

A csontvelői eredetű haem-és lymphangiogén endothel progenitor sejtek szerepe tüdőrákokban

Írta:

Dr. Bogos Krisztina

Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézet

Semmelweis Egyetem, Klinikai Orvostudományi Doktori Iskola

Légzőszervi megbetegedések program

Tüdődaganatok alprogram

Doktori Iskola Programvezető: Prof. Dr. Magyar Pál, MTA doktora

Témavezető: Dr. Döme Balázs Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Gyergyay Fruzsina Ph.D.

Dr. Gálffy Gabriella Ph.D.

A Szigorlati Bizottság Elnöke: Prof. Dr. Böszörményi Nagy György

A Szigorlati Bizottság Tagjai: Dr. Herjavec Irén Ph.D.

Dr. Vadász Pál Ph.D.

Dr. Kiss András Ph.D.

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés.....	5
1.1.	Tüdőrákok.....	6
1.1.1.	Epidemiológia.....	6
1.1.2.	A tüdőrákok felosztása.....	6
1.1.3.	A tüdőrákok komplex kezelése.....	7
1.1.1.1.	Nem kissejtes tüdőrák (NSCLC).....	7
1.1.1.2.	Kissejtes tüdőrák (SCLC).....	10
1.2.	Angiogenezis.....	11
1.2.1.	Vaszkulogenezis.....	12
1.2.2.	Angiogenezis, Tumor-indukált angiogenezis (TIA).....	13
1.2.3.	A tumorok vaszkularizációjának mechanizmusai.....	14
1.2.4.	A tumor-indukált angiogenezis molekuláris szabályozása.....	17
1.1.1.3.	Szolubilis angiogén molekulák.....	17
1.1.1.4.	VEGF (vascular endothelial growth factor) és receptorai.....	17
1.1.1.5.	Angiopoetinek és Tie receptorok.....	18
1.1.1.6.	FGF (Fibroblast growth factor).....	19
1.1.1.7.	PDGF (Platelet-derived growth factor).....	19
1.1.1.8.	TGF- β (Transforming growth factor- β).....	19
1.1.1.9.	IL-8 és IL-4.....	20
1.1.1.10.	Egyéb szolubilis angiogén faktorok.....	20
1.2.5.	Sejt-mátrix és sejt-sejt adhéziós molekulák.....	21
1.1.1.11.	Integrinek.....	21
1.1.1.12.	VE-kadherin.....	21
1.1.1.13.	Eph-B4/ephrin-B2.....	22
1.2.6.	Kapillárisdenzitás (MVD, microvessel density).....	22
1.2.7.	Endothel proliferációs index (ECLI, endothelial cell labeling index)....	23
1.2.8.	A kapillárisok pericitaborítása (PCI, pericyte coverage index).....	23
1.3.	Endothel prekursor sejtek és ko-mobilizált haematopoetikus prekursorok jellemzői.....	25
1.3.1.	EPC és a ko-mobilizált sejtek jellemzői.....	25
1.3.2.	Az EPC sejtek mobilizációja.....	28
1.3.3.	Az EPC sejtek hozzájárulása a tumor vaszkularizációjához.....	29
1.4.	Lymphangiogenezis.....	31
1.4.1.	A lymphangiogenezis pathofiziológiája.....	31
1.4.2.	Csontvelő eredetű lymphangiogén progenitor sejtek.....	35
2.	A keringő endotheliális progenitor sejtek (EPC) azonosítása és klinikai jelentősége nem kissejtes tüdőrákban (NSCLC).....	37
2.1.	Célkitűzés.....	37
2.2.	Módszerek.....	38
2.2.1.	Klinikai adatok.....	38
2.2.2.	EPC sejtek azonosítása konfokális lézer „scanning” mikroszkóppal humán NSCLC tumor szövetben.....	38
2.2.3.	EPC sejtek számának meghatározása flow cytometriával NSCLC betegek perifériás véréből.....	39
2.2.4.	NSCLC betegek perifériás vér EPC markereinek meghatározása relatív quantitative real-time RT-PCR módszerrel.....	40

2.2.5.	Statisztikai analízis	40
2.3.	Eredmények	41
2.3.1.	NSCLC betegek perifériás vér és szövetmintáiból EPC sejtek jellemzői és sejtszám meghatározás	41
2.3.2.	EPC markerek kimutatása realtime RT-PCR-rel NSCLC betegek perifériás véréből	42
2.3.3.	EPC sejtszám, mint prognosztikai marker NSCLC-ben.....	43
3.	A keringő lymphovaszkuláris endotheliális progenitor sejtek szerepe kissejtes tüdőrákban (SCLC)	44
3.1.	Célkitűzés	44
3.2.	SCLC Betegek és metodika	45
3.2.1.	Klinikai adatok	45
3.2.2.	SCLC betegek perifériás véréből flow cytometriával végzett LVEPC szám meghatározás	46
3.2.3.	Egészséges kontrollok és SCLC betegek perifériás véréből VEGF-C szint mérése	46
3.2.4.	Statisztikai analízis	46
3.3.	Eredmények	47
3.3.1.	SCLC betegek perifériás vér LVEPC sejtszintje és jellemzése.....	47
3.3.2.	LVEPC szint és a klinikopathológiai paraméterek összefüggései	47
3.3.3.	LVEPC szint és egyéb prognosztikai markerek SCLC betegeknél.....	48
3.3.4.	Perifériás vér VEGF-C szint SCLC betegeknél	48
4.	Megbeszélés	49
5.	Következtések.....	55
6.	Táblázatok	57
7.	Összefoglalás.....	67
8.	Summary.....	69
9.	Irodalomjegyzék	72
10.	Köszönetnyilvánítás	107

Rövidítések jegyzéke

SCLC Small Cell Lung Cancer
NSCLC Non Small Cell Lung Cancer
CEA Carcinoembryonalis Antigén
APUD Amin Precursor Uptake and Decarboxylation
NSE Neuronspecifikus Enoláz
AAH Atípusos Adenomatous Hyperplasia
AMF Autocrine Motility Factor
COX2 Cyclooxygenase 2
VEGF Vascular Endothelial Growth Factor
MMP Mátrix Metalloproteáz
VDA Vascular Disrupting Agents
PDGF Platelet Derived Growth Factor
TGF β Transforming growth factor- β
bFGF basic Fibroblast Growth Factor
HGF Hepatocytá eredetű növekedési Faktor
VE-cadherin Vaszkularis Endothelialis cadherin
ANG angiopoetinek
EPC Endothelial Progenitor Cell
PBMNCs perifériás vér mononukleáris sejtek
ECFCs Endothelial Colony-Forming Cells
SDF-1 Stromal cell-Derived –Factor-1
rHuEPO recombináns humán erythropetin
TNF α Tumor Nekrozis Faktor α
LEC lymphatikus endothelsejtek
ILGF Inzulin Like Growth Factor
LYVE 1 hyaluronan receptor
LEPCs Lymphatic Endothelial Precursor Cells
CEPC Circulating Endothelial Precursor Cells
EGFP Enhanced Green Fluorescent Protein
IASLC International Assotiation for the Study of Lung Cancer
LD Limited Diseases
ED Extended Disease
VDA Vascular Disrupting Agents
PFS Progression Free Survival
TTP Time to Progression/ progresszióig eltelt idő
GIST Gastrointestinalis Stroma Tumor
PIGF Placenta Growth Factor
HSC Haematopoetic Stem Cell
GOLD Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
CT Computer Tomography
MRI mágnese rezonancia

1. Bevezetés

A tüdőrák világszerte jelentős népegészségügyi problémát jelent. Az összes daganatos megbetegedés 12,4%-áért és a daganatos halálozás 17,6%-áért felelős ez a kórkép. A sebészi reszekció, a platina bázisú kombinált kemoterápia és a sugárkezelés javítottak ugyan a tüdőrák túlélési eredményein, azonban a tüdőrák túlélésének növekedési görbéje plató fázishoz érkezett. Az új terápiás lehetőségek közé tartoznak a célzott molekuláris terápiák melyeket önmagukban, illetve kemoterápiával kombináltan alkalmazhatunk. A célzott molekuláris terápiák egyik legfontosabb csoportja a tumorok érhálózatára ható szereké. A daganatok növekedéséhez és áttétképzéséhez megfelelő vérellátás szükséges. A tüdőrák a többi szolid tumorokhoz hasonlóan számos angiogén faktort termel melyek komplex folyamat eredményeként új erek képződéséhez vezetnek. A szolid tumorok biztosítják vérellátásukat endothelbimbózással (ez a folyamat ideális célpontja az érellenes terápiáknak), intusszuszeptív angiogenezissel, a gazdaszövet kisereinek inkorporációjával, glomeruloid angiogenezissel vagy vaszkuláris mimikriával, valamint posztnatális vaszkulogenezissel. A posztnatális vaszkulogenezis során csontvelő eredetű endotheliális progenitor sejtek (EPC-k) épülnek be a növekvő új vérerek falába és ott endothelsejteké differenciálódnak. Az EPC sejtek embrionális angioblasztokhoz hasonlítanak, kitapadás független, keringő sejtek, melyek proliferációra, migrációra és endothelsejtté történő differenciációra képesek.

Hasonlóan az angiogenezishez, felnőttkorban a nyirokérfejlődés legfontosabb mechanizmusa a meglévő nyirokerekből történő bimbózás folyamata. A tumor indukálta lymphangiogenezis folyamatához hozzájárulnak a közelmúltban identifikált, csontvelő eredetű sejtek, az úgynevezett nyirok/vaszkuláris –endotheliális progenitor sejtek (LVEPC). A csontvelő eredetű haem- és nyirokendothel progenitor sejtek szerepe a tüdőrák angio-és lymphangiogenezisében még nincs feltárva. Munkánkban bemutatjuk a keringő EPC sejtek szerepét nem-kissejtes tüdőrákban, valamint a keringő LVEPC-k jelentőségét a kissejtes tüdőrák progressziójában.

1.1. Tüdőrákok

1.1.1. Epidemiológia

Világszerte 11 millió újonnan felfedezett rosszindulatú daganatos megbetegedés és emiatt 7 millió haláleset fordul elő évente. 2020-ra több mint 16 millió új esetet és 10 millió halálozást prognosztizálnak az epidemiológusok.

A daganatos morbiditás és mortalitás terén egyaránt a tüdőrák a vezető betegség. 1.352 millió új tüdőrákos beteget diagnosztizáltak világszerte 2002-ben (965 ezer férfi és 387 ezer nő). Magyarországon a nemzeti rákregiszter adatai (2007) 10 404 új megbetegedést említenek, ami az utóbbi öt évet figyelembe véve stagnálást jelez. Ezen belül azonban emelkedik a nők aránya. A KSH halálloki statisztikája alapján 2006-ban a tüdőrák mortalitás 7721 volt. A modern diagnosztikai módszerek és képalkotó eljárások gyors fejlődése, az újabb és újabb terápiás lehetőségek bevezetése, a kombinált műtéti, gyógyszeres és sugárterápiás kezelések alkalmazása ellenére a tüdőrák 5 éves túlélése napjainkban 15% alatt van. A mortalitási adatok és a nemzetközi letalitási arányok alapján a reális incidencia 9300-9500 lehet (1, 2, 3).

1.1.2. A tüdőrákok felosztása

A tüdőrákokat morfológiai alapon két fő csoportra osztjuk, melyek különböznek a daganat szövettani és molekuláris biológiai szerkezetében, a betegség klinikai lefolyásában, a prognózisban és bizonyos mértékig az etiológiában is. Az egyik fő csoport az úgynevezett kissejtes tüdőrák (SCLC=small cell lung cancer) melynek részaránya az összes tüdőrákon belül kb. 15%, valamint a nem kissejtes tüdőrák (NSCLC=non small cell lung cancer). A nem kissejtes tüdőrák csoportban három fő altípus különíthető el: a laphámrák (a tüdőrákok 32%-a, a mirigyhámrák (38%) és a nagysejtes, rosszul differenciált karcinoma (kb 8%). A laphámrákok leggyakrabban dohányzó férfiakban fordulnak elő, centrális elhelyezkedésűek, a főhörgőkben, lebenyhörgőkben és szegmenshörgőkben találhatóak. Az adenokarcinóma gyakorisága az utóbbi időben növekszik, a nőknél a leggyakoribb daganattípus, és a nem dohányzóknál is ez a típus fordul elő leggyakrabban. A nagysejtes karcinóma önálló entitás, alsóportja az óriássejtes karcinóma. Gyorsan metasztatizáló, rossz prognózisú tumor (4). A kissejtes tüdőrák magas malignitású tumor, melyet elsőként a gyakori metasztázisból diagnosztizálnak. Általában extrabronchiálisan növekszik, komprimálja

a hörgőt, vagy infiltrálja a nyálkahártyát is, a daganatsejtekben neuroszekretorikus granulákat mutattak ki, azokat a bronchiális rendszer endokrin sejtjeiből, a Kulchitsky-sejtekből (az ún. APUD- rendszerből) származtatják (5-7).

1.1.3. A tüdőrákok komplex kezelése

1.1.1.1. Nem kissejtes tüdőrák (NSCLC)

A többi daganatos megbetegedéshez hasonlóan a tüdőrák kezelésében is multidiszciplináris megközelítés szükséges. A tüdőrák különböző biológiai viselkedésű két nagy csoportjának és altípusaiknak jelentősen különbözik a kezelése.

A NSCLC kezelésben a sebészeti-, a sugár-, a kemo- és a szupportív terápia, illetve ezek kombinációi egyenlő fontossággal bírnak a terápiás stratégia felállításában. Az egyre fejlettebb molekuláris kutatások és eredmények lehetőséget teremtenek azoknak mind a diagnosztikában, mind a klinikumban való mind szélesebb körű alkalmazására. A hagyományos citotoxikus kemoterápiás szerek mellett a molekuláris célpontokra tervezett gyógyszeres kezelés (molecular targeted therapy) teret enged az úgynevezett egyénre szabott kezelésnek, növelve ezzel a hatékonyabb daganatellenes küzdelem esélyét.

A tüdőrák terápiájának tervezését két alapinformáció segíti. A daganat morfológiai típusa és a daganat kiterjedése, azaz stádiuma.

Jelenlegi ismereteink szerint korai stádiumban törekedni kell a reszekciós tüdőműtetre, a daganat ablasztikus eltávolítására. Sugárterápia csak abban az esetben indokolt, ha a beteg nem alkalmas a műtetre vagy nem egyezik bele a műtéti megoldásba. Az I/B és II stádium esetén szemléletváltozásnak vagyunk tanúi. Az adjuváns kemoterápia hatékonyságát célzó klinikai vizsgálatok alapján adjuváns platina bázisú kemoterápia javasolt, jó általános állapotú, fiatal betegeknél.

A III. stádiumban mind a műtétnak, mind a kemoterápiának, mind a sugárterápiának helye lehet a döntési stratégia kialakításában. Minden egyes beteg esetén egyéni mérlegelés tárgyát képezi a kialakítandó kombinált kezelési metódus. A IV. stádiumú betegek kezelésében a beteg általános állapotától függően a platina bázisú kombinált citotoxikus kemoterápia alkalmazása indokolt. A molekuláris célzott kemoterápia, komplex kezelési stratégiába való beillesztése napjainkra mind pontosabban meghatározható (8, 9). Előtérbe kerültek az angiogenezis gátlásán alapuló terápiás

próbálkozások is. Az antivaszkuláris terápiás stratégiák kategorizálása igen nehéz, számos ponton átfedéseket találunk. Két fő csoportot szokás megkülönböztetni: az angioszuppresszív (anti-angiogén) és a VDA (vascular disrupting agents) szereket.

Az angioszuppresszív szerek csoportjának a létezését az indokolja, hogy a tumorokban új kapillárisok kialakulásához az endothel sejtek proliferációjának specifikus és nem specifikus mitogének által történő megindítása szükséges. Az endothelialis mitogének termelődésének, maguknak a mitogéneknek, endothelialis receptoraiknak, az ehhez kapcsolódó szignálutaknak, az endothelialis integrineknek és a mátrix metalloproteázoknak (MMP-k) a gátlása az endothel bimbózást és a posztnatális vaszkulogenezist (vagyis az EPC-ket) célozzák meg a daganatokban (10-12). Az alábbiakban részletezem jelenlegi ismereteinket az angiogenezis gátlókról és azok klinikai alkalmazásáról.

Számos kísérletes és humán vizsgálat történt angiogén citokineket, endothelialis túlélési valamint mitogén szignálokat gátló szerekkel. A legfontosabbnak tartott és a legismertebb angiogén citokin, a VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) hatásainak felfüggesztésére szolgáló szerek egy része magát a mitogént, illetve annak expresszióját, míg egy másik csoportjuk a VEGF receptor működését vagy a VEGF által kódolt szignálutat gátolja. A *bevacizumab* (Avastin® Genetech/Roche, USA) egy humanizált monoklonális antitest, mely a VEGF-A ligand kötésén és neutralizálásán keresztül hat. Monoterápiában a bevacizumab citosztatikus hatású, citotoxikus kemoterápiával kombinálva a bevacizumab szinergista hatású. Carboplatin/paclitaxel citotoxikus kombinációval kezelt IIIB/IV. stádiumú NSCLC betegek átlagos túlélését 3 hónappal hosszabbította meg, mely szignifikáns túlélési előnyt igazolt a kontroll csoporthoz képest (13). A fázis II-es vizsgálat során a laphámrákos betegeknél észlelt fatális vérzéssel szövődmények emelkedése miatt a további fázis III-as vizsgálatokba kizárólag nem laphámrákos betegeket vontak be. Az E4599 vizsgálat eredményei szerint, bevacizumabbal kiegészített carboplatin+paclitaxel kezeléssel 12,3 vs 10,3 hónapos teljes túlélés volt elérhető, míg az AVAiL (B017704) vizsgálatban, szignifikáns progressziómentes túlélést értek el, mindkét vizsgált (7,5mg/ttkg: 6,7 hónap illetve 15mg/ttkg:6,5hónap) bevacizumab dózissal, a kontroll csoportokhoz (gemcitabin+ciszplatin+placebo) képest (6,1 hónap). Az AVAiL vizsgálatban a teljes túlélés minden csoportban meghaladta a 13 hónapot, bár szignifikáns túlélési előnyt

egyik vizsgálati csoportban sem igazoltak. A megfelelően megválasztott betegpopulációnak köszönhetően a fázis III-as vizsgálatokban a súlyos tüdővérzések aránya 2,3%-ra illetve 1,5%-ra csökkent. Egy nagy, több mint 2200 beteget magába foglaló fázis IV (SAiL) vizsgálatban ez az érték elérte a 0,2 %-ot. Az E4599 és AVAiL vizsgálat alapján a bevacizumabbal kiegészített platina alapú kettős kombinációk nem laphámrákos, nem kissejtes, lokálisan kiterjedt és előrehaladott stádiumú tüdőrákos betegek részére kerültek törzskönyvezésre. A *vandetanib* (Zactima®, ZD6474, AstraZeneca, Macclesfield, UK) hatékony, kis molekulájú inhibitora a VEGF receptor-2 tirozin kináz doménjének. Rendelkezik mérsékelt anti-EGFR aktivitással is, Vandetanibbal két, fázis I és több fázis II klinikai vizsgálat zajlott terápia-refrakter, előrehaladott, szolid tumoros betegeken. A vizsgálatok alapján a laphámsejtes tüdőrákban is hatékony, mely egyértelmű előnyt jelent a bevacizumabhoz képest (14, 15).

Az *AMG 706* (AMGEN, USA) egy kis molekula, kinázgátló aktivitással minden ismert VEGFR, a PDGFR és a Kit ellen. Jelenleg egy fázis III vizsgálat folyik az *AMG 706* + paclitaxel-carboplatin kezeléssel, elsővonalban, előrehaladott NSCLC-ben. Az *aflibercept* (VEGF Trap; Sanofi-Aventis, France) a VEGFR-1 és VEGFR-2 extracelluláris doménjeiből készített, mesterséges, szolubilis receptor. A VEGF minden izoformájához kötődik, így a placenta eredetű növekedési faktorhoz is. Nemrég indult meg a betegek beválogatása abba a fázis III vizsgálatba, melyben docetaxellel kombinálva adják másodvonalban, előrehaladott NSCLC-ben.

Az *AZD2171* (Recentin™; AstraZeneca, UK) az összes VEGFR altípusra ható orálisan alkalmazható tirozin kináz inhibitor (TKI). Relapszusba került NSCLC-s betegeken jelenleg fázis II vizsgálat folyik, melyben az *AZD2171*-t pemetrexeddel kombinálják. Fázis III vizsgálatot terveznek, melyben III/B-IV stádiumú NSCLC-s betegeken carboplatin-paclitaxel kombinációt a vizsgálati szerrel vagy a nélkül alkalmaznak majd.

Az *axitinib* (AG-013736; Pfizer, USA) a VEGFR-1, -2, -3 kis molekulájú, tirozin kináz inhibitora, mely PDGFR-β és Kit ellenes aktivitással is rendelkezik. A szer hatékonyságát - önmagában alkalmazva - előrehaladott, NSCLC-s betegeken, fázis II vizsgálatban már bizonyították (16). A *sorafenib* (Nexavar®, BAY 43-9006; Bayer, Germany) orálisan adható, „multitarget” TKI, mely gátolja a C-RAF, B-RAF, VEGFR-2, -3, PDGFR-β és Kit kinázok működését is (17). NSCLC-ben különösen hatékony

volt, mert itt a K-Ras mutáció NSCLC-ben gyakoribb előfordulásának köszönhetően a Ras/Raf/MEK/ERK szignálutak fokozottan működnek (18). A *sunitinib* (Sutent®, SU11248; Pfizer, USA) orálisan adható, kismolekulájú, „multitarget” TKI, melyet vesesejtes karcinoma és imatinib-rezisztens gastrointestinalis stroma tumor (GIST) kezelésére törzskönyveztek 2006-ban. A sunitinib a PDGFR, Kit, FLT-3 és VEGFR-2 szignálutakat gátolja (19).

Mind a sorafenibbel, mind a sunitinibbel történtek fázis II vizsgálatok. Monoterápiában alkalmazva, kiújuló / terápia rezisztens NSCLC-ben a kezelés jól tolerálható volt, a hatékonyság a jelenleg elfogadott gyógyszerekével azonosnak bizonyult (20). Számos megközelítést használtak preklinikai és klinikai tanulmányokban a daganatos nyirokérnövekedés célzott terápiás gátlására is. Ezek közül, a legismertebbek a VEGF-C, VEGF-D vagy VEGFR3 ellenes antitestek, melyek a célmolekula és receptor hatását neutralizálják (21). VEGFR3 receptor solubilis formáját fejlesztették ki és preklinikai vizsgálatokban alkalmazták (22). Állatkísérletekben a tüdőrák okozta solubilis VEGFR-3 overexpresszió esetén csökkentette a tumor indukálta nyirokérfejlődést és a szentinel nyirokcsomókba történő metasztatizálást. Emellett néhány VEGFR2 kináz aktivitást gátló kis molekula VEGFR3 kináz működését is gátolja. Ezeket napjainkban tesztelik klinikai vizsgálatokban. Ilyen multikináz aktivitású molekula a BAY 43-9006 (sorafenib) a PTK787/ZK222584 (vatalanib), a CEP-7055 és az indolinok mint a MAE87 és a MAZ51 (23). A célzott anti-lymphangiogenezis terápia ígéretes megközelítése a daganat ellenes kezeléseknek. A kombinált kezelés mellyel blokkoljuk a haem- és lymphangiogenezist még több előnnyel járhat, bár néhány kedvezőtlen mellékhatás, mint a vérzés, a szöveti ödéma, óvatosságra int a klinikai alkalmazásban

1.1.1.2. Kissejtes tüdőrák (SCLC)

A kissejtes tüdőrák eltérő biológiai és klinikai viselkedése alapján a terápiás megközelítés is más a nem kissejtes tüdőrákhoz képest. Minden stádiumban alapvető a kombinált, szisztémás citotoxikus kemoterápia alkalmazása. A korai stádiumokban, ahol nyirokcsomó érintettségre nincs gyanú, ma már indokolt a reszekciós tüdőműtét, hangsúlyozottan a komplex terápia keretén belül. Előrehaladottabb stádiumokban, amennyiben nincs pleuralis folyadék és a folyamat, kiterjedése alapján sugárkezelésre alkalmas, a konkomitáló radiokemoterápia adása szükséges, platina bázisú

kemoterápiával. Malignus mellkasi folyadék esetén, illetve IV. stádiumú betegeknél a szisztémás kombinált kemoterápia a választandó. Az eddigi klinikai vizsgálatok (bcl-2 antisense oligonukleotid, proteosom inhibitor bortezomib, mátrix metalloproteináz inhibitorok (MMP-k), tirozin kináz gátlók anti-angiogén szerekkel) alapján a molekuláris célzott kemoterápiás szerek nem mutattak hatékonyságot e betegcsoportban.

1.2. Angiogenezis

A daganatsejtek szoros kapcsolatot alakítanak ki a környezetükben lévő normális vagy más daganatos sejtekkel és az extracelluláris mátrix-szal. Ez szükséges a daganatsejtek túlélését biztosító stroma-ideértve a vaszkularizációt is- kialakulásához, másrészt a daganat terjedéséhez, az invázióhoz és az áttétek képződéséhez. A daganatsejtek képesek arra, hogy a normális sejteket saját céljaik érdekében manipulálják (osztódásra kényszerítsék az endothelsejteket, vagy proteolitikus fehérjék termelésére a makrofágokat).

Az 1970-es évek elején leírt elképzelés szerint a daganatsejtek egy bizonyos tumor átmérő (szolid tumorok esetében 1-2 mm) elérése után a megfelelő oxigén- és tápanyagellátáshoz pusztán diffúzió útján már nem képesek hozzájutni. A daganat további növekedésének elengedhetetlen feltétele a megfelelő érhálózat kialakítása, melyet a tumorsejtek a szöveti hypoxia hatására felszabaduló angiogén faktorok termelése révén indítanak meg ezaz un.: „angiogén switch”(24). Ezt követően a tumorszövetnek a növekedéssel szorosan lépést tartó, állandóan megújuló, a tumorsejtekkel folyamatosan kommunikáló érhálózatot szükséges fenntartania. A fenti modell alapján, a daganatot tápláló kapilláris hálózatot a daganat- és a stromasejtek által termelt citokinek hatására újonnan képződött kapillárisok építik föl, melyeknek építőkövei, az endothelsejtek, melyek genetikailag stabilak (szemben a neoplasztikus komponenssel) ugyanakkor a terápiás céllal a keringésbe juttatott antiangiogén szerek számára könnyen hozzáférhetőek. A daganatok mikroérrendszerének sűrűségét meghatározhatjuk immunhisztokémiai módszerekkel. A monoklonális antitestekkel leggyakrabban kimutatott antigének az endothelsejteken: a VIII. faktor, és a CD-31. Az angiogenezist számos serkentő és gátló tényező szabályozza. Az egyik leghatékonyabb endothelsejtspecifikus mitogén a *VEGF* (vascular endothelial growth factor), mely az endotheliális bimbózásért felelős (ez definíció szerint az endothel sejtek

in situ proliferációját jelenti). A VEGF expresszió szabályozásában a hypoxia indukálta faktor (HIF) – von Hippel-Lindau (VHL) fehérje rendszernek van a legfontosabb szerepe, de számos egyéb onkogén fokozhatja a VEGF termelődést, ideértve az aktivált epidermális növekedési faktor receptort (EGFR), a RAS-t és az erbB-2/Her2-t. Az endothel bimbózást, NSCLC-ben a VEGF mellett befolyásolják a thrombocita-függő növekedési faktor (PDGF) (25), a bázikus fibroblaszt növekedési faktor (bFGF) (26), a mátrix metalloproteázok (MMPs) (27), az EGF (28), a placenta eredetű növekedési faktor (PIGF) (29), az interleukin-8 (IL-8) (30), a hepatocita eredetű növekedési faktor (HGF) (31), és az angiopoetinek (32). Az utóbbiak önmagukban is angiogenezist indukálnak, mind a primer tumor, mind a metasztázis területén. A tumor vaszkularizációjának fokozódása, valamint a tumorsejtek által termelt angiogenikus faktorok növekvő mennyisége a vizsgálatok szerint tüdőrákok esetében is rossz prognosztikai jel. Az angiogenezis gátlásán alapuló terápiás próbálkozások térhódítása a vaszkularizáció markereinek fontosságát és alkalmazásuk gyakoriságát is jelentősen megnövelik.

