessel density versus CD31 stan- dard microvessel density in non-small cell lung cancer. Can- cer Res 2000; 60:3088–95.

98. Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI, Georgoulias V, Gatter KC, Harris AL. Intratumoral angiogenesis: a new prognostic indicator for Stage I endometrial adenocarcino- mas? Oncol Res 1999; 11:205–12.

99. Seki N, Kodama J, Hongo A, Miyagi Y, Yoshinouchi M, Kudo T. Vascular endothelial growth factor and platelet-derived endo- thelial cell growth factor expression are implicated in the an- giogenesis of endometrial cancer. Eur J Cancer 2000; 36:68 –73.

100. KakuT, KamuraT, Kinukawa N, et al. Angiogenesis in endometrial carcinoma. Cancer 1997; 80:741 ^ 7.

101. Kirschner CV, Alanis-Amezcua JM, Martin VG, et al. Angiogenesis factor in endometrial carcinoma: a new prognostic indicator? Am J Obstet Gynecol 1996; 174:1879,82.1996.

102. Stefansson IM, Salvesen HB, Akslen LA. Vascular proliferation is important for clinical progress of endometrial cancer. Cancer Res 2006; 66:33.

103. Halder J, Kamat AA, Landen CN Jr, et al. Focal ad- hesion kinase targeting using in vivo short interfering RNA delivery in neutral liposomes for ovarian carcino- ma therapy. Clin Cancer Res 2006; 12:4916 ^ 24.

104. Engelsen IB, Akslen LA, Salvesen HB. Biologic markers in endo- metrial cancer treatment. APMIS 2009; 117: 693-707.

105. Boruban MC, Altundag K, Kilic GS, et al. From endometrial hyperplasia to endometrial cancer: insight into the biology and possible medical preventive measures. Eur J Cancer Prev 2008;17: 133-8.

106. Ioachin E. Immunohistochemical tumour markers in endometrial carcinoma. Eur J Gynaecol Oncol 2005; 26: 363-71.

107. Prat J. Prognostic parameters of endometrial carcinoma. Hum Pathol 2004; 35: 649-62.

108. Chen CA, Cheng WF, Lee CN, et al. Cytosol vascular endothelial growth factor in endometrial carcinoma: correlation with disease-free survival. Gynecol Oncol 2001; 80: 207-12.

109. Apana A. Kamat, William Merritt et al. Clinical and biological significance of Vascular Endothelial Growth factor in endometrial cancer, Clin Cancer Res 2007; 13()

110. Jedryka M, Chrobak A, Chelmonska-Soyta A, Gawron D, Halbersztadt A, Wojnar A, Kornafel J. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 expres- sion in tumor infiltrating CD3 lymphocytes from women with endometrial cancer. Int J Gynecol Cancer 2012; 22: 1303-1309.

111. liM R, Ahmed n, Borregaard n, Riley c, Wafai R, Thompson eW, Quinn MA, Rice ge. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) an ear- ly-screening biomarker for ovarian cancer: NGAL is associated with epidermal growth factor-in- duced epithelio-mesenchymal transition. Int J Cancer 2007; 120: 2426-2434.

112. H. Xu, X. Sun, W. J. Sun et al. Expression and clinical correlation of NGAL and VEGF in endometrial carcinoma, European review for medical and Pharmacological Sciences 2018; 22: 632-636

113. Mallbris l, O'brien KP, Hulthen A, Sandstedt B, Cowl and JB, Borrega ARD n, Stahle-Backdahl M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a marker for dysregulated keratinocyte differentiation in human skin. Exp Dermatol 2002; 11: 584-591.

114. Schmidt-ott KM, Mori K, li JY, Kalandadze A, cohen DJ, Devarajan P, barasch J. Dual action of neutro- phil gelatinase-associated lipocalin. J Am Soc Nephrol 2007; 18: 407-413.

115. CM Holland, K Day, A Evans et al., Expression of the VEGF and angiopoietin genes in endometrial atypical hyperplasia and endometrial cancer, British journal of cancer (2003) 89, 891 -898

116. B. Dobrzycka, Slawomir J. Terlikowski et al., Serum levels of VEGF and VEGF-C in patients with endometrial cancer, Eur.Cytokine Netw. Vol 22 n 1, March 2011, 45-51

117. Ayumi Saito et al., Human epidermal growth factor receptor 2 targeted therapy in endometrial cancer: Clinical and pathological perspectives, World J Clin Oncol. 2021

118. J. Fujimoto, Satoshi Ichigo, Reiko Hirose et al. Expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its mRNA in uterine endometrial cancers, Cancer Letters 134 (1998) 15-22

119. Смиленов Л. Алтънков Г., Biotechnology and bioindustry

120. Roumen Pankov and Kenneth M. Yamada - Fibronectin at a glance

121. George, E. L., Georges-Labouesse, E. N., Patel- King, R. S., Rayburn, H. and Hynes, R. O. (1993). Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. Development 119, 1079-1091.

