Ocena stężeń czynników angiogennych VEGF, VEGFR-2 i VCAM-1 w surowicy krwi kobiet z nowotworami złośliwymi jajnika przed i po menopauzie

The assessment of angiogenic factors VEGF, VEGFR-2 and VCAM-1 in the serum of women with malignant ovarian tumours before and after the menopause

Artur Czekierdowski, Sylwia Czekierdowska

I Katedra i Klinika Akademii Medycznej w Lublinie; kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Jan Kotarski

Przegląd Menopauzalny 2007; 3: 128–133

Streszczenie

Cel pracy: Ocena stężeń wybranych czynników związanych z angiogenezą w surowicy chorych na nowotwory złośliwe jajnika.

Materiał i metody: Badaniami objęto grupę 77 kobiet (43 po menopauzie). Metodą immunoenyzmatyczną ELISA oznaczono stężenia czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF – *vascular endothelial growth factor*), receptora VEGFR-2 (*vascular endothelial growth factor receptor 2*) i śródbłonkowego czynnika adhezji komórek 1 (VCAM-1 – *vascular cell adhesion molecule 1*), stosując zestawy firmy R&D Systems.

Wyniki: Stężenie VEGF i VEGFR-2 było wyższe w grupie kobiet po menopauzie (Z=–1,9; p=0,054 dla VEGF i Z=–1,71; p=0,08 dla VEGFR-2). Stopień zróżnicowania histologicznego i zaawansowania klinicznego choroby nie miał wpływu na stężenie VEGF i jego receptora. Stężenie VCAM-1 nie różniło się istotnie pomiędzy grupami kobiet w zależności od ich statusu menopauzalnego. Najwyższe stężenie VCAM-1 stwierdzono w nisko zróżnicowanych i zaawansowanych klinicznie nowotworach złośliwych (odpowiednio H=10,7; p=0,004 i H=17,4; p=0,0006).

Wnioski: Ocena stężeń VEGF i VEGFR-2 nie jest przydatnym parametrem różnicującym nowotwory złośliwe jajnika. Status menopauzalny może mieć wpływ na poziom rozpuszczalnych form tych czynników. VCAM-1 może być przydatny markerem w różnicowaniu nowotworów, a wzrost stężenia tego polipetydu może być związany ze stopniem zaawansowania klinicznego oraz stopniem zróżnicowania histologicznego guza.

Słowa kluczowe: rak jajnika, cytokiny angiogenne, VCAM-1, VEGF, VEGF-R, status menopauzalny

Summary

Aim: the aim of this study was to evaluate preoperative serum concentrations of selected soluble angiogenic cytokines in women with malignant ovarian tumours.

Material and methods: we investigated clinical and pathological characteristics of 77 women (43 after the menopause) with ovarian cancer and compared the results with VEGF, VEGFR-2 (receptor to VEGF, type 2) and VCAM-1 serum concentrations using the ELISA method and R&D Systems (USA) kits. The differences were compared with chi square test.

Results: Serum concentrations of VEGF and VEGFR-2 were higher in women after menopause (Z=–1.9; p=0.054 for VEGF and Z=–1.71; p=0.08 for VEGFR-2). Neither tumour histological grade nor FIGO clinical stage were related to the measured concentrations of these soluble cytokines. VCAM-1 concentration was not different between the groups of pre- and postmenopausal women. The highest concentrations of VCAM-1 were found in a subgroup of low histological grade and FIGO stage 3-4 tumours and the differences between these women and patients with high grade tumours and/or FIGO stage 1-2 cancers were statistically significant (H=10.7; p=0.004 and H=17.4; p=0.0006, respectively).

Conclusion: Measurements of the soluble forms of VEGF and VEGFR-2 in blood serum are probably not useful in preoperative malignant ovarian tumour management. VCAM-1 concentrations may be of value as an additional marker of ovarian cancer angiogenic characteristics, possibly related to histological grade and clinical stage.