Új véredények keletkezése a szervezetben két mechanizmus révén lehetséges. A korai embrionális fejlődés során az erek de novo alakulnak ki angioblaszt sejtek felhasználásával. Ezt nevezzük vaszkulogenezisnek (33, 34). Ezzel szemben angiogenezis alatt a már egzisztáló véredényekből kiinduló érképződést értjük, függetlenül attól, hogy az fiziológiás (embriogenezis, sebgyógyulás, szöveti regeneráció) vagy pathológiás (gyulladás, tumor-indukált angiogenezis) körülmények között zajlik (35).

1.2.1. Vaszkulogenezis

A korai embrionális fejlődés (praesomita stádium) során a szikhólyag falának mezoderájában megjelenő, haemangioblasztok (36) alkotta „vér-szigetek” összeolvadásából primitív kapilláris hálózat fejlődik ki, amely a keringés megjelenésével párhuzamosan a vasa omphaloenterica révén az embrió szívcsövével összeköttetésben álló arteriovenozus érrendszerré alakul át (37). A „vérszigetek” centrálisan elhelyezkedő sejteiből haematopoetikus- az őket körülvevő sejtekből endotheliális őssejtekből (angioblasztok) fejlődnek ki.

1.2.2. Angiogenezis, Tumor-indukált angiogenezis (TIA)

Az un. „angiogén switch” jelenségének leírása, az 1970-es évek kezdetére esett és Judah Folkman nevéhez fűződik (24). Ez indította el azt a rendkívül intenzív kutatómunkát mely máig töretlenül tart. A Folkman-féle teória szerint a daganatok az 1-2 mm-es átmérő eléréséig avaszkulárisak maradnak. Minél nagyobb angiogén potenciállal rendelkezik az adott daganat, annál nagyobb az intravazációra alkalmas érfelület, tehát ha gátoljuk az angiogenezist akkor feltehetően csökkenni fog a keringésbe jutó, haematogén áttét kialakítására alkalmas tumorsejtek száma. Ebből következik az is, hogy az érhaló sűrűsége információt kell hordozzon az adott tumor patológiai feldolgozásakor a prognózisra vonatkozóan. További lényeges szempont, hogy a daganat kapillárisainak felépítésében résztvevő endothelsejtek -a neoplasztikus tumorkomponenssel szemben- genetikailag stabilak és a citosztatikumokhoz képest sokkal kevesebb szisztémás mellékhatással bíró antiangiogén szerek számára könnyen hozzáférhetőek.

Az első valóban látványos állatkísérletekre a gyógyszerfejlesztők is azonnal felfigyeltek, és azóta is jelentős befolyást gyakorolnak az alapkutatásra. Jelenleg több mint 100 antiangiogén szer tesztelése folyik párhuzamosan, több mint 10000 beteg részvételével (<http://cancertrials.nci.nih.gov>). Az angiogenezis kutatás nem vesztett kezdeti lendületéből, azonban több szkeptikus hangvételű kísérletes és klinikai tanulmány látott napvilágot, amelyek rámutattak, hogy sem a heterotópiásan, a subcutan térbe oltott daganatok viselkedésére vonatkozó, sem más, korábban az antiangiogén szerek tesztelésére szolgáló in vivo angiogenezis modell (nyúl kornea, csirke chorioallantois membrán) nem veszi figyelembe a daganat kiindulási helyeül szolgáló alapszövet sajátosságait. Subcutan oltás esetén a tumorsejtek egy normál körülmények között nem létező, virtuális, és avaszkuláris térbe kerülnek, ahol esetleg elképzelhető, hogy a növekvő daganat az 1-2 mm-es átmérő eléréséig, a feltételezett „angiogén switch” kialakulásáig nem tesz szert kapilláris hálózatra, anélkül, hogy ez a növekedés rovására menne. A gyakorlatban azonban erre a képességre a malignus daganatoknak nincsen szüksége (legalábbis a növekedés kezdetén), mert infiltratív módon növekszenek és olyan szegényesen vaszkularizált szövet, amelyben a kapillárisok egymástól 1-2 mm-re futnának, nem létezik. Az alapszövetre specifikus, már perzisztáló érhalózatnak egészen korai (akár 1-2 sejtes) stádiumtól kezdve, és a progresszió során

folyamatosan lényeges szerepe van a tumor tápanyag- és oxigénellátásában, valamint a migrációra és intravazációra alkalmas érfeület prezentálásában (38). Bár maguk az endothelsejtek nem képesek az antiangiogén szerekkel szembeni rezisztencia kialakítására, a tumorsejtek a daganat progressziója során újabb és újabb angiogén faktorokat expresszálhatnak, egyszerre akár többet is. Miközben tehát az egyik citokin hatásának megakadályozására törekszünk, a tumorsejtek egy-egy újonnan megjelenő, eltérő angiogén potenciálú klónja teheti kétségessé erőfeszítéseink eredményességét.

1.2.3. A tumorok vaszkularizációjának mechanizmusai

A tumorok vaszkularizációjának mechanizmusai különbözőek, melyek egymás jelenlétét nem kizáró, bizonyos esetekben párhuzamosan is megjelenő, sőt helyenként egymásra épülő folyamatok. Ezek nem kizárólag a daganatok jellegzetességei, hanem megjelenhetnek egyéb fiziológiás vagy patológias folyamat részjelenségeként is.

Eredetileg az *angiogenesis* kifejezést a posztkapillaris venulák falából a különböző angiogén stimulusk hatására kiinduló *érbimbók* szinonimájaként használták. A daganat nagy mennyiségű citokint, főleg VEGF-et, de bFGF-et, HGF-et és PDGF-et is termel, ezzel stimulálva a meglévő erek endothel sejtjeit és mezenchímális elemeit érbimbók kialakítására, mely a citokin gradiens irányában történik. A folyamat során a kapillaris gél állapota megváltozik, ezt a környező stroma sejtek MMP-szekréciója segíti. Megváltozik az endothelsejtek morfológiája, megnyitják az intercellularis kapcsolataikat és az adhézios molekuláik (CD31, VE-kadherin, bazális mebránt felismerő receptorai $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$) felszíni expressziója is megváltozik. Az endothelsejtek, melyek normálisan nincsenek sejtciklusban, vagy lassan osztódnak, belépnek a sejtciklusba, illetve fokozódik a migrációs képességük. A daganat indukálta angiogenesis során a stimuláló angiogén faktorok hatására az endothel sejtek - belépve a sejtciklusba - egy részük elhagyja az eredeti bazális mebránját, illetve ők maguk új bazális mebránt termelnek és a citokin gradiensnek megfelelően, vándorolnak a proliferáció során folyamatos kapcsolatot tartva az anyaeérrel. A daganatsejtek olyan mitogéneket is szekretálnak melyek az anyakapillaris pericitáit is aktiválják, ezért a PDGFb citokin család felelős és a receptorain keresztül fejti ki hatásukat. Az endothelsejtekhez hasonlóan a megváltozó bazális mebrán másik oldala mentén

vándorolnak és osztódnak, így biztosítva komplett borítású új érbimbókat. A migrációt az angiopetin-2 szabályozza, melynek tirozin kináz receptora a TIE2. A daganatok esetében a véletlenszerű és egyenetlen citokin arány miatt a kialakuló érbimbók sem tökéletesek, fenesztrációk maradhatnak, a kis kapillárisok lefutása szabálytalan, a környezetükben lévő intersticiális nyomás nagyobb lehet zárva tartva az új érbimbókat.

A daganatok oxigén és tápanyag ellátásban fontos további mechanizmus a tumor szövet által bekebelezett normális érhálózat az ún. *érbekebelezés*. Ez olyan területeken valósulhat meg ahol magas a kapilláris érendentitás, mint például a bőrben és a tüdőben. A bekebelezett erek endothelsejtjeinek és pericitáinak túlélését a daganatsejtek által termelt különböző angiogén citokinek segítik elő, ezek közül is kiemelendő a VEGF és az angiopoetinek (ANG) szerepe.

A tüdőrák és a rosszindulatú agydaganatok esetében további angiogenezis jelenséget figyeltek meg. A *glomeruloid angiogenezis* esetében a daganatszövet növekedése során, a meglévő erekből formálódnak új kapillárisok az erek átépülése révén. A folyamat elnevezésére utal az így keletkező, felcsavarodó érgomolyag. A folyamat pontos patomechanizmusa nem ismert, kísérleti rendszerekben a VEGF egyik variánsa képes beindítani. Ennek az érszerkezetnek a funkcionális jelentősége kérdéses, azonban komoly prognosztikai jelnek tartják a már fent említett agy- és tüdődaganatokban.

Csak a '90-es évek végén derült fény arra, hogy egyes daganatokban például melanómában és más szolid tumorokban a daganatsejtek a növekedő daganatszöveten belül maguk is olyan csatornákat képeznek, amelyek kapcsolatban vannak az érrendszerrel, és ezek egy része működőképes. A jelenség, melyet *vaszkulogén mimikrinek* neveznek molekuláris háttere, hogy a csatornákat borító daganatsejtek olyan endotheliális markereket és adhéziós molekulákat expresszálnak, mint a VE-kadherin, $\alpha\beta 3$ -integrin, efrin-A2, trombinreceptor, VEGFR, angiopoetin receptorok, CD31 vagy CD34. A daganatokban endotheliális transzkripciós faktorok, endothelsejtekre jellemző ciklooxigenáz enzimek (pl. prosztaglandin szintáz) is expresszálódnak, ezek alapján kapta a folyamat az elnevezését.

Új erek keletkezésének további módja is létezik, amelynek jelentősége azonban kérdéses a daganatokban ez az ún. *intussuszeptív angiogenezis*. A folyamatot elsősorban tüdőben észlelték, de bizonyos daganatok is képesek rá. Az endothelsejtek

bimbózáása itt nem kifelé irányul, hanem az érlumenen belül történik az endotheliális proliferáció és érlumen kialakítása, ami gyakorlatilag megkettőzi az érlumenét.

Egészen a közelmúltig úgy tartották, hogy a felnőtt szervezetben neovaszkularizáció kizárólag angiogenezis útján képzelhető el. 1997-ben azonban Asahara és munkatársai (39) az egészséges felnőtt szervezet vérkeringésében is jelenlévő VEGFR2+, AC133+ (40), CD34+ endotheliális prekursorokat, angioblasztokat mutattak ki. E sejtpopuláció tagjai – amelyek a magasabb proliferációs index által különböztethetőek meg a desquamálódott endothelsejtektől (41) - beépülhetnek az ischaemiás károsodást szenvedett harántcsíkt (42) - és szívizomszövet (43) revaszkularizációja során felépülő kapilláris hálózatba, a sebszövetet tápláló véredények falába (44), és valószínűleg szerepük van az érimplantátumok endothelizációjának folyamatában, valamint a levált endothelsejtek pótlásáért felelős „karbantartó angiogenezis”-ben is (45).

A posztnatális vaszkulogenezis jelenségét leírták daganatos kísérleti modellekben is: csontvelő eredetű endothelsejt prekursorok göcszerű beépülése volt megfigyelhető egerek bőre alá oltott vastagbél karcinóma érrendszerének elsősorban a tumor perifériás területeit tápláló kapillárisaiba. A folyamat lényege, hogy a csontvelői progenitor sejtekből, a hemangioblasztokból a keringésbe endotheliális progenitor sejtek jutnak, amelyek helyileg a daganat közvetlen közelében vagy magában a daganatban differenciálódnak ki érett endothel sejtekké. Csontvelő eredetű mezenchímális őssejtek is aktiválódnak és progenitor sejteket juttatnak a keringésbe, melyek az új kapillárisok támasztófalainak képzésében vesznek részt. A csontvelő eredetű progenitor sejtek a daganatok által termelt angiogén citokinek ezek közül is a VEGF hatására mobilizálódnak. Ezek a sejtek CD34-, KIT-, WT1 pozitívak majd később VEGFR-receptor-(R1, R2) pozitívvá válnak és elkezdik a CD133, endotheliális markert expresszálni, de a CD34 expressziójukat végig megtartják. Már a keringésben differenciálódni kezdenek endothel prekursorokká, VE-kadherin expressziójuk mellett a VEGFR2-expressziójukat is megőrzik. Később F-VIII-at kezdenek termelni, elvesztik VEGFR-CD31-termelő képességüket is, de CD34 pozitívitas megmarad. WT1-expresszió végig az egész differenciálódás során kimutatható. Kísérleti rendszerekben nagy gyakorisággal lehet a daganatos erekben ilyen endothel prekursorokat kimutatni. Munkánkban, a tüdőrákban betöltött szerepükre szeretnénk rámutatni.

1.2.4. A tumor-indukált angiogenezis molekuláris szabályozása

1.1.1.3. Szolubilis angiogén molekulák

1.1.1.4. VEGF (vascular endothelial growth factor) és receptorai

A VEGF a legfontosabbnak tartott és a legismertebb angiogén citokin. Szinte nincsen olyan daganat, amelyben még ne mutatták volna ki jelenlétét (46). A tapasztalatok szerint a legfontosabb tényező a VEGF termelés szabályozásában a tumorszövet hypoxiája.

A kódoló gén alternatív splicing-ját követően a VEGF hat különböző izoformája íródhat át (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, és VEGF₂₀₆), amelyek közül a VEGF₁₆₅ expresszálódik a leggyakrabban és a legnagyobb mennyiségben.

A VEGF a kadherin/katenin komplex átrendezése révén az interendotheliális sejtkapcsoló struktúrák megváltoztatásával, továbbá az endothel luminális-abluminális transzportfolyamatainak facilitálásával fokozza a kapilláris permeabilitást. In vivo angiogén hatású, in vitro serkenti az endothelsejtek proliferációját és migrációját, antiapoptotikus hatású, továbbá fokozza a plazminogén aktivátorok és MMP-ok termelését (47).

Az eredetileg endothelspecifikusnak tartott, később azonban több más sejtfeleségen (simaizomsejtek, monociták, makrofágok, angioblasztok, lymphatikus endothel) is kimutatott tirozinkináz aktivitású VEGF receptorok a következők: Flt-1 (VEGFR-1)(48), KDR/Flk-1 (VEGFR-2) (49), Flt-4 (VEGFR-3) (50), neuropilin-1.

A molekulacsaládkhoz tartoznak még a VEGF-B, a VEGF-C, a VEGF-D, a VEGF-E és a PlGF (placenta growth factor). Az endothelre mitogén hatású VEGF-B a VEGFR-1-hez illetve a neuropilin-1-hez képes kötődni. A VEGFR-2-höz illetve VEGFR-3-hoz kapcsolódó, inkább a lymphangiogenezisben hatékony VEGF-C és VEGF-D in vitro és in vivo egyaránt stimulálja az angiogenezist (51, 52), bár jóval gyengébben mint a VEGF. A VEGF-E egy parapoxvírus által kódolt, a VEGF aminosav szekvenciájával kb. 27%-os homológiát mutató fehérje (53), amely a VEGFR-2-höz kapcsolódva in vitro és in vivo is angiogén hatású (54). A VEGF aminosav sorrendjével 53%-os homológiát mutató PlGF a VEGFR-1-hez illetve a neuropilin-1-hez kapcsolódva potenciálja a VEGF hatását (55).

A keringésben jelenlévő VEGF származhat a daganatszövetből, de termelhetik thrombociták, granulociták, hízósejtek, monociták és limfociták is (56). A tumorszövet által termelt és ott in situ kimutatott VEGF expressziója több, egymástól független munkacsoport szerint is összefüggést mutat a daganat prognózisával, ugyanakkor a konvencionális citosztatikumok hatékonysága a tumorszövet által termelt VEGF mennyiségével fordítottan arányos (57). Dirix és munkatársai voltak az elsők, akik kimutatták, hogy vastagbélrákkal kezelt betegekben a szérumban VEGF és FGF szintje a terápia utáni relapszust követően ugrásszerűen emelkedik (58). Jelenleg a szakirodalomban csak a VEGF koncentráció meghatározásának szükségességével kapcsolatban van egyetértés, vitatott azonban, hogy az teljes vérből, vagy plazmából történjen. Sem a mintavétel módja, sem a minta kezelésének körülményei nincsenek standardizálva, ezért előfordul, hogy két különböző munkacsoport ugyanazt a módszert alkalmazva az egészséges egyének szérumban VEGF koncentrációinak megállapításakor egymástól nagyságrendekkel eltérő értékeket ad meg (59).

1.1.1.5. Angiopoetinek és Tie receptorok

A Tie receptorok két fajtája a Tie1 és a Tie2 elsősorban embrionális szövetekben fordul elő: a Tie1 expressziója kifejezett az embrionális angioblasztokon, endotheliumon és endokardiumon, továbbá a felnőttkori pulmonális kapillárisokon (60). A Tie2 hasonló eloszlást mutat, csak a fejlődés során korábban jelenik meg, felnőttkorban pedig gyengébb az expressziója (61).

Az angiopoetinek a Tie2 ligandjai. A Tie1-hez nem képesek kötődni, jelenleg nem ismert, hogy ezt a receptort milyen hatás aktiválja.

Az angiopoetin család legismertebb tagja, az embrionális miokardiumban illetve az erek körüli mesenchimában expresszált angiopoetin-1 (Ang1), sem in vitro sem in vivo nem indukál endothel proliferációt, de érdekes módon elősegíti az endothelbimbók kialakulását, növekedését és stabilizációját.

Az angiopoetin család másik tagja az angiopoetin-2 (Ang2), az Ang1 strukturális homológja, a Tie2-höz kapcsolódik és endothelsejteken gátolja, más sejttípusokon viszont serkenti a receptor foszforilációját. Embrionálisan a fejlődő erekben, felnőttkorban pedig a placentában, az endometriumban és a korpusz luteumban antagonizálja az Ang1 Tie2 mediált hatásait.

Felnőtt szervezetben a fiziológiás angiogenezis helyszínein kívül Ang2 csak a tumor asszociált erekben expresszálódik, ráadásul már igen korai stádiumban. Ezért a TIA legkorábbi markereként tartják számon (62).

1.1.1.6. FGF (Fibroblast growth factor)

Az elsőként izolált és leírt angiogén faktor. Bázikus (bFGF) és savanyú (aFGF) formája is a sejtek citoplazmájában illetve az ECM-hoz kötve található. Stimulálja az endothelsejtek proliferációját, migrációját, plazminogén aktivátor/kollagenáz termelését, és az *in vivo* angiogenezist. Szemben a VEGF-el, ami szinte kizárólag az endothelsejtekre fejt ki mitogén hatását, az FGF a legtöbb, ha nem az összes mezoderális és neuroektoderális sejt proliferációját képes elősegíteni. FGF deficiens egereken végzett kísérletek szerint azonban hiánya az embrionális vaszkulo- és angiogenezist nem befolyásolja (63).

1.1.1.7. PDGF (Platelet-derived growth factor)

Mint a neve is utal rá, először thrombocitákból izolálták, később aztán kimutatták fibroblaszt-, keratinocita-, simaizomsejt-, és astrocita tenyészetekből is. A molekulának lehet homodimer (PDGF-AA, PDGF-BB) vagy heterodimer (PDGF-AB) formája. A PDGF receptorok szintén dimereket képeznek: $\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\alpha\beta$. Az α alegység képes a PDGF A és B láncát is kötni, míg a β csak a PDGF-B kötésére alkalmas, ezért egyedül az $\alpha\alpha$ dimer képes mind a három PDGF izoforma megkötésére(64).

A PDGF legfontosabb hatása, hogy fiziológiás és patológiás körülmények között egyaránt serkenti az endothelbimbó körüli proliferációját és migrációját.

1.1.1.8. TGF- β (Transforming growth factor- β)

A legtöbb egészséges és transzformált sejt expresszálja. A sejtek által szekretált TGF- β mindaddig az ECM-hoz kötötten, biológiailag inaktív formában található, amíg proteázok hatására nem aktiválódik (65). Mind a periciták, mind az endothelsejtek termelnek TGF- β -t és rendelkeznek TGF- β receptorral. *In vitro*, kis dózisokban (0.5 ng/ml) serkenti, nagy dózisokban (1–5 ng/ml) viszont gátolja az endothelproliferációt és az endotheltubulusok kialakulását. *In vivo* angiogenezis modellekben megfigyelhető erőteljes angiogén hatása valószínűleg csak indirekt, vagyis az általa kiváltott

kemotaktikus ingerek, odavonzotta gyulladással sejtekből felszabaduló egyéb angiogén citokineknek köszönhető (66). Pericitákat és endothelt is tartalmazó sejttényészetekben TGF- β adását követően az endothelproliferáció gátlása, a periciták α SMA (α -smooth-muscle-actin) expressziójának fokozódása és az endotheliális sejtkapcsoló struktúrák stabilizálódása figyelhető meg (67).

A TGF- β elsősorban a már kialakult kapillárisok falának megerősítéséért felelős, amelyet az endothel-endothel kapcsolatok stabilizációjával és a periciták illetve simaizomsejtek differenciálódásának elősegítésével ér el (tehát elsősorban differenciációs faktor).

1.1.1.9. IL-8 és IL-4

Az embrionális angiogenezisben és a vaszkulogenezis folyamatában betöltött szerepe ezidáig ismeretlen, krónikus gyulladással folyamatokban és a TIA-ban azonban feltételezik, hogy a makrofágokból felszabaduló IL-8-nak szerepe van az angiogenezis szabályozásában. Több daganattípusban is kimutatták, hogy expressziója összefüggésben van a kapillárisdenzitással, a tumorigenitással, és a metasztatizáló képességgel (68).

1.1.1.10. Egyéb szolubilis angiogén faktorok

Számos további citokinnél tudjuk, hogy rendelkezik angiogén hatással. A növekedési faktorok közül a főleg aktivált makrofágok és bizonyos tumorsejtek által termelt, elsősorban gyulladással reakciókban szerepet játszó TNF α in vitro az endothelsejtek tubulusokká rendeződését elősegíti, ugyanakkor gátolja proliferációjukat (69). A TGF α és az EGF (epidermal growth factor) - mindketten az EGF receptorához kötődnek - in vitro és in vivo is mitogén hatásúak az endothelsejtekre.

A kolóniastimuláló faktorok közül a G-CSF (granulocita colony stimulating factor) és a GM-CSF (granulocita/machrophage colony stimulating factor) jelenléte elengedhetetlen a haematopoetikus prekursorok növekedéséhez és differenciálódásához (70), továbbá ha a fenti faktoroknál gyengébben is, de serkentik az endothelsejtek migrációját, illetve proliferációját (71).

1.2.5. Sejt-mátrix és sejt-sejt adhézións molekulák

1.1.1.11. Integrinek

Az integrinek a normál és daganatos sejtek legfontosabb adhézións receptorai. Két transzmembrán fehérjéből állnak (α és β); az extracelluláris domén az RGDS peptidegységet tartalmazó ligand felismerésében játszanak szerepet, míg a citoplazmatikus részek közül az α -lánc az intracelluláris jeleket közvetíti a ligandfelismerő hely felé, a β -lánc pedig az extracelluláris ligand felől vált ki sejten belüli jelet. A 16 α - és 8 β -alegység több mint 20 kombinációját ismerjük. Az integrinek legfontosabb szubsztrátjai különböző ECM-fehérjék (kollagén, laminin, fibronectin, vitronectin, elasztin).

Az angiogenezis során megfigyelhető endothelsejt-invázió illetve -migráció szabályozásában kulcsszerepe van a vitronectint, fibronectint és fibrint is kötni képes $\alpha\beta3$ integrinnek. Az ECM-fehérjéken kívül azonban MMP-2-t is köt, így alkalmas az ECM lokális degradációjának az endothelbimbók csúcsán szükséges rendkívül finom szabályozására (72).

Az angiogenezis szempontjából legfontosabb az $\alpha\beta3$, de ezen kívül más integrinek is szerepet kapnak. Az $\alpha\beta5$ és a kollagén-receptor $\alpha1\beta1$ és $\alpha2\beta2$ integrinek expresszióját fokozza a VEGF, az ellenük alkalmazott antitestek pedig, csökkentik a VEGF által indukálható angiogenezist ezzel szemben az $\alpha5\beta1$ integrin expresszióját a VEGF kivételével több növekedési faktor is képes befolyásolni (73).

Az integrinek tehát komplex funkciójú molekulák, amelyek szükségesek az endothelsejtek és az ECM közötti adhézión kialakulásáért, ugyanakkor felelősek a kapillárisbimbók csúcsán elhelyezkedő proteázok működésének szabályozásáért, valamint a túlélési szignálok endothelsejtek felé történő továbbításáért.

1.1.1.12. VE-kadherin

A kadherineknél Ca^{2+} -kötő transzmembrán glikoproteinek, melyek elsősorban homotípiás sejt-sejt kapcsolatokért felelősek. Citoplazmatikus doménjük a katenineken (α , β és γ) keresztül a citoszkeletonnal áll kapcsolatban. Endothelsejteken a jukcionálisan elhelyezkedő VE-kadherin (74) és a jukcióktól független lokalizációjú N-kadherin

található. VEGF hatására a VE-kadherin/katenin komplex foszforilációja és disszociációja következik be, a kapillárispermeabilitás növekedését okozva (74).

1.1.1.13.Eph-B4/ephrin-B2

Az ephrinek és receptoraik kiemelkedő fontosságúak az embrionális angiogenezis folyamatában, a TIA-ban sem pontos szerepük, sem hatásmechanizmusuk nem ismert. Valószínűleg, annak késői fázisaiban bírnak jelentőséggel. Jelenleg 8 ephrin molekulát és 14 tirozinkináz aktivitású ephrin receptort különböztetünk meg (75).

1.2.6. Kapillárisdenzitás (MVD, microvessel density)

A TIA kvantitálásával kapcsolatos próbálkozások már több mint egy évtizedes múltra tekintenek vissza, ám még mindig nem rendelkezünk olyan a mindennapi gyakorlatban egységesen használható, kiforrott módszerrel, amelynek segítségével a pathológus nyilatkozni tudna az adott daganat angiogén aktivitásának prognosztikus értékével kapcsolatban. A legrégebben és leggyakrabban használt módszer a tumorból készült szövettani metszet egy adott területén a kapillárisok számának meghatározása. Az eljárásra több módszer is elterjedt. Egyesek kiválasztják a metszet szubjektive legvaszkularizáltabb területét (ez az általában a tumor-stroma határ közelében található ún. „hot spot”), ott fénymikroszkóp illetve egy erre a célra szolgáló sablon (Chalkley-féle grid) (76) segítségével megszámlálják a különböző immunhisztokémiai markerekkel jelölt kapillárisokat, majd a kapott értéket vetik össze a klinikummal. A hot spot-ok alapján történő prognosztizálás szerint a tumor legvaszkularizáltabb területein kell, hogy előforduljanak a legnagyobb angiogén potenciállal rendelkező daganatsejtek klónjai, amelyek a környezetükben jelentősen megnövekedett, az intravazációra alkalmas „vaszkuláris ablak”-on át könnyedén törnek be a keringésbe és hoznak létre szintén angiogén, ezért gyorsan növekvő, haematogén metasztázisokat. Jelenleg a szolid tumorok többségében már megvizsgálták az MVD és a prognózis közötti korrelációt. Az irodalomban mindössze 4:1 az arány az összefüggést elfogadó publikációk javára, sőt vastag- és végbél daganatok esetében leírták, hogy a fokozott érdenzitás jobb prognózissal párosul. 2002-ben nemzetközi szakemberekből álló munkacsoport által készített módszertani leírás született, amelynek ajánlása alapján az MVD szövettani metszetekben történő meghatározásának módja a következő: egy, a daganatból

származó reprezentatív metszet immunhisztokémiai jelölése anti-CD34 ellenanyaggal, a leginkább vaszkularizáltak tűnő terület megkeresése kis nagyítással. Három látótérben (200x) a Chalkley-grid és a kapillárisok átfedést mutató pontjainak számát kell megadni. A szerzők szerint a munka bizonyos előképzettséget feltételez, és szükség van a különböző munkacsoportok egymás általi kontrolljára, valamint további átfogó, nagy esetszámokat tartalmazó tanulmányokra is.

