

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО АКУШЕРСТВО И ГИНЕКОЛОГИЯ
СБАЛАГ „МАЙЧИН ДОМ“ ЕАД – СОФИЯ

д-р Димитър Илианов Митев

**СЪДОВО-ЕНДОТЕЛНИ РАСТЕЖНИ ФАКТОРИ И ФИБРОНЕКТИН ПРИ
ПАТОЛОГИЯ НА ЕНДОМЕТРИУМА**

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД
ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“

Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт

Професионално направление: 7.1. Медицина

Научна специалност: 03.01.45 Акушерство и гинекология

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ

Доц. д-р Румен Димитров, дм

София 2023 г.

Дисертационният труд е написан на 112 страници. Библиографията включва 141 източника.

Проучването е проспективно и е проведено в СБАЛАГ „Майчин дом“ ЕАД – София, като всички участници са пациентки на I-ва и II-ра гинекологични клиники. Пробите са обработени при строго спазване на всички правила и критерии в клиника по „Клинична лаборатория и клинична фармакология“ към УМБАЛ „Александровска“ – гр. София.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от Катедрен съвет на Катедра по Акушерство и гинекология, Медицински университет – София на 17.10.2022 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 01.03.2023 г. от 13:00 часа в аудиторията на СБАЛАГ „Майчин дом“ ЕАД – София, ул. „Здраве“ 2, ет. 2 на открито заседание на научно жури в състав:

Председател:

1. Проф. д-р Асен Иванов Николов, дм – вътрешен член

Членове:

2. Проф. Алексей Славков Савов, дб – вътрешен член

3. Проф. д-р Елена Димитрова Димитракова, дм – външен член

4. Проф. д-р Стефан Миладинов Ковачев, дмн – външен член

5. Доц. д-р Станислав Христов Славчев, дм – външен член

Резервни членове:

1. Проф. д-р Борислав Маринов Маринов, дм – вътрешен резервен член

2. Проф. д-р Мария Любенова Малинова, дм – външен резервен член

Материалите по защитата са на разположение в Научния отдел на МФ, МУ
- София

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	4
I. ВЪВЕДЕНИЕ	5
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	7
III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ.....	9
IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	24
V. ИЗВОДИ.....	47
VI. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	49
VII. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В КОНГРЕСИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	50

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

- EK** – Ендометриален карцином
- ПРМ** – Последна редовна менструация
- Fnc** - Фибронектин
- XЗТ** – 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, бенигна патология на ендометриума /ендометриален полип/ и здрави контроли.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

II.1 ЦЕЛ

Целта на настоящия дисертационен 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 бенигна такава и при здрави контроли.

II.2 ЗАДАЧИ

1. Да се определят нивата на VEGF-A при пациентки с малигнена и бенигна патология на ендометриума и при здрави контроли
2. Да се определят нивата на Фибронектин при пациентки с малигнена и бенигна 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

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

III.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 постменопаузална 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. Системни заболявания (автоимунни, чернодробни, бъбречни и др.)

От взетите общо 211 проби отпаднаха 29 вследствие на изключващите критерии, които бяха заложиени 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, заложиени 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 китовеите и поради това, че при част от пациентките липсата на ендометриална 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).

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.

III.2 МЕТОДИ

В дисертационния 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 СС
- 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.

Ехографското 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

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 бенигна и малигна патология на ендометрума остава извършването на сепарирано пробно абразио.

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

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.

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).

Класификация

Таблица 1. 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 половината или повече на миометриума	B	Тумор с инфилтрация на половината или повече на миометриума

2	Туморът засяга цервикалната строма поне 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 или метастази	IIB	Инвазия на влагалището или параметриумите - директна инвазияили метастази
1, N2	Позитивни лимфни възли	IIC	Метастази в тазовите и или парааорталните лимфни възли**,****
1	Позитивни тазови лимфни възли	IIC1	Метастази в тазовите лимфни възли
2	Позитивни парааортални лимфни възли	IIC2	Метастази в парааорталните лимфни възлисъс или без метастази в тазовите лимфни Възли
4****	Инфилтрация на мускулатурата напикочния мехур или ректума	VA	Инфилтрация на мускулатурата на пикочния мехур 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.