122. Zhao, Q., Liu, X. and Collodi, P. (2001). Identification and characterization of a novel fibronectin in zebrafish. Exp. Cell Res. 268, 211- 219.

123. Patel, R. S., Odermatt, E., Schwarzbauer, J. E. and Hynes, R. O. (1987). Organization of the fibronectin gene provides evidence for exon shuffling during evolution. EMBO J. 6, 2565-2572

124. I. E. Grammatikakis et al. Fibronectin plasma levels in gynecology cancers, J BUON 2010

125. Ricciardelli C, Rodgers RJ. Extracellular matrix of ovarian tumors. Semin Reprod Med 2006; 24: 270-282.

126. Tan MI, Strunck E, Scholzen T, Gerdes J, Vollmer G. Extra- cellular matrix regulates steady state mRNA levels of the pro- liferation associated protein Ki-67 in endometrial cancer cells. Cancer Lett 1999; 140: 145-152.

127. Goldberg I, Davidson B, Lerner-Geva L et al. Expression of ex- tracellular matrix proteins in cervical squamous cell carcinoma-a clinicopathological study. J Clin Pathol 1998; 51: 781-785.

128. Moro L, Dolce L, Cabodi S et al. Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. J Biol Chem 2002; 277: 9405-9414.

129. Pichard V, Honore S, Kovacic H et al. Adhesion, actin cy- toskeleton organisation and the spreading of colon adenocar- cinoma cells induced by EGF are mediated by alpha2beta1 integrin low clustering through focal adhesion kinase. His- tochem Cell Biol 2001; 116: 337-348.

130. Mitra A, Chakrabarti J, Banerji A, Chatterjee A. Binding of alpha2 monoclonal antibody to human cervical tumor cell (Si- Ha) surface alpha2beta1 integrin modulates MMP-2 activity. Gynecol Oncol 2004; 94: 33-39.

131. Hauck CR, Sieg DJ, Hsia DA et al. Inhibition of focal adhesion kinase expression or activity disrupts epidermal growth factor- stimulated signaling promoting the migration of invasive hu- man carcinoma cells. Cancer Res 2001; 61: 7079-7090.

132. Yang Z, Bagheri-Yarmand R, Wang RA et al. The epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Ires-125-126 sa) suppresses c-Src and Pak1 pathways and invasiveness of human cancer cells. Clin Cancer Res 2004 15; 10: 658-667.

133. Bill HM, Knudsen B, Moores SL et al. Epidermal growth fac- tor receptor-dependent regulation of integrin-mediated sig- naling and cell cycle entry in epithelial cells. Mol Cell Biol 2004; 24: 8586-8599.

134. Xiao J et al (2018) Expression of fibronectin in esoph- ageal squamous cell carcinoma and its role in migra- tion. BMC Cancer 18(1):976

135. Fernandez-Garcia B et al (2014) Expression and prog- nostic significance of fibronectin and matrix metallo- proteases in breast cancer metastasis. Histopathology 64(4):512–522

136. Hu D et al (2019) Stromal fibronectin expression in patients with resected pancreatic ductal adenocarci- noma. World J Surg Oncol 17(1):29–29

137. Rautonen J et al (1989) Elevated cerebrospinal fluid fibronectin concentration at diagnosis indicates poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. Int J Cancer 43(1):32–35

138. Murgai M et al (2017) KLF4-dependent perivascular cell plasticity mediates pre-metastatic niche forma- tion and metastasis. Nat Med 23(10):1176–1190

139. Kenny HA et al (2014) Mesothelial cells promote early ovarian cancer metastasis through fibronectin secretion. J Clin Invest 124(10):4614–4628

140. Ueda M, Ueki M, Terai Y et al. Biological implications ofgrowth factors on the mechanism of invasion in gynecological tumor cells. Gynecol Obstet Invest 1999; 48: 221-228.

141. Qiao P., Lu Rong Z. Fibronectin in the Tumor Microenvironment A. Birbrair (ed.), Tumor Microenvironment, Advances in Experimental Medicine and Biology 1245, 85-96