1.2.7. Endothel proliferációs index (ECLI, endothelial cell labeling index)

Az erek belfelszínét borító endothelsejtek a szervezet legalacsonyabb proliferációs rátájával rendelkező sejtei közé tartoznak. Szemben a csontvelő sejteivel, amelyek kb. 5 napos élettartammal rendelkeznek, az endothelsejtek esetében ez az érték több száz nap. A TIA során az endothel a csontvelői sejtekhez hasonló tempóban képes proliferálni.

A tumorból készült szövettani metszet proliferációs- (Ki67, PCNA, BrdU, ³HTdR) és endothelspecifikus (anti-CD31, anti-CD34, anti-vWF) markerekkel történő szimultán jelölése lehetővé teszi a daganat műtéti eltávolításakor vagy a biopszia vételekor aktuálisan zajló angiogenezis aktivitásának, valamint a proliferáló endothel- és tumorsejtek arányának megállapítását. Utóbbi adatból következtethetünk a daganat TIA-tól független növekedési képességére, amelynek ismerete az antiangiogén terápia tervezéséhez elengedhetetlenül szükséges. Amennyiben a terápia előtt és után vett biopsziák értékeit vetjük össze egymással, úgy a módszer az angiogenezisellenes kezelés hatékonyságának ellenőrzését is lehetővé teszi.

A különböző tumorokban meglehetősen eltérő ECLI (a proliferációs markerrel jelölt endothelsejtek százalékos aránya) értékek fordulhatnak elő. Kísérleti állatok rendkívül gyorsan növekvő daganataiban az ECLI jóval magasabb lehet, mint a jóval lassabb növekedést mutató humán tumorokban.

1.2.8. A kapillárisok pericitaborítása (PCI, pericyte coverage index)

A periciták (az angolszász irodalomban „Rouget cells”, „periendothelial cells”, és „mural cells” néven is ismertek) a kapillárisok és posztkapilláris venulák bazális membránjába ágyazott, elsősorban az érfal stabilizációjáért és a véráramlás szabályozásáért felelős, több citoplazmatikus nyúlvánnyal is rendelkező sejtek. Szerepük van továbbá az endothel- proliferáció, migráció és maturáció valamint a kapillárispermeabilitás szabályozásában (77). Míg korábban jellegzetes lokalizációjuk

és morfológiájuk alapján azonosították őket, jelenleg több immunhisztokémiai marker is alkalmas a kimutatásukra (α SMA, tropomiozin, dezmin (78), PDGFR β (79), nesztin, aminopeptidáz-A, aminopeptidáz-N (80), HMW-MAA, RGS5 (81), amelyek közül a leggyakrabban használtak a dezmin és az α SMA. A kapillárisok pericitái inkább dezmin, míg a posztkapilláris venulák pericitái α SMA-t és dezmin is expresszálnak.

A daganatok érhálózatára jellemző éretlen, fokozott permeabilitású és sérülékeny kapillárisok falának pericita rétege a daganat kiindulási helyéül szolgáló alapszövet érfalainak hasonló rétegéhez képest sokszor hiányos, az alkotásukban résztvevő periciták fenotípusa a normálistól eltérő. A különböző szövettani típusú daganatokban a PCI (a pericita- és endothelspecifikus markerrel kettősen jelölhető kapillárisok százalékos aránya) széles határok között mozoghat (glioblastoma multiforme 12.7%, veserák 17.9%, vastagbélrák 65.4%, emlőrák 67.3%, tüdőrák 40.8%, prosztatatarák 29.6%), ennek pontos okát nem ismerjük, de valószínűleg az alapszövetre jellemző értékeket is tükrözi.

Célszerű lehet meghatározni az egyes daganatok PCI értékeit, és abból - a környező gazdászövet érhálózatának periciták általi borítottságát is ismerve - következtetéseket levonni a tervezett antiangiogén terápia lehetőségeit illetően.

1.3. Endothel prekursor sejtek és ko-mobilizált haematopoetikus prekursorok jellemzői

1.3.1. EPC és a ko-mobilizált sejtek jellemzői

Az endothel progenitor sejteket először Asahara és munkatársai 1997-ben izolálták (39) a sejtek vaszkuláris endotheliális növekedési faktor receptor-2 (VEGFR2) és CD34 koexpressziója alapján. Az elmúlt néhány évben a specifikus sejtfelszíni markerek és molekuláris jelölési technikák elősegítették a funkcionális ős- és progenitor sejtek azonosítását. Az EPC (endothelial progenitor cell) és EC (endothelial cell) sejtek valamint a haematopoetikus őssejtek nemcsak a fentiekben említetteket, hanem számos egyéb markert is expresszálnak. Napjainkig nem volt egyértelmű definíció az endotheliális progenitor sejtekre. Az első publikációig számos kutatócsoport több definíciót is megállapított és tett közzé erre a sejt populációra. Az EPC sejteket úgy mutatták be, mint fibroblaszt növekedési faktort, CD38-at, c-kitet, CD31-et, CD146-t, CXCR4-et, von Willebrand factort (vWF), vaszkuláris endothelialis cadherint (VE-cadherin) Tie-2/TEK-et (angiopetin-1 receptor prekursor vagy tunica intima EC kinaze) és CD133-at expresszáló sejteket (82-84). Az EPC sejtek meghatározása ennek következtében magába foglalja a különböző érési stádiumban lévő sejtek csoportjait a primitív haemangioblastoktól a teljesen differenciált EC sejtekig. A korai EPC sejtek (a csontvelőben lokalizált vagy a közvetlenül a keringésbe kerülő sejtek) CD133+/CD34+/VEGFR2+ sejtek, a keringő EPC sejtek CD34 és VEGFR2 pozitívak, a CD133 pozitivitást elvesztik és az érett sejtek típusos sejtfelszíni markereket kezdenek expresszálni (85). Ily módon a legfőbb EPC marker jelölt a CD133 egy úgy nevezett árva receptor specifikusan expresszálódva a korai EPC sejteken, de amelynek expressziója elvész, amikor a progenitor sejt érett EC sejté differenciálódik (86).

A perifériás vérben keringő EPC sejtek számára vonatkozóan a különböző irodalmi adatok igen eltérőek, 70-120 sejt/vér milliliter –től (45) 3 000-5 000sejt/vér milliliter-ig (87) függően az alkalmazott izolálási eljárástól. A flow cytometriával meghatározott keringő EPC sejtek viszonylagos alacsony szintje éles kontrasztban áll a magas sejtszámú járulékos sejtekkel, melyeket mononukleáris sejt frakciót tartalmazó sejt kultúrákból izoláltak. Ez utóbbi sejteket, gyakran félreérthető módon szintén EPC sejtekként definiálják. A perifériás vér mononukleáris sejteket (PBMNCs) fibronectin-

, zselatin, vagy kollagén-nel bevont edényhez kötötték. Csökkentendő a differenciált EC sejteket és az adherens makrofágokat, a nem adherens sejteket eltávolítják, és újra szélesztik egy további edényben. Diszkrét kolóniák jelennek meg egy hét múlva, kerek a centrumukban orsó-alakú proliferáló sejtekkel. Ezeket a kolóniákat általában kolónia-képző EC sejt-egységnek colony-forming unit-ECs (CFU-ECs)-nek nevezik (88). A másik, gyakran használt technika: PBMNC sejteket tenyésztnek angiogén citokinek jelenlétében 4-6 napig, ami után a le nem tapadt sejteket eltávolítják, és így nyerik a cél adherens sejt frakciót (89). Mivel ezek az adherens sejtek állat modellekben elősegítették az angiogenezist miokardiális vagy végtag ischemia esetén, ezeket keringő angiogén sejteknek nevezték (CACs). Bár a CAC sejtek nem mutatnak CFU-EC sejt kolónia morfológiát és nagyobb számban lehet összegyűjteni a sejtenyészetből mint a CFU-EC sejteket, endothel fenotípussal rendelkeznek (kötik a Bandeiraea simplicifoli/BS-1 és Ulex europeus agglutinin-1/UEA-1 lektint), CD31-et, vWF-t, VE-cadherint és Tie-2/TEK expresszálnak, továbbá képesek acetilált low-density (aLDL) felvételére) in vitro, a sejtfelszíni molekuláris profiljuk analógnak tűnik a CFU-EC sejtekkel. Következésképp mindkét sejt populációt az irodalomban gyakran EPC sejteknek nevezik (90). A harmadik, legkevésbé tanulmányozott EPC sejt típus, melyet ma endothel kolónia-képző sejteknek nevezünk (ECFCs, „endothelial colony-forming cells”). Ebben a metodikában a PBMNC sejteket endotheliális specifikus növekedési médiumban tenyésztették. Miután eltávolították a nem adherens sejteket az ECFC kolóniák EC sejt típusos utcaő mintázatot mutatnak elkülönülve a többi adherens sejt populációtól. Tekintettel arra, hogy az ECFC sejtek összehasonlítva a CFU-EC sejtekkel valamint a CAC sejtekkel a tenyészetben később jelennek meg, ezeket értelemszerűen késői érésű EPC sejteknek nevezik (91). Harraz és munkatársai (92) feltételezték, hogy a CD34-angioblastok a CD14 pozitív monociter sejtek részei. Rehman és munkatársai (93) perifériás vérből monocita/makrofág frakcióból izolált CAC sejteket mutattak be, Yoder és munkatársai (94) azt találták, hogy a CFU-EC sejtek colonia stimuláló faktor-1-et expresszálnak és aktívan fagocitálják az Escherchia colit. Mindezek felvetik a kérdést, hogy a CAC és CFU sejtek az EPC sejtcsoportba vagy a monocita /makrofág sejt populációhoz tartoznak. Tisztázandó a komplex nomenklatúrát valamint a kapcsolatot az EPC és mononukleáris sejt típusok között, Prater és munkatársai egy elegáns, működő hipotézist állítottak fel (90). A szerzők

javaslata szerint a CAC sejtek képviselik a tenyésztett EPC sejtípusok legnagyobb csoportját, összehasonlítva a perifériás vér monocita számával, mely sejtcsoportról szintén azt feltételezik, hogy a CAC populációhoz tartoznak. Teóriájuk szerint a CD45 pozitív haematopoetikus progenitor sejtek egy bizonyos, de nem definiált mértékben, átfedésben vannak a CFU-EC sejtekkel, ugyanakkor, ECFC sejteket tartalmaz a keringő EC (CEC) sejtpopuláció is.

Még komplexebbé téve a képet számos szerző leírt különböző csontvelő eredetű keringő CD45+(sub) típusú sejt populációkat melyek hozzájárulnak a tumor angiogenezishez (95). E sejtek többsége periendotheliális pozícióban helyezkedik el és ezek közül feltételezhetően, csak néhány tartozik, a fentiekben leírt tenyészetben növekvő sejtpopulációkhoz.

A TIE2-t expresszáló monocytákat (TEMs) de Palma és munkatársai fedezték fel (96, 97). Ezek periendotheliális pozícióból toborozzák és segítik elő az angiogenezist, parakrin módon. CD11b-t, CD45-t és TIE2-t expresszálnak, de nem expresszálják a VEGFR2-t vagy egyéb meghatározott EC vagy pericita asszociált markert (pl: CD31, CD34 vagy α -simaizom aktint vagy NG2-t).

A tumor asszociált stroma sejteket (TASCs) Udagawa és munkatársai írták le (98). Ezek a sejtek CD45+/VEGFR+ kettős pozitív sejtek és képesek a tumor angiogenezist elősegíteni, bár kevésbé épülnek be az endothel csőbe, a tumor vaszkulaturában. Más szerzők leírták, hogy a TASC sejtek parakrin módon indirekte angiogén faktorok termelése révén segítik a tumor vaszkularizációt. Csontvelő eredetű keringő, TEM és TASC szerű sejteket (RBCC) mutattak ki korábban meglévő EC sejtek fokozott proliferációjakor. Az RBCC sejtek CD45-öt, CD11b-t, CXCR4-et és VEGFR1- et expresszálnak, de nem expresszálnak VEGFR2-öt, ezzel azt mutatva, hogy VEGF és CXCL12 által stimulálhatóak és túlnyomórészt haematopetikus természetűek. Lyden és mtsai nemrégiben azonosítottak VEGFR1+ haematopetikus progenitorokat, melyek a keringő VEGFR2+ EPC sejtekkel együtt épültek be a perikapilláris kötőszövetbe így stabilizálva a tumor vaszkulaturát.(99). Érdekessége ezeknek sejteknek, hogy akkor jelennek meg, mielőtt a metasztatikus tumorsejt eléri a célszervet, elősegítve a daganatnövekedést, kialakítva egy „bölcsőt” amelyben a tumor sejtek elhelyezkedhetnek és proliferálhatnak (100). Azonban, hogy milyen mértékben van átfedés ezen VEGFR1+ sejtek és az RBC sejtek között az még nem teljesen tisztázott.

Egy további új leukocita populációt (CD11c+CCR6+ dendritikus sejt prekurzor, tumor asszociált dendritikus sejtek) mely fokozza a tumor vaszkularizációt Conejo-Garcia és mtsai írták le (101). Munkájukban azt találták, hogy β -defensinek dendritikus prekurzorokat mozgósítottak a tumorba CCR6-on keresztül, ahol VEGF-A transzformálta a sejteket endothelszerű sejtekké. Ellentétben a TEM és TASC sejtekkel, ezek a sejtek főként a kapilláris falba vándorolnak és valódi endothelsejtekké alakulnak. Összefoglalva, a tumor eredetű angiogén citokinek nem csupán serkentik az EPC sejteket, hanem fokozzák a haematopoetikus prekurzorok toborzását a tumor vaszkulátúrába. A különböző sejtvonalak komobilizációja, újabb proangiogén citokinek termelődését idézik elő. A proangiogén citokinek elősegítik az EC sejtek stabilizációját a tumor stromában továbbá, serkentik a tumor indukálta angiogenezist.

1.3.2. Az EPC sejtek mobilizációja

A tumor vaszkularizáció elősegítésében az EPC sejteknek válaszolniuk kell a csontvelőből történő kiáramlást és a tumorhoz jutást jelző szignálra, majd érett EC sejté kell differenciálódniuk. Bár ismeretünk az EPC sejtek mobilizációjának molekuláris szabályozásáról még kezdeti stádiumban vannak, a VEGF a legjelentősebb citokin a többi molekula közül (102). A VEGF által aktivált mátrix metalloproteinase-9 (MMP-9) hasítja a membrán-kötött őssejt citokint az mKitL-et. Ennek hatására, a csontvelőben felszabaduló solubilis skitL, stimulálja a csontvelő vaszkuláris zónájában, nyugalomban lévő cKit pozitív EPC sejteket. Ez a transzlokáció aktiválja az EPC sejteket a nyugalmi fázisból a proliferatív stádiumba (103). Továbbá VEGF-fel kapcsolatban kimutatták, hogy szabályozza (fokozza) a stromal cell-derived -factor-1-et (SDF-1, másként CXCL12) és a CXCR4-et (SDF-1 receptor) (104, 105). Az SDF-1 az EPC sejtek kemotaktikus faktora és az EPC sejteket a neovaszkularizáció helyéhez vonzza (106). A legújabb állatkísérletek szerint a CXCR4 blokád megszünteti a progenitor „homing”-ot, míg a helyi SDF-1 bevitel fokozza a célszervhez jutásukat (107). Ugyanazén tanulmányban SDF-1 hiány esetén a VEGF nem volt képes a csontvelő eredetű sejtek serkentésére. A CXCR4 aktivitás blokkolása csökkenti, a csontvelő eredetű sejtek számát a célszervekben még magas VEGF szint jelenléte mellett is. Ennek következtében úgy tűnik, hogy az SDF-1 önállóan további szignálok nélkül nem elegendő az EPC sejtek tumorba való beépüléshez. Másrészt, további

tanulmányok demonstrálták, hogy az SDF-1 alapvető a csontvelő eredetű sejtek adheziójában, szignifikánsan segítheti az EPC sejteket az érképződésben (105). A VEGF, interakcióban a MMP-9-cel és a SDF-1-el gyorsan kiváltják együtt az EPC sejtek véráramba áramlását; VEGF kezelés hatására az EPC szint 24 óra alatt megemelkedik a keringésben (108). A keringésben emelkedő VEGF szint hatására daganatos betegekben fokozódik az EPC sejtek mobilizációja (109, 110). Azok a molekulák, amelyek leukocitákat és erithrocitákat mobilizálnak, hasonlóan befolyásolhatják az EPC sejtek mobilizációját. Emelkedett EPC szintet észleltek azon kísérleti állatoknál, amelyeknél exogén granulocita-monocita kolóniastimuláló faktor (GM-CSF) injekciót adtak be, továbbá felgyorsult korneális vérérnövekedést találtak csontvelő eredetű sejtekkel szintén GM-CSF kezelésben részesült állatoknál (111). Egy másik egér modellben a GM-CSF határozottan elősegítette a szubkután oltott vastagbél tumor sejtek növekedését, és részben, közvetett módon segítette a csontvelő eredetű sejtek beépülését az újonnan képződő erekbe (112). Recombináns humán erythropetin (rHuEPO) adása növelte a funkcionálisan aktív EPC sejtszámot. In vitro, valamint a humán perifériás vérben is az EPC sejtszám emelkedését észlelték EPO kezelést követően (113). Az EPO szérum szintje és a keringő EPC sejtszám, valamint funkciója között szignifikáns összefüggést találtak (114). Bár az EPO hasonló befolyással van az EPC sejtek mobilizációjára, mint a VEGF (115), arra nincs adat, hogy milyen módon hat az EPO az EPC sejtekre tumorhordozó állatokban illetve daganatos betegekben.

A fentiekben részletezett faktorok mellett a legújabb adatok szerint a placentanövekedési faktor (116), az angiopetin -1 (117), a thrombocita növekedési faktor-CC (118) a nitric oxid (119) a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase inhibitors /statinok (120) a fizikai tréning (121) és az ösztrogének (122) is stimulálják az EPC mobilizációt. Ezzel szemben a C-reaktív protein és a tumor nekrozis faktor α az apoptózist segítik elő, gyengítve és csökkentve az EPC sejtszámot és a sejtfunkciót (123,124).

1.3.3. Az EPC sejtek hozzájárulása a tumor vaszkularizációjához

Az EPC sejtek képesek elősegíteni a tumor-indukálta vaszkulogenezist. Bár elsődlegesen az embriogenezis során programozottak a véredényképződésre, ez a progenitor populáció felnőtt korban is megőrzi képességét angiogén milióban.

Az első leírás a tumor vaszkularizációban való részvételről Lyden és mtsai megfigyelése alapján született (99). Munkájukban demonstrálták, hogy az EPC sejtek kb 90%-ban játszanak szerepet limfómák vaszkularizációjában angiogenezis-defekt Id-mutáns egerekben, ahol egyébként az implantált tumorok gyorsan visszafejlődtek a csökkent tumor érképződés miatt. Vad-típusú csontvelő transzplantáció esetén helyreállt a tumor neovaszkularizáció és a növekedés Id mutáns egerekben. Valószínűleg azért lehetett fokozott EPC hozzájárulás a tumor vaszkulaturához, mert az Id-deficiens egerek képtelenek az endothel bimbózásra, a tumor növekedést így nem tudják segíteni, ezért alternatív vaszkularizációs mechanizmusok aktiválódnak. Újabb állat transzplantációs modellekben akár 50 százalékos arányban EPC sejtek inkorporációját figyelték meg az új erekbe (125), más szerzők alacsonyabb, de szignifikáns 10 és 20%-os beépülést írtak le (126). Olyan vizsgálatokról is beszámoltak, ahol nem találtak mérhető összefüggést az EPC sejtek és a tumor érújdonképződés között. De Palma és munkatársai (96) azt demonstrálták, hogy a TEM sejtek az EPC sejteknél nagyobb arányban keresik fel a tumorokat és lépnek kölcsönhatásba a vaszkuláris EC sejtekkel. Hasonlóképp Gother és mtsai (127) egy transzgenikus egér modellen azt vetették fel elképzelhető, hogy az EPC sejtek nem járulnak hozzá a tumor endotheliumhoz. A jelentősen eltérő eredményeket illetően egy lehetséges magyarázat az, hogy eltérők az experimentális modellek/technikák melyekkel azonosították az EPC sejteket. A legújabb adatok szerint az adott tumor stádiuma is meghatározza az EPC sejtek részvételét a tumor vaszkularizációban (128).

Az EPC sejtek közreműködését a humán malignus betegségek vaszkulaturájában szintén vizsgálták néhány újabb keletű tanulmányban. Peters és mtsai. tanulmányozták azokat a betegeket, akiknél csontvelő transzplantációt követően alakult ki malignus betegség ellentétes nemű egyénektől átvitt donor sejtekkel. Fluorescens in situ hybridizációt használtak sex kromoszóma specifikus jelöléssel és azt találták, hogy százalékos arányban fej-nyaki szarkománál 1%-ban, limfómánál 12% -ban volt csontvelő eredetű EC sejt a tumor vaszkulaturában (129). Ezek az adatok közelítettek ahhoz a számhoz, amit spontán egér tumoroknál figyeltek meg: nulla vagy egészen magas EC sejszámot implantált tumor vonal alkalmazása esetén. Nemrégiben végzett vizsgálatok CD133+ EPC sejteket igazoltak humán tumor kapillárisokban (130, 131). EPC sejteket mutattak ki különböző daganatos betegek perifériás vérében

hepatocellularis karcinómában (110), emlő daganatban (107) vastag- és végbél daganatban (132), myeloma multiplexben (133), myelofibrosisban (134) non-Hodgkin limfómában (130), akut myeloid limfómában (134), és malignus gliomában (135).

Összefoglalva, bár nyilvánvalónak tűnik, hogy az EPC sejtek képesek elősegíteni a tumor vaszkularizációt, ennek a sejtek részvétele függ számos körülménytől, így az állatkísérletes modelltől, a felhasznált technikától, a tumor hisztológiai típusától, a daganatos betegség stádiumától, és attól is vajon a daganat ellenes kezelést elkezdték-e.

1.4. Lymphangiogenesis

1.4.1. A lymphangiogenesis pathofiziológiája

A lymphatikus metasztázisok fontossága jól ismert a daganat stádiuma és kezelése szempontjából. A nyirokcsomó státusz meghatározza számtalan szolid tumor multimodális kezelését például emlő-, tüdő-, kolorektális daganat és fejnyci tumorok esetén. Bár a nyirokér invázió, a metasztázis képződés folyamata a regionális nyirokcsomókba és a tumor indukálta lymphangiogenesis mechanizmusa hasonló a haematogén áttétképződéshez illetve az angiogenesishez, ezek a folyamatok még kevésbé feltártak.

A lymphatikus rendszer funkciója, a kiválasztott, fehérjében gazdag folyadék, a nyirok elvezetése jelentős szerepet játszik a homeosztázis fenntartásában, valamint a zsírfelszívódásban. Fontos szerepet tölt be az immun surveillance-ben (136). A lymphatikus rendszer hierarchikus véredények hálózatából áll, melyek a kapillarisoktól indulnak, lymphatikus endothelsejtek alkotta (LEC) egyrétegű fallal bírnak a nagyobb átmérőjű véredényeken keresztül a vénás rendszerrel kapcsolatot teremtve. Szemben a vérerekkel, a lymphatikus kapillarisoknak nincs folytonos membránborításuk, és nagyobb endotheliális hézagokkal rendelkeznek, továbbá elasztikus rostok rögzítik az extracelluláris mátrixhoz. Ezek a rögzítő filamentumok védik meg őket az összeeséstől nagyobb intersticiális nyomás esetén és elősegítik a szolubilis szöveti anyagok felvételét (136). A nyirok visszaáramlást billentyűk akadályozzák meg, a külső perivaszkuláris simaizom sejt borítás pedig a nyirok előrehaladást biztosítja (137). A harántcsíkolt izomzat kontrakciója szintén segít a nyirokfolyadéknak a szív felé való haladásában.

A nyirokér fejlődés kezdeti lépése az endothelsejt szubpopulációjában a homeobox transzkripciós faktor, a Prox-1 polarizált expressziója a fő vénán, melyen keresztül

elindul a nyirokrendszer „bimbózása” és növekedése (138). A sejtek felveszik a nyirokér fenotípust (139). A humán vaszkuláris endotheliális sejtek Prox1 overexpressziója elnyomja a véredény specifikus géneket és fokozza a nyirokendothel specifikus sejt transzkripciót (140). A vaszkuláris endotheliális növekedési faktor C (Vascular Endothelial Growth Factor C/ VEGFC) a legfőbb kemotaktikus és túlélési faktor a lymphangiogenesis során. VEGFC szükséges az első nyirokerek növekedéséhez az embrionális vénából is. A VEGF C homozygota deléciója a nyirokérrendszer teljes hiányához vezet egér embrióban, heterozygota VEGF C egereknél súlyos lymphatikus hiperplázia alakul ki (141). Vaszkuláris endotheliális növekedési faktor receptor 3 (VEGFR 3) szignál az endothelsejteknek nyirokendothelszerű fenotípust „adományoz” (142). A VEGFR3 deléció az éredény remodelling defektusához és embrionális halálhoz vezet a középgesztációs időszakban (143). A FOXC2 egy „villafejű” transzkripció faktor mely felelős a nyirokérrendszer és a nyirokér billentyűk fejlődéséért (144). Újszülött egereknél a podoplanin deficienciája abnormálisan tág, dilatált, nem funkcionáló felületes nyirokerekhez vezet a bőrben (145). A Neuropilin 2 mely eredetileg „semaphorin” receptor az idegrendszerben VEGFC-hez és VEGFR3-hoz is kötődik, hiánya egerekben nyirokkapillárisok súlyos hipopláziáját okozza (146). Angiopetin 2 (Ang2) deficiens egereknél hasonló tüneteket észleltek (147). Az Integrin α IX β 1 közvetlenül kötődik a VEGF-C/D-hez, mely felveti a VEGFR3+ szignál és integrinek mediálta kommunikációt a lymphatikus endothelsejtek adhéziójában és migrációjában (148). A másodlagos nyirokszervek, mint pl. a nyirokcsomók és Peyer plakkok a vékonybélben, a migráló Prox1 pozitív nyirokendothelsejtekből származó, primitív nyiroktasakból egymásra rakódott nyirokerekből képződnek (149). Bár a lymphatikus rendszer fejlődése még nem teljesen feltárt, az egyértelmű, hogy a Prox1 és VEGF-C esszenciális citokinek szerepet játszanak ebben a folyamatban. A VEGF-C és -D a tirozinkináz receptor VEGFR-3 ligandjai. A VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 tengely alkotja a szignál úthálózatot a lymphatikus endotheliális sejt növekedés, migráció és túlélésben (150). A VEGFR-3 stimuláció egyedül megvédi a nyirokendothel sejteket a szérum megvonás, okozta apoptozistól és fokozza növekedésüket és migrációjukat. A VEGF-C specifikus biológiai hatása in vivo proteolitikus feldolgozásától függ, tekintettel arra, hogy éretlen pro-peptid formájában szekretálódik és extracellularis konvertázok proteolizálják. A proteolízisen átesett VEGFC-D szintén aktiválja a

VEGFR-2-t és véredény növekedést, indukál (52). Ellenben a VEGF-A, mely elsődlegesen VEGFR-2-höz kapcsolódik képes nyirok hiperpláziát előidézni, de nem képes helyettesíteni a VEGF-C indukálta nyirokfejlődést (151). A nyirokendothel sejtek VEGFR2-t expresszálnak és a VEGF-A is képes potenciálisan lymphangiogenezist indukálni xenograft nyirokérsejteken és a bőrön gyulladás és szövetgyógyulás esetén (152). Az inzulin like növekedési faktor 1 és 2 szintén részt vesz a lymphangiogenezisben *in vivo* (153). A hepatocita növekedési faktor egy limfangiogén faktor mely hozzájárul a nyirokáttek kialakulásához, amikor a daganatban fokozottan expresszálódik. További limfangiogén citokinek, mint a korábban is részletezett Ang1 és 2, illetve a Cyclooxygenaze 2 (Cox2) szintén szabályozó szereppel bírnak (154, 155). Vizsgálatok megerősítik, hogy a limfangiogén faktorok expressziója elősegíti a daganat áttétképződést *in vivo* és *in vitro* egyaránt. VEGF-C a makrofágok kemotaxisát is indukálja szintén *in vitro* és *in vivo* megfigyelések alapján, és ez felveti immunmoduláns funkcióját (156, 157).