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 разреждени 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 миеш 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 rpm.

С помощта на автоматично миешо устройство беше извършено прецизно отпипетиране на кладенчетата, последвано от шесткратно измиване с 350 μL миеш 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 миеш 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 разреждане на пробите и преизчислени в $\mu\text{g/mL}$.

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 миеш 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 rpm. С помощта на автоматично миешо устройство беше извършено прецизно отпипетиране на кладенчетата, последвано от трикратно измиване с 350 μL миеш 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 миеш 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.

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.

IV. 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 показва 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).

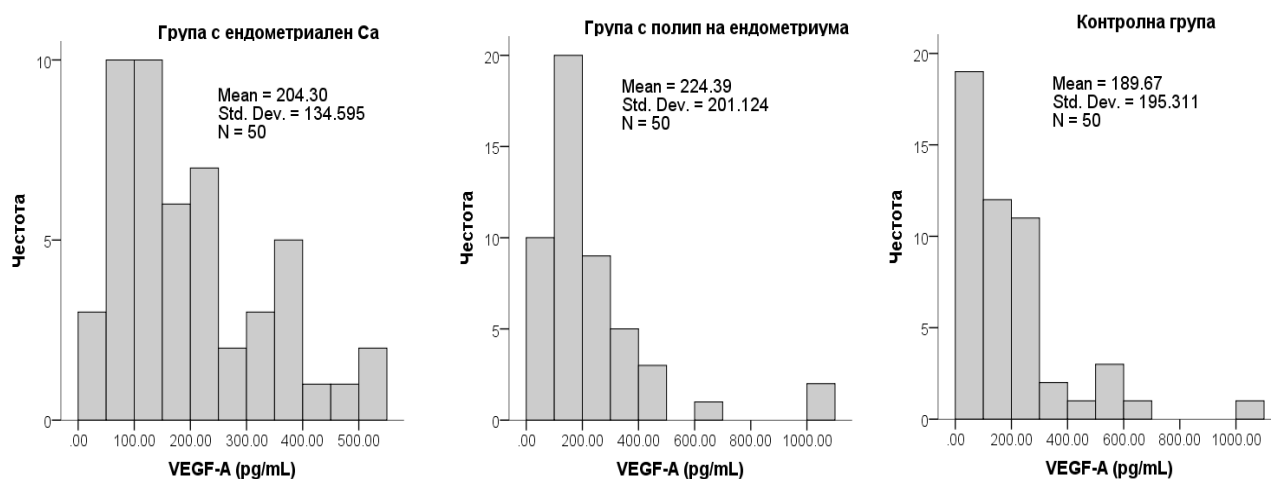
Въпреки това като анализ на чувствителността беше проверено дали резултатите се потвърждават и чрез използването на дисперсионен анализ (ANOVA-тест) и се установи, че заключенията за междугруповите различия не се променят. Затова в частта Резултати представяме данните от по-устойчивите на отклонения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

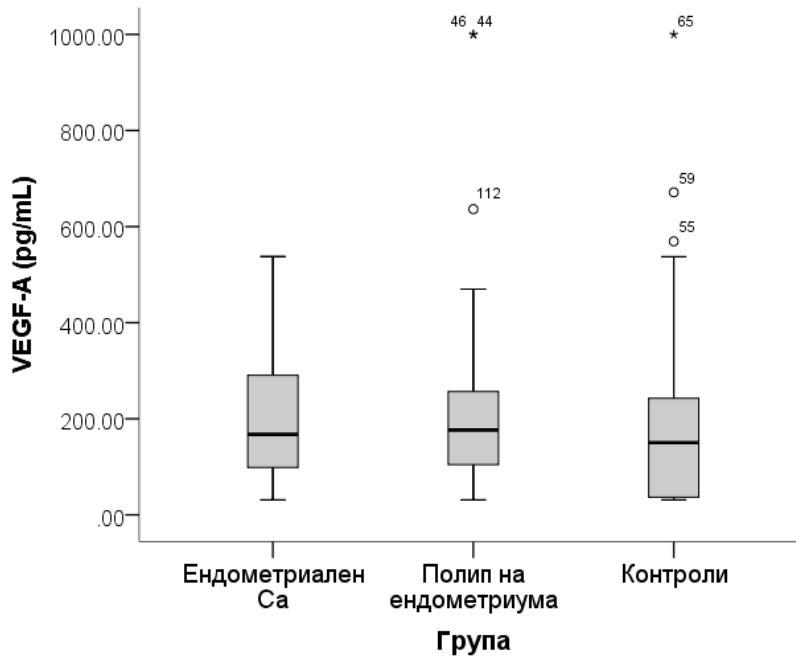
Също така в контролната група и групата с полип разпределението на показателя е изместено към по-ниски стойности.



