

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

Doktori tézisek

Dr. Bogos Krisztina

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
Pulmonológia program



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

Témavezető: Dr. Döme Balázs Ph.D.

Bíráló Bizottság elnöke: Prof. Dr. Kopper László

Bíráló Bizottság tagjai: Dr. Szilasi Mária Ph.D., intézetvezető
egyetemi docens
Prof. Dr. Kerényi Tibor egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Gálffy Gabriella Ph.D. egyetemi
adjunktus
Dr. Gyergyay Fruzsina Ph.D. főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Böszörményi Nagy György
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Herjavec Irén Ph.D., egyetemi
magántanár
Dr. Vadász Pál Ph.D., tanszékvezető
Dr. Kiss András Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2009

I. 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 estek 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 nyirokérféjlődés, endotheliális bimbózás útján fejlődik ki. A csontvelő eredetű endothel progenitor sejtek (EPC) és a később identifikált szintén csontvelő eredetű sejtpopuláció, melyeket lympho/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.

II. Célkitűzések

A nem kissejtes tüdőrák (NSCLC) a tüdődaganatok több mint 80%-a és ez okozza a legnagyobb számú daganatos halálozást. A sebészeti reszekció és az új terápiás kezelések ellenére számos NSCLC kiújul és végzetessé válik. Következésképp az NSCLC kezelése napjainkra a konvencionális kemoterápiás kezelésem túl molekuláris célzott terápiákkal egészül ki. Ezek egyik alapvető formája a tumor vaszkularizációért felelős specifikus citokinek gátlása. 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. Ennek megfelelően még kiforratlan a tumorok angiogén profiljának klinikai markerekkel történő jellemzése és az antiangiogén gyógyszerekre adott válasz monitorozása. Mostanáig a malignus tumorokról azt feltételezték, hogy vaszkulaturájukat angiogenezis útján szerzik, melynek során korábban meglévő kapillárisokból alakul ki új érhálózat. Újabb bizonyítékok szerint tumor érhálózat

vaszkulogenezis útján is kialakulhat, ezen folyamat során csontvelő eredetű endothel prekursor sejtek verbuválódnak és in situ differenciálódnak érett endothel sejtekké új ereket képezve. A legújabb tanulmányok is alátámasztják az EPC sejtek jelentőségét az ér újdonszövetképződésben és hogy az angiogén citokin stimulálta EPC sejtek a neovaszkularizáció kialakulásának segítő mechanizmusa. 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.

1.altéma: A keringő endotheliális progenitor sejtek azonosítása és klinikai szerepe nem kissejtes tüdőrákban (NSCLC)

Az volt a célkitűzésünk, hogy meghatározzuk az EPC sejtek szerepét nem kissejtes tüdőrákban (NSCLC).

A kissejtes tüdőrák (SCLC) agresszív malignus pulmonális betegség. Bár kemo-és sugárérzékeny daganat, mégis a SCLC igen ritkán gyógyítható betegség ezekkel a terápiás stratégiákkal. 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. Tekintettel arra, hogy mostanáig nem volt specifikus marker a nyirokér endothelium vizsgálatára, ismereteink a malignus tumorok nyirokrendszerére vonatkozóan messze elmaradtak a vaszkuláris rendszer mögött. A lymphangiogenezis szerepe a tumor növekedésben és disszeminációban kissejtes tüdődaganat esetén feltáratlan volt. A legújabb megfigyelések szerint a lymphangiogenezis a különböző humán daganatok progressziójának meghatározó mechanizmusának tűnik. A lymphangiogenezis mechanizmusának részeként nemrégiben azonosított csontvelő eredetű sejtek az úgynevezett nyirok/ vaszkuláris- endotheliális progenitor sejtek (LVEPCs) hozzájárulnak a *de novo* lymphangiogenezishez humán vese transzplantátumok esetében, és ami még fontosabb, experimentalis tumor modellekben. 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 észleltünk az érképződésben különböző humán malignus betegségekben.

2.altéma: A keringő lympho/vaszkuláris endotheliális progenitor sejtek szerepe kissejtes tüdőrákban (SCLC)

További célkitűzésünk volt az, hogy tanulmányozzuk kissejtes tüdőrákos (SCLC) betegeknél a keringő LVEPC sejtek szerepét a betegség progressziójában.