A tumor asszociált makrofágok nyirokendothel növekedési faktort és VEGFR-3-at expresszálnak ezzel elősegítve a peritumorális lymphangiogenezist és a daganatsejt disszeminációt (158). A primer tumorok limfangiogén faktorok termelésével előkészítik metasztatikus helyüket és a daganatsejt transzportot a szentinel nyirokcsomóba (159). VEGF-A hatása a nyirokerekre másodlagos mellyel fokozza a nyirokér permeabilitást, vagy gyulladásos sejteket toboroz melyek VEGF-C/VEGF-D –t termelnek (160).

A nyirokérrendszer fontos szerepet tölt be a daganatos progresszióban, mert a daganatsejtek gyakran elvándorolnak a nyirokkapillárisokon keresztül (161). Bár a nyirokcsomó pozitivitás klinikai relevanciája jól ismert, a daganatsejtek nyirokérrendszeren keresztüli vándorlása molekuláris szinten még nem kellően ismert. Az elmúlt években nagy erőfeszítések történtek a nyirokérrendszer specifikus markerek kimutatására. Ezen specifikus markerek a fentiekben részletezett VEGFR 3, VEGF-C/D, hyaluronan receptor (LYVE 1) és podoplanin. Segítségükkel lehetővé vált a nyirokérdenzitás mérése tumor biopsziás anyagokban. Számos klinikopathológiai vizsgálat korrelációt mutat a nyirokérdenzitás és a humán tumorok progressziója között (161). A VEGFC-D/VEGFR3 szignálút aktivációja tűnik a kulcsfontosságú molekuláris kapcsolatnak a daganat és lymphangiogenezis között is (ezzel jó esélyt teremtve a

metasztázis kialakulásának szolid tumorok esetén). Természetesen, ahogy ezt a korábbiakban is részleteztem és számos tanulmány is megerősíti, ez sokkal bonyolultabb folyamat, hiszen további ko-receptorok is részt vesznek a VEGF-C/D felismerésében mint a neuropilin 2 vagy a $\beta 1$ és $\alpha 9$ integrinek. A már leírt VEGF-A szintén képes lymphangiogenezist indukálni és a metastázis képződést elősegíteni (159). Állatkísérletek támasztották alá, hogy a tumor szekretálta VEGF C is képes stimulálni a tumor sejtek motilitását a nyirokendothel falon keresztül (162). Mindamellett bizonyos fokú ellentmondás is van, tekintve a peri -és/vagy az intratumoralis nyirokerek fontosságát (relevanciáját) illetően. Egyrészt több kutató szerint funkcionáló nyirokerek kizárólag a tumor szélén vannak és vesznek részt a nyirokmetasztázis képződésben (163). Másrésztől több experimentális vizsgálat kimutatta az intratumoralis nyirokerek létezését és összefüggését a daganat progressziójával és a betegség rosszabb prognózisával (164). Az intra-versus peritumorális elhelyezkedés a kiértékeléskor érdekes, mint például a tüdőtumorkok esetén, ahol a kiindulási szervben heterogén a nyirokér eloszlás. A tüdőben a nyirokér vaszkulátúra kiterjed messze a bronchiolusokig de nem éri el az alveolusokat (165). Kissejtes tüdődaganatos sejtvonalakban emelkedett VEGFC-/D mRNA és protein expressziót találtak (166). Munkacsoportunk egy korábbi munkája során reszekált NSCLC szövet mintáin emelkedett VEGF-C expressziót talált az angiogén tumorok esetén, de nem talált szignifikáns korrelációt a betegség prognosztikai faktoraival. Munkánk elsőként demonstrálta, hogy a lymphangiogenezis kizárólag az angiogén növekedési típusú tüdődagantokban jelenik meg és, hogy az LVD összefügg a klinikai viselkedéssel és a nyirokcsomó státusszal ebben a növekedési típusú tüdődaganatban. Továbbá az eredmények szintén az elsőként bizonyítják, hogy a nyirokcsomó metastázisok megjelenésének veszélye és a rövidebb túlélés valószínűbb, a nem angiogén típusú populációban, és hogy a nem angiogén tumorok elsősorban bekebelezik a gazdaszöveti nyirokereket növekedésük során, ellenben az angiogén tumorokkal, amelyek folyamatos lymphangiogenezis kíséretében növekednek (167). További vizsgálatokban a NSCLC esetekben a szérumban VEGF-C-t használták nyirokcsomó metastázis markerként kiegészítve képalkotó eljárással (CT vizsgálattal) hogy pontosan meghatározassák a nyirokcsomó stádiumot (168). Annak ellenére, hogy ismert a

tüdődaganatokban az aktív proliferáló nyirokérhálózat jelenléte, számos kérdés marad megválaszolatlanul a tüdődaganatban a lymphangiogenezist illetően (169).

1.4.2. Csontvelő eredetű lymphangiogén progenitor sejtek

Felnőttkorban a legfontosabb új nyirokérfejlődési folyamat a korábban meglévő nyirokerekből történő bimbózás folyamata (170). Sokáig tisztázatlan volt, hogy vajon a csontvelő eredetű keringő endothelsejtek részt vesznek-e a lymphangiogenezisben.

Ashara T. és munkatársai írták le elsőként endotheliális progenitor sejtek szerepét a posztnatális vaszkulogenezisben, miszerint a csontvelő eredetű endotheliális progenitor sejtek (CEPC) képesek in vivo endothel sejtekké differenciálódni (171). Ezeket a CEPC sejteket úgy definiálták, hogy ezen sejt populáció CD 34-et és VEGFR2-t expresszál, vagyis 2 sejtfelszíni markert melyeken osztoznak az embrionális endotheliális progenitor és haematopoetikus őssejtek ezek a már fentiekben is részletezett EPC-k (172). Salven és munkatársai írták le a VEGFR-3 és CD 133/CD34 pozitív sejteket, mint lymphatikus és vaszkuláris prekursor endotheliális sejteket (172). Hasonlóan a vaszkulogenezishez ezek a lymphatikus endotheliális sejtek is (LVEPCs- lymphatic endothelial precursor cells) csontvelő eredetűek, de termelhetik a máj és egyéb haematopoetikus szervek is. Az LVEPC sejteknek először ki kell válniuk a keringésből, hogy csatlakozhassanak a lymphangiogenezishez. A lymphangiogenezisben való részvételüket először állatkísérleti modellben igazolták. Religa és munkatársai tanulmányukban egér kornea lymphangiogenezis modellt alkalmaztak. Fiziológias viszonyok között a kornea szövetben nincsenek vér és nyirokerek. Modellükben irradiált egér korneán nyirokerek kialakulását idézték elő zöld fluorescens fehérjével jelölt EGFP pozitív (EGFP-enhanced green fluorescent protein) donor csontvelő sejtekkel és keringő endothel progenitor sejteket (CEPCs- circulating endothelial precursor cells) detektáltak az újonnan képződött nyirokerekben. Irradiációval legyengített recipiens egerek esetén csökkent lymphangiogenezist észleltek fibroblaszt növekedési faktor 2 (FGF-2 fibroblast growth factor-2) implantált korneán. Tovább vizsgálva, transzplantálták az izolált EGFP pozitív/VEGFR-3 pozitív vagy EGFP⁺/VEGFR-2⁺ sejt populációt és az EGFP⁺ sejtek beépülését találták az újonnan képződött nyirokerekben. EGFP⁺/CEPC sejtek voltak jelen fibroszarkómában a peritumorális nyirokerekben is (173). Shuguang (174) és munkatársai a közelmúltban publikálták,

hogy a haematopoetikus őssejtek (HSC/haematopoetic stem cell) hozzájárulnak a nyirokendothel sejtek (LEC) kialakulásához, azonban a myeloid eredetű sejt vonal sejtjei nem játszanak szerepet a nyirokerek fejlődésében. Munkájuk során megelőzően irradiált egerek szöveteiben figyelték a jelölt HSC sejteket. A különböző szövetekben azonosították a donor eredetű LEC sejteket, amelyek Lyve 1 és VEGFR3 nyirokendothel markereket expresszáltak. A HSC eredetű LEC sejtek 3-4%-ban járultak hozzá a nyirokerek kialakulásához. Donor eredetű sejteket nem találtak a myeloid és granulocita/makrofág progenitor sejtekkel transzplatált egereknél, mely alapján azt véleményezték, hogy ez sejt vonal a nyirokendothel sejtek fejlődésében nem bír jelentőséggel. Nem teljesen világos, hogy milyen módon ismeri fel a csontvelő eredetű sejt az aktív lymphangiogenesis helyét a beépüléshez. A csontvelő eredetű sejtek két független úton kapcsolódhatnak be a lymphangiogenesis folyamatába. Az egyik, hogy a csontvelő eredetű őssejtek keringő endothel prekursorokként vesznek részt az új nyirokér-képződésben, a másik, hogy a lymphangiogenesis során szekretált citokinek indukálják a csontvelő eredetű inflammatorikus sejtek aktiválódását és így kapcsolódnak a nyirokér újdonképződésbe (160).

2. A keringő endotheliális progenitor sejtek (EPC) azonosítása és klinikai jelentősége nem kissejtes tüdőrákban (NSCLC)

2.1. Célkitűzés

A nem kissejtes tüdőrák (NSCLC) a tüdődaganatok több mint 80%-a és ez okozza a legnagyobb számú daganatos halálozást (175). A sebészeti reszekció és az új terápiás lehetőségek ellenére számos NSCLC kiújul, és végzetessé válik (176). Következésképp az NSCLC kezelése napjainkra a konvencionális kemoterápián túl molekuláris célzott terápiákkal egészülhet ki. Ezek egyik alapvető formája a tumor vaszkularizációért felelős specifikus citokinek gátlása (177, 178). Az antiangiogén szerek hatékonyságának mérése a mikrovaszkuláris denzitás meghatározásán alapszik. Jóllehet ennek a folyamatnak invazív és a klinikai kimenetellel való összefüggése is bizonytalan számos tumor típus esetén, így NSCLC-ben is (179, 180, 181). Ennek megfelelően még kiforratlan a tumorok angiogén profiljának klinikai markerekkel történő jellemzése és az antiangiogén gyógyszerekre adott válasz monitorozása (182). Mostanáig a malignus tumorokról azt feltételezték, hogy vaszkulaturájukat angiogenezis útján szerzik, melynek során korábban meglévő kapillárisokból alakul ki új érhalózat (183). Újabb bizonyítékok szerint a tumor érhalózata vaszkulogenezis útján is kialakulhat, a folyamat során csontvelő eredetű endothel prekursor sejtek verbuválódnak és in situ érett endothel sejtekké differenciálódnak új ereket képezve (184, 185). A legújabb tanulmányok is alátámasztják az EPC sejtek jelentőségét az ér újdonszövődésben (131) és hogy az angiogén citokin stimulálta EPC sejtek a neovaszkularizáció kialakulásának segítő mechanizmusa (91, 186). Bár ezek az adatok azt vetik fel, hogy szoros kölcsönhatás van az EPC sejtek és a tumor vaszkularizáció között, de a pontos szerepük a NSCLC pathogenezisében még nem ismert. Ezért flow cytometriával NSCLC betegek perifériás véréből meghatároztuk a keringő EPC sejtek számát és tanulmányoztuk az EPC sejtek előfordulását és hozzájárulását a vaszkulaturához sebészileg eltávolított NSCLC szövetmintákból. Továbbá real-time relatív kvantitatív rezerv transzkripció-PCR (RT-PCR) módszerrel tanulmányoztuk az EPC specifikus marker CD34, vaszkuláris endotheliális növekedési faktor receptor 2 (VEGFR2), VE-cadherin és CD133 expresszióját egészséges kontrollok és NSCLC betegek perifériás véréből kezelés előtt és azt követően.

2.2. Módszerek

Betegek és Metodika

2.2.1. Klinikai adatok

A diagnózis idején, valamint a megfelelő daganat ellenes kezelés monitorozása során a keringő EPC-k számának, illetve EPC specifikus gének expressziós szintjének vizsgálata céljából perifériás vért gyűjtöttünk 21-gauge tűn keresztül EDTA kezelt csövekbe 53 NSCLC betegtől. Az újonnan diagnosztizált NSCLC pácienseknél kizártunk minden egyéb malignus betegséget, gyulladásos illetve ischaemiás kórképet továbbá pulmonális fibrózist, sebzést, fekélyt, melyek befolyásolhatják a keringő EPC-k számát (82). A műtéti sebgyógyulás és a kemoterápia direkt hatásainak kivédésére a második vérmintát 21 nappal az utolsó citotoxikus infúziót követően és 3 hónappal a thorakotomia után gyűjtöttük. A vizsgált betegek száma, nem és életkor szerinti összetétele a következő volt: 28 férfi és 25 nőbeteg, átlag életkoruk 58 év (tartomány: 45-67 év, 1.táblázat). NSCLC eseteknél a betegség stádiumát radiológiai és patológiai eredmények alapján, az American Joint Committee on Cancer/Unio Internationale Contra Cancrum tumor-node-metastasis classification ajánlása szerint állítottuk fel (196). Kontroll vérmintát 14 egészséges egyéntől is gyűjtöttünk. A NSCLC betegek szövettani típus szerinti megoszlása: 23 laphámsejtes karcinoma, 26 adenokarcinoma és 4 adenosquamosus karcinoma volt (1. táblázat). 22 betegnél történt sebészeti beavatkozás. 28 inoperábilis NSCLC beteg gemcitabin+cisplatin kezelést kapott, közülük 10 beteg lokálisan kiterjedt betegsége alapján kiegészítő radioterápiában is részesült a kemoterápiával kombinációban. Valamennyi beteg és egészséges önkéntes belegyező nyilatkozatot írt alá, a vizsgálat a helyi etikai bizottság engedélyével a Helsinki Declaration of the World Medical Association ajánlásának figyelembe vételével készült. A 22 sebészeti beavatkozáson átesett beteg friss, fagyasztott szövetmintáját is tanulmányoztuk, hogy felmérjük az EPC-k szerepét a tumorok vaszkularizáltságában.

2.2.2. EPC sejtek azonosítása konfokális lézer „scanning” mikroszkóppal humán NSCLC tumor szövetben

A friss fagyasztott NSCLC tumor mintán immunfluorescens festést végeztünk; 10µm vastagságú metszeteket -20°C methanolban 10 percig fixáltuk. Ezután, PBS- ben való

mosást követően, a következő antitesteket használtuk: nyúl polyclonalis anti-humán CD31 (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), FITC-konjugált anti-humán CD34 (1:50; BD Biosciences, San Jose, CA), egér anti-humán VEGFR2 (R&D Systems, Minneapolis, MN), és biotin-konjugált anti-humán CD133 (1:50; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Normál egér és nyúl IgG helyettesítette az elsődleges antitesteket a negatív kontrollban (ugyanabban a koncentrációban alkalmazva, mint a teszt antitesteket). PBS-ben történt mosás után a lemezeket szimultán inkubáltuk a megfelelő másodlagos antitesttel vagy streptavidin konjugátummal (FITC-konjugált kecske anti-nyúl IgG, rhodamine-konjugált kecske IgG, streptavidin-konjugált rhodamine és streptavidin-konjugált Cy5; 1:100; valamennyi Jackson ImmunoResearch, Inc., West Grove, PA), bizonyos esetekben magfestéssel kombinálva, mely TOTO-3-mal történt (1:1,000; Molecular Probes, Eugene OR). Morphometriás analízist végeztünk CD133+ és VEGFR2+CD133+ kettős pozitív sejtszám meghatározáshoz tíz 1-mm²-es random módon szelektált területen. A metszeteket NIKON Eclips 80i mikroszkóppal vizsgáltuk és digitális képeket készítettünk SPOT digitális kamera segítségével (Diagnostic Instruments, Streling Heights, MI) vagy a Bio-Rad MRC-1024 konfokális lézer scanning mikroszkóp rendszerrel (Bio-Rad, Richmond, CA)

2.2.3. EPC sejtek számának meghatározása flow cytometriával NSCLC betegek perifériás véréből

Keringő EPC számának meghatározása Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) módszerrel történt. 90µl perifériás vért inkubáltunk 30 percig 4°C-on PE-Cy5-konjugált anti-humán CD34 (BD Biosciences) és PE-konjugált anti-humán VEGFR2 (R&D Systems) vagy biotin-konjugált anti-humán CD133 (Miltenyi Biotec) és PE-konjugált anti-humán VEGFR2 antitesttel. Biotin konjugált anti-CD133-nak streptavidin-PE-Cy5-nel (BD Biosciences) történt a feltárása. Alkalmas fluorochrom-konjugált izotípus kontrollt használtunk minden egyes festési folyamathoz. Ezt követően a CD34+VEGFR2+ és CD133+VEGFR2+ sejtek számlálása történt és a mennyiségüket sejtszám/vér milliliterben fejeztük ki CyFlowSL flow cytometer és a FlowMax software segítségével (mindkettő Partec, Munster, Germany).

2.2.4. NSCLC betegek perifériás vér EPC markereinek meghatározása relatív quantitative real-time RT-PCR módszerrel

A perifériás vért 10 percig Red Blood Cell Lysing Buffer-ben (Sigma, Munich, Germany) inkubáltuk és 20 másodpercig teljes sebességgel centrifugáltuk. Total RNS-t extraháltunk a sejt lízist követően megmaradt sejtekből Qiagen RNeasy Mini kit segítségével és emésztést végeztünk Rnase Dnase Set alkalmazásával a gyári protokoll szerint. Minden mintából 3 μ g total RNS-ből reverz transzkripcióval cDNS-t készítettünk, deoxynucleotide triphosphatokat használtunk (0.5mmol/L) random primer és oligo dT keverékével (végső koncentráció=3 μ mol/L), RNasin RNase gátló (Promega, Madison, WI;20 units/reaction), és MMLV reverz transzkriptáz és puffere (Sigma; 200units/reaction) segítségével. 30 μ l mintát inkubáltunk 50 percig 37°C majd 85°C-on 10 percig. A PCR-hez használt primerek a következők voltak: AC133 (199): 5'-TGGATGCAGAACTTGACAACGT-3' és 5'-ATACCTGCTACGACAGTCGTGGT-3'; VEGFR2 (199) 5'-CACCACTCAAACGCTGACATGTA-3' és 5'-GCTCGTTGGCGCACTCTT-3'; A VE-cadherin primerek (199) 5'-TTCCAGCAGCCTTTCTACCA-3' és 5'-GGAAGAACTGGCCCTTGTC-3'; CD34 : 5'-TTGACAACAACGGTACTGCTAC-3' és 5'-TGGTGAACACTGTGCTGATTAC-3'. A real-time PCR standardizálásához egy houskeeping (belsőkontrollt biztosító) gént, a β actin-t, együttesen amplifikáltuk a vizsgált génekkel (primerek: 5'-TCTGGACCACACCTTCTAC-3'és 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'). A real-time PCR reakciót iCycler iQ(Bio-Rad) készüléken végeztük standardizált feltételek mellett (primerek optimalizált koncentrációja-végső koncentráció=200nmol/L), iQSYBR Green Supermix és 2 μ l cDNS-t felhasználva. Negatív kontrollként vizet használtunk, minden különböző primer páros esetén. A ciklusok a következők voltak: 95°C (3perc), 50 ciklus 95°C (30 másodpercig), 64°C (30másodpercig) és 72°C (1 percig). A gén expresszió mértékének meghatározásához egy mintából hígítási sort készítettünk, mely a standard görbét szolgáltatva a génextpresszió számszerűsítéséhez, illetve a keresett gén mennyiségét minden mintában a saját β actin, belső kontroll, tartalmához arányítottuk.

2.2.5. Statisztikai analízis

Az adatokat Fisher's teszt alkalmazásával hasonlítottuk össze. Az összefüggő adatokat Student's teszt segítségével hasonlítottuk össze, ha a minta eloszlása normál volt.

Amennyiben a minta eloszlása asszimmetrikus volt, Mann-Whitney U tesztet használtunk. A teljes túlélés analíziséhez Kaplan-Meier módszert használtunk. A teljes túlélést a diagnózis felállításától a halálig eltelt idővel határoztuk meg. A különböző túlélési adatok összehasonlítására log rank statisztikát használtunk. A prognosztikus faktorok multivariációs analízisét végeztük Cox regressziós modellel. Szignifikáns eltérésnek véleményeztük, ha a $P < 0.05$. Valamennyi statisztikai analízist a Statistica 6.0 (StatSoft, Inc, Tulsa, OK) software segítségével végeztük.

2.3. Eredmények

2.3.1. NSCLC betegek perifériás vér és szövetmintáiból EPC sejtek jellemzői és sejtszám meghatározás

Bár a legújabb tanulmányok adatai szerint az EPC sejtekre nincs tisztázott definíció (121, 200-202), munkánkban, flow cytometriás vizsgálatot használtunk a CD34+VEGFR2+ kettős pozitív sejtek számának meghatározásához NSCLC betegek perifériás véréből (1.A. ábra). Továbbá 10 beteg és 14 egészséges önkéntes kontroll egyén esetén is mértük a VEGFR2+CD133+ sejtek számát, melyek az éretlen EPC sejtek megfelelő subfrakciói (200). Mivel a VEGFR2+CD133+ és CD34+VEGFR2+ EPC sejtszámok között nem volt szignifikáns különbség ($P > 0.1$ minden analízisben, az adatokat nem mutattuk be), a következő vizsgálatban EPC sejszintet ez utóbbi phenotypussal értékeltük a korábbi vizsgálatokkal megegyezően (121, 200-202).

Az egészséges kontrollokban a perifériás vér keringő EPC sejtszám átlag értéke 345 ± 54.8 /mL (átlag \pm SE; $n=14$; 1.B. ábra). Az NSCLC betegeknél a daganat ellenes kezelés előtt a CD34+VEGFR2+ EPCs/mL a perifériás vérben szignifikánsan magasabb volt, az átlag érték $1,162.4 \pm 242.4$ (átlag \pm SE; $n=53$; $P < 0.002$; 1.B. ábra)

Az EPC sejtek jellemzésére a nem kissejtes tüdőrák (NSCLC) vaszkulátúrában immunhisztokémiai festést alkalmaztunk EPC specifikus CD133 és VEGFR2 markerrel és a panvaszkuláris markerrel a CD31-el tumor szövetben, sorozat metszeteken. Konfokális mikroszkóp segítségével azt találtuk, hogy a CD31 antitest intenzíven jelölte a vaszkulátúrát. Mivel a CD133+ sejtek száma és a CD133+VEGFR2+ sejtek nem különböztek egymástól szignifikánsan, EPC pozitív és negatív csoportokat különítettünk el a CD133 jelölés alapján. A 22 NSCLC miatt operált betegből 9 volt EPC pozitív. A normál tüdőszövetben nem észleltünk EPC sejteket. A NSCLC tumor

mintában főként a kis intratumorális kapillárisokban, ritkábban a nagyobb erek endotheliumához tapadva vagy a kapilláris falakban észleltünk EPC sejteket (2.A-B.ábra). Az EPC pozitív betegek tumor mintáiban az EPC átlag érték $2.4 \pm 1.1/\text{mm}^2$ (átlag \pm SD; n=9). Nem volt szignifikáns korreláció a NSCLC vaszkulaturában észlelt EPC szám és a FACS-szal meghatározott keringő EPC sejtszám között (adatokat nem mutattuk be).

2.3.2. EPC markerek kimutatása realtime RT-PCR-rel NSCLC betegek perifériás véréből

CD34, CD133, VE-cadherin és VEGFR2 mRNS szintet határoztunk meg 53 kemoterápia-naív és 14 egészséges kontroll egyén perifériás véréből relatív quantitativ realtime RT-PCR módszerrel. A NSCLC betegek kezelés előtti CD34, CD133 és VE-cadherin mRNS szintje szignifikánsan nem tért el az egészséges populációnál észlelt szintektől, de a VEGFR2 expresszió 80-szor emelkedettebb volt ($P < 0,05$ versus egészséges kontrollok) (3. ábra).

A keringő EPC szám és EPC specifikus mRNS szintek korrelációja a terápiával

NSCLC betegeket a sebészeti beavatkozás és a standard kemoterápia befejezése után is vizsgáltuk. Függetlenül a kezelés típusától a nem reagáló („nonresponder” = stabil, vagy progresszív betegség, illetve recidíva a kezelés ellenére) betegeknél magasabb kezelés előtti EPC sejtszámot, VEGFR2 és VE-cadherin mRNS szintet tapasztaltunk, mint a kezelésre jól reagáló betegeknél („responder” = tumormentes állapot sebészileg, illetve komplett, vagy parciális remisszió kemoterápiára, vagy kemoradioterápiára). Ezen megfigyelés ellenére statisztikailag nem volt szignifikáns differencia a responder és nonresponder csoport egyik esetében sem a kezelés előtti EPC sejtszámban (1.B. ábra) sem a kezelés előtti EPC marker szintekben (3.ábra). A responderok alcsoportjában a kezelés utáni perifériás vér átlag EPCs/mL 776.1 ± 265 (átlag \pm SE; n=36) szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a nonresponder csoport kezelés utáni értéke : $4,687.9 \pm 1,178.6$ (átlag \pm SE; n=17; $P < 0.005$; 1.B ábra). Bár a responder és nonresponder betegek ugyanazon kezelésben részesültek, a keringő EPC sejtszám a responder populáció 74%-ában csökkent, míg a nonresponder betegeknél 93%-ban emelkedett a daganat ellenes kezelés alatt, valamennyi kezelt beteg esetében ($P < 0.001$). A kemoradioterápiában részesült betegeknél a responder csoportnál 89%-ban csökkent, míg a non-responder

csoportban 88%-ban emelkedett az EPC sejtszám ($P<0.001$). Az eredmények azt vetették fel, hogy az eltérő keringő EPC sejtszám független a kezelési modalitástól, ugyanakkor szignifikáns összefüggést mutatott a klinikai jellemzőkkel. A kezelés utáni VEGFR2 mRNS szint a perifériás vérben szignifikánsan magasabb volt a nonresponder csoportban amikor azt összehasonlítottuk a daganat ellenes kezelésre jól reagáló csoporttal ($P<0.05$; 3.A.ábra). Ezzel ellentétben a CD34, CD133 és VE-cadherin mRNS szintek nem mutattak szignifikáns különbséget sem a kezelés előtt, sem a kezelés után a frissen felfedezett és kezelt NSCLC betegeknél és az egészséges kontroll egyéneknél (3.B-D. ábra).

