

Stężenie wybranych czynników angiogenicznych w płynie otrzewnowym i surowicy krwi pacjentek z endometriozą

Concentration of selected angiogenic factors in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis

Marek Gogacz, Krzysztof Gałczyński, Katarzyna Romanek-Piva, Izabela Winkler, Tomasz Rechberger, Aneta Adamiak-Godlewska

II Katedra i Klinika Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Polska

Streszczenie

Wstęp: Endometrioza jest hormonozależną, przewlekłą i postępującą chorobą charakteryzującą się występowaniem funkcjonującej tkanki endometrialnej poza jamą macicy. Etiologia endometriozy jest wieloczynnikowa, a rozwój jej zależy od czynników immunologicznych, hormonalnych, genetycznych i środowiskowych. Jednym z kluczowych procesów odpowiedzialnych za implantację i wzrost zmian endometriotycznych oraz tworzenie zrostów jest angiogeneza. Fizjologicznie proces ten odpowiada za powstawanie nowych naczyń oraz przebudowę już istniejących. Udowodniono związek pomiędzy występowaniem zaburzeń procesu angiogenezy a brakiem owulacji, niepłodnością, nawracającymi poronieniami, zespołem hiperstymulacji jajników oraz nowotworzeniem. Do czynników pobudzających angiogenezę możemy zaliczyć między innymi angiogenezę, naczyniowy czynnik wzrostu śródbłotka (VEGF) oraz czynnik wzrostu fibroblastów (FGF).

Cel pracy: Celem pracy była ocena stężenia czynników angiogenicznych (angiogenina, VEGF, FGF) w surowicy krwi żyłnej oraz płynie otrzewnowym pacjentek z endometriozą i niepłodnością idiopatyczną.

Materiały i metody: Do badania włączono 39 pacjentek. Grupę badaną stanowiło 19 pacjentek, u których w trakcie laparoskopii zdiagnozowano endometriozę, natomiast do grupy kontrolnej włączono 20 pacjentek z niepłodnością o niewyjaśnionej etiologii, u których w trakcie laparoskopii nie stwierdzono zmian morfologicznych w obrębie narządów miednicy mniejszej. Pacjentki zostały poddane laparoskopii w fazie folikularnej cyklu miesięczkowego. Przed zabiegiem od wszystkich pacjentek pobrano krew z żyły łokciowej, a podczas operacji, bezpośrednio po wprowadzeniu trokarów aspirowano całą widoczną objętość płynu otrzewnowego w celu oznaczenia stężenia VEGF, FGF i angiogeniny.

Autor do korespondencji:

Aneta Adamiak-Godlewska
II Katedra i Klinika Ginekologii UM w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8, 20-090 Lublin, Polska
tel. 605 851 796; email: adamiak@yahoo.com; fax. (081) 7244849

Otrzymano: 10.06.2014
Zaakceptowano do druku: 20.08.2014

Marek Gogacz et al. Stężenie wybranych czynników angiogennych w płynie otrzewnowym i surowicy krwi pacjentek z endometriozą.

Wyniki: W grupie pacjentek z niewyjaśnioną niepłodnością stwierdzono istotnie statystycznie ($p < 0,05$) wyższe stężenie angiogeniny w płynie otrzewnowym w odniesieniu do pacjentek z endometriozą. Stężenie angiogeniny w surowicy krwi w grupie pacjentek z niewyjaśnioną niepłodnością było również wyższe w odniesieniu do odnotowanego u pacjentek z endometriozą, aczkolwiek różnica ta nie uzyskała istotności statystycznej ($p > 0,05$). Stężenie VEGF i FGF w surowicy krwi oraz w płynie otrzewnowym było podobne u pacjentek z endometriozą i z niepłodnością idiopatyczną. ($p > 0,05$). Nie wykazano istotnych różnic między surowicą a płynem otrzewnowym dotyczących stężeń VEGF, FGF i angiogeniny w każdej z grup.

Wniosek: Stężenie czynników angiogennych (VEGF, FGF, angiogenina) w płynie otrzewnowym i w surowicy krwi kobiet w folikularnej fazie cyklu nie jest markerem odzwierciedlającym występowanie endometriozy.

