



### **Središnja medicinska knjižnica**

Radončić, Erden (2006) *Čimbenik rasta vaskularnog endotela i posteljični čimbenik rasta u serumu i folikulinskoj tekućini pacijentica podvrgnutih izvantjelesnoj oplodnji*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/185>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

Erden Radončić

**Čimbenik rasta vaskularnog endotela i  
posteljični čimbenik rasta u serumu i  
folikulinskoj tekućini pacijentica  
podvrgnutih izvantjelesnoj oplodnji**

DISERTACIJA

Zagreb, 2006

Disertacija je izrađena u Poliklinici «Vili», te laboratoriju Klinike za ženske bolesti i porode Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u sklopu istraživačkog projekta «Biokemijske i molekularne metode dijagnostike u asistiranoj reprodukciji».

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Ernest Suchanek.

Zahvaljujem:

Dr. sc. Koraljki Đurić Huderer, za laboratorijski dio izrade rada.

Dr. sc. Zdenku Sonickom, za statističku obradu podataka

Plivi Hrvatska d.o.o. za financijsku potporu disertacije

## SADRŽAJ

	Popis kratica .....	5
1.0	<b>Uvod</b> .....	6
1.1	<b>Vaskularni endotelni faktori rasta u reproduktivnoj biologiji</b> .....	7
	Angiogeneza .....	7
	Struktura, kemizam i opće osobine VEGF-a .....	8
	Struktura, kemizam i opće osobine PlGF-a .....	9
	Receptori za VEGF obitelj vaskularnih čimbenika .....	10
	Topivi oblici .....	11
	VEGF receptor-3 (VEGFR-3) .....	11
	Drugi receptori za VEGF obitelj proteina .....	13
	Tie-1 i Tie-2 receptori - struktura, ekspresija i funkcija .....	13
1.2	<b>Biološki učinci VEGF-a i PlGF u humanoј reprodukciji</b> .....	13
	Biološki učinci VEGF-a u fiziološkim uvjetima .....	13
	Hipofiza .....	13
	Uloga VEGF-a u fiziologiji jajnika .....	14
	Folikulinska faza i ovulacija .....	14
	Luteinska faza: .....	15
	VEGF u fiziologiji endometrija .....	16
	VEGF i ishod izvanjske oplodnje .....	20
	Patofiziološka stanja jajnika povezana s VEGF-om .....	20
	Sindrom policističnih jajnika (PCOS) .....	20
	Sindrom ovarijske hiperstimulacije (OHSS) .....	21
	Endometrioza .....	22
1.3	<b>Biološka funkcija PlGF-a</b> .....	23
	PlGF u blastocisti, implantaciji i trudnoći .....	23
	Funkcija PlGF izvan trudnoće .....	25
	Sinergizam i interakcija između angiogeničnih čimbenika; potencijalne terapijske implikacije PlGF-a .....	26
2.0	<b>Ciljevi istraživanja</b> .....	29
2.1	<b>Materijali i metode</b> .....	29
	Ispitanice i plan istraživanja .....	29
	Kontrolirana ovarijska hiperstimulacija .....	30
	Izdvajanje uzoraka za određivanje VEGF-a i PlGF-a .....	32
	Laboratorijsko određivanje VEGF-a i PlGF-a .....	32
	Određivanje ostalih hormonskih parametara u serumu i folikulinskoj tekućini .....	33
	Statističke metode .....	33
3.0	<b>Rezultati</b> .....	34
4.0	<b>Rasprava</b> .....	45
5.0	<b>Zaključci</b> .....	55
6.0	<b>Sažetak</b> .....	56
6.1	<b>Summary</b> .....	58
7.0	<b>Životopis</b> .....	60
8.0	<b>Popis literature</b> .....	61

## Popis kratica

Kratica	Engleski naziv	Hrvatski naziv
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>	Analiza varijance
ART(MPO)	<i>Assisted reproductive technologies</i>	Metode potpomognute reprodukcije
BMI	<i>Body mass index, weight (kg) / height<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>)</i>	Indeks tjelesne mase (u kg/cm)
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>	Fibroblastični čimbenik rasta
CC	<i>Clomiphene citrate</i>	Klimifen citrat
CI	<i>Confidence interval</i>	Interval pouzdanosti
E <sub>2</sub>	<i>Oestradiol</i>	Estradiol
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>	Epidermalni čimbenik rasta
ESHRE	<i>European Society of Human Reproduction and Embryology</i>	Europska udruga za humanu reprodukciju i embriologiju
ET	<i>Embryo transfer</i>	Embriotransfer
FSH	<i>Follicle-stimulating hormone</i>	Folikulostimulirajući hormon
GC	<i>Granulosa cell</i>	Stanice granuloze
GnRH	<i>Gonadotrophin-releasing hormone</i>	Gonadotropin oslobađajući hormon
hCG	<i>Human chorionic gonadotrophin</i>	Humani korionski gonadotropin
rhCG®	<i>Recombinant hCG</i>	Rekombinantni humani korionski gonadotropin
hMG	<i>Human menopausal gonadotrophin</i>	Humani menopauzalni gonadotropin
IVF	<i>In vitro fertilization</i>	Oplodnja <i>in vitro</i>
LH	<i>Luteinizing hormone</i>	Luteinizirajući hormon
OHSS	<i>Ovarian hyperstimulation syndrome</i>	Sindrom ovarijske hiperstimulacije
OR	<i>Odds ratio</i>	Omjeri šansi
PCOS	<i>Polycystic ovary syndrome</i>	Sindrom policističnih jajnika
TGF	<i>Transforming growth factor</i>	Transformirajući čimbenik rasta
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>	Čimbenik rasta vaskularnog endotela
PIGF	<i>Placental growth factor</i>	Placentarni čimbenik rasta

## 1.0 Uvod

Tek je odnedavna prihvaćena činjenica da je neovaskularizacija temeljna biološka pojava neohodna za normalnu funkciju reproduktivnog sustava u svih sisavaca, uključujući i ljude. Povećano zanimanje bioloških znanosti za angiogenezu na tragu je otkrića brojnih visokospecifičnih angiogeničnih tvari i njihovih receptora za koje se vjeruje da imaju ključnu ulogu u inicijaciji i regulaciji angiogeneze (Tablica 1).

VEGF (od engl. *vascular endothelial growth factor*) obitelj vaskuloendoteličnih proteina obuhvaća više glikoproteina međusobno slične građe, a pripisuje im se osobito značajna uloga u angiogenezi tijekom reproduktivnog razdoblja. Vaskularni endotelni faktor rasta i placentarni faktor rasta (PIGF, od engl. *placental growth factor*) dva su najčešće spominjana i istraživana proteina VEGF obitelji. Brojne su studije koje su pokazale nesumnjivi značaj VEGF-a u fiziološkoj i patološkoj angiogenezi reproduktivnog sustava žene. S druge strane, broj radova koji razjašnjavaju ulogu PIGF-a ograničen je prije svega na trudnoću, dok mu je funkcija izvan nje slabije poznata.

Poremećaji regulacijskih mehanizama angiogeneze suodgovorni su za brojna klinička stanja, poput anovulacije i neplodnosti, ali mogu sudjelovati i u pojavi spontanih pobačaja, nekih reumatskih bolesti, te rastu i širenju benignih i malignih novotvorina. S tog stanovišta potencijalna mogućnost manipuliranja angiogeničnih procesa primamljiva je alternativa u liječenju, pri čemu je inhibicija rasta i metastaziranje solidih tumora vjerojatno najprimamljiviji, mada ne i jedini cilj.

Namjera ovog rada je pokušaj rasvjetljavanja fiziološke uloge PIGF-a tijekom kontrolirane ovarijske hiperstimulacije u normogonadotropnih žena, te u najranijem postkonceptivskom razdoblju.

## 1.1 Vaskularni endotelni faktori rasta u reprodukcijskoj biologiji

### Angiogeneza

Stvaranje novih krvnih žila sastoji se iz dvije faze: rana (embrionalna) faza označena je kao vaskulogeneza, dok je kasnija (adultna) faza poznata kao angiogeneza. Vaskulogeneza obuhvaća stvaranje primarne kapilarne mreže iz hemangioblasta, prekursora mezodermalnog porijekla, nizom sljedstvenih stadija diferencijacije, proliferacije i koalescencije<sup>1</sup>.

Angiogeneza označava stvaranje novih kapilara iz već postojećih žila putem remodeliranja primarnog kompleksa koji na koncu završava diferencijacijom u arteriolu ili venulu<sup>1,2</sup>. Vaskulogeneza je primarno proces rane embriogeneze, dok je angiogeneza nerazdvojiva s vaskulogenezom i neohodna za fiziološki rast i sazrijevanja tkiva, kako tijekom prenatalnog, tako i u postnatalnom životu jedinke. Angiogenezu potiču upala, cijeljenje rana, imunološki mehanizmi te neoplazije, a sastavni je dio i metastaziranja malignih novotvorina<sup>3-5</sup>.

**Tablica 1. Lista najvažnijih aktivatora i inhibitora angiogeneze\***

Regulatori angiogeneze	
Aktivatori	Inhibitori
Fibroblastni faktori (bazični FGF, kiseli FGF)	Trombospondin
Endotelni faktor rasta trombocitnog porijekla (PD-ECGF)	Trombocitni faktor IV
Epidermalni faktor rasta (EGF)/Transformirajući faktor rasta- $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )	Faktor nekroze tumora- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )
Transformirajući faktor rasta- $\beta$ (TGF- $\beta$ )	Transformirajući faktor rasta- $\beta$ (TGF- $\beta$ )
Faktor nekroze tumora- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	Interferoni
Angiogenin	Angiostatini
VEGF/VPF	Inhibitori $\alpha v\beta 3$ integrina
	Prolaktin 16-kD

\* Prilagođeno prema referenci: 9

## Struktura, kemizam i opće osobine VEGF-a

VEGF obitelj angiopoetskih medijatora obuhvaća skupinu međusobno sličnih tvari s jakim angiogenetskim učinkom koji uključuju VEGF (ili VEGF-A), PlGF, te u novije vrijeme definirani VEGF –B, –C i –D<sup>6</sup>.

Gen za humani VEGF lociran je na kromosomu 6p21.3 a čine ga osam eksona i sedam introna. Sekvenca proteina kodirana eksonima 1-5 sadrži konformacijske informacije važne za prepoznavanje i vezanje receptora, dok su eksoni 6 i 7 važni za domenu koja veže heparin (tzv. heparin-binding domene, HBD)<sup>7,8</sup>. Prijepis gena za VEGF-a pozitivno je reguliran tkivnom i lokalnom hipoksijom te aktivacijom različitim onkogenima<sup>10</sup>. Stvoreni je protein nakon prijepisa eksona podložan daljnjim posttranskripcijskim modifikacijama. Alternativnim spajanjem (engl: alternative splicing) različitih dijelova sintetiziranih dijelova lanaca stvara se nekoliko postranskripcijskih varijanti VEGF-a. Do sada su opisani lanci duljine 121, 165, 189 i 206 aminokiselina, od kojih svaki ima specifični eksonski dodatak. VEGF<sub>165</sub> dominantan je oblik stvorenog proteina koji se može dokazati u gotovo svim tkivima, dok je VEGF<sub>206</sub> najrjeđi i opisan jedino u fetalnoj jetri čovjeka<sup>11,12</sup>. U novije vrijeme dokazano je i postojanje varijanti lanaca od 145 i 183 aminokiseline. Sva tri oblika u C-terminalnom dijelu sadrže domenu koja veže nepolarne spojeve poput heparina, a koja ima važnu ulogu u interakciji VEGF–liganda i odgovarajućeg staničnog receptora<sup>13</sup>. Posljednjih godina klonirani su i opisani novi članovi VEGF-B, -C i –D. Njihova funkcija i regulacija stvaranja još uvijek je nejasna, a prema prvim podacima svi se bitno razlikuju od VEGF-A<sup>14,15</sup>.

Najznačajnija osobina VEGF-A u odnosu na sve druge članove iste obitelji je pojačana produkcija stvaranja u uvjetima hipoksije<sup>16</sup>. Regulacija odgovora na hipoksiju na molekularnoj razini relativno je kompleksna, a uključuje međudjelovanje onkogeno (najčešće H-ras), nekoliko transmembranskih protein-kinaza (poput receptora za epidermalni faktor rasta), te skupinu pomoćnih transkripcijskih čimbenika povezanim s hipoksijom, poput hif-1 $\alpha$  i



hif-2 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1- $\alpha$  i 2- $\alpha$ )<sup>17</sup>. Oba čimbenika ovise o količini parcijalnog kisika, pri čemu ih normoksija vrlo brzo enzimski razgrađuje, a hipoksija stabilizira i prolongira aktivnost. Jednom aktivirani hif-1 $\alpha$  ili hif-2 $\alpha$  veže se za VEGF promotor/enhancer, a nakon stvaranja kompleksa s nuklearnim translokatorom, čija je nazočnost također neophodna. Navedeni mehanizam je predominantni regulacijski put sinteze VEGF-a, a on je istodobno odgovoran i za ushodnu regulaciju stvaranja gotovog proteina VEGF-a<sup>18</sup>.

### **Struktura, kemizam i opće osobine PIGF-a**

Placentarni faktor rasta (PIGF) po strukturi je glikoprotein od 149 aminokiselina izvorno kloniran iz komplementarne DNK (cDNK) zrele posteljice<sup>19</sup>. S obzirom na 53% identičnog aminokiselinskog slijeda s VEGF-om, i on se ubraja u VEGF obitelj angiogeničnih čimbenika rasta. Svi članovi VEGF skupine sadrže 8 cisteinskih ostataka odgovornih za disulfidne veze unutar samog lanca, po čemu su slični A i B lancima čimbenika rasta trombocitnog porijekla (PDGF)<sup>19,20</sup>.

Alternativnim spajanjem lanaca, nastaju najmanje tri do sada opisana monomera humanog PIGF-a: varijante od 149 (PIGF-1) i od 170 (PIGF-2) aminokiselina razlikuju se samo po dodatku od 21 aminokiseline (HBD), koji - slično VEGF-u – može vezati nepolarne molekule poput heparina, a igra važnu ulogu u interakciji ligand-receptor<sup>21</sup>. Treći, najduži oblik (PIGF-3) sadrži umetak od 72 aminokiselina u blizini C-terminalnog dijela PIGF-1, ali se o njemu za sada najmanje zna. Prolazna ekspresija PIGF-3 cDNA u stanicama sisavaca vodi stvaranju i sekreciji kako dimera, tako i monomera PIGF-3.

Gen koji kodira PIGF lociran je na ljudskom kromosomu 14q24-q31. Prirodno stvoreni i secernirani PIGF/VEGF heterodimeri otkriveni su u supernatantu različitih tumorskih staničnih linija. Inaktivacija PIGF gena ne dovodi do smrti embrija čak i kada se radi o homozigotnom obliku, jer pokusne životinje s dvostruko negativnim alelom (PIGF -/- miševi) normalno preživljavaju i

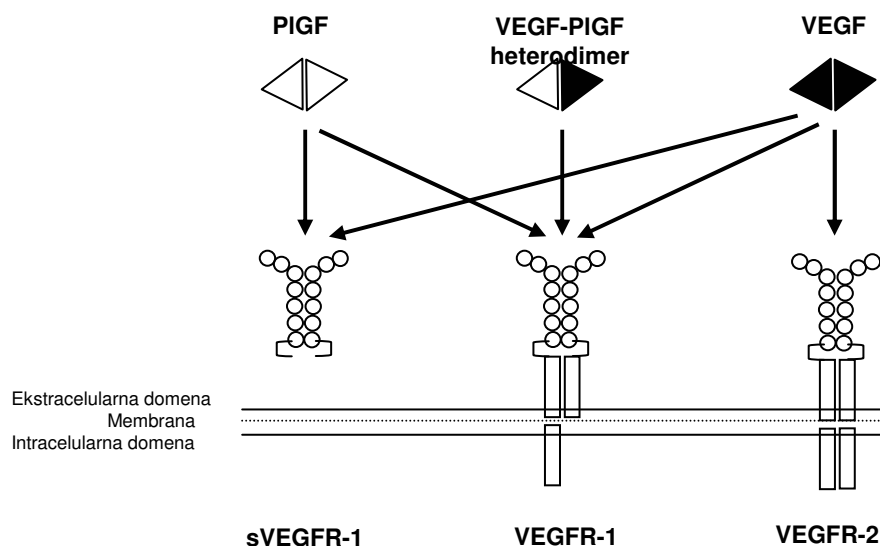
zadržavaju reproduksijsku sposobnost, mada mogu imati poremećeno ili usporeno cijeljenje rana. Blokada interakcije PlGF i odgovarajućeg receptora anti-Flt antitijelima smanjuje stvaranje aterosklerotičnih plakova, inhibira angiogenezu, ali i priječi mobilizaciju progenitora mijeloidne loze iz koštane srži<sup>22</sup>. U tkivima koja stvaraju mRNK oba čimbenika rasta, osim homodimera, može se dokazati i postojanje heterodimera VEGF/PlGF proteina<sup>22,23</sup>.

### **Receptori za VEGF obitelj vaskularnih čimbenika.**

Članovi VEGF obitelji angiogeničnih čimbenika rasta vežu se za najmanje tri različita receptora klasificiranih kao VEGFR-1, -2 i -3, svi redom tirozin-kinaznog ustroja. Nakon vezanja odgovarajućeg liganda, sva tri receptora najprije dimeriziraju, a cijeli proces završava fosforilacijom tirozina i aktivacijom odgovarajućih učinaka. VEGFR-1 (Flt-1) opisan je 1990; osim VEGF-a, ovaj 180kD težak receptor također veže i PlGF i VEGF-B, iako s puno slabijim afinitetom<sup>24,25</sup>. VEGFR-2 (KDR, Flk-1) vrlo je sličan strukturi VEGFR-1<sup>26</sup>. Naziv Flk-1 koristi se uglavnom za mišji analog, a radi se o glikoproteinu nešto većeg lanca za koji se veže VEGF-A ali i kraći oblik VEGF-C<sup>27</sup>. Pokusi na laboratorijskim životinjama potvrđuju specifičnu distribuciju oba receptora za vaskularni endotel u svim tkivima. Osim u odrasloj dobi, oba su dokazana i u posteljici te glatkom mišićju maternice.

Hipoksija povećava ekspresiju VEGFR-1 ali ne i VEGFR-2<sup>28</sup>. Null-mutacija VEGFR-1 i VEGFR-2 letalna je za mišji embrij u pravilu oko 8,5-9,5 dana gestacije<sup>29</sup>. Nedostatak samo VEGFR-1 vodi poremećaju organizacije endotelnih stanica unatoč urednom razvoju tubularnog kardiovaskularnog sustava a nedostatak VEGFR-2 -s druge strane- dovodi do potpunog nedostatka endotelnih stanica i teškom oštećenju ustrojstva KVS-a<sup>30</sup>.

**Slika 1.** Shematski prikaz afiniteta VEGF, PlGF i njihovog heterodimera za odgovarajuće receptore. VEGFR-1 i -2 =Vaskularni endotelni faktor rasta; sVEGFR-1=topivi (solubilni) VEGFR-1.



### Topivi oblici

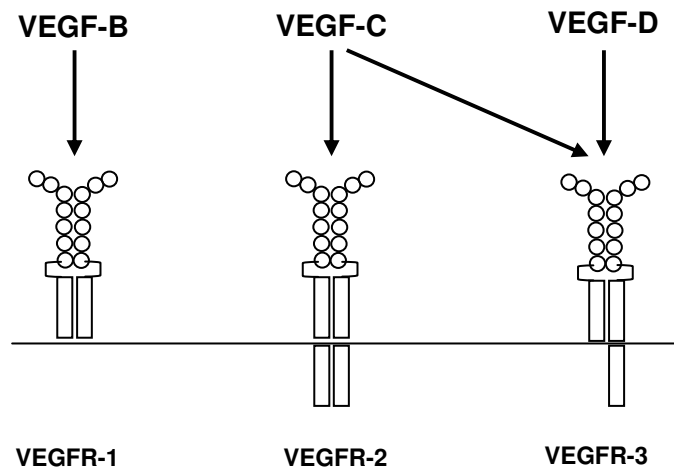
Osim membranskog receptora, *in vivo* je također dokazano postojanje i kraćeg, secernirajućeg oblika VEGFR-1 (sVEGFR-1), kojeg čini samo ekstraselularna domena bez transmembranskog i intracelularnog dijela lanca. Topivi oblik VEGFR-2 (sVEGFR-2) također postoji i opisan je nedavno; on veže cirkulirajući VEGF, no za razliku od s VEGFR-1 ne priječi mitogeno djelovanje VEGF molekule<sup>31</sup>.