III. Módszerek

1.altéma : Az EPC sejtek vizsgálatához 53 nem kissejtes tüdőrákos (NSCLC) beteg perifériás vér mintáit vizsgáltuk. Kontroll csoportként 14 egészséges egyént vontunk be a vizsgálatba. 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.

2.altéma: Az LVEPC sejtek vizsgálatához 88 lokálisan kiterjedt stádiumú SCLC beteg 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 (gyári kit alkalmazásával).

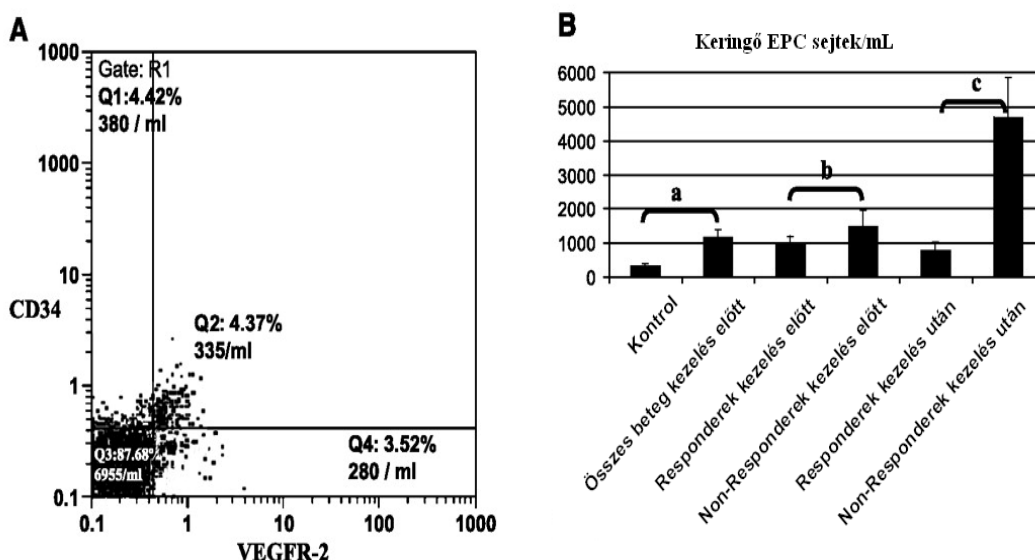
IV. Eredmények

1.altéma

Az EPC sejtek jellemzésére a nem kissejtes tüdőrák (NSCLC) vaszkulaturában 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 vaszkulaturát. 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. Az NSCLC tumor mintában főként a kis intratumorális kapillárisokban, ritkábban a nagyobb erek endotheliumához tapadva vagy a kapilláris falakban észleltünk EPC sejteket. 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 az NSCLC vaszkulatúrában észlelt EPC szám és a FACs-szal meghatározott keringő EPC sejtszám között (adatokat nem mutattuk be).

A keringő EPC szint a kezelés előtt emelkedett volt a NSCLC betegekben: az átlag érték $1,162.4 \pm 242.4$ (átlag \pm SE; $n=53$ ($p < 0.002$ vs egészséges egyének: 345 ± 54.8 /mL a (átlag \pm SE; $n=14$). (1.B. ábra) és a kezelés előtti magas keringő EPC szám rosszabb teljes túléléssel korrelált ($p < 0.001$) (1.C.ábra). Továbbá a jól reagáló (responder) alcsoportban a perifériás vérben a kezelés utáni EPC szint szignifikánsan alacsonyabb volt 776.1 ± 265 (átlag \pm SE; $n=36$) 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 a nonresponder betegeknél 93%-ban emelkedett a daganat ellenes kezelés alatt, valamennyi kezelt beteg esetében ($P < 0.001$). A kemoradioterápiában részesült betegeknél responder csoportnál 89%-ban csökkent a nonresponder csoportban 88%-ban emelkedett az EPC sejtszám a daganat ellenes kezelést követően ($P < 0.001$). (1.A-B. ábra)



1.A-B.ábra 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 non-responderek a kezelés után).