Słowa kluczowe: **endometrioza / VEGF / FGF / angiogenina / płyn otrzewnowy / surowica /**

Abstract

Introduction: Endometriosis is a sex hormone-dependent and successively progressing gynecological disease, characterized by the presence of endometrial tissue outside the uterus. The etiology of endometriosis is known to be multifactorial, and its growth depends on immunological, hormonal, genetic and environmental factors. Angiogenesis plays a key role in implantation and growth of endometriotic lesions, as well as in adhesion formation. Physiologically angiogenesis is responsible for neoangiogenesis and recruitment of new capillaries from the already existing capillaries. It is well-documented that altered angiogenesis provokes improper follicular maturation, infertility, recurrent miscarriages, ovarian hyperstimulation syndrome, and carcinogenesis. Factors stimulating angiogenesis include angiogenin, vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF).

Objectives: The aim of the study was to analyze angiogenic factor concentration (angiogenin, VEGF, FGF) in blood serum and peritoneal fluid in patients with diagnosed endometriosis and idiopathic infertility.

Material and methods: A total of 39 patients were recruited for the study, including 19 patients (study group) diagnosed with endometriosis during the laparoscopic procedure and 20 patients (control group) with idiopathic infertility and no morphologic changes within the pelvis revealed during the laparoscopic procedure. All patients underwent laparoscopy during the follicular phase of the menstrual cycle. Vein blood sample was obtained before the procedure and during laparoscopy the entire peritoneal fluid was aspirated for further measurement of VEGF, FGF and angiogenin concentrations.

Results: Angiogenin concentration in peritoneal fluid was statistically higher in patient with idiopathic infertility in comparison to endometriosis ($p < 0,05$). Higher angiogenin concentration was detected also in blood serum of patients with idiopathic infertility as compared to patients with endometriosis, but no statistical significance was found. VEGF and FGF concentration in blood serum and peritoneal fluid was similar in both groups ($p > 0,05$). There were no significant differences between serum and peritoneal fluid in case of VEGF, FGF and angiogenin in any of the groups.

Conclusions: Angiogenic factors concentration (VEGF, FGF, angiogenin) in the peritoneal fluid and blood serum during the follicular phase of the menstrual cycle is not a diagnostic criterion for endometriosis.

Key words: **endometriosis / VEGF / FGF / angiogenin / peritoneal fluid / serum /**

Wstęp

Endometrioza jest hormonozależną, przewlekłą i postępującą chorobą charakteryzującą się występowaniem funkcjonującej tkanki endometrialnej poza jamą macicy [1, 2]. Schorzenie obserwowane jest u około 3 do 10% kobiet w wieku rozrodczym, jednak w grupie kobiet leczonych z powodu niepłodności jej odsetek sięga niemal 50% [1-3]. Ektopowa tkanka endometrialna reaguje na zmiany stężenia hormonów płciowych zależnie od fazy cyklu miesięczkowego. Jest to łagodna choroba, jednak klinicznie może imitować proces nowotworowy, naciekając sąsiadujące tkanki [2]. Należy podkreślić, że ektopowe endometrium częściej ulega przemianie nowotworowej w odniesieniu do endometrium o prawidłowej lokalizacji.

Etiologia endometriozy jest wieloczynnikowa, a rozwój jej zależy od czynników immunologicznych, hormonalnych, genetycznych i środowiskowych. Upośledzona lokalna i ogólnoustrojowa odporność oraz zwiększona miejscowo w środowisku płynu otrzewnowego produkcja cytokin prozapalnych i autoprzeciwciał przemawiają za podłożem immunologicznym schorzenia. Jednym z kluczowych procesów odpowiedzialnych za implantację i wzrost zmian endometriotycznych oraz tworzenie zrostów jest angiogeneza [4]. Fizjologicznie proces ten odpowiada za powstawanie nowych naczyń oraz przebudowę już istniejących [5]. Neoangiogeneza występuje podczas gojenia się ran oraz w układzie rozrodczym kobiet podczas cyklu miesięczkowego odpowiadając za rozwój pęcherzyka dominującego, powstawanie ciała żółtego oraz wzrost endometrium [6-8].