Key words: ovarian cancer, angiogenic cytokines, VEGF, VEGFR, menopausal status

Adres do korespondencji:
dr hab. med. **Artur Czekierdowski** prof. nadzw. AM, I Klinika Ginekologii, Akademia Medyczna, ul Staszica 16, 20-081 Lublin, tel./faks +48 81 532 06 08, e-mail: ginonkol@am.lublin.pl

Wstęp

Wzrost i rozwój nowotworów jajnika zależy w dużym stopniu od powstania sieci naczyń wewnątrz guza w procesie angiogenezy [1]. Proces ten podlega ścisłej kontroli szeregu czynników angiogennych, wśród których śródbłonkowy czynnik wzrostu naczyń (VEGF) pełni kluczową rolę. [2]. Białko to jest silnym mitogenem endoteliocytów, które jednocześnie podtrzymuje ich przeżycie, wpływając na supresję szlaków apoptotycznych. Zwiększa przepuszczalność naczyń, co jest znamienną właściwością naczyń nowotworowych [3]. Wpływa na migrację endoteliocytów, co wiąże się często z powstawaniem przerzutów. Działanie VEGF uwarunkowane jest obecnością odpowiadających mu receptorów VEGFR, należących do grupy kinaz tyrozynowych, występujących na powierzchni komórek śródbłonka małych i dużych naczyń oraz jako wolne cząsteczki w surowicy [4]. Ze względu na swoje unikalne cechy, VEGF oraz jego receptor stanowią obecnie potencjalne białka docelowe do diagnozowania i terapii nowotworów ginekologicznych. Liczne prace dokumentują zwiększoną ekspresję VEGF i jego receptora w nowotworach złośliwych jajnika, co ma kliniczne znaczenie w prognozowaniu przeżycia i dostosowaniu odpowiedniej terapii [5–7].

Istotną rolę w regulacji ekspresji czynników angiogennych pełnią cząsteczki adhezyjne [8, 9]. Związki te mogą stymulować komórki nowotworowe do wytwarzania i uwalniania VEGF, co umożliwia wzrost naczyń krwionośnych w guzach złośliwych [10, 11]. Jednym z takich czynników jest śródbłonkowy czynnik adhezji komórek-1 (VCAM-1). VCAM-1 jest białkiem związanym z błoną komórkową endoteliocytów, lecz może występować w formie rozpuszczalnej w surowicy. W przypadku nowotworów złośliwych stwierdzono, że VCAM-1 produkowany jest w komórkach śródbłonka naczyń nowotworowych, natomiast nie stwierdzono jego obecności w śródbłonku naczyń prawidłowych [12]. Wyniki badań Byrne'a i wsp. [12], przeprowadzonych u pacjentek z rakiem sutka wykazały, że ocena stężenia surowiczej formy VCAM-1 może być przydatnym markerem angiogenezy nowotworowej.

Możliwość oznaczenia stężenia wolnych form czynników związanych bezpośrednio lub pośrednio z angiogenezą w surowicy pacjentek chorych na raka jajnika może być klinicznie przydatna do określenia tempa wzrostu guza, nawrotów i przerzutów u poszczególnych chorych. Celem pracy była ocena przydatności badania stężenia czynników angiogennych VEGF i VEGFR-2 oraz VCAM-1 w surowicy kobiet z nowotworami złośliwymi jajnika przed menopauzą i po menopauzie.

Materiał i metody

Badaniami objęto grupę 77 pacjentek diagnozowanych i operowanych z powodu guzów złośliwych jajnika w I Klinice Ginekologii Operacyjnej Akademii Medycznej w Lublinie w latach 2004–2006.

Z każdą z analizowanych chorych został przeprowadzony dokładny wywiad lekarski, uwzględniający także rodzinne występowanie nowotworów. Odnotowany został wiek, faza cyklu miesiączkowego i status menopauzalny wszystkich pacjentek. Menopauzę zdefiniowano jako wiek, w którym upłynął minimum rok od ostatniego krwawienia, albo u kobiet po histerektomii ukończone 45 lat życia. Weryfikację rodzaju guza jajnika stanowiły wyniki pooperacyjnego badania histopatologicznego. Złośliwe nowotwory jajnika klasyfikowano zgodnie z kryteriami histologicznymi podanymi przez WHO. Stadium zaawansowania klinicznego określano za pomocą kryteriów podanych przez Międzynarodową Federację Ginekologów i Położników. Guzy o granicznej złośliwości i guzy przerzutowe do gonad zakwalifikowano do grupy nowotworów złośliwych jajnika.

Krew pacjentek, pobraną w dniu operacji z żyły odłokciowej pozostawiano w temperaturze pokojowej przez 30–60 min, w celu utworzenia skrzepu. Surowicę odwirowywano przy 2500 rpm przez 20 min, a następnie zamrażano w próbówkach Eppendorfa w temp. –80°C, gdzie były przechowywane do chwili rozpoczęcia wykonywania oznaczeń.