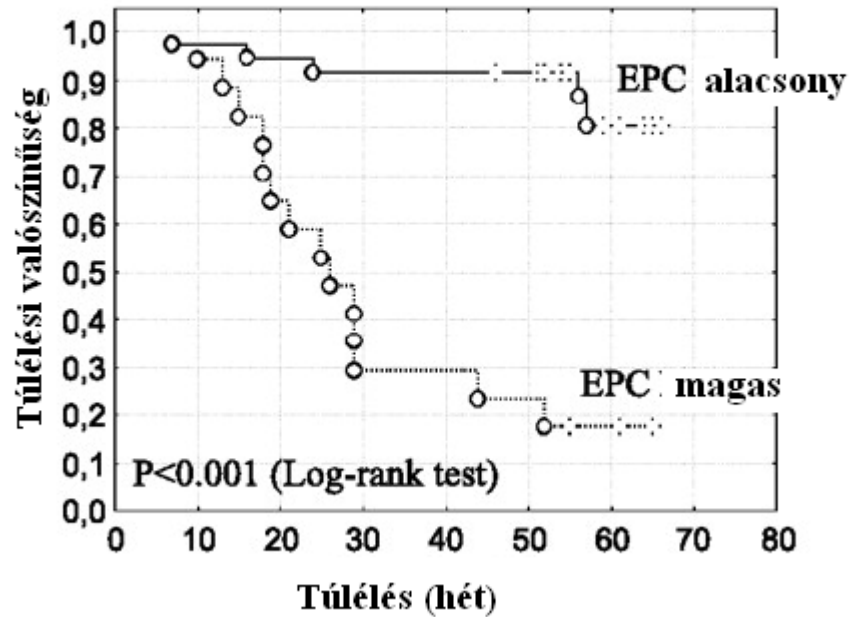
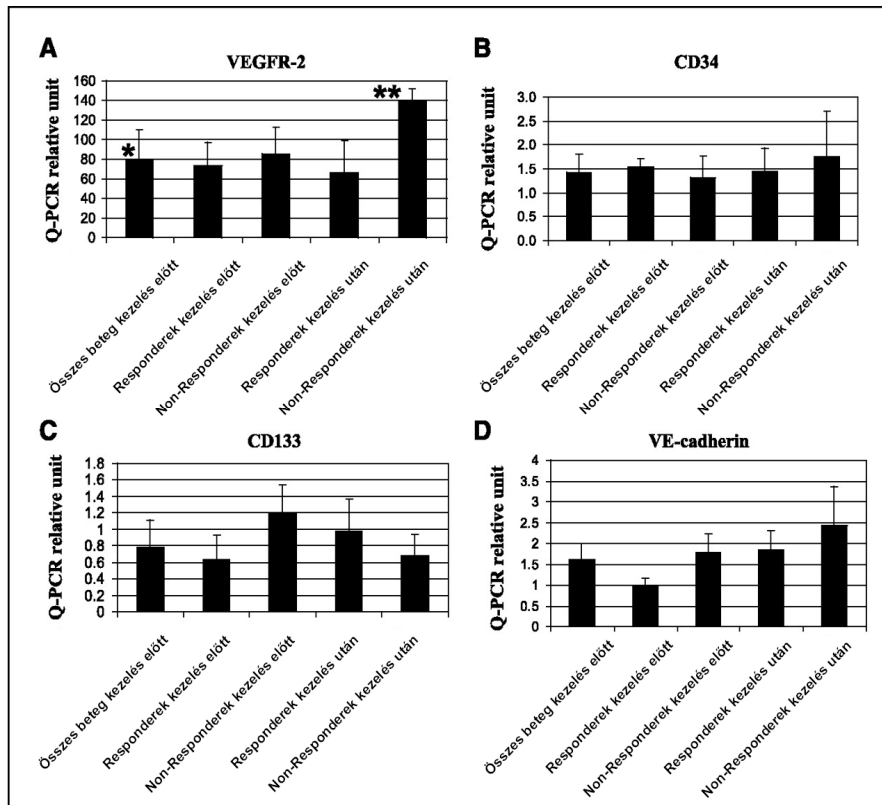
C

Fig.1. CKaplan- Meier görbe 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. Cut-off érték az alacsony és magas kezelés előtti sejtszintben: 1,000 EPC sejt/mL perifériás vér.