2.3.3. EPC sejtszám, mint prognosztikai marker NSCLC-ben

Az 53 NSCLC beteg közül 16 beteg halt meg 30 héten belül. Tekintettel arra, hogy ezeknél a betegeknél, a diagnózis felállításakor az EPC szint szignifikánsan magasabb volt, összehasonlítva azokkal akik tovább éltek ($2,206.8\pm 552$ versus 735.6 ± 222.3 ; $P<0.02$), meghatároztuk a kezelés előtti EPC „cutoff” értéket (perifériás vér 500, 750, 1,000, és 1,250/mL), amivel teszteltük a betegség kimenetelét befolyásoló tényezőket. Ez, az osztályozás azt mutatta, hogy azok a betegek, akiknek a vér mintájában a kezelés előtti EPC szám alacsonyabb volt mint 1,000/mL (EPC low) szignifikánsan hosszabb túlélők voltak, mint azok, akiknél magasabb keringő EPC sejtszámot észleltünk (median túlélési idő: 55.5 versus 26 hét; $P<0.001$; 1.C.ábra) Ennek ellenére nem volt szignifikáns összefüggés a korrallal, nemmel, hisztológiai típussal, dohányzási szokással, a betegség stádiumával vagy a kezeléssel (1.táblázat). Az elvégzett multivariáns analízis (belefoglalva a standard prognosztikai variánsokat mint a tumor stádium, dohányzási szokás és hisztológiai típus) szintén azt mutatta, hogy a kezelés előtti keringő EPC sejtszám független volt az egyéb változóktól ($P<0.001$; 2.táblázat).

3. A keringő lymphovaskuláris endotheliális progenitor sejtek szerepe kissejtes tüdőrákban (SCLC)

3.1. Célkitűzés

A kissejtes tüdőrák (SCLC) agresszív malignus pulmonális betegség (187). Bár kemo-és sugárérzékeny daganat, mégis a SCLC igen ritkán gyógyítható betegség a jelenleg ismert és alkalmazott terápiás stratégiákkal (188). Következésképp, új biológiai célpontok kifejlesztésére van szükség a minél hatékonyabb kezelés érdekében. Ilyen lehetséges célpontok a haem-és lymphangiogenezis, melyek a különböző szolid tumorok progressziójának alapvető mechanizmusai (189, 190). Tekintettel arra, hogy mostanáig nem volt specifikus marker a nyirokér endothelium vizsgálatára, ismereteink a malignus tumorok nyirokrendszerére vonatkozóan messze elmaradtak a vaszkuláris rendszer mögött (191). A lymphangiogenezis szerepe a tumor növekedésben és disszeminációban kissejtes tüdődaganat esetént feltáratlan volt. A legújabb megfigyelések szerint a lymphangiogenezis a különböző humán daganatok progressziójának meghatározó mechanizmusának tűnik (192). A lymphangiogenezis mechanizmusának részeként nemrégiben azonosított csontvelő eredetű sejtek az úgynevezett nyirok/ vaszkuláris- endotheliális progenitor sejtek (LVEPCs) (172) hozzájárulnak, a *de novo* lymphangiogenezishez humán vese transzplantátumok (193) esetében, és ami még fontosabb, experimentalis tumor modellekben (173). Az LVEPC sejtek szerepe a SCLC indukálta nyirokér növekedésben még tisztázatlan, de feltételeztük a betegség progressziójában való részvételüket, miután az analóg sejtpopuláció (haemangio endotheliális progenitor sejtek) vizsgálata során szignifikáns klinikai összefüggést észleltek, az érképződésben különböző humán malignus betegségekben (109, 110, 139, 194, 195). Ezért kissejtes tüdőrákos betegek perifériás véréből flow cytometriával mértük a keringő LVEPC sejtek szintjét és vizsgáltuk az összefüggést a sejtszám valamint a lymphangiogenezis kulcsfontosságú citokinjének a VEGF-C-nek a szérum szintjével és/vagy ezek hatását a nyirok metasztázisokra és a túlélésre.

3.2. SCLC Betegek és metodika

Anyag és metodika

3.2.1. Klinikai adatok

A keringő LVEPC szám mérése céljából perifériás vért gyűjtöttünk 88 lokálisan kiterjedt stádiumú SCLC betegtől a kezelés megkezdése előtt. A vért 21G tűvel nyertük és EDTA –val kezelt csövekbe gyűjtöttük. Az International Assotiation for the Study of lung cancer (IASLC) ajánlása szerint a lokálisan kiterjedt (LD/ limited diseases) betegség definíciója: egy mellkasfélre lokalizálódó, regionális nyirokcsomó metasztázisokkal, beleértve a hílusi, ipsilaterális és/ vagy kontralaterális mediastinális és/vagy ipsilaterális és/vagy kontralaterális szupraklavikuláris nyirokcsomókat (197). Bár a LD magába foglalja a malignus perikardiális illetve malignus pleurális folyadékgyülemet, vizsgálatunkba nem vontunk be ilyen betegeket. A kissejtes tüdőrákban szenvedő betegeinknél nem volt gyulladásos betegség, pulmonális fibrozis, sebzés vagy egyéb fekély és kardiovaszkuláris rizikó faktor, mint diabetes mellitusz, krónikus vesebetegség, kezeletlen hipertonia vagy reumatoid arthritisz, melyek befolyásolhatják a keringő LVEPC számot. 54 férfi és 34 nőbeteg vett részt a vizsgálatban. Átlag életkoruk 63 év volt (tartomány: 44-77 év, 3.táblázat). A betegeknél a stádium megállapításhoz komplex vizsgálatot végeztünk el: fizikális vizsgálat, légzésfunkciós teszt, kiegészítő vér kémiai vizsgálat, mellkas röntgen, mellkasi-, hasi CT (komputer tomográfia) vizsgálat, csont szcintigráfia, agyi MRI (mágneses rezonancia) illetve CT vizsgálat. Valamennyi SCLC beteg kemoterápiában (ciszplatín + etopozid /PE) és kiegészítő irradiációban részesült. A betegség progressziójakor kemoszenzitív tumor esetén (progresszió> 3 hónappal az elsővonalbeli kezelés utolsó ciklusát követően) ismételten PE kezelést alkalmaztunk. Azoknál a betegeknél, akiknél a progresszió három hónapon belül jelentkezett másodvonalbeli kezelést adtunk: cyclophosphamide+epirubicin+vincristin kombinációban. A túlélést a diagnózis dátumától a halál időpontjáig határoztuk meg és számoltuk. Az átlag követési idő 15 hónap volt (4-től 27 hónapig). A medián követést „Kaplan-Meier” analízissel számoltuk (198), ez 26 hónap volt (25-27 hónap). A vizsgálat végéig 77 beteg halt meg (87%) a daganatos alapbetegség következtében. A kontroll csoportba 32 egészséges egyént vontunk be. Az 5. táblázatban foglaltuk össze a kor, nem, dohányzási szokás és

légzésfunkciós paramétereket. Valamennyi SCLC beteg és önkéntes kontroll személy beleegyező nyilatkozatot írt alá, a vizsgálatot a helyi etikai bizottság engedélyével (Helsinki deklaráció alapján) végeztük.

3.2.2. SCLC betegek perifériás véréből flow cytometriával végzett LVEPC szám meghatározás

A keringő LVEPC szám meghatározása flow cytometriás analízissel történt: vörösvérsejt lízist követően, a maradék perifériás vér mononukleáris sejt frakcióját reszuszpendáltuk 90 μ l fluoresszens-aktivált „cell-sorting” pufferben, mely 0.1 %-os bovin albumint és PBS-t tartalmazott, majd 30 percig inkubáltuk 4°C-on PE-Cy5-konjugált anti-humán CD34 (BD Biosciences, San Jose, CA) és PE konjugált anti-humán VEGFR3 antitestekkel. (R&D Systems, Minneapolis, MN). Fluorochrom – konjugált izotípus kontrollt használtunk minden egyes festési eljárásához negatív kontrollként. A megfelelő festődést követően a CD34+/VEGFR3+ kettős pozitív sejteket számláltuk és mennyiségüket sejtszám/vér millilitere határoztuk meg CyFlow SL flow cytometer és FlowMax software-t alkalmazva (mindkettő Partec, Münster, Germany).

3.2.3. Egészséges kontrollok és SCLC betegek perifériás véréből VEGF-C szint mérése

VEGF-C szint meghatározásához szérum mintát készítettünk valamennyi egészséges kontroll és beteg perifériás véréből és -80°C-on tároltuk az analízisig. A VEGF-C szintet gyári ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN) felhasználásával határoztuk meg, követve a pontos felhasználási útmutatót. Az eredményeket standard görbék alapján hasonlítottuk össze, az alsó detekciós limit 4pg/mL volt. Minden mérést kétszer megismételtünk.

3.2.4. Statisztikai analízis

A folyamatos változókat Student's teszttel hasonlítottuk össze, amennyiben a minta eloszlása normál volt vagy Mann-Whitney U tesztet használtunk, ha a minta eloszlása aszimmetrikus volt. A meghatározott adatokat Fishers' exact találati valószínűségi és chi négyzet teszttel hasonlítottuk össze. Az LVEPC szám és VEGF-C szint összefüggésének megállapítására Spearman rank's korrelációs tesztet alkalmaztunk. A

teljes túlélés analízishez Kaplan-Meier módszert használtunk. A teljes túlélési időt a diagnózis felállításától a halálig eltelt időintervallumban határoztuk meg. A túlélés különböző rétegeinek összehasonlítását log rank statisztikával állapítottuk meg. A prognosztikai faktorok multivariáns analíziséhez Cox's regressziós modellt használtunk. Szignifikáns különbséget véleményeztünk ha $P < 0.05$.

Valamennyi statisztika analízist a Statistica 7. 0 (StatSoft Inc.Tulsa, OK) software program segítségével végeztük.

3.3. Eredmények

3.3.1. SCLC betegek perifériás vér LVEPC sejtszintje és jellemzése

Az endotheliális progenitor sejtekről (mind a vér és nyirok) úgy gondolják, hogy CD34+ haematopoetikus progenitor sejtekből származnak (203, 204). Míg a haemangiogén progenitor sejteket CD34, CD133 és VEGFR-2 sejtfelszíni markerekkel azonosíthatjuk, az LVEPC sejteket CD34, CD133 és VEGFR3 expresszió jellemzi.

Tekintettel arra, hogy mindkét típusú endothel progenitor sejtek gyorsan elveszítik CD133 expressziójukat a csontvelőből a keringésbe történő migrációjukkal, a CD133+ LVEPC sejtek beleesnek a teljes CD34+ LVEPC szubpopulációba. Munkánk során meghatároztuk a CD34+/VEGFR3+ kettős pozitív LVEPC sejteket 32 egészséges önkéntes kontroll egyénnél és 88 SCLC betegnél flow cytometriával (1.A. ábra). A kontroll csoportban a CD34+/VEGFR3 keringő LVEPC sejtek átlag értéke 455/mL volt (interquartilis tartomány, 370-530/mL) a perifériás vérben (n=32; 4.A-B. ábra). A kissejtes tüdőrákos betegeknél ez az érték szignifikánsan magasabb volt (átlag érték 1625/mL, interquartilis tartomány, 600-2750/mL; n=88; $P < 0.01$, 4. A-B. ábra).

3.3.2. LVEPC szint és a klinikopathológiai paraméterek összefüggései

Az LVEPC számot betegeink klinikopathológiai faktoraival összefüggésében is kiértékeljük. Statisztikailag szignifikáns összefüggést észleltünk az LVEPC szint és a nyirokcsomó metasztázisok között ($P < 0.01$, 3.táblázat) További klinikai paraméterekkel mint a kor, dohányzási szokás, életkor és a tumor stádium nem találtunk szignifikáns összefüggést.

3.3.3. LVEPC szint és egyéb prognosztikai markerek SCLC betegeknél

Tekintettel arra, hogy a SCLC betegeknél, nyirokcsomó érintettségénél emelkedett LVEPC számot észleltünk, Kaplan-Meier analízissel tovább vizsgáltuk a teljes túlélést két csoportra osztva a betegeket azokra, akiknél alacsony, illetve akiknél magas LVEPC szintet találtunk (5. ábra). Azoknál, akiknél alacsony kiindulási CD34+/VEGFR3+ szintet detektáltunk (átlag érték $<1625/\text{mL}$) szignifikánsan hosszabb volt a túlélés mint a másik csoportban, a kezelés előtt mért magasabb keringő LVEPC sejtszám esetén (közép túlélési idő 20 versus 11.5 hónap; $P<0.01$, 5. ábra). Az összes beteg medián túlélése 14 hónap volt. Multivariáns analízis (belefoglalva a standard prognosztikai eltéréseket mint az életkor, nem, tumor stádium) szintén jelezte, hogy a kezelés előtti keringő LVEPC szint független prediktora ezen változóknak ($P<0.01$, 3.táblázat) Az IASLC (International association for the Study of Lung Cancer) SCLC klinikai stádium meghatározása alapján az N stádium független prognosztikai faktor. Az N2-3 betegség rossz túlélést jelzett. versus N0-1 stádium, $P=0,014$, 4.táblázat)

3.3.4. Perifériás vér VEGF-C szint SCLC betegeknél

Annak ellenére, hogy a VEGF-C szérumszint a betegeknél szignifikánsan emelkedett volt a kontroll egyénekéhez képest (4931 ± 881 vs. $3992\pm 462\text{pg/mL}$, illetve, $P<0.01$; 5.táblázat), szignifikáns kapcsolatot nem tudtunk kimutatni a kulcsfontosságú limfangiogén molekula VEGF-C és a keringő CD34+/VEGFR3+ LVEPC szám között ($P=0.74$, adatokat nem mutattuk be). Ezen felül, amikor a VEGF-C szint emelkedett volt, betegeink egyéb klinikopathológiai faktoraival (életkor, dohányzási szokás, a nem, és ami még érdekesebb, a tumor és nyirokcsomó státusszal) nem volt szignifikáns összefüggés.

4. Megbeszélés

Irodalmi adatok szerint különböző vaszkuláris megbetegedésekben emelkedett keringő EPC sejtszám figyelhető meg (121, 200-202). Számos különböző rágcélzóval végzett modelben kimutatták ezeket a csontvelő eredetű keringő EPC sejteket (112, 184, 185) melyek hozzájárulnak a tumor vaszkularizációhoz. Napjainkig azonban csak kevés tanulmányban tettek kísérletet az EPC sejtek humán tumor vaszkularizációjában betöltött szerepének értékelésére (129, 139, 205). Megelőzően nem volt közlemény ahol NSCLC-ben keringő EPC sejteket írtak volna le. Munkánkban analizáltuk a keringő EPC sejteket flow cytometriával, vizsgáltuk az EPC specifikus markerek CD34, VEGFR2, VE-cadherin és CD133 expresszióját relatív quantitativ real time RT-PCR módszerrel NSCLC betegek perifériás véréből és tanulmányoztuk az EPC sejtek gyakoriságát és közreműködését a sebészileg eltávolított NSCLC tumor minta vaszkulaturájában.

A VEGF gént kb 15 évvel ezelőtt klónozták, és mint humanizált monoklonális VEGF elleni antitestet (bevacizumab) alkalmazták daganat ellenes első vonalbeli kezeléshez (206). Az alapkutatásban, a gyógyszerfejlesztésben és a klinikai alkalmazásban észlelhető gyors fejlődés ellenére a tumorok angiogén státuszának illetve az antiangiogén szerekre adott válaszok monitorozására a lehetőségeink még beszűkültek (207). A jelenleg rendelkezésre álló módszerek az antiangiogén szerek hatékonyságának lemérésére a mikrovaszkuláris denzitás mérése illetve a kezelés előtti és kezelést követő angiogén citokinek szérumban szintjének meghatározása a perifériás véréből. Sajnálatos módon ezek meg lehetőségen invazív módszerek illetve nem mindig megbízhatóak (179-181, 208). Figyelemre méltó az, hogy a keringő EPC szint szenzitív kiegészítő markernek bizonyult egérmodellben alacsony dózisú metronomikus kemoterápia antiangiogén aktivitásának detektálására (209), valamint az, hogy a keringő EPC sejtszám gyorsan csökkent bevacizumab kezelésben részesülő végbél karcinómás betegeknél (210). Ez utóbbi eredmények alapján munkánkban EPC sejtek szintjét mértük kezelés előtt és a daganat ellenes kezelést követően. A kezelést követően szignifikánsan alacsonyabb keringő EPC sejtszámot észleltünk azoknál a betegeknél ahol parciális vagy komplett remissziót értünk el (responder) ellentétben a stabil illetve progrediáló betegekkal (nonresponder). Ezen háttér valamint a legújabb tanulmányok

eredménye alapján mely szerint egy új antiangiogén szer a bevacizumab alkalmazása a standard kemoterápia mellett szignifikáns túlélési előnyt biztosított NSCLC betegeknél (211), az EPC szint és NSCLC tumor progresszió korrelációja különös fontossággal bírhat a jövőben. Megfigyeltük, hogy az NSCLC betegeknél kezelés előtt az egészséges kontrollokhoz képest szignifikánsan emelkedett a keringő EPC sejtszám. Eszerint a prospektív tanulmányunk új felfedezéssel is bírt, miszerint a sejtek CD34+VEGFR2+ EPC szintjének flow cytometriás mérése hasznos diagnosztikus módszer az NSCLC betegek prognózisának előjelzésében. Statisztikailag nem szignifikánsan ugyan, de a responder csoportnál, a kezelés előtt alacsonyabb EPC sejtszámot észleltünk, mint a kezelésre nem reagálóknál. A 15 hónapos követési idő alatt szignifikánsan magasabb halálozás volt megfigyelhető azoknál NSCLC betegeknél, akiknél magasabb kezelés előtti EPC sejtszámot találtunk, mint azoknál, akiknél ez az érték alacsonyabb volt. Ez azt jelentheti, hogy a perifériás vérben flow cytometriával detektálható EPC sejtszám a humán NSCLC klinikai viselkedésével korrelál. Ez a feltevés összefüggést mutat Jain és munkatársai által leírt, „ér-normalizációs” hipotézissel (212, 213) az anti-VEGF kezelés klinikai hatását illetően. Az „ér-normalizációs” elmélet szerint a daganatos kapillárisok fokozott permeabilitása és kaotikus lefutása, ill. a daganatos szövetben uralkodó magas intersticiális nyomás nem teszi lehetővé a tumoros sejtek számára a megfelelő vérátáramlás létrejöttét. A VEGF szignálút blokkolásával a bevacizumab a tumor vaszkulátúra „normalizálásával” tud segíteni, ezáltal a kemoterápiás szerek odajutása is könnyebbé válik: A bevacizumab alkalmazását követően az endothel sejtek egy részének proliferációja leáll, az érlumenek egy része eltűnik, véráramlásuk megszűnik. A túlélő kapillárisokban az endothelréteg nem feneztrált, VEGFR-2/3 expressziójuk csökkent. A VEGF szignálút gátlásával tehát néhány tumor kapilláris elpusztul, mások átalakulnak a normálhoz hasonlóbb fenotípusúvá. Eredményeink, arra utalnak, hogy azok a betegek, akiknél alacsonyabb kezelés előtti EPC számot észleltünk, valószínűleg „normál” tumor erezzel rendelkeztek, így a kezelésre is jobban reagáltak, míg azok, akiknél magasabb kiindulási EPC sejtszámot észleltünk, tekervényes intratumorális kapillárisokkal rendelkezve kevésbé jól reagáltak. Következésképp a magas kezelés előtti sejtszámú betegeket anti-VEGF kezelésben kellene részesíteni (ezzel normalizálni az intratumorális vaszkulátúrát) a standard kemoterápia előtt, ily módon potenciálisan javítani lehetne a kezelésre adott választ.

Bár egy korábbi tanulmányban egyéb daganat típusban a perifériás vér VE-cadherin mRNA szintje szignifikáns összefüggést mutatott a tumor progresszióval (214), jelen tanulmányunkban nem volt egyértelmű kapcsolat a CD34, CD133 vagy VE-cadherin mRNAs szintek és a daganat progresszió között. Azt találtuk, hogy a kezelés előtt a VEGFR2 mRNA expresszió emelkedett volt NSCLC betegeknél összehasonlítva az egészséges kontrollokkal valamint, hogy a kezelés után ez a marker szignifikánsan magasabb volt a nonresponder csoportnál összevetve a daganat ellenes kezelésre jól reagálókhoz képest. A VEGFR2 izolált emelkedésére lehetséges ok az EPC marker expresszió intenzitásának eltérése a sejttípus érésének fokozataiban, melyekben vizsgáltuk (a perifériás keringésben a csontvelőből történt kiáramlást követően de a tumorhoz való vándorlás előtt). Amellett, hogy a befogadó szerv (215), vagy a tumor kapilláris (216) lehetséges forrása az emelkedett VEGFR2 mRNA szintnek, az érett endothel sejtfelszín szintén expresszálhatja (217). Tekintettel arra, hogy munkánkban figyelemre méltó változást nem észleltünk a VE-cadherin mRNA szintben (érett endothel sejtek szintén expresszálják), még valószínűbb, hogy a perifériás vérben mért magas VEGFR2 mRNA szint VEGFR-2 pozitív NSCLC sejtek vérkeringésbe jutásának eredménye (216).

A kezelés előtti EPC szint és a tumor progresszió okozta halál független volt a standard prognosztikai változóktól, mint a tumor kiterjedés, hisztológiai típus, és érdekes módon az NSCLC vaszkulátúrába beépült EPC sejtektől is. Valójában az NSCLC betegek tumor szövetmintáiban észlelt EPC sejt arány alacsonyabb volt, mint azt a flow cytometriás eredmények alapján vártuk. Feltételezve, hogy a keringő EPC sejtek nagyobb része eléri és beépül a tumor vaszkulátúrába, a fenti diszkrépancia a keringő és a tumorban észlelt EPC sejtszámban nem teljesen világos. Mivel CD34 és VEGFR2 expresszálódik az EPC sejteken és az érett endothel sejtek bélelik a tumor vaszkulátúrát illetve a CD133 expresszió folyamatosan, csökken a keringő EPC sejtfelszínen (86), nyilvánvalónak tűnik, hogy az NSCLC tumor szövetbe beépült sejtek aránya elkerülhetetlenül alábecsült. Azonban nehéz arra a következtetésre jutni, hogy a humán NSCLC-vaszkularizációjának folyamata kizárólagosan az EPC sejtek korábban meglévő erek falába való inkorporációja útján valósul meg, mint ahogy azt a közelmúltban, experimentális modellekben leírták (112, 184, 185). Az a legvalószínűbb, mint ahogy azt a nem tumoros ischaemiás szövetmodellekben leírták (91, 186, 218),

hogy a tumor vaszkulátúra kialakulásához a fizikai hatásukon túl az EPC sejtek képesek endothel bimbózást elősegíteni angiogén növekedési faktorok parakrin elválasztása révén is. Ezt a feltevést azonban még további vizsgálatokkal kell megerősíteni.

Napjainkra elfogadott tény, hogy a lymphangiogenezist (in situ nyirokérbimbózás) VEGFR3 szignál segíti elő, hozzájárulva a tumor progresszióhoz (219, 220). A legújabb bizonyítékok azt igazolják, hogy a tumoros nyirokérképződés szintén nem feltétlenül az endothel bimbózásból ered; hanem, hasonló mechanizmussal a vaszkulogenezishez, a tumor nyirokerek szintén kifejlődhetnek lymphangiogenezis útján is, mely folyamat során, a csontvelő eredetű LVEPC sejtek toborzása és in situ érett endothel sejtté differenciálódása biztosítja az új nyirokér kapillárisok kialakulását. Ezek a VEGFR3+ LVEPC sejtek funkcionálisan egységes sejt populáció, CD34-et expresszálnak de nem expresszálnak CD105-öt, CD11b-t, CD14-et vagy VEGFR1-et. Tekintettel arra, hogy in vitro kimutatták nyirok és/vagy vaszkuláris endothel sejtté való differenciálódási képességüket, LVEPC sejtek humán SCLC-ben hozzájárulhatnak a nyirokér és érkapillárisok kialakulásához. Jelen tanulmány nem tette lehetővé sem az LVEPC sejtek vaszkulogén aktivitásának mérését sem a vaszkulogenezisben illetve limfangioneziszben való szerepük mértékének a megállapítását. Megfigyelhettük azonban, hogy a csontvelő eredetű LVEPC sejtek száma kapcsolatban állt a nyirokcsomó metasztatikus kiterjedésével kissejtes tüdőrákban, mely alapján feltételezhető ezeknek, a sejteknek potenciális szerepe a lymphangiogenezis folyamatában. A fenti elmélet alapján valószínűsíthető, hogy az emelkedett LVEPC szám az emelkedett VEGF-C szint (VEGFR3 ligand) eredménye. Experimentális állat modellekben mutatták be a közvetlen bizonyítékot, hogy ez a kulcs limfangiogén citokin játszik meghatározó szerepet a daganat progresszióban lymphangiogenezist indukálva, erősítve a metasztatikus terjedést a nyirokerekben keresztül és ezt a hatását a VEGFR3 szignálút blokkolásával gátolni lehet (221, 222). Humán NSCLC xenograft modellen például a VEGFC-t overexpresszáló tumorokban magasabb nyirokér denzitást észleltek, mint a kontroll tumorokban és a VEGFR3 szignál gátlásával csökkent a tumor lymphangiogenezis és a regionális nyirokcsomó metasztatikus képződése (22). Munkánkban, perifériás vérben vizsgáltuk a VEGF-C szintet és azt találtuk, hogy bár a koncentrációja szignifikánsan magasabb volt a SCLC betegeknél a kontroll csoporthoz

képest, statisztikailag nem volt szignifikáns kapcsolat a VEGF-C szint és a keringő LVEPC sejtszám között. Annak ellenére, hogy a jelen eredményeink nem támasztották alá, hogy a SCLC, VEGF-C serkentette az LVEPC sejtek csontvelőből való mozgósítását, mint egyéb (például kardiovaszkuláris, malignus, vagy gyulladáso) betegségekben, melyekben számos inflammatorikus és noninflammatorikus citokin kontrollálja a vaszkulogén EPC-sejteket (102, 223), a különböző növekedési faktorok dinamikus egyensúlya befolyásolja az LVEPC sejtek számát.

Megfigyelésünkön túl, miszerint a SCLC betegeknél összehasonlítva a kontroll csoporttal emelkedett kezelés előtti keringő LVEPC sejtszámot észleltünk, ez a prospektív tanulmány bemutatja, hogy a CD34/VEGFR3+ LVEPC sejtek egyszerű flow cytometriás mérése hasznos prediktív marker a SCLC betegek túlélésére vonatkozóan. A 25 hónapos utókövetés alatt szignifikánsan magasabb halálozást észleltünk azoknál a betegeknél, akiknél magas LVEPC számot detektáltunk összehasonlítva az alacsonyabb kiindulási LVEPC csoporttal. Ennek alapján megállapítható, hogy a flow cytometriával a perifériás vérből mért LVEPC sejtszám korrelál a humán SCLC klinikai viselkedésével. A korábban ismertett experimentális tanulmány mellett, különböző humán daganatok esetében számos vizsgálat felvetette, hogy VEGF-C expresszió tumor szövetből immunhisztokémiával és/vagy ELISA módszerrel perifériás vérből történő megállapítása korrelál a nyirokcsomó metasztázissal és/vagy a túléléssel (191, 224-229). Munkánk során mi is kiértékeljük VEGF-C perifériás vér szintjét, mint módszert a nyirokcsomó metasztázis és/vagy SCLC prognózisának megítélésére. Bár emelkedett VEGF-C koncentrációt észleltünk a kissejtes tüdőrákos betegeknél a kontroll csoporthoz képest, a VEGF-C szint és a betegek túlélése között nem találtunk összefüggést. Nem volt különbség a betegcsoport különböző klinikopathológiai alcsoportjaiban sem. Nem láttunk különbséget, a VEGF-C szintet illetően az N0-1 vs. N2-3 betegség stádiumban. Ez a megfigyelés megegyezik egy korábbi tanulmányban leírtakkal SCLC betegeknél mért perifériás vér VEGF-C szint esetén (230). Ezzel ellentétben a perifériás vér VEGF-C szintje előjelezte a nyirokcsomó státuszt különböző tumor típusokban, mint például nyelőcső tumor (231), gyomor tumor (232) papilláris pajzsmirigyrák (233) malignus melanóma (234) és NSCLC /nem kissejtes tüdőrák esetén (235).