Stężenie rozpuszczalnych form VEGF, VEGFR oraz VCAM-1 w surowicy krwi oznaczano metodą immunoenzymatyczną (ELISA) przy użyciu standardowej 96-dołkowej płytki, stosując zestawy Human sVEGF Immunoassay, Human sVEGFR-2 Immunoassay oraz Human sVCAM-1 Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, USA). Postępowano zgodnie z protokołem podanym przez producenta. Odczytu absorbancji dokonywano we wszystkich przypadkach przy długości fali 450 nm, stosując 8-kanałowy czytnik Mulitscan RC (Labsystems, USA). Stężenia badanych czynników angiogennych wyliczono na podstawie krzywej semilogarytmicznej, uzyskanej ze stężeń standardowych, przy użyciu programu Genesis Life 3,0 (Life Sciences International, USA).

Wyniki badań poddano analizie statystycznej. Z uwagi na skośny rozkład zmiennych, badane parametry oceniano przy pomocy mediany i zakresu zmienności z wyliczeniem 25. i 75. percentyla. Ze względu na brak zgodności z rozkładem normalnym, do wykrycia istotności różnic między cechami niepowiązanymi dla dwóch grup użyto nieparametrycznego testu U Manna-Whitney'a oraz testu kolejności *rang* ANOVA wg Kruskala, w przypadku więcej niż dwóch grup. Przyjęto 5% błąd wnioskowania i związany z nim poziom istotności statystycznej $p<0,05$ wskazujący na istnienie istotnych różnic bądź zależności. Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu Statistica v.6.0 (Statsoft, Polska).

Wyniki

Badana grupa obejmowała 77 chorych z nowotworami złośliwymi przydatków w wieku 24–85 lat (śred-

Tab. I. Charakterystyka kliniczna badanych kobiet z nowotworami złośliwymi jajnika z uwzględnieniem statusu menopauzalnego

		Liczba pacjentek (n=77)	Przed MNP (n=34)	Po MNP (n=43)
rodzaj histologiczny	surowicze	36	17	19
	śluzowe	11	4	7
	endometrialne	5	5	0
	jasnokomórkowe	4	1	3
	przerzutowe	9	5	4
	inne (ziarniszczaki germinalne niezróżnicowane)	12	2	10
stopień zróżnicowania histologicznego	G1	6	3	3
	G2	32	15	17
	G3	39	16	23
stopień zaawansowania klinicznego	I	15	7	8
	II	7	3	4
	III	50	23	27
	IV	5	1	4

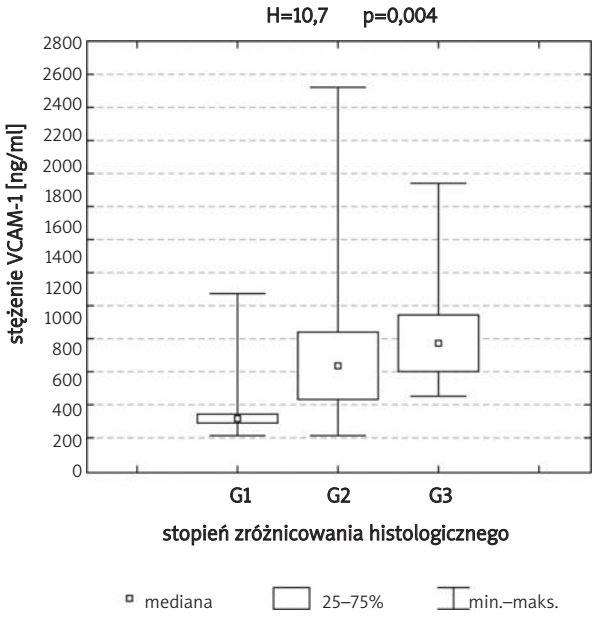
nia 56,01±12,7 lat). W grupie tej 34 (41,5%) kobiety były przed menopauzą, a 43 (58,5%) chorych po menopauzie. W grupie przedmenopauzalnej średnia wieku wyniosła 44,4±7,5 lat, w grupie pomenopauzalnej zaś 64,4±8,3 lat. Charakterystykę kliniczną badanych pacjentek przedstawiono w tab. I.

