

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ – ВАРНА

КАТЕДРА „НЕВРОХИРУРГИЯ И УНГ БОЛЕСТИ“

УНИВЕРСИТЕТСКА БОЛНИЦА „СВ. МАРИНА“

КЛИНИКА ПО НЕВРОХИРУРГИЯ

Д-р Деян Димитров Ханджиев

АНГИОГЕНЕЗА ПРИ ГЛИАЛНИ МОЗЪЧНИ ТУМОРИ

АВТОРЕФЕРАТ

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

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

ДОЦ. Д-Р ГЕОРГИ НЕДКОВ КЮЧУКОВ, ДМ

ДОЦ. Д-Р ЯВОР ПЕТКОВ ЕНЧЕВ, ДМ

ВАРНА, 2015

Дисертационният труд е представен на 136 страници и съдържа 7 таблици и 62 фигури. Литературната справка включва 214 заглавия, от които 1 на кирилица и 213 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за защита на Катедрен съвет на Катедрата по „Неврохирургия и УНГ болести“ на МУ-Варна №15/17.11.2014 г.

Научно жури: Проф. Кирил Романски, д.м.н.

Проф. Ара Капрелян, д.м.

Доц. Георги Кючуков, д.м.

Доц. Христо Цеков, д.м.

Доц. Кирил Георгиев, д.м.

Изказвам благодарност към целия колектив на Клиниките по Неврохирургия към УМБАЛ „Св. Анна“ и УМБАЛ „Св. Марина“ без чието съдействие осъществяването на това проучване би било невъзможно.

Благодаря на персонала на Лаборатория по Клинична имунология към Катедра по микробиология и вирусология, Университетска болница “Св. Марина” – Варна за съдействието и осъществяването на имунохистохимичните изследвания.

Благодаря на Стоян Ненков за статистическата обработка и най-вече за времето и творческата мисъл, без които анализите щяха да бъдат „суха“ математика.

Публичната защита на дисертационният труд ще се състои на 23.02.2015г. (понеделник) от 12.00 часа в III аудитория на МУ-Варна, ул. „Марин Дринов“ №55

Материалите по защитата са на разположение в Научния отдел на МУ-Варна и на интернет страницата на Медицински университет - Варна

СЪДЪРЖАНИЕ

Увод	5
I. Литературен обзор	7
1. Ангиогенеза	7
1.1. Същност	7
1.2. Механизъм на ангиогенезата	8
1.3. Туморна ангиогенеза	10
1.4. Ангиогенно превключване	11
1.5. Фактори, участващи в туморната ангиогенеза	12
1.6. VEGF	12
1.7. bFGF	14
2. Ангиогенеза при глиоми. Модел на взаимоотношенията	15
2.1. Ликворни маркери	15
II. Цел и задачи	17
III. Материали и методи на изследване	18
1. Бази за реализация на дисертационния труд	18
2. Пациенти, контроли и характеристика на проучваните групи	18
3. Рутинни методи на изследване. Клинични и биологични маркери	19
4. Медицинска документация	19
4.1. Анкетна карта	20
5. Специфични методи на изследване	20
6. Статистически анализи	20
IV. Резултати	22
4.1. Клинико-морфологична характеристика на проучваните групи заболявания	22
4.2. Клинико-морфологична характеристика на изследваните лица, участващи в изследването на стойностите на VEGF и bFGF в кръвна плазма	23
4.3. Сравнителен анализ на стойностите на VEGF и bFGF, измерени в кръвна плазма при пациенти с мозъчни неоплазми - динамично проследени предоперативно и постоперативно	30
4.4. Корелационен анализ между стойностите на VEGF и bFGF, измерени в кръвна плазма, по групи	32
4.5. Корелацията между факторите VEGF и FGF при глиомите според степента на малигненост (high grade, low grade)	33
4.6. Корелационен анализ на стойностите на VEGF и bFGF, измерени в кръвна плазма и продължителността на живота при пациенти с мозъчни неоплазми	34
4.7. Клинико-морфологична характеристика на изследваните лица, участващи в изследването на стойностите на VEGF в ликвор	35
4.8. Дисперсионен анализ	42
4.9. Регресионен анализ. Оценка на корелационната зависимост между ликворната концентрация на VEGF и продължителността на живота	43
4.10. Нелинеен модел	46
4.11. Подгрупи. Варианти. Уточняване на модела	47
V. Дискусия	53
VI. Изводи	67
VII. Приноси на дисертационния труд	68
VIII. Публикации, научни съобщения и проекти свързани с темата на дисертационния труд	69
IX. Приложение	71

Използвани съкращения

ЕЦМ – екстрацелуларен матрикс
ЕК – ендотелна клетка
ММП – матриксни металопротеази
ТАМ – тумор-асоциирани макрофаги
Ang-1, -2 – Angiopoetin 1 и Angiopoetin 2
bFGF – Basic Fibroblast Growth Factor
c-met – онкоген, кодиращ MET рецептор
CECS – циркулиращи ендотелни клетки
ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay
EPAS-1 – ендотелен PAS протеин -1
ЕРС – ендотелни прогениторни клетки
GBM – мултиформен глиобластом
HBGF – heparin binding growth factor-2
HIF-1 – Hypoxia inducible factor-1
HGG – high grade glioma
IFN – Interferon
Jak/STAT – клетъчен сигнално-трандукционен път
Klf2 – Kruppel-like factor 2
LGG – low grade glioma
МАРК – Митоген Активирани Протеин Кинази
MVD – micro vessel density -микро съдова плътност
PDGF – Platelet derived growth factor
PET – позитронно-емисионната томография
PIGF – Placenta growth factor
rCBV – relative cerebral blood volume
SDF-1 – stromal derived фактор-1
SCF – Stem cell factor
SPECT – еднофотонна емисионна компютърна томография
TGF β – трансформиращ растежен фактор β
TSP-1 – тромбосподин – 1
VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R – рецептор на VEGF
vHL – von Hippel-Lindau протеин
vWF – von Willebrand Factor
VPF – vascular permeability factor

УВОД

Ангиогенеза - разрастване на нови кръвоносни съдове, е т. нар. „общ знаменател“, споделян от множество заболявания, засягащи над един милиард хора по света.

Това са всички злокачествени заболявания, сърдечно-съдови заболявания, слепота, артрити, усложнения от СПИН, диабет, болест на Алцхаймер и повече от 70 други здравословни проблеми, засягащи деца и възрастни в развитите и развиващите се страни.

В епохалната си публикация през 1971г., Folkman J, развива идеята, че туморният растеж е ангиогенно зависим и описва за първи път възможните перспективи на анти-ангиогенната терапия при онкологичните заболявания (Folkman J., 1971). Оттогава бяха нужни 13 години за идентифицирането на първият хепарин-свързващ растежен фактор, fibroblast growth factor (FGF)-2 и 18 години за откриването на vascular endothelial growth factor (VEGF), който понастоящем се оказва, че е единственият най-важен ангиогенен фактор и в здраве и в болест (Ferrara N., 2002).

Въпреки изминалите над 40 години, все още няма утвърдени туморни маркери приложими при пациенти страдащи от глиални тумори. Множество съобщени циркулиращи биомаркери имат потенциал, но нито един не е доказан, за да бъде въведен в клиничната практика, независимо от спешността и необходимостта за стандартизиране на измерванията на ефекта от лечението в ежедневната клинична практика и проучвания.

I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. АНГИОГЕНЕЗА

1.1. Същност

ANGIO-GENESIS - разрастване на нови кръвоносни съдове от вече съществуващи.

През 1787г. Английския хирург Dr. John Hunter за първи път използва термина “ангиогенеза”.

Процес, нормално съществуващ в живите организми представен при:

- зарастване на рани
- възстановяването на кръвотока през тъканите при травми
- инсулт
- по време на менструалният цикъл / за възстановяване на маточната лигавица и за
- съзряване на яйцеклетката по време на овулация
- при бременност / за изграждане на плацентата и на циркулацията между майката и плода /.

Основните компоненти на кръвоносните съдове са ендотелните клетки, които взаимодействат помежду си формират тубуларна структура, направляваща и поддържаща кръвотока и тъканната перфузия. По време на ембриогенезата, кръвоносните съдове се развиват чрез два процеса: васкулогенеза, при която ендотелните клетки произлизат от прогениторни клетъчни типове и ангиогенеза, която е процес на формиране на нови капилари от вече съществуващи кръвоносни съдове. Постнатално, новите кръвоносни съдове се формират само чрез ангиогенеза.

Съдовата система се състои от два основни типа клетки: съдови ендотелни клетки, покриващи вътрешността на кръвоносните съдове, като монослой, и гладки мускулни клетки, които регулират интраваскуларното налягане.

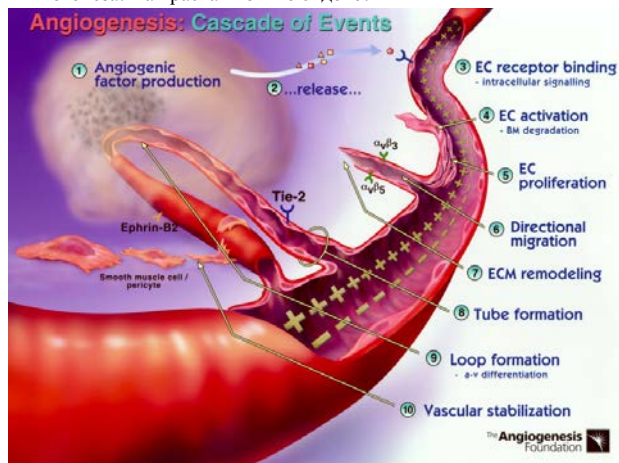
По време на ембриогенезата, образуването на сърдечно-съдовата система преминава през един първоначален етап, наречен васкулогенеза, в който ендотелните клетки се диференцират от мезодермални прекурсори, с последваща ангиогенеза - разработване на тръбна мрежа от ендотелни клетки. Този процес изисква серия от стъпки, включително ендотелно клетъчно активиране, разграждане на базалната мембрана, клетъчна миграция, извънклетъчна матриксна инвазия, пролиферация на ендотелни клетки и образуване на капиларен лумен. След стабилизиране на съдовата мрежа се включва обръщането на тези процеси, възстановяване на базалната мембрана, прекратяване на клетъчната пролиферация, образуване на съединително-тъканният комплекс, както и набирането на перицитите за стабилизиране на стената на съда (Ferrara N, 2004).

Ендотелните клетки са едни от най-дълго живеещите, след тези в централната нервна система. Общата повърхност, която може да се покрие от ендотелните клетки при възрастен - грубо е с размерите на тенис корт. В нормален кръвоносен съд, средно 1 на 10 000 ендотелни клетки (0,01%) в дадено време се намира в активен клетъчен цикъл.

Така че, като време, ендотелно-клетъчният “turnover” се измерва в години. При съответна стимулация обаче, латентната съдова стена може да стане активна и да даде нови капилари. Този процес, познат като неоваскуларизация или ангиогенеза е изключително сложен и специфично регулиран. Той включва разграждане на базалната мембрана и екстрацелуларните матриксни протеини, активация, пролиферация и миграция на ендотелни клетки и перицити. В развитието му взимат участие голям брой растежни и инхибиторни фактори, цитокини, адхезионни молекули и ензими. Ако всички кръвоносни съдове в тялото се свържат край с край, ще се получи линия, която ще обиколи Земята два пъти.

1.2. Механизъм на ангиогенезата

Ангиогенеза: Как растат новите съдове?



Фигура 1. Каскада от етапи на образуване на нов кръвоносен съд. (Фондация Ангиогенеза (The Angiogenesis Foundation, 2014, www.angio.org))

Процесът на ангиогенеза при здрави възрастни индивиди съществува, като серия от събития:

Кръвоносните съдове осигуряват хранителни вещества и кислород в целия организъм и се състоят от вътрешен слой от тясно сглобени ендотелни клетки, покрити от перицитите, образуващи базалната мембрана, вградена в стромата на тъканта (различни стромални клетки и извънклетъчен матрикс).

При здрави възрастни баланса на растежни фактори поддържа ендотелните клетки в летаргия или в покой.

Кръвоносните съдове имат кислородни и хипоксия-индуцируеми рецептори, за да мониторира и съответно да доставят нужните количества от кислород на околните тъкани.

Хипоксията или други ендотелни сигнали активират клетките и освобождават сигнални фактори (като VEGF, Ang-2, FGF и хемокини), за да подпомогнат растежа на нови кръвоносни съдове от съществуващите - процес наречен ангиогенеза.

1. Увредената тъкан или тумор продуцира растежни фактори /протеини/, които дифундират към околната тъкан.

2. Растежните фактори се свързват със специфични рецептори локализирани върху ендотелните клетки или близките кръвоносни съдове.

3. Когато растежните фактори се свържат с рецепторите си, ендотелните клетки се активират и започват да продуцират нови молекули включително и ензими.

Перицитите се откъсват от съда (Ang-2 сигнална молекула), ендотелните клетки се активират и губят близкия контакт помежду си при разширението на съда (VE- кадхеринова сигнализация).

4. Ензимите лизират подлежащата базална мембрана, образувайки малки дупчици.

В растящата формация, се селектират върхови клетки (избор повлиян от Neuropilin, VEGF/VEGFR and NOTCH/ DLL4 and JAGGED1), които освобождават матриксни металлопротеази (MT1-MMP), за да разграждат базалната мембрана и да ремоделират екстрацелуларния матрикс.

5. Ендотелните клетки започват да пролиферират и мигрират през лизираната мембрана на съществуващите кръвоносни съдове към увредената тъкан или тумор.

6. Специфични адхезивни молекули (Интегрини - avb3, avb5) служат като захващащи “кукички”, за да помогнат на новите съдове да прорастнат.

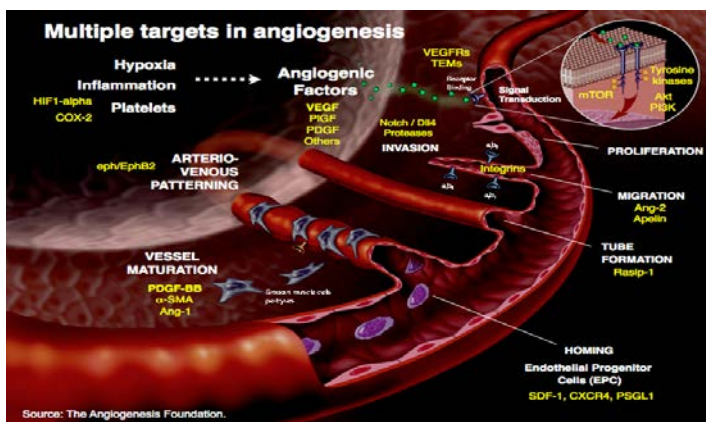
7. Върховите клетки се поляризират и протягат различен брой филоподи, (водени от сигналите на семафорини, ефрини и интегрини), за да направляват миграцията и растежа на прорастъка към ангиогенният стимул (градиент на VEGF). Върховите клетки са предимно мигриращи и не пролиферират.

8. Стволовите клетки следват върховете и се размножават, удължавайки съдовата издънка. Пролифериращите стволови клетки образуват връзки със съседните ендотелни клетки и освобождават молекули като EGFL7 (хемокин въздействащ върху самите ЕК), които се свързват с компонентите на екстрацелуларния матрикс и регулират формирането на съдовия лумен.

9. Свързването на съседни клончета става, когато две върхови клетки се срещнат, установявайки връзка между ендотелна клетка с ендотелна клетка (под въздействието на VE-кадхерин, Ang-1) и образуват непрекъснат лумен.

Екстрацелуларния матрикс се отлага, за да се образува новата базална мембрана, ендотелноклетъчната пролиферация спира, набират се перичити за стабилизиране на новия съд (PDGFR/PDGF-B, Ang-1).

10. Щом се появи кръвоток, перфузията на кислород и хранителни вещества редуцира ангиогенните стимули (VEGF–експресията) и инактивира кислородните рецептори на ЕК, възстановявайки летаргичното състояние на кръвоносния съд (Adams RH, Alitalo K., 2007; Carmeliet P, Jain RK., 2011; Chung AS. 2010; Nichol D, Stuhlmann H., 2011; Potente M., 2011).

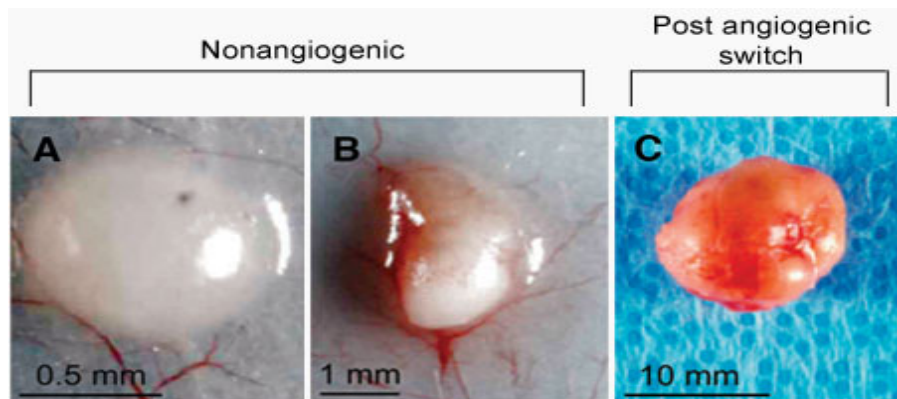


Фигура 2. Показани са различните етапи на сформирание на новообразуваният се кръвоносен съд, както и малка част от основните молекули и ензими участващи в различните процеси. (Фондация Ангиогенеза (The Angiogenesis Foundation, 2014, www.angi.org))

1.3. Туморна ангиогенеза

Концепцията за значението на ангиогенезата в туморната биология и терапията на солидните тумори с ангиогенни инхибитори е представена от Judah Folkman още през 1971 - Tumor angiogenesis: therapeutic implications (Folkman J, 1971). Интересът за изучаване на туморната ангиогенеза нараства през 80-те, с изолирането на първата проангиогенна молекула - bFGF, а впоследствие - на главния ангиогенен промотор VEGF и тирозин-киназните му рецептори. Следва изолирането на други проангиогенни молекули, на техните рецептори и механизми на сигнална трансдукция, както и на естествените им инхибитори. Тези събития формират основата за изучаване на ангиогенезата при солидните тумори, създаването на синтетични ангиогенни инхибитори и въвеждането им в клинични проучвания като част от цялостната терапевтична стратегия при много онкологични заболявания (Folkman J, 1992; Senger DR et al., 1983; Leung DW et al., 1989).

Ангиогенезата е от съществено значение за растежа на първичните тумори и тяхното последващо метастазиране. Туморите могат да абсорбират достатъчно хранителни вещества и кислород, чрез проста дифузия, до размер от 1-2 mm, при което по-нататъчният им растеж изисква разработването на кръвоснабдяване. Процесът на осъществяване на кръвоснабдяването включва стимулиране на съседната, на тумора, зряла съдова система да започне изграждането и прорастването на нови капилари на кръвоносните съдове. Те растат към туморната маса и впоследствие проникват в нея (Kerbel RS, 2000). (фигура 3)

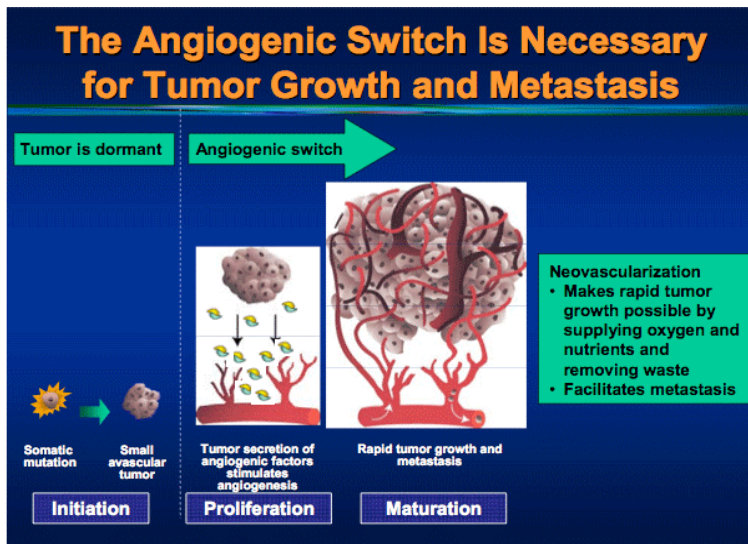


Фигура 3. А и В- микроскопски тумори генерирани от неангиогенна туморна клетъчна линия (аваскуларни, не се установяват кръвоносни съдове), С- макроскопски тумор (също от неангиогенна туморна клетъчна линия) претърпял спонтанно превключване от латаргично състояние в ангиогенен фенотип (вече има изградени кръвоносни съдове). (Naumov GN et al., 2006)

В допълнение, както физиологичната така и туморната ангиогенеза включват набирането на циркулиращите ендотелни прекурсорни клетки от костния мозък за насърчване на неоваскуларизацията (Asahara T et al., 1999; Jain RK, Carmeliet P, 2012).

1.4. Ангиогенно превключване

Туморите могат да бъдат в латаргично състояние с години, преди да придобият ангиогенен фенотип. Това придобиване на ангиогенен фенотип, се нарича ангиогенно “превключване”, което се получава в резултат на нарушаване на баланса между инхибиращи и стимулиращи фактори. Неоваскуларизация настъпва, ако балансът на проангиогенните фактори преодолее негативните ефекти на ендогенните ангиогенни инхибитори (Hanahan D, Folkman J, 1996).



Фигура 4. Ангиогенно превключване. Показана е трансформацията на група туморни клетки. Как малък аваскуларен туморен възел в латаргично състояние, под въздействието на различни фактори се активира и се наблюдава агресивен туморен растеж. (Carmeliet P et al., 2000)

Генетичните промени, които са в основата на трансформацията в злокачествено състояние, като активирани онкогени и загуба на туморните супресорни гени, са способни да предизвикат ангиогенно превключване. Веднъж стартирана туморната ангиогенеза не само позволява растежа на първичния тумор, но също така предлага маршрут за метастатично разпространение на индивидуални ракови клетки, чрез зараждащите се кръвоносните съдове. Последните изследвания показваха, че ако клетките вече са трансформирани, ангиогенезата може да се иницира с туморна маса, съдържаща едва 100-300 клетки (Li CY et al., 2000). По същия начин, метастатични тумори, които са получени от трансформирани клетки, подложени на много от генетичните промени в основата на ангиогенното превключване, имат потенциал за бърз растеж от най-ранните етапи на своето развитие.

1.5. Фактори, участващи в туморната ангиогенеза.

Здравият организъм контролира процеса на ангиогенеза, чрез редица “on” - ”off” превключвания.

Главните “on” елементи са известни като – angiogenesis- stimulating growth factors (ангиогенезни стимулиращи фактори).

Главните “off” елементи са известни като- angiogenesis inhibitors (ангиогенезни инхибитори).

При здравият организъм се поддържа перфектно равновесие от ангиогенни модулатори. Съществуват най-малко 20 ангиогенни растежни фактора. Пет са тествани върху хора за стимулиране на растежа на нови кръвоносни съдове, за зарастване на рани и възстановяване на кръвотока към сърце, крайници и мозък.

Първият ангиогенен инхибитор е открит през 1975г. От Dr. Judah Folkman и Dr. Henry Brem.