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 показва 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 Dobrzyska 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:

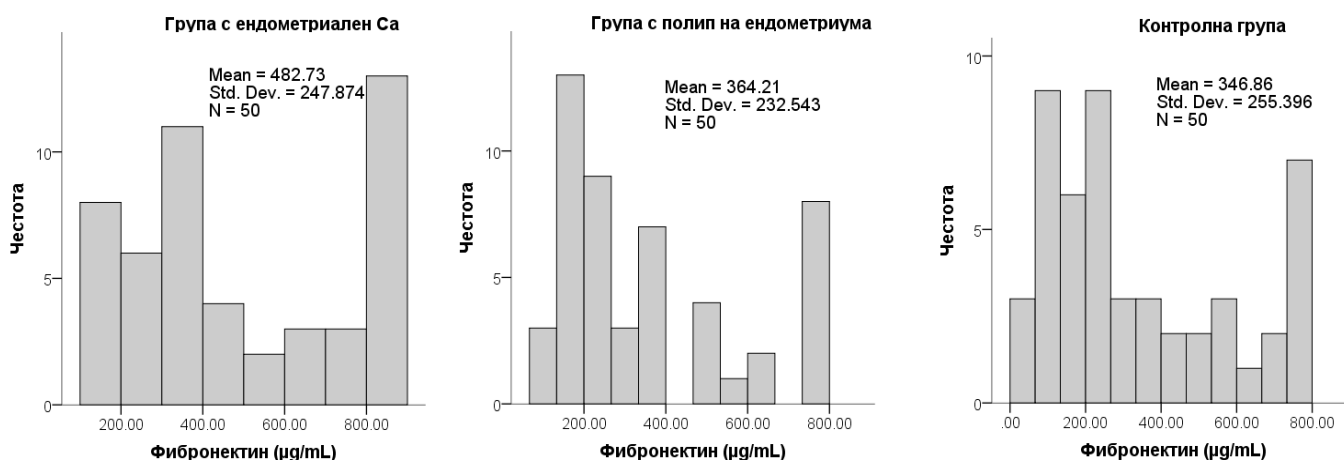
Настоящото проучване, подобно на други такива, установи повишени серумни нива на VEGF при жени с ендометриален карцином в сравнение с останалите две групи, но не установи достатъчна статистическа значимост

2. Резултати от изследване на Фибронектин при пациентки с малигнена и бенигна 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.