Mediana stężenia VEGF w grupie kobiet po menopauzie wynosiła 361 pg/ml (zakres 330–670 pg/ml) i była wyższa w porównaniu do grupy kobiet przed menopauzą, gdzie mediana stężenia VEGF w surowicy wynosiła 341 (zakres 184–434 pg/ml). Różnice te były bliskie istotności statystycznej (Z=–1,9; p=0,054) (tab. II). Stopień zaawansowania klinicznego wpływał istotnie (Z=2,0; p=0,04) na stężenie VEGF w surowicy u kobiet przed menopauzą, które było wyższe u kobiet w zaawansowanych stadiach klinicznych choroby, tj. w III i IV stopniu wg FIGO (*International Federation of Gynecology and Obstetrics*), w porównaniu do grupy kobiet w stopniu I i II, i wynosiło odpowiednio 450 ng/ml *vs* 360 pg/ml). Biorąc pod uwagę rodzaj histologiczny guza stwierdzono istotne różnice pomiędzy stężeniem VEGF w grupie raków surowiczych a stężeniem VEGF w rakach śluzowych (Z=–2,42; p=0,01) u kobiet po menopauzie. W grupie kobiet przed menopauzą takich różnic nie odnotowano. Mediana stężenia VEGF w rakach surowiczych wynosiła 247 pg/ml, natomiast w rakach śluzowych 434 pg/ml.

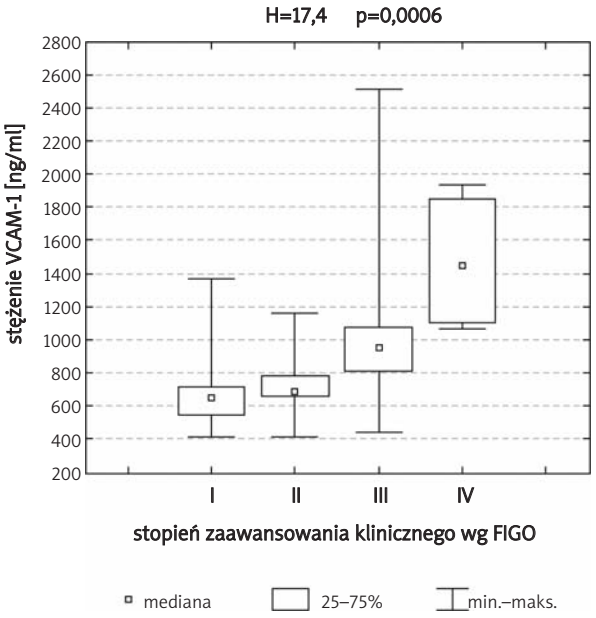
Oceniając stężenie receptora VEGF w surowicy stwierdzono również wyższe wartości u kobiet po menopauzie w porównaniu z grupą przed menopauzą, a mediana stężenia VEGFR wynosiła odpowiednio 9276 pg/ml (zakres 6968–10387 pg/ml) i 8046 pg/ml (6523–9646 pg/ml). Różnice te były bliskie istotności statystycznej (Z=–1,71;

Tab. II. Wskaźniki istotności statystycznej uwzględniające różnice w stężeniach badanych czynników angiogennych w grupach chorych klasyfikowanych w zależności od różnych parametrów klinicznych

	VEGF		VEGFR		VCAM-1	
	przed MNP	po MNP	przed MNP	po MNP	przed MNP	po MNP
stopień zróżnicowania histologicznego G1:G2:G3	H=1,7 p=0,47	H=4,94 p=0,08	H=1,11 p=0,57	H=3,21 p=0,02	H=8,4 p=0,01	H=7,82 p=0,02
stopień zaawansowania klinicznego I i II: III i IV	Z=–2,0 p=0,04	Z=1,2 p=0,21	Z=–1,62 p=0,10	Z=1,17 p=0,23	Z=–2,79 p=0,005	Z=–2,7 p=0,006
rodzaj histologiczny (surowicze: śluzowe)	Z=–0,35 p=0,72	Z=–2,42 p=0,01	Z=0,89 p=0,37	Z=0,4 p=0,64	Z=0,71 p=0,47	Z=–0,2 p=0,83



Ryc. 1. Różnice w stężeniu VCAM-1 w surowicy kobiet chorych z guzami złośliwymi jajnika w zależności od stopnia zróżnicowania histologicznego



Ryc. 2. Różnice w stężeniu VCAM-1 w surowicy kobiet chorych z guzami złośliwymi jajnika w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego wg FIGO

p=0,08) (tab. II). Jedynym czynnikiem, istotnie wpływającym na poziom wolnej formy receptora VEGF, był stopień zróżnicowania histologicznego. Stwierdzono, że w grupie po menopauzie mediana VEGFR wynosiła 7834 pg/ml (6975–1029 pg/ml) w nowotworach wysoko zróżnicowanych i 9508 pg/ml (zakres 6968–10549 pg/ml) w nowotworach nisko zróżnicowanych. Różnice te były statystycznie istotne – H=3,21; p=0,02 (tab. II).