Kissejtes tüdőrák esetén, mint a malignus tumorok többségében a nyirokcsomó áttétek rosszabb túléléssel függenek össze és ez az egyik faktor mely rosszabb prognózissal társul. Vajon a nyirokterjedés rossz prognosztikai faktor-e még megállapításra vár. Jelen tanulmány elsőként demonstrálja, hogy SCLC –ban a csontvelő eredetű LVEPC sejtek száma szignifikánsan emelkedett és korrelál a regionális nyirokterjedéssel és a betegek túlélésével. Bár adataink felvetik az LVEPC sejtek részvételét SCLC betegek limfogén metasztázis progressziójában, nem világos még, vajon az LVEPC sejtek csak a tumorsejtek nyirokutakon át való terjedésében játszanak szerepet, vagy elősegítik a primer tumor növekedését és a haematogén metasztázisok kialakulását új vérér kapillárisok kialakulásának fokozásával. Megállapításra vár még, hogy az LVEPC sejteket használhatjuk-e kiegészítő markerekként a standard illetve a jövőben kifejlesztésre kerülő anti-limfangiogén kezelések hatékonyságának monitorozására SCLC-ben. További kutatások szükségesek arra vonatkozóan is, hogy vajon, az LVEPC sejtek, mint terápiás célpontok használhatók-e a SLCL kezelésében? Képesse lehet e tenni a sejteket arra, hogy toxinok, illetve nyirokér ellenes szerek szállításával a daganat ellenes kezelések alternatíváját jelentsék.

5. Következtések

A vaszkularizáció (magába foglalva a nyirokérfejlődést is) a tumor progresszió egyik alapvető folyamatának tekinthető, így jelentős erőfeszítések történnek az angio/lymphangiogenezis folyamatának megismerésére (139, 236), a betegek antivaszkuláris kezelésre való érzékenységének megállapítására, a tumor rezisztencia felismerésére és az antiangiogén szereket tartalmazó kombinált gyógyszeres kezelés hatékonyságának prognosztizálására (237). Ezidáig nem találtak alkalmas biomarkert a tumor angiogenezis monitorozására. Fontos célkitűzés noninvazív biomarkereket kifejleszteni a tumor válasz/relapszus megítélésére, amelyek segítenek a betegek antivaszkuláris szerekekkel való kezelésének megtervezésében.

Munkánkban elsőként mutattuk be, hogy a csontvelő eredetű EPC sejtek szintje szignifikánsan emelkedett NSCLC betegeknél és ez korrelált a tumor klinikai viselkedésével. Eredményeink igazolják az EPC sejtek szerepét a tumor növekedésben és vaszkularizációban. Következésképp NSCLC betegeknél, a magas kezelés előtti EPC sejtszámú betegeket anti-VEGF kezelésben kellene részesíteni (ezzel normalizálni az intratumorális vaszkulaturát) a standard kemoterápia előtt, ily módon potenciálisan javítani lehetne a kezelésre adott választ.

Eredményeink sem teszik azonban világossá, hogy az EPC sejtek a tumor angiogenezis folyamatában nélkülözhetetlenek, vagy a vaszkulogenezishez csak részben járulnak hozzá összehasonlítva az in situ angiogenezissel (endotheliális bimbózás).

A felfedezés miszerint a keringő csontvelő eredetű EPC sejtek résztvesznek a tumor vaszkulogenezisben új stratégiákat vet fel a tumor növekedés megállításában. Ez megvalósítható lenne, például, ex vivo manipulált EPC sejtekkel, melyek hordozó sejt-ként szuicid géneket, toxinokat, antiangiogén gyógyszereket szállítanának a daganat vaszkulaturába. Ezeket, az újszerű megközelítéseket a transzplantációs modellekben alkalmazzák, bizonyos fokig csökkentve a tumor progressziót (184, 238, 239). Bár a tumor vaszkularizációnak különböző mechanizmusai léteznek, az egyes experimentális modellekben változó EPC szinteket írtak le, valamint változó mértékű összefüggéseket találtak a vaszkularizáció, a tumor stádium, és a hisztológiai típus között.

Munkánkban szintén elsőként mutatjuk be, hogy a kissejtes tüdőrákos betegek perifériás vérében keringő CD34+/VEGFR3+ LVEPC sejtszám szignifikánsan emelkedett, a tumormentes kontroll egyénekével összehasonlítva, és az emelkedett LVEPC sejtszint a nyirok metasztázis kialakulásával és így a klinikai viselkedéssel is összefüggésben áll. Adataink alátámasztják az LVEPC sejtek részvételét a lymphatikus tumor progresszióban a kissejtes tüdőrákos betegeknél, azonban még nem tisztázott, hogy az LVEPC sejtek csak a tumor nyirokutakon való terjedésében vesznek részt vagy maguk is facilitálják a tumor növekedést és a haematogén metasztázisok kialakulását segítik elő új kapillárisok kialakulásának fokozásával.

Meghatározásra vár, hogy az EPC sejtek és az LVEPC sejtek, csak mint prognosztikai faktorok illetve mint kiegészítő biomarkerek használhatók a daganatellenes kezelésben az antiangio-antilimfangiogén szerek hatékonyságának megítélésében, vagy alternatívan - mivel rendelkeznek a tumorvaszkulaturába való beépülés képességével- alkalmazhatók terápiás gének, toxinok vagy antiangiogén szerek szállítására is.

6. Táblázatok

1. Táblázat

A keringő EPC sejt szám összefüggése NSCLC betegek klinikopathológiai paramétereivel

	Betegek (%)	EPC alacsony^b (%)	EPC magas^b (%)	P érték
Betegek	53	36	17	
Életkor (év)^a				
<58	26 (49.1%)	18 (50%)	8 (47%)	
≥58	27 (50.9%)	18 (50%)	9 (53%)	n.s.
Dohányzás				
Nem-dohányzó	19 (35.8%)	13 (36.1%)	6 (35.3%)	
Dohányzó vagy ex-dohányos	34 (64.2%)	23 (63.9%)	11 (64.7%)	n.s.
Nem				
Férfi	28 (52.8%)	18 (50%)	10 (58.8%)	
Nő	25 (47.2%)	18 (50%)	7 (41.2%)	n.s.
Hisztológiai típus				
Planocelluláris karcinoma	23 (43.4%)	15 (41.7%)	8 (47.1%)	
Adenokarcinoma	26 (49.1%)	18 (50%)	8 (47.1%)	
Adenosquamous	4 (7.5%)	3 (8.3%)	1 (11.8%)	n.s.
Pathológiai stádium				
Sádium I	17 (32.1%)	10 (27.8%)	7 (41.2%)	
Stádium II	9 (17%)	8 (22.2%)	1 (5.9%)	
Stádium III	22 (41.5 %)	15 (41.7%)	7 (41.2%)	
Stádium IV	5 (9.4%)	3 (8.3%)	2 (11.7%)	n.s.
Therápia				
Chemoterápia	18 (34%)	12 (33.3%)	6 (35.3%)	
Chemo-radiotherápia	10 (18.9%)	6 (16.7%)	4 (23.5%)	
Sebészet	22 (41.5%)	15 (41.7%)	7 (41.2%)	
Palliative therápia	3 (5.6%)	3 (8.3%)	0 (0%)	n.s.

^a Cut-off érték egy átlag érték; ^b cut-off érték az alacsony és magas kezelés előtti EPC sejt szint: 1000 EPCs/mL perifériás vér.

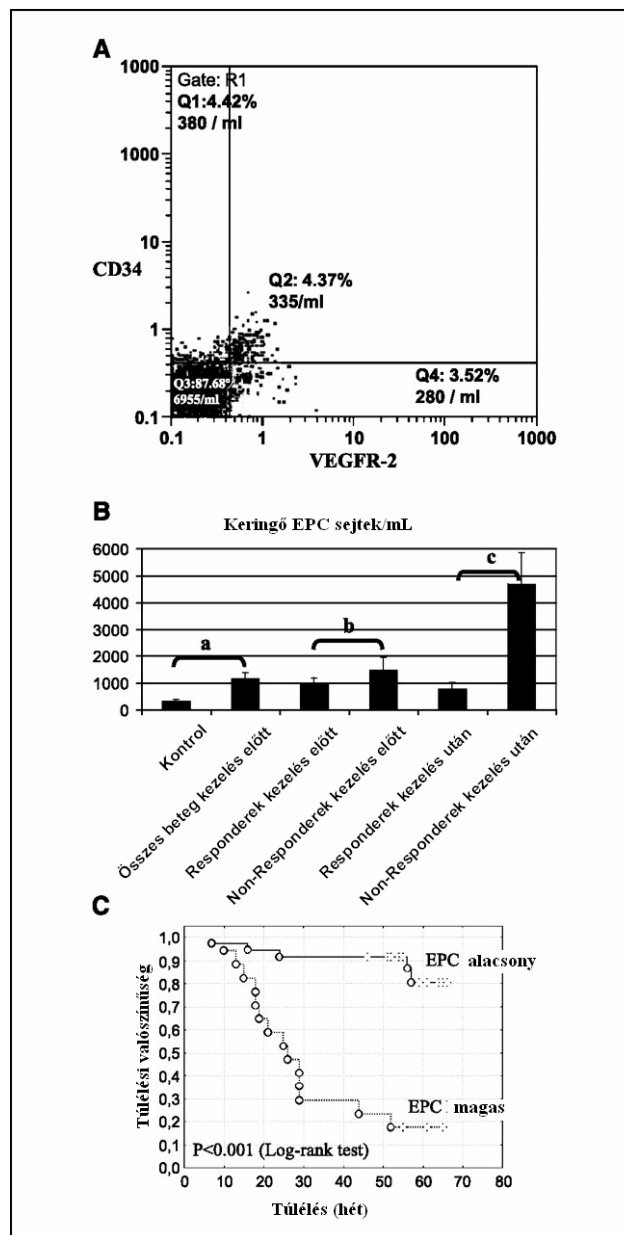
2.Táblázat

NSCLC betegek prognosztikai faktorainak multivariáns analízise

Prognosztikai faktor	RR	95% CI	P
Nem (nő vs.férfi)	0.719	(0.289-1.789)	0.478
Dohányzási szokás (nem -dohányzó vs. dohányzó)	1.602	(0.576-4.453)	0.366
Hisztológiai típus (nem -adenokarcinoma vs. adenokarcinoma.)	0.781	(0.367-1.665)	0.523
Stádium (I-II. vs. III-IV.)	1.277	(0.811-2.013)	0.291
Keringő kezelés előtti EPC sejt szám (alacsony vs. magas) ^a	8.41	(3.333-26.610)	<0.001

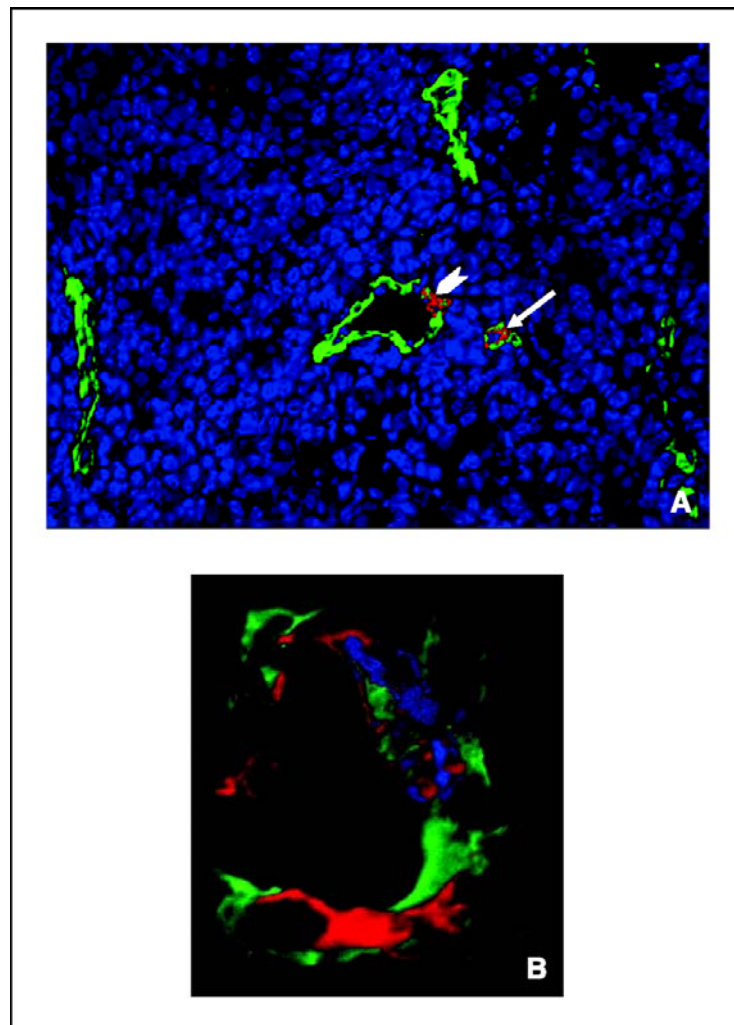
^a Cut-off érték az alacsony és magas kezelés előtti EPC szintben: 1.000EPCsejt/mL perifériás vér.RR: relativ rizikó, CI: fiducia intervallum

1.ábra A keringő EPC sejtek kvantitatív meghatározása flow cytometriával



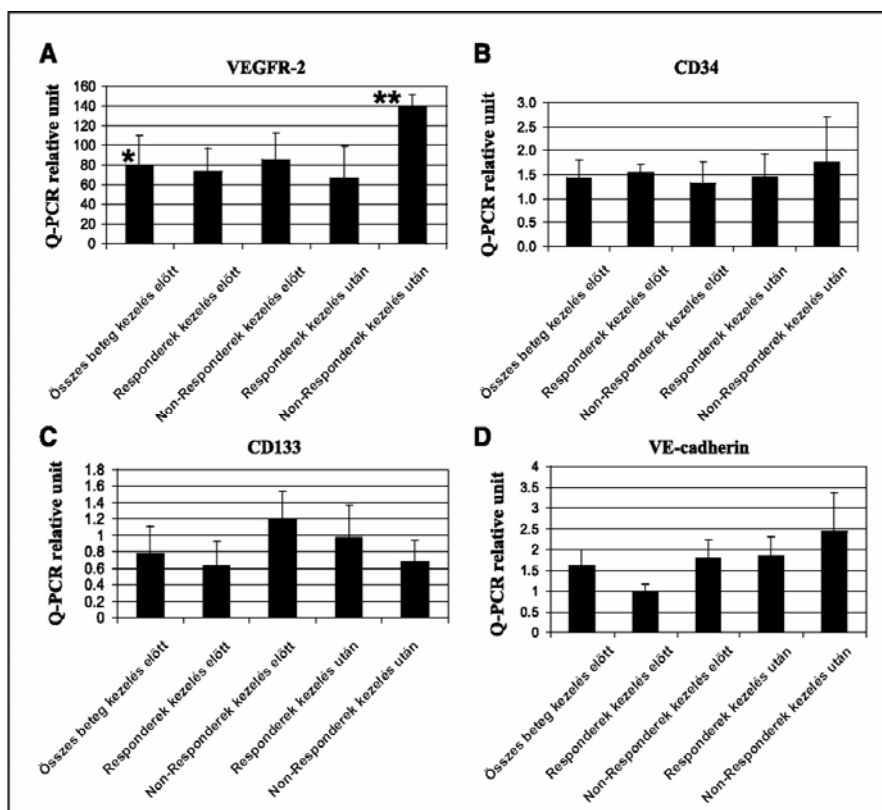
1.ábra A .A keringő EPC sejtek kvantitatív meghatározása flow cytometriával. A CD34/VEGFR2 kettős pozitív sejtek meghatározásának reprezentatív flow cytometriás analízise. Q1 = CD34+, Q2 = CD34+/VEGFR2+, Q3 = CD34-/VEGFR2-, Q4 = VEGFR2+ sejtek, **B**. Keringő EPC szint egészséges kontroll és a különböző beteg csoportokban. Az oszlopok az EPC sejtszámot jelentik EPC sejt/mL perifériás vér. SE. **a**, $P < 0.002$ (egészséges kontrollok vs. NSCLC betegek kezelés előtt); **b**, $P = 0.12$ (responder vs nonresponder a kezelés előtt) ; **c**, $P < 0.005$ (responderek vs nonresponderek a kezelés után); **C**,Kaplan- Meier túlélési görbe az össz NSCLC betegnél a kezelés előtti EPC sejtszám függvényében . A keringő EPC sejteket a CD34/VEGFR2 kettős jelölés alapján flow cytometriával határoztuk meg.Cutoff érték az alacsony, és magas kezelés előtti sejtszintben:1,000 EPC sejt/mL perifériás vér.

2.ábra A-B. EPC sejtek kimutatása humán NSCLC szövetben



2.ábra A- B. EPC sejtek kimutatása humán NSCLC szövetben. A CD133 + EPC sejtek (piros fluorescens) a kis intratumoralis kapillárisokban voltak kimutathatók (nyíllal jelölt) vagy az endotheliumhoz kapcsolódva (zöld fluorescens) a nagyobb kapillárisokban (nyílhegy). Nukleáris festéshez TOTO-3 iodide (kék fluorescens) használtunk. B. EPC sejtek kismértékben (CD133, kék fluorescens, VEGFR2, piros fluorescens) épültek be a kapilláris falba.

3. ábra VEGFR2 (A), CD34 (B), CD133 (C) és VE-C (D) mRNS szintje NSCLC betegeknél és a kezelésre adott válasz a különböző csoportokban



3. ábra VEGFR2 (A) CD34, (B) CD133 (C) és VE-C (D) mRNS relatív kvantifikációja a különböző csoportú betegeknél és az egészséges kontrolloknál. SE*, $P < 0,05$ (vs egészséges kontroll); **, $P < 0,05$

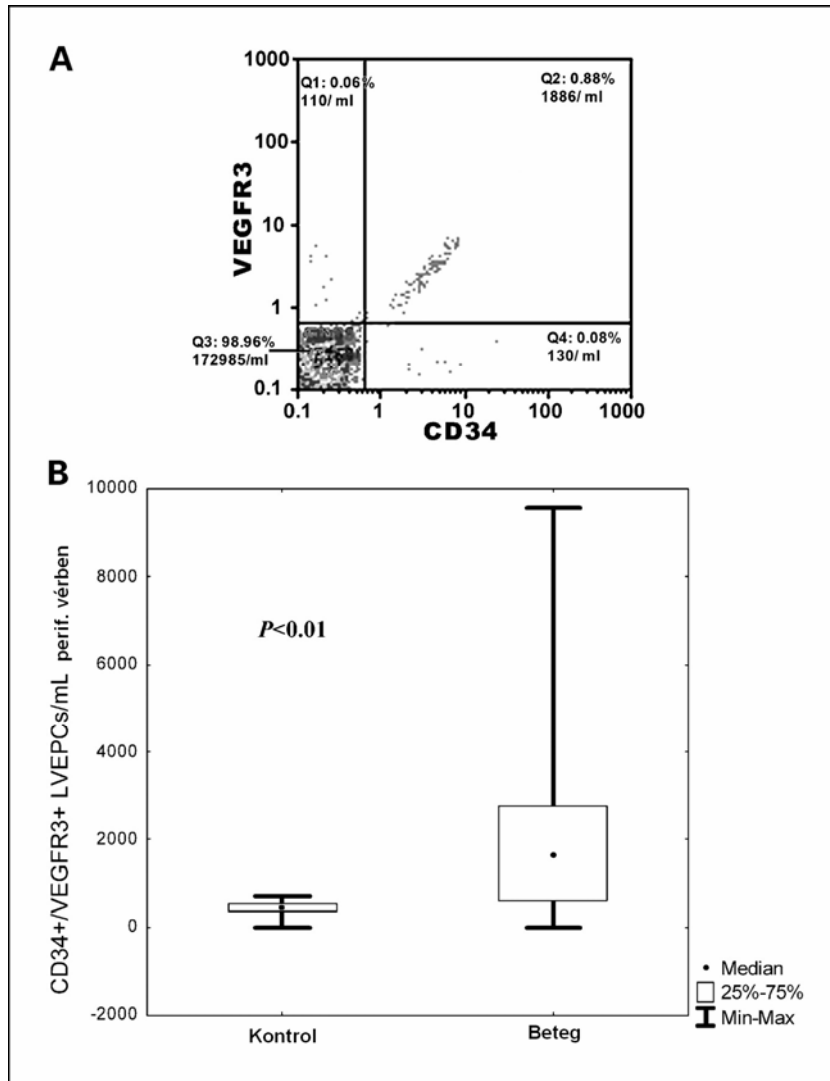
3. Táblázat

Keringő LVEPC sejtszám összefüggése 88 SCLC beteg klinikopathológiai paramétereivel

	Betegek (%)	CD34+/VEGFR3+LVEPC		P érték
		alacsony ^a (%)	magas ^a (%)	
Kor (év)^a				
63<	43 (48.9%)	22 (50%)	21 (47.7%)	
63≥	45 (51.1%)	22 (50%)	23 (52.3%)	0.83
Dohányzás				
Nem dohányzó	13 (14.8%)	6 (13.7%)	7 (15.9%)	
Dohányzó/ex-dohányzó	75 (85.2%)	38 (86.3%)	37 (84.1%)	0.77
Nem				
Férfi	54 (61.4%)	25 (56.8%)	29 (65.9%)	
Nő	34 (38.6%)	19 (43.2%)	15 (34.1%)	0.38
N stádium				
N0-1	24 (27.3%)	21 (47.3%)	3 (6.8%)	
N2-3	64 (72.7%)	23 (52.7%)	41 (93.2%)	<0.01
T stádium				
T1	8 (9.1%)	6 (13.6%)	2 (4.5%)	
T2-T4	80 (90.9%)	38 (86.4%)	42 (95.5%)	0.14
VEGF-C szint^b				
magas	44(50%)	22 (50%)	22 (50%)	
alacsony	44(50%)	22 (50%)	22 (50%)	1
Therápia				
EP	68 (77.3%)	37 (84.1%)	31 (70.5%)	
EP+CEV	20 (22.7%)	7 (15.9%)	13 (29.5%)	0.13

^a Cut-off /közép érték; ^b Cut-off /átlag érték; EP, ciszplatin , etoposide; CEV, cyclophosphamide, epirubicin , vincristine

4. ábra A-B. A keringő LVEPC sejtek kvantitatív meghatározása flow cytometriával



4.ábra A-B. A keringő LVEPC sejtek kvantitatív meghatározása flow cytometriával (A) CD34+/VEGFR3+ LVEPCs (Q1=CD34-/VEGFR3+, Q2=CD34+/VEGFR3+, Q3=CD34-/VEGFR3-, Q4=CD34+/VEGFR3- sejtek reprezentatív flow cytometriás analizise. (B) A keringő CD34+/VEGFR3+ LVEPC sejtszint a kontroll egyéneknél (n=32) és a SCLC betegeknél (n=88). A négyzet területein belüli pontok mutatják a medián értéket, a négyzetek 25%-75% quartilis tartományt és jelöltük a minimum/maximum szinteket.

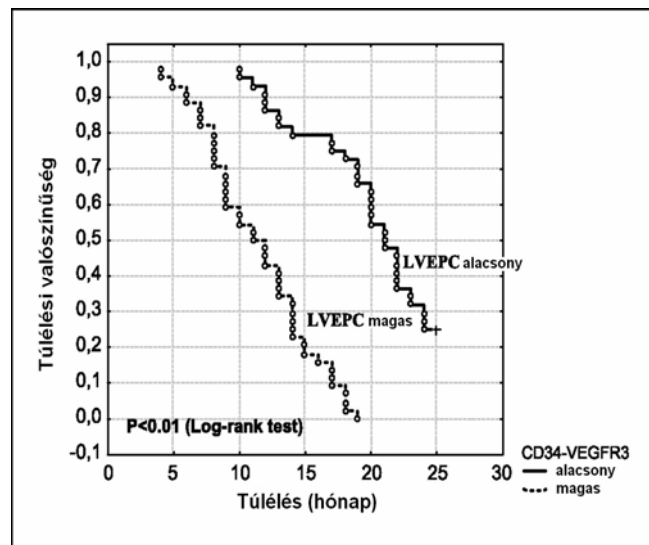
4. Táblázat

SCLC beteget prognosztikai faktorainak multivariáns analízise

Prognosztikai faktor	RR	95% CI	P
Életkor év (<63 versus ≥63)	1.213	(0.747-1.969)	0.434
Nem (nő versus férfi)	1.081	(0.655-1.782)	0.761
T stádium (T1 versus T2-4)	2.024	(0.725-5.65)	0.178
N stádium (N0-1 versus N2-3)	2.634	(1.215-5.711)	0.014
CD34+/VEGFR3+ LVEPC szint (alacsony versus magas) ^a	5.379	(2.659-10.882)	<0.01
VEGF-C szérumszint (alacsony versus magas) ^b	1.221	(0.76-1,961)	0.408

^a Cut-off közép érték; ^b cut-off közép érték ; RR, relative rizikó,

5.ábra LVEPC szint és a túlélés közötti összefüggés



5.ábra Kaplan- Meier görbe a SCLC betegek túlélésére a perifériás vérben keringő flow cytometriával meghatározott CD34+/VEGFR3+ LVEPC sejtszám függvényében. Cut off érték az alacsony és magas CD34+/VEGFR3+ LVEPC szintnél :1625 LVEPCs/mL perifériás vér.

5. Táblázat A betegek és a kontroll csoport klinikai jellemzői és a VEGF-C szérumszintje

	Betegek (n=88)	Kontrollok (n=32)	P
Nem (férfi/nő)	54/34 (61.4% vs. 38.6%)	19/13 (59.4% vs. 40.6%)	0.5 ^a
Életkor (év)	63 (44-77)	61 (48-70)	0.62 ^b
Dohányzási szokás (dohányzó, ex-dohányzó/nem-dohányzó)	75/13 (85.2% vs. 14.8%)	26/6 (81.2% vs. 18.8%)	0.39 ^a
Légzésfunkció (spirometia) (normál/enyhe vagy közepes COPD) ^c	74/14 (84% vs. 16%)	27/5 (84.4% vs. 15.6%)	0.61 ^a
VEGF-C (pg/mL)	4931±881 ^d	3992±462 ^d	<0.01 ^{e,f}

^a Fischer's exact teszt; ^b Mann-Whitney teszt; ^c GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases) klasszifikáció ; ^d mean±SD; ^e Student t-teszt; ^f Szignifikáns különbség a beteg és egészséges kontroll csoport között.

7. Összefoglalás

Bevezetés: A tüdőrák a vezető betegség a daganatos incidencia és mortalitás terén a nyugati világban. A sebészi reszekció, a platina bázisú kombinált kemoterápia és a sugárkezelés javítottak ugyan a tüdőrák túlélési eredményein, azonban a reszekált esetek 50%-ában is 5 éven belül megjelennek az áttétek. A tüdőrák túlélésének növekedési görbéje plató fázishoz érkezett. A szomorú túlélési adatok az utóbbi években a figyelmet a különböző hatásmechanizmusú, tolerálhatóbb mellékhatás profillal rendelkező molekuláris célzott terápiák felé fordították. A molekuláris célzott terápiák közé tartoznak a tumorok érhálózatára ható szerek. Az egyik legforrongóbb kutatási terület a tumor indukált angiogenezis. Napjainkig elfogadott tény volt, hogy a tumor vaszkularizáció, továbbá a nyirokérfejlődés endotheliális bimbózás útján fejlődik ki. A csontvelő eredetű endothel progenitor sejtek (EPC) és a később identifikált szintén csontvelő eredetű sejtpopuláció, melyeket limfo/vaszkuláris endotheliális progenitor sejteknek neveznek (lymphatic/vascular endothelial progenitor cells/ LVEPCs), experimentális tumor modellekben hozzájárulnak a vérér és nyirok kapillárisok növekedéséhez. A keringő endotheliális progenitor sejtek és az érett, levált keringő endothel sejtek az antivaszkuláris célzott terápiák hatékonyságának legígéretesebb biomarkereivé válhatnak a jövőben.