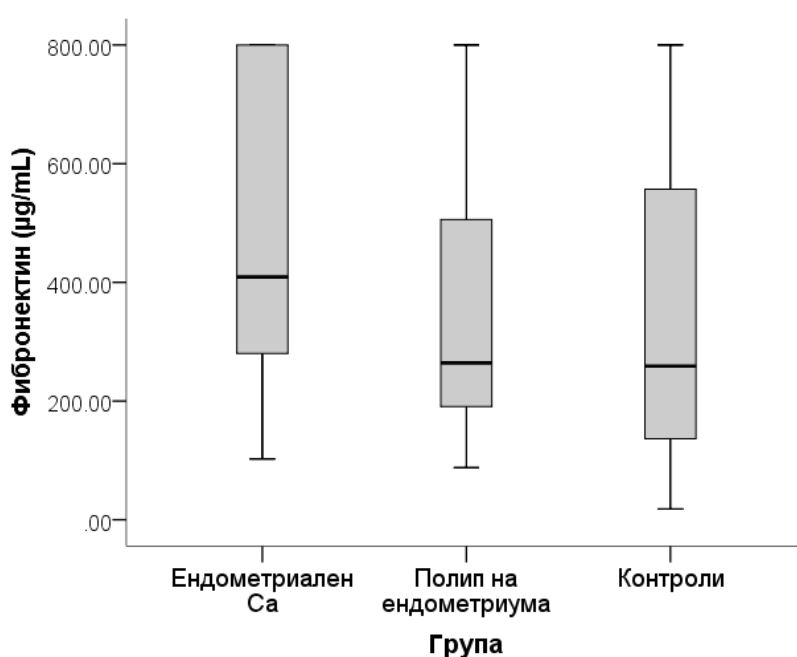
Фиг 4. Разпределение на стойностите на фибронектин в трите групи

Тестът на Kruskal-Wallis беше значим за междугрупови различия (10.11, df = 2, p = 0.006), като показва, 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 $\mu\text{g/mL}$).

Стойностите на Фибронектин в групата с полип (средна 364.21, медиана 264.25 $\mu\text{g/mL}$) 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.

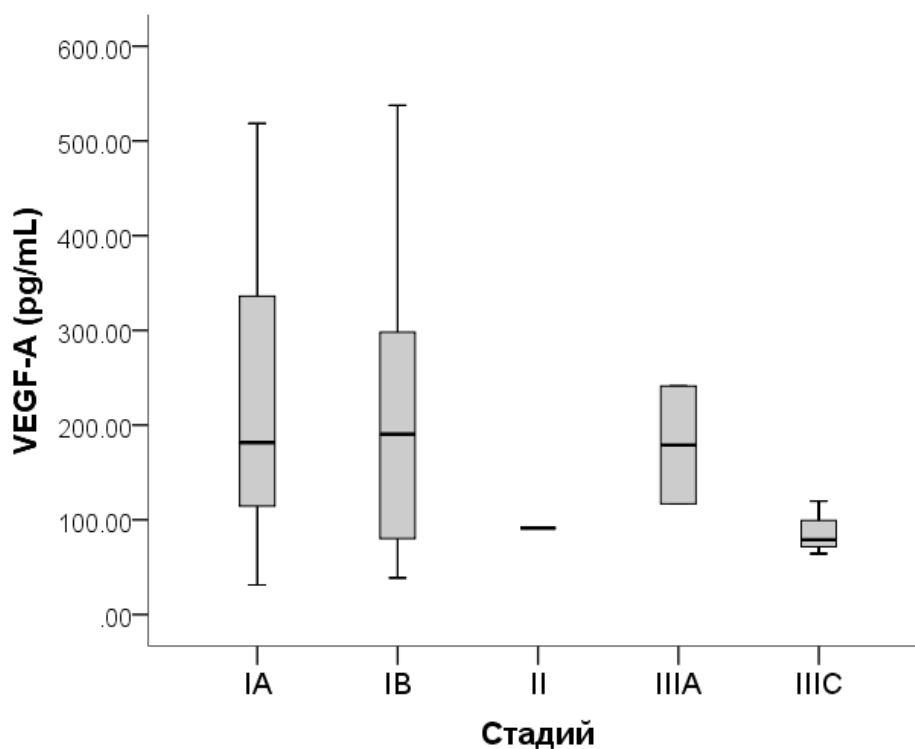
Всички пациентки с ендометриален карцином в пручването са оперирани и имат постоперативно стадиране на база хистологичния резултат.

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 показва, 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).