Mediana stężenia VCAM-1 w całej grupie wynosiła 897 ng/ml (zakres 693–1081 ng/ml). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu w zależności od statusu menopauzalnego (Z=–0,98; p=0,32) (tab. II). Stężenie VCAM-1 różniło się istotnie w zależności od stopnia zróżnicowania histologicznego (H=10,7; p=0,004) w badanej grupie chorych i było najwyższe w rakach nisko zróżnicowanych, a najniższe w rakach wysoko zróżnicowanych (967 *vs* 522 ng/ml) (ryc. 1.). Stopień zaawansowania klinicznego wg FIGO miał wpływ na wartości mediany stężenia VCAM-1 w surowicy badanych kobiet (H=17,4 p=0,0006). Najwyższe stężenie VCAM-1 stwierdzono w surowicy krwi kobiet w IV stopniu zaawansowania choroby, przy czym różnice pomiędzy poszczególnymi grupami były wysoce istotne statystycznie (ryc. 2.). Nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniu VCAM-1 w zależności od rodzaju histologicznego guza (tab. II).

Dyskusja

Liczne doniesienia opublikowane w ostatnich latach wskazują, że komórki nowotworowe mogą aktywować śródbłonek naczyń poprzez stymulację cytokinami [2, 4, 9] Aktywacja ta prowadzi do zwiększonej ekspresji czynników angiogennych, takich jak VEGF oraz jego receptorów, co w konsekwencji prowadzi do indukcji neoangiogenezy. Najnowsze badania Wanga i wsp. [13] wskazują, że VEGF, za pośrednictwem VEGFR, wpływa na inwazję i migrację komórek nowotworowych raka jajnika poprzez aktywację metaloproteinaz macierzy. Uzyskane wyniki pozwalają autorom niniejszej pracy stwierdzić, że stężenie VEGF oraz jego receptora różni się u kobiet chorych na nowotwory złośliwe jajnika w zależności od ich statusu menopauzalnego. Prawdopodobnie nie tylko obecność rozrostu nowotworowego może wpływać na podwyższone stężenie VEGF, lecz również obecność lub brak hormonów steroidowych produkowanych przez jajniki. W przeprowadzonym badaniu stopień zaawansowania klinicznego choroby nie miał istotnego wpływu na stężenie VEGF i jego receptora w grupie kobiet po menopauzie, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami [6, 7,]. Co ciekawe, w przypadku grupy kobiet przed menopauzą zależność stężenia VEGF od stopnia zaawansowania klinicznego była statystycznie istotna. Prawdopodobnie VEGF działa stale na wszystkich etapach rozrostu nowotworowego. Podobnie jak Tempfer i wsp. [14], autorzy prezentowanego badania stwierdzili wyraźnie podwyższone stężenia VEGF i VEGFR w rakach nisko zróżnicowanych (G3), co może sugerować, że VEGF i jego receptor mogą być wskaźnikami aktywności proliferacyjnej komórek nowotworowych.

VEGF powoduje ekspresję molekuł adhezyjnych śródbłonka, m.in. VCAM-1 w endoteliocytach [11]. Przeprowadzone badania potwierdziły i poszerzyły informacje

na temat przydatności diagnostycznej oznaczania w surowicy krwi stężenia VCAM-1. W analizowanej grupie chorych nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniu tej cytokiny w zależności od statusu menopauzalnego. Najwyższe stężenie VCAM-1 stwierdzono w surowicy krwi chorych z guzami nisko zróżnicowanymi oraz w zaawansowanych stadiach klinicznych raka jajnika (ryc. 1.–2.). Uzyskane wyniki są zgodne z danymi przedstawionymi przez Qiao i Wanga [15], którzy badali stężenia VCAM-1 w surowicy chorych z guzami złośliwymi i niezłośliwymi jajnika oraz u kobiet zdrowych. Autorzy stwierdzili istotnie wyższe stężenia cytokiny w nowotworach złośliwych w porównaniu z guzami niezłośliwymi i z grupą kontrolną. Jednocześnie stwierdzono pozytywną korelację pomiędzy stężeniem VCAM-1 i stopniem zaawansowania klinicznego oraz brak zależności pomiędzy stężeniem VCAM-1 a histologicznym rodzajem guza.