Marek Gogacz et al. Stężenie wybranych czynników angiogennych w płynie otrzewnowym i surowicy krwi pacjentek z endometriozą.

Angiogeneza regulowana jest poprzez aktywność czynników pro- i antyangiogennych. Udowodniono związek pomiędzy występowaniem zaburzeń procesu angiogenezy a brakiem owulacji, niepłodnością, nawracającymi poronieniami, zespołem hiperstymulacji jajników oraz nowotworzeniem [6, 9]. Do czynników pobudzających angiogenezę możemy zaliczyć między innymi angiogelinę, naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonna (VEGF) oraz czynnik wzrostu fibroblastów (FGF) [5]. Ektopowe endometrium charakteryzuje się bogatym unaczynieniem, a w laparoskopii widoczne są liczne naczynia krwionośne towarzyszące zwykle zmianom endometriotycznym. W modelach zwierzęcych wykazano wrastanie naczyń krwionośnych z istniejącego już unaczynienia do implantów endometriotycznych oraz hamowanie tego procesu poprzez podawanie leków antyangiogennych [10].

Angiogenina jest białkiem zbudowanym ze 123 aminokwasów wykazującym aktywność RNAzy, produkowanym przez wątrobę, fibroblasty, monocyty i nabłonek jelitowy [11, 12]. Pobudza wczesne etapy angiogenezy poprzez aktywację komórek endotelialnych oraz zwiększenie ich proliferacji i migracji [3]. Wykazano zwiększoną aktywność angiogeniny w surowicy i płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą, odpowiadającą stopniowi zaawansowania choroby [3, 13].

VEGF pobudzany przez hipoksję jest jednym z najsilniejszych mediatorów angiogenezy odpowiedzialnym za większość jej etapów [8]. Wiele innych czynników wzrostowych takich jak czynnik martwicy guza (TNF- α), naskórkowy czynnik wzrostu (EGF), transformujący czynnik wzrostu (TGF- β), płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), interleukina 1 β (IL-1 β) wykazują również pośrednie działanie angiogenne, poprzez zwiększenie ekspresji VEGF [5]. VEGF wykazuje aktywność mitogenną poprzez pobudzanie komórek endotelialnych oraz zwiększenie przepuszczalności naczyń. Badania wykazały, że czynnik wzrostu fibroblastów (FGF) oraz naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonna (VEGF) pobudzają translokację angiogeniny do jądra komórek endotelialnych a następnie proces proliferacji komórek [14]. Tak więc VEGF jak i FGF odpowiadają z jednej strony za fizjologiczne procesy tworzenia naczyń, ale są także zaangażowane w proces nowotworzenia, rozwój retinopatii cukrzycowej, miażdżycy oraz reumatoidalnego zapalenia stawów [5]. W dotychczas przeprowadzonych badaniach wykazano zwiększone stężenie VEGF w płynie otrzewnowym, surowicy jak i ektopowym endometrium pochodzącym od kobiet z endometriozą [3, 15, 16].

Cel pracy

Celem pracy była ocena stężenia czynników angiogennych (angiogenina, VEGF, FGF) w surowicy krwi żyłnej oraz płynie otrzewnowym pacjentek z endometriozą i niepłodnością idiopatyczną.

Materiały i metody

Do badania włączono 39 pacjentek, u których wykonano laparoskopię w II Katedrze i Klinice Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Grupę badaną stanowiło 19 pacjentek, u których w trakcie laparoskopii zdiagnozowano endometriozę. Stopień zaawansowania endometriozy został określony na podstawie klasyfikacji Amerykańskiego Towarzystwa Medycyny Rozrodu [17]. Wczesną endometriozę (stopień I lub II) zdiagnozowano u 12 pacjentek, natomiast u 7 pacjentek stwierdzono