### VEGF receptor-3 (VEGFR-3)

VEGFR-3, ili Flt-4, receptor je koji veže novije opisane VEGF-C i VEGF-D. Oblik s kraćim lancem također je dokazan, ali je dulji oblik dominantan u svim ispitivanim tkivima. Tijekom rane embriogeneze, VEGFR-3 se najprije pojavljuje u vaskularnom i limfatičnom endotelu, no kako dalje teče diferencijacija tkiva, sve je više ograničen na limfatički sustav. Delecija gena

za VEGFR-3 vodi smrti miša *in utero* nakon 10 dana gestacije, s dominantnim poremećajem razvoja velikih krvnih žila<sup>32</sup>. (Slika 2).

**Slika 2.** Shematski prikaz afiniteta VEGF-B, -C i -D za odgovarajuće receptore VEGFR-1, -2 i -3.



## **Drugi receptori za VEGF obitelj proteina**

### **Tie-1 i Tie-2 receptori - struktura, ekspresija i funkcija**

Ovo je još jedna skupina receptora koja čini se ima važnu ulogu u reproduktivnom sustavu, a nazvani su Tie-1 i Tie-2. Prvi je sličan epidermalnom faktoru rasta, dok je Tie-2 (ili *tek*, tunica interna endothelial cell-kinase) slabije poznat. Tijekom embriogeneze, Tie-1 i Tie-2 se pojavljuju nakon VEGFR-1 i VEGFR-2, ali i prije nego von Willebrandt-ovog čimbenika (F-VIII), koji se općenito smatra markerom konačno diferencirane i zrele endotelne stanice<sup>33</sup>. U miševa s nedostatkom Tie-1 učestala je pojava degenerativnih promjena u miokardu, a u Tie-2 deficijenciji - edem i krvarenje u istom<sup>34</sup>.

Ekspresija Tie-1 pojačana je u fiziološkoj i patološkoj angiogenezi, poput sazrijevanja folikula u jajniku, tijekom procesa cijeljenja rane i angiogeneza koja prati tumore<sup>35</sup>. Ligand Tie-2 je angiopoetin-1 a otkriven je 1996; ligand za receptor Tie-1 za sada još nedefiniran, mada ima izvješća o nekoliko potencijalnih kandidata<sup>36</sup>.

## **1.2 Biološki učinci VEGF-a i PLGF u humanoj reprodukciji**

### **Biološki učinci VEGF-a u fiziološkim uvjetima**

#### **Hipofiza**

Hiperprolaktinemija mijenja hipotalamo-hipofizno-ovarijalnu koordinaciju dovodeći do anovulacije, amenoreje i neplodnosti, a trajno povišene vrijednosti prolaktina mogu biti odgovorne i za ponavljane spontane pobačaje. Još su sredinom 80-tih godina prošlog stoljeća Elias and Weiner<sup>37</sup> pretpostavili da je angiogeneza neophodna za nastanak i rast novotvorina hipofize koje stvaraju prolaktin (adenomi) u pojedinim laboratorijskih životinja. Tumori prednjeg

režnja hipofize pojedinih sojeva štakora stvaraju novu arterijsku mrežu krvnih žila koje premošćuju postojeći portalni sustav opskrbe, te tako zaobilaze dopaminergičku inhibiciju sekrecije prolaktina. Koncem 1990-tih Banerjee i sur.<sup>38</sup> ekspresiju VEGF-a i odgovarajućeg receptora u prednjem režnju hipofize štakora dovode u vezu s razvojem prolaktinoma, a nešto kasnije slična studija dokazala je ekspresiju VEGF-a i u hipofizi ovce<sup>39</sup>. Na temelju ovakvih nalaza vjeruje se da VEGF također igra važnu ulogu i u humanoj patologiji, za što djelomično potkrijeplju i radiološki te elektronsko – mikroskopski provedene studije u adenomima ali ne i u hipofiza posve zdravih osoba<sup>40</sup>.

## **Uloga VEGF-a u fiziologiji jajnika**

### **Folikulinska faza i ovulacija**

Rast, selekcija i sazrijevanje folikula do ovulacije, stvaranja žutog tijela i njegova regresija tijekom menstruacijskog ciklusa nerazdvojivi su s cikličkom proliferacijom i regresijom novih krvnih žila<sup>41</sup>.

Primarni folikuli već na početku svoga rasta stvaraju inicijalnu vaskularnu mrežu koju čine 1-2 arteriole koje završavaju s kompliciranijom prstastom kapilarnom mrežom nalik vijencu. S napredovanjem rasta, tekalni dio vaskularne mreže, postavlja se nasuprot bazalne membrane koja odvaja avaskularni sloj sastavljen od granuloza stanica i sve jače prokrvljene teke. U skladu s morfološkim promjenama, granuloza stanice primordijalnih i primarnih folikula negativne su na imunohistokemijsko bojanje na VEGF, dok je u preantralnim folikulima, a kasnije i tijekom čitavog procesa folikulogeneze, VEGF slabio pozitivan. Nasuprot granulozi, stanice teka interne rastućeg folikula intenzivno se boje nakon primjene obilježenih antitijela na VEGF, što je u izravnoj vezi s paralelnim nalazom nuklearnog staničnog antigena za VEGF<sup>42</sup>.

Postoje pretpostavke da je proces selekcije dominantnog folikula ovisan o nejednakom stvaranju upravo ove potpore, koju čini bogata vaskularna mreža i njena povećana propusnost oko dominantnog folikula. Razlika u distribuciji VEGF-a tijekom folikulinske faze ciklusa na tragu je tih pretpostavki, tim više što se parakrino stvaranje i sekrecija u folikulima čija je konačna sudbina atrezija, ne može dokazati<sup>43</sup>.

Stvaranje velikih količina VEGF-a u vrijeme ovulacije i ranoj luteinskoj fazi, u vezi je s razinom progesterona u ovulirajućem folikulu i LH u serumu<sup>44</sup>. Odmah nakon početnog skoka LH, bazalna membrana koja odvaja sada već izrazitu vaskularnu teku od još uvijek avaskularne granuloze, postupno degenerira, a iz teka-staničnog sloja započinje vrlo intenzivno umnažanje i uraštanje guste kapilarne mreže prema središtu ovulacijskog folikula. Laitinen i sur<sup>45</sup>. su uz pomoć PCR-reverzibilne transkriptaze (RT-PCR) u kultiviranim granulosa-luteinskim stanicama jajnika pokazali da je u tim stanicama najčešći oblik stvorenog VEGF-a onaj od 145 aminokiselina, (VEGF<sub>145</sub>), dok su Ferrara i sur.<sup>46</sup> utvrdili je VEGF<sub>145</sub> zapravo najvažniji angiogeni faktor rasta foliklinsko-luteinske tranzicije. Primjena topivog VEGFR-2 koji za posljedicu ima smanjenu bioaktivnost VEGF-a za posljedicu ima potpunu supresiju stvaranja žutog tijela.

Brza invazija kapilara završava u potpunosti oko trećeg dana nakon ovulacije. Čini se da je biološka uloga ovako kompleksne kapilarne mreže oko preovulacijskog folikula od iznimne važnosti prije svega za dopremanje velike količine lipoproteina neophodnih za sintezu progesterona od strane novostvorenog žutog tijela, ali i za eventualno kasnije održavanje rane trudnoće<sup>47</sup>.

### **Luteinska faza:**

Nakon ovulacije, granulosa stanice u sklopu žutog tijela sadrže VEGF jedino u njegovoj ranoj fazi, sugerirajući dalje usku povezanost njegove produkcije s nazočnošću LH/hCG-a u serumu. Primjena antagonista VEGF (Flt-1 receptora)

u ovoj fazi ciklusa izaziva potpunu supresiju angiogeneze u jatrogeno potaknutoj ovulaciji laboratorijskih životinja, a time i inhibiciju formiranja žutog tijela, produkciju progesterona i posljedični izostanak maturacije endometrija<sup>48,49</sup>. Nasuprot rane, u kasnoj fazi žutog tijela prema većini istraživanja ne mogu se dokazati niti mVEGF transkripti, niti imunoreaktivni VEGF što je u skladu s morfološkim promjenama kapilarnih struktura čim započne propadanje žutog tijela<sup>50</sup>. Tijekom luteolize ipak nema potpune vaskularne regresije jednom stvorenih krvnih žila, iako nema niti daljnjeg napredovanja u njihovom stvaranju. Prema nekim izvješćima, funkcionalna kapilarna mreža slična onoj u atretičnom folikulu tijekom selekcije dominantnog folikula postoji čak i u degeneriranom žutom tijelu, no ona ne mora nužno biti u vezi s VEGF-om<sup>41</sup>.

### **VEGF u fiziologiji endometrija**

Ciklički proces ljuštenja i regeneracije endometrija povlače za sobom snažne promjene u rastu i remodeliranju vakularnog sustava uterusa<sup>51,52</sup>.

Na temelju morfoloških studija, u endometriju se tijekom menstruacijskog ciklusa mogu razlučiti najmanje četiri razdoblja kada je angiogeneza iznimno aktivna.

- tijekom menstruacije, kada započinje popravak (reparacija) raskinutih krvnih žila
- tijekom proliferacijske faze, kada intezivan rast endometrija prati i odgovarajuća vaskularna potpora
- u sekrecijskoj fazi, s razvojem spiralnih arteriola koje daju bogatu subepitelnu kapilarnu mrežu
- u premenstruacijskoj fazi, kada započinje vaskularna regresija



Odstupanja i poremećaji u bilo kojoj navedenoj fazi, može voditi brojnim nepravilnostima funkcije endometrija, uključujući i klinički najčešći poremećaj menometroragiju.

Angiogenezu tijekom proliferacijske faze odlikuje uglavnom elongacija preegzistentnih krvnih žila<sup>53</sup>.

U sekrecijskoj fazi, intususcepcija je glavni mehanizam koji doprinosi grananju kapilara; proliferacija endotelnih stanica unutar ovih žila ultimativno vodi proširivanju njihovog lumena katkada podijeljenog transkapilarnim poprečnim pregradama, koje kasnije mogu rezultirati podijelom ili fuzijom tako stvorenih žila. Iako je najjače izražena u kasnoj menstruacijskoj i ranoj/srednjoj proliferacijskoj fazi, proliferacija endotelnih stanica kontinuirani je proces koji se može dokazati tijekom čitavog menstruacijskog ciklusa<sup>54</sup>. Stoga se rast krvožilja nastavlja i u sekrecijskoj fazi unatoč činjenici da je okolno endometrijsko tkivo već prestalo rasti, što vodi izraženom vijuganju spiralnih arteriola.

Opisane morfološke promjene endometrija i remodeliranje krvnih žila pod kontrolom su fine mreže signalnih tvari i receptora koju čine pripadnici obitelji VEGF, FGF angiopoetina, angiogenina i efrina, te odgovarajućih receptora – koji se također i u endometriju mogu dokazati kao slobodne i kao membranske ligand-vežuće domene. Opisani su i drugi angiogeni faktori čije se prostorna i vremenska pojava poklapa s morfološkim promjenama endometrija tijekom ciklusa, no njihova je uloga nepoznata<sup>55</sup>.

Članovi VEGF obitelji i najmanje dva VEGFR receptora (VEGFR-1 i -2) čine se vrlo važnim za angiogenezu endometrija. VEGFR-1 pri tome ima važniju ulogu u posredovanju proliferacije endotelnih stanica, a VEGFR-1 čini se primarno regulira kapilarnu propusnost<sup>56</sup>. Distribucija oba receptora u stromalnim i epitelnim stanicama odnosno dilatiranim kapilarama najjača su potvrda njihove važnosti.

Ekspresija funkcionalnog VEGF-a može se dokazati u žljezdanim epitelnim i stromalnim stanicama proliferacijskog endometrija, najvjerojatnije potaknut

rastućim estradiolom. VEGF kojega stvaraju imunokompetentne stanice u dodiru s endotelom (neutrofili i mononuklearne stanice bijele loze) također stimuliraju rast kapilara, a slično je i s NK-stanicama (engl. Natural Killer) koje se intenzivnije počinju nakupljati neporedno nakon ovulacije. U sekrecijskoj fazi, VEGF se može dokazati i na površini epitelnih stanica, za kojeg se vjeruje da se kasnije aktivno secernira i u materničnu šupljinu. Vjeruje se da VEGF porijekla iz NK stanica ima važnu ulogu u stvaranju subendometralne i subepitelijalne kapilarne mreže tijekom sekrecijske faze. Nakon ovulacije uočljiva je promjena izoformi VEGF koja se očituje u pojavi VEGF<sub>189</sub> u perivaskularnim stromalnim stanicama. Njegova je uloga čini se u pojačanju permeabilnog učinka VEGFR-1, a produkt koji nastaje nakon djelovanja plazminogen aktivatora (PA) ima snažno mitogeno djelovanje<sup>57</sup>.

Najveća razina VEGF nađene su tijekom menstruacijske faze, vjerojatno kao odgovor na brojne inflamacijske citokine, ali i na lokalnu hipoksiju<sup>58</sup>.

Slično je i s oba funkcionalna receptora zbog čega se zapravo i vjeruje da je intenzivno remodeliranje i reparacija oštećenih krvnih žila primarni uzrok povećanja svih čimbenika<sup>59</sup>.

Vrlo je malo jasnih dokaza oko toga kada i kako točno započinje stvaranje novih endometralnih krvnih žila. Najočitiiji kandidati koji bi poticali angiogenezu endometrija jesu hormoni jajnika i žutog tijela, no sam mehanizam regulacije stvaranja VEGF-a putem estrogena, progesterona te njihovih do sada poznatih antagonista još uvijek je predmetom rasprave<sup>60</sup>. U tumačenju mehanizama endometrijske angiogeneze dvije činjenice se svakako moraju uzeti u obzir:

1. Proliferirajuće endotelne stanice uvijek se nalaze pored već postojećih krvnih žila, a vrlo rijetko ili nikad u obliku primarnih nakupina povezanih s *de novo* stvaranjem vaskularne mreže. To je bitno drukčije od sličnog procesa u preovulacijskom folikulu i jajniku, gdje imunohistokemijska istraživanja potvrđuju da je upravo *de novo* stvaranje krvnih žila daleko češći mehanizam.

2. U ljudi, endotelne stanice same po sebi ne reagiraju izravno na stimulaciju estrogenima ili progesteronom. Dodavanje različitih polipeptidnih čimbenika rasta kultiviranim stanicama snažno potiču regulaciju, proliferaciju i diferencijaciju stanica parakrinim i autokrinim mehanizmima.

Razina mRNA za VEGF raste počevši od sredine proliferacijske pa sve do sekrecijske faze endometrija. I mRNA i secernirani VEGF-protein mogu se dokazati u stanicama žljezdanog epitela ali i u stromalnom odjeljku<sup>61</sup>. *In vitro* ekspresiju VEGF-a od strane stanica humanog endometrija potiče estradiol, medroksi-progesteron acetat (MPA) ili MPA u kombinaciji s estradiolom i čini se da se odvija na nuklearnoj razini<sup>62</sup>. Pretpostavka koja je danas na snazi smatra da estradiol primarno aktivira transkripciju gena za VEGF u luminalnom epitelu, dok progesteron najvjerojatnije potiče ekspresiju VEGF gena u stromalnom dijelu endometrija<sup>63</sup>. Ta se pretpostavka temelji ponajprije na zapažanju da se tijekom estrusnog ciklusa u štakora, VEGF mRNA predominantno može dokazati u luminalnom epitelu endometrija u vrijeme proestrusa (kada je omjer estradiol: progesteron najveći), dok je u stromalnom odjeljku bojanje na VEGF najjače tijekom faze estrusa i diestrusa, kada je progesteron dominantan hormon jajnika. Slično, u menstruacijskoj i proliferacijskoj fazi ciklusa u primata, koncentracija i VEGF mRNA i gotovog proteina najveća je u epitelu, dok su stromalne stanice uglavnom difuzno pozitivne tek u sekrecijskoj fazi<sup>64</sup>. Tijekom ovulacijskog ciklusa, VEGF mRNA i gotov protein stvaraju se razasuto u različitim dijelovima endometrijskog tkiva<sup>65</sup>.

Navedena zapažanja sugeriraju da bi poremećaji u regulaciji endometrijske angiogeneze u velikoj mjeri mogli biti odgovorni za različita disfunkcijska stanja endometrija poput krvarenja ili nekih vrsta hiperplazija, ali i onih koja nastaju kao nuspojave adjuvantnog liječenja. Tako su Hyder i sur<sup>66</sup> pokazali da i relativno kratkotrajna primjena antiestrogena poput tamoksifena, može potaknuti ekspresiju VEGF putem svoje genuine parcijalne agonističke

aktivnosti, što u određenim stanjima može objasniti i poznate nuspojave SERM-ova na endometriju i miometriju. Stoga bi bolje razumijevanje vaskularne mreže endometrija i razvoj terapijskih tvari koje mogu poticati ili inhibirati regulatore endometrijske angiogeneze moglo pružiti osnovu za racionalnije liječenje kliničkih stanja poput endometrioze, disfunkcijskih krvarenja, hiperplazije/karcinoma endometrija, te nepravilnih krvarenja u korisnica oralnih kontraceptiva (OK) ili hormonskog nadomjestnog liječenja (HNL).

### **VEGF i ishod izvantjelesne oplodnje**

Podaci o povezanosti stope uspješnosti u IVFu i stvaranju VEGF-a u serumu, folikulinskoj tekućini i u granulosa stanicama za sada su oprečni. Dok Doldi i sur<sup>67</sup>. nalaze pozitivnu korelaciju između stope uspješnosti postupaka izvantjelesne oplodnje i ekspresije glasnike RNA za VEGF u stanicama granulose dobivene nakon aspiracije jajnih stanica, Friedman i sur<sup>68</sup>. izvješćuju da je povišena koncentracija VEGF-a u folikulinskoj tekućini združena s manjom vjerojatnošću o uspješnom IVF postupku. Ta se povezanost prije svega odnosi na prijevremenu luteinizaciju što povećava stvaranje velikih količina VEGF-a i negativno djelovanje na implantacijski prozor. Drugi autori su našli da je količina stvorenog VEGF-a tijekom kontrolirane ovarijske hiperstimulacije u uskoj vezi s s kronološkom dobi pacijentice, te da visoke doze primjenjenih gonadotropina mogu također izazvati povećano stvaranje VEGF, iako je značaj tih nalaza ostao nejasan<sup>69</sup>. Do danas, međutim, nema radova koji bi uključivali i istraživanje moguće uloge PlGF-a u izvantjelesnoj oplodnji.

### **Patofiziološka stanja jajnika povezana s VEGF-om**

#### **Sindrom policističnih jajnika (PCOS)**

Kako je već naglašeno, ovariji u žena koje pate od kroničnih hiperandrogenih anovulacija (sindroma policističnih jajnika, PCOS) stvaraju veću količinu

VEGF-a u usporedbi s ženama s urednim ovulacijskim ciklusima<sup>70</sup>. U njih se također mogu dokazati i više serumske koncentracije VEGF-a, te veće brzine stromalnih protoka krvi dobivene Dopplerskim mjerenjima<sup>71</sup>.

Glavnina stvorenog VEGF-a u PCOS potječe iz hipertekozne strome i folikula žena koji pate od tog sindroma čije granuloza i teka stanice sadrže visoke količine VEGF-a tijekom čitavog ciklusa. S obzirom na postojeće dokaze da je LH jedan od važnih modulatora stvaranja VEGF-a, trajno visoke vrijednosti VEGF-a u pacijentica s PCOS također su odraz toničnog povećanja LH koji je čest pratilac poremećaja<sup>72</sup>.

### **Sindrom ovarijske hiperstimulacije (OHSS)**

Sindrom ovarijske hiperstimulacije (OHSS) potencijalno je po život opasno stanje koje nastaje kao posljedica preosjetljivosti na stimulaciju gonadotropinima i osobito luteinizirajućim dozama LH/HCG-a. Glavna patofiziološka značajka sindroma je masivna ekstravaskularna transudacija s posljedičnom intravaskularnom hipovolemijom i hemokonzentracijom. Gubitak tekućine u trećem prostoru postupno dovodi do vitalne ugroženosti, kardijalnog aresta i sklonosti trombotičkim epizodama. Težina sindroma je veća ukoliko nastupi trudnoća, a samo stanje može se gotovo potpuno izbjeći ukoliko se odgodi ili posve izbjegne davanje HCG-a, što vodi spontanoj regresiji folikula<sup>73-75</sup>.