W badaniach nad ekspresją cząsteczek adhezyjnych w komórkach nowotworowych raka sutka Fox i wsp. [16] stwierdzili, że synteza VCAM-1 ma miejsce w komórkach śródbłonka naczyń nowotworowych, natomiast nie stwierdzono jego obecności w śródbłonku naczyń prawidłowych. Interesujący jest fakt, że ekspresję VCAM-1 stwierdzono również w komórkach nowotworowych guza sutka. Guerero-Esteo i wsp. [17] wysunęli hipotezę zakładającą, że VCAM-1 związany jest z ligandem określanym jako VLA4, co powoduje nie tylko aktywację komórek śródbłonkowych, lecz prowadzi również do złuszczania się komórek nowotworowych i w konsekwencji do naciekania przyległych tkanek. Byrne i wsp. [12] zasugerowali, że VCAM-1 syntetyzowany jest w endoteliocytach pod wpływem stymulacji VEGF. Cytowani autorzy wykazali, że u kobiet we wczesnym stadium zaawansowania raka sutka stężenie VCAM-1 było dodatnio skorelowane z gęstością mikronaczyń w guzie ($p<0,001$). U kobiet z wczesną wznową, stężenie VCAM-1 było wyższe w porównaniu do kobiet, u których wznowa nie wystąpiła ($p=0,01$). Wzrost stężenia badanego białka miał miejsce w przypadku pacjentek z progresją choroby, natomiast w przypadku kobiet bez progresji stężenie VCAM-1 było stabilne lub nawet zmalało w sposób istotny ($p<0,001$). Autorzy zasugerowali, że omawiana cząsteczka adhezyjna śródbłonka może być potencjalnym markerem angiogenezy w raku sutka. Badania Dinga i wsp. [18], przeprowadzone u chorych z rakiem żołądka wykazały, że obecność VCAM-1 w tkance nowotworowej związana była z istotnie wyższą gęstością mikronaczyń w porównaniu z tkanką, w której nie obserwowano ekspresji VCAM-1. Wyniki te sugerują, że synteza VCAM-1 może być jednym z czynników biorących udział w aktywacji angiogenezy. Autorzy stwierdzili ponadto istotną statystycznie korelację pomiędzy stężeniem VCAM-1 w surowicy a ekspresją tego białka w zmianie nowotworowej. Stopień zaawansowania klinicznego oraz występowanie przerzutów odległych były skorelowane ze stężeniem VCAM-1 w surowicy chorych. Kolejne badania potwierdziły przydatność oznaczania stężenia VCAM-1 w innych rodzajach nowotworów [19–21].

Immunohistochemiczna ocena ekspresji VCAM-1 w tkance nowotworowej oraz porównanie jej ze stężeniem tego białka w surowicy krwi chorych mogą dodatkowo potwierdzić, czy rzeczywiście VCAM-1 pochodzi z komórek śródbłonka naczyń nowotworowych.

Stężenie rozpuszczalnych form tych czynników prawdopodobnie nie zależy od stopnia zróżnicowania zaawansowania nowotworu. Status menopauzalny może mieć wpływ na stężenie czynników VEGF i VEGFR, dlatego ich ocena nie jest przydatnym parametrem różnicującym nowotwory złośliwe jajnika. Uzyskane wyniki badań VCAM-1 w surowicy kobiet z nowotworami złośliwymi jajnika wskazują, że wzrost stężenia polipetydu może być związany ze stopniem zaawansowania klinicznego oraz stopniem zróżnicowania histologicznego guza. Marker ten może być stosunkowo szybko i łatwo oznaczony, a wynik jest prosty w interpretacji. Z wymienionych względów wydaje się, że cytokina ta może być przydatna jako potencjalny biomarker w monitorowaniu wyników leczenia chorych na raka jajnika.

Dzięki włączeniu danych histochemicznych oraz oceny stężenia wybranych czynników modulujących angiogenezę do stosowanych obecnie modeli prognostycznych, prawdopodobnie możliwe będzie wyeliminowanie znacznej części błędów powstających przy określaniu prawdopodobieństwa wystąpienia oporności na cytostatyki, nawrotu choroby lub zgonu chorej na raka jajnika. Może się to z kolei przyczynić się do zapewnienia celowanej i indywidualizowanej dla poszczególnych chorych terapii.