A kezelés előtti CD133, VE-cadherin és CD34 mRNS szint nem volt szignifikánsan magasabb NSCLC betegeinknél, míg a VEGFR2 expresszió 80-szor magasabb volt összehasonlítva az egészséges kontrollokhoz. A kezelés utáni VEGFR2 mRNS szint szignifikánsan magasabb volt a nonresponder betegeknél, összehasonlítva a kezelésre jól reagálókkal.(2. ábra)



2.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); **, $P < 0,05$

Azok a NSCL betegek akiknél 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. tábl.)

	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 carcinoma	23 (43.4%)	15 (41.7%)	8 (47.1%)	
Adenocarcinoma	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				
Chemotherápia	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.

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

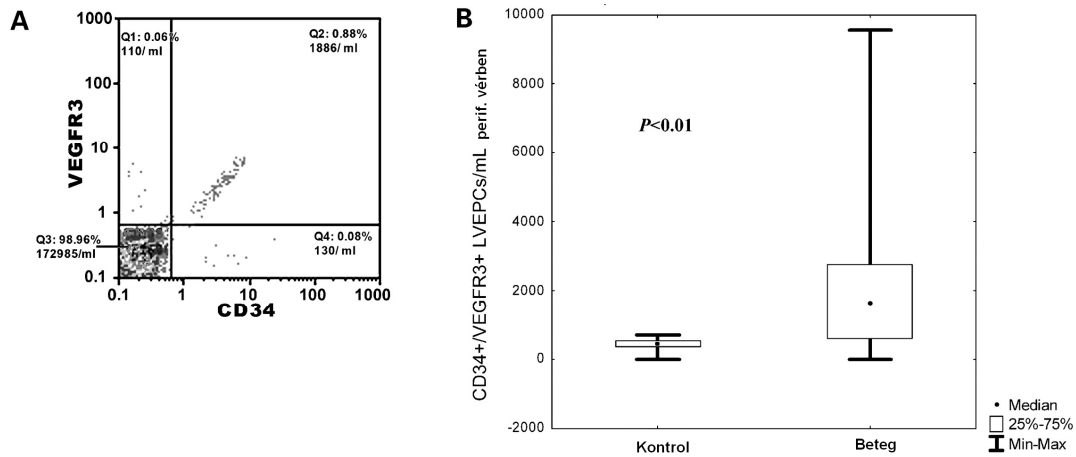
Az elvégzett multivariáns analízis (belefoglalva a standard prognosztikai variánsokat mint a tumor stádium, dohányzási szokás és hisztológiai típus) szintén azt mutatta, hogy a kezelés előtti keringő EPC sejtszám független volt az egyéb változóktól ($P < 0.001$; 2. tábl).

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 szérum szint (alacsony versus magas) ^b	1,221	(0,76-1,961)	0,408

2.tábl. NSCLC betegek prognosztikai faktorainak multivariáns analízise, a Cut-off érték az alacsony és magas kezelés előtti EPC szintben:1.000EPCsejt/mL perifériás vér. RR: Relatív rizikó, CI:konfidencia intervallum