zaawansowaną postać schorzenia (stopień III lub IV). Do grupy kontrolnej włączono 20 pacjentek z niepłodnością o niewyjaśnionej etiologii, u których w trakcie laparoskopii nie stwierdzono zmian morfologicznych w obrębie narządów jamy brzusznej. Badanie uzyskało pozytywną opinię Komisji Bioetycznej, a wszystkie pacjentki wyraziły pisemną zgodę na pobranie próbek krwi i płynu otrzewnowego do badania. Pacjentki zostały poddane laparoskopii w fazie folikularnej cyklu miesięczkowego. Przed zabiegiem od wszystkich pacjentek pobrano krew z żyły łokciowej, a podczas operacji, bezpośrednio po wprowadzeniu trokarów aspirowano całą widoczną objętość płynu otrzewnowego (PO) z zatoki Douglasa i Retziusa. Płyn aspirowano za pomocą drenu połączonego ze strzykawką wprowadzonego przez jeden z portów roboczych. próbki PO pobrane do badania nie były zanieczyszczone krwią. Krew i PO bezpośrednio po pobraniu odwirowano (700g przez 10 minut), po czym zamrożono i przechowywano w -80°C do czasu analizy. Stężenie VEGF, FGF i angiogeniny oznaczono przy pomocy dostępnych komercyjnie zestawów ELISA (R&D Systems, Minneapolis) zgodnie z instrukcjami dołączonymi przez producenta. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przy pomocy programu Statistica 7.1 (StatSoft, USA). Różnice stężeń VEGF, FGF i angiogeniny między opisywanymi grupami w surowicy oraz płynie otrzewnowym porównano testem U Mann-Whitney'a. Różnice stężeń poszczególnych badanych substancji angiogennych między surowicą a płynem otrzewnowym w każdej grupie pacjentek zbadano za pomocą testu kolejności par Wilcoxon. W obu przypadkach wartość $p < 0,05$ uznano za istotną statystycznie.

Wyniki

Charakterystykę pacjentek odnośnie wieku, wartości BMI i stężenia antygenu CA 125 w opisywanych grupach przedstawia tabela I.

VEGF, FGF i angiogenina zostały wykryte w surowicy i płynie otrzewnowym wszystkich badanych pacjentek (Tabela II i III).

W grupie pacjentek z niewyjaśnioną niepłodnością stwierdzono istotnie statystycznie ($p < 0,05$) wyższe stężenie angiogeniny w płynie otrzewnowym (Me = 1114,8 pg/ml vs 734,6 pg/ml; $p = 0,04$) w odniesieniu do pacjentek z endometriozą. Podobnie stężenie angiogeniny w surowicy krwi w grupie pacjentek z niewyjaśnioną niepłodnością było wyższe w odniesieniu do odnotowanego u pacjentek z endometriozą (Me = 796,1 pg/ml vs 595,9 pg/ml) lecz nie stwierdzono istotności statystycznej ($p > 0,05$) pomiędzy stężeniami.

Nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniach VEGF i FGF w surowicy krwi pacjentek oraz w płynie otrzewnowym między grupą z endometriozą a niepłodnością idiopatyczną.

Porównanie stężeń VEGF, FGF i angiogeniny między surowicą krwi a płynem otrzewnowym w poszczególnych grupach również nie wykazało istotnych różnic.

Dyskusja

Angiogeneza jest jednym z procesów związanych z rozwojem endometriozy. Odpowiada za implantację i wzrost ektopowego endometrium. Z kolei wywołana schorzeniem odpowiedź zapalna, aktywność proangiogenna, oraz zaburzona fibrynoliza prowadzą do formowania się zrostów [4].

Marek Gogacz et al. Stężenie wybranych czynników angiogennych w płynie otrzewnowym i surowicy krwi pacjentek z endometriozą.

Tabela I. Charakterystyka wieku, BMI i stężenia Ca125 u pacjentek w porównywanych grupach.

Grupa pacjentek	Średni wiek M ± SD (lata)	wartość BMI M ± SD (kg/m ²)	Średnie stężenie CA125 M ± SD (U/ml)
BADANA (n=19)	22,33 ± 3,45	33,58 ± 4,74	58,98 ± 80,33
KONTROLNA (n=20)	23 ± 1,79	31,24 ± 5,95	34,12 ± 80,56
wartość p	NS	NS	< 0,05

Tabela II. Stężenie VEGF, FGF i angiogeniny w surowicy pacjentek z endometriozą i niepłodnością idiopatyczną.