До днес са открити около 30 ангиогенни инхибитора в човешкото тяло, а общо са над 300 в естествени източници- гъби, дървесни кори, мускул и хрущял от акула, корали, зелен чай, чесън, жен-шен, билки и др. (Folkman J, 2000; Li W et al., 2005; Li W, 2000; Ribatti D, 2009).

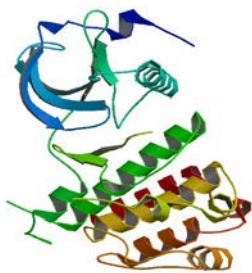
Когато ангиогенезните растежни фактори се продуцират в условията на недостиг на инхибитори, балансът е нарушен и се формират нови кръвоносни съдове.

Когато инхибиторите са представени при липса на стимулатори ангиогенезата е спряна.

Най-общо ангиогенезата е „спряна“ при продукцията на повече инхибитори отколкото стимулатори (Folkman J, 2000; Li W et al., 2005).

Предвид факта, че VEGF и рецепторите му 1 и 2 са сред основните звена в туморната ангиогенеза, а bFGF е първата изолирана проангиогенна молекула и са сред основните анализирани молекули в настоящата дисертация, същите са разгледани по-обстойно в настоящия раздел.

VEGF



Фигура 5. Кристална структура на човешки VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR РЕЦЕПТОР 2 (KDR) KINASE DOMAIN. Белтъчните вериги са оцветени от N-край към C-край, чрез спектрален цветен градиент. (Protein Data Bank, www.rcsb.org, 2014)

VEGF-vascular endothelial growth factor, vascular permeability factor VPF или vasculotropin.

Глюкопротеин открит в туморни клетки при редица гризачи и хора - карцином на бял дроб и пикочен мехур, фибросарком, промиелоцитна левкемия, лимфоми и глиални тумори.

В здрави тъкани се открива в активирани макрофаги, кератиноцити, хепатоцити, гладкомускулни клетки, епитела на бронхи и плексус хоронидеус.

През 80-те години, благодарение на усилията на няколко групи изследователи, VEGF е описан първоначално като съдов пермеабилитетен фактор (VPF-vascular permeability factor), а впоследствие е идентифициран като VEGF-A, основният ангиогенен промотор (Leung DW et al., 1989; Ferrara N, Henzel WJ, 1989, Connolly DT et al., 1989).

Понастоящем, VEGF фамилията се състои от общо 6 структурно подобни димерни гликопротеини, принадлежащи към PDGF (Platelet derived growth factor) – суперфамилията от растежни фактори, и включва 6 представители - VEGF-A, VEGF-B, (25) VEGF-C, (26) VEGF-D, (27) VEGF-E и PlGF (Placenta growth factor) (Ferrara N, 2004, . Hicklin DJ, Ellis LM, 2005). Тези фактори се свързват с различен афинитет към съответните 3 тирозин-киназни рецептора: VEGFR-1 (Flt-1), (30) VEGFR-2 (KDR, flk-1) (31) и VEGFR-3. Докато VEGF-A, -B и PlGF имат по-голямо значение за ангиогенезата, то VEGF-C, -D и вероятно -E са с подчертано стимулиращ ефект върху лимфатичните ендотелни клетки и лимфангиогенезата. Активните форми на VEGF (основно се има в предвид VEGF-A) се синтезират като хомодимери (40-45kDa) или като хетеродимери с други VEGF представители, като PlGF. VEGF, локализиран върху хромозома 6p21.3, се кодира от 8 екзона, разделени от 7 интрона.

Основни биологични свойства на VEGF

Съдов пермеабилитетен фактор (Senger DR et al., 1983).

Специфичен митоген за ендотелните клетки – не е митоген за други типове клетки (с някой изключения) (Leung DW et al., 1989).

Медира секрецията и активацията на ензими участващи в разграждането на екстрацелуларния матрикс. Въздействайки върху ендотелните клетки, VEGF индуцира експресията на плазминогенният активатор и неговия рецептор, експресията на урокиназияния рецептор и на матриксните металопротеази, колагеназа и желатиназа А, като същевременно намалява нивата на тъканните инхибитори на металопротеазите I и II (Lamoreaux WJ et al., 1998; Pepper MS, Ferrara N et al., 1991).

Анти-апоптозен фактор за ендотелните и туморните клетки (Alon T et al., 1995; Dias S et al., 2000).

VEGF е незаменим за организирането и набирането на прекурсорите на ендотелните клетки от костния мозък и организация на васкуларизацията (Asahara T et al., 1999).

Модулира миграцията на ендотелните клетки (Rousseau S et al., 2000).

Експресията му се стимулира от форболов естер, TGF-transforming growth factor и хипоксия, която е главния “дразнител”.

In vitro VEGF е силен митоген за ендотелните клетки.

In vivo индуцира процеса на ангиогенеза едновременно с микроваскуларния пермеабилитет.

bFGF



Фигура 6. Кристална структура на човешки BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR, полимер, Белтъчните вериги са оцветени от N-край към C-край, чрез спектрален цветен градиент. (Protein Data Bank, www.rcsb.org, 2014)

FGF basic, FGF-2 или хепарин-свързващ растежен фактор (HBGF- heparin binding growth factor-2) е най-интензивно изследваният член на групата на 22 митогенни фактора от семейството на FGF (Mohammadi M et al., 2005).

Изолиран от редица източници-неврална тъкан, хипофиза, кортекса на надбъбречните жлези, жълто тяло и плацента.

bFGF е първата проангиогенна молекула, изолирана през 1984г. от Shing от хондросарком. bFGF се експресира в клетките от мезодермален и невроектодермален произход, както и от множество малигнени тумори и туморно-клетъчни линии. Продуцира се и от стромни клетки, мегакариоцити и клетки от гранулоцитната линия, като стимулира тяхната пролиферация (Shing Y et al., 1984).

FGF стимулира пролиферацията на клетките от мезодермален и невроектодермален произход, включително фибробласти, ендотелни клетки, астроцити, олигодендроцити, невробласти, кератиноцити, гладкомускулни клетки, остеобласти и меланоцити.

Той е силен хемотактичен и митогенен фактор за ендотелните клетки стимулирайки тяхната продукция на фактори свързани с разграждането на основната мембрана и миграцията на капилярни ендотелни клетки в колагенни матрици образувайки първични капилярни тубули.

FGF модулира нормални процеси като ангиогенеза, зарастване на рани, учене, памет, както и ембрионалното развитие на сърцето, костите и мозъка (Presta M et al., 2005; Reuss B et al., 2003; Su N. et al., 2008), неадекватната му експресия или други членове на семейството на FGF резултира в туморна прогресия (Rogeli S et al., 1989). Тези феномени водят до извода, че семейството на FGF може би взема активно участие в редица патологични състояния в резултата на неконтролирана клетъчна пролиферация и неконтролируема ангиогенеза.

FGF-индуцира невронална диференциация, преживяемост, регенерация и предпазва невроните от т. нар. лезионно индуцирана смърт („lesion-induced death“). Стимулира не-митогенните функции на глиалните клетки като миграцията и е установен в зони на хипокампус, мозъчен ствол и периферни ганглии.

Повишената му регулация е в отговор на възпаление, чрез медиатори като TNF, IL-1, IL-2, PDGF и азотен окис (Presta M et al., 2005).

2. Ангиогенеза при глиоми. Модел на взаимоотношения.

Глиобластомите (GBM) представляват болшинството от глиомите и са приблизително 17% от всички първични мозъчни тумори (Kleihues et al., 1993, 2000).

Честотата варира около 3.2/100.000 годишно в Съединените Американски Щати и Европа (CBTRUS, Central Brain Tumor Registry of the United States; ABTR, Austrian National Cancer Registry) и се увеличава с напредване на възрастта (Fritz et al., 2000; Ohgaki et al., 2004; CBTRUS, 2010). Въпреки, че се срещат във всяка възрастова група, пикът е в късна зрялост между 65-75 години с лека доминация при мъжете (Fritz et al., 2000; Ohgaki et al., 2004).

GBM е най-злокачествената форма сред мозъчните глиоми.

Той е с бърз и инфилтративен растеж, който хистологично рефлектира с малигнена морфология, туморна некроза и съдова пролиферация. GBM може да бъде първичен (или de novo GBM - pGBM) или да еволюира от предшестваща лезия, като астроцитом - II по СЗО и анапластичен астроцитом - III (A III) (вторичен, или прогресиращ GBM - sGBM) (Kleihues and Ohgaki, 1999; Brat et al., 2002; Louis and International Agency for Research on Cancer, 2007).

Пациентите с GBM често са с къса анамнеза. Симптомите варират от гърчове и главоболие до симптоми на повишено интракраниално налягане или до огнищна неврологична симптоматика като парези, говорни нарушения или други в зависимост от локализацията на туморния растеж.

Въпреки съвременният прогрес в хирургичната резекция, лъче- и химиотерапия, прогнозата на GBM все още е твърде лоша със средна преживяемост от 12.1 до 14.6 месеца след диагнозата (Stupp R and Weber, 2005) и пет годишна преживяемост по-малко от 5% (CBTRUS, 2010).

2.1. Ликворни маркери

Гръбначно-мозъчната течност обгражда главният и гръбначният мозък и циркулира във вентрикулната система. Малки молекули, соли, пептиди и протеини формират физиологичните съставки на ликвора (Yuan and Desiderio at all, 2005), като белтъчната концентрация в нормален ликвор варира между 0.2-0.8 мг/мл (Zheng PP et al., 2003).

Промените в състава могат да са индикация за патофизиологични състояния като инфекции, невродегенеративни заболявания или туморен растеж (Khawaja FW et al., 2006; Zougman A et al., 2008).

Поради близостта на гръбначно-мозъчната течност с мозъка и съответно с мозъчните тумори, свързаните с GBM, белтъци могат да достигнат ликвора чрез директна секреция, дифузия или разкъсване на кръвно-мозъчно-ликворната бариера (Papadopoulos M C et al., 2001; Schneider SW et al., 2004). Въпреки това, понастоящем в клиничната практика няма диагностични, прогностични или предиктивни ликворни маркери за GBM.

Ограничаващ фактор за ликворните маркери може да бъде достъпът за получаване на гръбначно-мозъчна течност при пациенти с GBM. Може да бъде по време на хирургия, което е неприемливо за повторни проби, както и чрез външен дренаж или лумбални пункции, които са доста инвазивни. Болшинството от болните с GBM са диагностицирани с интракраниален

обемен процес, което може да е контраиндикация за лумбална пункция. Следователно нуждата от повторни ликворни изследвания с прогностична цел или продължителен мониторинг може да ограничи широката употреба на ликворните маркери.

Проучвания върху хибридизация „in situ“ показаха висока концентрация и засилена активност на mRNA на ангиогенни фактори като basic fibroblast growth factor (bFGF) и vascular endothelial growth factor (VEGF) при болни с глиобластом (Brem et al., 1992; Plate and Risau, 1995).

Нивата на VEGF и bFGF показват значителна корелация с микросъдовата плътност, която е повишена при GBM в сравнение с другите глиални тумори (Takano et al., 1996), а също така корелира с преживяемостта на пациентите с астроцитни тумори (Fukui et al., 2003) и са индикатор за степента на глиома (Takahashi et al., 1992).

Ангиогенните фактори в ликвор са анализирани в относително малки групи от 15 и 27 пациенти. Нивата на VEGF и bFGF в ликвор корелират със степента на туморна васкуларизация и са относително свързани с преживяемостта на болните (Peles et al., 2004; Sampath P et al., 2004). Значително са повишени при GBM в сравнение с не-астроцитните тумори и не се откриват в нормални, апатологични ликворни проби (Peles et al., 2004; Sampath P et al., 2004). Следователно нивата на bFGF и VEGF в ликвор могат да служат като маркер за ангиогенезата на GBM, могат да предскажат преживяемостта и да се окажат полезни за бъдещи ангиогенни терапевтични методи. С повишено внимание трябва да се интерпретират повишените нива на bFGF и VEGF при не-туморни състояния, като бактериален менингит (van der Flier et al., 2001). Липсват проучвания с проследяване и с по-голям брой пациенти (Jung CS et al., 2011).

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

НЕРЕШЕНИ ПРОБЛЕМИ

Въз основа на щателния литературен обзор се установи, че понастоящем липсва ясна детайлна представа за ангиогенезата при глиални тумори и ролята на растежните фактори VEGF и bFGF. В клиничната практика няма утвърдени прогностични фактори за ефекта от химиотерапия, лъчетерапия и ангиосупресивна терапия при високостепенни глиоми, както и за евентуалната очаквана продължителност на живота при тези болни.

Изследването на корелацията между нивата на VEGF и HGF в плазма и ликвор и продължителността на живота, евентуално може да доведе до утвърждаване на лесна и достъпна ангиогенна методика за клинично приложение, а определянето на прогностичната им стойност – до адекватен подбор за подходяща химио-, лъче- и/или биотерапия. Резултатите евентуално биха дали възможност и за адекватен подбор на групи болни, подходящи за ангиосупресивна терапия.

Различните нива на растежните фактори, изследвани в ликвора могат предполагаемо да позволят прогнозиране степента на малигненост на тумора, както и хода на заболяването и евентуалната продължителност на живота.

Базирайки се на досега натрупаните данни за ангиогенезата и злокачествените заболявания се формулира следната цел:

Да се изясни ролята на растежните фактори VEGF и bFGF в ангиогенезата на глиалните мозъчни тумори и евентуалната им употреба в клиничната практика като прогностични фактори за очаквана продължителност на живота при тези болни.

За постигането на тази цел се формулираха следните задачи:

- 1) Характеристика на проучваните групи заболявания, демографските показатели и клиничната история на включените в проучването пациенти.
- 2) Да се проследят пациентите и да се оцени следоперативното им неврологично и функционално състояние.
- 3) Да се проведе катамнезно проучване, за да се установи проведени ли са реоперации, лъчетерапия, химиотерапия, дата на екзитус и др.
- 4) Изследване на ангиогенната активност при пациенти с глиални тумори (основна група), менингеоендотелиални тумори и здрави (контролни групи) чрез степента на експресия на VEGF и bFGF в плазма и ликвор.
5.1 Определяне нивата на плазмените концентрации на VEGF и bFGF.
5.2 Определяне нивата на ликворната експресия на VEGF.
- 5) Динамично проследяване на стойностите на VEGF и bFGF при пациенти с мозъчни тумори предоперативно и в ранен постоперативен период;
- 6) Оценка на корелационната зависимост между ангиогенните маркери (плазмените концентрации на ангиогенните промотори VEGF и bFGF) и вида на мозъчния тумор.
- 7) Оценка на корелационната зависимост между ангиогенните маркери и степента на малигненост на глиомите.
- 8) Оценка на корелационната зависимост между ликворната експресия на VEGF и очакваната продължителност на живота.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ

1. Бази за реализиране на дисертационния труд.

- Клиника по Неврохирургия – Университетска болница “Св. Марина” и Медицински Университет – Варна
- Клиника по Неврохирургия – Университетска болница “Св. Анна” и Медицински Университет – Варна
- Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология– Медицински Университет и Университетска болница “Св. Марина” – Варна
- Лаборатория по Клинична имунология към Катедра по микробиология и вирусология, Медицински Университет и Университетска болница “Св. Марина” – Варна

2. Пациенти, контроли и характеристика на проучваните групи.

Включени са пациенти на Клиника по Неврохирургия – Университетска болница “Св. Марина” - Варна и Клиника по Неврохирургия – Университетска болница “Св. Анна”– Варна, при които е проведено неврохирургично лечение, чрез краниотомия и резекция на мозъчна неоплазма за периода 2006-2013г. Критериите са основани съгласно общоприетите стандарти по Неврохирургия и Невроонкология.

Всички пациенти са хистологично диагностицирани, като при тези с глиални тумори е регистриран летален изход до края на анализирания период (Декември, 2013 година), за разлика от контролните групи, при които смъртността е 0%.

В настоящето проучване са включени общо 109 пациента, разделени на четири групи, според вида на мозъчната неоплазма, съгласно класификацията на СЗО: 71 с високостепенни глиоми (Hi-grade glioma) - Глиобластома Мултиформе (GBM), 7 с нискостепенни глиоми (Low-grade glioma) - Астроцитом – I-II степен по СЗО, 11 с Менингеоми, и две групи по 10 пациента, служещи за контролни групи (Таблица 1).

Общо	Високостепенни глиоми	Нискостепенни глиоми	Менингеоми	Здрави
109	71	7	11	20

Таблица 1. Групи проучвани болни по вид неоплазма и контроли.

Контролни групи

Всички пациенти са запознати с провежданото проучване и са подписали информирано съгласие, одобрено от етичната комисия на болница УМБАЛ „Св. Марина“ - Варна.

Контролна група за плазмените проби.

Включени са общо 10 здрави доброволци, при които няма данни за хематологично, неопластично, остро или хронично възпалително заболяване, на средна възраст от 45 години (22–68) и съотношение жени: мъже- 1:1. Контролната група включва брой анализирани индивиди, които да съставят минимум една трета от общия предвиден брой изследвани пациенти с мозъчни тумори.

Химиотерапия:

Реоперация:

Екзитус:

Преживяни дни:

4.1 Анкетна карта (виж Приложение 1)

5. Специфични методи на изследване.

5.1 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) методика за изследване концентрацията на свободните форми VEGF и bFGF в плазмени проби.

- **Вземане и съхранение на плазмените проби.**

Венепункция на 5 мл кръв в EDTA антикоагулант, центрофугиране на 1000 об. за 15 минути- до 30-тата минута от вземането, отделяне на 1 мл плазма (от най-горния слой), съхранение при минус 70 градуса по Целзий.

5.2 ELISA методика за изследване концентрацията на свободните форми VEGF и bFGF в ликворни проби.

- **Вземане и съхранение на ликворните проби.**

Лумбална пункция, интраоперативно след туморната резекция, 2-3мл. ликвор в стерилен контейнер, центрофугиране на 3000 об. за 10мин., до 30-тата минута от вземането, отделяне на 1мл. от най-горния слой, съхранение при минус 70 градуса по Целзий.

Използвахме оригинални системи за определяне на плазмените концентрации на VEGF и bFGF (Human VEGF, Quantikine; Human bFGF, Quantikine - R&D Systems, Inc. USA), според изискванията за работа със съответния протокол.

Добавяне на 100 микролитра на разребител за анализ към всяка ямка.

Прибавят се 100 мкл. от стандартна контрола или проба към всяка ямка. Покрива се с уплътняващо блюдо, и се оставя при стайна температура за 2 часа.

Аспирира се и се промива всяка ямка, като процесът се повтаря два пъти за общо 3 измивания.

Добавя се 200 μ l. на конюгат към всяка ямка. Покрива се с ново уплътнително блюдо и се инкубира при стайна температура в продължение на 2 часа.

Аспирира се и се промива три пъти.

Добавя се 200 μ l. субстратен разтвор към всяка ямка.

Серум и плазмени проби: Инкубира се при стайна температура в продължение на 25 минути. Да се пази от светлина.

Добавя се 50 микролитра от Stop Solution във всяко гнездо.

Отчита се при 450 нм в рамките на 30 минути.

Определя се корекция дължина на вълната 540 нанометра или 570 нанометра.

Чувствителността на методиката е съответно 5 pg/ml за VEGF и 3 pg/ml за bFGF.

6. Статистически анализи.

Статистическият анализ е осъществен чрез програмен пакет DATA ANALISIS за Windows и включва следните методи:

(1) Дискриптивен анализ за определяне на статистически величини: средна стойност, стандартна грешка на средната, минимални и максимални стойности, персентилю, медиана.

(2) Непараметрични методи:

Kruskal-Wallis Test: тест за статистическа оценка на средните стойности между отделните групи.

Kolmogorov-Smirnov Test: тест за проверка на нулевата хипотеза и определяне на типа на разпределение на стойностите с оглед подбор на параметричен или непараметричен корелационен метод за анализ.

(3) Параметрични методи:

Student t-test: тест за сравняване на средните стойности между две групи от случаи

(4) Статистическо изследване на зависимости чрез корелационен анализ:

чрез определяне коефициент на Spearman (непараметричен метод) и/или

чрез коефициент на Pearson (параметричен метод)

(5) Kaplan-Meier Test за преживяемост.

(6) Соx регресионен модел за мултипараметричен анализ с цел подбор на фактор с независимо прогностично значение.

(6) Графично изобразяване на статистическите данни.

При всички проведени анализи се приема допустимо ниво на значимост $p < 0.05$ при доверителен интервал 95%.

IV. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Клинико-морфологична характеристика на проучваните групи заболявания.

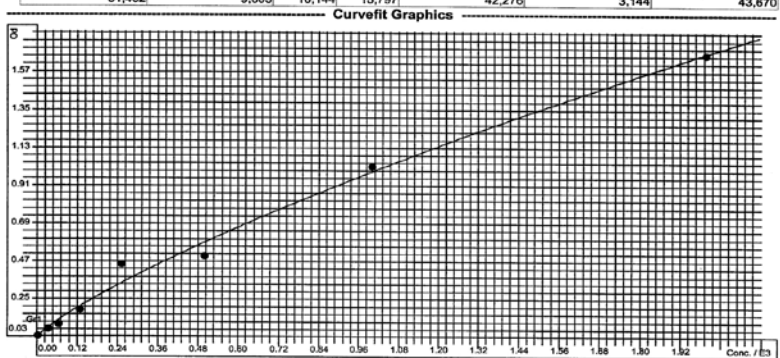
В настоящето проучване са обхванати и анализирани общо 109 пациента. Пациентите са разделени в две главни групи – при 25 от пациентите са изследвани плазмените концентрации на VEGF и bFGF, при 64 от пациентите са изследвани ликворните нива на VEGF.

Включени са злокачествени първични мозъчни неоплазми от различни нозологични единици, като се оформят две групи: Нискостепенни и Високостепенни глиоми.

Контролни групи- 20 пациента, клинично здрави, без данни за хронични заболявания и група от 11 пациенти с доброкачествени новообразувания- Менингиом.

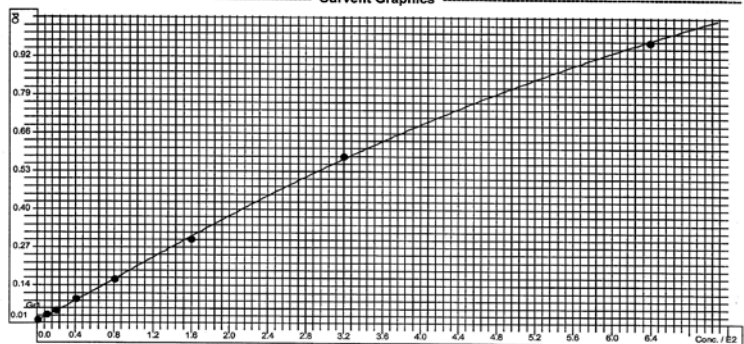
В динамика са проследени общо 14 болни, които са анализирани пред и постоперативно (в ранният постоперативен период - 7 ден) според еволюционния ход на болестта и/или на фона на провежданото лечение.