Od svih istraživanih kandidata uključenih u patofiziologiji OHSS-a, VEGF ima središnju ulogu u razvoju ovog poremećaja. VEGF receptor je danas prepoznat kao glavna angiogena tvar odgovorana za povećanu kapilarnu propusnost koja vodi ekstravazaciji tekućine bogatoj proteinima, i sljedstveni razvoj OHSS-a. S druge strane, VEGF potiče proliferaciju endotelnih stanica i angiogenezu *in vivo* i također pojačava kapilarnu propusnost<sup>76-78</sup>.

Razina VEGF-a u folikulinskoj tekućini žena podvrgnutih kontroliranoj ovarijskoj hiperstimulaciji (KOH) u korelaciji je s brojem aspiriranih oocita. Primjena ove folikulinske tekućine u zdravih životinja dovodi do klinički

prepoznatljivog OHSS-a koji se može blokirati davanjem anti-VEGF antitijela<sup>78</sup>. Ova je studija snažan argument koji dokazuje da je VEGF faktor koji je odgovoran za povećanu vaskularnu permeabilnost, te samim tim ima aktivnu ulogu u razvoju kliničkog OHSS-a. Slično, u više je studija dokazan dramatičan porast serumskih vrijednosti VEGF-a nakon primjene hCG-a što je izravan dokaz o regulaciji stvaranja VEGF-a putem hCG/LH u luteiniziranim granulosa stanicama<sup>79,80</sup>. U stvari, kvantitativni porast serumskog VEGF-a dobar je biljeg za razvoj OHSS-a s obzirom da serumska razina korelira s težinom kliničke slike OHSS-a<sup>81</sup>. Ovdje ipak treba napomenuti da postoje i izvješća koja hipotezu o VEGF-u kao najznačajnijem medijatoru OHSS-a nisu uspjeli potvrditi ili su našli i dodatne čimbenike koji mogu jednako tako utjecati na to stanje<sup>82-84</sup>.

## **Endometrioza**

Endometrioza je patološko stanje za koje se vjeruje da angiogenetske tvari mogu imati važnu ulogu u širenju i (p)održavanju bolesti. Usađivanje odljuštenih dijelova endometrija u peritoneju i stvaranje novih krvnih žila od vitalne je važnosti za preživljavanje implantata i daljnje širenje procesa<sup>85</sup>. Eutopični žljezdani epitel endometrija u žena s endometriozom iskazuje značajno veću razinu VEGF-a tijekom kasne sekrecijske faze nego endometrijem zdravih žena. To bi značilo da fragmenti implantiranog endometrija na neki način mogu potaknuti stvaranje novih krvnih žila što nije slučaj u žena koje nemaju endometriozu<sup>86</sup>. U tom smislu zanimljivo je i opažanje da je razina VEGF-a značajno niža u grupi s tzv. „crnim“ nego s „crvenim“ žarištima u usporedbi s normalnim eutopičnom sluznicom. Ipak, u obje podgrupe, apsolutne vrijednosti VEGF-a su slične, što govori u prilog tezi da endometrioza najvjerojatnije počinje iz primarnih peritonealnih žarišta koja nastaju retrogradnom menstruacijom, te da se crvena žarišta mogu smatrati primarnim žarištima na koje se kasnije nadovezuje upalna reakcija, ožiljne promjene, te taloženje hemosiderina i pretvaranje u tipična tamna, odnosno „crna“ žarišta. I zaista, niže vrijednosti oba angiogenična čimbenika (VEGF i

PlGF) dokazane u „crnim“ žarištima, objašnjavaju smanjenu vaskularizaciju na koju se postupno nadovezuje fibroza<sup>87</sup>. Peritonealna tekućina u bolesnica s umjerenim ili teškom stupnjem bolesti sadrži više VEGF-a u usporedbi s blagim oblikom bolesti ili zdravim ženama<sup>88</sup>.

### **1.3 Biološka funkcija PlGF-a**

#### **PlGF u blastocisti, implantaciji i trudnoći**

Razvoj embrija u sisavaca i ljudi ovisan je o vaskularizaciji posteljice. U fiziološkim uvjetima tkivo posteljice stvara velike količine PlGF, i to predominantno njegov dulji oblik laca (PlGF-2), u količini koja nadmašuje VEGF.

Tijekom embrionalnog razvoja u miša, mRNK za PlGF se može dokazati samo u ekstraembrionalnim tkivima; PlGF-protein nazočan je u vilusnom trofoblastu, dok je VEGF unutar korionske ploče nazočan u stanicama mezenhimalnog porijekla. Prirodne ili umjetno izazvane mutacije gena za angiogenične čimbenike rasta i/ili njihovih receptora vodi potpunom izostanku diferencijacije posteljične vaskularizacije i smrću embrija, a s neznatnim razlikama slično je i u viših sisavaca<sup>89, 90</sup>.

U rhesus majmuna, implantacija blastociste počinje 8-9 dana nakon ovulacije, uraštanjem polarnih stanica sinciotrofoblasta u luminalni epitel. Ovaj je proces -bar što se tiče morfološkog opisa- vrlo sličan onome koji se odvija u ljudi. Unatoč uobičajenoj distribuciji VEGF receptora samo na endotelne stanice, ekstravilozni trofoblast humane posteljice posjeduje oba glavna receptora za VEGF (VEGF-1 i-2) čija aktivacija vodi intenzivnom umnažanju trofoblastnih stanica. Šestog do dvanaestog dana nakon koncepcije, intaktne kapilare okružuju sinciotrofoblast, pri čemu stvaraju kapilarne pleksuse koji u doticaju s lakunama sinciotrofoblasta stvaraju jednostavan vaskularni sustav koji okružuje i opskrbljuje embrij<sup>91,92</sup>.

Postoji uska povezanost između stadija razvoja embrija i zrelosti vaskularne mreže korionskih resica, koja se očituje putem prostorne i vremenske ekspresije pojedinih vaskulogeničnih čimbenika<sup>93</sup>. U lakunarnom stadiju, ekspresija VEGF-a dokazana je u citotrofoblastnim stanicama koje oblažu ekstraembrionalnu šupljinu, i slabije u velikim trofoblastnim stanicama koje čine trofoblastnu ploču. U to vrijeme, PlGF-a gotovo i da nema u citotrofoblastu koji oblaže ekstraembrionalnu šupljinu<sup>94</sup>. S napredovanjem trudnoće stanice citotrofoblasta koje oblažu viluse i intervilozne prostore postaju pozitivne za oba čimbenika, za razliku od ekstraviloznih stanica trofoblasta koje i dalje ostaju negativne ili s vrlo slabom ekspresijom kako za VEGF, tako i za PlGF<sup>95</sup>. U amniju, korionu vilusnim stromalnim stanicama mogu se dokazati oba proteina te njihova odgovarajuća mRNA<sup>96</sup>.

Proces trofoblastne invazije u spiralne arterije koji zatim slijedi, također je pod kontrolom vaskularnih čimbenika rasta ali i hipoksije<sup>97</sup>. U tom trenutku dovršen je i proces epitelno-endotelne konverzije te s time i konačna diferencijacija endotelnih stanica posteljice<sup>98</sup>. Regulacija invazivnosti najvjerojatnije je autokrini, s obzirom da trofoblastne stanice posjeduju odgovarajuće receptore ali i sposobnost stvaranja i secerniranja VEGF i PlGF proteina<sup>99</sup>.

Odstupanje ili poremećaj angiogeneze u ranom stadiju trudnoće za posljedice ima nepotpunu trofoblastnu invaziju i smanjenu vaskularnu podršku, a kasnije i kliničke komplikacije u trudnoći, poput preeklampsije i intrauterinog zastoja u rastu ploda (IUGR, intrauterine growth restriction). U trudnoći koja je predodređena za razvoj preeklampsije, vrijednosti cirkulirajućeg VEGF-a više su u usporedbi s nekomplikiranim trudnoćama<sup>100,101</sup>. Nasuprot tome, trudnoće koje će kasnije razviti preeklampsiju i/ili IUGR u prosjeku sadrže niže cirkulirajuće vrijednosti PlGF, a razlika postoji i s obzirom na paritet. Te dodatne razlike u skladu su s dugo poznatim činjenicama da je svaka naredna trudnoća na neki način protektivna za razvoj ove vrste komplikacija<sup>102</sup>.

Posteljica stvara i velike količine topivih oblika receptora za PlGF i VEGF. Pokusno injiciranje topivog receptora sFlt1/sVEGFR-1 dobivenog iz seruma



preeklampsične trudnice u inače zdravih skotnih laboratorijskih životinja dovodi do pojave hipertenzije, masivne proteinurije i promjena na bubrezima u smislu glomerularne endotelioze<sup>103</sup>.

Ta su zapažanja dovela do brojnih kliničkih istraživanja koja potvrđuju da paralelno određivanje PlGF i Flt-receptora u ranoj trudnoći može biti od pomoći u ranom probiru trudnica sklonih preeklampsiji<sup>104</sup>.

Unatoč brojnim poznatim detaljima o regulaciji angiogeneze u trudnoći i dalje je nepoznanica što pokreće stvaranje angiogeničnih čimbenika u posteljici. Nasuprot tvrdnjama da je hipoksija posteljice najvažniji poticaj za povećanu ekspresiju VEGF-a i PlGF-a, nije zanemariv broj studija koje govore suprotno, pa kontroverza oko ovog važnog biološkog pitanja još nije razriješena<sup>105</sup>. Dodatnoj nejasnoći doprinosi i slabo poznat međusobni odnos PlGF-a i VEGF-a koji se tek posljednjih godina počinje uzimati u obzir. U nekoliko provedenih studija postavljena je teza da je PlGF na neki način primarno regulator ekspresije i aktivnosti VEGF-a u patološkim, a da je sam VEGF značajniji u fiziološkim uvjetima. Kako bi se razjasnila kontradikcija između prikupljenih dokaza i razumjele kliničke implikacije dobivenih spoznaja, neohodna su daljnja istraživanja na ovom području<sup>106, 107</sup>.

### **Funkcija PlGF izvan trudnoće**

Puno je manje podataka o funkciji PlGF-a izvan trudnoće. Na temelju predkliničkih istraživanja posljednjih godina, vjeruje se da je PlGF i odgovarajući receptor daleko važniji i utjecajniji u patološkim nego u fiziološkim uvjetima.

Ekspresija PlGF-proteina dokazana je u endotelnim stanicama, epitelnim stanicama te u stanicama različitih vrsta tumora<sup>108</sup>. Imunohistokemijska istraživanja u ljudi dokazala su najintenzivniju ekspresiju PlGF-a u vaskulosincicijskoj membrani te velikim krvnim žilama, a vrlo male količine dokazane su u štitnjači, miokardu, mozgu i skeletnoj muskulaturi. PlGF mRNA se može dokazati i u kultiviranim stanicama humanog endotela (HUVEC i sl.)

ali i različitih trofoblastnih tumora poput koriokarcinomskih staničnih linija JAR i JEG-3, te hepatomu<sup>109</sup>.

Postoje značajna neslaganja u pogledu biološkog značaja, regulacije produkcije i uloge PIGF-a izvan trudnoće. Dok je izravna *in vitro* mitogena aktivnost pokazana za, primjerice, endotelne stanice teleće pulmonalne arterije, dodatak proteina drugim kulturama (poput ACCE ili HUVE) nema izravan mitogeni ili permeabilni učinak sam po sebi, već samo uz nazočnost VEGF-a u test sustavu<sup>110</sup>. U laboratorijskim uvjetima, rekombinantni PIGF potiče vaskularnu permeabilnost, no ta uloga nije dokazana i za endogeno stvoreni peptid<sup>24</sup>. Bez obzira na sve trenutne nepoznanice o fiziološkoj ulozi PIGF-a, postoji opće slaganje da PIGF biološke učinke može postići jedino preko membranskog, a ne topivog tipa VEGFR-1 receptora<sup>111</sup>.

### **Sinergizam i interakcija između angiogeničnih čimbenika; potencijalne terapijske implikacije PIGF-a**

Interakcija gotovo svih angiogeničnih čimbenika s odgovarajućim receptorima rezultira dimerizacijom, fosforilacijom tirozinskih ostataka i daljnjim prijenosom signala<sup>112</sup>. Malo se zna o mogućim interakcijama angiogeničnih receptora u prekondukcijskom dijelu. Za razliku od dobro poznate važnosti signalizacije putem Flk-1/VEGF sustava, uloga Flt-1 i njegovog liganda PIGF i dalje ostaje nerazjašnjenom. Novije studije revidiraju brojne prijašnje nedoumice i dokazuju da na krvne žile PIGF djeluje na sve dosada poznate načine: potiče kolateralni rast krvnih žila (vjerojatno putem mobilizacije i aktivacije monocita) koji uzrokuje povećanje protoka kroz tkiva; mobilizira endotelne matične stanice iz koštane srži, te potiče miocite na stvaranje permanentnih krvnih žila<sup>113,114,115</sup>. PIGF pojačava učinak VEGF-potaknute angiogeneze u patološkim, ali ne i u fiziološkim uvjetima putem novoopisane međusobne komunikacije različitih sustava receptor/ligand. Aktivacija Flt-1 od strane PIGF potiče komunikaciju između Flt-1 i Flk-1, što vodi transfosforilaciji Flk-1, koji na koncu postaje aktivniji u prijenosu VEGF-poticane angiogeneze<sup>116,117</sup>.

Slična sinergija u revaskularizaciji post-ishemičnih tkiva dokazana je i u slučaju PDGF-BB i FGF-2 te za Flk-1/ VEGFR-3 (Flt-4), što govori u prilog širem principu međudjelovanja cijele obitelji vaskuloendoteličnih proteina<sup>118</sup>. Aktivacija receptora putem VEGF-C -koji inače ima angiogenični ali i limfangiogenični učinak- u pokusnih životinja potiče stvaranje homodimera Flt-4/Flt-4 ili heterodimera Flk-1/Flt-4. Nakon aktivacije Flt-4 fosforiliraju se različite tirozin-kinazne rezidue, što je možda mehanizam različitog učinka VEGF-C<sup>119</sup>.

PIGF, VEGF, ali i VEGF-B imaju visok afinitet za VEGFR-1/Flt-1<sup>120,121</sup>, pa gubitak (delecija) ili funkcionalna inaktivnost (mutacija) VEGFR-1 nepopravljivo oštećuje normalni vaskularni razvoj<sup>122</sup>. Delecija samo domene koja kodira tirozin-kinazu s druge strane, dovodi neometanom dovršenju embrionalne angiogeneze<sup>123</sup>, što vodi pretpostavci da je sam VEGFR-1 inertan „mamac“ (engl: decay) za VEGF-protein, čime se najvjerojatnije regulira bioraspoloživost VEGF-a za aktivaciju moćnijeg VEGFR-2. Funkcija „mamca“ prije svega odnosi se na topivi/slobodni VEGFR-1 koju čini samo ligand-vežuća ekstracelularna domena, ali mu nedostaje aktivacijski dio lanca povezan s intracelularno smještenom tirozin-kinazom<sup>124,125</sup>.

Trenutni koncept pretpostavlja da PIGF potiče angiogenezu putem istiskivanja već vezanog VEGF-a za slobodne receptore, čime se povećava frakcija slobodnog proteina VEGF na raspolaganju za aktivaciju VEGFR-2. Drugo je mišljenje da PIGF možda može izravno poticati angiogenezu i putem VEGFR-1, no slaba aktivnost tirozin-kinaze VEGFR-1 i nedovoljno poznavanje specifičnog unutarstaničnog ustrojstva tog receptora za sada ne idu u prilog toj pretpostavci<sup>126</sup>.

Zbog nedostatka specifičnih inhibitora za PIGF ili VEGFR-1, uloga svakog od njih u patološkoj angiogenezi za sada ostaje u domeni pretpostavki. Inaktivacija ili delecija gena za PIGF smanjuje sposobnost prilagodbe na patološke uvjete, što se očituje u smanjenoj sposobnosti permeabilnosti i kolateralnog rasta kapilara u ishemiji, upalnoj reakciji, ali i malignoj bolesti<sup>127</sup>.

Vjeruje se PIGF u malignoj bolesti stvaraju same tumorske stanice<sup>128,129</sup>; u umjetno izazvanim tumorima intaktan gen za PIGF stvara vrlo bogatu vaskularnu mrežu oko neoplazme, dok delecija istog vodi smanjenju vaskularizacije te slabom potencijalu tumorskog rasta<sup>130</sup>.

Terapijska stimulacija novih funkcionalnih i zrelih krvnih žila u ishemijskom tkivu ili inhibicija ekscesivne kapilarne mreže u upalnom ili malignom tkivu može zahtjevati i sekvencijalnu primjenu dva ili čak više angiogeničnih čimbenika i/ili njihovih receptora, pa čak i stvaranje alternativnih molekula s mnogostrukim djelovanjem<sup>131</sup>.

## **2.0 Ciljevi istraživanja**

1. Odrediti koncentraciju i dinamiku PIGF-a i VEGF-a u folikulinskoj tekućini i serumu tijekom kontrolirane hiperstimulacije i najranije trudnoće u žena podvrgnutih metodama asistiranе reprodukcije.
2. Istražiti odnos oba čimbenika u oba odjeljka ovisno o uspješnosti postupka izvantjelesne oplodnje.
3. Odrediti može li PIGF biti pretskazatelj uspješnosti postupka u metodama potpomognute oplodnje.

## **2.1 Materijali i metode**

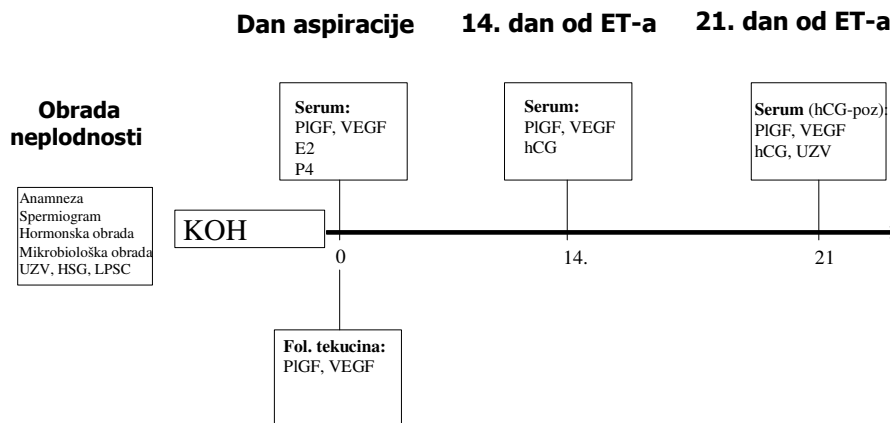
### **Ispitanice i plan istraživanja**

U istraživanje je uključeno 58 normogonadotropnih žena dobi do 38 godina i indeksa mase (BMI) do 27, u kojih je na temelju predhodne obrade u svrhu liječenja neplodnosti po prvi put primijenjen postupak izvantjelesne oplodnje (IVF). U obzir su uzete samo pacijentice u kojih je isključen teži stupanj subfertilnosti partnera. Prije početka stimulacije, u svih je pacijentica primijenjen protokol rutinske obrade neplodnosti koji se primjenjuje u Zavodu za ginekološku endokrinologiju i neplodnost Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, i prema preporukama Europske udruge za humanu reprodukciju i embriologiju (ESHRE) (Shema 3.).

U svih je parova predhodno učinjena obrada neplodnosti koji je uključivala anamnezu, rutinski pregled s citološkim uzorkom i ultrazvučnim pregledom, spermogram, mikrobiološku obradu cervikalnih briseva, uretre i spermokulturu gdje je to bilo potrebno, hormonski profil žene (FSH, LH, prolaktin, estradiol i TSH) 2. ili 3. dana ciklusa. Po potrebi, osnovne su pretrage nadopunjavane histerosalpingografijom (rentgenskom ili

ultrazvučnom), te dijagnostičkom i/ili operativnom laparoskopijom kada je to bilo indicirano.

**Slika 5. Shematski prikaz plana istraživanja.**



**Legenda:** KOH–kontrolirana ovarijska hiperstimulacija; E<sub>2</sub>–estradiol; P<sub>4</sub>–progesteron; UZV–ultrazvuk; HSG–histerosalpingografija; LPSC–laparoskopija; hCG–humani korionski gonadotropin; PIGF–posteljčni faktor rasta; VEGF–vaskularni endotelijalni faktor rasta

### **Kontrolirana ovarijska hiperstimulacija**

Za indukciju multiple oogeneze korišten je tzv. dugi protokol, primjenom komercijalno dostupnih analoga gonadorelina (GnRHa) i humanog rekombinantnog folikulostimulirajućeg hormona (rhFSH) prema slijedećoj shemi:

U ciklusu koji prethodi stimulaciji, između 20. i 22. dana započeta je primjena buserelina (Suprefact®, Hoechst, Frankfurt, Njemačka) u obliku nazalnog spreja 3x2 uštrcaja u nos (po jednom u svaku nosnicu), ili svakodnevnih

supkutanih injekcija po 0,5 mL buserelin–acetata. Adekvatna supresija endogene produkcije gonadotropina potvrđivana je transvaginalnim ultrazvukom i/ili određivanjem serumskog estradiola nakon 7-10 dana terapije. Primjena rekombinantnog FSH započeta je kod koncentracija estradiola <50ng/L, te ultrazvučno povoljnom nalazu (tanak endometrij i nepostojanje inkluzijskih cista u jajniku). U svih žena korišten je rekombinantni humani FSH (rhFSH, Gonal-F®, Serono, Aubonne, Švicarska), u individualno prilagođenim dozama, u obliku supkutanih svakodnevnih injekcija po tzv. padajućem (step-down) protokolu.