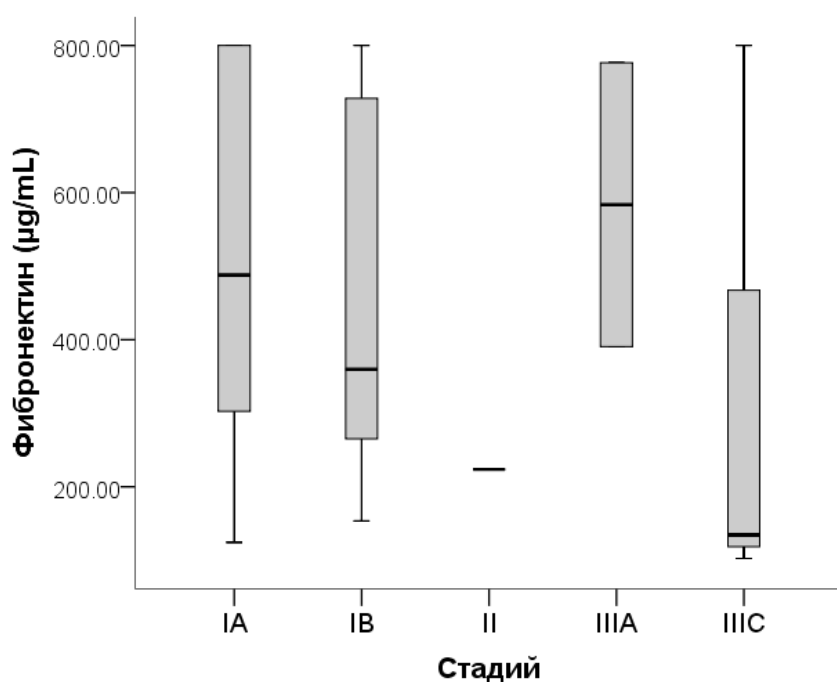


Фиг 7. Сравнение на стойностите на VEGF-A по стадий

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

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 анализираниите 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 ендометриален 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

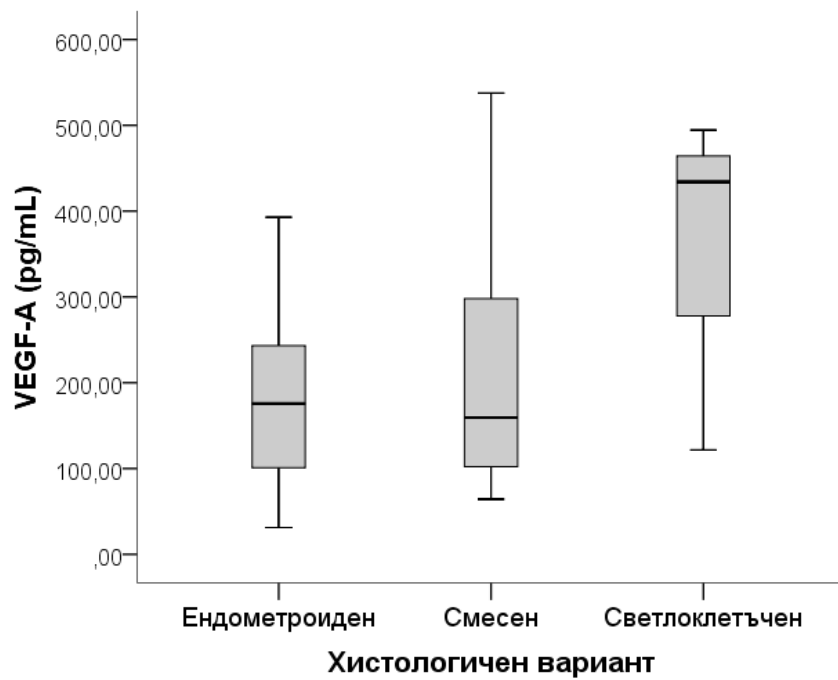
Според степента на диференциация жените с ендометриален карцином бяха разпределени както следва – 12 пациентки с високодиференциран

карцином (24%), 33 пациентки с умеренодиференциран карцином (66%) и 5 пациентки с нискодиференциран карцином (10%). (фиг. 10).