Wniosek

Badanie stężenia rozpuszczalnej formy cytokiny VCAM-1 może być dodatkowym czynnikiem przydatnym w przedoperacyjnej ocenie angiogenezy nowotworowej w złośliwych guzach jajnika. Stężenia VEGF i VEGFR prawdopodobnie nie są pomocne w ocenie charakteru angiogennego guzów jajnikowych. Status menopauzalny może mieć wpływ na poziom rozpuszczalnych form śródbłonkowego czynnika wzrostu i jego receptora.

Piśmiennictwo

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med 1971; 285: 1182-6.
2. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, et al. Vascular specific growth factors and blood vessel formation. Nature 2000; 407: 242-8.
3. Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis Curr Top Microbiol Immunol 1999; 237: 97-132.
4. Ferrara N. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. Curr Opin Biotechnol 2000; 11: 617-24.
5. Orre M, Rogers PA. VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, microvessel density and endothelial cell proliferation in tumours of the ovary. Int J Cancer 1999; 84: 101-8.
6. Tanir HM, Ozalp S, Yalcin OT, et al. Preoperative serum vascular endothelial growth factor (VEGF) in ovarian masses. Eur J Gynaecol Oncol 2003; 24: 271-4.

7. Artini PG, Cristello F, Monti M, et al. Vascular endothelial growth factor and its soluble receptor in ovarian pathology. Gynecol Endocrinol 2005; 21: 50-6.
8. Ohene-Abuakwa Y, Pignatelli M. Adhesion molecules as diagnostic tools in tumor pathology. Int J Surg Pathol 2000; 8: 191-200.
9. Byrne GJ, Bundred NJ. Surrogate markers of tumoral angiogenesis. Int J Biol Markers 2000; 15: 334-9.
10. Osborn L, Hession C, Tizard R, et al. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. Cell 1989; 59: 1203-11.
11. Pigott R, Dillon LP, Hemingway IH, Gearing AJ. Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 1992; 187: 584-9.
12. Byrne GJ, Ghellal A, Iddon J, et al. Serum soluble vascular cell adhesion molecule-1: role as a surrogate marker of angiogenesis. J Natl Cancer Inst 2000; 92: 1329-36.
13. Wang FQ, So J, Reierstad S, Fishman DA. Vascular endothelial growth factor-regulated ovarian cancer invasion and migration involves expression and activation of matrix metalloproteinases. Int J Cancer 2006; 118: 879-88.
14. Tempfer C, Obermair A, Hefler L, et al. Vascular endothelial growth factor serum concentrations in ovarian cancer. Obstet Gynecol 1998; 92: 360-3.
15. Qiao XM, Wang ZM. Significance of concentration of serum soluble vascular cell adhesion molecule-1 in epithelial ovarian carcinoma. Ai Zheng 2004; 23: 81-4.
16. Fox SB, Turner GD, Leek RD, et al. The prognostic value of quantitative angiogenesis in breast cancer and role of adhesion molecule expression in tumor endothelium. Breast Cancer Res Treat 1995; 36: 219-26.
17. Guerrero-Esteo M, Ruiz-Velasco N, Munoz M, Teixido J. Role of two conserved glycine residues in the beta-propeller domain of the integrin alpha4 subunit in VLA-4 conformation and function. FEBS Lett 1998; 429: 123-8.
18. Ding YB, Chen GY, Xia JG, et al. Association of VCAM-1 overexpression with oncogenesis, tumor angiogenesis and metastasis of gastric carcinoma. World J Gastroenterol 2003; 9: 1409-14.
19. Alexiou D, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, et al. Serum levels of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in colorectal cancer patients: correlations with clinicopathological features, patient survival and tumour surgery. Eur J Cancer 2001; 37: 2392-7.
20. Giannoulis K, Angouridaki C, Fountzilas G, et al. Serum concentrations of soluble ICAM-1 and VCAM-1 in patients with colorectal cancer. Clinical implications. Tech Coloproctol 2004; 8: 65-7.
21. Czekierdowski A, Czekierdowska S, Stachowicz N, et al. Serum vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) concentration and 3D sonographic assessment of intratumoral blood flow in women with endometrial cancer. Pol J Environ Stud 2005; 14: 483-7.