ELISA VEGF												
Measurement file : FGF basic.dat		Valid Assay						Measurement date : 00.0.0000 "A"				
Template file : Untitled.par								Measurement time : 01:00:00				
Sample_ID / Reader_Values / Results												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,041	Blanc 0,031 6,983	Clinically healthy 0,060 17,571	Clinically healthy 0,059 17,571	Clinically healthy 0,118 66,549	Clinically healthy 0,099 28,164	...ingeoma 0,077 26,234	...ingeoma 0,074 26,234	0,065	Glioma 0,069 20,595	0,095	Glioma 0,140 68,458
		Std 2000 1,457 2350,86	Clinically healthy 0,220 138,296	Clinically healthy 0,204 138,296	0,116	0,040 55,090	...ingeoma 0,110 50,753	...ingeoma 0,039 5,977	0,059	Glioma 0,053 16,976	0,134	Glioma 0,140 68,458
B	1,889	1,457 2350,86	Clinically healthy 0,220 138,296	Clinically healthy 0,204 138,296	0,116	0,040 55,090	...ingeoma 0,110 50,753	...ingeoma 0,039 5,977	0,059	Glioma 0,053 16,976	0,134	Glioma 0,140 68,458
		Std 1000 0,956 1127,77	Clinically healthy 0,039 5,977	Clinically healthy 0,037 10,144	...ingeoma 0,047 10,144	...ingeoma 0,027 7,223	...ingeoma 0,102 45,071	Glioma 0,095 29,464	0,037	Glioma 0,036 5,000	0,090	Glioma 0,091 36,784
C	1,088	0,956 1127,77	Clinically healthy 0,039 5,977	Clinically healthy 0,037 10,144	...ingeoma 0,047 10,144	...ingeoma 0,027 7,223	...ingeoma 0,102 45,071	Glioma 0,095 29,464	0,037	Glioma 0,036 5,000	0,090	Glioma 0,091 36,784
		Std 500 0,452 467,061	Clinically healthy 0,062 18,771	Clinically healthy 0,061 18,771	...ingeoma 0,064 19,984	...ingeoma 0,076 27,518	...ingeoma 0,064 19,984	Glioma 0,063 19,984	0,035	Glioma 0,035 4,053	0,062	Glioma 0,062 18,771
D	0,552	0,452 467,061	Clinically healthy 0,062 18,771	Clinically healthy 0,061 18,771	...ingeoma 0,064 19,984	...ingeoma 0,076 27,518	...ingeoma 0,064 19,984	Glioma 0,063 19,984	0,035	Glioma 0,035 4,053	0,062	Glioma 0,062 18,771
		Std 250 0,420 401,163	Clinically healthy 0,187 110,468	Clinically healthy 0,139 110,468	...ingeoma 0,124 60,967	...ingeoma 0,102 45,071	...ingeoma 0,099 45,071	Glioma 0,101 42,972	0,079	Glioma 0,078 29,464	0,083	Glioma 0,090 32,093
E	0,491	0,420 401,163	Clinically healthy 0,187 110,468	Clinically healthy 0,139 110,468	...ingeoma 0,124 60,967	...ingeoma 0,102 45,071	...ingeoma 0,099 45,071	Glioma 0,101 42,972	0,079	Glioma 0,078 29,464	0,083	Glioma 0,090 32,093
		Std 125 0,175 113,779	Clinically healthy 0,033 3,144	Clinically healthy 0,031 3,144	...ingeoma 0,054 14,057	...ingeoma 0,091 37,463	...ingeoma 0,137 37,463	Glioma 0,146 70,735	0,057	Glioma 0,072 15,797	0,132	Glioma 0,134 66,948
F	0,181	0,175 113,779	Clinically healthy 0,033 3,144	Clinically healthy 0,031 3,144	...ingeoma 0,054 14,057	...ingeoma 0,091 37,463	...ingeoma 0,137 37,463	Glioma 0,146 70,735	0,057	Glioma 0,072 15,797	0,132	Glioma 0,134 66,948
		Std 62.5 0,105 43,670	Clinically healthy 0,046 9,603	Clinically healthy 0,044 9,603	...ingeoma 0,045 9,603	...ingeoma 0,030 1,863	...ingeoma 0,074 26,234	Glioma 0,073 26,234	0,055	Glioma 0,055 14,633	0,069	Glioma 0,104 23,072
G	0,100	0,105 43,670	Clinically healthy 0,046 9,603	Clinically healthy 0,044 9,603	...ingeoma 0,045 9,603	...ingeoma 0,030 1,863	...ingeoma 0,074 26,234	Glioma 0,073 26,234	0,055	Glioma 0,055 14,633	0,069	Glioma 0,104 23,072
		Std 31.2 0,068 31,432	Clinically healthy 0,046 9,603	Clinically healthy 0,046 9,603	...ingeoma 0,047 10,144	...ingeoma 0,057 10,144	...ingeoma 0,057 10,144	Glioma 0,109 42,276	0,033	Glioma 0,032 3,144	0,100	Glioma 0,104 23,072
H	0,082	0,068 31,432	Clinically healthy 0,046 9,603	Clinically healthy 0,046 9,603	...ingeoma 0,047 10,144	...ingeoma 0,057 10,144	...ingeoma 0,057 10,144	Glioma 0,109 42,276	0,033	Glioma 0,032 3,144	0,100	Glioma 0,104 23,072



Фигура 7. Стандартен протокол за ELISA. Резултати от изследване на плазмените стойности на VEGF. Кривата на диаграмата показва стандартното отклонение, т.е.че тестът е валиден и направен по стандартите на производителя.

Measurement file : FGF basic.dat		Valid Assay						Measurement date : 00.0.0000 'a'					
Template file : Untitled.par												Measurement time : 01:00:00	
----- Sample_ID / Reader_Values / Results													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,022	Blanc	Clinically healthy		Clinically healthy		...ingeoma	...ingeoma	0,023	Glioma	0,027	Glioma	
		Udr	0,022	0,020	0,022	0,025	0,025	0,035		0,024		0,026	
B	1,006	Std 640	Clinically healthy		Clinically healthy		...ingeoma	...ingeoma	0,025	Glioma	0,030	Glioma	
		Udr	0,020	0,021	0,021	0,022	0,028	0,023		0,025		0,035	
C	0,523	Std 320	Clinically healthy		...ingeoma	...ingeoma	0,036	Glioma	0,024	Glioma	0,281	Glioma	
		Udr	0,020	0,018	0,073	0,017		0,034		0,019		0,305	
D	0,315	Std 160	Clinically healthy		...ingeoma	...ingeoma	0,023	Glioma	0,172	Glioma	0,034	Glioma	
		Udr	0,024	0,023	0,029	0,035		0,026		0,218		0,037	
E	0,177	Std 80	Clinically healthy		...ingeoma	...ingeoma	0,022	Glioma	0,020	Glioma	0,025	Glioma	
		Udr	0,021	0,020	0,019	0,022		0,022		0,020		0,025	
F	0,095	Std 40	Clinically healthy		...ingeoma	...ingeoma	0,023	Glioma	0,034	Glioma	0,032	Glioma	
		Udr	0,020	0,021	0,038	0,024		0,025		0,035		0,037	
G	0,053	Std 20	Clinically healthy		...ingeoma	...ingeoma	0,029	Glioma	0,018	Glioma	0,018	Glioma	
		Udr	0,028	0,021	0,017	0,018		0,030		0,019		0,016	
H	0,039	Std 10	Clinically healthy		...ingeoma	...ingeoma	0,023	Glioma	0,023	Glioma	0,050	Glioma	
		Udr	0,027	0,021	0,027	0,030		0,027		0,023		0,062	
----- Curvfit Graphics													

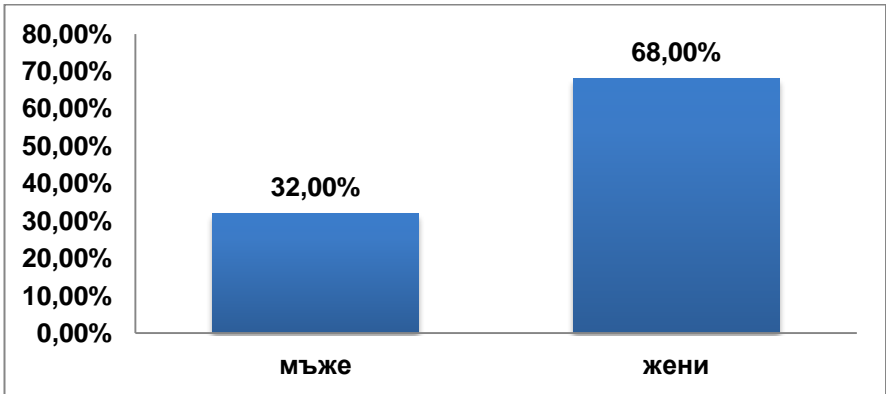


Фигура 8. Изследване на плазмените нива на bFGF. Стандартен протокол за ELISA. Кривата на диаграмата показва стандартното отклонение, т.е. че тестът е валиден и направен по стандартите на производителя.

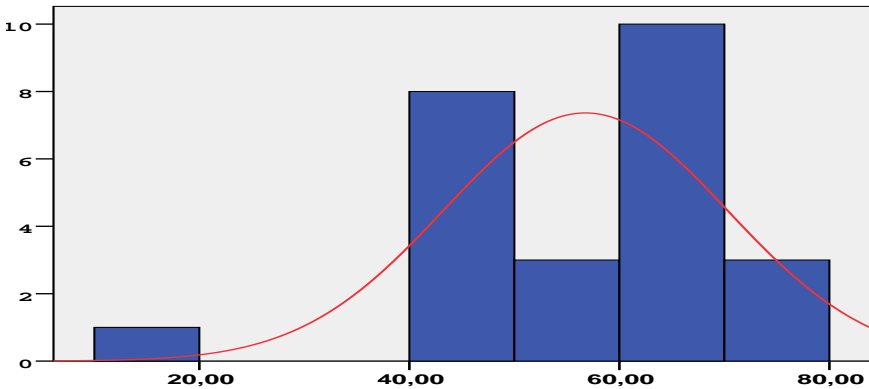
4.2. Клинико-морфологична характеристика на изследваните лица, участващи в изследването на стойностите на VEGF и bFGF в кръвна плазма

В изследването на растежните фактори (VEGF и bFGF) в кръвната плазма взеха участие общо 35 пациента- 25 болни и 10 здрави лица, които са разделени в основна и контролна групи.

Разпределението по пол на лицата в основната група е в полза на жените (68,00 %), като средната възраст на участниците в тази група е 56,7 г. ± 13,5 г. Минималната възраст е 17 г., а максималната е 75 г. (Фигура 9 и Фигура 10).

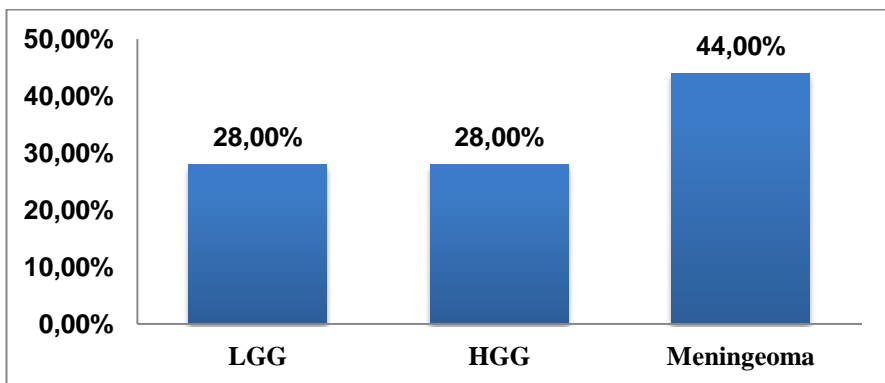


Фигура 9. Разпределение по пол на пациентите участващи в изследването на стойностите на VEGF и bFGF в кръвна плазма.



Фигура 10. Разпределение по възраст на пациентите участващи в изследването на стойностите на VEGF и bFGF в кръвна плазма.

От изследваните лица с новообразования в основната група със злокачествени новообразования са 66,00 %, а с доброкачествени - 44,00 %. Като разпределението по вид диагноза е представено на Фигура 11.

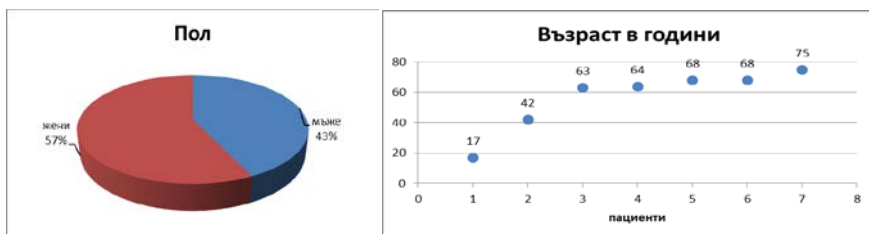


Фигура 11. Разпределение на пациентите участващи в изследване на стойностите на VEGF и bFGF в кръвна плазма според диагнозата.

Според класификацията на СЗО злокачествените тумори сме разделили на две групи – първа група са нискостепенни глиоми (low grade glioma- LGG), в която влизат астроцитом I и II степен- 7 болни, а втората група са високостепенни глиоми (high grade glioma- HGG), която обхваща астроцитом III - IVст., мултиформен глиобластом (glioblastoma multiforme - GBM) и олигодендроглиом - 7 болни. Групата на менингеомите е съставена от 11 пациента. При 14 пациента, за проследяване на растежните фактори динамично, стойностите са изследвани и постоперативно, в ранният постоперативен период (седми ден).

Нискостепенни глиоми LGG

Групата се състои от 7 пациента Трима с Астроцитом I степен и четирима с Астроцитом II степен. Средната възраст е 64 (17–75) години, с разпределение по пол, както следва: 4 жени и 3 мъже (Фигура 12 и Фигура 13).



Фигура 12. Разпределение по пол на пациентите с нискостепенни глиоми, участващи с изследване на стойностите на VEGF и bFGF в кръвна плазма.

Фигура 13. Разпределение по възраст на пациентите с нискостепенни глиоми, участващи с изследване на стойностите на VEGF и bFGF в кръвна плазма.

Средните предоперативни нива на VEGF при пациенти с LGG са: 163,6 пгр./мл. (st. dev. = 226.2; range 33 – 670 пгр./мл).

Средните постоперативни нива на VEGF при пациенти с LGG са: 220 пгр./мл. (st. dev. = 295; range 35 – 560 пгр./мл).

Средните предоперативни нива на bFGF при пациенти с LGG са: 57 пгр./мл. (st. dev.= 81; range 33 – 670 пгр./мл).

Средните постоперативни нива на bFGF при пациенти с LGG са: 157 пгр./мл. (st. dev. = 117; range 25 – 250 пгр./мл).

	VEGF	bFGF
Предоперативно	163.6 (st. dev. 226.2 пгр/мл., range 33–670 пгр/мл.)	57 (st.dev. 81 пгр/мл., range 33 – 670 пгр/мл.)
Постоперативно	220 (st. dev. 295 пгр/мл., range 35 – 560 пгр/мл.)	157 (st. dev. 117 пгр/мл., range 25 – 250 пгр/мл.)

Таблица 2. Стойности на VEGF и bFGF измерени в плазма при пациенти с LGG.

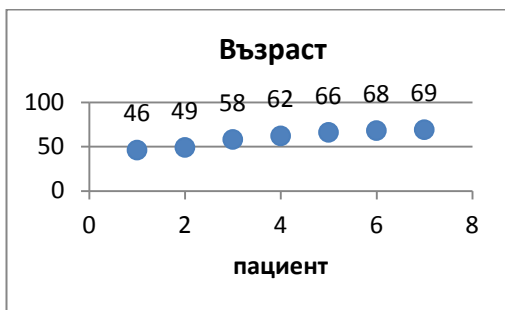
Средната преживяемост в дни на групата с нискостепенни глиоми е 294 дни (range 17 – 1652 дни). (Фигура 14).



Фигура 14. Преживяемост на пациентите с нискостепенни глиоми, участващи в изследване на VEGF и bFGF в кръвна плазма.

Високостепенни глиоми (HGG)

Групата се състои от 7 пациента с мултиформен глиобластом. Средната възраст е 62 (46–69) години, с разпределение по пол, както следва: 4 жени и 3 мъже (Фигура 15 и Фигура 16).



Фигура 15. Разпределение по възраст на пациентите с високостепенни глиомы, участващи в изследване на VEGF и bFGF в кръвна плазма.

Фигура 16. Разпределение по пол на пациентите с високостепенни глиомы, участващи в изследване на VEGF и bFGF в кръвна плазма.

Средните предоперативни нива на VEGF при пациенти с HGG са 77.1 пгр/мл. (st. dev. = 16.0; range 55 – 100 пгр/мл.).

Средните постоперативни нива на VEGF при пациенти с HGG са 107 пгр/мл. (st. dev. = 33.0; range 57 – 142 пгр/мл.).

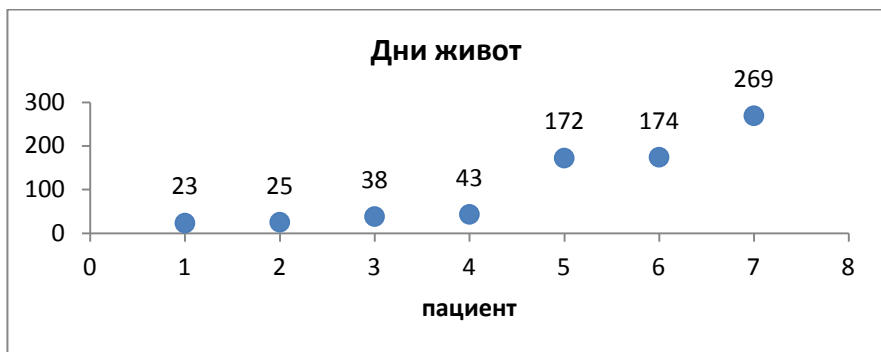
Средните предоперативни нива на bFGF при пациенти с HGG са 130 пгр/мл. (st. dev. = 135.0; range 17 – 300 пгр/мл.).

Средните постоперативни нива на bFGF при пациенти с HGG са 123 пгр/мл. (st. dev. = 112.0; range 35 – 250 пгр/мл.).

	VEGF	bFGF
Предоперативно	77.1 (st. dev. 16.0 пгр/мл., range 55-100 пгр/мл.)	130 (st. dev. 135.0 пгр/мл., range 17 – 300 пгр/мл.)
Постоперативно	107 (st. dev. 33.0 пгр/мл., range 57 – 142 пгр/мл.)	123 (st. dev. 112.0 пгр/мл., range 35 – 250 пгр/мл.)

Таблица 3. Стойности на VEGF и bFGF в плазма при пациенти с HGG, участващи в изследване на VEGF и bFGF в кръвна плазма.

Средната преживяемост в дни на групата на пациентите с високостепенни глиомы – 106,3 дни (range 23 – 269) (Фигура 17).



Фигура 17. Преживяемост на пациентите с високостепенни глиоми, участващи в изследване на VEGF и bFGF в кръвна плазма.

Менингеоми

Групата се състои от 11 пациента, с хистологично верифицирана диагноза Менингеом.

Средната възраст е 54 (40–73) години, с разпределение по пол, както следва: 9 жени и 2 мъже (Фигура 18 и Фигура 19).



Фигура 18. Разпределение по възраст на пациентите с Менингеом, участващи в изследване на VEGF и bFGF в кръвна плазма.

Фигура 19. Разпределение по пол на пациентите с Менингеом, участващи в изследване на VEGF и bFGF в кръвна плазма.

Средните предоперативни нива на VEGF при пациенти с Менингеом са 66 пгр./мл. (st. dev. = 29,0; range 30 – 124 пгр./мл.).

Средните постоперативни нива на VEGF при пациенти с Менингеом са 63 пгр./мл. (st. dev. = 31,0; range 27 – 102 пгр./мл.).

Средните предоперативни нива на bFGF при пациенти с Менингеом са 31 пгр./мл. (st. dev. = 15,0; range 18 – 73 пгр./мл.).

Средните постоперативни нива на bFGF при пациенти с Менингеом са 23 пгр./мл. (st. dev. = 7,0; range 17 – 35 пгр./мл.).

	VEGF	bFGF
Предоперативно	66 (st. dev. 29.0 пгр/мл., range 30 – 124 пгр/мл.)	31 (st. dev. 15.0 пгр/мл., range 18 – 73 пгр/мл.)
Постоперативно	63 (st. dev. 31.0 пгр/мл., range 27 – 102 пгр/мл.)	23 (st. dev. 7.0 пгр/мл., range 17 – 35 пгр/мл.)

Таблица 4. Стойности на VEGF и bFGF в плазма при пациентите с Менингеом, участващи в изследване на VEGF и bFGF в кръвна плазма. Менингеоми

Всички пациенти са живи към момента на приключване на проучването.

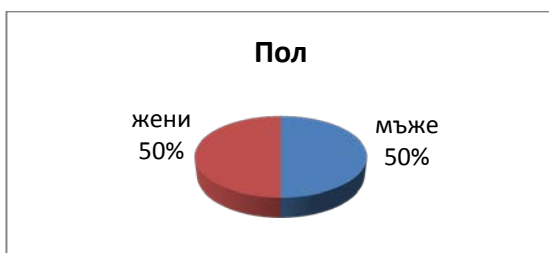
	Нискостепенни глиоми	Високостепенни глиоми	Менингиоми
Преживяемост в дни	293,6 (range 17 – 1652)	106,3 (range 23 – 269)	живи

Таблица 5. Преживяемост в дни при различните групи заболявания на пациентите, участващи в изследване на VEGF и bFGF в кръвна плазма.

Изследването на зависимостта между преживяемостта и стойностите на VEGF и bFGF в плазма показва, че не съществува корелация между изследваните величини ($p > 0,05$).

Контролна група

Контролната група от здрави лица включва 10 човека, равно разпределени по пол, като възрастовия показател е съобразен с този на пациентите от основната група (Фигура 20).



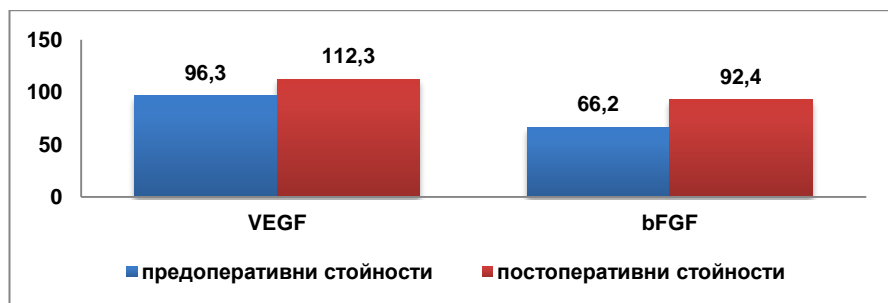
Фигура 20. Разпределение по пол на клинично здравите пациенти, служещи за контролна група в изследване на VEGF и bFGF в кръвна плазма.

	Мултиформен глиобластом	Астроцитоми	Менингеоми	Здрави
Брой пациенти	7	7	11	10
Пол, n(%)				
Мъже	3(43)	3(43)	2(18)	5(50)
Жени	4(57)	4(57)	9(82)	5(50)
Възраст, години (mean-S.D.)	60(9,2)	56,7(20,3)	54	
Починали	7	7	0	0
Преживяемост(дни) (mean-S.D)	106(97,97)	294(655)		

Таблица 6. Демографска характеристика на пациентите с мозъчни тумори разделени на 4 групи, участващи в изследване на VEGF и bFGF в кръвна плазма.

4.3. Сравнителен анализ на стойностите на VEGF и bFGF, измерени в кръвна плазма при пациенти с мозъчни неоплазми- динамично проследени предоперативно и постоперативно.