Surowica	Endometrioza (n=19)				Niepłodność idiopatyczna (n=20)				p
	Me	25 percentyl	75 percentyl	Zakres (min-max)	Me	25 percentyl	75 percentyl	Zakres (min-max)	
VEGF (pg/ml)	85,6	36,3	136,8	13,7-1758,3	47,5	28,7	122,8	12,6-1176,8	0,42
FGF (pg/ml)	8,0	6,8	9,9	5,7-49,6	9,1	6,5	13,4	4,9-22,5	0,68
Angiogenina (pg/ml)	595,9	408,8	831,0	87,8-1896,6	796,1	560,2	1487,0	168,8-3294,8	0,16

Tabela III. Stężenie VEGF, FGF i angiogeniny w płynie otrzewnowym pacjentek z endometriozą i niepłodnością idiopatyczną.

Płyn otrzewnowy	Endometrioza (n=19)				Niepłodność idiopatyczna (n=20)				p
	Me	25 percentyl	75 percentyl	Zakres (min-max)	Me	25 percentyl	75 percentyl	Zakres (min-max)	
VEGF (pg/ml)	113,0	83,3	179,8	29,4-2268,1	151,8	91,6	179,1	23,2-378,9	0,83
FGF (pg/ml)	9,1	7,3	14,1	5,2-73,7	8,4	6,5	13,3	4,6-53,4	0,43
Angiogenina (pg/ml)	734,6	474,1	1217,8	111,9-1996,3	1114,8	580,5	1901,9	309,6-3078,9	0,04*

*wartość istotna statystycznie

Nasze badania w zakresie stężenia VEGF i FGF nie wykazują różnic między badanymi grupami ani w surowicy krwi ani w płynie otrzewnowym. Wyniki tych badań w zakresie VEGF są zgodne z poprzednimi badaniami, w których również nie wykazano związku między stężenia VEGF w surowicy krwi a endometriozą [18-21]. Przeciwnie do nas wyniki w postaci zwiększonego stężenia VEGF i angiogeniny zarówno w surowicy jak i w płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą wykazały badania Bourlev i wsp. [3]. Należy wziąć jednak pod uwagę, że w tym badaniu brały udział tylko pacjentki z zaawansowaną endometriozą (III i IV stopień wg rASRM), a grupę kontrolną stanowiły kobiety zgłaszające się na laparoskopową sterylizację. Nie podano wieku kobiet objętych badaniem, ani fazy cyklu, w której przeprowadzono badania, ale należy podejrzewać, że grupy wiekowe były zbliżone a sterylizacji poddawały się kobiety przed 40 r.ż. więc nie można bezpośrednio porównywać naszych wyników do tej populacji kobiet.

Stężenie angiogeniny w surowicy krwi zostało również ocenione przez Steff i wsp. [13]. Badacze stwierdzili zwiększone jej stężenie w lutealnej fazie cyklu w porównaniu do fazy folikular-

nej w całej badanej populacji kobiet. Z kolei przy podziale badanej populacji na pacjentki z endometriozą oraz grupę kontrolną stężenie angiogeniny było znacząco wyższe u pacjentek z endometriozą tylko w fazie folikularnej. Stężenie angiogeniny było istotnie dodatnio skorelowane ze zwiększonym odsetkiem „białych” implantów endometriozy, czego nie zaobserwowano przy implantach „czerwonych” lub „czarnych”. Autorzy sugerują, że w przypadku implantów „białych” angiogenina prawdopodobnie indukuje waskularyzację zmian, a jej odwrotna korelacja z odsetkiem implantów „czarnych” pokazuje obniżenie się jej aktywności, gdyż zmiany te są już formą nekrotyczną choroby. W naszym badaniu stwierdziliśmy istotnie zwiększone stężenie angiogeniny w płynie otrzewnowym pacjentek z niepłodnością idiopatyczną w porównaniu do pacjentek z endometriozą. Podobna tendencja utrzymywała się również w surowicy krwi, aczkolwiek różnica ta nie była istotna statystycznie. Wszystkie pacjentki badane były w fazie folikularnej cyklu. Odmienność naszych wyników w porównaniu do Steff i wsp. może wynikać po pierwsze ze zbyt małej populacji objętej badaniem, a po drugie z innego doboru pacjentek do grupy kontrolnej. W naszym badaniu były to pacjentki