Rast folikula praćen je serijskim ultrazvučnim mjerenjima i/ili određivanjem estradiola u serumu počevši od 6. ili 7. dana terapije rhFSH. U trenutku kada su najmanje dva vodeća folikula dosegla prosječnu veličinu  $\geq 18$  mm (prosjek mjerenja transvaginalnom sondom u dvije dimenzije), za konačno sazrijevanje oocita primjenjena je luteinizirajuća doza 10000IU hCG-a (Profasi®, Serono, Aubone, Švicarska). Aspiracija jajnih stanica učinjena je nakon 36-37 sati, ultrazvučno vođenim transvaginalnim pristupom, laganom sukcijom s oko 150mmHg negativnog tlaka u zatvorenom sustavu, aspiracijskom iglom debljine 16G. Embriotransfer je učinjen nakon 72 sata od aspiracije, a za podršku luteinskoj fazi u svih je žena korišten mikronizirani progesteron (Utrogestan®, Serono, Aubonne, Švicarska) u dozi od 3x200mg/dan. Svim ženama su vraćena najviše tri zametka.

Test na trudnoću rađen je 14 dana nakon embriotransfera, kvantitativnim određivanjem hCG-a u serumu. Potvrda intrauterine, odnosno vijabilne trudnoće učinjena je sedam dana kasnije, kombinacijom transvaginalne sonografije i kvantitativnog hCG-a.

## **Izdvajanje uzoraka za određivanje VEGF-a i PlGF-a**

Uzorci za određivanje VEGF i PlGF-a izdvajani su iz:

- folikulinske tekućine svih aspiriranih folikula 36-37h nakon egzogene primjene luteinizacijskih doza hCG-a.
- seruma periferne venske krvi na dan aspiracije jajnih stanica.
- 14. dana nakon embriotransfera, iz seruma venske krvi uzete za rutinsko određivanje hCG.
- 21. dana nakon embriotransfera u slučaju pozitivnog hCG-a i ultrazvučne potvrde intrauterine trudnoće.

Serum iz periferne venske krvi dobivene venepunkcijom (Vacutainer), izdvajan je centrifugiranjem pune krvi na 3000 okretaja/min tijekom 10min. Tako dobiveni uzorci skladišteni su na  $-20^{\circ}\text{C}$  do konačne laboratorijske analize.

Stanični elementi iz folikulinske tekućine, bez vidljivih primjesa krvi, odvajani su dekantiranjem supernatanta nakon prethodnog centrifugiranja na 3000 o/min tijekom 10 minuta. Tako dobivena folikulinska tekućina također je čuvana u smrznutom stanju na  $-20^{\circ}\text{C}$  do konačne laboratorijske obrade.

Sva planirana laboratorijska određivanja učinjena su nakon jednokratnog zamrzavanja/odmrzavanja.

## **Laboratorijsko određivanje VEGF-a i PlGF-a**

Za kvantitativno određivanje angiogenih čimbenika rasta korišteni su komercijalno dostupni enzim imunokemijski testovi (ELISA hPlGF i hVEGF; Quantikine®, R&D Systems Europe Ltd., V. Britanija).

Načelo mjerenja: VEGF ili PlGF u uzorku veže se u prvoj inkubaciji na specifična monoklonska protutijela imobilizirana na unutrašnjoj stijenci jažica (bunarića), nakon čega se dodaje drugo (poliklonsko) antitijelo obilježeno peroksidazom. Nakon svake inkubacije, nevezani materijal odvaja se ispiranjem. Na kraju se dodaje supstrat za peroksidazu TMB i mjeri promjena



boje spektrofotometrijski (valna duljina 450nm). Količina peroksidaze specifično vezane posredstvom obilježenog antitijela u kompleks sa citokinom direktno je proporcionalna koncentraciji citokina u uzorku.

Svojstva metoda: Metode su standardizirane prema rekombinantnom humanom VEGF<sub>165</sub> i PIGF standardu dobivenom u *Sf21*, odnosno *E Coli*. Raspon metode za VEGF bio je 0-1000 ng/L, a za PIGF 0-500 ng/L. Analitička osjetljivost ELISA testa za VEGF bila je 5 ng/L, a za PIGF <7 ng/L.

Svi uzorci seruma i folikulinske tekućine određivani su za PIGF nativno, dok su za određivanje VEGF folikulinske tekućine razrijeđene 1:10 s Calibrator Diluent RD6U reagensom.

Analitička kontrola točnosti i preciznosti vršena je u svakoj seriji mjerenja. Kao kontrolni uzorak rabljen je pool serum. Dozvoljeno odstupanje u kontroli točnosti bilo je 2SD u odnosu na srednju vrijednost. Nepreciznost između serija mjerenja bila je <9% za VEGF i <10,5% za PIGF.

### **Određivanje ostalih hormonskih parametara u serumu i folikulinskoj tekućini**

Estradiol (E<sub>2</sub>), progesteron i hCG određivani su komercijalno dostupnim reagensima tijekom rutinske obrade odnosno praćenja postupka izvantjelesne oplodnje<sup>132</sup>.

### **Statističke metode**

Za skladištenje, obradu i statističku analizu podataka korišteni su računalni statistički programi SPSS 10 i Statistica 5.

$\chi^2$ -test korišten je za usporedbu proporcija, Mann Withitney U-test za određivanje značajnosti razlika između medijana grupa, a Spearmanov test korelacije za povezanost dviju kontinuiranih varijabli. Vrijednosti  $p < 0,05$  smatrane su statistički značajnima.

Korištena su i dva modela logističke regresije: izrada predikcijskih modela metodom isključivanja i uključivanja, te analiza čimbenika rasta u

pojedinačnom i grupnom modelu. Za potonji model vrijednosti PlGF-a i VEGF-a podijeljene su dihotomno ovisno o medijanu u skupinu visokih i niskih vrijednosti. Izračunati su omjeri šansi (OR, odds ratios) i intervali pouzdanosti (CI; confidence intervals).

### 3.0 Rezultati

Od 58 obrađenih pacijentica koje su bile kandidati za postupak izvantjelesne oplodnje, kriterije uvrštenja u studiju zadovoljavale su 42 osobe s ukupno 140 uzoraka folikularne tekućine i seruma. Prosječna dob istraživane skupine iznosila je  $32,43 \pm 3,75$ g; najmlađa pacijentica bila je u dobi od 24g a najstarija s navršenih 42g.

Indikacije za liječenje neplodnosti izvantjelesnom oplodnjom bile su slijedeće: mehanički faktor u 8 parova (16,7%), subfertilnost supruge u 18 (37,5%) i idiopatski oblik neplodnosti u 16 (33,3%) parova.

Ostali istraživani parametri na dan aspiracije jajnih stanica prikazani su u tablici 2.

**Tablica 2. Prikaz vrijednosti istraživanih parametara na dan aspiracije oocita**

	Srednja vrijednost $\pm$ SD	Min	Max	Rang
Br. amp	23,19 $\pm$ 7,5	2	40	38
Br. oocita	6,50 $\pm$ 3,67	1	15	14
Br. zametaka	4,02 $\pm$ 2,59	1	11	10
Estadiol (ng/L)	1574,65 $\pm$ 1204,70	46,10	5990,00	5943,90
Debljina endometrija (mm)	11,76 $\pm$ 1,63	8,50	14,50	6,00
Progesteron u serumu (nmol/L)	39,81 $\pm$ 24,73	6,80	105,40	98,60
PlGF u serumu (ng/L)	10,00 $\pm$ 2,04	7,00	16,80	9,80
VEGF u serumu (ng/L)	326,85 $\pm$ 178,27	46,20	967,20	921,00
PlGF u fol. tekućini (ng/L)	62,13 $\pm$ 24,66542	28,30	136,65	108,35
VEGF u fol.tekućini (ng/L)	3724,96 $\pm$ 3592,12	513,50	22043,00	21529,50

U niti jedne pacijentice tijekom stimulacije multiple oogeneze nije došlo do razvoja klinički prepoznatljivog sindroma ovarijske hiperstimulacije (OHSS).

Intrauterina trudnoća potvrđena je u 14 postupaka izvantjelesne oplodnje; u 28 pacijentica postupak nije rezultirao trudnoćom. Devet trudnoća je završilo rođenjem živog djeteta u terminu, 1 prijevremenim porodom, a 4 trudnoće spontanom pobačajem (tri u I tromjesečju, 7-12tj, i jedna u II tromjesečju). Prosječna težina živorođene djece iznosila je 3256±816g (1650-4400g), a duljina 49,40±2,63cm (podaci nisu prikazani).

U tablici 3 prikazani su istraživani parametri s obzirom na ishod postupka izvantjelesne oplodnje.

**Tablica 3. Prikaz općih istraživanih parametara ovisno o ishodu postupka izvantjelesne oplodnje**

Ishod postupka	Bez trudnoće (n=28)		Trudnoća (n=14)		Man - Whitney U test Z p
	Srednja vrijednost ±SD	Medijan (CI 95%)	Srednja vrijednost ±SD	Medijan (CI 95%)	
<b>Dob (god.)</b>	32,11 ± 4,14	33 (30,88-34,70)	33,07 ± 2,76	33 (31,48-34,66)	-0,67 >0,05
<b>Br. ampula FSH (75IU)</b>	23,04 ± 7,72	22 (19 -27)	25,00 ± 4,74	24 (22-28)	-0,99 >0,05
<b>Br. oocita</b>	5,85 ± 3,63	5 (4 -8)	8,14 ± 3,16	8 (6-10)	<b>-2,10</b> <b>&lt;0,05</b>
<b>Br. zametaka</b>	3,31 ± 2,31	3 (2-5)	5,57 ± 2,68	5 (4-8)	<b>-2,61</b> <b>&lt;0,01</b>
<b>Estradiol (ng/L)</b>	1293,11± 1046,86	1123,7 (887,18-1699,04)	2137,74 ± 1337,50	2174,4 (1365,48-2909,99)	<b>-2,33</b> <b>&lt;0,05</b>
<b>Progesteron (nmol/L)</b>	34,55 ± 25,26	27,75 (24,76-44,34)	50,35 ± 20,62	52 (38,45-62,26)	<b>-2,11</b> <b>&lt;0,05</b>
<b>Endometrij (mm)</b>	11,48 ± 1,78	11,5 (10,78-12,19)	12,37 ± 1,21	12,5 (11,67-13,07)	-1,43 >0,05

Nije bilo značajne razlike između obiju skupina s obzirom na prosječnu dob (33,07±2,76 i 32,11±4,14g; Z=0,67, P>0,05), broju primjenjenih ampula gonadotropina tijekom kontrolirane ovarijske stimulacije (24 naspram 22 ampule; Z=0,99, p>0,05) i debljini endometrija na dan embriotransfera (12,37±1,21mm spram 11,48±1,78mm; Z=-1,43, P>0,05).

Broj aspiriranih oocita bio je statistički značajno viši u skupini u kojoj je došlo do trudnoće (8 naspram 5 oocita; Z=-2,10; P<0,05), kao i broj ukupnih zametaka (pet spram tri zametka, Z=-2,61; P<0,01), te prosječna razina estradiola (2137,74±1337,50ng/L spram 1293,11±1046,86ng/L Z=-2,33;

$p < 0,05$ ) i progesterona u serumu na dan aspiracije ( $50,35 \pm 20,62 \text{ nmol/L}$  spram  $34,55 \pm 25,26 \text{ nmol/L}$ ,  $Z = -2,11$ ;  $p < 0,05$ , tablica 3).

Mjerljive količine VEGF i PlGF dokazane su u oba istraživana odjeljka, folikulinskoj tekućini i serumu. Prosječne vrijednosti oba čimbenika obzirom na ishod postupka potpomognute oplodnje, prikazane su u tablici 4.

**Tablica 4. Usporedba vrijednosti angiogeničnih čimbenika rasta u oba istraživana odjeljka na dan aspiracije oocita ovisno o ishodu postupka izvantjelesne oplodnje**

Ishod postupka	Bez trudnoće (n=28)		Trudnoća (n=14)		Man Whitney U test  Z p
	Srednja vrijednost ± SD	Medijan (CI 95%)	Srednja vrijednost ±SD	Medijan (CI 95%)	
PlGF u serumu (ng/L)	9,64 ± 1,56	9,30 (9,04-10,25)	10,74 ± 2,70	9,95 (9,19-12,30)	-1,11 >0,05
VEGF u serumu (ng/L)	340,34 ± 187,64	299,45 (267,58-413,10)	299,89 ± 161,04	233,50 (206,90-392,87)	-0,67 >0,05
PlGF u fol. tekućini (ng/L)	63,97 ± 28,14	56,42 (53,06-74,88)	58,46 ± 15,89	57,10 (49,28-67,63)	-0,19 >0,05
VEGF u fol. tekućini (ng/L)	4388,94 ± 4182,82	3549,98 (2767,01- 6010,87)	2397,02 ± 1228,35	2203,0 (1687,80- 3106,25)	-1,79 (0,07) <b>=0,05</b>

Prosječne vrijednosti serumskog PlGF-a i VEGF-a iznosile su  $9,64 \pm 1,56 \text{ ng/L}$  u skupini u kojoj nije došlo do trudnoće, spram  $10,74 \pm 2,70 \text{ ng/L}$  u skupini s dokumentiranom trudnoćom ( $Z = -1,11$ ;  $p > 0,05$ ). Za serumski VEGF vrijednosti su iznosile  $340,34 \pm 187,64 \text{ ng/L}$  i  $299,89 \pm 161,04 \text{ ng/L}$  ( $Z = -0,67$ ;  $p > 0,05$ ).

U folikulinskoj tekućini, prosječna koncentracija PlGF-a iznosila je  $63,97 \pm 28,14 \text{ ng/L}$  za skupinu bez trudnoće i  $58,46 \pm 15,89 \text{ ng/L}$  u skupini s trudnoćom ( $Z = -0,19$ ;  $p > 0,05$ ). Statističke značajnosti nije bilo niti obzirom na VEGF ( $4388,94 \pm 4182,82 \text{ ng/L}$  odnosno  $2397,02 \pm 1228,35 \text{ ng/L}$ ), iako je postojala tendencija statističke značajnosti prema višoj koncentraciji VEGF-a u folikulinskoj tekućini u skupini pacijentica čiji postupak nije rezultirao trudnoćom, no ona nije dosegnuta ( $p = 0,05$ ).

Razina PlGF-a 14. dana nakon embriotransfera bila je značajno viša u trudnica nego u netrudnica ( $10,85 \pm 2,18 \text{ ng/L}$  i  $8,35 \pm 1,14 \text{ ng/L}$ ;  $Z = -3,30$   $p < 0,001$ ). Iako je tendencija statistički značajne razlike postojala i za VEGF u istom razdoblju ( $219,57 \pm 59,23 \text{ ng/L}$  za neuspjeli postupak i  $321,01 \pm 138,00 \text{ ng/L}$  za trudnice), ta

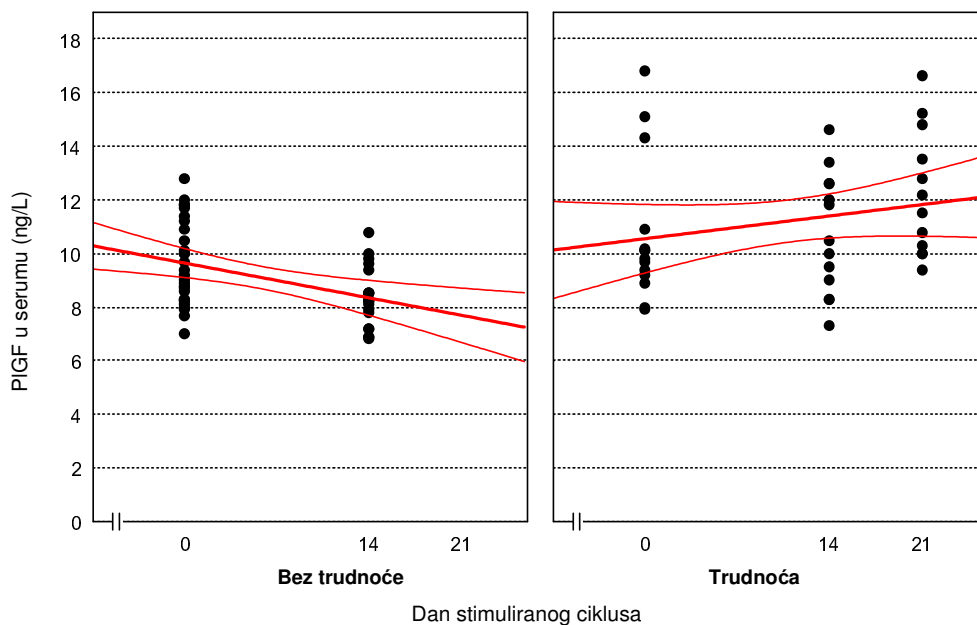
razlika nije dosegla  $P < 0,05$ , već je slično vrijednostima u folikulinskoj tekućini- bila granično viša ( $p = 0,07$ ; podatak nije prikazan).

**Tablica 5. Usporedba vrijednosti angiogeničnih čimbenika rasta u serumu nakon embriotransfera a s obzirom na ishod postupka IVF**

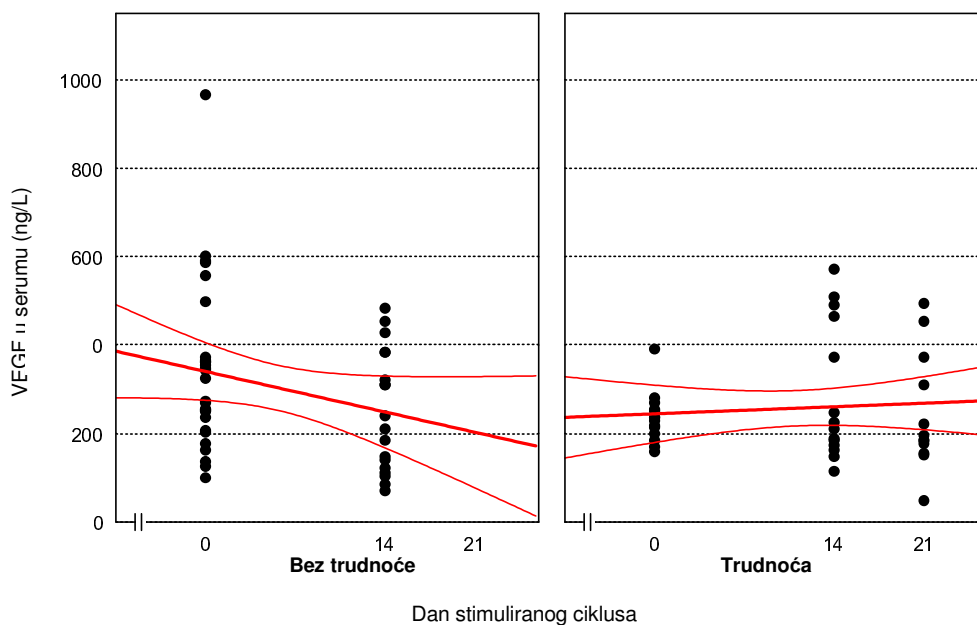
Ishod postupka	Bez trudnoće (n=28)		Trudnoća (n=14)		Man Whitney U test
	Srednja vrijednost $\pm$ SD	Medijan (CI 95%)	Srednja vrijednost $\pm$ SD	Medijan (CI 95%)	Z p
<b>PIGF 14. dana (ng/L)</b>	8,35 $\pm$ 1,14	8,20 (7,80-8,90)	10,85 $\pm$ 2,18	11,15 (9,59-12,11)	-3,30 <b>&lt;0,001</b>
<b>VEGF 14. dana (ng/L)</b>	219,57 $\pm$ 59,23	218,0 (191,03-248,12)	321,01 $\pm$ 138,00	350,75 (241,33-400,70)	-1,71 <b>&gt;0,05</b>
<b>PIGF 21. dana (ng/L)</b>	nije određivan		12,26 $\pm$ 2,35	11,85 (10,77-13,75)	-2,23 <b>&lt;0,05</b>
<b>VEGF 21. dana (ng/L)</b>	nije određivan		173,45 $\pm$ 84,60	148,0 (116,61-230,28)	-2,48 <b>&lt;0,05</b>

U ciklusima koje su završili trudnoćom, PIGF je 21. dana ponovno viši nego u ciklusima bez trudnoće, ali i u odnosu na vrijednosti dobivene 14. dana koncepcijskog ciklusa ( $12,26 \pm 2,35 \text{ ng/L}$  spram  $8,35 \pm 1,14$ , i  $10,85 \pm 2,18 \text{ ng/L}$   $Z = -2,23$ ;  $p < 0,05$ ). Nasuprot tome, VEGF je bio niži ( $173,45 \pm 84,60 \text{ ng/L}$  spram  $219,57 \pm 59,23$  odnosno  $321,00 \pm 138 \text{ ng/L}$ ,  $Z = -2,48$ ;  $p > 0,05$ , tablica 5, te grafikoni 1 i 2)

**Grafikon 1. Grafički prikaz vrijednosti PIGF-a u serumu ispitanica ovisno o ishodu postupka izvantjelesne oplodnje**



**Grafikon 2. Grafički prikaz vrijednosti VEGF-a u serumu ispitanica ovisno o ishodu postupka izvantjelesne oplodnje**



Placentarni faktor rasta seruma u negativnoj je korelaciji s progesteronom u serumu ( $r=0,26$ ;  $p<0,09$ ) dok je njegova razina u folikulinskoj tekućini u pozitivnoj korelaciji kako s progesteronom, tako i s brojem oplodjenih jajnih stanica ( $r=0,26$  i  $r=0,36$ ;  $p<0,05$ , tablica 6 i grafikon 3.).

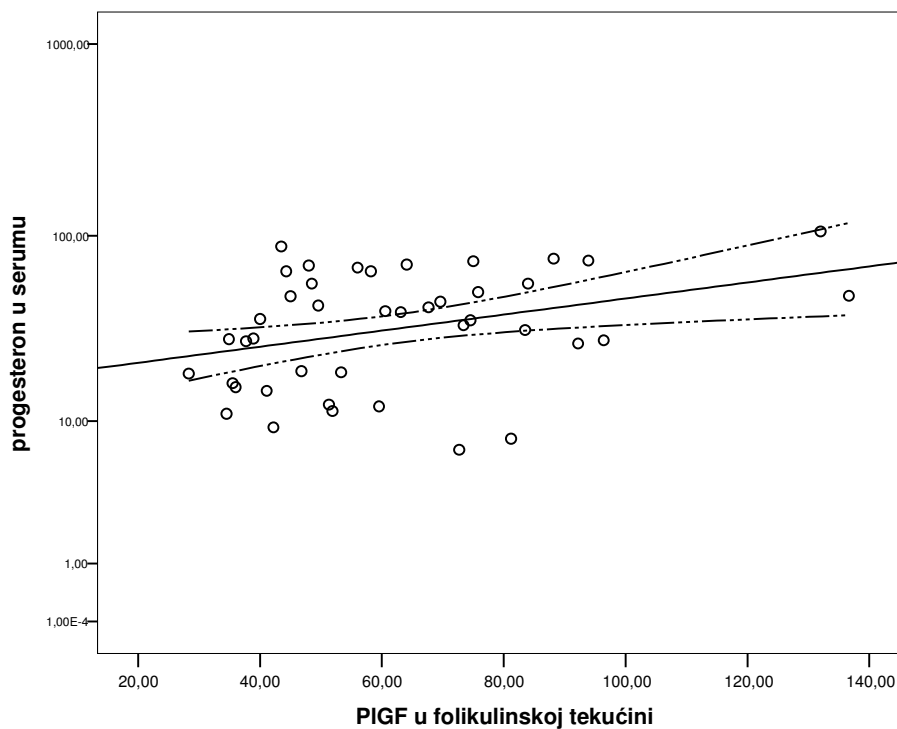
Serumski VEGF u statistički je negativno korelirao s estradiolom i progesteronom ( $r=-0,37$  i  $r=-0,17$ ;  $p<0,02$  odnosno  $p=0,27$ ).

**Tablica 6. Prikaz koeficijenata korelacije angiogeničnih čimbenika rasta s drugim značajnim istraživanim parametrima na dan aspiracije oocita**

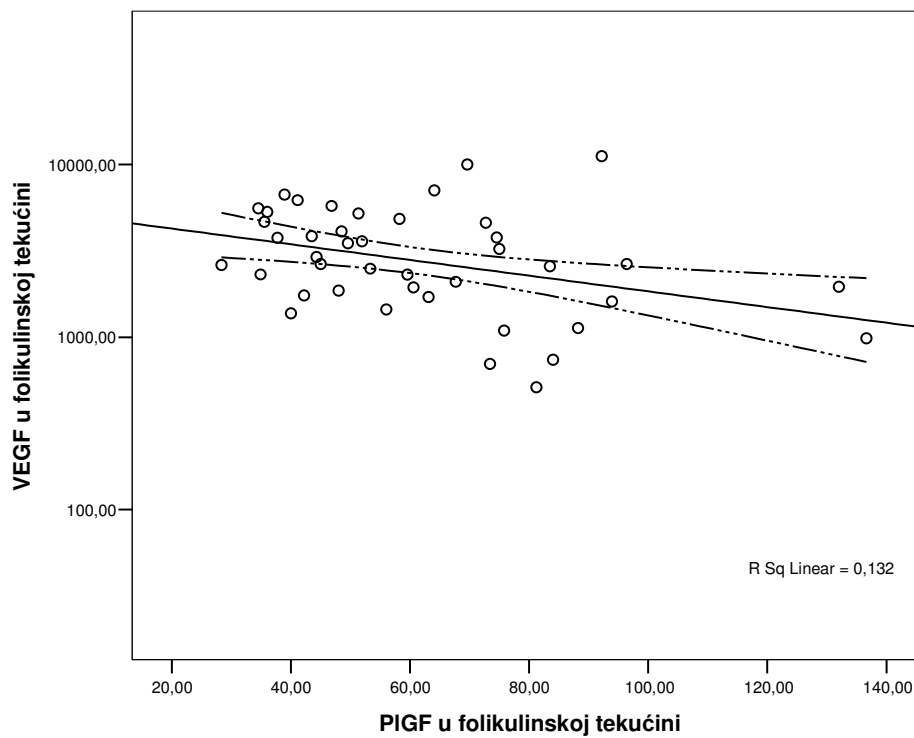
Faktori	Koeficijent korelacije R	P
PIGF-ser: E <sub>2</sub>	-0,064	0,68
PIGF-ser: P <sub>4</sub>	0,26	0,09
PIGF-FF: P <sub>4</sub>	0,36	0,02
PIGF-ser: br. ampula	-0,02	0,87
PIGF-FF: br. zametaka	0,44	0,005
PIGF-FF: ishod postupka	-0,029	0,42
PIGF-FF: VEGF-FF	-0,38	0,01
VEGF-ser: E <sub>2</sub>	0,10	0,50
VEGF-ser: P <sub>4</sub>	-0,17	0,27
VEGF-ser: br. ampula	0,43	0,005
VEGF-FF: br. zametaka	-0,28	0,08
VEGF-FF: ishod postupka	-0,28	0,04
VEGF-FF: E <sub>2</sub>	-0,37	0,01
VEGF-FF: P <sub>4</sub>	-0,24	0,12

Međusobno, PIGF i VEGF u folikulinskoj tekućini negativno su korelirali na razini visoke značajnosti ( $p=0,01$ ; tablica 6 i grafikon 4), a inverzna korelacija je nađena i između VEGF i ishoda postupka ( $p=-0,28$ ;  $p=0,04$ )

**Grafikon 3. Grafički prikaz korelacije progesterona i koncentracije PIGF-a u folikulinskoj tekućini na dan aspiracije**



**Grafikon 4. Grafički prikaz korelacije folikularne vrijednosti PIGF-a i VEGF-a na dan aspiracije**





**Tablica 7. Prikaz koeficijenata korelacije angiogeničnih čimbenika rasta na dan aspiracije s drugim značajnim istraživanim parametrima ovisno o ishodu postupka IVF**

Faktori	Bez trudnoće (n=28)		Trudnoća (n=14)	
	r	p	r	p
PIGF-ser: E <sub>2</sub>	-0,12	0,53	0,007	0,98
PIGF-ser: P <sub>4</sub>	0,26	0,17	0,04	0,89
PIGF-FF: P <sub>4</sub>	0,59	0,001	-0,41	0,14
PIGF-FF: br. zametaka	0,60	0,001	-0,05	0,86
VEGF-ser: E <sub>2</sub>	0,32	0,09	-0,002	0,99
VEGF-ser: P <sub>4</sub>	0,03	0,87	-0,57	0,03
VEGF-ser: br. ampula	0,40	0,04	0,51	0,06
VEGF-FF: E <sub>2</sub>	-0,46	0,01	0,21	0,45
VEGF-FF: P <sub>4</sub>	-0,31	0,10	-0,32	0,26
PIGF-FF: VEGF-FF	-0,37	0,01	-0,52	0,06

Rasčlanjivanjem navedenih interakcija s obzirom na ishod postupka, dobiveni su rezultati prikazani u tablici 7. Povezanost među istraživanim čimbenicima snažnija je i statistički značajna s nepovoljnim ishodom postupka IVF. U trudnica, granična statistička značajnost dobivena je jedino u slučaju VEGF u serumu: broj ampula gonadotropina ( $r=0,51$ ,  $p=0,058$ ) te PIGF: VEGF u folikulinskoj tekućini ( $r=-0,52$ ;  $p=0,056$ , tablica 7).

U svrhu utvrđivanja prediktivne vrijednosti istraživanih angiogeničnih čimbenika rasta na ishod postupka potpomognute oplodnje, primijenjena je logistička regresija. Kako bi se došlo do što kvalitetnijeg modela predikcije, učinjene su i koračne logističke regresije metodom isključivanja, odnosno uključivanja pojedinih varijabli.

Kao potencijalni prediktori ishoda postupka izvantjelesne oplodnje uvrštene su slijedeće varijable:

- Dob
- Broj primjenjenih ampula FSH
- Broj oocita dobivene aspiracijom
- Broj dobivenih zametaka tijekom IVF
- Estradiol na dan aspiracije
- Debljina endometrija na dan embriotransfera
- Progesteron u serumu na dan aspiracije
- PIGF u serumu

- VEGF u serumu
- PIGF u folikulinskoj tekućini
- VEGF u folikulinskoj tekućini

Početni model koji obuhvaća svih 11 prediktora prikazan je u tablici 8.

**Tablica 8. Model logističke regresije prediktora za ishod postupka izvantjelesne oplodnje**

Varijable	Koeficijent B	Standardna pogreška	Waldov $\chi^2$ -kvadrat	Stupnjevi slobode	P
Dob	-0,165	0,257	0,414	1	0,51
Br. ampula FSH	0,544	0,315	2,979	1	0,08
Br.oocita	0,411	0,552	0,555	1	0,45
Br.zametaka	1,217	0,703	2,990	1	0,08
Estradiol	-0,001	0,001	1,571	1	0,20
Debljina endometrija	0,571	0,486	1,380	1	0,24
Progesteron u serumu	0,068	0,053	1,60	1	0,20
PIGF u serumu	0,641	0,515	1,550	1	0,21
VEGFu serumu	-0,003	0,007	0,272	1	0,60
PIGF u FF	-1505	0,08	3,200	1	0,07
VEGF u FF	-0,01	0,001	2,910	1	0,08

Model je bio statistički značajan,  $\chi^2 = 33,464$ ,  $df=11$ ,  $p=0,0004$ . Klasifikacijska točnost modela primjenom svih istraživanih parametara iznosila je 95,12%, što je prikazano na tablici 9.

**Tablica 9. Klasifikacijske sposobnosti i slaganje početnog logističkog modela**

Opaženo	Predviđeno		
	Bez trudnoće N	Trudnoća N	Postotak slaganja %
Bez trudnoće	27	0	100
Trudnoća	2	12	0,00
Ukupno			95,12

Kako bi se dobio jednostavniji model, primijenjena je metoda koračnog isključivanja varijabli. Kao manje važne varijable, u 7 koraka isključene su sljedećim redosljedom:

- Dob
- Broj oocita dobivene aspiracijom
- Estradiol na dan aspiracije
- Debljina endometrija na dan embriotransfera
- Progesteron u serumu na dan aspiracije
- VEGF u serumu

Na taj način dobiven je konačni model prikazan tablici 10. Model je statistički značajan na razini  $\chi^2 = 26,6$ ,  $df=5$  i  $p=0,0001$  s klasifikacijskom točnošću od 85,37% (tablica 11).

**Tablica 10. Konačni model logističke regresije prediktora za ishod postupka izvantjelesne oplodnje**

Varijable	Koeficijent B	Standardna pogreška	Waldov $\chi$ -kvadrat	Stupnjevi slobode	P
Br. ampula FSH	0,243	0,121	4,013	1	0,04
Br. zametaka	1,1647	0,478	5,916	1	0,01
PIGF u serumu	0,704	0,339	4,309	1	0,03
PIGF u FF	-0,079	0,04	3,983	1	0,04
VEGF u FF	-0,001	0,0006	4,214	1	0,04

**Tablica 11. Klasifikacijske sposobnosti i slaganje konačnog logističkog modela**

Opaženo	Predviđeno		
	Bez trudnoće N	Trudnoća N	Postotak slaganja %
Bez trudnoće	24	3	88,89
Trudnoća	3	11	78,57
<b>Ukupno</b>			<b>85,37</b>

S druge strane, primjena logističke regresije metodom uključivanja zadovoljavala je model jedino u slučaju uključivanja varijable broja zametaka ( $B=0,369$ ; Wald-ov  $\chi^2=5,89$ ,  $p=0,015$ , podaci nisu prikazani). Time je dobiven model na razini  $\chi^2=7,28$ ,  $df=1$ ,  $p=0,007$  s maksimalnom prediktivnom vrijednošću od 70,73% (tablica 12).

**Tablica 12. Klasifikacijske sposobnosti i slaganje konačnog logističkog modela s metodom uključivanja varijabli**

Opaženo	Predviđeno		
	Bez trudnoće N	Trudnoća N	Postotak slaganja %
Bez trudnoće	24	3	88,89
Trudnoća	9	5	35,71
Ukupno (%)			70,73

Logističkom analizom grupnog modela procijenjena je vjerojatnost negativnog ishoda potupka izvantjelesne oplodnje temeljene na angiogeničnim čimbenicima rasta određenim u folikularnoj tekućini i serumu u vrijeme aspiracije. Pojedinačne vrijednosti predhodno su dihotomizirane tako da su vrijednosti ispod medijana određene kao niske, a one iznad kao visoke vrijednosti za svaku od distribucija vrijednosti. Intervali pouzdanosti određeni su razradom modela temeljenim na pojedničnim koncentracijama PIGF-a i VEGF-a, te u mješanom modelu (tablica 13).

**Tablica 13. Intervali pouzdanosti povezani s neuspjelim ishodom potupka izvantjelesne oplodnje temeljene na visokim vrijednostima angiogeničnih čimbenika rasta primjenom raznovrsnih logističkih modela**

Model	PIGF		VEGF	
	OR	CI 95%	OR	CI 95%
<b>Folikularna tekućina</b>				
PIGF i VEGF	1,44	(0,35-5,87)	4,25	(1,00-18,07)
PIGF ( $\geq 51,7$ ng/L)	1,00	(0,28-3,61)		
VEGF ( $\geq 2656,75$ ng/L)			3,87	(0,97-15,44)
<b>Serum (aspiracija)</b>				
PIGF i VEGF	0,56	(0,15-2,06)	1,56	(0,42-5,73)
PIGF ( $\geq 9,7$ ng/L)	0,56	(0,15-2,06)		
VEGF ( $\geq 272,45$ ng/L)			1,54	(0,42-5,61)

Dobivene vrijednosti omjera šansi (OR) ukazuju da su povišene vrijednosti VEGF-a ili PIGF-a u folikulinkoj tekućini povezane s većom vjerojatnošću neuspješnog ishoda postupka izvantjelesne oplodnje. Kada se povišene vrijednosti oba čimbenika uključe u isti model, vjerojatnoća neuspješnog ishoda postupka izvantjelesne oplodnje je još veća (OR=4,25; CI=1-18,7, tablica 13).

## 4.0 Rasprava

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju da je funkcija angiogeničnih čimbenika i njihovih topivih receptora u žena podvrgnutih kontroliranoj ovarijskoj hiperstimulaciji (KOH) kompleksnije nego se prije smatralo. Neki od podataka koji proizilaze iz ovog istraživanja oslikavaju kompleksnu interakciju između srodnih i funkcionalno različitih angiogeničnih tvari tijekom KOH i rane trudnoće.

Regulacija ovarijske angiogeneze proces je koji uključuje više vazoaktivnih i angiogeničnih čimbenika rasta koji uključuje VEGF i PlGF, angiopoetin, angiogenin i FGF<sup>1,2,4</sup>. Iako je uloga mnogih od njih još uvijek neistražena, respektabilan broj dosadašnjih studije upućuju da VEGF-obitelj vaskuloendotelnih proteina zauzima središnju ulogu u njenoj regulaciji i održavanju<sup>4,11,47</sup>. VEGF u ovariju stvaraju granulosa i teka-stanice, a na poticaj FSH, LH i hCG, a vjerojatno i drugih za sada manje poznatih tvari<sup>133</sup>. Najbolje dokumentirana uloga VEGF-a u ovariju je mitogeno djelovanje na endotelne stanice i poticanje angiogeneze, povećanje propusnosti kapilara, te utjecaj na folikularno-luteinsku transformaciju rastućeg folikula<sup>134,135</sup>.

PlGF je drugi otkriveni član VEGF-obitelji angiogeničnih faktora rasta čije mjesto stvaranja, regulacija i biološka uloga izvan trudnoće za sada nije poznata. PlGF je slabiji mitogen od VEGF-a, ne potiče angiogenezu na dosada poznate načine, i čini se ima osobito važnu ulogu u patološkoj angiogenezi<sup>113</sup>. Specifične interakcije PlGF-a i VEGF upoznate su tek posljednjih godina, otkrićem da se većina interakcija između oba angiogenična čimbenika odvija putem zajedničkog VEGFR-1 receptora<sup>114</sup>.

### ***VEGF i PlGF u uzorcima na dan aspiracije (0-ti dan)***

U ovom istraživanju, oba angiogenična čimbenika dokazana su u serumu i folikulinskoj tekućini. Razina VEGF-a i PlGF-a u folikulinskoj tekućini u prosjeku su višestruko više nego u serumu, što podržava pretpostavku o

intrafolikulinskoj proizvodnji oba glikoproteina. Ta je činjenica i ranije bila poznata za VEGF<sup>136</sup>, no ovo je za sada prvi dokaz koji govori u prilog da je jajnik također mjesto najvjerojatnije sinteze i PlGF-a.

Intrafolikularna produkcija oba angiogenična čimbenika u izvjesnoj mjeri implicira ovisnost o gonadotropinima, odnosno egzogenom FSH i LH/hCG u stimuliranih ciklusa<sup>137</sup>. Nekoliko činjenica podupire ovakvu tezu: (I) količina oba čimbenika u folikulinskoj tekućini više puta je veća od one koja je istodobno cirkulira u serumu; (II) novije studije potvrđuju da se mRNK za PlGF može dokazati neovisno o VEGF-u u brojnim staničnim linijama, uključujući i vaskulosincicijsku membranu<sup>109,110</sup>; (III) međusobni odnos oba angiogenična čimbenika u svim do sada istraživanim sustavima uključuje i dodatne regulacijske tvari, poput estradiola, progesterona i čimbenika rasta.

Najjači argument u prilog konceptu o povezanosti gonadotropina i produkciji angiogeničnih proteina, jesu *in vitro* istraživanja na kultiviranim granulosa stanicama. Hazzard i sur<sup>138</sup> dokazali su da dodatak LH u granulosa stanicama koje su dobivene u predhodno stimuliranih Rhesus majmuna rekombinantnim humanim FSH-om, uzrokovao porast produkcije VEGF od osam puta više nego stanicama kojima LH nije dodavan. Ovi podaci konzistentni su s nekim prijašnjim zaključcima iz kliničkih studija<sup>139,140</sup>, mada valja spomenuti kako ih ne potvrđuju sva istraživanja<sup>141,142</sup>.

VEGF je neophodan za folikulogenezu i razvoj žutog tijela, značajan je za kvalitetu aspiriranih oocita, te ima nesumnjiv doprinos u razvoju sindroma ovarijske hiperstimulacije<sup>143,144</sup>. Nekoliko daljnjih istraživanja otkrila su i nepovoljan utjecaj visokih vrijednosti VEGF-a na ishod postupka izvantjelesne oplodnje<sup>145,146</sup>. Mehanizmi za koje se predpostavlja da su odgovorni za takav nepovoljan utjecaj VEGF-a, mogu se sažeti u slijedećem:

1. visoke vrijednosti VEGF-a u folikulinskoj tekućini negativno utječu na konačnu morfologiju gameta i embrija, što je u vezi s hipoksijom unutar folikula<sup>147,148</sup>.

2. VEGF modulira produkciju progesterona<sup>149-151</sup>

3. Vrijednosti VEGF-a povišene su u folikulinskoj tekućini starijih žena podvrgnutih potpomognutoj oplodnji, te onih koje slabije reagiraju na stimulaciju gonadotropinima<sup>7,152</sup>.

Činjenica da je koncentracija oba čimbenika u folikulinskoj tekućini oko 6-10 veća nego u serumu, navodi na pretpostavku da tijekom folikulogeneze gonadotropini imaju značajan učinak i na stvaranje PlGF-a. Međutim, u našem istraživanju PlGF za razliku od VEGF-a ne pokazuje ovisnost o primjenjenoj količini rFSH što više sugerira neovisnu, ali za sada još nepoznatu regulaciju njegovog stvaranja.

Međusobni odnos PlGF-a i VEGF-a u folikulinskoj tekućini u negativnoj je korelaciji, što može značiti da je biološka uloga oba čimbenika međusobno suprotstavljena, ali i da jedan drugog regulira u konačnoj ekspresiji. Postoje dokazi da je u nedostatku PlGF-a ekspresija VEGF kompenzatorno pojačana zbog pojačane potrebe za amplifikacijom biološkog djelovanja VEGF-a. S izuzetkom trudnoće, u odrasloj jedinki je pojačana potreba za VEGF-om i PlGF-om rijetka i incidentna, ali je realna u specifičnim stanjima povećane neovaskularizacije, poput one koja se odvija u reproduktivnom sustavu žene. Vjeruje se da u takvim okolnostima magnituda potrebe za oba angiogenična čimbenika čak nadmašuje onu koja se sreće u vrijeme embrionalnog razdoblja i vaskulogeneze<sup>120</sup>. Na tragu tih izvješća je i studija Tokoyame i sur<sup>153</sup> koji pretpostavljaju da su visoke vrijednosti VEGF-a u folikulinskoj tekućini u žena starije dobi i koje slabije reagiraju na stimulaciju gonadotropinima odraz prije svega kompenzacijskih mehanizama koji nastoje povećati vaskularizaciju u svrhu poticanja bolje maturacije oocite<sup>154-156</sup>. U skladu s tim, Friedman i sur<sup>157</sup> nalaze i značajnu povezanost između količine stvorenog VEGF-a i dobi; žene iznad 38. a pogotovo iznad 40. godine, u folikulinskoj tekućini stvaraju više VEGF-a nego žene mlađe dobne skupine.

Povećanje intrafolikularnih vrijednosti VEGF-a tumači se pretpostavkom o hipoksičnim uvjetima u folikulu žena starije dobne skupine, a u skladu s vjerovanjem da je hipoksija najvažniji promotor produkcije VEGF-a<sup>158</sup>. Takva izvješća međutim, nisu konzistentna i opovrgavaju ih radovi koji su dokazali da

je povećana ekspresija i stvaranje VEGF-a u folikulu češće popraćeno zapravo s povišenom koncentracijom otopljenog kisika u folikulu, što na koncu pitanje regulacije stvaranja angiogeničnih čimbenika rasta u folikulu još uvijek ostavlja neriješenim<sup>159</sup>.

U ovom istraživanju, povezanost dobi i produkcije VEGF-a nije mogla biti dokazana. Nedostatak značajne povezanosti može se objasniti ponajprije homogenom skupinom koja je uključena u istraživanje, s obzirom da je prosječna dob pacijentica uključenih u istraživanje bila 33g, svega 11,5% žena bilo je u dobi od 38g a niti jedna iznad 39g. Količina stvorenog PIGF-a u oba odjeljka također nije bila povezana s dobi, i ova činjenica na tragu je ranijih sličnih istraživanja<sup>160</sup>.

Tijekom luteinske faze ciklusa, razina VEGF-a u pravilu se ne mijenja; blagi inicijalni porast u ciklusa koji će završiti trudnoćom, statistički nije značajan i ubrzo zatim slijedi progresivan pad. U ciklusima koji ne rezultiraju trudnoćom negativizacija VEGF-a može se očekivati već oko početka slijedeće menstruacije, dok su u nekomplikiranim koncepcijskim ciklusima vrijednosti VEGF-a mogu dokazati do oko 40. dana trudnoće. Smatra se da je za taj postupni pad odgovorno povećano stvaranje VEGFR-1, čiji je porast paralelan s porastom PIGF-a<sup>161</sup>.

S obzirom na sinhroniziranu prirodu procesa neovaskularizacije, rašireno je gledište da je ekspresija i stvaranje angiogeničnih čimbenika potaknuto steroidnim hormonima koji reguliraju stvaranje krvnih žila u reprodukcijskoj angiogenezi<sup>162</sup>

Estradiol i progesteron u serumu na dan aspiracije jajnih stanica u prosjeku su viši u žena čiji je postupak završava trudnoćom (tablica 2). Spolni hormoni ovarija primarno su uterotropni i kontroliraju ciklički oblik stanične i vaskularne proliferacije u maternici izvan gestacije. Iako progesteron može djelovati na lokalnoj razini u periovulacijskom folikulu i na taj način regulirati brojne procese, dobro kontrolirane studije su pokazale da je stvaranje VEGF-a neovisno o steroidnim hormonima. Lee i sur.<sup>158</sup> zaključili su da *in vitro*



inkubacija humanih luteiniziranih stanica s trilostanom i antagonistom progesterona ZK137-316 ne utječe na količinu stvaranja VEGF-a.

Produkcija VEGF-a prema brojnim radovima pozitivno korelira s estradiolom i progesteronom u vrijeme aspiracije jajnih stanica<sup>163</sup>. Ta se povezanost objašnjava činjenicom da je produkcija VEGF-a u folikulu određena stupnjem luteinizacije, a ona se neizravno očituje razinom produkcije estradiola i progesterona. S druge strane, gotovo su jednako brojni i radovi koji nisu uspjeli dokazati tu vezu, odnosno ona se svodi na negativnu korelaciju<sup>164</sup>.

Negativna korelacija VEGF-a na dan aspiracije sa svim istraživanim parametrima (osim s količinom egzogenog rhFSH) u ovom istraživanju, čini se govore u prilog nepovoljnog djelovanja VEGF-a iako se potencijalni mehanizam tog djelovanja ne nazire. S druge strane, serumski a pogotovo folikulinski PIGF nije ovisan o razini serumskog estradiola, ali pokazuje statistički značajnu korelaciju s serumskim progesteronom. Viša koncentracija PIGF-a čini se također imaj nepovoljan učinak na ishod postupka izvantjelesne oplodnje mada nije jasno radi li se o neovisnom djelovanju ili je ono u sklopu pojačanja negativnog djelovanja samog VEGF-a.

Ovakav nalaz može se protumačiti na nekoliko načina: (I) s obzirom na prirodu ovog istraživanja, u odabranoj skupini isključene su sve pacijentice koje su razvile klinički i/ili ultrazvučno prepoznatljive znakove hiperstimulacije; (II) najveći broj dosadašnjih istraživanja za indukciju multiple oogeneze koristilo je humani menopauzalni gonadotropin (hMG), za koji je poznato da u odnosu na rekombinantni FSH češće uzrokuje OHSS i potiče produkciju veće količine estradiola tijekom KOH<sup>165</sup>. Novije činjenice spoznate korištenjem suvremenih molekularnih, genetičkih i farmakoloških metoda ukazuju da estrogeni i progesteron imaju bitno različite učinke na ekspresiju VEGF-a *in vivo*. S jedne strane, estrogeni podržavaju vaskularnu propusnost uterinih i ovarijskih žila istodobno duboko potiskujući angiogenezu, dok progesteron stimulira angiogenezu i ima vrlo mali ili nikakav učinak na propusnost kapilara. Učinak

oba hormona jajnika je permisivne prirode, posredovan prije svega različitom vremenskom i prostornom ekspresijom proangiogeničnih čimbenika<sup>166</sup>.

Veza između razine PlGF-a i produkcije steroidnih hormona jajnika tijekom gonadotropinske stimulacije nije poznata. Ovim je istraživanjem nađeno da su folikulinske vrijednosti PlGF u pozitivnoj korelaciji jedino s razinom progesterona i brojem oplođenih stanica. Zanimljivo je, međutim da korelacija jača u skupini žena u kojih postupak nije uspio, a da je u trudnica korelacija negativnog (iako nesignifikantna) predznaka, što –slično utjecaju VEGF-a- govori o potencijalno negativnom učinku visokih vrijednosti PlGF-a na konačni ishod postupka. S obzirom na pozitivnu korelaciju PlGF-a s brojem zametaka te brojem oocita, može se spekulirati da visoka razina PlGF-a u folikulinskoj tekućini ne utječe negativno preko kvalitete oocita niti zametaka, odnosno da je taj utjecaj neovisan o ova dva čimbenika.

***VEGF i PlGF tijekom implantacijskog prozora i u ranoj trudnoći (14. i 21. dan stimuliranog ciklusa)***

Nađeno je da je serumski VEGF u trudnica 14. dana nakon embriotransfera blago povišen u odnosu na žene koje nisu zatrudnile ali je niži nego vrijednosti 0-tog dana koncepcijskog ciklusa. Tumačenje te razlike prije svega svodi se na postojanje multiplih žutih tijela u stimuliranom ciklusu, pa prema tome povišene razine VEGF-a porijekla su jajnika, a ne tek usađenog embrija. Prema Neulenu i sur.<sup>167</sup> periimplantacijska produkcija endogenog hCG-a pojačava produkciju VEGF-a neizravno, održavanjem ovarija i žutog tijela. U njihovoj seriji stimuliranih žena nije bilo razlike između vrijednosti VEGF-a koncepcijskih i nekoncepcijskih ciklusa, što govori u prilog tezi o postupnom smanjenju cirkulirajućeg VEGF-a koji je porijekla iz ovarija, te da je kasniji eventualni porast u trudnoći ekstraovarijskog porijekla. S napredovanjem trudnoće, vrijednosti VEGF-a imaju tendenciju daljnjeg snižavanja; serumske vrijednosti posebno značajno padaju nakon drugog tjedna, dok hCG očekivano raste.

Dinamika serumskog PIGF-a upravo je obrnuta od one VEGF-a; koncentracija u koncepcijskom ciklusu postupno raste dok u nekoncepcijskom opada. Naknadnom obradom podataka, nađena je jasna pozitivna korelacija u između serumskog PIGF i hCG-a 14. dana odnosno hCG-a 21. dana ciklusa, ali ne i između VEGF-a i hCG-, bez obzira na ishod ciklusa. Ovo može značiti da u postkoncepcijskom periodu hCG ima značajniju ulogu u modeliranju stvaranja i biološkoj aktivnosti PIGF-a nego VEGF-a, no mehanizme te međuovisnosti tek treba razjasniti prije svega na većim uzorkom i uz određivanje VEGFR-1.

Početak vaskularnih adaptivnih promjena na fetomaternalnoj površini tek je nedavno utvrđena. Rast krvnih žila posteljice započinje vrlo rano, već 19-21. postkoncepcijskog dana, a ekspresija brojnih angiogeničnih mRNK može se dokazati već od stadija 4-staničnog embrija<sup>168-170</sup>. Ubrzo nakon invazije endometrija, započinje intenzivno umnažanje krvnih žila, stvaranje vaskularnih ovoja i u konačnici organizacija posteljice.

Mehanizam djelovanja PIGF-a u trudnoći nije poznat. Blagi ali trajni porast serumskog PIGF-a odmah nakon implantacije govori u prilog vjerojatnog stvaranja u posteljici<sup>171</sup>. Imunohistokemijska istraživanja otkrivaju da je za razliku od ekspresije VEGF-a koja je najjača u ranoj trudnoći<sup>172</sup>, ekspresija PIGF-a i VEGFR-1 raste tek s njenim napredovanjem<sup>173</sup>. PIGF se može dokazati u sinciciotrofoblastu<sup>174</sup>, ali i u mediji većih žila<sup>175</sup>. Imunolokalizacija oba čimbenika u drugih vrsta sugerira njihovu umiješanost u sam proces implantacije i moduliranja različitog ustroja posteljice u različitim vrstama<sup>176</sup>. Studija Langa i sur.<sup>177</sup> pokazala je da PIGF *in vivo* stimulira proliferaciju mikrovaskularnih endotelnih stanica humane posteljice, a Ziche i sur.<sup>178</sup> su dodatno potvrdili da se radi o izravnom učinku PIGF-a, što je u suprotnosti s ranijim radovima u *in vitro* uvjetima.

S obzirom na promjene stvaranja VEGF-a i pad PIGF-a u ovisnosti o parcijalnom tlaku mikrookoliša, ravnotežu stvaranja oba angiogenična čimbenika najvjerojatnije regulira parcijalni tlak kisika, uz ogradu da posteljica u različitom stadiju sazrijevanja i gestacije različito reagira na promjene u količini raspoloživog kisika<sup>179</sup>. U ranoj normalnoj trudnoći, blaga prevaga

PlGF-a nad VEGF-om osigurava potenciranje biološke aktivnosti VEGF-a na razini vaskulogeneze, na što ukazuju i rezultati dobiveni ovim istraživanjem.

Nekoliko je predloženih mehanizama koji objašnjavaju molekularnu regulaciju između PlGF-a i VEGF-a u uvjetima patološke, a u određenim uvjetima vjerojatno i fiziološke angiogeneze:

1. PlGF i VEGFR-1 se zbog gotovo potpune supresije teško dokazuju u rezervnim vaskularnim stanicama odrasle jedinke, ali se ekspresija u povećanom obimu može dokazati tijekom svih stanja povećanog zahtjeva za angiogenezom.

2. PlGF može pojačati angiogeni odgovor endotelnih stanica na VEGF, na način da s njime stvara VEGF/PlGF heterodimere koji su otkriveni u različitim tumorima i za koji se smatra da predstavljaju odgovor na hipoksiju<sup>180,181</sup>.

3. PlGF aktivira VEGFR-1 u smislu prijenosa angiogenog signala, čiji se učinak može blokirati dodatkom anti VEGFR-1 antitijela kako *in vitro*, tako i *in vivo*<sup>113</sup>. U skladu s tim, ukoliko bi jedina funkcija PlGF-a bila „zauzimanja“ VEGFR-1 receptora, onda bi i antitijela protiv samog receptora imala također proangiogenični učinak. Pojačana ekspresija VEGFR-1 u patološkoj angiogenezi u usporedbi s embrionalnom angiogenezom i inhibicija PlGF-a putem inhibicije Src-kinaze, konzistentna je s ulogom PlGF-a i VEGFR-1 signaliziranju angiogenih učinaka. PlGF najvjerojatnije pojačava angiogenezu na bar dva do sada poznata načina: spomenutim «istiskivanjem» VEGF-a iz «lažnog» VEGFR-1 receptora i povećanje frakcije slobodnog VEGF-a za aktivaciju VEGFR-2, ali i izravnom aktivacijom VEGFR-1 koji VEGF ne aktivira<sup>182, 183</sup>.

4. PlGF je snažan kemoatraktant inflamatornih stanica što je značajno za središnji mehanizam patološke angiogeneze i kolateralnog rasta, ali može biti iznimno važno i za mobilizaciju pojedinih subpopulacija upalnih stanica u endometriju. To se u prvom redu odnosi za uterine NK stanice (uNK, uterine natural killer, CD56<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), za koje je poznato da imaju važnu ulogu u pospješenoj implantaciji i održavanju rane trudnoće<sup>184</sup>. Iako za sada nema

konkretnih istraživanja, jedna od pretpostavki bila bi mogućnost kemotaksije uterinih NK-leukocita, putem -na njihovoj površini također dokazanog-receptora VEGFR-1 (Flt-1)<sup>185</sup>. Alternativno, uNK mogu biti i izvor velikih količina kako VEGF-a, tako i PlGF-a jer je sposobnost sinteze oba angiogenična faktora rasta također dokazana u CD56<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> limfocitima<sup>184</sup>.

### ***Predikcijska vrijednost PlGF i VEGF na ishod postupka***

Visoke folikulinske i serumske vrijednosti VEGF-a negativno se odražavaju na ishod postupka izvantjelesne oplodnje<sup>68,141</sup>. U ovom istraživanju, koncentracija VEGF-a u folikulinskoj tekućini pokazala je nepovoljan utjecaj na ishod postupka izvantjelesne oplodnje. Međutim, regresijska analiza pokazala je da i PlGF ima stanovit utjecaj, neizravno, putem amplifikacije nepovoljnog djelovanja VEGF-a, a koji je postao vidljiv tek u multivarijantnom modelu.

Nije jasan način na koji spomenuti čimbenici nepovoljno utječu na ishod postupka, ali on svakako nije izravan. Količina egozogenog FSH unatoč statističkoj značajnosti, također najvjerojatnije ima neizravan utjecaj. Nepovoljan utjecaj visokih vrijednosti VEGF-a u folikulinskoj tekućini na ishod postupka izvantjelesne oplodnje opisan je i prije, a povezivan je ponajprije s smanjenom ovarijskom rezervom koja je u funkciji biološke dobi žene podvrgnute stimulaciji, što se reflektira već pomenutom vezom između ukupno primjenjene doze gonadotropina i VEGF-a<sup>68</sup>.

Do sada nije učinjen pokušaj kvantificiranja tog nepovoljnog djelovanja angiogeničnih proteina na ishod postupka kao što je to učinjeno u ovom istraživanju. Prema dobivenim rezultatima, broj oplođenih jajnih stanica (broj zametaka), razina PlGF i VEGF u folikulinskoj tekućini, te koncentracija PlGF u serumu imaju najjaču predikcijsku vrijednost uspješnosti stimuliranog IVF ciklusa, koja je dosegla 85,37%. Dodatnom analizom, utvrđeno je da povišene vrijednosti VEGF i PlGF u folikulinskoj tekućini, pokazuju više od 4 puta manju vjerojatnost uspješnog postupka izvantjelesne oplodnje (omjer šansi, OR=4,25; interval pouzdanosti, CI=1,00-18,07), nego kada su povišeni samo VEGF ili samo PlGF. Dodatno uvrštenje varijable poput vrijednosti serumskih

koncentracija navedenom modelu, ne poboljšava sposobnost identifikacije ovih pacijentica.

Ovi rezultati još jednom ukazuju na sinergizam između PlGF-a i VEGF i na tragu su radova o negativnom utjecaju folikulinskog VEGF-a na ishod IVF postupka. Kako bi se stekao uvid u (pato)fiziološke mehanizme tog utjecaja, neophodna su daljnja istraživanja, prije svega na uzorcima staničnih kultura granulose te na velikim uzorcima.

U ovoj studiji nazočna su dva važna ograničenja:

1. Nedostatak adekvatne kontrolne skupine, prije svega određivanje PlGF-a u prirodnom ciklusu. Nepoznavanje vrijednosti PlGF-a u spontanom menstruacijskom ciklusu u oba odjeljka otežava tumačenje nalaza u induciranih ciklusa
2. Drugo važno ograničenje tiče se kompleksnosti u regulaciji angiogeničnih čimbenika rasta i njihovih receptora. Upoznavanje značaja topivog oblika receptora za VEGF i PlGF (sVEGFR-1) u najnovije vrijeme te nemogućnost uvrštenja u dobivene rezultate bitno otežava interpretaciju biološke vrijednosti dobivenih nalaza, te stoga navedeni zaključci vrijede za slobodne oblike oba istraživana čimbenika.

## 5.0 Zaključci

VEGF i PlGF aktivno sudjeluju u regulaciji folikulogeneze tijekom kontrolirane ovarijske stimulacije. Mehanizmi te regulacije kompleksni su i u mnogim aspektima još uvijek nepoznati.

Ovo je prvi dokaz da se uz VEGF, i PlGF također stvara u rastućem folikulu.

VEGF je u stimuliranih ciklusa ovisan o gonadotropinima. PlGF ne pokazuje ovisnost o primjenjenoj količini FSH.

Nije dokazana povezanost stvaranja serumskog PlGF o dobi, gonadotropinima, estradiolu i progesteronu.

Folikulinski PlGF povezan je s razinom progesterona u serumu i negativno korelira s VEGF-om u oba istraživana odjeljka

VEGF i PlGF pokazuju izražene promjene tijekom KOH i ranoj trudnoći. Razina oba angiogenična čimbenika u serumu ne pokazuju značajnu razliku u konceptijskim i nekonceptijskim ciklusima. Postoje razlike u dinamici stvaranja oba angiogenična čimbenika između žena čiji ciklus završi trudnoćom i onih koje nisu trudne.

U najranijoj trudnoći razina PlGF-a naglo raste nakon implantacije; VEGF u isto vrijeme teži opadanju.

Visoka koncentracija VEGF u folikulinskoj tekućini povezana je s nepovoljnim ishodom stimuliranog ciklusa. Učinak je sinergičan ako su oba čimbenika istodobno povišena. Na temelju podataka dobivenih u ovom istraživanju, koncentracije oba čimbenika u folikulinskoj tekućini mogu biti koristan biljeg za ishod potpomognute reprodukcije.

## 6.0 Sažetak

**Uvod** Vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF) i posteljični čimbenik rasta (PIGF) ključni su angiogenični stimulatori tijekom normalnog razvoja i cijeljenju rane, te u brojnim patološkim stanjima. Novija istraživanja pokazala su sinergistički učinak VEGF-a i PIGF-a u patološkoj angiogenezi, sugerirajući ulogu PIGF-a u amplifikaciji djelovanja VEGF-a u endotelnim stanicama. Gonadotropini potiču rast folikula u ovariju koji se odvija u uvjetima pojačane intrafolikulinske vaskularizacije, sugerirajući važnu ulogu angiogeneze u razvoju folikula. Ove vazoaktivne tvari mogu biti odgovorne za intenzivno remodeliranje ovarija i vaskulogenezu u najranijoj trudnoći.

**Ispitanice i metode.** Istraživanjem je obuhvaćeno 42 žene podvrgnute kontroliranoj ovarijskoj hiperstimulaciji (KOH) u svrhu liječenja neplodnosti. U svih je žena određivan PIGF i VEGF u folikulinskoj tekućini i serumu na dan aspiracije, dva tjedna nakon embriotransfera (ET), te u slučaju pozitivnog testa na trudnoću, i tjedan dana kasnije. Estradiol i progesteron na dan aspiracije oocita također je određen u svih ispitanica.

**Rezultati.** Od 42 žene koje su zadovoljavale kriterija uključenja u studiju, (prosječna dob  $32,88 \pm 4,29$ g), 14 je žena imalo pozitivan test na trudnoću. Koncentracija VEGF-a i PIGF-a u folikulinskoj tekućini na dan aspiracije bila je značajno veća od odgovarajućih vrijednosti u serumu ( $P < 0.0001$ ). Dinamičke i međusobno inverzne promjene VEGF-a i PIGF-a dokazane su u koncepcijskim u odnosu na nekoncepcijske IVF cikluse, što govori u prilog posteljičnog porijekla oba čimbenika nakon embriotransfera i u vrlo ranoj trudnoći. Vrijednosti VEGF-a u folikulinskoj tekućini bile su u izravnoj korelaciji s brojem ampula gonadotropina primjenjenih tijekom stimulacije ( $r = 0,43$ ,  $P < 0,005$ ), ali inverznoj korelaciji s estradiolom u serumu na dan aspiracije oocita ( $r = -0,37$ ,  $P < 0,01$ ). Pozitivna korelacija nađena je za folikulinski PIGF (FF PIGF) i serumski progesteron ( $r = 0,36$ ,  $P < 0,02$ ), te broj dobivenih zametaka ( $r = 0,44$ ,  $P = 0,005$ ), ali i inverznu korelaciju između



folikulinskih vrijednosti samih VEGF-a i PlGF-a ( $r = 0,38$ ,  $P = 0,01$ ). Ishod postupka IVF negativno je korelirao s količinom folikulinskog VEGF-a ( $r = 0,28$ ,  $P < 0,04$ ). U svrhu određivanja omjera šansi, primjenjena je logistička regresija za konstruiranje modela vjerojatnosti negativnog ishoda postupka IVF. Rezultati omjera šansi jasno su pokazali da su povišene vrijednosti jednog ili oba angiogenična čimbenika u folikulinskoj tekućini, udružene s većom vjerojatnošću negativnog ishoda IVF postupka. (OR=4,25; CI=1,00-18,7).

**Zaključak.** Rezultati ove studije pružaju od prvi dokaz o ulozi i regulaciji PlGF-a u kontroliranoj ovarijskoj stimulaciji, odnos s drugim čimbenicima angiogeneze i odnos spram periimplantacijskom razdoblju i najranijoj trudnoći. Istraživanje po prvi put uzima u obzir da uz VEGF, i povećana razina PlGF-a u folikulinskoj tekućini također može biti biljeg veće vjerojatnosti nepovoljnog ishoda IVF postupka, te može pojačati nepovoljne učinke VEGF-a.

## 6.1 Summary

**Background:** Vascular endothelial growth factor (VEGF) and placental growth factor (PlGF) are key angiogenic stimulators during normal development and wound healing, as well as in a variety of pathological conditions. Recent studies have demonstrated a synergistic effect of VEGF and PlGF in pathological angiogenesis and suggest a role for PlGF in amplifying VEGF action in endothelial cells. Gonadotropins induce ovarian follicle growth that is coincident with increased follicular vasculature, suggesting a role of angiogenesis in follicle development. These vasoactive substances may be implicated in extensive ovarian tissue remodelling and in early pregnancy.

**Methods:** The present report investigated follicular fluid (FF) and circulating concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placental growth factor (PlGF) in 42 consecutive IVF patients. Serum and FF concentrations of oestradiol and progesterone were also measured in the 42 IVF cycles studied.

**Results:** Of the forty-two women enrolled in the study (mean age  $32,88 \pm 4,29$ ), fourteen women become pregnant. Follicular fluid concentrations of both VEGF and PlGF were significantly higher ( $P < 0.0001$ ) than the corresponding circulating concentrations. A dynamical and inverse changes of VEGF and PlGF occurred in the conception compared to nonconception IVF cycles suggesting placental origin of both angiogenic factors in early pregnancy. FF VEGF concentration showed a direct relationship with number of gonadotrophin ampoules administered ( $r = 0,43$ ,  $P < 0,005$ ), but an inverse correlation with estradiol concentration ( $r = -0,37$ ,  $P < 0,01$ ). A positive correlation was found for FF PlGF concentration and progesterone concentrations ( $r = 0,36$ ,  $P < 0,02$ ) and number of embryo fertilized ( $r = 0,44$ ,  $P = 0,005$ ), but inverse correlations between FF VEGF and FF PlGF ( $r = 0,38$ ,  $P = 0,01$ ). The IVF outcome was negatively correlated with FF VEGF ( $r = 0,28$ ,  $P < 0,04$ ). To estimate odds ratios, logistic regression analysis was used

to model the probability of negative IVF outcome. The resulting odds ratio clearly demonstrated that, when considered individually higher level of either VEGF or PlGF in FF are associated with an increased probability of negative IVF outcome (OR=4,25; CI=1,00-18,7).

**Conclusions:** This study suggested for the first time that increased FF concentrations of PlGF also can be a marker of decreased IVF outcome and can amplify the negative effects of VEGF. Our results also provide some of the first evidence of role and regulation of PlGF in controlled ovarian hyperstimulation and in early pregnancy.

## **7.0 Životopis**

Erden Radončić rođen je 20.06.1964. u Kumanovu, Rep. Makedonija. Osnovnu i srednju školu pohađao je i završio u rodnom mjestu, a studij medicine 1991. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Skopju. Iste je godine upisao i s uspjehom završio poslijediplomski studij iz Kliničke imunologije na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Pripravnički staž položio je 1993.

Od 1994. do 1998. u cijelosti proveo specijalistički staž iz ginekologije i opstetricije u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb, a specijalistički ispit položio u lipnju 1998. Tijekom specijalizacije aktivno sudjeluje u dodiplomskoj i poslijediplomskoj nastavi, te znanstveno-istraživačkim projektima. Magisterij po naslovom „Lupus antikoagulant u trudnica s zadržanim pobačajem“ obranio je u siječnju 1999 na Medicinskom fakultetu u Zagrebu.

Od 01. 03.1999. radi kao specijalist ginekologije i porodništva. Autor je nekoliko radova indeksiranih u CC i Index Medicus, te više poglavlja u monografijama i udžbenicima.

## 8.0 Popis literature

1. Koblizek TI, Weiss C, Yancopoulos GD, Deutsch U, Risau W. Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Curr Biol* 1998; 8: 529-32.
2. Klagsbrun M, D'Amore D. Regulation of angiogenesis. *Ann Rev Physiol* 1991; 53: 217-39.
3. Nguyen M, Watanabe H, Budson AE, Richie JP, Folkman J. Elevated levels of angiogenic peptide basic fibroblast growth factor in urine of bladder cancer patient. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 241-2.
4. Yamamoto S, Konishi Y, Tsuruta Y, Nanbu K, Mandai M, Kuroda H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) during folliculogenesis and corpus luteum formation in the human ovary. *Gynecol Endocrinol* 1997; 11: 371-81.
5. Dewitt N. Angiogenesis. *Nature*. 2005; 438: 931-5.
6. Li X, Eriksson U. Novel VEGF family members: VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001; 33: 421-6.
7. Koos RD, Kazi AA, Roberson MS, Jones JM. New insight into the transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor expression in the endometrium by estrogen and relaxin. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1041: 233-47.
8. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005; 438: 932-6.
9. Gordon JD, Shifren JL, Foulk RA, Taylor RN, Jaffe RB. Angiogenesis in the Human Female Reproductive Tract. *Obstet Gynecol Surv* 1995; 50: 688-97.
10. Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, Silva M, Schilling J, Lau K, et al. Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-

derived growth factor gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165, 1198–206.

11. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Rev* 1997; 18: 4-25.
12. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992; 267.
13. Klagsbrun D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7: 259-70.
14. Gordon JD, Mesiano S, Zaloudek CJ. Vascular endothelial growth factor localization in human ovary and fallopian tubes: possible role in reproductive function and ovarian cyst formation. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 353-9.
15. Enholm B, Paavonen K, Ristimaeki A, Kumar V, Gunji Y, Klefstrom J, et al. Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene* 1997; 14: 2475–83.
16. Shweiki D, Itin A, Soffer D, and Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature (London)* 1992; 359: 843–5.
17. Safran M, Kaelin WG Jr. HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *J Clin Invest* 2003; 111: 779–83.
18. Laitinen M, Ristimaki A, Honkasalo M, Narko K, Paavonen K, Ritvos O. Differential hormonal regulation of vascular endothelial growth factors VEGF, VEGF-B, and VEGF-C messenger ribonucleic acid levels in cultured human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 1997; 138: 4748-56.
19. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Ferraro MG, Aprelikova O, Alitalo K, et al. Two alternative mRNAs coding for the angiogenic

factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene* 1993; 8: 925-31.

20. Cao Y, Chen H, Zhou L, Chiang MK, Anand-Apte B, Weatherbee JA et al. Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor: endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 1996; 271: 3154-62.
21. DiSalvo J, Bayne ML, Conn G, Kwok PW, Trivedi PG, Soderman DD, et al. Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor-placenta growth factor heterodimer. *J Biol Chem* 1995; 270: 7717-23.
22. Sho M, Akashi S, Kanehiro H, Hamada K, Kashizuka H, Ikeda N, et al. Function of the vascular endothelial growth factor receptors Flt-1 and Flk-1/KDR in the alloimmune response in vivo. *Transplantation* 2005; 80: 717-22.
23. Kurz H, Wilting J, Sandau K, Christ B. Automated evaluation of angiogenic effects mediated by VEGF and PlGF homo- and heterodimers. *Microvasc Res* 1998; 55: 92-102.
24. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res.* 2005; 65: 550-63.
25. Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Aonuma M, Shibuya M. Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth Differ.* 1996 Feb;7: 213-21.
26. Terman B, Dougher-Vermazen M, Carrion M, Dimitrov V, Armellino D, Gospodarovicz D, and Bohlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187: 1579-86.

27. Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y, et al. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO Journal* 1997; 16: 3898-911.
28. Gerber H, Condorelli F, Park J and Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 1997; 272: 23659-67.
29. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M and Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376: 66-70.
30. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; 376: 62-6.
31. Röckl W, Hecht D, Sztajer H, Waltenberger J, Yayon A and Weich H. Differential binding characteristics and cellular inhibition by soluble VEGF receptors 1 and 2. *Exp Cell Res* 1998; 241: 161-70.
32. Dumont D, Jussila L, Taipale J, Lymboussakis A, Mustonen T, Pajusola K, et al. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 1998; 282: 946-9.
33. Dumont D, Yamaguchi T, Conlon R, Rossant J and Breitman M. Tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene* 1992; 7: 1471-80.
34. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg BK, Fujiwara Y, Gendron MM, et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995; 376: 70-4.
35. Kaipainen A, Vlaykova T, Hatva E, Böhling T, Jekunen A, Pyrhönen S, et al. Enhanced expression of the Tie receptor tyrosine kinase



messenger RNA in the vascular endothelium of metastatic melanomas. *Cancer Res* 1994; 54: 6571-7.

36. Saharinen P, Kerkela K, Ekman N, Marron M, Brindle N, Lee GM, et al. Multiple angiopoietin recombinant proteins activate the Tie1 receptor tyrosine kinase and promote its interaction with Tie2. *J Cell Biol* 2005; 169: 239-43.
37. Elias KA, Weiner RI. Direct arterial vascularization of estrogen-induced prolactin-secreting anterior pituitary tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:4549-53.
38. Banerjee SK, Sarkar DK, Weston AP, De A, Campbell DR. Overexpression of vascular endothelial growth factor and its receptor during the development of estrogen-induced rat pituitary tumors may mediate estrogen-initiated tumor angiogenesis. *Carcinogenesis* 1997; 18:1155-61.
39. Jabbour HN. Pattern and localisation of expression of vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1 in the ovine pituitary gland: expression is independent of hypothalamic control. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 134: 91-100.
40. Schechter J, Goldsmith P, Wilson C, Weiner R. Morphological evidence for the presence of arteries in human prolactinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67: 713-9.
41. Suzuki T, Sasano H, Takaya R, Fukaya T, Yajima A, Nagura H. Cyclic changes of vasculature and vascular phenotypes in normal human ovaries. *Hum Reprod* 1998; 13: 953-9.
42. Van Blercom J, Antzak M, Schrader R. The development potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod* 1997; 12: 1047-554.

43. Zimmerman RC, Xiao E, Bohlen P, Ferin M. Administration of antivascular endothelial growth factor receptor 2 antibody in the early follicular phase delays follicular selection and development in the rhesus monkey. *Endocrinology* 2002; 143: 2496–2502.
44. Anasti JN, Kalantaridou SN, Kimzey LM, George M, Nelson LM. Human follicle fluid vascular endothelial growth factor concentrations are correlated with luteinization in spontaneously developing follicles. *Hum Reprod.* 1998; 13: 1144-7.
45. Yonekura H, Sakurai S, Liu X, Migita H, Wang H, Yamagishi S, et al. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B and C expression in microvascular endothelial cells and pericytes. Implication in autocrine and paracrine regulation of angiogenesis. *J Biol Chem.* 1999 3; 274: 35172-8.
46. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber H, Nguyen T, Peers D, et al. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nature Med* 1998; 4:336-40.
47. Fraser HM, Lunn SF. Angiogenesis and its control in the female reproductive system. *Br Med Bull* 2000; 56: 787-97.
48. Yan Z, Neulen J, Raczek S, Weich HA, Grunwald K, Breckwolt M. Vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability factor (VPF) production by luteinized human granulosa cells in vitro; a paracrine signal in corpus luteum formation. *Gynecol Endocrinol.* 1998;12: 149-53
49. Neulen J, Raczek S, Pogorzelski M, Grunwald K, Yeo TK, Dvorak HF, et al. Secretion of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor from human luteinized granulosa cells is human chorion gonadotrophic dependent. *Mol Hum Reprod.* 1998; 4 :203-6.

50. Sakurai T, Tamura K, Kogo H. Stimulatory effects of eicosanoids on ovarian angiogenesis in early luteal phase in cyclooxygenase-2 inhibitor-treated rats. *Eur J Pharmacol* 2005; 516: 158-64.
51. Gargett CE, Rogers PA. Human endometrial angiogenesis. *Reproduction* 2001; 121: 181-6.
52. Taylor RN, Lebovic DI, Hornung D, Mueller MD. Endocrine and paracrine regulation of endometrial angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 943: 109-21.
53. Gambino LS, Wreford NG, Bertram JF, Dockery P, Lederman F, Rogers PA. Angiogenesis occurs by vessel elongation in proliferative phase human endometrium. *Hum Reprod* 2002; 17: 1199-206.
54. Krussel JS, Casan EM, Raga F, Hirchenhain J, Wen Y, Huang HY, et al. Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor transmembraneous receptors Flt1 and KDR, and the soluble receptor sflt in cycling human endometrium. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 452-8.
55. Koga K, Osuga Y, Tsutsumi O, Yano T, Yoshino O, Takai Y, et al. Demonstration of angiogenin in human endometrium and its enhanced expression in endometrial tissues in the secretory phase and the decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5609-14.
56. Sugino N, Kashida S, Karube-Harada A, Takiguchi S, Kato H. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Reproduction* 2002; 123: 379-87.
57. Ancelin M, Buteau-Lozano H, Meduri G, Osborne-Pellegrin M, Sordello S, Plouet J, et al. A dynamic shift of VEGF isoforms with a transient and selective progesterone-induced expression of VEGF189 regulates angiogenesis and vascular permeability in human uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 6023-8.

58. Graubert MD, Ortega MA, Kessel B, Mortola JF, Iruela-Arispe ML. Vascular repair after menstruation involves regulation of vascular endothelial growth factor-receptor phosphorylation by sFLT-1. *Am J Pathol* 2001; 158: 1399-410.
59. Moller B, Rasmussen C, Lindblom B, Olovsson M. Expression of the angiogenic growth factors VEGF, FGF-2, EGF and their receptors in normal human endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 2001 Jan; 7: 65-72.
60. Greb R, Heikinheimo O, Williams R, Hodgen G, Goodman A. Vascular endothelial growth factor in primate endometrium is regulated by oestrogen-receptor and progesterone-receptor ligands in vivo. *Hum Reprod* 1997; 12: 1280-92.
61. Shifren J, Tseng J, Zaloudek C, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N, et al. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3112-8.
62. Cullinan-Bove K, Koos R. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology* 1993; 133: 829-37.
63. Karuri A, Kumar A, Mukhopadhyay D. Differential expression and selective localization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in the rat uterus during the estrous cycle. *J Endocrinol* 1998; 159: 488-99.
64. Zhang L, Scott P, Turley H, Leek R, Lewis C, Gatter K. Validation of anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) antibodies for immunohistochemical localization of VEGF in tissue sections: expression of VEGF in the human endometrium. *J Pathol* 1998; 185:402-8.

65. Hornung D, Lebovic D, Shifren J, Vigne J, Taylor R. Vectorial secretion of vascular endothelial growth factor by polarized human endometrial epithelial cells. *Fertil Steril* 1998; 69: 909-15.
66. Hyder S, Chiapetta C, Stancel G. Triphenylethylene antioestrogens induce uterine vascular endothelial growth factor expression via their partial estrogen agonist activity. *Cancer Letters* 1997; 120: 165-71.
67. Doldi N, Bassan M, Fusi FM, Ferrari A. In controlled ovarian hyperstimulation, steroid production, oocyte retrieval, and pregnancy rate correlate with gene expression of vascular endothelial growth factor. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14: 589-92.
68. Friedman CI, Seifer DB, Kennard EA, Arbogast L, Alak B, Danforth DR. Elevated level of follicular fluid vascular endothelial growth factor is a marker of diminished pregnancy potential. *Fertil Steril* 1998; 70: 836-9.
69. Chaffin CL, Hess DL and Stouffer RL (1999) Dynamics of periovulatory steroidogenesis in the rhesus monkey follicle after ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1999; 14: 642-9.
70. Kamat BR, Brown LF, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. *Am J Pathol* 1995; 146: 157-65.
71. Agrawal R, Sladkevicius P, Engmann L, Conway GS, Payne NN, Bekis J, et al. Serum vascular endothelial growth factor concentrations and ovarian stromal blood flow are increased in women with polycystic ovaries. *Hum Reprod* 1998; 13: 651-5.
72. Agrawal R, Conway G, Sladkevicius P, Tan SL, Engmann L, Payne N, et al. Serum vascular endothelial growth factor and Doppler blood flow velocities in an in vitro fertilization: relevance to ovarian

hyperstimulation syndrome and polycystic ovaries. *Fertil Steril* 1998; 70: 651-8.

73. Navot D, Bergh PA, Laufer N. Ovarian hyperstimulation syndrome in novel reproductive technologies: prevention and treatment. *Fertil Steril* 1992; 58: 249-61.
74. Wheelan JG 3rd, Vlahos NF. The ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2000; 73: 883-96.
75. Loret de Mola JR, Baumgardner GP, Goldfarb JM, Friedlander MA. Ovarian hyperstimulation syndrome: pre-ovulatory serum concentrations of interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha cannot predict its occurrence. *Hum Reprod* 1996; 7: 1377-80.
76. Abramov Y, Barak V, Nisman B, Schenker JG. Vascular endothelial growth factor plasma levels correlate to the clinical picture in severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1997; 67: 261-5.
77. Artini PG, Fasciani A, Monti M, Luisi S, D'Ambrogio G, Genazzani AR. Changes in vascular endothelial growth factor levels and the risk of ovarian hyperstimulation syndrome in women enrolled in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1998; 70: 560-4.
78. Levin E, Rosen G, Cassidenti D, Yee B, Meldrum D, Wisot A, Pedram A. Role of vascular endothelial cell growth factor in ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Invest* 1998; 102: 1978-85.
79. Albert C, Garrido N, Mercader A, et al. The role of endothelial cells in the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol Hum Reprod* 2002; 8:409-18.
80. Wang TH, Horng SG, Chang CL, Wu HM, Tsai YJ, Wang HS, et al. Human chorionic gonadotropin-induced ovarian hyperstimulation syndrome is associated with up-regulation of vascular endothelial growth factor. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3300-8.

81. McElhinney B, Ardill J, Caldwell C, Lloyd F, McClure N. Variations in serum vascular endothelial growth factor binding profiles and the development of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2002; 78: 286-90.
82. Koboyashi H, Okada Y, Asahina T, Gotoh J, Terao T. The kallikrein-kinin system, but not vascular endothelial growth factor, plays a role in the increased vascular permeability associated with ovarian hyperstimulation syndrome. *J Mol Endocrinol* 1998; 20: 363-74.
83. Ludwig M, Gembruch U, Bauer O, Diedrich K. Ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) in a spontaneous pregnancy with fetal and placental triploidy: information about the general pathophysiology of OHSS. *Hum Reprod* 1998; 13: 2082-7.
84. Ludwig M, Bauer O, Lopens A, Jelkmann W, Diedrich K. Serum concentration of vascular endothelial growth factor cannot predict the course of severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 1998; 13: 30-2.
85. Nisolle M, Casanas Roux B, Anaf V, Mine J, Donnez J. Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 1993; 59: 681-4.
86. Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod* 1998; 13: 1686-90.
87. Suzumori N, Sugiura-Ogasawara M, Katano K, Suzumori K. Women with endometriosis have increased levels of placental growth factor in the peritoneal fluid compared with women with cystadenomas. *Hum Reprod.* 2003; 18: 2595-8.
88. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Millican SA, Muller KH, et al. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid

macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest* 1996; 98: 482–9.

89. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996; 380: 439-42.
90. Cheung CY, Brace RA. Developmental expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in ovine placenta and fetal membranes. *J Soc Gynecol Investig* 1999; 6: 179-85.
91. Enders AC, Lantz KC, Peterson PE, Hendrickx AG. From blastocyst to placenta: the morphology of implantation in the baboon. *Hum Reprod Update* 1997; 3: 561-73.
92. Athanassiades A, Hamilton GS, Lala PK. Vascular endothelial growth factor stimulates proliferation but not migration or invasiveness in human extravillous trophoblast. *Biol Reprod* 1998; 59: 643-54.
93. Kingdom J, Huppertz B, Seaward G, Kaufmann P. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 92: 35-43.
94. Lash GE, Cartwright JE, Whitley GS, Trew AJ, Baker PN. The effects of angiogenic growth factors on extravillous trophoblast invasion and motility. *Placenta* 1999; 20: 661-7.
95. Achen MG, Gad JM, Stacker SA, Wilks AF. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor are co-expressed during early embryonic development. *Growth Factors* 1997; 15: 69–80.
96. Ghosh D, Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Dhawan L, Dhara S, Smith SK, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placental growth factor (PlGF) in conceptus and endometrium during implantation in the rhesus monkey. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 935-41.



97. Crocker IP, Strachan BK, Lash GE, Cooper S, Warren AY, Baker PN. Vascular endothelial growth factor but not placental growth factor promotes trophoblast syncytialization in vitro. *J Soc Gynecol Investig* 2001; 8: 341-6.
98. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, et al. Human Cytotrophoblasts Adopt a Vascular Phenotype as They Differentiate: A Strategy for Successful Endovascular Invasion? *J Clin Invest* 1997; 99: 2139-51.
99. Clark DE, Smith SK, Sharkey AM, Charnock-Jones DS. Localization of VEGF and expression of its receptors flt and KDR in human placenta throughout pregnancy. *Hum Reprod* 1996; 11:1090-8.
100. Baker PN, Krasnow J, Roberts JM, Yeo KT. Elevated serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1995; 86: 815-21.
101. Sharkey AM, Cooper JC, Balmforth JR, McLaren J, Clark DE, Charnock-Jones DS, et al. Maternal plasma levels of vascular endothelial growth factor in normotensive pregnancies and in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 1182-5.
102. Thadhani R, Mutter WP, Wolf M, Levine RJ, Taylor RN, Sukhatme VP et al. First trimester placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase 1 and risk of preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 770-5.
103. Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, et al. 2002 Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol* 2002; 160: 1405–23.

104. Wolf M, Hubel CA, Lam C, Sampson M, Ecker JL, Ness RB, et al. Preeclampsia and future cardiovascular disease: potential role of altered angiogenesis and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 6239-43.
105. Lyall F, Young A, Boswell F, Kingdom JC, Greer IA. Placental expression of vascular endothelial growth factor in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction does not support placental hypoxia at delivery. *Placenta* 1997; 18: 269-76.
106. Mac Gabhann F, Popel AS. Model of competitive binding of vascular endothelial growth factor and placental growth factor to VEGF receptors on endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: H153-64.
107. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249–57.
108. Viglietto G, Romano A, Maglione D, Rambaldi M, Paoletti I, Lago C, et al. Neovascularization in human germ cell tumors correlates with a marked increase in the expression of the vascular endothelial growth factor but not the placenta growth factor. *Oncogene* 1996; 13: 577-87.
109. Folkman, J. Angiogenesis-dependent diseases. *Semin Oncol* 2001; 28: 536–42.
110. Post, M.J., Laham, R., Sellke, F.W. & Simons, M. Therapeutic angiogenesis in cardiology using protein formulations. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 522–31.
111. Rahimi N. VEGFR-1 and VEGFR-2: two non-identical twins with a unique physiognomy. *Front Biosci* 2006 Jan 1;11: 818-29 (abstract).
112. Schlessinger J: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000, 103: 211–225.

113. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001; 7: 575–83.
114. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003; 9: 936–43.
115. Li X, Tjwa M, Moons L, Fons P, Noel A, Ny A, et al. Revascularization of ischemic tissues by PDGF-CC via effects on endothelial cells and their progenitors. *J Clin Invest* 2005;115: 118-27.
116. Pipp F, Heil M, Issbrucker K, Ziegelhoeffer T, Martin S, van den Heuvel J, et al. VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ Res* 2003; 92: 378–85.
117. Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, et al. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med* 2002; 8: 841–9.
118. Cao R, Brakenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, Wahlberg E, et al. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med* 2003; 9: 604–13.
119. Dixelius J, Makinen T, Wirzenius M, Karkkainen MJ, Wernstedt C, Alitalo K, et al. Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites. *J Biol Chem* 2003; 278: 40973–9.

120. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13: 9–22.
121. Shibuya M, Ito N, Claesson-Welsh L. Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237: 59–83.
122. Fong GH, Klingensmith J, Wood CR, Rossant J, Breitman ML. Regulation of flt-1 expression during mouse embryogenesis suggests a role in the establishment of vascular endothelium. *Dev Dyn* 1996; 207: 1-10.
123. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9349–54.
124. Kendall RL, Wang G, Thomas KA. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226: 324–328.
125. Clark DE, Smith SK, He Y, Day KA, Licence DR, Corps AN. A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. *Biol Reprod* 1998; 59: 1540–8.
126. Landgren E, Schiller P, Cao Y, Claesson-Welsh L. Placenta growth factor stimulates MAP kinase and mitogenicity but not phospholipase C- $\gamma$  and migration of endothelial cells expressing Flt 1. *Oncogene* 1998; 16: 359–67.
127. Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, Alitalo K. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10: 528–35.
128. Hatva E, Bohling T, Jaaskelainen J, Persico MG, Haltia M, Alitalo K. Vascular growth factors and receptors in capillary hemangioblastomas and hemangiopericytomas. *Am J Pathol* 1996; 148: 763–75.

129. Takahashi A, Sasaki H, Kim SJ, Kakizoe T, Miyao N, Sugimura T. Identification of receptor genes in renal cell carcinoma associated with angiogenesis by differential hybridization technique. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 855–9.
130. Viglietto G, Maglione D, Rambaldi M, Cerutti J, Romano A, Trapasso F. Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PIGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines. *Oncogene* 1995; 11: 1569–79.
131. Simons M, Ware JA. Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 863–71.
132. Suchanek E, Simunic V, Juretic D, Grizelj V. Follicular fluid contents of hyaluronic acid, follicle-stimulating hormone and steroids relative to the success of in vitro fertilization of human oocytes. *Fertil Steril* 1994; 62: 347-52.
133. Hunter MG, Robinson RS, Mann GE, Webb R. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim Reprod Sci.* 2004; 82-83:461-77.
134. Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil Steril* 2000; 74 (3): 429-37.
135. Quintana R, Kopcow L, Marconi G, Sueldo C, Speranza G, Baranao RI. Relationship of ovarian stimulation response with vascular endothelial growth factor and degree of granulosa cell apoptosis. *Hum Reprod* 2001; 16: 1814-8.
136. Manau D, Balasch J, Jimenez W, Fabregues F, Civico S, Casamitjana R, et al. Follicular fluid concentrations of adrenomedullin, vascular endothelial growth factor and nitric oxide in IVF cycles: relationship to ovarian response. *Hum Reprod* 2000; 15: 1295-9.

137. Malamitsi-Puchner A, Sarandakou A, Baka S, Hasiakos D, Kouskouni E, Creatsas G. In vitro fertilization: angiogenic, proliferative, and apoptotic factors in the follicular fluid. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 997: 124-8.
138. Hazzard TM, Christenson LK, Stouffer RL. Changes in expression of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 and -2 in the macaque corpus luteum during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod*. 2000; 6(11): 993-8.
139. Ludwig M, Jelkmann W, Bauer O, Diedrich K. Prediction of severe ovarian hyperstimulation syndrome by free serum vascular endothelial growth factor concentration on the day of human chorionic gonadotropin administration. *Hum Reprod* 1999; 14: 2437-41.
140. Chen CD, Chen HF, Lu HF, Chen SU, Ho HN, Yang YS. Value of serum and follicular fluid cytokine profile in the prediction of moderate to severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 2000; 15: 1037-42.
141. Artini PG, Monti M, Fasciani A, Battaglia C, Ambrogio GD, Genazzani AR. Vascular endothelial growth factor, interleukin-6 and interleukin-2 in serum and follicular fluid of patients with ovarian hyperstimulation syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Bio* 2002; 101: 169-74.
142. Agrawal R, Tan SL, Wild S, Sladkevicius P, Engmann L, Payne N, et al. Serum vascular endothelial growth factor concentrations in in vitro fertilization cycles predict the risk of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1999; 71: 287-93.
143. Welt CK, Smith ZA, Pauler DK, Hall JE. Differential regulation of inhibin A and inhibin B by luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and stage of follicle development. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86: 2531-7.

144. Delvigne A, Rozenberg S. Systematic review of data concerning etiopathology of ovarian hyperstimulation syndrome. *Int J Fertil Womens Med* 2002; 47: 211-26.
145. Benifla JL, Bringuier AF, Sifer C, Porcher R, Madelenat P, Feldmann G. Vascular endothelial growth factor, platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in the follicular fluid of patients undergoing IVF. *Hum Reprod* 2001; 16: 1376–81.
146. Sibug RM, Helmerhorst FM, Tijssen AM, de Kloet ER, de Koning J. Gonadotrophin stimulation reduces VEGF(120) expression in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Hum Reprod* 2002; 17: 1643-8.
147. Barroso G, Barrionuevo M, Rao P, Graham L, Danforth D, Huey S, et al. Vascular endothelial growth factor, nitric oxide, and leptin follicular fluid levels correlate negatively with embryo quality in IVF patients. *Fertil Steril* 1999; 72: 1024-6.
148. McElhinney B, Ardill J, Caldwell C, Lloyd F, McClure N. Ovarian hyperstimulation syndrome and assisted reproductive technologies: why some and not others? *Hum Reprod* 2002; 17: 1548-53.
149. Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R. Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *J Endocrinol* 2000; 167: 371-82.
150. Hyder SM. The role of steroid hormones on the regulation of vascular endothelial growth factor. *Am J Pathol* 2002; 161: 345-6.
151. Dabrosin C. Positive correlation between estradiol and vascular endothelial growth factor but not fibroblast growth factor-2 in normal human breast tissue in vivo. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8036-41.
152. Asimakopoulos B, Nikolettos N, Papachristou DN, Simopoulou M, Al-Hasani S, Diedrich K. Follicular fluid levels of vascular endothelial

growth factor and leptin are associated with pregnancy outcome of normal women participating in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Physiol Res* 2005; 54: 263-70.

153. Tokuyama O, Nakamura Y, Muso A, Fujino Y, Ishiko O, Ogita S. Vascular endothelial growth factor concentrations in follicular fluid obtained from IVF-ET patients: a comparison of hMG, clomiphene citrate, and natural cycle. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19: 19–23.
154. Klein NA, Battaglia DE, Woodruff TK, Padmanabhan V, Giudice LC, Bremner WJ, et al. Ovarian follicular concentrations of activin, follistatin, inhibin, insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, IGF-binding protein-2 (IGFBP-2), IGFBP-3, and vascular endothelial growth factor in spontaneous menstrual cycles of normal women of advanced reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4520–5.
155. Isobe N, Kitabayashi M, Yoshimura Y. Microvascular distribution and vascular endothelial growth factor expression in bovine cystic follicles. *Domest Anim Endocrinol* 2005; 29: 634-45.
156. Sibug RM, de Koning J, Tijssen AM, de Ruiten MC, de Kloet ER, Helmerhorst FM. Urinary gonadotrophins but not recombinant gonadotrophins reduce expression of VEGF120 and its receptors flt-1 and flk-1 in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Hum Reprod* 2005; 20: 649-56.
157. Friedman CI, Danforth DR, Herbosa-Encarnacion C, Arbogast L, Alak BM, Seifer DB. Follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations are elevated in women of advanced reproductive age undergoing ovulation induction. *Fertil Steril* 1997; 68: 607-12.
158. Lee A, Christenson K, Stouffer RL, Burry KA, Patton PE. Vascular endothelial growth factor levels in serum and follicular fluid of patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1997; 68: 305-11.



159. Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular growth factor levels and perifollicular flow characteristics. *Hum Reprod* 1997; 12: 1047-55.
160. Wolf M, Shah A, Lam C, Martinez A, Smirnakis KV, Epstein FH, et al. Circulating levels of the antiangiogenic marker sFLT-1 are increased in first versus second pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193: 16-22.
161. Chaiworapongsa T, Romero R, Kim YM, Kim GJ, Kim MR, Espinoza J, et al. Plasma soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 concentration is elevated prior to the clinical diagnosis of pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2005; 17: 3-18.
162. Goede V, Schmidt T, Kimmina S, Kozian D, Augustin HG. Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest* 1998; 78: 1385-94.
163. Anasti J, Moy E, Kimzey R, George M, Nelson LM. Human follicular fluid vascular endothelial growth factor (VEGF) is correlated with serum LH and follicle fluid progesterone. *FASEB J* 1996; 10: A-646.
164. Coppola F, Ferrari B, Barusi L, Caccavari V, Salvaani MC, Piantelli G. Follicular fluid levels of vascular endothelial growth factor and early corpus luteum function during assisted reproductive technology cycles. *J Exp Clin Assist Reprod* 2005; 2: 13.
165. Kilani Z, Dakkak A, Ghunaim S, Cognigni GE, Tabarelli C, Parmegiani L, et al. A prospective, randomized, controlled trial comparing highly purified hMG with recombinant FSH in women undergoing ICSI: ovarian response and clinical outcomes. *Hum Reprod* 2003; 18: 1194-9.
166. Ma W, Tan J, Matsumoto H, Robert B, Abrahamson DR, Das SK, Dey SK. Adult tissue angiogenesis: evidence for negative regulation by estrogen in the uterus. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 1983-92.

167. Neulen J, Yan Z, Raczek S, Weindel K, Keck C, Weich HA, et al. HCG dependent expression of VEGF/VPF in human granulosa cells: importance in OHSS. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1967: 71.
168. Zygmunt M, Mazzuca D, Han V. Human chorionic gonadotrophin (hCG) induces VEGF expression in vitro. *Placenta* 2000; 31: A23.
169. Krussel JS, Behr B, Hirchenhain J, Wen Y, Milki AA, Cupisti S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor mRNA in human preimplantation embryos derived from triprounuclear zygotes. *Fertil Steril* 2000; 74: 1220-6.
170. Wei P, Chen XL, Song XX, Han CS, Liu YX. VEGF, bFGF, and their receptors in the endometrium of Rhesus monkey during menstrual cycle and early pregnancy. *Mol Reprod Dev* 2004; 68: 456–462.
171. Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis I. Molecular recognition. *Placenta* 2004; 25:103–113.
172. Kumazaki K, Nakayama M, Suehara N, Wada Y. Expression of vascular endothelial growth factor, placenta growth factor, and their receptors Flt-1 and KDR in human placenta in pathologic conditions. *Hum Pathol* 2002; 33: 1069-77.
173. Ahmad S, Ahmed A. Antiangiogenic effect of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in placental angiogenesis. *Endothelium* 2005; 12(1-2): 89-95.
174. Shore VH, Wang T-H, Wang C-L, Torry RJ, Caudle MR, Torry DS. Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta* 1997; 18: 657-65.
175. Khaliq A, Dunk C, Jiang J, Shams M, Li XF, Acevedo C et al. Hypoxia down-regulates placenta growth factor whereas fetal growth restriction up-regulates placenta-growth factor expressions: molecular evidence

for «placental hyperoxia» in intrauterine growth restriction. *Lab Invest* 1999 79: 151-70.

176. Charnock-Jones DS, Clrk DE, Licence D, Day K, Wooding FB, Smith SK. Distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its binding sites at the maternal-fetal interface during gestation in pigs. *Reproduction* 2001; 122: 753-60.
177. Lang I, Pabst MA, Hiden U, Blaschitz A, Dohr G, Hahn T, et al. Heterogeneity of microvascular endothelial cells isolated from human term placenta and macrovascular umbilical vein endothelial cells. *Eur J Cell Biol* 2003; 82: 163-73.
178. Ziche M, Maglione D, Iabetti D, Morbidelli L, Lago CT, Battisti M, et al. Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Lab Invest* 1997; 76: 517-31.
179. Zhang EG, Smith SK, Baker PN, Charnock-Jones DS. The regulation and localisation of angiopoietin-1, -2 and their receptor Tie-2 in normal and pathological human placentae. *Mol Med* 2001; 7: 624-35.
180. Cao Y, Linden P, Shima D, Browne F, Folkman, J. In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. *J Clin Invest* 1996; 98: 2507-11.
181. DiSalvo J, Bayne ML, Conn G, Kwok PW, Trivedi PG, Soderman DD, et al. Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor - placenta growth factor heterodimer. *J Biol Chem* 1995; 270: 7717-23.
182. Monsky WL, Fukumura D, Gohongi T, Ancukiewicz M, Weich HA, Torchilin VP, et al. Augmentation of transvascular transport of macromolecules and nanoparticles in tumors using vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 1999; 59: 4129-35.

183. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 1994; 269: 25646–54.
184. Li XF, Charnock-Jones DS, Zhang E, Hiby S, Malik S, Day K, et al. Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1823-34.
185. Chen WS, Kitson RP, Goldfarb RH. Modulation of human NK cell lines by vascular endothelial growth factor and receptor VEGFR-1 (FLT-1). *In Vivo* 2002; 16: 439-45 (Abstract)