Анализа на данните от направеното изследване на промените във VEGF в цялата извадка показва, че в предоперативно състояние факторът има приблизително 1,5 пъти по ниска стойност в сравнение с постоперативните стойности, т.е. нараства постоперативно. Същата тенденция се наблюдава и по отношение на стойностите на bFGF (Фигура 21).

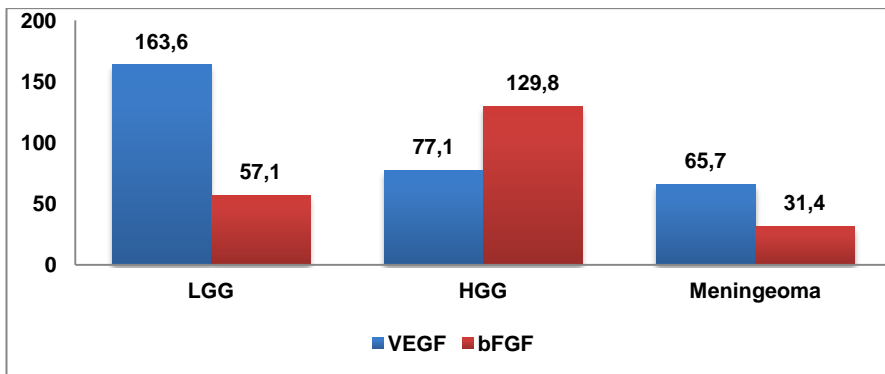


Фигура 21. Средни стойности на VEGF и bFGF в пг./мл. измерени в кръвна плазма пре – и постоперативно (7 ден).

Това може да се обясни както с редуцията на туморната маса и механичното освобождаване в кръвта на голямо количество биологично активни вещества, в това число и растежни фактори, така също и с факта, че се е активирала физиологичната ангиогенеза, следствие на нарушаване целостта на тъканите от оперативната интервенция.

При извършването на ANOVA анализ намерихме, че средните стойности на VEGF са по-високи при пациентите с LGG, спрямо HGG и менингиоми. (фиг. 22)

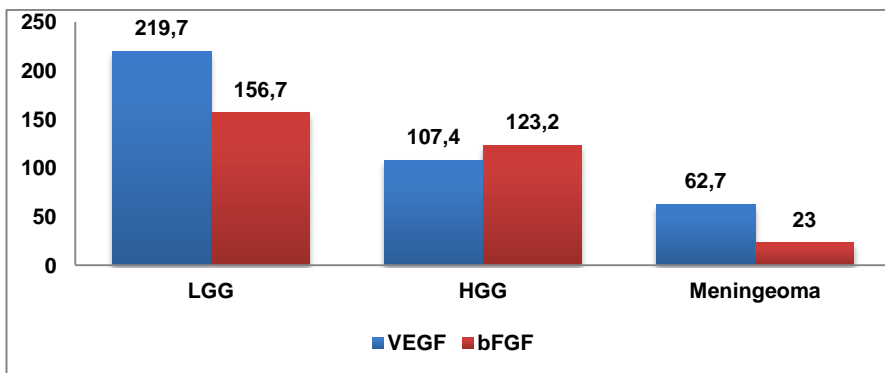
Анализа на резултатите от изследването на bFGF, показва завишаване на стойностите при пациенти с HGG и в по-малка степен на тези с LGG (Фигура 22).



Фигура 22. Средни предоперативни стойности на VEGF и bFGF в кръвна плазма (пгг./мл.).

Това не би следвало да се очаква поради факта, че високостепенните глиоми и менингеомите са силно кръвоснабдени и следователно първоначалните нива на растежни фактори при тях би следвало да са по-високи.

Сравнителният анализ на средните постоперативни стойности на VEGF и bFGF при изследваните групи пациенти не показва статистически достоверна разлика (Фигура 23).



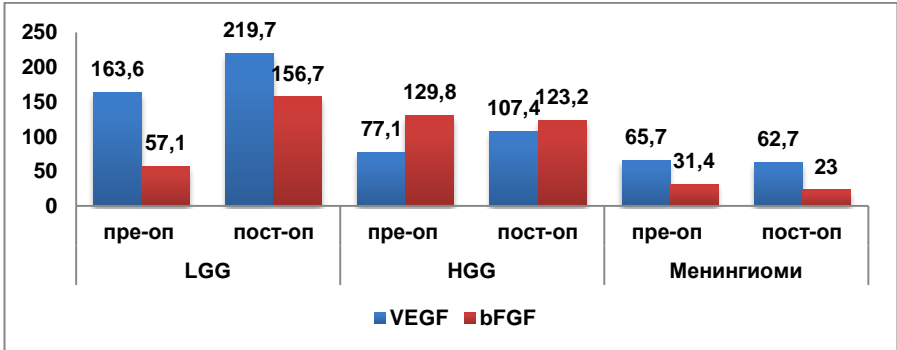
Фигура 23. Средни постоперативни стойности на VEGF и bFGF в кръвна плазма (пгг./мл.).

Проведения сравнителен анализ на стойностите на VEGF и bFGF преди и след операцията показва, че наблюдаваме статистически значимо нарастване на факторите при пациентите с LGG ($p < 0,05$), като при VEGF нарастването е приблизително 1,5 пъти, докато при bFGF е приблизително трикратно.

При пациентите с HGG съществена разлика при сравняването на преоперативни и постоперативни данни се наблюдава само по отношение на VEGF ($p < 0,05$). При другият фактор

- bFGF, не беше установена статистическа разлика, въпреки констатираното намаляване на стойността.

При пациентите с доброкачествени новообразования не беше намерена статистическа разлика в предоперативните и постоперативни данни на VEGF и bFGF, въпреки наблюдаваното намаляване на стойностите и на двата фактора (Фигура 24).

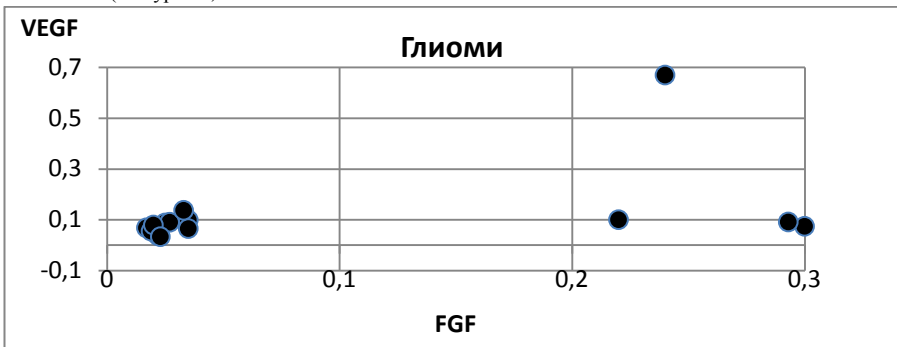


Фигура 24. Сравнителен анализ на стойностите на VEGF и bFGF при пациентите участващи в изследване на кръвна плазма- пре- и постоперативно.

4.4. Корелационен анализ между стойностите на VEGF и bFGF, измерени в кръвна плазма, по групи.

Корелация на факторите VEGF и bFG според вида на тумора.

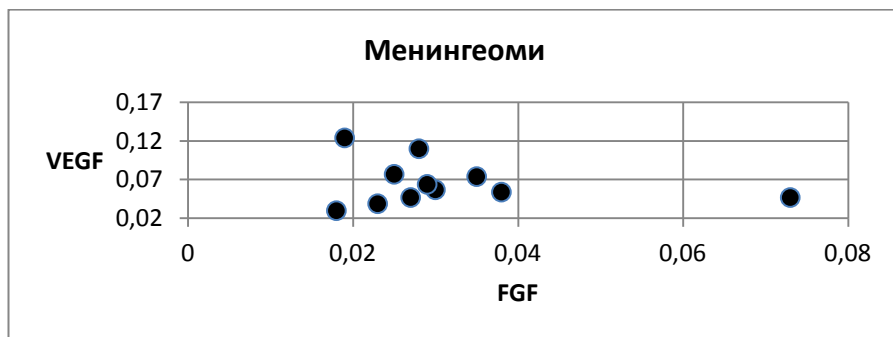
При глиалните тумори корелационния коефициент е 0,40 което показва умерена положителна зависимост (Фигура 25).



Фигура 25. Корелационен анализ между стойностите на VEGF и bFGF измерени в кръвна плазма при пациенти с глиални мозъчни тумори

Група на менингиомите

Изследвани са 11 обекта. Корелационния коефициент е - 0,22 което означава слаба отрицателна зависимост (Фигура 26).



Фигура 26. Корелационен анализ между стойностите на VEGF и bFGF измерени в кръвна плазма при пациенти с Менингеоми.

4.5. Корелацията между факторите VEGF и FGF при глиомите според степента на малигненост (high grade, low grade)

При HGG корелацията е следната: Корелационния коефициент на Пирсън между факторите VEGF и FGF е 0,473. Това означава умерена до значителна положителна зависимост между факторите, т.е. повишаване стойностите на единия ще доведе до умерено-значително увеличаване на другия фактор.

	<i>VEGF</i>	<i>FGF</i>
FGF	0,473	
възраст	-0,027	-0,452

Корелацията между възрастта и двата фактора е отрицателна. При VEGF е слаба отрицателна, а при FGF е умерена отрицателна ($R=-0,027$; $R=-0,452$, Pearson).

При LGG корелацията е:

	<i>VEGF</i>	<i>FGF</i>
FGF	0,993	
год	0,308	0,258

Между факторите VEGF и FGF имаме много силна положителна зависимост, т.е. при покачване на стойностите на единия фактор се очаква и покачване на стойностите на втория

фактор. Наблюдава се положителна слаба зависимост и при двата фактора с възрастта на изследваните (съответно $R=0,308$; $R=0,258$, Pearson).

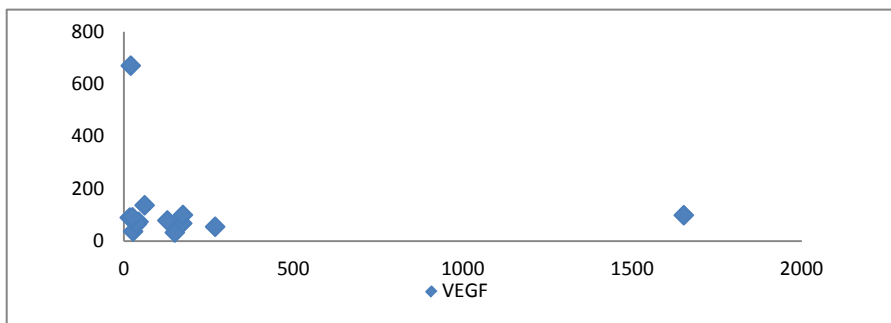
Наблюдават се някои различия между двете наблюдения. При LGG корелацията между факторите е много силна и расте слабо с нарастването на възрастта. Докато при Глиобластом (high grade) корелацията е умерена и намалява слабо с нарастването на възрастта.

Между злокачествените, от една страна и доброкачествените и здравите от друга страна, има значителна разлика. При първите тенденцията е положителна умерена, което означава, че увеличаването на единия фактор ще води до увеличаване на другия. Докато при доброкачествените и здравите изследвани, тази тенденция е обратна т.е. при нарастване на единия фактор другия би трябвало слабо да намалява.

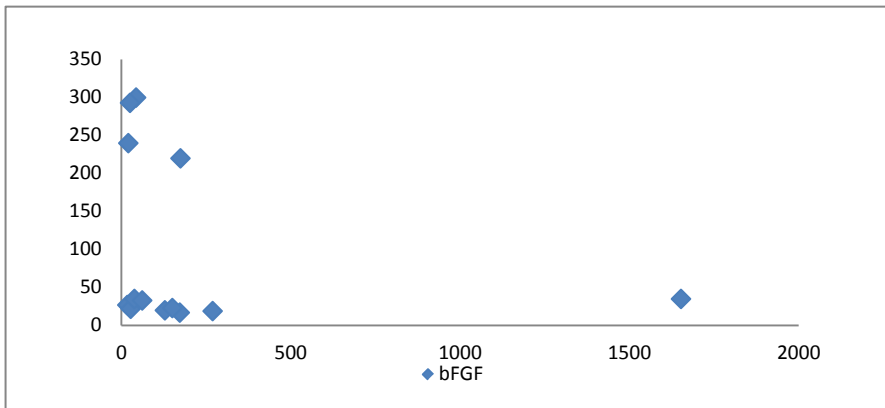
Анализа (при ниво на значимост 0,05) показва, че няма значителни различия между стойностите на фактора VEGF (стойността е значително по-голяма от нивото на значимост 0,05) в трите групи и евентуалните разлики се дължат по-скоро на влиянието на други фактори, експресията на факторите не корелира със степента на малигненост на неоплазмата. (Kruskal-Wallis test, 3; 25; $\alpha=0.05$)

4.6. Корелационен анализ на стойностите на VEGF и bFGF, измерени в кръвна плазма и продължителността на живота при пациенти с мозъчни неоплазми

Изследването на зависимостта между преживяемостта и стойността на VEGF и bFGF показва, че не съществува корелация между изследваните величини ($p > 0,05$) (Фигури 27 и 28).



Фигура 27. Корелационен анализ на стойностите на VEGF, измерени в кръвна плазма и продължителността на живота в дни при пациенти с мозъчни неоплазми.



Фигура 28. Корелационен анализ на стойностите на bFGF, измерени в кръвна плазма и продължителността на живота при пациенти с мозъчни неоплазми.

Коефициентът на корелация на Пирсън между VEGF и преживяемостта е $R = -0.10$, което означава слаба отрицателна зависимост, с други думи нарастването на VEGF ще намали преживяемостта пренебрежимо незначително. Стойностите на фактора обясняват по-малко от 8% от продължителността на живот, т.е. над 92% от преживяемостта се обяснява с влияние на други фактори. Освен това модела не е достатъчно значим ($p > 0.05$).

При корелацията между стойностите на bFGF и продължителността на живота имаме коефициент на Пирсън $R = -0.20$. Корелацията е слаба отрицателна, а стойностите на този фактор обяснява до 5% от продължителността на живот. Модела не е достатъчно статистически значим ($p > 0.05$).

4.7. Клинико-морфологична характеристика на изследваните лица, участващи в изследването на стойностите на VEGF в ликвор

В изследването на растежният фактор (VEGF) в ликвор взеха участие общо 74 пациента- 64 болни и 10 здрави лица, които са разделени в основна и контролна групи.

Контролна група

Контролната група от здрави лица включва 10 здрави доброволци, при които няма данни за хематологично, неопластично, остро или хронично възпалително заболяване, равно разпределени по пол, като възрастовия показател е съобразен с този на пациентите от основната група. Хоспитализирани са по повод травми на опорно-двигателния апарат и е извършена артроскопия.

Ликворната проба при всички пациенти е вземана постоперативно, чрез лумбална пункция, а при пациентите от контролната група по време на спинална анестезия по повод основната процедура.

Measurement file : -VEGF 20130729.dat		Valid Assay										Measurement date : 0-0.0000 'a'	
Template file : Untitled.par		Measurement time : 02:00:00											
		Sample_ID / Reader_Values / Results											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	STD0	STD00	STD2000	STD2000	L9	L20	L240199	L153101	L239123	L175106	H248680	L8	
	0.012	0.013	2.794	2.856	0.603	0.019	0.250	0.018	0.031	0.168	0.015	0.020	
B	5.333	6.757	1848.24	1923.56	245.270	9.000	137.597	8.626	13.485	65.421	7.504	9.373	
	19.097	19.840	7.504	129.058	396.380	6.008	9.000	9.373	15.728	1638.03	11.242	17.599	
C	STD15.625	STD15.625	L15	L10	L9	H207397	L15	L224207	L239123	L241832	L249442	L227296	
	0.046	0.048	0.015	0.329	0.924	0.011	0.019	0.020	0.037	2.611	0.025	0.042	
D	60.414	59.646	1728.30	7.130	12.363	7.878	13.111	222.379	659.967	6.757	8.252	10.858	
	0.064	0.062	0.348	0.015	0.011	0.018	0.028	0.013	0.985	0.281	0.019	0.250	
E	33.360	32.625	136.781	7.504	6.008	8.626	11.616	6.757	427.177	109.755	9.000	97.441	
	STD82.5	STD62.5	L19	L16	L16	L17	L12	L148806	L13	L100	H248604	L237074	
F	0.155	0.153	2.662	0.014	0.028	0.016	0.030	0.551	1.404	0.013	0.017	0.024	
	60.414	59.646	1728.30	7.130	12.363	7.878	13.111	222.379	659.967	6.757	8.252	10.858	
G	STD125	STD125	L7	L15	L11	H216700	L1	L244328	L249518	L100	H66858	L240199	
	0.290	0.280	0.014	0.012	0.851	0.013	0.012	0.012	0.010	0.013	0.013	0.486	
H	113.352	109.356	7.130	6.383	360.442	6.757	6.383	6.383	5.634	6.757	6.757	185.829	
	STD250	STD250	L23	H249009	L11	L241485	L241832	L229305	L216760	L227124	H66858	L229305	
I	0.565	0.578	0.013	0.013	1.789	0.019	2.714	0.021	0.017	0.169	0.012	0.032	
	228.501	234.213	6.757	6.757	912.892	9.000	1753.95	9.747	8.252	65.807	6.383	13.858	
J	STD500	STD500	H207397	L14	L4	L249568	L221977	L207712	L3	L227124	L225614	L175106	
	1.117	1.152	0.014	0.023	0.014	0.074	1.788	0.043	0.014	0.209	0.256	0.244	
K	496.341	515.285	7.130	10.494	7.130	29.810	912.177	17.974	7.130	81.334	99.815	95.071	
	STD1000	STD1000	L24	L14	L20	L249568	L221977	L153101	L3	L237074	L227496	L148806	
L	2.062	2.060	0.037	0.021	0.022	0.070	2.026	0.021	0.017	0.024	0.041	0.769	
	1121.21	1119.58	15.728	9.747	10.121	28.105	1092.16	9.747	8.252	10.858	17.225	321.214	

General Data												
Measurement	EndPoint, Time of Measurement : 0-0.0000 'a' / 02:00:00, State of Measurement : Data has been changed											
Parameter	Parameter loaded during measurement time : Untitled parameter file.											
Files	Data file : VEGF 20130729 - 29.7 / 20.23.40											
Reader	Template file : Untitled - 00.00.00 / 00.00.00											
Calculation	Null Device, Driver Version : 4.20, Filter = 405nm											
Program	Calculation Status : Valid Assay, Calculation Time : 29.7 / 20.14.03											
	Version 4.31; License No. : 0001; Assembly Code : FFD7 FF71 FFFF FFFF											
	Operating System : Professional; User Name : imun; Printer Name : Kyocera Mita FS-1020D KX											

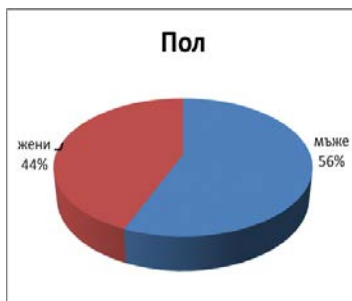
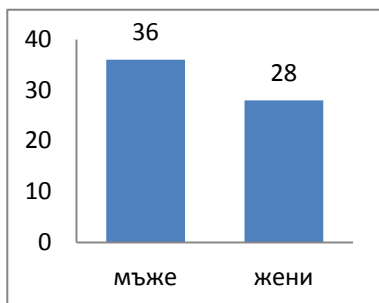
CurveFit Statistics												
Methods	Assay	Grp	Source Matrix	Lower Limit	Turning Slope	Turning Point	Upper Limit	Fitting Error	Fitting State			

Фигура 29. Резултати от изследване на стойностите на VEGF в ликвор при пациенти с Мултиформен глиобластом. Стандартен протокол.



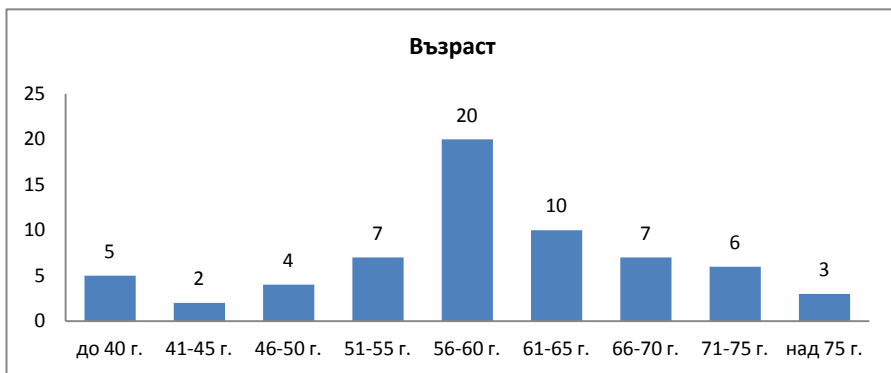
Фигура 30. ELISA –кит. Ликворна експресия на VEGF при пациенти с Мултиформен глиобластом. Наситеността на цвета зависи от концентрацията на ангиогенния фактор, колкото е по-плътен цвета, толкова концентрацията е по-висока.

Разпределението по пол на лицата в основната група е както следва: мъже - 36 (56,00 %), жени - 28 (44%) (Фигура 31 и Фигура 32).

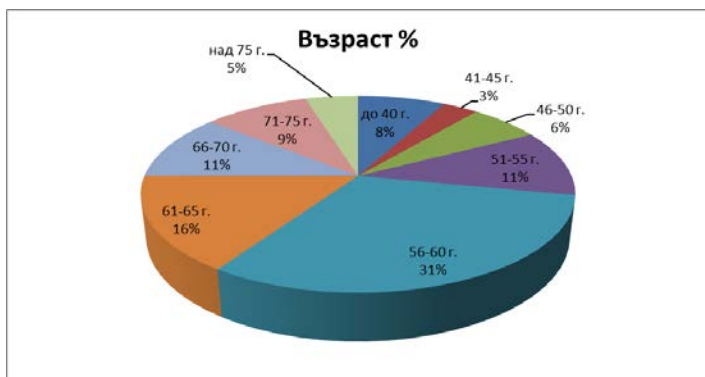


Фигура 31. и Фигура 32. Разпределение по пол на пациентите участващи в изследването на стойностите на VEGF в ликвор по брой и процентно.

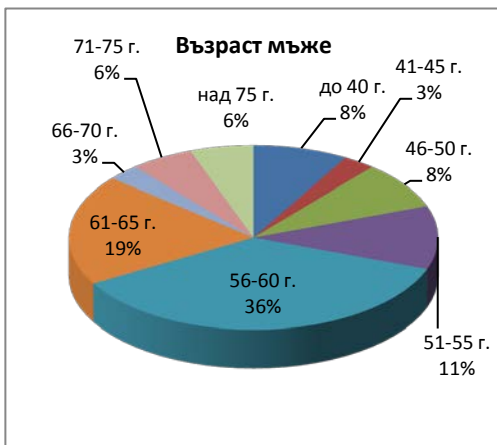
Средната възраст на участниците в тази група е 58,2 г. \pm 12 г. Минималната възраст е 4 г., а максималната е 78 г. (Фигура 33).