Célkitűzés: Az volt a célkitűzésünk, hogy meghatározzuk az EPC sejtek szerepét nem kissejtes tüdőrákban (NSCLC). További célkitűzésünk volt az, hogy tanulmányozzuk kissejtes tüdőrákos (SCLC) betegeknél a keringő LVEPC sejtek szerepét a betegség progressziójában.

Betegek és Metodika: Az EPC sejtek vizsgálatához 53 nem kissejtes tüdőrákos (NSCLC) beteg perifériás vérmintáit vizsgáltuk. Flow cytometriával mértük a CD34, a CD133 és a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor -2 (VEGFR2) antitesttel jelzett EPC sejteket. Relatív kvantitatív reverz transzkripció-Real Time PCR (polymerase chain reaction) módszerrel mértük a VEGFR2, CD133, CD34 és VE-cadherin mRNS (messenger RNS) szintet. Konfokális mikroszkóp alkalmazásával EPC sejteket azonosítottunk tumor mintákból CD31, CD34, CD133 és VEGFR2 antitestekkel.

Az LVEPC sejtek vizsgálatához 88 lokálisan kiterjedt stádiumú SCLC beteget és 32 tumormentes kontroll egyént vontunk be a vizsgálatba. A perifériás vérben keringő

CD34 és VEGFR-3 antitesttel jelölt LVEPC sejtek és a lymphangiogenezisben kulcsszerepet játszó fő citokin a VEGF-C szérumszintjét mértük ELISA módszerrel.

Eredmények: A NSCLC szövetmintákban az immunfluoreszcens módon jelölt mikroerek révén világossá vált, hogy az EPC sejtek inkorporációja ritka jelenség (9 esetben a 22-ből). A keringő EPC szint a kezelés előtt emelkedett volt a NSCLC betegekben ($p < 0.002$ vs egészséges egyének) és a kezelés előtti magas keringő EPC szám rosszabb teljes túléléssel korrelált ($p < 0.001$). A jól reagáló (responder) alcsoportban, a perifériás vérben a kezelés utáni EPC szint szignifikánsan alacsonyabb volt, összehasonlítva a daganat ellenes kezelésre nem reagáló (nonresponder) csoporthoz képest. A kezelés előtti CD133, VE-cadherin és CD34 mRNS szint nem volt szignifikánsan magasabb a NSCLC betegeinknél, ugyanakkor a VEGFR2 expresszió 80-szor magasabb volt. A kezelés utáni VEGFR2 mRNS szint szignifikánsan magasabb volt a nonresponder betegeknél, összehasonlítva a kezelésre jól reagálókkal.

A CD34+/VEGFR3+ LVEPC szint szignifikánsan emelkedett volt a beteg csoportban (vs kontroll csoport $p < 0,01$) és szintén szignifikáns kapcsolat volt az LVEPC szám és a nyirokcsomó metasztázisok között ($p < 0,01$). A kezelés előtti magas keringő LVEPC szint rossz túléléssel korrelált ($p < 0,01$). Nem találtunk szignifikáns összefüggést a VEGF-C és LVEPC szint között, annak ellenére, hogy szignifikánsan emelkedett VEGF-C koncentrációt észleltünk a betegeknél (vs. kontroll $p < 0,01$). Nem volt szignifikáns különbség az LVEPC szint és az eltérő klinikopatológiai alcsoportok között. Szoros korreláció volt kimutatható azonban a LVEPC-k mennyisége és a nyirokáttek száma valamint a túlélés között.

Konklúziók: A perifériás vérben mért keringő csontvelő eredetű EPC sejtek száma nem kissejtes tüdőrákban (NSCLC) emelkedett és korrelált a klinikai viselkedéssel.

Kissejtes tüdőrákos (SCLC) betegek perifériás vérében szignifikánsan emelkedett a csontvelő eredetű LVEPC sejtek szintje, mely korrelált a nyirokcsomó metasztázissal és a rosszabb prognózissal.

8. Summary

Lung cancer is the most common malignancy in terms of both incidence and mortality in the western world. Although modest survival benefit has been observed with surgery and chemo (radio)therapy, even in surgically resectable cases, more than 50% of patients develop metastases within 5 years and an efficacy plateau has been reached. Given the still dismal survival rates, attention over recent years has focused on novel molecular targeted therapies with different mechanisms of action and better toxicity profile. The tumor induced angiogenesis is one of the most exciting research areas in this field. Until recently, it was generally accepted that vascularization and lymphangiogenesis of tumors arises exclusively from endothelial sprouting. The bone marrow derived endothelial progenitor cells (EPCs) and the newly identified bone marrow- derived cell population, called lymphatic/vascular endothelial progenitor cells (LVEPCs) have been shown to contribute to vascular and to lymph capillary growth in experimental tumor systems. The circulating endothelial progenitor cells and the mature exfoliated endothelial cells are potential biomarkers for monitoring the efficacy of antiangiogenic therapies in the future.

Aims: The aim of the study was to identify the role of the EPC cells in non- small cell lung cancer (NSCLC). Further aim was to studying the role of the circulating LVEPC cells in small cell lung cancer (SCLC) and the relationship with the diseases progression.

Methods: EPCs labeled with CD34, CD133, and vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR2) antibodies were counted by flow cytometry in the peripheral blood of 53 NSCLC patients. Furthermore, by means of a relative quantitative reverse transcription real time-PCR approach, we measured VEGFR2, CD133, CD34, and VE-cadherin mRNA in the peripheral blood samples of the same patient population. EPCs in tumor samples were identified by confocal microscopy using CD31, CD34, CD133, and VEGFR2 antibodies.

To measure the number of circulating LVEPC, peripheral blood samples were collected from 88 patients with limited-disease SCLC before therapy. The control group was also

included 32 individuals. There were determined the numbers of CD34-positive/VEGFR3-positive double-positive LVEPC in the peripheral blood of 32 control subjects and 88 SCLC patients by flow cytometry. The levels of VEGF-C in the peripheral blood of controls and patients with SCLC were carried out by using ELISA method.

Results: Although immunofluorescent labeling of microvessels made clear that incorporation of EPCs is a rare phenomenon in NSCLC tissue (9 of 22 cases), circulating EPC levels before therapeutic intervention were increased in NSCLC patients ($P < 0.002$, versus healthy controls), and high pretreatment circulating EPC numbers correlated with poor overall survival ($P < 0.001$). Furthermore, in the subgroup of responders to treatment, the posttreatment EPC numbers in the peripheral blood were significantly lower compared with nonresponding patients. Interestingly, pretreatment mRNA levels of CD133, VEGFR2, and CD34 were not significantly increased in NSCLC patients, whereas VEGFR2 expression was increased by 80-fold. Moreover, posttreatment VEGFR2 mRNA level in the peripheral blood was significantly higher in the subgroup of nonresponding patients when compared with posttreatment level of patients responding to antitumor therapy.

CD34-positive/VEGFR3-positive LVEPC levels were significantly increased in patients (versus controls; $P < 0.01$), and there was also a significant relationship between LVEPC counts and lymph node metastasis ($P < 0.01$). High pretreatment circulating LVEPC numbers correlated with poor overall survival ($P < 0.01$). Although we observed significantly elevated VEGF-C concentrations in patients (versus controls; $P < 0.01$), there was no significant correlation between VEGF-C and LVEPC levels. Moreover, no significant differences in peripheral blood VEGF-C levels were seen between patients subgrouped by clinicopathologic variables including tumor and lymph node stages and survival.

Conclusion: Circulating levels of bone marrow-derived EPCs are significantly increased in NSCLC patients and correlate with clinical behavior.

Peripheral blood levels of bone marrow - derived LVEPCs are significantly increased

in patients with SCLC and correlated with lymphatic involvement and poor prognosis.

9. Irodalomjegyzék

1. Mackay J., Jemal A, Lee C.N, et Parkin D M. The Cancer Atlas. American Cancer Society 2006 (www.cancer.org)
2. A pulmonológiai intézmények 2007 évi epidemiológiai és működési adatai. OKTPI 2008.
3. Mackay J, Eriksen M et Shafey O. The Tobacco Atlas American Cancer Society (sec.ed.) 2006 (www.cancer.org)
4. Appel Judit, Lukács Judit, A tüdőrák patológiája. In.:szerk.:Kovács G., Ostoros Gy., Szondy K. Tüdőrák a gyakorlatban és a mellhártya mezoteliómája. Medicina, Budapest, 2006: 39-46.
5. Paesmans M, Sculier JP, Lecomte J, Thiriaux J, Libert P, Sergysels R, Bureau G, Dabouis G, Van Cutsem O, Mommen P, Ninane V, Klastersky J. Prognostic factors for patients with small cell lung carcinoma: analysis of a series of 763 patients included in 4 consecutive prospective trials with a minimum follow-up of 5 years. Cancer, 2000, 89: 523-533.
6. Cerny T, Blair V, Anderson H, Bramwell V, Thatcher N. Pretreatment prognostic factors and scoring system in 407 small-cell lung cancer patients. Int J Cancer, 1987, 39: 146-149.
7. Rawson NS, Peto J. An overview of prognostic factors in small cell lung cancer. A report from the Subcommittee for the Management of Lung Cancer of the United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research. Br J Cancer, 1990, 61: 597-604.
8. Fosella FV, Komaki J et al: Lung Cancer. M.D. Anderson Cancer Care Series. Springer, New York, Berlin, Heidelberg, 2002. Hansen HH, Bunn PA. Lung

- Cancer Therapy Annual. Martin Dunitz, London, 2002. Lung Cancer Guidelines. Chest, 2003, 123, Suppl. 1.
9. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, Maoleekoonpiroj S, Smylie M, Martins R, van Kooten M, Dediu M, Findlay B, Tu D, Johnston D, Bezjak A, Clark G, Santabárbara P, Seymour L; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 2005, 353: 123-132.
 10. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, 2004, 350: 2129-2139.
 11. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, 2004, 304: 1497-1500.
 12. Fontanini G, Vignati S, Boldrini L. Vascular endothelial growth factor is associated with neovaszkulárisation and influences progression of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*, 1997, 3: 861-865.
 13. Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, Herbst RS, Nemunaitis JJ, Jablons DM, Langer CJ, DeVore RF 3rd, Gaudreault J, Damico LA, Holmgren E, Kabbinavar F. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 2004, 22: 2184-2191.

14. Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Fusco A, Vecchio G. Molecular mechanisms of RET activation in human cancer. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 963: 116-121.
15. Natale RB, Bodkin D, Govindan R, Sleckman BG, Rizvi NA, Capó A, Germonpré P, Eberhardt WE, Stockman PK, Kennedy SJ, Ranson M. Vandetanib Versus Gefitinib in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Results From a Two-Part, Double-Blind, Randomized Phase II Study. *J Clin Oncol*, 2009, Mar 30. [Epub ahead of print]
16. Schiller JH, Larson T, Ou SI. Efficacy and safety of axitinib (AG-013736) in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): A phase II trial. *J Clin Oncol*, 2007, 25: 7507.
17. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, PostLE, Bollag G, Trail PA. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res*, 2004, 64: 7099-7109.
18. Gollob JA, Wilhelm S, Carter C, Kelley SL. Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway. *Semin Oncol*, 2006, 33: 392-406.
19. O'Farrell AM, Abrams TJ, Yuen HA, Ngai TJ, Louie SG, Yee KW, Wong LM, Hong W, Lee LB, Town A, Smolich BD, Manning WC, Murray LJ, Heinrich MC, Cherrington JM. SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood*, 2003, 101: 3597-3605.

20. Liu B, Barrett T, Choyke P. A Phase II study of BAY 43-9006 (Sorafenib) in patients with relapsed non-small cell lung cancer (NSCLC). *J. Clin Oncol*, 2006, 24: 17119.
21. Wissmann C, Detmar M. Pathways targeting tumor lymphangiogenesis. *Clin Cancer Res*, 2006, 12: 6865-6868.
22. He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T, Alitalo K. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94: 819-825.
23. Achen MG, McColl BK, Stacker SA. Focus on lymphangiogenesis in tumor metastasis. *Cancer Cell*, 2005, 7: 121-127.
24. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 1971, 285:1182-1186.
25. Vignaud JM, Marie B, Klein N, Plénat F, Pech M, Borrelly J, Martinet N, Duprez A, Martinet Y. The role of platelet-derived growth factor production by tumor-associated macrophages in tumor stroma formation in lung cancer. *Cancer Res*, 1994, 54: 5455-5463.
26. Iwasaki A, Kuwahara M, Yoshinaga Y, Shirakusa T. Basic fibroblast growth factor (bFGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels, as prognostic indicators in NSCLC. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2004, 25: 443-448.
27. Shiraga M, Yano S, Yamamoto A, Ogawa H, Goto H, Miki T, Miki K, Zhang H, Sone S. Organ heterogeneity of host-derived matrix metalloproteinase expression and its involvement in multiple-organ metastasis by lung cancer cell lines. *Cancer Res*, 2002, 62: 5967-5973.

28. Ellis LM. Epidermal growth factor receptor in tumor angiogenesis. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2004, 18:1007-1021,
29. Zhang LJ, Chen JF, Lu AP, Ke Y, Mansel RE, Jiang WG. Expression of Placenta growth factor (PIGF) in non-small cell lung cancer (NSCLC) and the clinical and prognostic significance. *World J Surg Oncol*, 2005, 3: 68.
30. Chen JJ, Yao PL, Yuan A, Hong TM, Shun CT, Kuo ML, Lee YC, Yang PC. Up-regulation of tumor interleukin-8 expression by infiltrating macrophages: its correlation with tumor angiogenesis and patient survival in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 729-737.
31. Olivero M, Rizzo M, Madeddu R, Casadio C, Pennacchietti S, Nicotra MR, Prat M, Maggi G, Arena N, Natali PG, Comoglio PM, Di Renzo MF. Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in human non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer*, 1996, 74: 1862-1868.
32. Tanaka F, Ishikawa S, Yanagihara K, Miyahara R, Kawano Y, Li M, Otake Y, Wada H. Expression of angiopoietins and its clinical significance in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 2002, 62: 7124-7129.
33. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995, 11:73-91.
34. Auerbach R, Gilligan B, Lu LS, Wang SJ. Cell interactions in the mouse yolk sac: vasculogenesis and haematopoiesis. *J Cell Physiol*, 1997, 173: 202-205.
35. Jain RK, Schlenger K, Hockel M, Yuan F. Quantitative angiogenesis assays: progress and problems. *Nat Med*, 1997, 3:1203-1208.
36. Flamme I, Risau W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development*, 1992, 116: 435- 439.

37. Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Eklom P, Kemler R, Doetschman T. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic stem cell-derived embryoid bodies. *Development*, 1988, 102:471-478.
38. Li CY, Shan S, Huang Q, Braun RD, Lanzen J, Hu K, Lin P, Dewhirst MW. Initial stages of tumor cell-induced angiogenesis: evaluation via skin window chambers in rodent models. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92:143-147.
39. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, 275:965-967.
40. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 1997, 90: 5000-5012.
41. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*, 2000, 105:71-77.
42. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearney M, Wagner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 1999, 85: 221-228.
43. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*, 2001, 7:430-436.
44. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Wagner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone

- marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*, 1999, 5:434-438.
45. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(1) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 2000, 95:952-958.
46. Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res*, 1986, 46:5629-32.
47. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 181:902-906.
48. De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, 1992, 255: 989-991.
49. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 187: 1579-1586.
50. Pajusola K, Aprelikova O, Korhonen J, Kaipainen A, Pertovaara L, Alitalo R, Alitalo K. FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res*, 1992, 52: 5738-5743.

51. Pepper MS, Mandriota SJ, Jeltsch M, Kumar V, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C synergizes with basic fibroblast growth factor and VEGF in the induction of angiogenesis in vitro and alters endothelial cell extracellular proteolytic activity. *J Cell Physiol*, 1998, 177: 452.
52. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 548-553.
53. Lyttle DJ, Fraser KM, Fleming SB, Mercer AA, Robinson AJ. Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol*, 1994, 68:84-92.
54. Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, Lanz C, Buttner M, Rziha HJ, Dehio C. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J*, 1999,18: 363-374.
55. 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, 269:25646-25654.
56. Salven P, Orpana A, Heikki JH. Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res*, 1999, 5: 487-491.
57. Toi M, Inada K, Suzuki H, Tominaga T. Tumor angiogenesis in breast cancer: its importance as a prognostic indicator and the association with vascular

- endothelial growth factor expression. *Breast Cancer Res Treat*, 1995, 36: 193-204.
58. Dirix LY, Vermeulen PB, Benoy I, Martin M, Van Oosterom AT. Serum basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and tumour growth kinetics in patients with advanced colorectal cancer. *Ann Oncol*, 1996, 7: 843-848.
59. Yamamoto Y, Toi M, Kondo S, Matsumoto T, Suzuki H, Kitamura M, Tsuruta K, Taniguchi T, Okamoto A, Mori T, Yoshida M, Ikeda T, Tominaga T. Concentrations of vascular endothelial growth factor in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res*, 1996, 2: 821-826.
60. Korhonen J, Polvi A, Partanen J, Alitalo K. The mouse tie receptor tyrosine kinase gene: expression during embryonic angiogenesis. *Oncogene*, 1994, 9:395-403.
61. Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, Puri MC, Gertsenstein M, Auerbach A, Breitman ML. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev*, 1994, 8:1897-1909.
62. Zagzag D, Hooper A, Friedlander DR, Chan W, Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Grumet M. In situ expression of angiopoietins in astrocytomas identifies angiopoietin-2 as an early marker of tumor angiogenesis. *Exp Neurol*, 1999, 159: 391-400.
63. Miller DL, Ortega S, Bashayan O, Basch R, Basilico C. Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 2260-2268.

64. Heldin CH and Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*, 1999, 79:1283-1316.
65. Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL. Proteolytic activation of latent transforming growth factor- β from fibroblastconditioned medium. *J Cell Biol* 1988; 106:1659–65.
66. Wahl S, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84:5788-5792.
67. Orlidge A, D'Amore PA. Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J Cell Biol*, 1987, 105:1455-1462.
68. Yuan A, Yang PC, Yu CJ, Chen WJ, Lin FY, Kuo SH, Luh KT. Interleukin-8 messenger ribonucleic acid expression correlates with tumor progression, tumor angoigenezis, patient survival, and timing of relapse in non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162:1957-1963.
69. Klagsbrun M, D'Amore P. Regulators of angoigenezis. *Annu Rev Physiol*, 1991, 53: 217-239.
70. Clark SC, Kamen R. The human hematopoietic colonystimulating factors. *Science*, 1987, 236: 1229-1237.
71. Bussolino F, Wang JM, Defilippi P, Turrini F, Sanavio F, Edgell CJ, Aglietta M, Arese P, Mantovani A. Granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature*, 1989, 337: 471-473.

72. Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresch DA. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha v \beta 3$. *Cell*, 1996, 85:686-693.
73. Kim S, Bell K, Mousa SA, Varner JA. Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin $\alpha 5 \beta 1$ with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am J Pathol*, 2000, 156: 1345-1362.
74. Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, Ruco LP, Dejana E. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol*, 1992, 118: 1511-1522.
75. Gale NW, Baluk P, Pan L, et al.: 2001. Ephrin-B2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both endothelial and smoothmuscle cells. *Dev Biol*, 230:151-160
76. Chalkley H. Method for the quantitative morphological analysis of tissues. *J Natl Cancer Inst*, 1943, 4: 47-53.
77. Shepro D, Morel NM. Pericyte physiology. *FASEB J*, 1993, 7:1031-1038.
78. Nehls V, Drenckhahn D. Heterogeneity of microvascular pericytes for smooth muscle type alpha-actin. *J Cell Biol*, 1991, 113: 147-154.
79. Sundberg C, Ljungstrom M, Lindmark G, Gerdin B, Rubin K. Microvascular pericytes express platelet-derived growth factor-beta receptors in human healing wounds and colorectal adenokarcinoma. *Am J Pathol*, 1993, 143: 1377-1388.
80. Alliot F, Rutin J, Leenen PJ, Pessac B. Pericytes and periendothelial cells of brain parenchyma vessels co-express aminopeptidase N, aminopeptidase A, and nestin. *J Neurosci Res*, 1999, 58: 367-378

81. Cho H, Kozaka T, Bondjers C, Betsholtz C, Kehrl J. Pericyte specific expression of RGS5: implications for PDGF and EDG receptor signaling during vascular maturation. *FASEB J*, 2003, 17: 440-442.
82. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: isolation and characterization. *Trends Cardiovasc Med*, 2003, 5: 201-206.
83. Burger PE, Coetzee S, McKeehan WL, Kan M, Cook P, Fan Y, Suda T, Hebbel RP, Novitzky N, Muller WA, Wilson EL. Fibroblast growth factor receptor-1 is expressed by endothelial progenitor cells. *Blood*, 2002, 10: 3527-3535.
84. Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, De Ferrari GM, Ferlini M, Goffredo L, Bertolotti A, Klersy C, Pecci A, Moratti R, Tavazzi L. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood*, 2005, 1: 199-206.
85. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 7: 1185-9.
86. Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissig B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer*, 2002, 11: 826-835.
87. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Gravelleaux E, Pieczek A, Iwaguro H, Hayashi SI, Isner JM, Asahara T. Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res*, 2000, 12: 1198-1202.
88. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*, 2003, 7: 593-600.

89. Dimmeler S, Zeiher AM. Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circ Res*, 2000, 6: 434-439.
90. Prater DN, Case J, Ingram DA, Yoder MC. Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia*, 2007, 6: 1141-1149.
91. Yoon CH, Hur J, Park KW, Kim JH, Lee CS, Oh IY, Kim TY, Cho HJ, Kang HJ, Chae IH, Yang HK, Oh BH, Park YB, Kim HS. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation*, 2005, 11: 1618-1627.
92. Harraz M, Jiao C, Hanlon HD, Hartley RS, Schatteman GC CD34- blood-derived human endothelial cell progenitors. *Stem Cells*, 2001, 4: 304-312.
93. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*, 2003, 8: 1164-1169.
94. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich R, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*, 2007, 5: 1801-1809.
95. Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, Kerbel RS. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nat Rev Cancer*, 2006, 11: 835-845.
96. De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi L, Politi LS, Sampaolesi M, Naldini L. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes

- required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell*, 2005, 3: 211-226.
97. Venneri MA, De Palma M, Ponzoni M, Pucci F, Scielzo C, Zonari E, Mazziere R, Doglioni C, Naldini L. Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood*, 2007, 12: 5276-5285.
98. Udagawa T, Puder M, Wood M, Schaefer BC, D'Amato RJ. Analysis of tumor-associated stromal cells using SCID GFP transgenic mice: contribution of local and bone marrow-derived host cells. *FASEB J*, 2006, 1: 95-102.
99. Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajjar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med*, 2001, 11:1194-201.
100. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 2005, 8: 820-827.
101. Conejo-Garcia JR, Benencia F, Courreges MC, Kang E, Mohamed-Hadley A, Buckanovich RJ, Holtz DO, Jenkins A, Na H, Zhang L, Wagner DS, Katsaros D, Carroll R, Coukos G. Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a beta-defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A. *Nat Med*, 2004, 9: 950-958.
102. Khakoo AY, Finkel T. Endothelial progenitor cells. *Annu Rev Med*, 2005, 56: 79-101.

103. Heissig B, Werb Z, Rafii S, Hattori K. Role of c-kit/Kit ligand signaling in regulating vasculogenesis. *Thromb Haemost*, 2003, 4: 570-576.
104. Kryczek I, Lange A, Mottram P, Alvarez X, Cheng P, Hogan M, Moons L, Wei S, Zou L, Machelon V, Emilie D, Terrassa M, Lackner A, Curiel TJ, Carmeliet P, Zou W. CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res*, 2005, 2: 465-472.
105. Schatteman GC, Dunnwald M, Jiao C. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 1: 1-18.
106. De Falco E, Porcelli D, Torella AR, Straino S, Iachininoto MG, Orlandi A, Truffa S, Biglioli P, Napolitano M, Capogrossi MC, Pesce M. SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. *Blood*, 2004, 12: 3472-3482.
107. Kollet O, Spiegel A, Peled A, Petit I, Byk T, HersHKoviz R, Guetta E, Barkai G, Nagler A, Lapidot T. Rapid and efficient homing of human CD34(+)CD38(-/low)CXCR4(+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m (null) mice. *Blood*, 2001, 10: 3283-3291.
108. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*, 1999, 14:3964-3972.
109. Fürstenberger G, von Moos R, Lucas R, Thürlimann B, Senn HJ, Hamacher J, Boneberg EM. Circulating endothelial cells and angiogenic serum factors during neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer. *Br J Cancer*, 2006, 4:524-531.

110. Ho JW, Pang RW, Lau C, Sun CK, Yu WC, Fan ST, Poon RT. Significance of circulating endothelial progenitor cells in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2006, 4: 836-843.
111. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*, 1999, 4: 434-438.
112. Natori T, Sata M, Washida M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M. G-CSF stimulates angiogenesis and promotes tumor growth: potential contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 4:1058-1061.
113. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, Boehm SM, Menne J, Haller H, Fliser D. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood*, 2004, 103: 921-926.
114. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell Mobilization. *Blood*, 2003, 102: 1340-1346.
115. Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension*, 2005, 45: 321-325.
116. Li B, Sharpe EE, Maupin AB, Teleron AA, Pyle AL, Carmeliet P, Young PP. VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J*, 2006, 20: 1495-497.

117. Moore MA, Hattori K, Heissig B, Shieh JH, Dias S, Crystal RG, Rafii S. Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 938:36-45; discussion 45-47.
118. Li X, Tjwa M, Moons L, Fons P, Noel A, Ny A, Zhou JM, Lennartsson J, Li H, Lutun A, Pontén A, Devy L, Bouché A, Oh H, Manderveld A, Blacher S, Communi D, Savi P, Bono F, Dewerchin M, Foidart JM, Autiero M, Herbert JM, Collen D, Heldin CH, Eriksson U, Carmeliet P. Revascularization of ischemic tissues by PDGF-CC via effects on endothelial cells and their progenitors. *Clin Invest*, 2005, 115: 118-127.
119. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med*, 2003, 9: 1370-1376.
120. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, Walsh K, Isner JM, Asahara T. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*, 2001, 108: 399-405.
121. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Miche E, Böhm M, Nickenig G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*, 2004, 109: 220-226.
122. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Böhm M, Nickenig G. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation*, 2003, 107: 3059-3065.
123. Seeger FH, Haendeler J, Walter DH, Rochwalsky U, Reinhold J, Urbich C, Rössig L, Corbaz A, Chvatchko Y, Zeiher AM, Dimmeler S. p38 mitogen-

- activated protein kinase downregulates endothelial progenitor cells. *Circulation*, 2005, 111: 1184-1191.
124. Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, Szmitko PE, Zucco L, Wang CH, Badiwala MV, Mickle DA, Weisel RD, Fedak PW, Stewart DJ, Kutryk MJ. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation*, 2004, 109: 2058-2067.
125. Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Raffi S, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick R. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science*, 2003, 300: 1155-1159.
126. Goon PK, Lip GY, Boos CJ, Stonelake PS, Blann AD. Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, and endothelial microparticles in cancer. *Neoplasia*, 2006, 8: 79-88.
127. Göthert JR, Gustin SE, van Eekelen JA, Schmidt U, Hall MA, Jane SM, Green AR, Göttgens B, Izon DJ, Begley CG. Genetically tagging endothelial cells in vivo: bone marrow-derived cells do not contribute to tumor endothelium. *Blood*, 2004, 104: 1769-1777.
128. Spring H, Schüler T, Arnold B, Hämmerling GJ, Ganss R. Chemokines direct endothelial progenitors into tumor neovessels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 18111-18116.
129. Peters BA, Diaz LA, Polyak K, Meszler L, Romans K, Guinan EC, Antin JH, Myerson D, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW, Lengauer C. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med*, 2005, 11: 261-262.