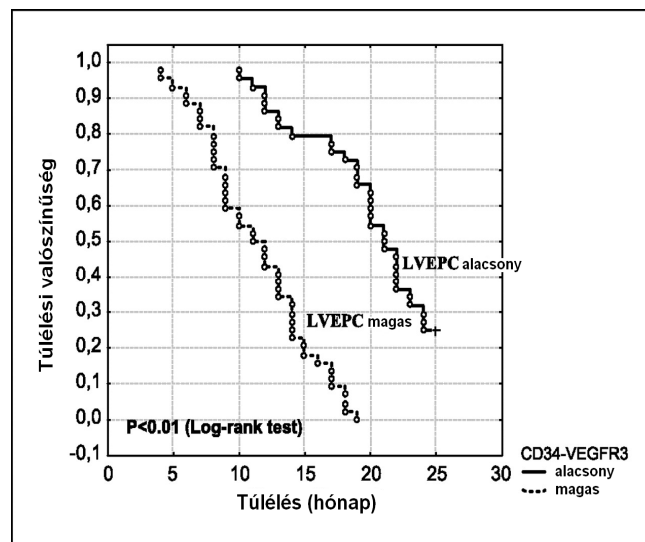
2.altéma

A CD34+/VEGFR3+ LVEPC szint szignifikánsan emelkedett volt a beteg csoportban (vs kontroll csoport $p < 0,01$). A kontroll csoportban a CD34+/VEGFR3 keringő LVEPC sejtek átlag értéke 455/mL volt (interquartilis tartomány: 370-530/mL). A kissejtes tüdőrákos betegeknél ez az érték szignifikánsan magasabb volt, az átlag érték 1625/mL (interquartilis tartomány: 600-2750/mL) (3.A-B. ábra) és szintén szignifikáns kapcsolat volt az LVEPC szám és a nyirokcsomó metasztázisok között ($p < 0,01$). (3.tábl.)



3.A-B.ábra. A. CD34+/VEGFR3+ LVEPCs Q1=CD34-/VEGFR3+, Q2=CD34+/VEGFR3+, Q3=CD34-/VEGFR3-, Q4=CD34+/VEGFR3- sejtek reprezentatív flow cytometriás analízise. B A keringő CD34+/VEGFR3+ LVEPC sejt szint a kontroll egyéneknél (n=32) és a SCLC betegeknél (n=88).

Azoknál a betegeknél akiknél alacsony kiindulási CD34+/VEGFR3+ szintet detektáltunk (átlag érték <math>< 1625/\text{mL}</math>) szignifikánsan hosszabb volt a túlélés mint a kezelés előtt mért magasabb keringő LVEPC sejtszám esetén (medián túlélési idő 20 versus 11.5 hónap; $P < 0.01$, 4. ábra). Az összes beteg medián túlélése 14 hónap volt. A kezelés előtti magas keringő LVEPC szint rossz túléléssel korrelált ($p < 0,01$). (4. ábra)



4. 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.

A VEGF-C szérumszint a betegeknél szignifikánsan emelkedett volt a kontroll egyénekéhez képest (4931±881 vs. 3992±462pg/mL, P<0.01), azonban szignifikáns kapcsolatot nem tudtunk kimutatni a kulcsfontosságú limfangiogén molekula a VEGF-C és a keringő CD34+/VEGFR3+ LVEPC szám között (P=0.74.). Ezen felül, amikor a VEGF-C szint emelkedett volt, betegeink egyéb klinikopathológiai faktoraival (életkor, dohányzási szokás, nem, és még érdekesebb, hogy a tumor és nyirokcsomó státusszal) nem volt szignifikáns összefüggés. (3. tábl.).

	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 (spirometria) (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}

3.tábl. ^a Fischer teszt; ^b Mann-Whitney teszt; ^c GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases) klasszifikáció (ref. 19); ^d közép±SD; ^e Student t-test; ^f Szignifikáns különbség a beteg és kontroll csoport között.

Az LVEPC számot betegeink klinikopathológiai faktoraival összefüggésben is kiértékeljük. Statisztikailag szignifikáns összefüggést észleltünk az LVEPC szint és a nyirokcsomó metasztázisok között (P<0.01) További klinikai paraméterekkel mint a kor, dohányzási szokás, életkor és a tumor stádium nem találtunk szignifikáns összefüggést. (4.tábl.)

	Betegek (%)	CD34+/VEGFR3+		P érték
		LVEPC		
		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

4.tábl. ^a Cut-off /medián érték; ^b Cut-off / átlag érték ; EP, cisplatin , etoposide; CEV, cyclophosphamide, epirubicin , vincristine

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, 5. tábl.) 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).

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 szérum szint (alacsony versus magas) ^b	1,221	(0,76-1,961)	0,408

5.tábl.^aCutoff érték/medián érték, ^b Cutoff érték/átlag érték,RR,relatív rizikó,CI,95% confidencia intervallum.

V. Megbeszélés

1.altéma

Eredményeinket összefoglalva megállapítható, hogy a NSCLC szövetmintákban az immunfluorescens módon jelölt mikroerekben az EPC sejtek inkorporációja ritka jelenség volt (9 esetben a 22-ből).