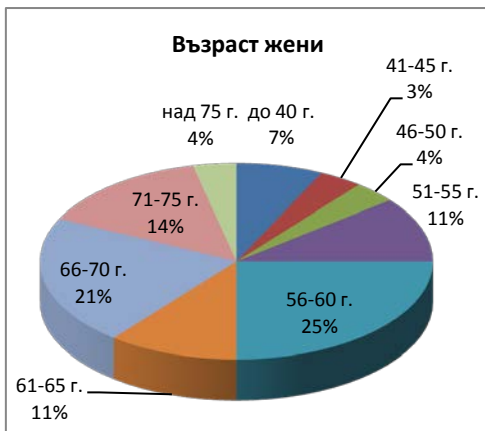
Фигура 33. Разпределение по възраст на пациентите участващи в изследването на стойностите на VEGF в ликвор в брой.



Фигура 34. Разпределение по възраст на пациентите участващи в изследването на стойностите на VEGF в ликвор в проценти.



Фигура 35 и 36. Възрастово разпределение по пол, мъже, на пациентите, участващи в изследването на стойностите на VEGF в ликвор в брой и процентно.

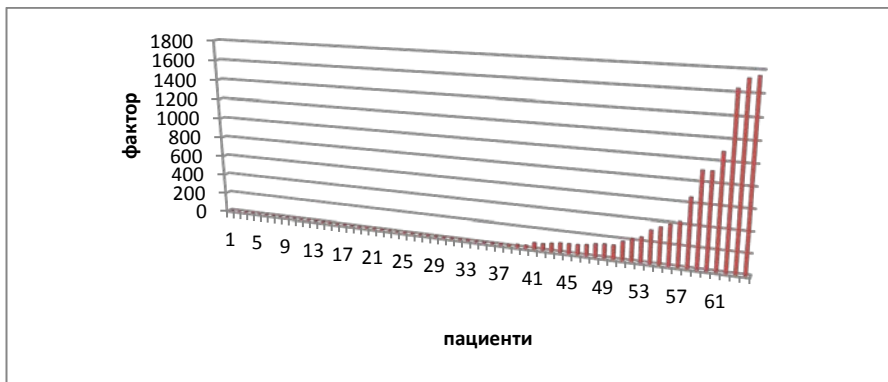


Фигура 37 и 38. Възрастово разпределение по пол, жени, на пациентите, участващи в изследването на стойностите на VEGF в ликвор в брой и процентно.

Тези резултати са в съответствие с публикуваните в литературните източници данни, но без статистическа значимост.

Ликворни стойности на VEGF

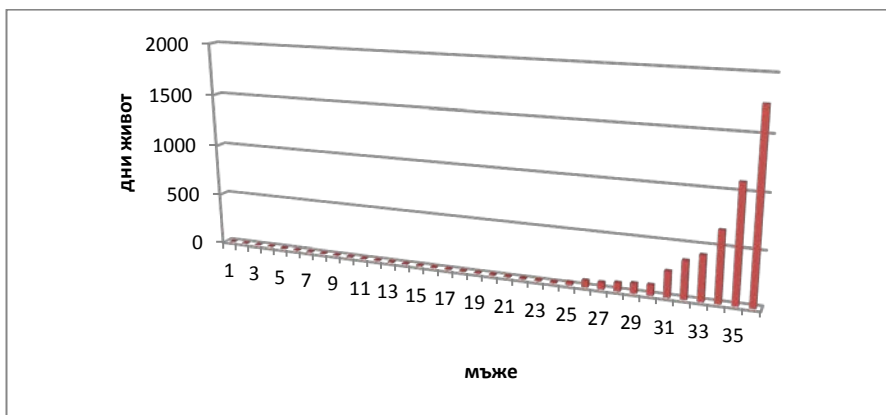
Средните нива на VEGF при пациенти с Мултиформен глиобластом са 192.1 пгг./мл. (st.dev. = 408.4; range 5.6–1753.5 пгг./мл.) (Фигура 39).



Фигура 39. Стойности на VEGF в пгг./мл. измерени в ликвор при пациенти с Мултиформен глиобластом.

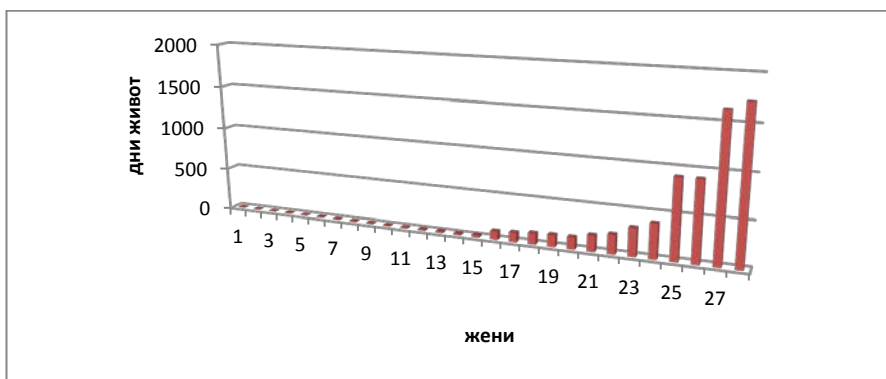
Съответно при мъже:

Средните нива на VEGF при мъже: 144.6 пгр./мл., (st. dev. = 352.9 range 5.6-1753.6 пгр./мл.) (Фигура 40).



Фигура 40. Стойности на VEGF в пгр./мл. измерени в ликвор при пациенти с Мултиформен глиобластом -мъже.

Средните нива на VEGF при жени: 253.1пгр./мл., (st. dev. = 470.0 range 6.38-1728.3 пгр./мл.) (Фигура 41).

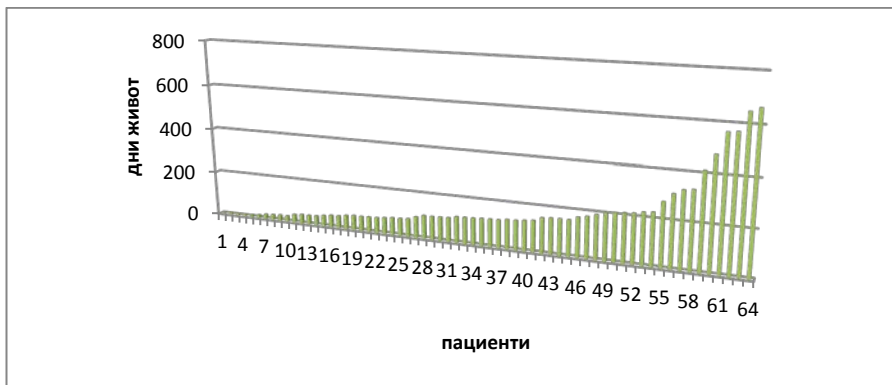


Фигура 41. Стойности на VEGF в пгр./мл. измерени в ликвор при пациенти с Мултиформен глиобластом- жени.

Между групата на мъжете и групата на жените няма значима разлика в стойностите на VEGF (Kruskal-Wallis test, 2; 64; $\alpha=0.05$) т.е. евентуалните различия не се дължат на половата принадлежност, а се дължат на други фактори.

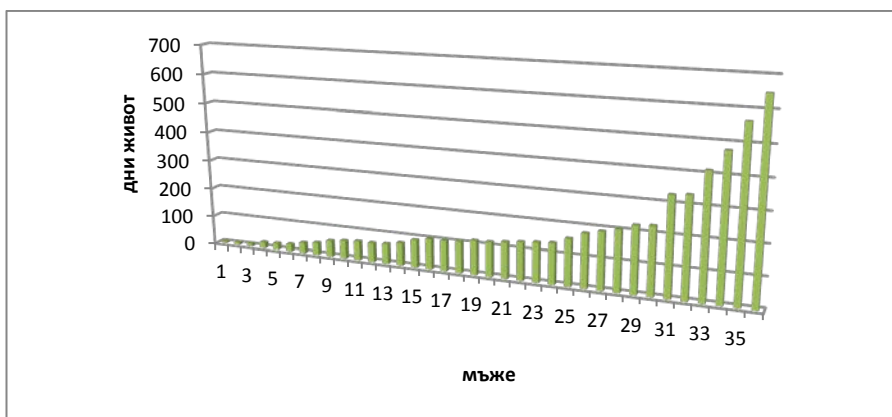
Преживяемост в дни.

Средната преживяемост в дни на групата на пациентите с високостепенни глиоми: 154,4 (st. dev. =154.9 дни, range 6 – 665) (Фигура 42).



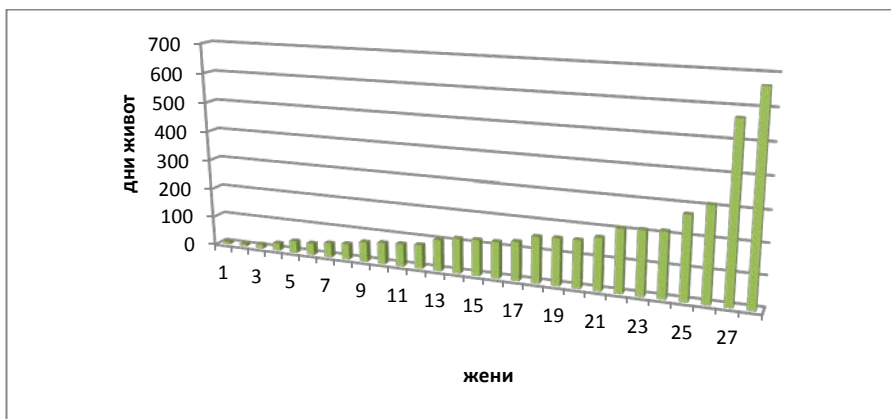
Фигура 42. Преживяемост в дни при пациенти с Мултиформен глиобластом, участващи в изследването на VEGF в ликвор.

Средна преживяемост при мъже: 157.4 (st. dev. =157.7 дни, range 6-649).



Фигура 43. Преживяемост в дни при пациенти с Мултиформен глиобластом, участващи в изследването на VEGF в ликвор- мъже.

Средна преживяемост при жени: 150.6 (st. dev. = 154.2 дни, range 8-665) (Фигура 44).



Фигура 44. Преживяемост в дни при пациенти с Мултиформен глиобластом, участващи в изследването на VEGF в ликвор- жени.

Няма значима разлика в преживяемостта между групата на мъжете и групата на жените (Kruskal-Wallis test, 2; 64; $\alpha=0.05$) т.е. евентуалните различия ще се дължат на действието на други фактори.

4.8. Дисперсионен анализ

Дисперсионен анализ между група на болните и група на здравите.

Изследвани са 64 заболели и 10 здрави. Ще проверим има ли значителни разлики в измерванията на фактора при двете групи и до каква степен това се дължи на заболяемостта. Средната стойност на фактора в групата на заболелите е 192.1 ± 408.4 пгр./мл., а при здравите тези стойности са 7.13 ± 0.9 пгр./мл.

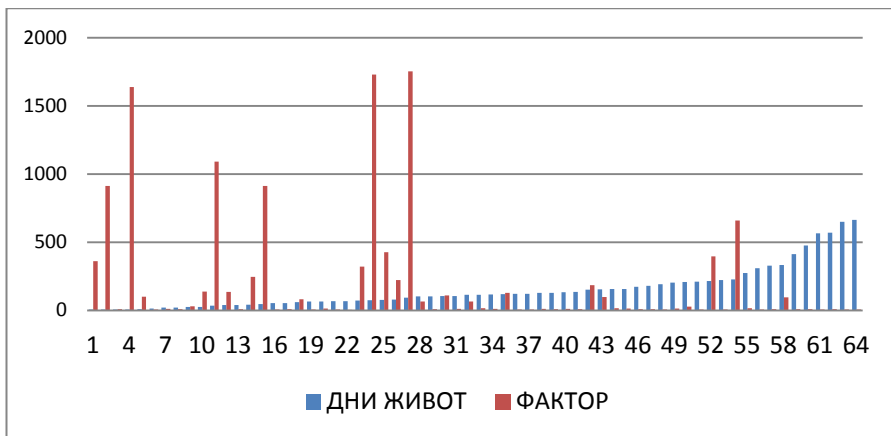
Получения резултат показва средна стойност в групата на болните – 192пгр./мл., а в групата на здравите малко над 7пгр./мл. Получената стойност показва, че до 84% от случаите се очаква значителна разлика в стойностите на изследвания фактор, която да се дължи на заболяемостта, а в над 16% от случаите евентуални различия ще се дължат на действието на други фактори (изследването е Anova: Single Factor, F-test, $\alpha=0.05$)

Проверката за значителни различия в стойностите на фактора между групата на болните и групата на здравите чрез Kruskal-Wallis test (2; 74; $\alpha=0.05$). Теста показва, че при високо ниво на значимост ($p<0.05$) се наблюдават големи различия в стойностите на кръвния фактор. Това означава, че в над 95% от случаите това се дължи на заболяемостта и в много по малка степен (под 5%) се дължи на влиянието на други фактори.

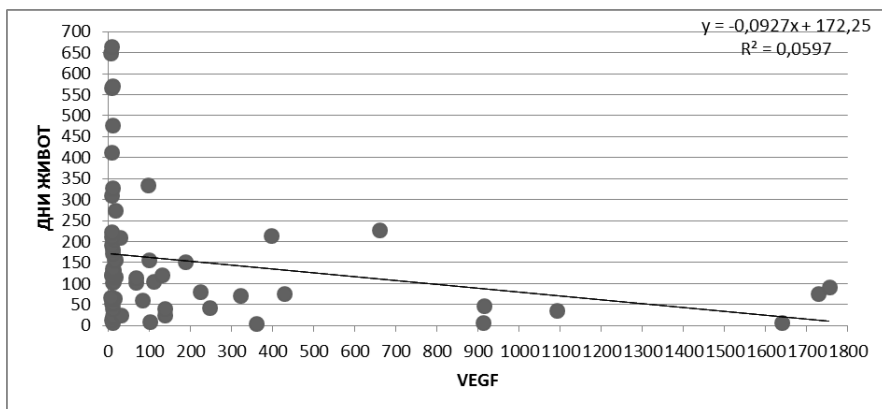
4.9. Регресионен анализ

Корелация между стойностите на VEGF, измерени в ликвор и продължителността на живота при пациенти с Мултиформен глиобластом.

Изследваме зависимостта между стойностите на фактора и продължителността на живота (в брой дни) на заболялите, т.е. как се влияе продължителността на живота от стойностите на кръвния фактор (Фигура 45).



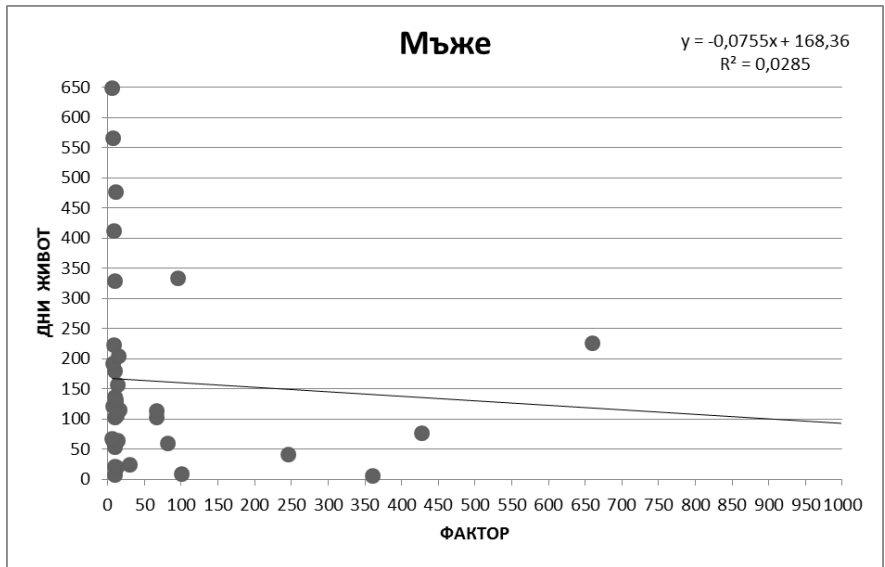
Фигура 45. Корелация между стойностите на VEGF в пгр./мл. и преживяемостта в дни при пациенти с Мултиформен глиобластом, участващи в изследването на VEGF в ликвор.



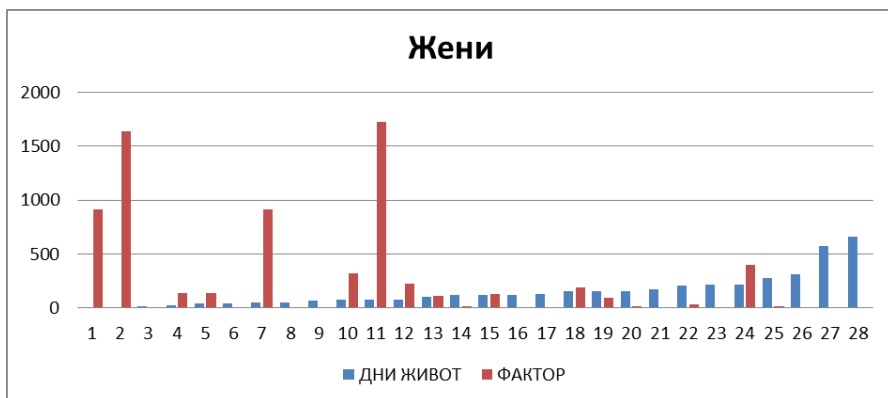
Фигура 46. Корелация между стойностите на VEGF в пгр./мл. и преживяемостта в дни при пациенти с Мултиформен глиобластом, участващи в изследването на VEGF в ликвор.



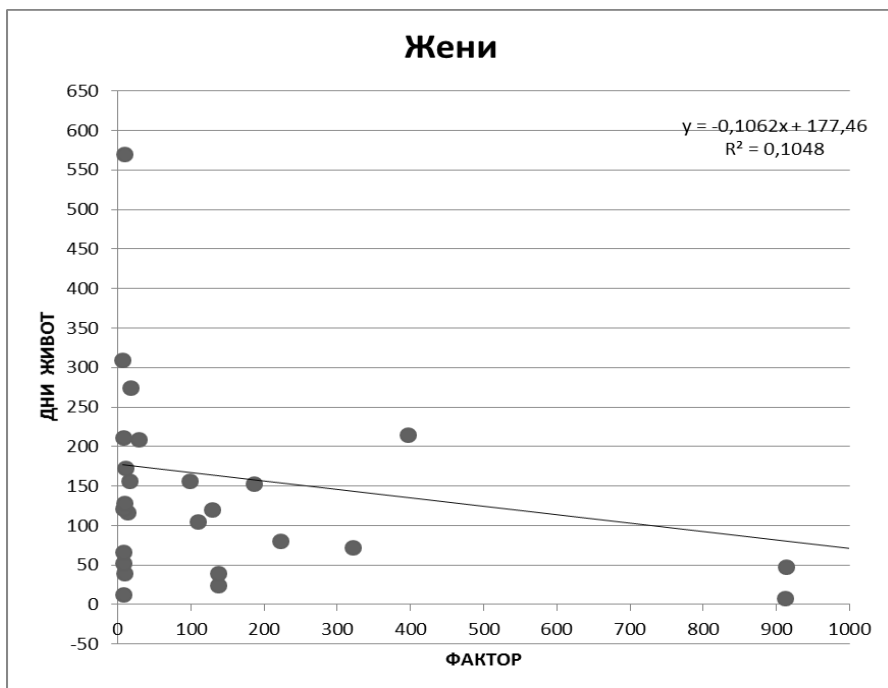
Фигура 47. Корелация между стойностите на VEGF в пгр./мл. и преживяемостта в дни при пациенти с Мултиформен глиобластом, участващи в изследването на VEGF в ликвор - мъже.



Фигура 48. Корелация между стойностите на VEGF в пгр./мл. и преживяемостта в дни при пациенти с Мултиформен глиобластом, участващи в изследването на VEGF в ликвор - мъже.



Фигура 49. Корелация между стойностите на VEGF в пгр./мл. и преживяемостта в дни при пациенти с Мултиформен глиобластом, участващи в изследването на VEGF в ликвор - жени.

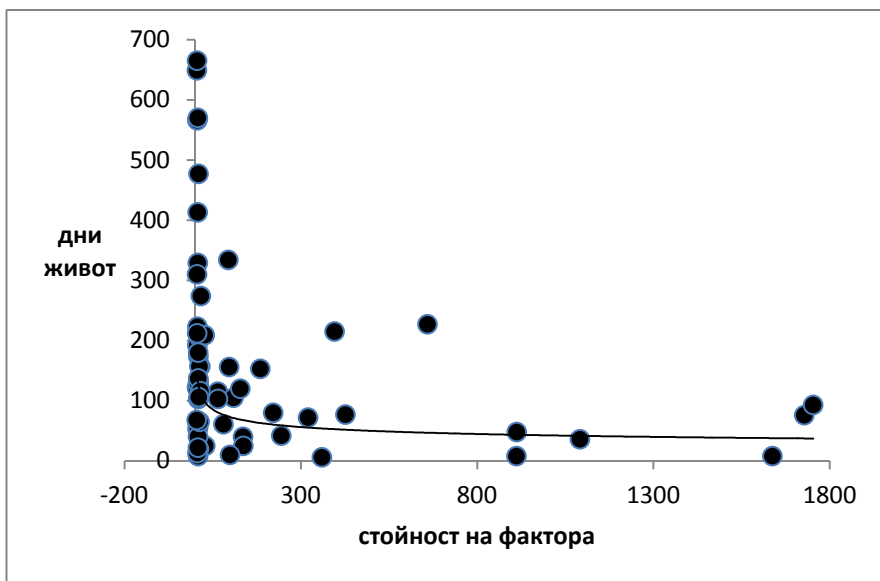


Фигура 50. Корелация между стойностите на VEGF в пгр./мл. и преживяемостта в дни при пациенти с Мултиформен глиобластом, участващи в изследването на VEGF в ликвор - жени.

При мъжете се установява слаба отрицателна зависимост, т.е. при нарастване на големината на фактора със 100 единици продължителността на живота намалява в интервала 7-23 дни. Влиянието на фактора върху продължителността на живота е около три пъти по-слабо в сравнение с това при жените, където зависимостта е умерено до значителна отрицателна. При жените големината на фактора влияе по-силно на продължителността на живота, отколкото при мъжете. Също така модела е с по-висок процент на значимост отколкото при мъжете. Това означава, че данните при жените са по-устойчиви, докато при мъжете влиянието на случайни (други) фактори върху продължителността на живота е по-голямо.

4.10. Нелинеен модел

Нелинейният модел обяснява по-добре връзката между преживяемостта и стойностите на кръвния фактор, защото както се вижда на точковата графика, пациентите с малки стойности на кръвния фактор имат различна продължителност на живот (точките не се групират около права линия) (Фигура 51).



Фигура 51. Корелация между стойностите на VEGF в пгр./мл. и преживяемостта в дни при пациенти с Мултиформен глиобластом, участващи в изследването на VEGF в ликвор - нелинеен модел.

$R = -0,37$ (Pearson coefficient) е стойността на корелационния коефициент между кръвния фактор и дните живот. Той показва умерена отрицателна зависимост между тези величини, т.е. нарастването на стойността на фактора ще доведе до умерено намаляване на дните живот. Освен това тъй като броят на изследванията N надхвърля 60, може да се счита, че този резултата е значим (може да пренесе за генералната съвкупност).