130. Igreja C, Courinha M, Cachaço AS, Pereira T, Cabeçadas J, da Silva MG, Dias S. Characterization and clinical relevance of circulating and biopsy-derived endothelial progenitor cells in limfóma patients. *Haematologica*, 2007, 92: 469-477.
131. Hilbe W, Dirnhofner S, Oberwasserlechner F, Schmid T, Gunsilius E, Hilbe G, Wöll E, Kähler CM. CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol*, 2004, 57:965-969.
132. Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Kozin SV, Mino M, Cohen KS, Scadden DT, Hartford AC, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Chen HX, Shellito PC, Lauwers GY, Jain RK. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasculature effects in human rectal cancer. *Nat Med*, 2004, 10: 145-47.
133. Massa M, Rosti V, Ramajoli I, Campanelli R, Pecci A, Viarengo G, Meli V, Marchetti M, Hoffman R, Barosi G. Circulating CD34+, CD133+, and vascular endothelial growth factor receptor2-positive endothelial progenitor cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J Clin Oncol*, 2005, 23: 5688-5695.
134. Wierzbowska A, Robak T, Krawczyńska A, Wrzesień-Kuś A, Pluta A, Cebula B, Smolewski P. Circulating endothelial cells in patients with acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*, 2005, 75: 492-497.
135. Zheng PP, Hop WC, Luider TM, Sillevs Smitt PA, Kros JM. Increased levels of circulating endothelial progenitor cells and circulating endothelial nitric oxide synthase in patients with gliomas. *Ann Neurol*, 2007, 62: 40-48.
136. Tammela T, Petrova TV, Alitalo K: Molecular lymphoangiogenesis: New players. *Trends Cell Biol*, 2005, 15:434-441.

137. Witte MH, Bernas MJ, Martin CP, Witte CL. Lymphangiogenesis and lymphangiodysplasia: from molecular to clinical lymphology. *Microsc Res Tech*, 2001, 55:122-145.
138. Wigle JT, Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell*, 1999, 98:769-778.
139. Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G, Gunn MD, Jackson DG, Oliver G. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *Embo J*, 2002, 21: 1505-1513.
140. Petrova TV, Mäkinen T, Mäkelä TP, Saarela J, Virtanen I, Ferrell RE, Finegold DN, Kerjaschki D, Ylä-Herttuala S, Alitalo K. Lymphatic endothelial cells by the Prox1 homeobox transcription factor. *Embo J*, 2002, 21:4593-4599.
141. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol*, 2004, 5: 74-80.
142. Suzuki H, Watabe T, Kato M, Miyazawa K, Miyazono K. Roles of vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling in differentiation of mouse embryonic stem cell derived vascular progenitor cells into endothelial cells. *Blood*, 105: 2372-2379.
143. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, Alitalo K. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor 3. *Science*, 1998, 282: 946-949.
144. Petrova TV, Karpanen T, Normén C, Mellor R, Tamakoshi T, Finegold D, Ferrell R, Kerjaschki D, Mortimer P, Ylä-Herttuala S, Miura N, Alitalo K.

- Defective valves and abnormal mural cell recruitment underlie lymphatic vascular failure in lymphedema distichiasis. *Nat Med*, 2004, 10: 974-981.
145. Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, Harvey N, Williams M, Dvorak AM, Dvorak HF, Oliver G, Detmar M. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J*, 2003, 22: 3546-3556.
 146. Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, Bréant C, Karkkainen MJ, Alitalo K, Eichmann A. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development*, 2002, 129: 4797-4806.
 147. Morisada T, Oike Y, Yamada Y, Urano T, Akao M, Kubota Y, Maekawa H, Kimura Y, Ohmura M, Miyamoto T, Nozawa S, Koh GY, Alitalo K, Suda T. Angiopoietin-1 promotes LYVE-1-positive lymphatic vessel formation. *Blood*, 2005, 105: 4649-4656.
 148. Vlahakis NE, Young BA, Atakilit A, Sheppard D.J. The lymphangiogenic vascular endothelial growth factors VEGF-C and -D are ligands for the integrin alpha9beta1. *Biol Chem*, 2005, 280: 4544-4552.
 149. Mebius RE. Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3: 292-303.
 150. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Breitman M, Alitalo K. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92:3566-3570.
 151. Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, Lawitts JA, Benjamin L, Tan X, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor

- induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med*, 2002, 196: 1497-506.
152. Hong YK, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Hirakawa S, Kunstfeld R, Brown LF, Bohlen P, Senger DR, Detmar M. VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins. *FASEB J*, 2004, 18: 1111-1113.
153. Björndahl M, Cao R, Nissen LJ, Clasper S, Johnson LA, Xue Y, Zhou Z, Jackson D, Hansen AJ, Cao Y. Insulin-like growth factors 1 and 2 induce lymphangiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102:15593-15598.
154. Tammela T, Saaristo A, Lohela M, Morisada T, Tornberg J, Norrmén C, Oike Y, Pajusola K, Thurston G, Suda T, Ylä-Herttuala S, Alitalo K. Angiopoietin-1 promotes lymphatic sprouting and hyperplasia. *Blood*, 2005, 105: 4642-4648.
155. Timoshenko AV, Chakraborty C, Wagner GF, Lala PK. COX-2-mediated stimulation of the lymphangiogenic factor VEGF-C in human breast cancer. *Br J Cancer*, 2006, 94: 1154-1163.
156. Skobe M, Hamberg LM, Hawighorst T, Schirner M, Wolf GL, Alitalo K, Detmar M. Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am J Pathol*, 2001, 159: 893-903.
157. Angeli V, Ginhoux F, Llodrà J, Quemeneur L, Frenette PS, Skobe M, Jessberger R, Merad M, Randolph GJ. B cell-driven lymphangiogenesis in inflamed lymph nodes enhances dendritic cell mobilization. *Immunity*, 2006, 24: 203-215.
158. Schoppmann SF, Birner P, Stöckl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, Kriehuber E, Nagy K, Alitalo K, Kerjaschki D. Tumor-associated macrophages express

- lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphoangiogenesis. *Am J Pathol*, 2002, 161: 947-956.
159. Hirakawa S, Brown LF, Kodama S, Paavonen K, Alitalo K, Detmar M. VEGF-C-induced lymphoangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. *Blood*, 2007, 109: 1010-1017.
160. Cursiefen C, Chen L, Borges LP, Jackson D, Cao J, Radziejewski C, D'Amore PA, Dana MR, Wiegand SJ, Streilein JW. VEGF-A stimulates lymphoangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *Clin Invest*, 2004, 113: 1040-1050.
161. Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ, Alitalo K. Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol*, 2004, 25: 387-395.
162. Su JL, Yang PC, Shih JY, Yang CY, Wei LH, Hsieh CY, Chou CH, Jeng YM, Wang MY, Chang KJ, Hung MC, Kuo ML. The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells. *Cancer Cell*, 2006, 9: 209-223
163. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, Choi NC, Mathisen D, Wain J, Mark EJ, Munn LL, Jain RK. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics *Science*, 2002, 296: 1883-1886.
164. Ji RC. Lymphatic endothelial cells, tumor lymphoangiogenesis and metastasis: New insights into intratumoral and peritumoral lymphatics. *Cancer Metastasis Rev*, 2006, 25:677-694.
165. Itoh H, Nakatsu M, Yoxtheimer LM, Uematsu H, Ohno Y, Hatabu H. Structural basis for pulmonary functional imaging *Eur J Radiol*, 2001, 37: 143-154.

166. Tanno S, Ohsaki Y, Nakanishi K, Toyoshima E, Kikuchi K. Human small cell lung cancer cells express functional VEGF receptors, VEGFR-2 and VEGFR-3. *Lung Cancer*, 2004, 46: 11-19.
167. Renyi-Vamos F, Tovari J, Fillinger J, Timar J, Paku S, Kenessey I, Ostoros G, Agocs L, Soltesz I, Dome B. Lymphoangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 7344-7353.
168. Tamura M, Oda M, Tsunozuka Y, Matsumoto I, Kawakami K, Ohta Y, Watanabe G. Chest CT and serum vascular endothelial growth factor-C level to diagnose lymph node metastasis in patients with primary non-small cell lung cancer *Chest*, 2004, 126: 325-326.
169. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos C, Gatter KC, Harris AL, Jackson DG. LYVE-1 immunohistochemical assessment of lymphoangiogenesis in endometrial and lung cancer *J Clin Pathol*, 2005, 58:202-206.
170. He Y, Rajantie I, Ilmonen M, Makinen T, Karkkainen MJ, Haiko P, Salven P, Alitalo K. Preexisting lymphatic endothelium but not endothelial progenitor cells are essential for tumor lymphoangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res*, 2004, 64: 3737-3740.
171. Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287: C572-579.
172. Salven P, Mustjoki S, Alitalo R, Alitalo K, Rafii S. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells *Blood*, 2003, 101: 168-172.

173. Religa P, Cao R, Bjorndahl M, Zhou Z, Zhu Z, Cao Y. Presence of bone marrow-derived circulating progenitor endothelial cells in the newly formed lymphatic vessels *Blood*, 2005, 106: 4184-4190.
174. Jiang S, Bailey AS, Goldman DC, Swain JR, Wong MH, Streeter PR, Fleming WH. Hematopoietic stem cells contribute to lymphatic endothelium. *PLoS ONE*, 2008, 3: e3812.
175. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008 *CA Cancer J Clin*, 2008, 58: 71-96.
176. Gridelli C, Rossi A, Maione P. Treatment of non-small-cell lung cancer: state of the art and development of new biologic agents. *Oncogene*, 2003, 22: 6629-6638.
177. Herbst RS, Onn A, Sandler A. Angiogenesis and lung cancer: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol*, 2005, 23:3243-3256.
178. Sandler AB, Johnson DH, Herbst RS. Anti-vascular endothelial growth factor monoclonals in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 4258s-4262s.
179. Pastorino U, Andreola S, Tagliabue E, Pezzella F, Incarbone M, Sozzi G, Buyse M, Menard S, Pierotti M, Rilke F. Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis. *J Clin Oncol*, 1997, 15: 2858-2865.
180. Apolinario RM, van der Valk P, de Jong JS, Deville W, van Ark-Otte J, Dingemans AM, van Mourik JC, Postmus PE, Pinedo HM, Giaccone G. Prognostic value of the expression of p53, bcl-2, and bax oncoproteins, and neovascularization in patients with radically resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 1997, 15: 2456-2466.

181. Chandrachud LM, Pendleton N, Chisholm DM, Horan MA, Schor AM. Relationship between vascularity, age and survival in non-small-cell lung cancer Br J Cancer, 1997, 76:1367-1375.
182. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, Beliën JA, de Waal RM, Van Marck E, Magnani E, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. Eur J Cancer, 2002, 38: 1564-1579.
183. Tímár J, Döme B, Fazekas K, Janovics A, Paku S. Angiogenesis-dependent diseases and angiogenesis therapy Pathol Oncol Res, 2001, 7: 85-94.
184. Davidoff AM, Ng CY, Brown P, Leary MA, Spurbeck WW, Zhou J, Horwitz E, Vanin EF, Nienhuis AW. Bone marrow-derived cells contribute to tumor neovasculature and, when modified to express an angiogenesis inhibitor, can restrict tumor growth in mice. Clin Cancer Res, 2001, 7: 2870-2879.
185. Bolontrade MF, Zhou RR, Kleinerman ES. Vasculogenesis Plays a Role in the Growth of Ewing's Sarcoma in Vivo. Clin Cancer Res, 2002, 8: 3622-3627.
186. Urbich C, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. J Mol Cell Cardiol, 2005, 39: 733-742.
187. Govindan R, Page N, Morgensztern D, Read W, Tierney R, Vlahiotis A, Spitznagel EL, Piccirillo J. Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. J Clin Oncol, 2006, 24: 4539-4544.

188. Simon GR, Turrisi A; Management of small cell lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). American College of Chest Physicians Chest, 2007, 132(3 Suppl):324S-339S.
189. Döme B, Hendrix MJ, Paku S, Tóvári J, Tímár J. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. Am J Pathol, 2007, 170: 1-15.
190. Achen MG, Mann GB, Stacker SA. Targeting lymphangiogenesis to prevent tumour metastasis Br J Cancer, 2006, 94: 1355-1360.
191. Van der Auwera I, Cao Y, Tille JC, Pepper MS, Jackson DG, Fox SB, Harris AL, Dirix LY, Vermeulen PB. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. Br J Cancer, 2006, 95: 1611-1625.
192. Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. FASEB J, 2002, 16: 922-934.
193. Kerjaschki D, Huttary N, Raab I, Regele H, Bojarski-Nagy K, Bartel G, Kröber SM, Greinix H, Rosenmaier A, Karlhofer F, Wick N, Mazal PR. Lymphatic endothelial progenitor cells contribute to de novo lymphangiogenesis in human renal transplants Nat Med, 2006, 12: 230-234.
194. Zhang H, Vakil V, Braunstein M, Smith EL, Maroney J, Chen L, Dai K, Berenson JR, Hussain MM, Klueppelberg U, Norin AJ, Akman HO, Özçelik T, Batuman OA. Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance Blood, 2005, 105:3286-3294.
195. Pircher A, Kähler CM, Skvortsov S, Dlaska M, Kawaguchi G, Schmid T, Gunsilius E, Hilbe W. Increased numbers of endothelial progenitor cells in peripheral blood and tumor specimens in non-small cell lung cancer: a

- methodological challenge and an ongoing debate on the clinical relevance *Oncol Rep*, 2008, 19:345-352.
196. Mountain: Revision in the international system for staging lung cancer. *Chest*, 1997, 111:1710-7.
 197. Stahel R, Ginsberg R, Havemann K, et al. Staging and prognostic factors in small cell lung cancer: a consensus report. *Lung Cancer*, 1989, 5:119-126.
 198. Schemper M, Smith TL. A note on quantifying follow-up in studies of failure time *Control Clin Trials*, 1996, 17: 343-346.
 199. Sussman LK, Upalakalin JN, Roberts MJ, Kocher O, Benjamin LE Blood markers for vasculogenesis increase with tumor progression in patients with breast carcinoma. *Cancer Biol Ther*, 2003, 2: 255-256.
 200. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G . Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*, 2005, 353: 999-1007.
 201. Fadini GP, Miorin M, Facco M, Bonamico S, Baesso I, Grego F, Menegolo M, de Kreutzenberg SV, Tiengo A, Agostini C, Avogaro A Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45:1449-1457.
 202. Adams V, Lenk K, Linke A, Lenz D, Erbs S, Sandri M, Tarnok A, Gielen S, Emmrich F, Schuler G, Hambrecht R. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24:684-690.
 203. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance *J Cell Mol Med*, 2004, 8: 498-508.

204. Eguchi M, Masuda H, Asahara T . Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis Clin Exp Nephrol, 2007, 11:18-25.
205. Cortelezzi A, Fracchiolla NS, Mazzeo LM, Silvestris I, Pomati M, Somalvico F, Bertolini F, Mancuso P, Pruneri GC, Gianelli U, Pasquini MC, Cortiana M, Deliliers GL. Endothelial precursors and mature endothelial cells are increased in the peripheral blood of myelodysplastic syndromes Leuk Limfóma, 2005, 46: 1345-1351.
206. Ellis LM. Bevacizumab. Nat Rev Drug Discov, 2005, Suppl: S8-9.
207. Schneider M, Tjwa M, Carmeliet P. A surrogate marker to monitor angoigenezis at last Cancer Cell, 2005, 7:3-4.
208. Miller JC, Pien HH, Sahani D, Sorensen AG, Thrall JH. Imaging angoigenezis: applications and potential for drug development. J Natl Cancer Inst, 2005, 97: 172-187.
209. Shaked Y, Emmenegger U, Man S, Cervi D, Bertolini F, Ben-David Y, Kerbel RS. Optimal biologic dose of metronomic chemotherapy regimens is associated with maximum antiangiogenic activity Blood, 2005, 106: 3058-3061.
210. Willett CG, Boucher Y, Duda DG, di Tomaso E, Munn LL, Tong RT, Kozin SV, Petit L, Jain RK, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Cohen KS, Scadden DT, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Shellito PC, Mino-Kenudson M, Lauwers GY. Surrogate markers for antiangiogenic therapy and dose-limiting toxicities for bevacizumab with radiation and chemotherapy: continued experience of a phase I trial in rectal cancer patients. J Clin Oncol, 2005, 23: 8136-8139.

211. Treat J. Incorporating novel agents with gemcitabine-based treatment of NSCLC Lung Cancer, 2005, 50 Suppl 1: S8-9.
212. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy Science, 2005, 307: 58-62.
213. Tong RT, Boucher Y, Kozin SV, Winkler F, Hicklin DJ, Jain RK. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. Cancer Res, 2004, 64: 3731-3736.
214. Rabascio C, Muratori E, Mancuso P, Calleri A, Raia V, Foutz T, Cinieri S, Veronesi G, Pruneri G, Lampertico P, Iavarone M, Martinelli G, Goldhirsch A, Bertolini F. Assessing tumor angiogenesis: increased circulating VE-cadherin RNA in patients with cancer indicates viability of circulating endothelial cells. Cancer Res, 2004, 64: 4373-4377.
215. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A et al. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. J. Clin Invest, 2000, 105: 71-77.
216. Decaussin M, Sartelet H, Robert C, Moro D, Claraz C, Brambilla C, Brambilla E. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival. J Pathol. 1999, 188: 369-77.
217. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. Cardiovasc Res, 2005, 65: 550-563.
218. O'Neill TJ 4th, Wamhoff BR, Owens GK, Skalak TC. Mobilization of bone marrow-derived cells enhances the angiogenic response to hypoxia without transdifferentiation into endothelial cells Circ Res, 2005, 97: 1027-1035.

219. Jackson DG. Lymphatic markers, tumour lymphoangiogenesis and lymph node metastasis *Cancer Treat Res*, 2007, 135: 39-53.
220. Sundar SS, Ganesan TS. Role of lymphoangiogenesis in cancer *J Clin Oncol*, 2007, 25:4298-4307.
221. Su JL, Yen CJ, Chen PS, Chuang SE, Hong CC, Kuo IH, Chen HY, Hung MC, Kuo ML. The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. *Br J Cancer*, 2007, 96: 541-545.
222. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphoangiogenesis in development and human disease. *Nature*, 2005, 438: 946–953.
223. Liew A, Barry F, O'Brien T. Endothelial progenitor cells: diagnostic and therapeutic considerations *Bioessays*, 2006, 28: 261-270.
224. Sedivy R, Beck-Mannagetta J, Haverkamp C, Battistutti W, Hönigschnabl S J. Expression of vascular endothelial growth factor-C correlates with the lymphatic microvessel density and the nodal status in oral squamous cell cancer. *Oral Pathol Med*, 2003, 32: 455-460.
225. Tsurusaki T, Kanda S, Sakai H, Kanetake H, Saito Y, Alitalo K, Koji T. Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *Br J Cancer*, 1999, 80: 309-313.
226. Kitadai Y, Amioka T, Haruma K, Tanaka S, Yoshihara M, Sumii K, Matsutani N, Yasui W, Chayama K. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in human esophageal squamous cell carcinomas *Int J Cancer*, 2001, 93: 662-666.

227. Schietroma C, Cianfarani F, Lacal PM, Odorisio T, Orecchia A, Kanitakis J, D'Atri S, Failla CM, Zambruno G. Vascular endothelial growth factor-C expression correlates with lymph node localization of human melanoma metastases. *Cancer*, 2003, 98: 789-797.
228. Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, Fushida S, Ninomiya I, Bandou E, Taniguchi K, Miwa K, Ohoyama S, Sugiyama K, Sasaki T. Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 1999, 5: 1823-1829.
229. Li Q, Dong X, Gu W, Qiu X, Wang E. Clinical significance of co-expression of VEGF-C and VEGFR-3 in non-small cell lung cancer *Chin Med J (Engl)*, 2003, 116: 727-730.
230. Swidzińska E, Ossolińska M, Naumnik W, Izycki T, Kucejko W, Chyczewska E. Circulating VEGF and its soluble receptor sVEGFR-1 in patients with lung cancer. *Pneumonol Alergol Pol*, 2004, 72: 389-394.
231. Kimura H, Kato H, Tanaka N, Inose T, Faried A, Sohda M, Nakajima M, Fukai Y, Miyazaki T, Masuda N, Manda R, Fukuchi M, Ojima H, Tsukada K, Kuwano H. Preoperative serum vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) levels predict recurrence in patients with esophageal cancer *Anticancer Res*, 2008, 28: 165-169.
232. Wang TB, Deng MH, Qiu WS, Dong WG. Association of serum vascular endothelial growth factor-C and lymphatic vessel density with lymph node metastasis and prognosis of patients with gastric cancer *World J Gastroenterol*, 2007, 13: 1794-1797.
233. Yu XM, Lo CY, Lam AK, Leung P, Luk JM. Serum vascular endothelial growth factor C correlates with lymph node metastases and high-risk tumor profiles in papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg*, 2008, 247: 483-489.

234. Vihinen PP, Hilli J, Vuoristo MS, Syrjänen KJ, Kähäri VM, Pyrhönen SO. Serum VEGF-C is associated with metastatic site in patients with malignant melanoma. *Acta Oncol*, 2007, 46: 678-684.
235. Tamura M, Ohta Y. Serum vascular endothelial growth factor-C level in patients with primary nonsmall cell lung carcinoma: a possible diagnostic tool for lymph node metastasis *Cancer*, 2003, 98: 1217-1222.
236. Wessels JT, Busse AC, Mahrt J, Dullin C, Grabbe E, Mueller GA. In vivo imaging in experimental preclinical tumor research-a review. *Cytometry A*, 2007, 71:542-549.
237. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, Beliën JA, de Waal RM, Van Marck E, Magnani E, Weidner N, Harris AL, Dirix LY, Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer*, 2002, 38: 1564-1579.
238. Ferrari N, Glod J, Lee J, Kobiler D, Fine HA. Bone marrow-derived, endothelial progenitor-like cells as angiogenesis-selective gene-targeting vectors. *Gene Ther*, 2003, 10: 647-656.
239. Wei J, Blum S, Unger M, Jarmy G, Lamparter M, Geishauser A, Vlastos GA, Chan G, Fischer KD, Rattat D, Debatin KM, Hatzopoulos AK, Beltinger C. Embryonic endothelial progenitor cells armed with a suicide gene target hypoxia-induced metastases after intravenous delivery. *Cancer Cell*, 2004, 5: 477-488.

Az értekezés tárgykörében megjelent saját közlemények bibliográfiai adatai

Az értekezés alapját képező közlemények:

1. **Bogos K.**, Renyi-Vamos F, Dobos J, Kenessey I, Magyar M, Tovari J, Timar J, Strausz J, Ostoros G, Klepetko W, Ankersmit HJ, Lang G, Hoda MA, Nierlich P, Dome B. High VEGFR-3 positive circulating lymphatic/vascular endothelial progenitor cell level is associated with poor prognosis in human small cell lung cancer. Clin Cancer Res, 2009, 1;15:1741-6.
2. Dome B, Timar J, Ladanyi A, Paku S, Renyi-Vamos F, Klepetko W, Lang G, Dome P, **Bogos K.**, Tovari J. Circulating endothelial cells, bone marrow-derived endothelial progenitor cells and proangiogenic haematopoietic cells in cancer: from biology to therapy. Crit Rev Oncol Hematol, 2009, 69:108-24.
3. Dome B, Timar J, Dobos J, Meszaros L, Raso E, Paku S, Kenessey I, Ostoros G, Magyar M, Ladanyi A, **Bogos K.**, Tovari J. Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. Cancer Res, 2006; 66:7341-7.

Egyéb közlemények :

1. **Bogos K.**, Renyi-Vamos F, Kovacs G, Tovari J, Dome B. Role of retinoic receptors in lung carcinogenesis. J Exp Clin Cancer Res, 2008; 27:18.
2. Derecskei K., Moldvay J., **Bogos K.**, Tímár J.: Protocol modifications influence the result of EGF receptor immunodetection by EGFR pharmDx™ in paraffin-embedded cancer tissues. Pathol. Oncol. Res. 2006, 12, 243-246.
3. **Bogos K.** A tüdődaganatos betegek fájdalomcsillapítása. Miért szenvednek még betegeink? Családorvosi Fórum 2006,11:2933
4. **Bogos K.**, Tóth K., Máthé A., COPD és infekció: egyre sokszínűbb összefüggés. Orvostovábbképző Szemle. 2006: Suppl,31-36.

5. Moldvay J, Jackel M, **Bogos K**, Soltész I, Agócs L, Kovács G, Schaff Z.
The role of TTF-1 in differentiating primary and metastatic lung adenocarcinomas.
Pathol Oncol Res. 2004,10,85-8.

6. **Bogos K**, Ostoros G. Tüdődaganatos betegek szupportív kezelése, Magy Onkol.
2000, 44, 227-233.

Könyvfejezet:

Bogos K., A tüdődaganatos betegek fájdalomcsillapítása .Tüdőrák a klinikai
gyakorlatban és a mellhártya mezoteliómája szerk.: Kovács G, Ostoros Gy., Szondy K.
Medicina könyvkiadó Rt. Budapest, 2006

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönetem fejezem ki Dr Döme Baláznak, témavezetőmnek, a lehetőségért, hogy a munkacsoportjában dolgozhattam, köszönöm a szakmai irányítását. Köszönettel tartozom Dr Kovács Gábornak, osztályvezetőmnek, aki megteremtette a munkám feltételeit, és aki folyamatosan, kitartásra biztatott, végig a munka során. Köszönet illeti Dr Moldvay Juditot és Dr Tímár Józsefet, akiktől szintén sok segítséget kaptam, hogy klinikusként elsajátíthattam a molekulárbiológiai módszerek alkalmazását. Köszönöm továbbá Dr Strausz Jánosnak, hogy intézetvezetőként lehetővé tette tudományos tevékenységemet az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet keretei között. Köszönetem fejezem ki közvetlen Kollégáimnak: Dr Ostoros Gyula, Dr Gergely-Farnos Erzsébet, Dr Mihály Éva, Dr Gyökeres Gyöngyi, Dr Tóth Krisztina, Dr Tóth Éva, Dr Máthé Olga, akik segítettek, támogattak, távollétemben biztosították a zavartalan betegellátást. Külön köszönöm az OKTPI Tumorbiológiai Osztály valamennyi munkatársának, továbbá a Pathológiai Osztály: Dr Soltész Ibolya és munkatársai és a Mellkassebészeti Osztály: Dr Csekeő Attila és munkatársai szakmai segítségét. Köszönöm továbbá Dr Kánitz Évának az értekezés megírásához és szerkesztéséhez nyújtott házi opponensi tanácsait.

Végezetül férjemnek, családomnak szeretném megköszönni szeretetüket, megértésüket és segítségüket, hogy támogattak céltom elérésében.

Sajnos, személyesen már nem fejezhetem ki köszönetem Dr Magyar Pál Professzor Úrnak, aki tragikus hirtelenséggel, a közelmúltban elhunyt. Professzor Úr sok segítséget nyújtott programvezetőként a Semmelweis Egyetem, Klinikai Orvostudományi Doktori Iskola, Tüdődaganatok alprogramban.