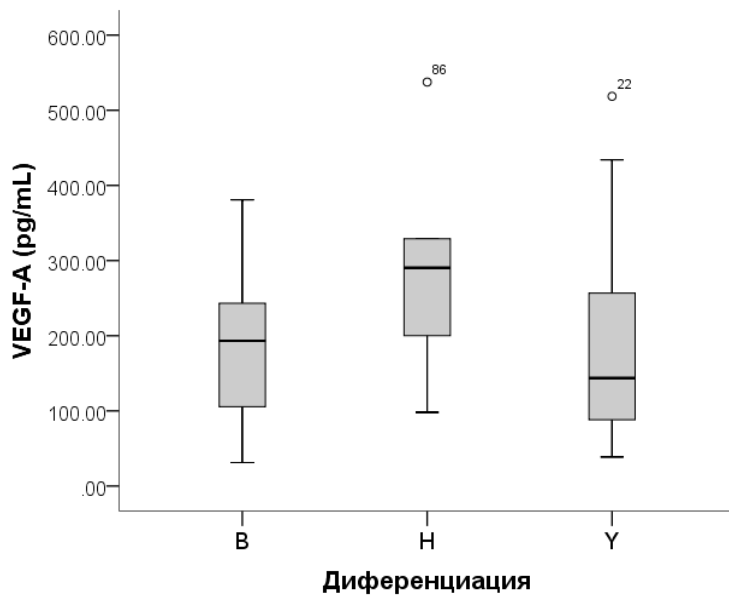
Фиг 10. Процентно разпределение на пациентките с ендометриален карцином по степен на диференциация

По отношение на VEGF-A Mood's Median тестът не беше значим за междугрупови 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).



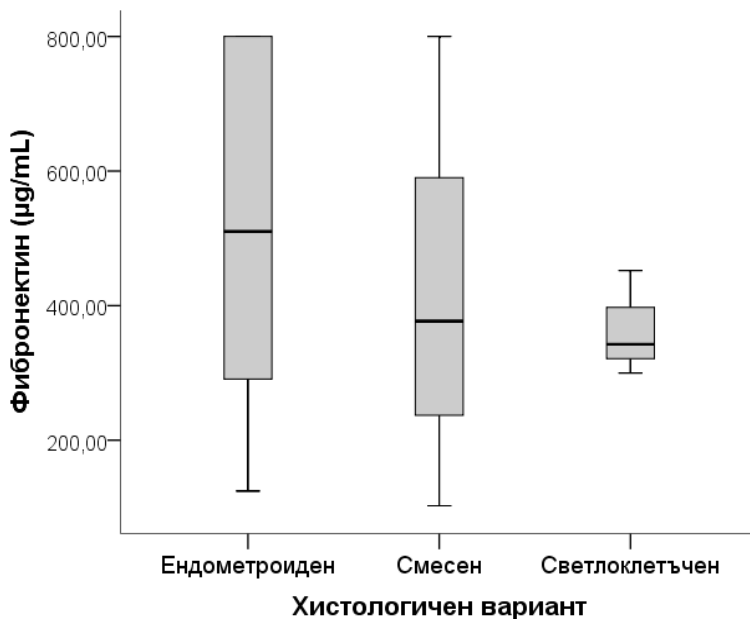
Фиг 11. Сравнение на стойностите на VEGF-A по хистологичен вариант

Не се установиха значими различия и по степен на диференциация (2.94, $df = 2$, $p = 0.230$) между високодиференциран (В) (средна 188.32, медиана 193.18 pg/mL), нискодиференциран (Н) (средна 291.00, медиана 290.37 pg/mL) и умеренодиференциран (У) (средна 189.81, медиана 143.71 pg/mL). (фиг. 12).



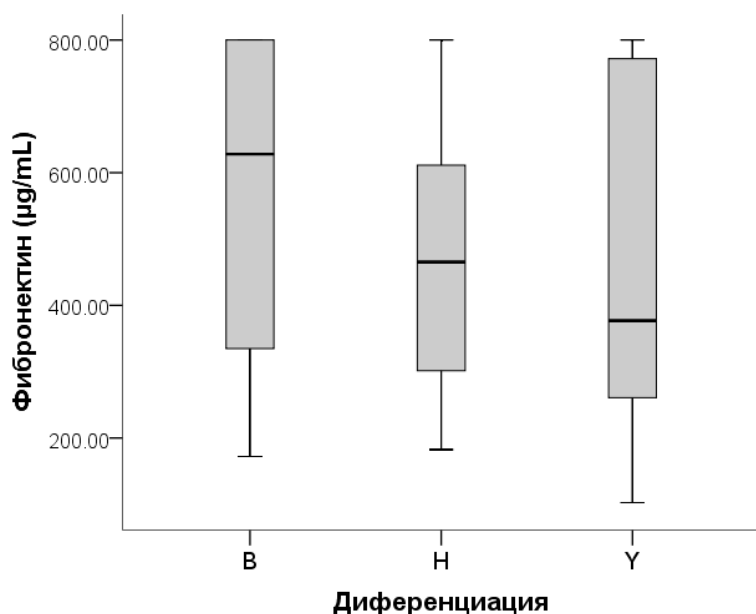
Фиг 12. Сравнение на стойностите на VEGF-A по диференциация

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$), смесен (средна 420.81, медиана 377.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$) и светлоклетъчен (средна 364.84, медиана 342.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (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 (В) (средна 566.46, медиана 628.07 $\mu\text{g/mL}$), нискодиференциран (Н) (средна 472.13, медиана 465.40 $\mu\text{g/mL}$) и умеренодиференциран (У) (средна 458.91, медиана 377.04 $\mu\text{g/mL}$). (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).



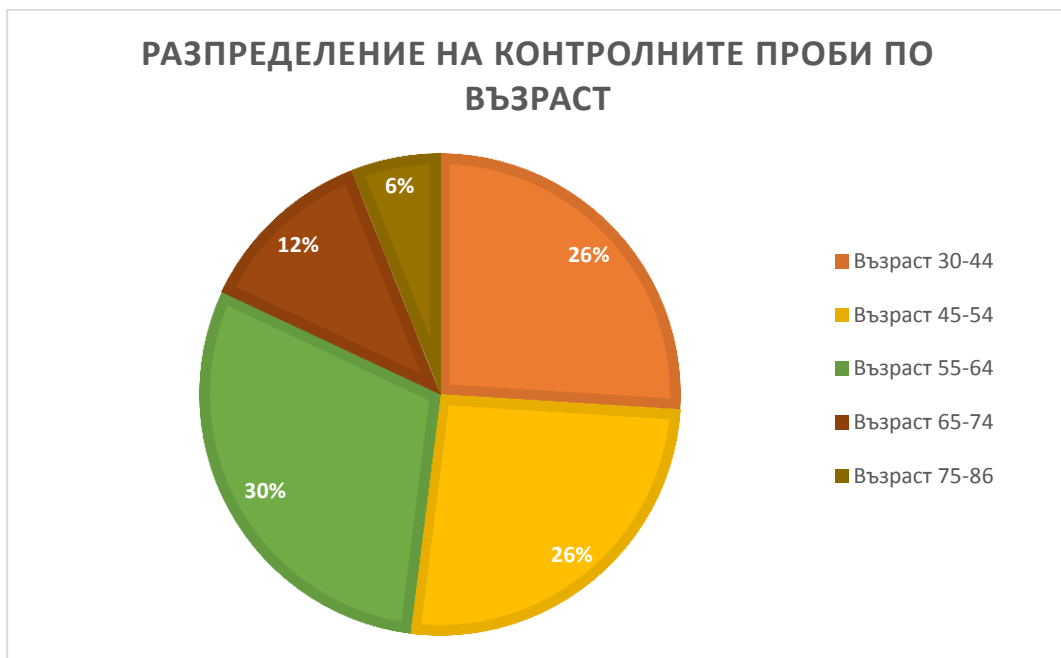
Фиг 15. Разпределение на пациентките с ендометриален карцином по възраст

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).

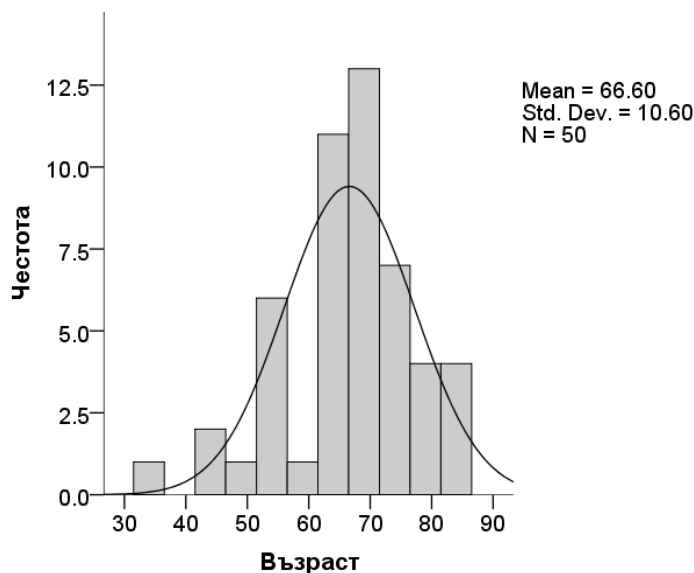


Фиг 17. Разпределение на контролните проби по възраст

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 Спийрман.



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 Спийрман 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.

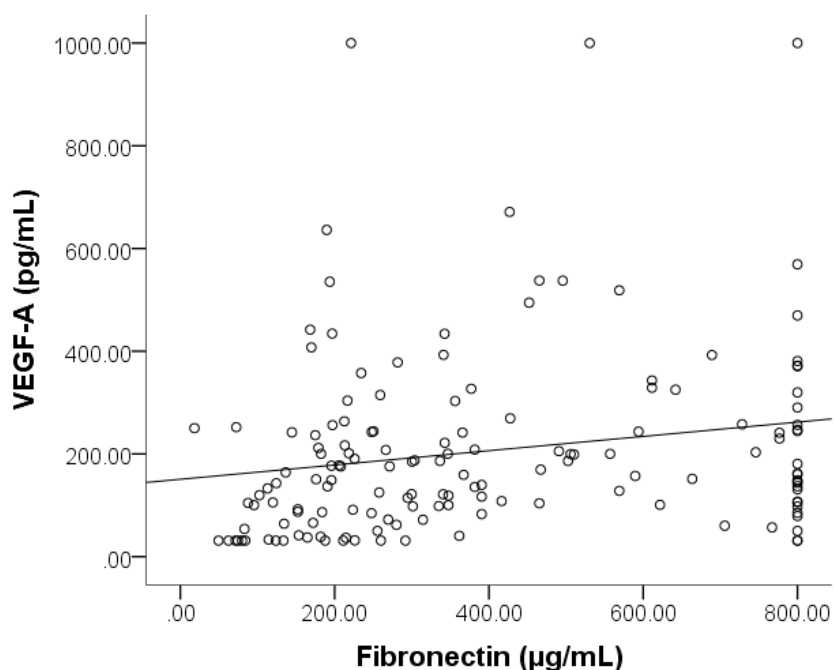
Корелация между VEGF-A и Фибронектин – изчислен е корелационен коефициент на Спийрман, който показва значима позитивна

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).

Correlations

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

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



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 $r = 0.29$, $p < 0.001$. 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.

V. 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 ендометриален 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 показва 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 показва значими различия

5. Липсва корелация между възрастта на изследваните пациентки и нивата на VEGF-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.

VI. 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.

VII. 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 бенигна и малигна 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

Искрени благодарности на научния ми ръководител доц. Румен Димитров, който ме подкрепяше и напътстваше през цялото време на разработване на дисертационния труд и ми гласува безрезервно доверие.

Сърдечна благодарност на д-р Жулиета Христова и проф. Добрин Свиначков за съдействието в съхранението и обработването на всички проби в текущото проучване.

Огромно благодаря на проф. Асен Николов, проф. Иван Костов, д-р Веселин Дяволов за дадената ми възможност за интелектуално израстване, медицинско обогатяване и развитие.

Благодаря и на всички колеги в СБАЛАГ „Майчин дом“ - София за ежедневната подкрепа в справянето с всички предизвикателства и трудности в нашата нелека професия.