Модела показва, че с вероятност 95% (в 95% от случаите) може да се твърди, че на 10 единици промяна на кръвния фактор в повечето случаи ще доведе до промяна на дните живот между 7 и 19 дни. Ако се промени с 10 единици в положителна посока, броя на дните трябва да намалява, а ако промяната е отрицателна броя на дните трябва да се увеличава.

Стойността $p = 0.0026$ показва, че модела (при ниво на значимост $p < 0.01$) добре обяснява данните (в над 99% от случаите).

Ако се разгледат само резултатите на мъжете ще се получи съответно стойности (Pearson coefficient $R = -0.32$; $p = 0.053$).

Тук модела обяснява данните в над 94% от случаите и коефициента на Pearson е сходен с предходния.

Ако се разгледат резултатите при жените съответните резултати са: Pearson coefficient $R = -0.43$; $p = 0.023$

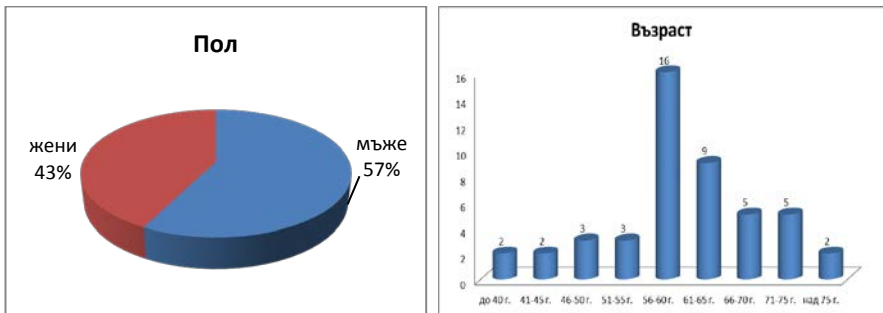
Модела обяснява данните в над 97% от случаите и коефициента на Pearson е съизмерим с предходния.

4.11. Подгрупи. Вариации. Уточняване на модела.

Групирането на данните близо до ординатната ос показва, че при много пациенти с ниска стойност на изследвания фактор преживяемостта е в много широки граници, което не може да се обясни само с величината на VEGF.

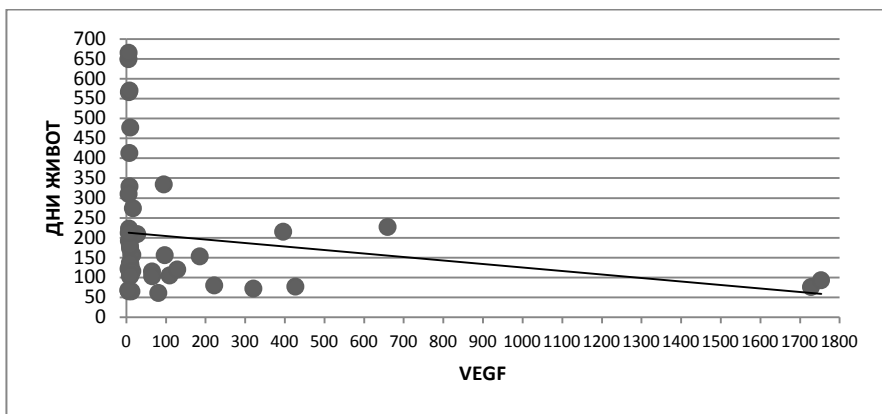
Това наложи разделянето на основната група на няколко подгрупи с цел уточняване на модела.

Първоначално от анализите се изключиха пациентите с преживяемост под 60 дни. Това са пациенти постъпили в тежко общо състояние, с изразена огнищна и общомозъчна симптоматика и нисък Карновски индекс. По този начин се оформи група от 47 пациента. Разпределението им по пол и възраст кореспондира с основната група (Фигури 52 и 53).



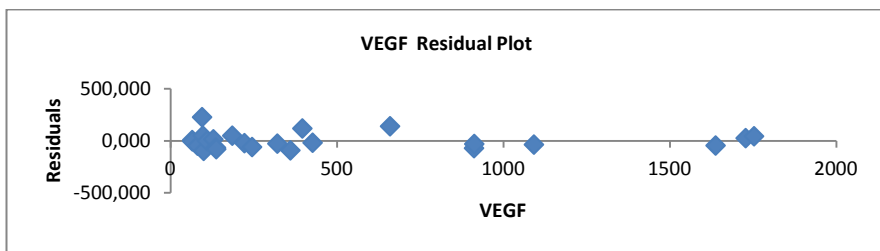
Фигура 52. Разпределение по пол на пациентите с Мултиформен глиобластом, участващи в изследването на VEGF в ликвор, след изключване на болни с преживяемост < 60 дни.

Фигура 53. Разпределение по възраст на пациентите с Мултиформен глиобластом, участващи в изследването на VEGF в ликвор, след изключване на болни с преживяемост < 60 дни.

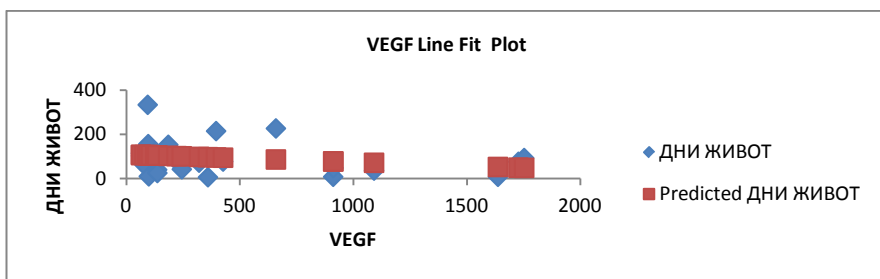


Фигура 54. Регресионен анализ на пациентите с Мултиформен глиобластом, участващи в изследването на VEGF в ликвор, след изключване на болни с преживяемост < 60 дни.

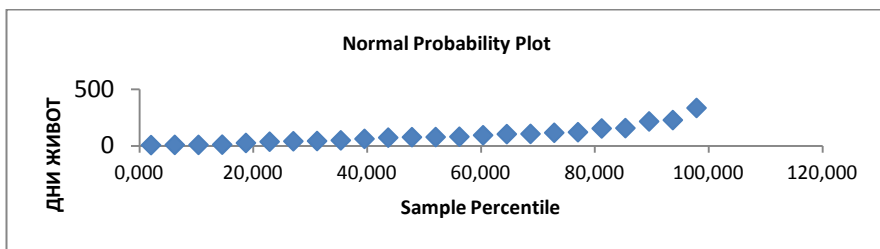
На фигури 55, 56, 57 графично е показан модела на вероятните грешки, илюстриращ коректността на математическия модел и нивото на доверителност е под 0,05.



Фигура 55.



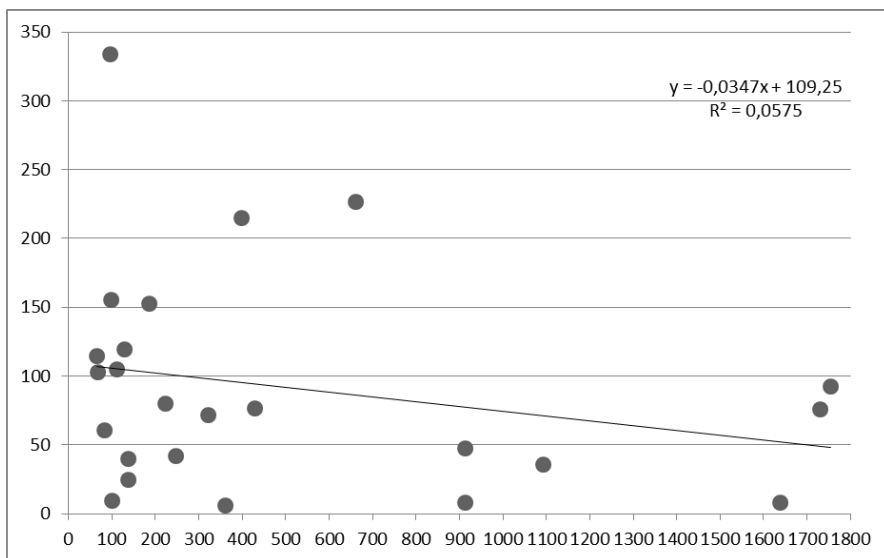
Фигура 56.



Фигура 57.

Регресионен анализ при VEGF > 50 пгр./мл.

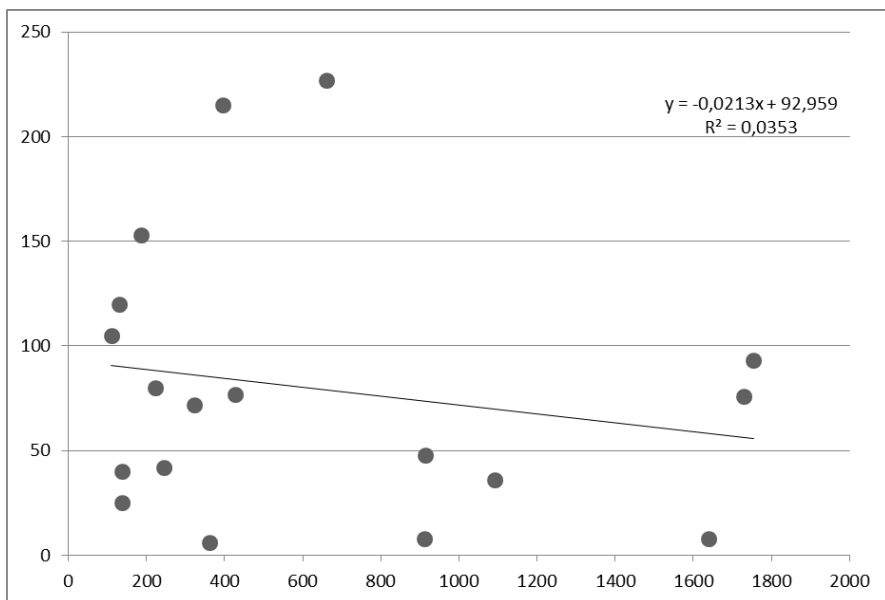
Втората група се оформи след изключване на пациенти с ниски стойности на VEGF, чийто точки се групират около и близо до ординатната ос. При изследване на пациенти със стойности на VEGF фактора над 50 пгр./мл. резултатите са подобни. Изследваните пациенти са 24. Коефициента на Пирсън е сходен (-0.24), което означава отново умерена отрицателна зависимост. Регресионният модел показва, че при нарастване на фактора със 100 единици се наблюдава намаляване на преживяемостта с 0-10 дни (Фигура 58).



Фигура 58. Регресионен анализ пол на пациентите с Мултиформен глиобластом, участващи в изследването на VEGF в ликвор, при стойности на VEGF > 50 пгр./мл.

Регресионен анализ при VEGF > 100 пгр./мл.

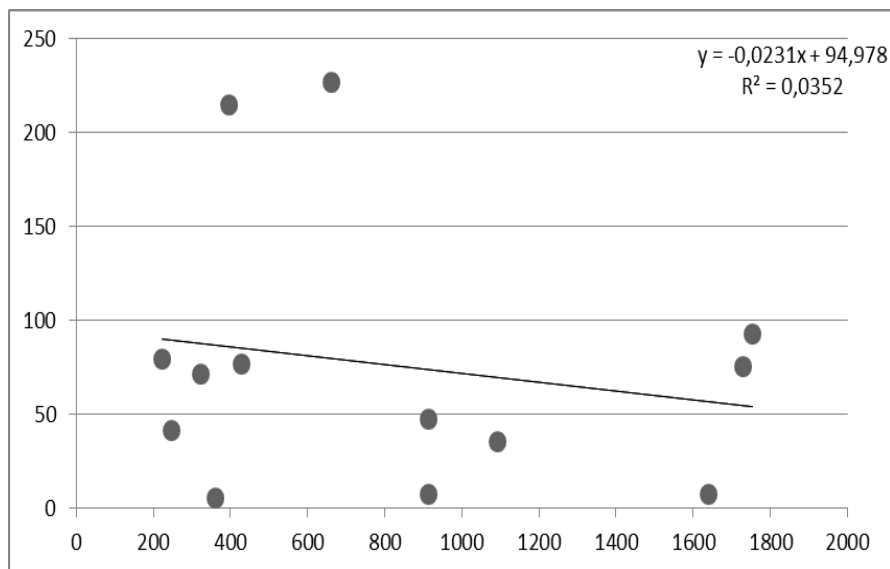
При изследване на пациенти със стойност на VEGF фактора над 100 пгр./мл.се оказва, че почти нищо не се променя. Изследваните пациенти са 18. Коефициента на Пирсън (-0.19) показва сходна тенденция. Регресионния модел е сходен с горния (Фигура 59).



Фигура 59. Регресионен анализ пол на пациентите с Мултиформен глиобластом, участващи в изследването на VEGF в ликвор, при стойности на VEGF > 100 пгр./мл.

Регресионен анализ при VEGF > 200 пгр./мл.

Групата със стойност на фактора > 200 пгр./мл. се състои от 13 болни. Регресионният модел е следния (Фигура 60).

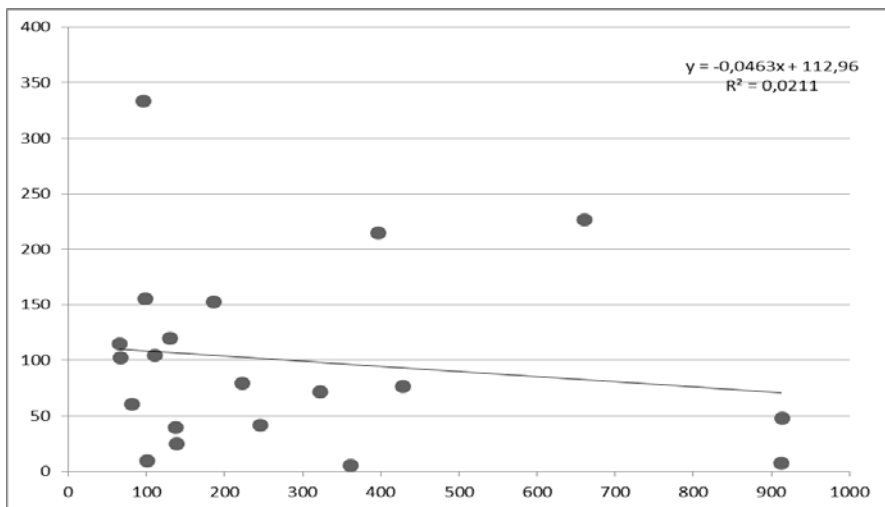


Фигура 60. Регресионен анализ пол на пациентите с Мултиформен глиобластом, участващи в изследването на VEGF в ликвор, при стойности на VEGF > 200 пгр./мл.

Коефициента на Пирсън е отново (-0.19) и води до същата закономерност, т.е. моделът е същия.

Регресионен анализ при VEGF >50 пгр./мл. < 1000 пгр./мл.

Групата се формира при изключване на най-ниските и най-високите стойности, т.е. при изключване на крайните варианти и хомогенизиране на популацията. При изследване на пациенти със стойности на фактора между 50 и 1000 резултатите са следните: Коефициента на Пирсън (-0.15) се тълкува по сходен начин с горните случаи. Регресионния модел показва подобно изменение на преживяемостта, като при горните, а именно на 100 единици увеличаване на фактора дните живот намаляват с до 20 (Фигура 61).



Фигура 61. Регресионен анализ пол на пациентите с Мултиформен глиобластом, участващи в изследването на VEGF в ликвор, при стойности на VEGF >50 пгр./мл. < 1000 пгр./мл.

Получените резултати при всички направени изследвания (и при 64, и при 47, и при 24, и при 18, и при 20 пациента) са съпоставими. Коэффициента на Пирсън варира в рамките на минус 0.15-0.30 което се тълкува като умерена отрицателна зависимост. Регресионния анализ показва отрицателен тренд, т.е. с увеличаване стойностите на фактора, преживяемостта бавно ще намалява (приблизително на 100 единици увеличаване на фактора се очаква намаляване на преживяемостта с 5-25 дни). Според всички резултати модела е значим (t теста на Стюдънт, $p=0.05$). Относително стабилните резултати при промяна на броя на изследваните пациенти показва, че модела е устойчив. Може да се очаква, че и при изследването на по-голяма група пациенти резултатите ще са сходни с получените, което ни дава възможност да обобщим резултатите и да изведем окончателна формула:

Предвиждане на продължителността на живота според регресионното уравнение:

При случая с 47 пациенти регресионния анализ подава уравнение :

$$\text{дни живот} = -0.088 \cdot (\text{стойност на VEGF в ликвор}) + 213$$

Стойностите - 0.088 и 213 са коефициенти екстраполирани от регресионния анализ следствие устойчивостта на модела.

Измерената стойност на VEGF фактора се замества на мястото и получения резултат е приблизителния брой дни живот.

Пример: нека е измерена стойност на фактора 250. Това означава, че в модела заместваме $x=250$. Получаваме $y = -0.088 \cdot 250 + 213 = -22 + 213 = 191$ дни живот приблизително, като очаквания интервал е 110-270 дни (95% от случаите; $p=0.05$).

V. ДИСКУСИЯ

Ангиогенезата е основен феномен при редица физиологични процеси - заздравяване на рани, ембриогенеза, репродуктивни процеси при жената. Тя е задължително събитие при солидните тумори, като при много от тях е с доказано прогностично значение по отношение на метастазирането и преживаемостта.

Малигнените глиоми все още са нелечимо заболяване, те са биологично агресивни и представляват уникално предизвикателство за лечение към клиницисти, хирурзи и радиолози, поради:

- 1) локализацията на туморите в мозъка;
- 2) присъща устойчивост на тези лезии на конвенционална терапия;
- 3) ограничен капацитет на мозъка да се възстанови;
- 4) разпространение на злокачествени клетки в мозъчния паренхим;
- 5) променливо нарушената кръвно-мозъчна бариера усложнява доставянето на лекарството;
- 6) туморен и перитуморен оток и повишено вътречерепно налягане;
- 7) ограничен отговор на терапия;
- 8) невротоксичност на насоченото към глиоми лечение

Причините за ангиогенеза са идентифицирани и се дължат предимно на хронично активиране на пътя на хипоксията.

Въпреки това, всички механизми в развитието на туморните съдове са далеч от напълно изясняване. Постнаталната васкулогенеза може да има значение при развиването на патологичната съдова мрежа, което може да отвори нови възможности при мониторинга или лечението на солидните тумори. Ролята на третото звено (т.е., перипити, микроглия и астроцити) в допълнение към ендотелните и туморни клетки остава неясна. Налице е също така малко информация по отношение на еволюцията на ангиогенезата по време на лечение. Много лекарства са вече на разположение за подтискане на всички свръхекспресирани пътища. В същото време, остават важни въпроси по отношение на кои, следва да се използват лекарства и кога трябва да се прилагат.

Вече е установено, че по-добрия избор на пациентите, въз основа на индивидуални молекулни пътища, трябва да подобри ефикасността на анти-ангиогенните терапии. Също така е разумно да се предположи, че това лечение трябва да се приложи по-рано - или когато е налице ангиогенно превключване или за неговото предодврътане.

Един от главните проблеми при лечението на глиалните тумори е липсата на метод за надеждна оценка на туморният прогрес или отговор в резултат на лечението. Това определя необходимостта от използването на точни маркери за ангиогенезата. Някои вече са на разположение, а други трябва да бъдат разработени скоро.

Най-често използваните невроизобразяващи изследвания (КТ или ЯМР с контраст) се базират на промените в интегритета на кръвно-мозъчната бариера и дават само индиректна оценка на туморния обем и характеристика. Имайки предвид, че кръвно-мозъчната бариера може да се засегне от често използвани в практиката интервенции като радиация, глюкокортикоиди и инхибитори на VEGF, това допълнително усложнява интерпретацията на образните изследвания.

Новите радиологични техники като PET и магнитно-резонансна спектроскопия са теоретично обещаващи, но до този момент не са променили значимо оценката на пациентите с малигнени глиоми.

Специфичните туморни, кръвни биомаркери биха могли да бъдат незабавно използвани от клиницисти и изследователи, ако се докаже тяхната чувствителност и специфичност.

Промените свързани с лечението, включително хирургия, лъчетерапия и кортикостероиди могат да усложнят и затруднят резултатите.

Класическите критерии за отговор на лечението при солидните тумори, които разчитат на дву- и триизмерни измервания (RECIST) не са адекватни за оценка и приложение при малигнените глиоми. Разработени са специфични радиографски критерии използвани в клинични проучвания от години, като критерия на McDonald, при който се интегрират клиничния статус и стероидната доза в оценъчните параметри (Macdonald DR et al., 1990).

Критериите от Revised Assessment in Neuro-Oncology (RANO) са развитите критерии на McDonald, като включват измервания в зоните непоемащи контраст, въпреки това тези критерии все още не са утвърдени. Новите образни техниките като PET и MPT- спектроскопия са с ограничено приложение, следствие на относително слаба пространствена резолюция и липса на специфичност. PET и MPT- спектроскопия имат малък принос към радиографската оценка на малигнените глиоми.

Следователно са необходими алтернативни методи за оценка на туморния статус и отговора към приложеното лечение.

Туморни маркери в циркулиращите течности могат да заобиколят ограниченията на невровизобразителните изследвания и да се превърнат в ценен инструмент за клинична оценка и поведение.

Туморен маркер е термин, използван за биохимично измерване на вещество (например: протеин, генетични, хромозомни или аминокиселини, метаболити и др.), който е свързан с определен тумор. Маркерът може да се намира в някоя телесна течност или кухина (например: серум, урина, жлъчка, гръбначно-мозъчна течност). В идеалният случай, обаче, тази течност трябва да бъде достъпна, възобновяема и количествено измерима. Най-полезният туморен маркер трябва да бъде с висока специфичност и чувствителност към тумора и трябва да бъде уникален.

Например, простат-специфичният антиген (PSA) е прототипен серумен туморен маркер, който има висока специфичност (96%) и умерена чувствителност (23%), и това е серологичен тест, които лесно се получава, може да се възпроизведе в различни лаборатории и може да бъде надеждно измерен. Ниво PSA > 10 нг/ мл има висока корелация с рак на простатата (67%) (Frankel S et al, 2003).

Следователно, този тест може да се използва не само за да се потвърди диагнозата, но и да се наблюдава резултата от лечението и да се мониторира пациента за бъдещи евентуални рецидиви. Идеалният туморен маркер, би трябвало да може да се приложи за скрининг на цели популации, особено при високо-рискови групи, да се потвърди хистопатологично, да прогнозира отговор към лечение, както и да предоставя субстратна мишена за по-нататъшни терапии (Catty A et al., 1988; Canto EI et al., 2003; Jensen RL, 1998).

Биохимично вещество, което да е специфично за тумори не е нова концепция. През 1847 г. сър Henry Bence Jones е първият, който описва уринарен туморен маркер, като метод да се потвърди диагнозата: кръвна дискразия, водеща до бъбречна недостатъчност, отслабване и смърт. Много години по-късно, беше установено, че протеина на Bence Jones е лека верига, част от IgG и е свързан с множественият миелом. Същата година, сър Майкъл Фостър описва амилазата като маркер за рак на панкреаса. В началото на 20-ти век се наблюдават много постижения в областта на биологията на туморните маркери. Тези открития разкриха маркери,

които са по-специфични и са свързани с много по-добро разбиране на патофизиологията на неоплазия. Сред тези маркери бяха кисела фосфатаза (1930) като маркер за рак на простатата и рак на костите, пикочния хорион гонадотропин (1940) за гестационните трофобластни неоплазми, и ванилилбадемова киселина през 1950 за невроендокринни тумори.