Marek Gogacz et al. Stężenie wybranych czynników angiogennych w płynie otrzewnowym i surowicy krwi pacjentek z endometriozą.

starające się o zajście w ciążę w wieku 23,4 lata, podczas gdy grupę kontrolną u Steff i wsp. stanowiły kobiety w wieku 35,7 ±6,3 lat zgłaszające się na operacje ubezdzielania poprzez podwiązanie jajowodów, operacje odtworzenia ciągłości jajowodów, czy nawet histerektomie. Malamitsi-Puchner i wsp. badali czynniki angiogenne (VEGF, bFGF i angiogeninę) w płynie pęcherzykowym aspirowanym w czasie procedury zapłodnienia pozaustrojowego i stwierdzili, że jedynie stężenie angiogeniny korelowało z dojrzałością komórek jajowych [14]. Badacze ci odkryli nową rolę angiogeniny poza neowaskularyzacją.

Stwierdzenie w naszym badaniu istotnie wyższego stężenia angiogeniny w płynie otrzewnowym pacjentek z niepłodnością w fazie folikularnej cyklu mogłoby sugerować pośrednio, że prawdopodobnie w tej grupie kobiet pęcherzyki jajnikowe odznaczają się istotnie większą dojrzałością niż u kobiet z endometriozą. Potwierdzeniem tego przypuszczenia może być obserwowana gorsza jakość oocytów uzyskiwanych w procedurze in vitro u pacjentek z endometriozą. Istotnie wyższe stężenie angiogeniny w płynie otrzewnowym zarówno w fazie folikularnej jak i w lutealnej u kobiet z endometriozą w porównaniu do grupy kontrolnej stwierdzili również Suzumori i wsp [22]. Aczkolwiek również i w tym badaniu grupę kontrolną stanowiły pacjentki operowane z powodu łagodnych torbieli jajników (cystadenoma) gdzie średnia wieku wynosiła 37 ±1,8 lat. Nie można wykluczyć, iż to większe zaawansowanie wiekowe pacjentek w wyżej wymienionym badaniu (około dziesięcioletnia różnica) w odniesieniu do naszej grupy kontrolnej mogło mieć wpływ na różnice wartości uzyskanych wyników.

Wniosek

Stężenie czynników angiogennych (VEGF, FGF, angiogenina) w płynie otrzewnowym i w surowicy krwi kobiet w folikularnej fazie cyklu nie jest markerem odzwierciedlającym występowanie endometriozy u kobiet.

Oświadczenie autorów:

1. Marek Gogacz – autor koncepcji i założeń pracy, zebranie materiału, przeprowadzenie badań, korekta ostatecznego kształtu manuskryptu.
2. Krzysztof Gałczyński – współautor tekstu pracy, przygotowanie bazy literaturowej, korekta ostatecznego kształtu manuskryptu.
3. Katarzyna Romanek-Piva – przygotowanie manuskryptu, aktualizacja literatury.
4. Izabela Winkler – zbieranie materiału, statystyczne opracowanie charakterystyki grupy.
5. Tomasz Rechberger – korekta manuskryptu.
6. Aneta Adamiak-Godlewska – opracowanie statystyczne materiału, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa – autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.

Źródło finansowania:

Praca nie była finansowana przez żadną instytucję naukowo-badawczą, stowarzyszenie ani inny podmiot, autorzy nie otrzymali żadnego grantu.

Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

Piśmiennictwo

1. Mohamed M, El Behery M, Mansour SA. Comparative study between VEGF-A and CA-125 in diagnosis and follow-up of advanced endometriosis after conservative laparoscopic surgery. *Arch Gynecol Obstet.* 2013, 287, 77–82.
2. Li YZ, Wang LJ, Li X, [et al.]. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms contribute to the risk of endometriosis: an updated systematic review and meta-analysis of 14 case-control studies. *Genet Mol Res.* 2013, 12, 1035-1044.
3. Bourlev V, Iljasova N, Adamyan L, [et al.]. Signs of reduced angiogenic activity after surgical removal of deeply infiltrating endometriosis. *Fertil Steril.* 2010, 94, 52-57.
4. Barcz E, Milewski Ł, Dziunycz P. Peritoneal cytokines and adhesions formation in endometriosis: an inverse association with vascular endothelial growth factor concentration. *Fertil Steril.* 2012, 97, 1380-1386.
5. Bisht M, Dhasmana DC, Bist SS. Angiogenesis: Future of pharmacological modulation. *Indian J Pharmacol.* 2010, 42, 2-8.
6. Gruemmer R, Motejlek K, Berghaus D, [et al.]. Regulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor (sFlt-1/sVEGFR-1) expression and release in endothelial cells by human follicular fluid and granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005, 3, 57.
7. Stouffer RL, Martinez-Chequer JC, Molskness TA, [et al.]. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch Med Res.* 2001, 32, 567-575.
8. Sharkey AH, Catalano R, Evans A, [et al.]. Novel antiangiogenic agents for use in contraception. *Contraception* 2005, 71, 263-271.
9. Aboulghar M, Mansour RT, Serour GI, [et al.]. Elevated concentration of angiogenin in serum and ascitic fluid from patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod.* 1998, 13, 2068-2071.
10. Xu H, Zhang T, Man GC, [et al.]. Vascular endothelial growth factor C is increased in endometrium and promotes endothelial functions, vascular permeability and angiogenesis and growth of endometriosis. *Angiogenesis.* 2013, 16, 541-551.
11. Li S, Hu GF. Emerging role of angiogenin in stress response and cell survival under adverse conditions. *J Cell Physiol.* 2012, 227, 2822-2826.
12. Sadlecki P, Walentyńowicz-Sadlecka M, Szymański W, Grabiec M. Comparison of VEGF, IL-8, and beta-FGF concentrations in the serum and ascites of patients with ovarian cancer. *Ginekol Pol.* 2011, 82, 498-502.
13. Steff A, Gagne D, Page M, [et al.]. Serum concentrations of insulin-like growth factor-1, soluble tumor necrosis factor receptor-1 and angiogenin in endometriosis patients. *Am J Reprod Immunol.* 2004, 51, 166-173.
14. Malamitsi-Puchner A, Sarandakou A, Baka SG, [et al.]. Concentration of angiogenic factors in follicular fluid and oocyte-cumulus complex culture medium from women undergoing in vitro fertilization: association with oocyte maturity and fertilization. *Fertil Steril.* 2001, 76, 98-101.
15. Gilabert-Estelles J, Ramon L, Espana F, [et al.]. Expression of angiogenic factors in endometriosis: relationship to fibrinolytic and metalloproteinase systems. *Hum Reprod.* 2007, 22, 2120-2127.
16. Altinkaya S, Ugur M, Ceylaner G, [et al.]. Vascular endothelial growth factor +405 C/G polymorphism is highly associated with an increased risk of endometriosis in Turkish women. *Arch Gynecol Obstet.* 2011, 283, 267-272.
17. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril.* 1997, 67, 817-821.
18. Bourlev V, Volkov N, Pavlovitch S, [et al.]. The relationship between micro vessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions. *Reproduction.* 2006, 132, 503-511.
19. Gagne D, Page M, Robitaille G, [et al.]. Levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in serum of patients with endometriosis. *Hum Reprod.* 2003, 18, 1674-1680.
20. Bedaiwy MA, Falcone T. Laboratory testing for endometriosis. *Clin Chim Acta.* 2004, 340, 41-56.
21. Potlog-Nahari C, Stratton P, Winkel C, [et al.]. Urine vascular endothelial growth factor-A is not a useful marker for endometriosis. *Fertil Steril.* 2004, 81, 1507-1512.
22. Suzumori N, Zhao XX, Suzumori K. Elevated angiogenin levels in the peritoneal fluid of women with endometriosis correlate with the extent of the disorder. *Fertil Steril.* 2004, 82, 93-96.