A keringő EPC szint a kezelés előtt szignifikánsan emelkedett volt a NSCLC betegekben az egészséges kontrollokhoz képest ($p < 0.002$) Eszerint a prospektív tanulmányunk új felfedezéssel is bírt, miszerint a CD34+VEGFR2+ EPC szintjének flow cytometriás mérése hasznos diagnosztikus módszer a NSCLC betegek prognózisának előjelzésében.

A kezelés előtti magas keringő EPC szám rosszabb teljes túléléssel korrelált ($p < 0.001$). 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 a NSCLC betegeknél akiknél magasabb kezelés előtti EPC sejtszámot találtunk, mint azoknál akiknél ez az érték alacsonyabb volt.

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. Ez azt jelentheti, hogy a perifériás vérben

flow cytometriával detektálható EPC sejtszám a humán NSCLC klinikai viselkedésével korrelál.

A kezelés előtti CD133, VE-cadherin és CD34 mRNS szint nem volt szignifikánsan magasabb a NSCLC betegeinknél, míg a VEGFR2 expresszió 80-szor emelkedettebb volt.

A kezelés utáni VEGFR2 mRNS szint szignifikánsan magasabb volt a nonresponder betegeknél, összehasonlítva a kezelésre jól reagálókkal.

2.altéma

A CD34+/VEGFR3+ LVEPC sejtek szintje emelkedett a SCLC betegeknél, összehasonlítva a kontroll csoporttal. 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. A „magas” kezelés előtti keringő LVEPC szám rosszabb túléléssel korrelált.

Ennek alapján megállapítható, hogy a flow cytometriával a perifériás vérből mért LVEPC sejtszám korrelál a humán SCLC klinikai viselkedésével.

Szignifikáns összefüggés volt megfigyelhető a LVEPCs szám és a nyirokcsomó metasztázis között, mely alapján feltételezhető ezeknek a sejteknek a potenciális szerepe a lymphangiogenesis folyamatában

Emelkedett VEGFC koncentrációt észleltünk a SCLC betegeknél a kontroll csoporthoz képest, azonban nem volt szignifikáns kapcsolat a VEGF-C szérumszint és a keringő LVEPC szám között. Továbbá nem találtunk összefüggést a szérumszint és a betegek túlélése között. Nem volt különbség a betegcsoportok különböző klinikopathológiai alcsoportjaiban sem. Nem láttunk különbséget a VEGF-C szintet illetően az N0-1 vs. N2-3 betegség stádiumban. Ezek a megfigyelések megegyeznek egy korábbi tanulmányban észleltekkal SCLC betegeknél mért perifériás vér VEGF-C szint esetén.

VI. Következtetések

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 a NSCLC betegeknél, következésképp a magas kezelés előtti 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.

Munkánkban szintén elsőként mutatjuk be, hogy a kissejtes tüdőrákos betegek perifériás vérében keringő CD34+/VEGFR3+ LVEPC sejtszám szignifikánsan emelkedett a tumor mentes kontroll egyénekével összehasonlítva és ezen 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.

A keringő endotheliális progenitor sejtek prognosztikus értékkel bírnak. Ugyanakkor az antivaszkuláris célzott terápiák hatékonyságának biomarkereivé válhatnak a jövőben .

További vizsgálatok szükségesek, az EPC és LVEPC sejtek alkalmazásának megismerésére az NSCLC és SCLC célzott molekuláris kezelésére terápiás gének, toxinok vagy antiangiogén szerek szállítása révén.

VII. 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 Patológiai 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 céloom 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.

VIII. 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., **Bogós 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. **Bogós K.** A tüdődaganatos betegek fájdalomcsillapítása. Miért szenvednek még betegeink? Családorvosi Fórum 2006,11:2933

4. **Bogós K.**, Tóth K., Máthé A., COPD és infekció: egyre sokszínűbb összefüggés. Orvostovábbképző Szemle. 2006: Suppl,31-36.

5. Moldvay J, Jackel M, **Bogós 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. **Bogós K.**, Ostoros G. Tüdődaganatos betegek szupportív kezelése, Magy Onkol. 2000, 44, 227-233.

Könyvfejezet:

Bogós 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