Съвременната епоха на туморни маркери, е повлияна от многото технологични постижения в имунохистохимията, молекулярната биология, генетиката и хромозомният и ядрен анализ (Frankel S et al, 2003; Caty A et al., 1988; Canto EI et al., 2003; Jensen RL, 1998). Тази експлозия на знанието помогна на изследователите да разработят все повече и по-конкретни и чувствителни маркери за различни видове рак. Въпреки това, не са описани надеждни туморни маркери за малигнените глиоми. Причините за това са многобройни, включително сравнително ниската им честота сред населението, висока смъртност (средна преживяемост за GBM е 13,2 месеца), трудност при получаване на тъканни проби за откриване на потенциален туморен маркер, както и ограничения, наложени от кръвно-мозъчната бариера за получаване на серумни проби на всеки потенциален туморен маркер. Въпреки това, предварителните резултати от два важни кандидат туморни маркери, VEGF и bFGF, изглеждат обещаващи за клинично приложение при пациенти с малигнени глиоми. Тези маркери могат да бъдат по-ползени като инструменти за доказване на тумора, наблюдение и различаване на рецидив на тумора от радиационна некроза, отколкото като средство за диагностика и скрининг.

Най-важните неблагоприятни прогностични фактори при пациенти със злокачествени глиоми са напреднала възраст, хистологични особености на глиобластома, лош Karnofsky статус индекс при диагностициране и резидуален нерезециран тумор (Curran WJ Jr et al., 1993).

Продължават усилията за идентифициране на биологични и генетични промени в туморите, които могат да предоставят допълнителна прогностична информация, както и насоки при вземането на решения за оптимална терапия.

Ролята на ангиопетичните фактори в развитието на мозъчни тумори е широко проучена по отношение на iPHK и на протеини на тъканно ниво, но въпреки това, няма представени убедителни данни за тяхната плазмена и ликворна откриваемост, както и за евентуална корелация с изхода на заболяването и продължителността на живота.

Поради липсата на данни за комплексна оценка на ангиогенезата, която да включва проследяването и анализа на плазмените и ликворните нива на VEGF и bFGF, както и на връзката им с вида на мозъчния тумор и продължителността на живота, предприехме комплексен анализ за установяване на цялостния ангиогенен потенциал при новодиагностицирани пациенти с различни видове мозъчни тумори. Комплексната оценка, която използвахме в настоящата работа, включва изследване на плазмените и ликворните концентрации на два от най-специфичните ангиогенни фактора – VEGF и bFGF, динамично проследени пред- и постоперативно, създаване на анкетна карта за катамнезно проучване, създаване на медицинско досие.

В настоящото проучване, след прилагане на критериите за подбор, са включени общо 109 пациента, разделени на четири групи, според вида на мозъчната неоплазма, съгласно класификацията на СЗО: 71 с високостепенни глиоми (Hi-grade glioma)- Глиобластома Мултиформе (GBM), 7 с нискостепенни глиоми (Low-grade glioma)- Астроцитом –I-II степен по СЗО, и две групи служещи за контрола- доброкачествени мозъчни тумори- Менингеом – 11 пациента и 20 клинично здрави доброволци.

Включени са пациенти на Клиника по Неврохирургия – Университетска болница “Св. Марина”- Варна и Клиника по Неврохирургия – Университетска болница “Св. Анна”– Варна,

при които е проведено неврохирургично лечение, чрез краниотомия и резекция на мозъчна неоплазма за периода 2006-2013г. Критериите са основани съгласно общоприетите стандарти по Неврохирургия и Невроонкология. Всички са хистологично диагностицирани и са с летален изход до края на анализирания период (декември 2013година).

На първи етап, за да се определи плазмения профил на пациентите, бяха изследвани концентрации на VEGF и bFGF в плазма при 35 пациента. В динамика са проследени общо 14 болни, които са анализирани пред и постоперативно (в ранния постоперативен период - 7 ден) според еволюционния ход на болестта и/или на фона на провежданото лечение. Включени са общо 10 здрави доброволци, при които няма данни за хематологично, неопластично, остро или хронично възпалително заболяване, на средна възраст от 45 години (22-68) и съотношение жени:мъже - 1:1. Контролната група включва брой анализирани индивиди, които да съставят минимум една трета от общия предвиден брой изследвани пациенти с мозъчни тумори.

Според класификацията на СЗО злокачествените тумори сме разделили на две групи – първа група са нискостепенни глиоми (LGG), в която влизат астроцитом I и II степен - 7 болни, а втората група са високостепенни глиоми (HGG), която обхваща астроцитом III - IVст. И мултиформен глиобластом (GBM) - 7 болни. Групата на менингеомите е съставена от 11 пациента.

Разпределението по пол на лицата в основната група е в полза на жените (68,00 %), като средната възраст на участниците в тази група е 56,7 г. \pm 13,5 г. Минималната възраст е 17 г., а максималната е 75 г.

Нашето изследване описва значителните плазмени стойности на VEGF и bFGF отчетени в проби взети от болни с различен вид първични мозъчни тумори- Злокачествени глиоми- Нискостепенни - Астроцитом I-II степен по СЗО и Високостепенни - Глиобластом и доброкачествени тумори - Менингеом.

Неоваскуларизация често корелира с биологичната агресивност и степента на злокачественост на мозъчните тумори, така както и с проявяването на рецидив, и с постоперативната преживяемост на пациентите с астроцитомии (Zagzag, D, 1995; Brem, S, 1976). Доказано е, че сред ангиогенните фактори на растежа, експресията на VEGF, но не и на bFGF, силно корелира с кръвоснабдяването и в двата вида човешки тумори: глиоми и менингиоми (Samolo K et al., 1995).

Palte K. H, (1994), предполага, че стартирането на ангиогенезата, която се проявява по време на прогресията на нискостепенните астроцитомии във високостепенни глиоми (анапластичен астроцитом и глиобластом) изглежда, медирано от най-малко три отделни събития: възходяща регулация на рецепторите на PDGF и на VEGF в ендотелните клетки и свръхекспресия на VEGF от туморните клетки. Определянето на концентрацията на VEGF може да предостави средство за диагностика, например, за да се реши проблема с категоризация при някой случай, в допълнение към хистопатологичната диагноза. В бъдеще е възможно измерването на VEGF и други ангиогенни пептиди в тъкани, кистично съдържимо и CSF заедно с измерване на неоваскуларизацията на самия тумор в мозъка, да могат да бъдат използвани за подобряване на точността на прогнозата при пациенти с мозъчни тумори.

В зората на първоначалните ангиогенни проучвания първоначалният провал за откриване на VEGF в серумите от пациенти с различни видове злокачествени новообразувания, включително на белия дроб, рак на гърдата, яйчиците, шийката на матката, на дебелото черво, лимфома и рак на стомаха, се обяснявал с бързото свързване на VEGF към клетъчните рецептори или към екстрацелуларния матрикс, което води до изчистване на VEGF от кръвообращението (Yeo K T et al., 1993).

С модифициране на антителата използвани в ELISA, Kondo S et al., (1994) установяват, че нивата на VEGF в серумите на пациенти с различни видове рак, включително на матката, на яйчниците и рак на белия дроб, са значително по-високи от тези в серумите на лица без никакви признаци на рак.

Въпреки това, в серуми на пациенти с мозъчни тумори, нивата на VEGF са в рамките на нормалният диапазон, дори и в случаи с изключително високи нива на VEGF в туморната тъкан и течност от туморни кисти, най-вероятно като резултат от наличието на кръвно-мозъчна или туморно-кръвна бариера. Въпреки, че капилярите на злокачествените глиоми са свръхпропускливи, те са морфологично и по същество прекъснати и без фенестрации, докато капилярите при други тумори, различни от мозъчните понякога са фенестрирани и непрекъснати (Dvorak H F et al., 1995; Takano S et al., 1991). Чрез молекулярно трасиращо проучване (Kohn S et al., 1992) и чрез ултраструктурна имунохистохимия по-прецизно е установено, че микросъдовото свързване на VEGF е към извънлуменната повърхност на ендотелноклетъчната плазмена мембрана и към везикуло-вакуоларни органелни структури (Dvorak HF et al., 1995), чиято функция е регулирана от туморния съд. Тези проучвания демонстрират преминаване на молекули през везикуло-вакуоларните органелни структури, като прости вериги от везикули и вакуоли, а посоката е директна, т.е. от лумена към извънлуменната страна (Kohn S et al., 1992). Следователно, VEGF локализиран по извънлуменната повърхност на плазмената мембрана и везикуло-вакуоларните органелни структури на ендотелните клетки не може да проникне в съдовия лумен и в общото кръвообращение.

Доказано е, че при различните видове тумори, както и при различните степени на злокачественост при един вид тумор, съществуват разлики в стойностите на експресия на растежните фактори и тези различни нива корелират с туморната прогресия и еволюция (Plate KH et al, 1994; Yao Y et al., 2001; Takano S et al., 1996). Всички тези проучвания са проведени върху туморни тъкани проби и концентрациите на растежните фактори са отчетени директно в туморните клетки.

В нашата серия пациенти, установените разлики в стойностите, показват видимо увеличение, степенувайки ги от здрави към доброкачествени, нискостепенни и високостепенни глиални тумори.

Това обаче не се доказва, чрез статистическите анализи, който точно обратното показват, че нивата на VEGF и bFGF не корелират със степента на малигненост на тумора. Освен това нашите резултати показват, че плазмените нива и на двата фактора не корелират и с вида на мозъчната неоплазма, което е установено и от други автори (Takano S et al, 1996; Peles E et al, 2004).

Към момента, въпреки опитите на различни автори, не е установена връзка и корелация между нивата на VEGF и bFGF в туморна тъкан и туморно кистично съдържимо и нивата им в плазма. Най-вероятно, защото нивата в плазма зависят от много повече фактори, много са вариабилни и не могат да бъдат използвани като маркер за предвидимост (Prakash S et al., 2004).

Едно от възможните обяснения за различията в стойностите на растежните фактори, в плазма, и тяхната вариабилност е пряката секреция на ангиогенни фактори от тумора в субарахноидалното пространство, както и кръвно-мозъчната бариера служеща като филтър. Това обяснява и установеният значителен градиент между ликворните и серумните нива на тези фактори. Това предположение се подкрепя от наблюдението, че нивата на ангиогенни фактори в ликвор при пациенти със системни злокачествени заболявания са ниски, въпреки повишените нива на ангиогенни фактори в серума (Li VW et al., 1994). Подобни резултати са били отчетени

от Takano (Takano S et al., 1996), който открива пренебрежимо ниски серумни нива на VEGF (в сравнение с интратуморните им нива) при пациенти с диагностицирани различни мозъчни тумори.

В нашите данни между факторите VEGF и FGF имаме много силна положителна зависимост, т.е. при покачване на стойностите на единия фактор се очаква и покачване на стойностите на втория фактор. Наблюдава се положителна слаба зависимост и при двата фактора с възрастта на изследваните, което корелира и с литературните данни.

Наблюдават се някои различия между двете наблюдения. При нискостепенните глиоми корелацията между факторите е много силна и расте слабо с нарастването на възрастта, докато при високостепенните (high grade) корелацията е умерена и намалява слабо с нарастването на възрастта. Тези данни противоречат със становището, че с увеличаване на степента на малигненост на глиома той става по-кръвоснабден т.е. ангиогенно зависим и следователно с увеличаване на злокачествеността би трябвало да се покачат и стойностите на растежните фактори.

Между злокачествените, от една страна и доброкачествените и здравите от друга страна, има значителна разлика. При първите тенденцията е положителна умерена, което означава, че увеличаването на единия фактор ще води до увеличаване на другия. Докато при доброкачествените и здравите изследвани, тази тенденция е обратна т.е. при нарастване на единия фактор другия би трябвало слабо да намалява.

Резултатите (при ниво на значимост 0,05) показват, че няма значителни различия между стойностите на фактора VEGF (стойността е значително по-голяма от нивото на значимост 0,05) в трите групи и евентуалните разлики се дължат по-скоро на влиянието на други фактори, експресията на факторите не корелира със степента на малигненост на неоплазмата.

Коефициентът на корелация на Пирсън между VEGF и преживяемостта е $R = -0,10$, което означава слаба отрицателна зависимост, с други думи нарастването на VEGF ще намали преживяемостта пренебрежимо незначително. Стойностите на фактора обясняват по-малко от 8% от продължителността на живот, т.е. над 92% от преживяемостта се обяснява с влияние на други фактори. Освен това модела не е достатъчно значим ($p > 0,05$). При корелацията между стойностите на bFGF и продължителността на живота имаме коефициент на Пирсън $R = -0,20$. Корелацията е слаба отрицателна, а стойностите на този фактор обяснява до 5% от продължителността на живот. Модела не е достатъчно статистически значим ($p > 0,05$).

Изследването на зависимостта между преживяемостта и стойността на VEGF и bFGF показва, че не съществува корелация между изследваните величини ($p > 0,05$).

Въпреки малкия брой пациенти в тази група, получените резултати потвърждават тезата на редица автори, че серумните нива на VEGF и bFGF не корелират с вида на мозъчния тумор, степента на малигненост и продължителността на живота (Takano S et al., 1996; Peles E et al., 2004; Prakash S et al., 2004).

Физиологичната ангиогенеза е наблюдавана и доказана от много автори (Folkman J, 1971; Li W et al, 2005). Процес, нормално съществуващ в живите организми представен при: зарастване на рани, възстановяването на кръвотока през тъканите при травми, инсулт, по време на менструалния цикъл - за възстановяване на маточната лигавица и за съзряване на яйцеклетката по време на овулация, при бременност- за изграждане на плацентата и на циркулацията между майката и плода.

При много сериозни болестни състояния е нарушена регулацията на ангиогенезата. По този начин се получават ангиогенно-зависими заболявания, при които новите кръвоносни съдове или растат прекомерно или недостатъчно.

Екссивна ангиогенеза:

Среща се при заболявания като рак, диабетна ретинопатия и слепота, свързани с възрастта макулна дегенерация, ревматоиден артрит, псориазис и повече от 70 други заболявания.

Възниква, когато болни клетки и тъкани произвеждат необичайни количества от ангиогенни фактори на растежа, нарушаващи ефектите от природните, естествени инхибитори на ангиогенезата.

В тези условия, новите кръвоносни съдове растат и хранят болните тъкани; новите съдове са абнормални и пропускливи и могат да разрушат нормалните тъкани. В случай на рак, ненормалните съдове позволяват на туморни клетки, за да избягат в кръвообращението и да попаднат и в други органи (туморни метастази).

Инсуфициентна ангиогенеза:

Среща се при заболявания като коронарна болест на сърцето, инсулт и хронични рани.

В тези условия, растежа на кръвоносните съдове е недостатъчен и кръвната циркулация не е правилно възстановена, което води до риск от тъканна смърт.

Недостатъчна ангиогенеза се получава, когато тъканите не произвеждат достатъчни количества от ангиогенните фактори на растежа (Li WW et al., 1998).

Концепцията за значението на ангиогенезата в туморната биология и терапията на солидните тумори с ангиогенни инхибитори е представена от Judah Folkman още през 1971 (Tumor angiogenesis: therapeutic implications). Интересът за изучаване на туморната ангиогенеза нараства през 80-те, с изолирането на първата проангиогенна молекула - bFGF, а впоследствие - на главния „двигател“ на ангиогенезата VEGF и тирозин-киназните му рецептори. Следва изолирането на други проангиогенни молекули, на техните рецептори и механизми на сигнална трансдукция, както и на естествените им инхибитори. Тези събития формират основата за изучаване на ангиогенезата при солидните тумори, създаването на синтетични ангиогенни инхибитори и въвеждането им в клинични проучвания като част от цялостната терапевтична стратегия при много онкологични заболявания (Folkman J, 1992; Senger DR et al., 1983; Leung DW et al., 1989).

В светлината на гореизложеното, направихме опит да проучим съществува ли динамика в плазмените концентрации на VEGF и bFGF- пред- и постоперативно, има ли статистическа достоверност и дали има връзка със злокачествеността или вида на тумора.

Анализа на данните от направеното изследване на промените във VEGF в цялата извадка показва, че в предоперативно състояние факторът има приблизително 1,5 пъти по-ниска стойност в сравнение с постоперативните стойности, т.е. нараства след операция. Същата тенденция се наблюдава и по отношение на стойностите на bFGF. Средните стойности на VEGF са по-високи при пациентите с LGG, спрямо HGG и менингиоми. Това не би следвало да се очаква поради факта, че високостепенните глиоми и менингеомите са силно кръвоснабдени и следователно първоначалните нива на растежни фактори при тях би следвало да са по-високи.

Анализа на изследването на bFGF, показва завишаване на стойностите при пациенти с HGG и в по-малка степен на тези с LGG.

Проведения сравнителен анализ на стойностите на VEGF и bFGF преди и след операцията показва, че наблюдаваме статистически значимо нарастване на факторите при пациентите с LGG ($p < 0,05$), като при VEGF нарастването е приблизително 1,5 пъти, докато при bFGF е приблизително трикратно.

При пациентите с HGG съществена разлика при сравняването на преоперативни и постоперативни данни се наблюдава само по отношение на VEGF ($p < 0,05$). При другият фактор

- bFGF, не беше установена статистическа разлика, въпреки констатираното намаляване на стойността.

При пациентите с доброкачествени новообразования не беше намерена статистическа разлика в предоперативните и постоперативни данни на VEGF и bFGF, въпреки наблюдаваното намаляване на стойностите и на двата фактора.

Сравнителният анализ на средните постоперативни стойности на VEGF и bFGF при изследваните групи пациенти не показва статистически достоверна разлика

Всъщност получава се постоперативно средно повишение на стойностите на растежните фактори, при глиалните тумори и намаляване на нивата им при групата на менингиомите. Това би било логично, като се има предвид, че всички са доказани ангиогенни заболявания с богато кръвоснабдяване. При глиалните тумори нарастването на нивата на факторите може да е израз, както на хирургичната редукция на туморната маса и механичното освобождаване в кръвта на голямо количество биологично активни вещества, в това число и растежни фактори, така също и с факта, че резидуалната туморна тъкан е в условията на некроза и хипоксия, които са два от най-силните стимулатори на ангиогенезата.

При менингиомите намаляването на нивата на растежните фактори може да се обясни с радикално отстранената патологична тъкан, която е източник на ангиогенни стимули.

Тези предположения не се подкрепиха със статистически доказателства. Установи се, че при нискостепенните глиоми нивата на VEGF са по-високи отколкото при високостепенните, а би трябвало да е обратно, както потвърждават редица автори (Plate KH et al, 1994; Yao Y et al., 2001; Takano S et al., 1996).

Освен това, постоперативно се получи статистически значимо повишаване на стойностите на двата фактора (трикратно повече на bFGF спрямо VEGF) само при нискостепенните глиоми, докато при високостепенните няма съществена динамика. Това по своята същност не е логично, поради факта, че при повишаване на степента на малигненост се повишава и ангиогенността.

Наблюдаваното спадане на нивата на факторите при контролната група с доброкачествени новообразования не се оказва статистически значимо.

Според нашите резултати можем да обобщим, че съществува динамика преоперативно и постоперативно в плазмената експресия на VEGF и bFGF, при пациенти с мозъчни тумори. Тази динамична промяна може да бъде засечена и отчетена. Поради непропорционалността и нехомогенността на разпределение на резултатите, както и следствие на приложените статистически анализи, става ясно, че нивата на VEGF и bFGF постоперативно не корелират с вида и степента на злокачественост на туморната формация или обема на оперативната интервенция, а по-скоро са израз на физиологична ангиогенеза свързана с оперативната травма и започващите регенерационни процеси на организма. Потвърждаването или отхвърлянето на значението на физиологичната ангиогенеза би било обещаващ обект на бъдещи проучвания. Влиянието на физиологичната ангиогенеза може се намали до минимум, ако например постоперативните проби се събират в по-късен постоперативен период, а не както при сегашното проучване на седмия ден. Това не е непостижимо, защото пробите се събират, чрез венепункция и вземане на кръв, което е лесно достъпна и рутинна манипулация. Не така стоят нещата с изследването на VEGF и bFGF в гръбначно-мозъчната течност.

Цереброспиналната течност заобикаля мозъка и гръбначния мозък и циркулира в мозъчните стомашчета. Малки молекули, соли, пептиди и протеини, съставят физиологичните съставки на ликвора (Yuan and Desiderio, 2005), например концентрацията на протеин, в нормални граници, в ликвора варира между 0.2-0.8mg / мл (Zheng PP et al., 2003). Промени в състава на

церебро-спиналната течност може да насочи към патофизиологични състояния, като инфекции, невродегенеративни заболявания или туморен растеж (Khwaja FW et al., 2006; Zougman A et al., 2008). Поради интимната свързаност на CSF с мозъка и до мозъчните тумори, протеини свързани с GBM могат да достигнат до CSF чрез директна секреция, дифузия или смущения на кръвно-мозъчната бариера (Papadopoulos MC et al., 2001; Schneider SW et al., 2004). Ограничаващ фактор за установяване на ликворни маркери може да бъде начина за достъп до цереброспиналната течност и събирането на пробите. Подходящи са вземане по време на операция, което е неподходящ метод за повтарящи се изследвания, както и чрез външен дренаж или лумбална пункция, които са инвазивни процедури. Освен това, по-голямата част от пациентите с GBM са диагностицирани с пространствозаемащи лезии, които могат да са контраиндицирани за лумбална пункция. Следователно, необходимостта от повторни ликворни изследвания с цел непрекъснат мониторинг може да ограничи широкото използване на ликворните маркери при GBM.

Наличието на ангиогенни фактори при пациенти с мозъчни тумори е демонстрирано от редица автори, които са намерили значително повишени нива на bFGF в гръбначномозъчната течност при пет пациента с мозъчни тумори в сравнение със седем пациента с хидроцефалия и 25 пациента в спешно отделение с други диагнози (Malek AM et al., 1997).

Връзката между неоваскуларизация и нивата на ангиогенните фактори при пациенти с мозъчни тумори е анализирана в няколко проучвания. Shweiki (1992), показва, че в различни видове клетъчни култури, производството на VEGF е значително повишено в присъствието на хипоксемична среда (Shweiki D et al., 1992).

Също така, анализ на мултиформен глиобластом *in situ*, подложен на проби за неоваскуларизация е показал, че производството на VEGF се индуцира особено силно в отделна група глиобластомни клетки, които са близо до некротични или хипоксемични огнища.

Допълнителни доклади са установили, че нивата на VEGF (Samoto K et al., 1995; Plate KH et al., 1992) и bFGF рибонуклеинова киселина (Takahashi JA et al., 1990, 1992) корелира с микросъдовата плътност в мозъка при глиални тумори, като е доказана и връзката между нивата на VEGF в туморен екстракт и микросъдовата плътност (Takano S et al., 1996).

Ангиогенните фактори, не само служат като маркери за съдова плътност, но също така посочват и степента на малигненост на тумора. Открита е количествена връзка между интратуморните нива на bFGF и степента на глиома (Takahashi JA et al., 1992; Zagzag D et al., 1990). Освен това, преживяемостта на пациенти с астроцитни тумори корелира с микросъдовата плътност, вътретуморните нива на VEGF (Zagzag D et al., 1990) и натрупване на ядрен bFGF (Zheng PP et al., 2003; Fukui SN et al., 2003).

Връзката между степента на малигненост на тумора и експресията на ангиогенните фактори в ликвора при възрастни е установена и при деца.

Нивата на bFGF при тях надхвърлят 30 пг/мл в 62% от случаите, което не се установява при контролните групи, съставени от деца страдащи от хидроцефалия или други системни злокачествени заболявания (Li VW et al., 1994). Концентрацията на bFGF в ликвор корелира с плътността на кръвоносните съдове в рамките на образеца на тумора. Въпреки това, времето до рецидив е свързано с плътността на микросъдовете, а не с нивата на bFGF (Li VW et al., 1994).

Нашите резултати разширяват тези наблюдения, след комплексен ангиогенен анализ, включващ серумна и ликворна експресия на VEGF и bFGF, оценка на продължителността на живота, динамично проследяване на серумната експресия-предоперативно и постоперативно. Документирали сме повишени нива на VEGF в цереброспиналната течност при пациенти с Мултиформен глиобластом. Данните показват липса на връзка между серумните нива на

ангиогенни фактори и степента на малигненост на тумора. Едно от възможните обяснения за това наблюдение е, че директната секреция на ангиогенни фактори от тумора е в субарахноидалното пространство, а кръвно-мозъчната бариера служи като филтър и това е в основата на значителния градиент между ликворните и серумните нива на тези фактори. Това предположение се подкрепя от наблюдението, че ликворните нива на ангиогенните фактори при пациенти със системни злокачествени заболявания са ниски, въпреки повишени нива на ангиогенни фактори в серума.

Подобни резултати са отчетени от Takano и сътр. (1996), който открива незначителни серумни нива на VEGF (в сравнение с интратуморните нива) при хора, с диагностицирани различни мозъчни тумори.

Установено е, че нивата на ангиогенните фактори са повишени не само при пациенти с мозъчни тумори, но също така и при нетуморни заболявания, като Моча-моча (Yoshimoto T et al., 1996) и бактериален менингит (van der Flier M et al., 2003).

Следователно, трябва да се внимава при тълкуването на значимостта на повишените ликворни нива на ангиогенни фактори при наличие на допълнителни фактори като инфекция на централната нервна система.

Значимостта на наличието на ангиогенни фактори при мозъчни тумори е изследвана от McDonald TJ, (2001). Мишки инжектирани с човешки мозъчни туморни клетъчни линии на медулобластом и мултиформен глиобластом са третирани с антиангиогенен фактор. Всички третирани мишки са живи на 24-та седмица, докато всички мишки в контролната група, която не получава лечение, загиват в резултат на туморната прогресия. Ударният терапевтичен ефект на антиангиогенният фактор е доказан при хистологичните изследвания на третираната група, където не се установява тумор или е с минимални остатъчни микроскопични размери (McDonald TJ et al., 2001).

VEGF е вече доказан, важен посредник на ангиогенезата, за развитието на злокачествените глиални тумори (Jensen RL, 1998; Chan AS et al., 1998; Chaudhry IH et al., 2001). Анапластичният астроцитом и GBM са високостепенни лезии и се характеризират с увеличаване на клетъчната пролиферация, митотична активност, неоваскуларизация и некроза. Няколко туморни клетъчни линии, включително глиомни клетъчни линии, са проучвани, както *in vivo* така и *in vitro*, за получаване на различни ангиогенни растежни фактори, като например фибробластни растежни фактори, съдов ендотелен растежен фактор/фактор на съдовият пермеабилитет (VEGF/ ДПФ), и получен от тромбоцити растежен фактор (PDGF) (Plate KH et al., 1994). Известно е, че ангиогенезата играе важна роля в растежа на тумора и неговото метастазизиране. VEGF е мощен и високо специфичен ендотелен клетъчен митоген и повишава съдовата пропускливост (Strugar J et al., 1994; Zagzag D et al., 1995). Проучвания на „*in situ*“ хибридазация са показали ясна възходяща регулация на VEGF и РНК активност в злокачествени глиоми, както и това, че нивата на VEGF са постоянно високи в комбинация с малигнен глиом (Weindel K et al., 1994; Plate KH and Risau W, 1995; Stockhammer G et al., 2000; Berkman RA et al., 1993; Abdulrauf SI et al., 1998). Освен това е доказано, че VEGF има сериозна прогностична стойност, когато се измерва в отделена туморната тъкан на пациенти с астроцитом (Yao Y et al., 2000; Takano S et al., 1996). Към днешна дата, множество опити не успяха да съпоставят нивата на VEGF в туморни кисти и туморна тъкан с измерените нива в серум. (Takano S et al., 1996). Това е така, защото нивата на серумния VEGF са силно променливи, което ги прави ненадеждни като туморни маркери. В по-късни проучвания се установява, че VEGF е измерим в ликвора на пациенти с метастазни мозъчни тумори, а също така е и полезен маркер за карциноматозен менингит (Stockhammer G et al., 2000).

Разнопосочните литературни данни, липсата на категоричност, както и на проучвания в по-големи серии пациенти ни накарата да обособим група от пациенти само с Мултиформен глиобластом, при които е изследвана ликворната експресия на VEGF. Изследвани са 74 пациента: 64 новодиагностицирани пациенти и група от 10 здрави доброволци, което е максималният брой, който може да се изследва с един кит за ELISA (налични общо 96 гнезда-останалите 22 броя гнезда са контролни), за да бъде изследването адекватно, обективно и да се извърши едноетапно, за да се изключат възможностите за евентуални грешки, съществуващи не само между китовете на различните фирми производители, но и между китовете на една и съща фирма.

Нашите резултати демонстрират, че VEGF се секретира в церебро-спиналната течност при пациенти с първични злокачествени мозъчни неоплазми и може да бъде отчетен. Нивата на експресия при здрави контроли е на границата на чувствителност на ELISA анализ.

Това е установено и при Prakash S et al., (2004), който сравнява групи пациенти с астроглиални тумори, неастроцитни тумори: първични и вторични и здрави контроли. Те документират статистически по-високи ликворни нива на VEGF при пациенти с малигнени глиоми, в сравнение с неастроцитни тумори, като това потенциално може да бъде полезен маркер за разграничаване на мозъчни метастази от първични мозъчни тумори при пациенти, които имат данни за неизвестна вътречерепна формация. Това е донякъде изненадващо, предвид факта, че метастатичните тумори също експресират високи нива на VEGF и може да отразява уникална физиологична особеност на астроцитомите. Сравнявайки нивата на VEGF и преживяемостта (дни от диагнозата до смъртта) Prakash S et al. (2004), получават корелационен коефициент от 0,05, което предполага, че нивата на VEGF в ликвор нямат прогностична стойност.

Не такива резултати получава Peles E et al., (2004), който изследва 26 пациента: 19 с високостепенни глиоми и 7 с нискостепенни и контролна група от 10 болни с хидроцефалия. Всички пациенти с нискостепенни глиоми и 3 (16%) от 19 пациенти със злокачествен глиоми са живи в края на периода на проследяване. Средната преживяемост на всички пациенти с тумори на мозъка е 651,9 дни (95% , 476.5-827.3 дни). Kaplan-Meier анализите за оценяване показват, че пациентите в групата на високостепенните глиоми, са имали значително по-кратка преживяемост (средна, 495 дни; 95% , 315-676 дни), в сравнение с пациентите с нискостепенни глиоми 908 дни; 95% , 631-1185 дни). Тази разлика е статистически значима (log rank, 4.1; $P < 0.05$).

Резултатите от нашето проучване са сходни, всички наши пациенти са завършили летално и е изчислена средната продължителност на живота. Средната преживяемост в дни на групата на пациентите с високостепенни глиоми е 154,4 дни (st. dev. = 154.9 дни, range 6 – 665 дни).

Прави впечатление, че средната преживяемост е двукратно по-ниска, при почти еднаква максимална преживяемост. Това е следствие на ниския праг на минимална преживяемост, което означава, че една част от нашите пациенти са постъпили за лечение в крайно тежко общо състояние, при започнали необратими мозъчни процеси. Това ни накарата да осъществим редица статистически анализи с цел установяване на математически модел на поведение, както и за минимализиране на отклоненията.

В нашите резултати $R = -0,37$ (Pearson coefficient), това е стойността на корелационния коефициент между VEGF и дните живот. Той показва умерена отрицателна зависимост между тези величини, т.е. нарастването на стойността на фактора ще доведе до умерено намаляване на дните живот. Освен това тъй като броят на изследванията N надхвърля 60, може да се счита, че

този резултат е значим (може да се пренесе за генералната съвкупност). Модела показва, че с вероятност 95% (в 95% от случаите), може да се твърди, че на 100 единици промяна на нивото на VEGF в повечето случаи ще доведе до промяна на дните живот между 7 и 19 дни. Ако се промени с 100 единици в положителна посока, броя на дните трябва да намалява, а ако промяната е отрицателна броя на дните трябва да се увеличава.

Стойността $p = 0.0026$ показва, че модела (при ниво на значимост $p < 0.01$), добре обяснява данните (в над 99% от случаите).

Ако се разгледат само резултатите на мъжете ще се получат съответно стойности (Pearson coefficient $R = -0.32$; $p = 0.053$). Тук модела обяснява данните в над 94% от случаите и коефициента на Pearson е сходен с предходния.

Ако се разгледат резултатите при жените съответните резултати са: Pearson coefficient $R = -0.43$; $p = 0.023$.

Модела обяснява данните в над 97% от случаите и коефициента на Pearson е съизмерим с предходния.

При мъжете се установява слаба отрицателна зависимост, т.е. при нарастване на големината на фактора със 100 единици продължителността на живота намалява в интервала 7-23 дни. Влиянието на фактора върху продължителността на живота е около три пъти по-слабо, в сравнение с това при жените, където зависимостта е умерено до значителна отрицателна.

При жените големината на фактора влияе по-силно на продължителността на живота, отколкото при мъжете. Също така модела е с по-висок процент на значимост отколкото при мъжете. Това означава, че данните при жените са по-устойчиви, докато при мъжете влиянието на случайни (други) фактори върху продължителността на живота е по-голямо.

При много пациенти с ниска стойност на изследвания фактор преживяемостта е в много широки граници, което не може да се обясни само с величината на VEGF.

Това наложи разделянето на основната група на няколко подгрупи с цел уточняване на модела.

Първоначално от анализите се изключиха пациентите с преживяемост под 60 дни. Това са пациенти в тежко общо състояние, с висок Карновски индекс. По този начин се оформи група от 47 пациента.

Втората група се оформи след изключване на пациенти с ниски стойности на VEGF. При изследване на пациенти със стойности на VEGF фактора над 50 пгг./мл. резултатите са подобни. Изследваните пациенти са 24. Коефициента на Пирсън е сходен (-0.24), което означава отново умерена отрицателна зависимост. Регресионният модел показва, че при нарастване на фактора със 100 единици – се наблюдава намаляване на преживяемостта с 0-10 дни.

При изследване на пациенти със стойност на VEGF фактора над 100 пгг./мл. се оказва, че почти нищо не се променя. Изследваните пациенти са 18. Коефициента на Пирсън (-0.19) показва сходна тенденция. Регресионния модел е сходен с предишните.

Групата със стойност на фактора > 200 пгг./мл. се състои от 13 болни. Регресионният модел показва същата тенденция.

Последната група се формира при изключване на най-ниските и най-високите стойности, т.е. при изключване на крайните варианти и хомогенизиране на популацията. При изследване на пациенти със стойности на фактора между 50 и 1000 резултатите са следните: Коефициента на Пирсън (-0.15) се тълкува по сходен начин с горните случаи. Регресионния модел показва подобно изменение на преживяемостта, като при горните, а именно на 100 единици увеличаване на фактора дните живот намаляват с до 20.

Получените резултати при всички направени изследвания (и при 64, и при 47, и при 24, и при 18, и при 20 пациенти) са съпоставими. Коефициента на Пирсън варира в рамките на минус 0.15-0.30, което се тълкува като умерена отрицателна зависимост. Регресионния анализ показва отрицателен тренд, т.е. с увеличаване стойностите на фактора преживяемостта бавно ще намалява (приблизително на 100 единици увеличаване на фактора се очаква намаляване на преживяемостта с 5-25 дни). Според всички резултати модела е значим (t теста на Стюдънт, $p=0.05$). Относително стабилните резултати при промяна на броя на изследваните пациенти показва, че модела е устойчив. Може да се очаква, че и при изследването на по-голяма група пациенти резултатите ще са сходни с получените.

Ангиогенни фактори са анализирани в CSF в относително малки групи пациенти на 15 и 27 пациенти (Jung CS et al., 2011).

В публикацията на Prakash S et al. (2004) пациентите са 66, но само 27 са с диагноза HGG.

Peles E et al. (2004), проучва 26 болни, като само 19 са високостепенни глиоми.

Takahashi JA et al. (1992) - 26 пациента.

Malek AM et al. (1997) - 5 болни с мозъчни тумори.

Li VW et al. (1994) - 26 деца и младежи до 30г.

Поради факта, че в достъпната литература, досега, не бе открито съобщение за проучване с по-значителен брой пациенти, ние оформихме настоящата целева група в обем достатъчен за провеждането на редица статистически анализи, целящи да установят съществува ли статистически значима зависимост между нивата на VEGF и продължителността на живота. В резултат получихме значим и устойчив математически модел, който не само предсказва с голяма вероятност резултатите от евентуални бъдещи проучвания с по-големи групи пациенти, но и ни позволява да екстраполираме математическа формула, чрез която обективно можем да изчислим евентуалната продължителност на живота на пациенти с Мултиформен глиобластом.

$$\text{дни живот} = -0.088 \cdot (\text{стойност на VEGF в ликвор}) + 213$$

Стойностите 0.088 и 213 са коефициенти екстраполирани от регресионния анализ следствие устойчивостта на модела.

Извършен е дисперсионен и корелационен анализ, като е създаден нелинеен математически регресионен модел, на базата на направените измервания. Този модел дава възможност да се определи как се променя продължителността на живота на пациентите според измерената стойност на кръвния фактор и до колко определящо е влиянието му.

Тъй като броят на пациентите надхвърля 60, може да се счита, че този резултат е статистически значим, с ниво на доверие над 95% ($p<0.05$). Сходни на получените резултати могат да се очакват и при изследването на по-голяма група пациенти, т.е. параметрите от регресионния анализ са близки до генералните (тези на генералната съвкупност, които по начало ние не знаем). Относително стабилните резултати при промяна на броя на изследваните пациенти показва, че модела е устойчив и не настъпват значителни промени.

Можем да твърдим, че направените изводи са статистически достоверни и могат да се очакват резултати близки до получените в модела и при изследването на по-голяма група пациенти.

Съвременната медицина все още не може да излекува инфилтративните глиоми, които засягат хора в активна възраст и са с голямо социално значение. Честотата им нараства с повишаване на диагностичните възможности и инструменти. Навременното поставяне на

правилната диагноза, познаването и спазването на показанията за оперативно лечение са ключови фактори за постигането на добри клинични резултати.

Все още липсва доказан, специфичен и надежден туморен маркер, чрез който да се диагностицират мозъчните глиоми, да се мониторира ефекта от приложеното лечение, както и да се определи очакваната продължителност на живота.

Ролята на растежните фактори при физиологичната и патологична ангиогенеза е проучена, но не са изяснени самите механизми детайлно.

Въпреки, че се изискват по-нататъшни изследвания, за да се установи ролята на растежните фактори, нашите резултати показват, все пак, че туморната ангиогенеза и прогресия могат да бъдат свързани с наличието и нивото на ангиогенни фактори в ликвора.

Следователно, нивата на ангиогенния фактор в ликвора могат да послужат като индикатор за туморната ангиогенна активност и могат да помогнат при избора на антиангиогенно терапевтично лечение, определяне на подхода, мониторинг и отговора на приложеното лечение.

Ликворната експресия на VEGF може да се окаже дълго търсеният маркер и настоящото проучване подкрепя оптимистичните изводи на много автори, въпреки че за рутинното му въвеждане в практиката са необходими редица допълнителни проучвания.

VI. ИЗВОДИ

1. От междугруповия анализ на представените мозъчни неоплазми и контролните групи, се установи статистически достоверно увеличена степен на ликворна експресия на VEGF при високостепенни глиални тумори.
2. Установи се отрицателна зависимост между ликворната експресия на VEGF и продължителността на живота при пациенти с мултиформен глиобластом, която е слабо отрицателна при мъжете и три пъти по-изразена при жените, т.е. при жените големината на фактора влияе по-силно на продължителността на живота, отколкото при мъжете.
3. Кръвно-мозъчната бариера е важен фактор в разпределението на VEGF и bFGF в тъканните течности.
4. Плазмената експресия на VEGF и bFGF не корелира с хистологичния вид на тумора, степента на малигненост и продължителността на живота.
5. Плазменият ангиогенен профил, включващ VEGF и bFGF, е лесно достъпен индиректен метод за отразяване на ангиогенезата, но не е приложим при изследваните групи мозъчни неоплазми.
6. Отчетените постоперативно, повишени нива на VEGF и bFGF, не корелират с обема на туморната резекция, вида или степента на малигненост на тумора и най-вероятно са израз на физиологична регенерация индуцирана от оперативната рана.
7. Комплексният подход с прогностична цел при пациентите с глиални мозъчни тумори, включващ ликворна диагностика на VEGF и многофакторна оценка на постоперативното лечение превъзхожда самостоятелното използване на отделни прогностични критерии и фактори.

ВИ. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛНА СТОЙНОСТ

1. За първи път, според достъпната литература, се изследват растежните фактори VEGF и bFGF при пациенти с мозъчни тумори в толкова голяма серия пациенти, даваща статистическа достоверност.
2. За първи път, според достъпната литература, се установява независимото прогностично значение и влиянието на ликворните нива на VEGF върху продължителността на живота.
3. За първи път, според достъпната литература, е създаден регресионен нелинеен математически модел на зависимостта между стойностите на VEGF и продължителността на живота измерена в дни и въз основа на това е изведена формула за определяне на евентуалната продължителност на живота при пациенти с мултиформен глиобластом.
4. За първи път в страната се изследват растежните фактори VEGF и bFGF при пациенти с мозъчни тумори.
5. За първи път в страната е осъществен комплексен ангиогенен анализ, включващ плазмена и ликворна оценка на VEGF и bFGF концентрации при три групи мозъчни тумори и група от здрави пациенти.
6. За първи път в страната се съпоставят концентрациите на VEGF и bFGF при доброкачествени и злокачествени първични мозъчни неоплазми.
7. За първи път в страната се оценява корелацията между експресията на VEGF и bFGF в ликвор и плазма и продължителността на живота.
8. Установи се, че плазмените нива на VEGF и bFGF не дават информация за вида, степента на малигненост на неоплазмата или продължителността на живота.
9. Създадена е анкетна карта за катамнезно проучване.
10. Проведено е целенасочено проучване за установяването на продължителността на живота.
11. Определя се високата прогностична стойност на ликворната експресия на VEGF като евентуален маркер за оценка на очакваната продължителност на живота.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ, НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ И ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Публикации в пълен текст

1. **Ханджиев, Д.,** Г. Кючуков, Я. Енчев, Т. Аврамов, Б. Илиев, Т. Кондев, Пл. Трендафилов, Т. Червенков (2013): Ангиогенеза при глиоми- Status quo. Предварителни резултати на двуфакторно ангиогенезно проучване. Българско дружество по Неврохирургия, Сборник научни трудове, 2013г., стр. 98-102, ISSN 1314-9466
2. **Ханджиев, Д.,** Г. Кючуков, Я. Енчев, Б. Илиев, Т. Кондев, Т. Аврамов, С. Върбанова: Ангиогенеза и злокачествени мозъчни тумори. Същност и механизъм на ангиогенезата. Medical Magazine, 2015, 01, ISSN:1314-9709 .
3. **Deyan Handzhiev,** Georgy Kyuchukov, Yavor Enchev , Toni Avramov, Toni Kondev, Bogomil Iliev, Stanislava Varbanova: Angiogenesis in brain tumors., J IMAB, 2015, 21(1), ISSN 1312 773X (e) in press
4. **D. Handzhiev,** G. Kiuchukov, Y. Enchev, T. Avramov, R. Georgiev, S. Varbanova: Plasma expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) in patients with brain tumors. J IMAB, 2015, 21(1), ISSN 1312 773X (e) in press

2. Научни съобщения

1. **Handzhiev D.,** G. Kiuchukov, T. Avramov, B. Iliev, T. Kondev , Enchev, Y (2013): Expresion of angiogenic factors in serum and cerebrospinal fluid of patients with glial brain tumors- Is it a reliable prognostic marker? 15-th World Congress of Neurosurgery, 8-13.09.2013, Seoul, Korea
2. **Handzhiev D.,** Y. Enchev, T. Avramov, B. Iliev, T. Kondev, G. Kiuchukov, Pl. Trendafilov. (2013): Correlation between expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and life expectancy rate in patient with high grade gliomas. 1-st Congress of Southeast European Neurosurgical Society- SEENS. 31.10-02.11.2013, Belgrade, Serbia
3. Enchev, Y., **D. Handziev,** T. Avramov, B. Iliev, T. Kondev, G. Kiuchukov (2013): Angiogenesis in gliomas and plasma levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF). 3-rd National Conference of Neuro-Oncology with International Participation 16-20.04.2013, Cluj-Napoka, Romania

4. Radoslav Georgiev, Boyan Balev, Marianna Novakova, Deyan Dzhenkov, **Deyan Handzhiev** The Role Of Diffusion And Perfusion Weighted Magnetic Resonance Imaging In Distinguishing Glioblastoma on The Background Of Multiple Sclerosis Lesions Case Report - XX Symposium Neuroradiologicum, 7-12.09.2014, Istambul, Turkey
5. **Handzhiev, D.**; Enchev, Y.; Kiuchukov, G.; Avramov, T.; Kondev, T.; Iliev, B.: How Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor Helps as Managing Glioma Patients Journal of Neurological Surgery Part A: Central European Neurosurgery; Issue S 01, 2014
6. Enchev, Y., **D. Handzhiev**, T. Avramov, B. Iliev, T. Kondev, A. Tonchev, (2013): The value of MicroRNA as prognostic factor in high grade gliomas. 3-rd National Conference of Neuro-Oncology with International Participation 16-20.04.2013, Cluj-Napoka, Romania
7. **Ханджиев, Д.**, Г. Кючуков, Я. Енчев, Т. Аврамов, Б. Илиев, Т. Кондев, Пл. Трендафилов, Т. Червенков (2013): Васкулогенеза, ангиогенеза и артериогенеза. Механизъм на ангиогенеза. XXII Национална конференция по Неврохирургия, 24-26.10.2013г., Велинград, България, постер

1. Научни проекти

Ханджиев, Д., Кючуков, Г., Ангиогенеза при глиални тумори. Степен на експресия на VEGF и bFGF в плазма и ликвор. 2007г. Фонд Медицинска Наука, Медицински Университет – Варна. Максимална априорна и апостериорна оценка.

IX. ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Анкетна карта

Проведена по: Телефон: Среца:

Идентификация на пациент:

Имена:

Информирано съгласие: Да Не

Лъчетерапия: Да Не

Химиотерапия:

Темодал Други Не

Реоперация:

1 2 3 4

Дата на екзитус:

Име на анкетиращ:

Дата:

Подпис:

