

Rosszindulatú daganatok ereződésének mintázata és molekuláris mechanizmusa

Bevezetés

A daganat-indukált angiogenezisről alkotott kép az elmúlt egy évtizedben jelentősen fejlődött és mára világossá vált hogy a kezdeti elképzelésekkel szemben nem egyszerűen csak a neoangiogenesis bimbózási formáját jelenti bár ez a leggyakoribb. (1,2) Magának a bimbózásnak a patomechanizmusáról is egyre többet tudunk és a kezdeti elég egysíkú molekuláris kép (VEGF indukált VEGFR2-n keresztüli endoteliális mitogenezis) jelentősen finomodott és részletgazdagabbá vált. A mai elfogadott nézet szerint a daganat-indukált angiogenezisben a VEGF izoformák mellett az FGF, ANG1/ANG2, NOTCH és kemokinek is fontos szerepet játszanak. Ennek megfelelően a VEGFR variánsok mellett az FGFR-ok, TIE, WNT receptorok és az ephrinek is fontos szerepet kapnak. (3,4) A posztnatális vaszkulogenezis szerepének jelentősége még mindig kérdéses és funkcionális szerepe helyett inkább „angiogenesis marker” szerepe domborodik ki ugyanakkor elismerve azt, hogy ezen endotél prekursorok esetében a sejtfelszíni receptorok egy másik csoportja tűnik kulcsfontosságúnak (KIT, Flt3). (5,6) Az érinorporáció daganatereződést előmozdító szerepe egyre inkább bizonyítást nyert melynek molekuláris mechanizmusáról azonban még nem elég részletesek az adatok a TIE2/ANG2 szerepén kívül. Hasonló a helyzet az un. glomeruloid angiogenesis esetében is: a jelenség ismert, de mechanizmusa nem világos. A daganatok un. vaszkulogén mimikri jelensége (a daganatos erekkel történő sajátos kooperáció) egyre több daganatban került felismerésre ugyanakkor molekuláris mechanizmusáról nincsenek újabb adatok, csak az EphA2 és FAK kinázok szerepe ismert. Másrészt a daganat-összejtek megismerése és kutatása során nyilvánvalóvá vált hogy ezek a sejtek plaszticitásuk miatt endotél irányba is differenciálódhatnak és a daganat saját sejtjeiből képes (lehet) ereket generálni. Hogy ez a jelenség is a vaszkulogén mimikri része vagy attól független még nem eldöntött. Végül, de nem utolsó sorban ismert még az un. intuszuszeptív angiogenesis (vagy ereződési forma) ami gyakorlatilag endotélsejt osztódás nélkül képes már meglévő daganatereket megsokszorozni. Erről a formáról a leggyérebbek az adatok és főleg molekuláris mechanizmus nem ismert.

Előző kutatások összefoglalása

A tumor-asszociált endotélsejt fenotípusa: Vizsgálataink kimutatták, hogy ezek az endotélsejtek CD44v3-at expresszálnak sejtfelszínükön (7) és gyakran megőrzik csontvelői „összejt-markerüket” a WT1 expressziót.(8) Másrészt a daganatsejtek endoteliális fenotípusának szempontjából fontos lehet hogy kimutattuk melanóma esetében a CD34, endothelin B és prostaciklin szintáz expressziót ami része lehet a vaszkulogén mimikri jelenségének. (9) Vizsgálataink kimutatták, hogy az EPO potens angiogén faktor és hatását a daganatos erekre is kifejti ugyanakkor megnövelve azok területét is és segítve a daganatellenes kemoterápiás szerek kijutását.(10)

A különböző daganatféleségek vaszkularizációs stratégiáinak elemzése során pontosítottuk az endotélbimbózás révén történő angiogenesis mechanizmusát ami mára elfogadottá vált széles körben. Ugyanakkor leírtunk egy új ereződési módot a májáltétekben ami egy endotélproliferáció-domináns formának tekinthető. Májáltétekben azonban megfigyelhető egy másik szokatlan forma is ami a sinusoidok kapillarizációjával történik. (11) Agyi áltétekben a glomeruloid angiogenesis/vaszkularizáció passzív, endotélproliferáció-nélküli formáját írtuk le.(12) NSCLC tüdőrák esetében igazoltuk a posztnatális vaszkularizációs mechanizmus részvételét a daganat érellátásában illetve a keringő endotélprekursorok prognosztikus szerepét.(13) Szintén bemutattuk, hogy az NSCLC-nek két formája van, az angiogén (neoangiogenetikusan) és az érinorporációs forma.(14) Az előbbi daganatokra igen prominens nyirokéreképítő képesség is jellemző.

A daganat érdenzitás patológia/klinikai jelentőségét több daganatféleségben elemeztük. Melanómák esetében, miután azok érinkoprorációval éreződnek,(15) a denzitásnak ilyen szempontból nincsen jelentősége. Igazoltuk, hogy a veserák a legerősebben vaszkularizált emberi daganat (érdaganatoktól eltekintve).(16) Bemutattuk, hogy emlőrák esetében az angiogén képesség csontáttétekben fokozódik, különösen kezeletlen esetekben.(17) Fejnyaki laphámrákokban a sugárterápia hatásosságának jó prediktora volt a daganat ereinek számbeli csökkenése. (18)

Bár ismereteink a daganatos angiogenezisről jelentősen gyarapodtak, számos égető kérdés megválaszolásra várt, melyek közül különböző okokból az alábbiakat emeltük ki 2007-ben:

1. *A primer tumor és szervi áttéteinek éreződése*
2. *Nyirokcsomóáttétek éreződése*
3. *Különféle endoteliális prekursorok elemzése daganatos betegekben*
4. *Angiogén citokinek és tirozin kináz gátlók hatásának elemzése kísérletes daganatokban és daganatos betegekben*

Eredmények

Primer tumor és szervi áttéteinek éreződése

Coloncarcinoma vaszkularizációja

Vizsgáltuk három coloncarcinóma (egér-c38 és humán HT25 és HT29) ér és kötőszöveti szerkezetét különböző (egér) szövetkörnyezetben. Meglepő hasonlóságot találtunk a stróma szerkezetében májáttétben, orthotop bélfalban, illetve szubkután szövetben. A tumorok stromális oszlopaiban centrálisan elhelyezkedő ér található melyeken nincs pericyta borítás. A kötőszövetes oszlopokat a tumor bazális membránja határolta és belsejüket simaizom aktin+ sejtek és kollagén I töltötte ki. Eltérő volt a stróma szerkezete a daganatsejtek agyszövetben történő növekedése során: hiányzott a kollagén I, ugyanakkor az erek pericyta borítása megtartott volt.

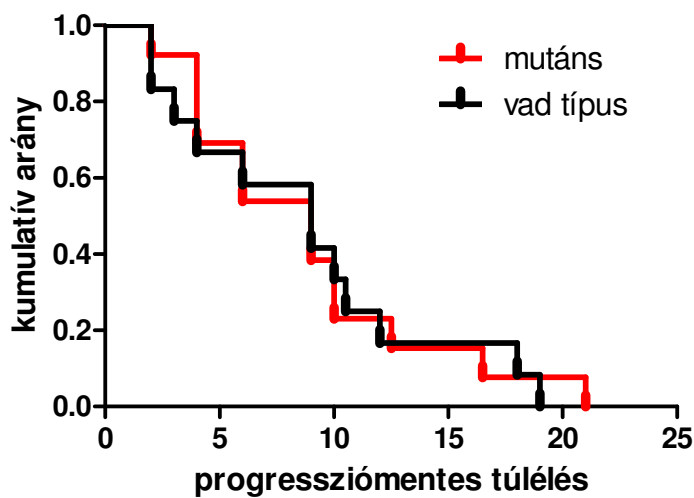
Vizsgáltuk a c38 colon- és 3LL-HH tüdő karcinóma, valamint A2058 humán melanóma érrendszerét májmetasztázisaikban. Mindhárom tumorvonal metastázisai döntően artériás ellátásúnak bizonyultak 2-2,5 mm-es méret felett, melyeket általában egy hilus felől a metastázisba belépő centrálisan elhelyezkedő tágult artéria táplált. Az endotél és simaizom sejtek proliferációs rátája megemelkedett, ami magyarázhatja a metastázisba vezető artéria tágulatát. A két egértumor esetében nem találtunk eltérést az arteriális, illetve portális ellátású metastázisok proliferációjában. **(Isd megjelent dolgozat:19)**

Megfigyeléseink szerint egerekben növekvő szubkután emberi tumorok esetében az angiogenezis fő formája az intussusceptív angiogenezis (érosztódás). Az elfogadott mechanizmus szerint a pillar képződés első lépése az érlumen szemközi falainak benyomódása, mely az endothelsejtek érintkezéséhez illetve később a sejtkapcsoló struktúrák reorganizációjához vezet, és az erek falát a perivaszkuláris sejtek nyomják be. Megfigyeléseink szerint colon rákokban bár a venulák lumenében úgynevezett oszlopok (pillar) voltak jelen, ugyanakkor kezdeti stádiumban ezek az oszlopok nem tartalmaztak kötőszöveti sejteket illetve pericitákat, hanem kollagén kötegből álltak, melyet endotélsejtek borítottak. Az endotélsejtek a kollagén-rostokat adhézios plakkokkal rögzítették, melyekben $\alpha 1$ integrin illetve sejtes oldalon vinculin és aktin rostok voltak kimutathatóak. Elképzelésünk szerint ezek az endotél hidak képesek a kötőszöveti kollagén kötegeket az érlumenen áthúzni mivel az oszlopokban található kollagén kötegek mérete hasonló a kötőszövetben található kötegekéhez. Ultrastrukturális vizsgálatok nem mutattak ki bazális membránt az endotélsejtek és a kollagén köteg között, az endotélsejtek közvetlenül tapadtak a kollagén rostokhoz. Ezzel

a folyamat új formáját írtuk le, mint inverz bimbózás: reverse sprouting (**lsd. megjelent dolgozat:20**)

35 májáttétes vastagbélrákos beteg esetében vizsgáltuk, hogy az áttétek jellegzetes genetikai hibája, a K-RAS-gén mutációja, befolyásolja-e a daganat anti-VEGF antitest-terápiára adott válaszát. Az áttétek nagyobb része K-RAS mutáns volt (21/35, 60%). Log-rank analízis segítségével megállapítható volt, hogy a KRAS-vad és mutáns daganatos betegek anti-angiogén kezelése utáni progresszió-mentes túlélés hasonló (8.7 ± 5.7 és 9.2 ± 5.5 hónap), ami a RAS-független angiogén fenotípusra utal.

1. ábra. Vastagbélrákos betegek progresszió-mentes túlélése anti-VEGF terápia után a KRAS státusz függvényében.



Primer agydaganatok és agyi áttétek vaszkularizációja illetve angiogén fenotípusa

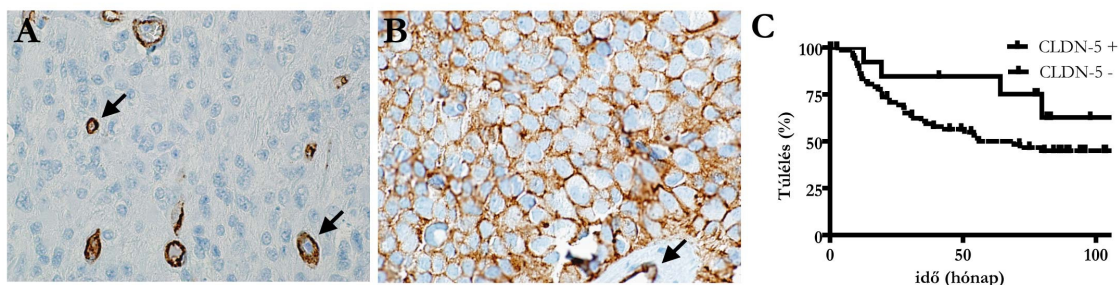
A gyermekkori daganatok 30%-át a központi idegrendszeri tumorok képezik és etiológiájuk többnyire ismeretlen. Az utóbbi években lehetőség nyílt egyrészt az érképződés másrészt a tirozinkináz receptorok molekuláris szintű célzott gátlására más daganatok esetében. Éppen ezért vizsgálataink során 17 astrocytoma, 16 medulloblastoma, és 14 ependymoma gyermekkori daganatban elvégeztük az érképződés vizsgálatát endotheliális markerek (CD34, SMA és claudin-5 immunhisztokémia) segítségével, valamint megvizsgáltuk az érképződésben szerepet játszó TK receptorok szerepét (c-KIT, PDGFR). Számos TK receptor kifejeződését nem csak a daganat érhálózatában, de a daganatos sejtekben is megfigyeltük, amely felveti ezen TK receptorok gátlószereinek alkalmazást, amely mind az érképződést, mind a daganatsejtek növekedését közvetlenül is befolyásolhatja.

1. táblázat. Gyermekkori agydaganatok TK profilja. Virág J, Tímár J, Hegedűs B, Garami M: Tyrosine kinase receptors in pediatric brain tumors. 19th Annual Meeting of the European Society of Pediatric Clinical Research, Bratislava, 2010.

Receptor	Sejttípus	Ependymoma (15)	Astrocytoma (18)	Medulloblastoma (13)
c-Kit	Endothél	66% (10)	55% (10)	56% (7)
	Tumorsejt	45% (7)	45% (8)	56% (7)
PDGFRα	Endothél	87% (13)	83% (15)	92% (12)
	Tumorsejt	72% (11)	66% (12)	62% (8)
PDGFRβ	Endothél	20% (3)	11% (2)	31% (4)
	Tumorsejt	0 % (0)	5% (1)	8% (1)

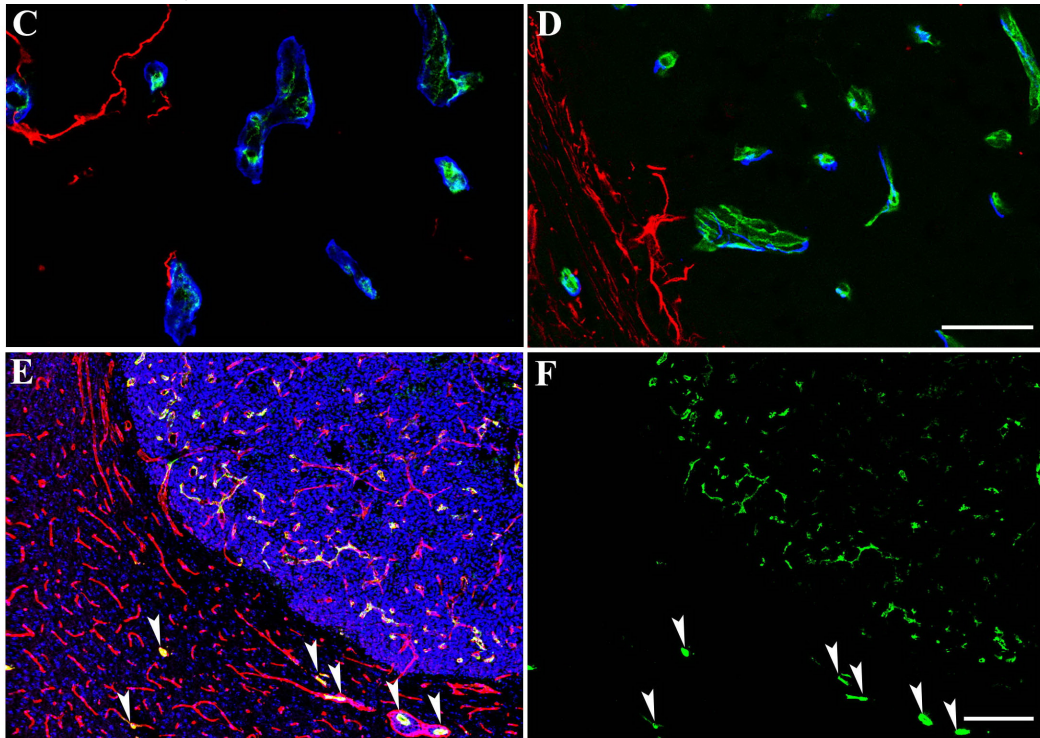
Vizsgálataink során egyes szupratentoriális ependymomákban a daganatsejteken is megfigyeltük a claudin-5 fehérje expresszióját (2. ábra, B), amely specifikus endotélium markerként ismert (2. ábra, A). Ebbe a vizsgálatba további gyermekkori ependymomákat is bevontunk és így 89 daganat immunhisztokémiai és túlélési adatait tanulmányoztuk. A klinikai paraméterek összehasonlító elemzése során kiderült, hogy a claudin-5-pozitív ependymomás betegek jobb daganatspecifikus túlélést mutatnak (2. ábra C). A claudin-5 daganatsejteken történő kifejeződése arra is utalhat, hogy az ependymoma sejtek képesek lehetnek egyfajta molekuláris vaszkuláris mimikrire, amely alternatív érképződési mechanizmus alapja lehet ezen daganatokban.

2.ábra. CLDN-5 fehérje megjelenése gyermekkori ependymomákban és klinikai jelentősége. Virág J, Karádi Z, Baksa G, Kiss A, Tímár J, Schaff Zs, Garami M, Hegedűs B: Region specific expression of adhesion molecules in ependyma and pediatric ependymomas with prognostic value. *Genes and Cancer* 2009, 26th Annual Molecular Biology of Cancer Congress, Warwick, 2009



Négy hámeredetű és egy mezenchymalis daganat agyi áttéteinek vaszkularizációs mechanizmusát elemeztük morfológiai módszerekkel. Egyik daganat esetében sem lehetett megfigyelni az áttétet környező szövetben neoangiogenezist/érbimbózást: a daganatok érbekebelezés útján alakították ki érellátásukat. Bár az érdenzitás lecsökkent a daganatokban, az erek átmérője megemelkedett a peritumorális erekhez képest. Az intratumorális érdenzitás és az endotélsejtek proliferatív aktivitása között inverz kapcsolatot találtunk. Az inkorporálódott erek esetében az astrocytákat daganatsejtek helyettesítették támasztószövetként egy idő múlva. Az emberi fibrosarcoma áttét esetében az intuszuszeptív érképzésre utaló morfológiai jeleket találtunk. Az érbimbózás jelenségét agyi sérülések utáni regeneráció során sem észleltük (daganatsejtek hiányában).

3. ábra. Kisérletes áttétek ereződése.



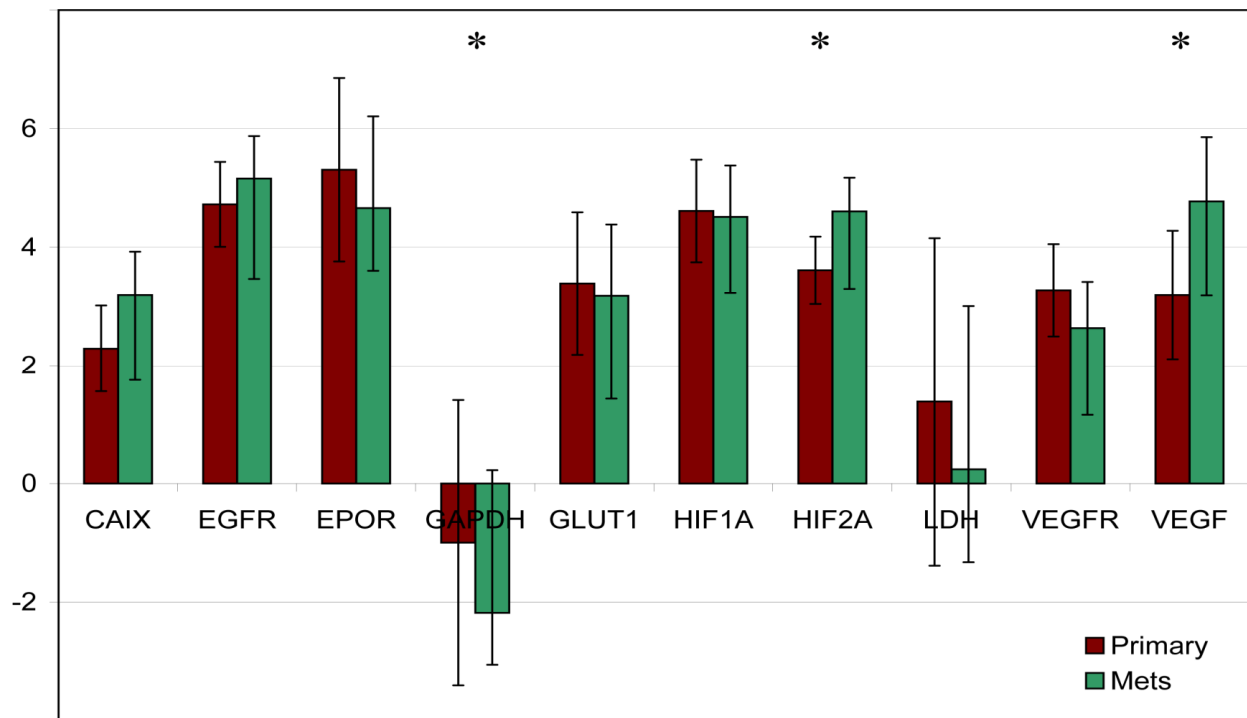
C. H1650 emberi tüdőrákgyi áttéte. GFAP-piros, CD31-zöld, laminin-kék. Az áttétben számos bazálmembránnal borított inkorporált ér. D. HT1080fibroszarkóma agyi áttéte: CD31-zöld, GFAP-vörös, desmin-kék. Az inkorporált ereken ép a pericita borítás. E-F: HT1080 fibroszarkóma áttét. SMA-zöld pericita marker, sejtmag-kék, laminin-vörös. Az inkorporált erek pericitái SMA-t fejeznek ki, szemben a környező agyszövet kapillárisaival, ahol csak az arteriólák pozitívak erre a markerre.

(J Neuropathol Exp Neurol elbírálás alatt)

HIF-szabályozott gének expressziója emberi veserákban és csontáttéteiben

Vizsgálatunkban a HIF1a és HIF2a, illetve az általuk szabályozott sejtanyagcsere-folyamatokat reprezentáló gének és kifejezett fehérjetermékük expresszióját vizsgáltuk, és prognosztikus képességüket mértük fel. 60 nem recidíváló vesesejtes daganat (NM-RCC) és 65 metasztatizáló (M-RCC) veserák és párhuzamos csontáttét (CSM) paraffinos mintáján. A HIF1a ($p=0.001$), HIF2a ($p=0.001$) mellett a HIF-regulált gének közül az áttétképző veserákban csak a VEGFR2 ($p=0.002$) mutatott fokozott expressziót RNS-szinten. Fehérje szinten ezek közül csak a HIF1a ($p<0.001$) és a VEGFR2 ($p=0.010$) fokozódott. Másrészt azonban az GLUT1 ($p=0.001$), GAPDH ($p=0.001$), CAIX ($p<0.001$) fehérjék is megemelkedett szintet mutattak, amelyek közül az GLUT1 és GAPDH új megfigyelés. A veserákok csontáttéteiben a HIF2a ($p=0,034$) és VEGF ($p=0.001$) és CAIX ($p=0.03$) expresszió tovább fokozódott míg a GAPDH ($p=0.036$) szint lecsökkent.

4. ábra. HIF-jelpálya géneinek expressziója primer és csontáttétes veserákban (mRNS)

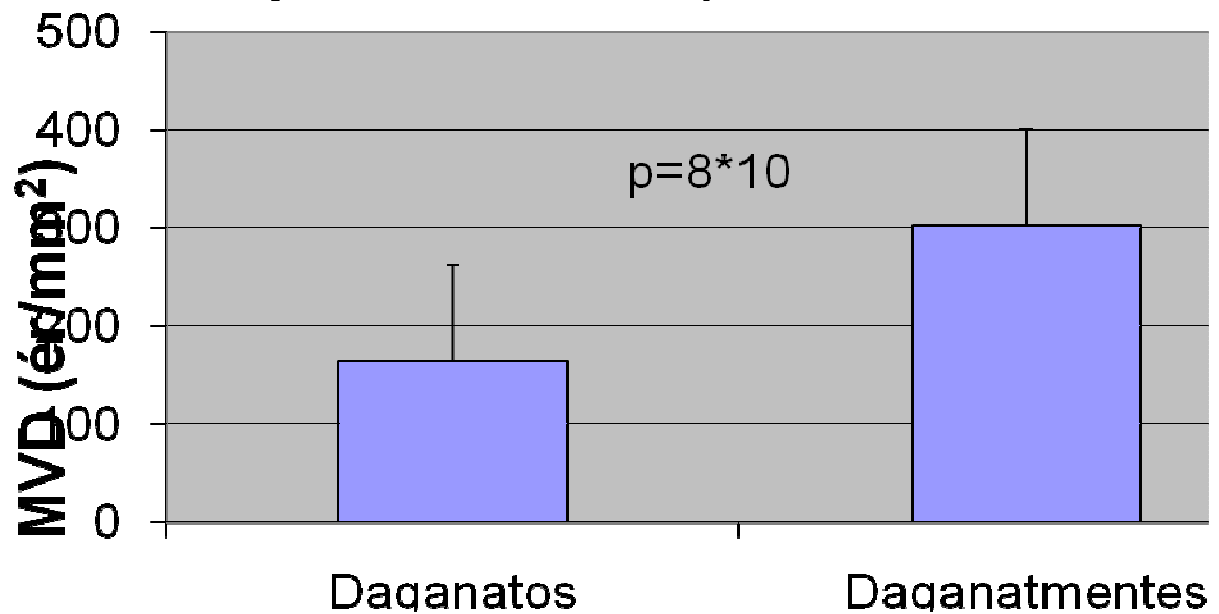


Fontos megfigyelésünk volt továbbá, hogy a csontáttétekben az EGFR fehérje ugyan csökkent szinten volt jelen azonban foszforilációja szignifikánsan fokozódott és ez a p1186-os autofoszforilációs helyen történt ami a lipidkináz jelút aktiválásáért felelős.

Nyirokcsomó áttétek ereződése

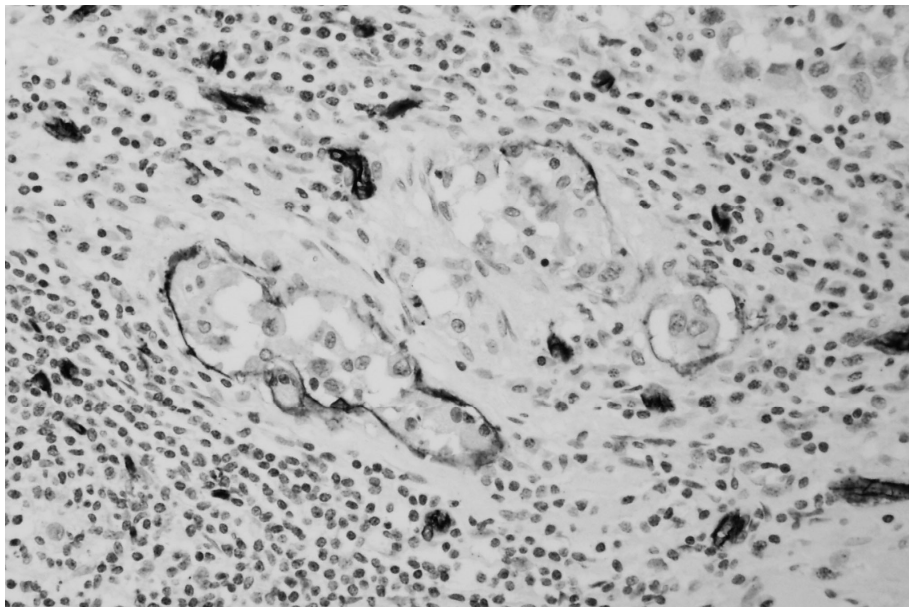
Patológiailag és daganatbiológiailag eldöntetlen az a kérdés hogy a nyirokcsomó áttét forrása lehet-e szisztémás keringésben történő áttétképzésnek szolid daganatok esetében. Ennek vizsgálatára 58 emlőrákos esetet vizsgáltunk, melyek nagyobb részében axilláris nyirokcsomóáttétet találtak a műtétnél (38) míg a többi esetben ez hiányzott. A nyirokcsomókban CD34 immunreakcióval jelöltük meg a vérereket és két jelenséget elemeztünk: vajon az áttétes illetve nem áttétes nyirokszövetben változik-e a kisérdenzitás illetve meg lehet-e figyelni un. vaszkuláris inváziót ami a primer tumorban igen erős kedvezőtlen prognosztikai tényező és a daganatsejtek szisztémás keringésbe jutásának egyik markere. A morfometriai elemzés arra a meglepő eredményre jutott, hogy az emlőrák primer tumorának regionális nyirokcsomóiban szignifikánsan magasabb az érdenzitás akkor ha nincsen daganatáttét.

5. ábra. Kisérdenzitás emlőrákos betegek axilláris nyirokcsomóiban az áttétek függvényében.



Ugyanakkor megállapítottuk, hogy a nyirokcsomó áttétekben a daganatszövetben igen jelentős a vérerdensítés és szemben a primer tumorban szokásossal, peritumorálisan jóval alacsonyabb. Az anyagban az is látható volt, hogy a nyirokérinvázió jelensége is kimutatható. Ennél sokkal fontosabb az a megfigyelésünk, hogy a vizsgált 38 áttétes nyirokcsomó 61.1%-ban (több mint felében) egyértelmű daganat-intravazáció azaz vaszkuláris invázió volt kimutatható.

6. ábra. Daganatsejt intravazáció áttétes nyirokcsomóban emlőrák esetén. VÉRÉR: CD34+.



Különbféle endoteliális prekursorok elemzése daganatos betegekben

88 alacsony stádiumú kissejtes tüdőrákos beteg és 32 egészséges donor esetében végeztük el a limfovaskuláris prekursorsejtek meghatározását (LVEPC) áramlási citometriával CD34/VEGFR3 markerekkel és mértük egyúttal a VEGF-C szintet is. Megállapítottuk, hogy az LVEPC szint a daganatos betegekben szignifikánsan emelkedett.

Továbbmenve, szignifikánsan magasabb LVEPC szintet észleltünk a nyirokcsomó áttétes betegek esetében az ilyen áttéttel nem rendelkezőkhöz képest is. A magas kezdeti LVEPC szint a daganatos betegekben kedvezőtlen prognosztikus markernek bizonyult a túlélés szempontjából. Elemzésünk során szignifikánsan magasabb VEGF-C szintet tapasztaltunk a daganatos betegekben, de ez nem függött össze a LVEPC szinttel illetve egyéb klinikopatológiai jellemzőkkel. **(Isd. megjelent dolgozat:21)**

Fej-nyaki-, emlőrákos, illetve melanómás betegek perifériás vérmintáiban flow cytometriával határoztuk meg a keringő CD133+/VEGFR3+ (korai-LVEPC) és CD34+/VEGFR3+ late-LVEPC) lymphatikus/vaszkuláris endothel progenitor szinteket, majd hasonlítottuk össze ezeket az egészséges kontroll személyek megfelelő adataival. Míg a CD133+/VEGFR3+ sejtek esetében nem mutatkozott különbség, a CD34+/VEGFR3+ sejtpopuláció szignifikánsan magasabb számban volt jelen a melanómás és emlődaganatos betegek perifériás vérében a kontroll populációhoz viszonyítva. Bár hasonló tendencia a fej-nyak daganatos betegek esetében is megfigyelhető volt, itt az alacsony betegszám miatt ez nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak.

*P<0.05	CD133+/VEGFR3+ (perifériás vér, n/mL)	CD34+/VEGFR3+ (perifériás vér, n/mL)
Fej-nyakrák (n=5)	98±145	3152±1021
Melanoma (n=30)	210±370	1250±1825*
Emlőrák (n=54)	136±66	1074±2826*
Egészséges kontroll populáció (n=32)	154.1±135.6	455±185

Angiogén citokinek és tirozin kináz gátlók hatásának elemzése kísérletes daganatokban és daganatos betegekben

Új daganat- angiogén citokin az Apelin

Megvizsgáltuk egy új angiogén citokin az apelin expressziója és a humán NSCLC tüdőrák stádiuma, klinikai viselkedése és vaszkularizáltsága közti összefüggéseket. A vizsgálatba 94, I-IIIa stádiumú NSCLC esetet válogattunk be. A 6 különböző vizsgált NSCLC sejtvonalon mind mRNS, mind fehérje szinten igazoltuk az apelin kifejeződését. Bár az apelin túltermelés vagy apelin kezelés in vitro nem növelte az NSCLC vonalak proliferációs aktivitását, a géntranszfer révén NSCLC sejtekbe juttatott apelin szignifikánsan stimulálta a szubkután tumorok növekedését, a kapilláris denzitást/kerületet humán NSCLC xenotranszplantált egerekben. Az apelin mRNS szint szignifikánsan emelkedett volt human NSCLC mintákban, összehasonlítva normál tüdő szövetmintákkal. Humán NSCLC esetében a magas apelin fehérje szint emelkedett kapilláris denzitással és kedvezőtlen teljes túléléssel társult. **(Isd. megjelent dolgozat:22)**

EPO hatása a keringő EPC-re daganatokban

Megvizsgáltuk a humán rekombináns erythropoietin (rHuEPO) hatását EPOR-pozitív humán nem kissejtes tüdőrák (H1975) és humán laphámrák (A431) xenograftok angiogenezisére. Az rHuEPO kezelés hatására nagyobb átmérőjű erek képződnek intratumorálisan mindkét fajta xenograft esetében. Ezek körül az erek körül ugyanakkor megszakad az SMA+ pericyta borítás. Mindkét tumor esetében az erek növekedése az intratumorális endotheliális sejtek (CD31+) fokozott proliferációjának következménye a kontrollhoz képest (mitózis-index: 49,12% vs. 15,3%). Mindeközben az EPOR+ daganatsejtek proliferációs indexe nem változott. Az exogén rHuEPO kezelés hatására a

daganatokban a HIF-1 α mRNS expresszió szignifikánsan lecsökkent, amely arra utal, hogy a tumorok kevésbé voltak hypoxiásak. **(lsd. megjelent dolgozat:23).**

A késői és a korai EPC-k kimutatására a CD34⁺VEGFR2⁺ illetve a CD133⁺ VEGFR2⁺ kettős jelölést alkalmaztunk egészséges kontroll személyekben (8 fő), valamint tüdőrákos betegek perifériás vérmintáiban EPO kezelés előtt, illetve után (14 fő; 9 SCLC, 5 fő NSCLC).

	CD34 ⁺ /VEGFR2 ⁺ (db/ml)		CD133 ⁺ /VEGFR2 ⁺ (db/ml)	
kontroll	351		278	
	EPO előtt	EPO után	EPO előtt	EPO után
SCLC	795	1006	133	50
NSCLC	1118	1207	0	0

Eredményeink szerint az EPO kezelés hatására elsősorban a kissejtes tüdőrákban észlelhető eltolódás a periférián a késői endothel-prekursorok irányába, ami erősíti az EPO angiogén faktor szerepét daganatos betegekben is.

EPO hatása angiogenezis gátló kezelésekre preklinikai modellben

EPO receptor-pozitív H1975 humán NSCLC sejteket oltottunk s.c. SCID egerekbe. Az állatokat a humán dózishoz megfelelően kezeltük anti-VEGF antitesttel (Gemcitabin, Avastin) és rHuEPO-val. A tumor növekedését és a véráramlást a tumorban kisállat SPECT/CT-vel detektáltuk, majd a kísérlet végén meghatároztuk a tumorok tömegét és az élő tumorszövetben immunhisztokémiával az erek számát. Az rHuEPO-val kezelt állatokban a tumorok növekedése nem tért el a kontroll állatokéhoz képest, míg az Avastin terápia több mint 70%-os növekedésgátlást eredményezett, melyet a rHuEPO terápia már nem tudott fokozni. Az anti-VEGF terápia a tumorokban az erek számát a kontrollhoz képest közel felére csökkentette, ami az rHuEPO hozzáadásakor tovább csökkent 20%-al. A véráramlás az anti-VEGF kezelés hatására 70%-ra csökkent, míg az rHuEPO kezelés hatására több mint kétszeresére nőtt a daganatokban. A kombinált anti-VEGF és rHuEPO kezeléssel azonban tovább lehetett a véráramlást csökkenteni 50%-ig. Eredményeink abból a szempontból érdekesek, hogy úgy tűnik, hogy az anti-VEGF antitestterápia az érdenzitás csökkentése révén lecsökkenti a daganat keringését, melyet az rHuEPO hozzáadásával tovább lehet potenciózni.

Kísérleti modellben (C38 egér vastagbélrák) elemeztük az rhEPO hatását az intuszuszeptív angiogenezisre és megállapítottuk, hogy az EPO megnövelte az érfeületet és ezzel volt inkább magyarázható a megemelkedett hídképzés (táblázat). Másrészt elemeztük egy multi-VEGFR kinázgátló, a vatalanib hatását is ugyanezen modellben az intuszuszeptív angiogenezisre és megállapítottuk, hogy a VEGFR-ok blokkolása gátolta a tumornövekedést, lecsökkentette az érdenzitást de fokozta a hídképződést a daganatos erekben azaz az intuszuszeptív angiogenezist **(lsd. megjelent dolgozat, 20).**

2. táblázat. EPO és vatalanib kezelés hatása az intuszuszeptív érsokszorozódásra c38 karcinoma esetében.

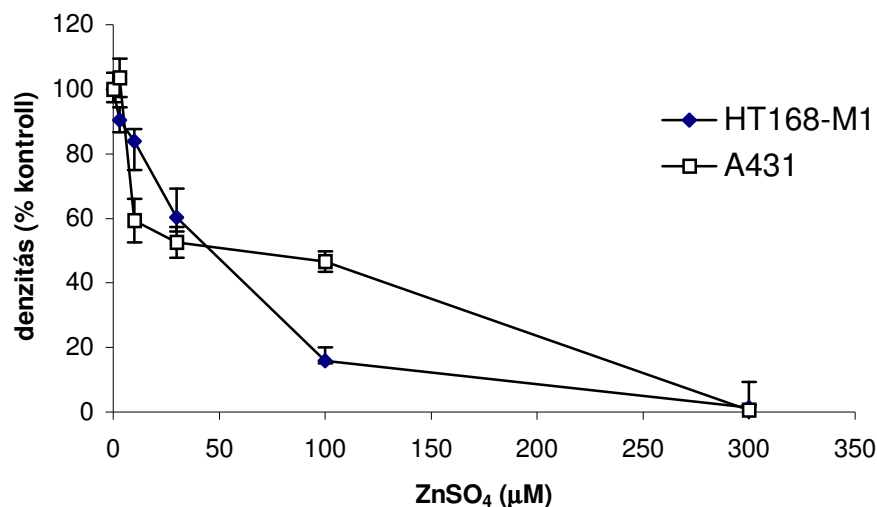
	Treatments		
	control	rHuEPO	vatalanib
C38 colon carcinoma subcutaneous tumor weight (g)	2,73±0,72	2,77±1,12	1,46±0,82*
Relative vessel area (vessel/tumor area in %)	1,47±0,32	1,75±0,28	1,21±0,14
Number of pillars/vessel area (n/mm ²)	21±3	25±5	32±6*
Number of pillars/tumor area (n/mm ²)	0,31±0,04	0,43±0,06*	0,38±0,08

Results are expressed as mean ± SD, *P<0,05

HIF-gátlás hatása emberi melanóma növekedésére és áttétképzésére

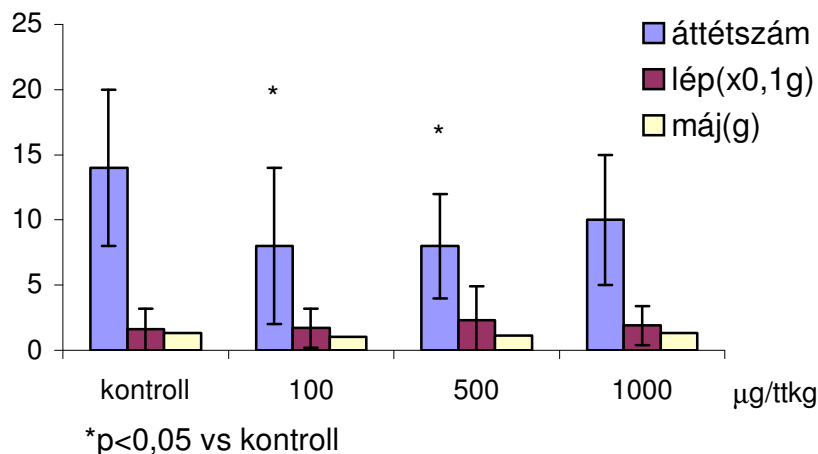
Manapság számos kémiai szert vizsgálnak amely képes volna felfüggeszteni a hypoxia- vagy onkogén-indukálta konstitutív HIF-aktiválódást ami a daganatok angiogén fenotípusának egyik legfontosabb eleme. Újabb vizsgálatok azt igazolták hogy ennek a cinkűj fehérjének transzkripciós faktor aktivitását Zn adásával DNS-szinten fel lehet függeszteni (Kim et al. NeuroReport 19:1065,2008). Ezek az adatok alapján megvizsgáltuk in vitro és in vivo áttétképzési modellben a Zn hatását emberi melanoma sejtvonalak viselkedésére és áttétképzésére. A cinkszulfátot 3-300 µM-os koncentrációkban alkalmaztuk, szérumentes, illetve szérumot tartalmazó médiumban oldva. A teszteket HT168-M1, HT199, WM983B, A431, KS sejtvonalakon, illetve fibroblast- és endothelsejteken végeztük el. Szérumentes médiumban a HT168-M1 melanoma és az A431 laphámrák sejtvonal is dózisfüggően érzékenynek bizonyult a ZnSO₄ kezelésre és az 50%-os sejtszámcsökkenéshez szükséges cinkszulfát-dózis közel azonos volt a két sejtvonal esetén.

7. ábra. ZnSO₄ hatása emberi daganatsejtekre in vitro (72 óra).



Arról, hogy a sejtszámcsökkenés hátterében sejtpusztulás, és nem pusztán proliferációgátlás áll, Tripánkék-festéssel győződünk meg. Az 50%-os gátláshoz kétszer nagyobb cinkszulfát-dózisra volt szükség fibroblasztok esetén mint melanóma-sejtekben. Normális és transzformált endotélsejteket elemezve (Kaposi-sarcoma) a normális endothel kevésbé bizonyult érzékenynek a cink toxikus hatására. 50%-os sejtszámcsökkenéshez szükséges dózisok markánsan különböztek és a 100 μM -os cinkszulfát-dózisnál is mintegy tízszeres különbség adódott a sejtpusztulásban. A fenti Zn-érzékenységbeli különbségek szérumban jelenlétében is megmaradtak. Felmerült, hogy a ZnSO_4 esetleg apoptózist indukálva toxikus, de ezek a feltételezések nem nyertek megerősítést. A melanomasejtek májattétképzését veleszületetten immunhiányos SCID egerekben lép-máj modellben vizsgáltuk. Amikor 5×10^4 tumorsejtet (HT168-M1) oltottunk az egerek lépébe, a 28. napon átlagosan 70 áttétet találtunk a májban. A cinkszulfát az áttétek számát csökkentette, bár ez csak az 500 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ -os dózisnál bizonyult szignifikánsnak. Ha kevesebb, 10^4 sejtet oltottunk lépbe, a 39. napon történő értékelésnél ~ 10 -15 áttétet találtunk. A cinkszulfát itt is hatásosnak bizonyult, és az 500 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ -os mellett a 100 $\mu\text{g}/\text{ttkg}$ -os dózisnál is statisztikailag szignifikáns volt az áttétek számának csökkenése. A lép tömegére, vagyis a primer tumor nagyságára a kezelés nem hatott.

8. ábra. ZnSO_4 hatása emberi melanóma áttétképzésére SCID egérben



Megbeszélés/ az eredmények hasznosítása

A daganatok ereződése

Vizsgálataink során elsősorban kísérleti modellekben a daganatok ereződésének új formáit figyeltük meg, mint amilyen az érbekebelezés sajátos formái májattétek egy részében és agyi áttétekben. Leírtuk az inverz bimbózás, vagy belső-bimbózás pontos folyamatát különböző egér és emberi daganatfélések esetében amit intuszuszeptív érkettződésnek ismernek. A folyamatban igazoltuk az endotélsejtek eddig pontosan még nem azonosított kollagénreceptorának szerepét mely a citoskeletális rendszer révén képes megfelelő húzóerőt kifejteni a kötőszövetes hídképződéshez. Fontos megfigyelés az hogy a májattétek döntően arteriális vér és érellátásuk, ami a klinikailag használt ún. intraarteriális terápiák biológiai racionalitását támasztja alá.

A daganatbiológia és patológia a daganatok limfatikus terjedését is úgy értékeli hogy az a szisztémás terjedéshez vezető út egyik formája, ugyanakkor nincsenek arra bizonyítékok, hogy ez hogyan valósul meg: mi a kapcsolat a nyirokrendszeri áttét és a szisztémás

vérkeringésben történő terjedés (hematogén disszemináció) között. Megfigyeléseink ebben a kérdésben segítik a tisztánlátást, hiszen emlőrák esetében igazoltuk, hogy hasonlóan a primer daganathoz, a regionális áttétek egy jelentős százalékában is kimutatható a vérerekbe történő daganatbetörés. Ennek prognosztikus jelentősége a primer tumor vonatkozásában ismert, további feladatunk annak bebizonyítása, hogy a nyirokcsomókban bekövetkező vérérbetörésnek is ilyen szerepe van, azaz az ilyen daganatos betegekben fokozott a szervi áttétek kialakulásának esélye.

A posztnatális vaszkulogenezis a keringő endotélprekursorok révén reaktiválódhat emberi daganatokban ahogy mások mellett ez mi is korábban kimutattuk. Vizsgálataink arra mutattak rá, hogy a posztnatális limfangiogenezis folyamata is reaktiválódhat rosszindulatú daganatokban, amihez elemeztük a keringésben a korai és késői limfovaszkuláris EPC sejtpopulációkat kissejtes tüdőrákokban és számos más daganatféleségben is. Azt igazoltuk, hogy a daganatos betegekben elsősorban az ún. késői LVEPC mutatható ki megemelkedett szinten (CD34+/VEGFR3+) és ennek a populációnak lehet szerepe a nyirokcsomóáttétek kialakulásának előrejelzése szempontjából. Az azonban továbbra is nyitott kérdés, hogy ezek a prekursorok maguk mennyiben járulnak hozzá a nyirokérújdonképződéshez, vagy csak jelzői a limfangioenetikus képességnek.

A daganat angiogén fenotípusának markerei

Vizsgálataink szélesítik a daganatos angiogén faktorok palettáját az Apelin ilyen irányú szerepének tisztázásában és tovább erősítik az EPO ezen szerepére vonatkozó nézeteket. Ugyanakkor felhívtuk magunk is a figyelmet arra, hogy daganatokban gyakran nincsen egyértelmű összefüggés az angiogén citokinek szérumban vagy tumorszintje és az angiogén képesség között, aminek egyik magyarázata ezen citokinek különböző izoformáinak léte amire nézve vannak már adatok bár meglehetősen ellentmondásosak.

Ismert tény, hogy a szolid daganatok, közöttük a vastag- és végbélrákok érellátásukat különböző módon oldják meg, amely angiogén fenotípusukból ered. Ezek közül csak az egyik a neoangiogenezis, de más alternatív módok is vannak, mint a postnatalis vascularisatio, az érbekebelezés, vagy a vaszkulogén mimikri jelensége, amelyeket mind-mind eltérő kináz típusú receptorok érintettsége jellemez, és értelemszerűen eltérő angiogén citokin profil vált ki. A vastag- és végbélrákok esetében az egyetlen klinikailag sikeres antiangiogén terápiát a VEGF citokin elleni monoklonális antitest terápia jelenti, amely a kemoterápiával kombinációban mutatott kedvező klinikai hatást. Amikor azonban a lehetséges hatásmechanizmus egyes elemeit vizsgálták, kiderült, hogy emberi alkalmazás során a daganat indukált angiogenesis gátló hatás nem bizonyított. Amire azonban bizonyítékokat sikerült gyűjteni, az arra vonatkozott, hogy a daganatos erek funkciója változik ún. ér normalizálás következik be, ami az erek kidifferenciálódását jelenti, optimálisabb funkcióját, aminek következtében a daganatban lévő hipoxia és perfúzió javul, és ezzel magyarázták a kemoterápia hatékonyságának fokozódását is. (24) Kezdetből fogva nagy probléma a vastag- és végbélrákok esetében is, de más szolid daganatok esetében is, hogy az ún. angiogenesis gátló terápiák szempontjából sem pozitív, sem negatív prediktív faktorról nem rendelkezünk. Egy friss tanulmány összesítette ezen vizsgálatokat, amelyben megállapították, hogy vastag- és végbélrák esetében a szérumban VEGF szintje biztosan nem jelent pozitív vagy negatív prediktív faktort, a vizsgálatok többsége nem talált összefüggést a terápia hatékonyságával. (25) Szöveti szintű vizsgálatok pedig azt mutatták, hogy a daganatos érdenzitás nem függ össze az angiogenesis gátló gyógyszer hatékonyságával, és a tumorban kimutatható VEGF citokin szint sem. (25) Tehát azzal a helyzettel állunk szembe, hogy nem rendelkezünk ezen célzott terápia esetében sem pozitív prediktív tényezővel. A klinikai és preklinikai vizsgálatok azonban meghatároztak néhány ún. anti-VEGF terápia rezisztencia tényezőt. Ezek között az egyik a daganatok neutrofil infiltrációja, ahol a neutrofilek egy alternatív angiogén citokint

biztosítanak a tumor számára. A PDGF-C termelés a daganatban pl. egy ilyen negatív tényezője volt, ill. a DLL4 endoteliális marker megjelenése is ezzel állt kapcsolatban. Miután pozitív prediktív tényező nincs, a kérdés úgy merült fel, hogy van-e esetleg negatív prediktív markere az antiangiogenezis terápiának, mint ahogy az anti-EGFR terápiák esetében van. Ilyen negatív tényezőt kerestek a gyakori génhibákban, mint a K-RAS, BRAF, P53 mutáció, és sem a kezdeti vizsgálatok, sem a megismételték nem igazolták, hogy a K-RAS vagy BRAF mutáns státusz befolyásolta volna a teljes túlélést IFL, oxaliplatin ill. irinotecan és capecitabin kombinációk esetén. *Saját vizsgálataink is ezeket az eredményeket erősítik meg.* Az angiogenezis-terápiák sikertörténete a világossejtes veserák, melyben 4 multikinázgátló (főleg VEGFR-ek) és az anti-VEGF antitestek hatékonyak azonban itt sem ismert pozitív vagy negatív prediktív faktor. Ebből a szempontból érdekes lehet az az eredményünk, hogy a csontáttétképző veserákban a HIF2a expresszió fokozódik és valószínűleg ezzel összefüggésben a VEGF expresszió is tovább fokozódik. Ugyanakkor az EGFR jelpálya jelentős változáson megy keresztül és a lipidkináz útvonal aktiválódása mutatható ki. Ez a megfigyelés azért fontos, mert eddig az mTOR gátlók klinikai helyét az adjuváns elsővonalas kezeléseknél látták és fel sem merült, hogy VEGFR gátló kezeléseket után próbálják alkalmazni, pedig lehet hogy ennek molekuláris alapja van a progresszió során kialakuló változások logikája miatt.

Daganatindukált angiogenezis modulációja

Az EPO-val foglalkozó kutatásaink gyakorlati hasznosításának jelenleg legfontosabb akadálya az lehet hogy az EPO mellékhatásai és túladagolása miatt egyre inkább diszkriminálódott a daganatos betegek kezeléséből. Ugyanakkor bemutattuk, hogy mind az esetleges sugárterápiás válasz potencírozása mind pedig az anti-VEGF antitestterápia potencírozása révén fokozni képes daganatellenes terápiák vagy az angiogenezis elleni terápiák daganatellenes hatását.

A vatalanibra vonatkozó megfigyeléseink érdekes új szempontot jelenthetnek az anti-angiogén TK gátlók biológiai hatásainak megértésében. Eddig úgy gondolták, hogy az angiogenezis-gátlók érnormálizálás útján fejtik ki hatásukat fokozva a daganatellenes szerek hatékonyságát. Adataink arra utalnak, hogy az ilyen kezeléseknél során a rezisztencia egyik lehetséges mechanizmusa a daganat ereződési stratégiájának megváltozása: az eredeti bimbózási típus (VEGF-VEGFR mediált) háttérbe szorul és pl. alternatív mechanizmus, egy VEGFR-független mint pl. az intuszuszeptív érsokszorozódás előtérbe kerülése következik be. Ezt a megfigyelésünket természetesen más daganatokon és a ma forgalomban lévő szerekre is meg kell vizsgálni.

Szintén nagyon fontos megfigyelésünk a ZnSO₄ daganatellenes hatásának elemzése illetve kimutatása annak fényében hogy idegsejtekben bizonyítást nyert az hogy képes a HIF transzkripció hatásának blokkolására így egy hatékony nemspecifikus anti-HIF gyógyszerként tekinthető. Ebből a szempontból érdekes az a tény is hogy az általunk vizsgált daganatok esetében a Zn iránti érzékenység sokkal nagyobb mint a normális sejteké (fibroblasztok vagy endotélsejtek), aminek egyik oka lehet a daganatokban oly gyakran különböző genetikai okokból konstitutívan aktiválódott HIF-jelpálya. A közeljövő feladata lesz annak megvizsgálása, hogy veserák esetében ahol a VHL-génhiba felelős a HIF aktiválásáért a Zn képes-e ezt felfüggeszteni. Ezzel egy fontos kiegészítő un. szupportív kezelés racionális alkalmazásának lehetősége merül fel.

Irodalom:

1. Carmeliet P, Jain RK: *Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. Nature* 473: 298-307, 2011

2. Döme B, Hendrix MJC, Paku S, Tóvári J, Tímár J. Alternative vascularization mechanism in cancer. Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol* 170:1-15, 2007

3. Tímár J, Döme B. Antiangiogenic drugs and tyrosine kinases. *Anticancer Agents Med Chem* 8:462-469, 2008

4. Amir E, Hughes S, Blackhall F, Thatcher N, Ostoros G, Tímár J, Tóvári J, Kovacs G, Döme B. Targeting blood vessels for the treatment of non-small cell lung cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 8:392-403, 2008

5. Döme B, Dobos J, Tóvári J, Paku S, Kovács G, Ostoros G, Tímár J. Circulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells: characterization, mobilization, and therapeutic considerations in malignant disease. *Cytometry Part 73A*:186-193, 2008

6. Döme B, Tímár J, Ladányi A, Paku S, Rényi-Vámos F, Klepetko W, Láng Gy, Döme P, Bogos K, Tóvári J: Circulating endothelial cells, bone marrow-derived endothelial progenitor cells and proangiogenic haematopoietic cells in cancer: from biology to therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 69: 108-124, 2009

7. Forster-Horváth C, Mészáros L, Rásó E, Döme B, Ladányi A, Morini M, Albin A, Tímár J. Expression of CD44v3 protein in human endothelial cells in vitro and in tumoral microvessels in vivo. *Microvasc Res* 68:110-118, 2004

8. Tímár J, Mészáros L, Orosz Z, Albin A, Rásó E. WT1 expression in angiogenic tumours of the skin. *Histopathology* 47:67-73, 2005

9. Döme B, Rásó E, Dobos J, Mészáros L, Varga N, Puskás LG, Fehér LZ, Lőrincz T, Ladányi A, Trikha M, Honn KV, Tímár J. Parallel expression of α IIb β 3 and α v β 3 integrins in human melanoma cells upregulates bFGF expression and promotes their angiogenic phenotype. *Int J Cancer* 116:27-35, 2005

10. Tóvári J, Gilly R, Rásó E, Paku S, Bereczky B, Varga N, Vágó Á, Tímár J. Recombinant human erythropoietin α targets intratumoral blood vessels, improving chemotherapy in human xenograft models. *Cancer Res* 65:7186-7193, 2005

11. Paku S, Kopper L, Nagy P: Development of the vasculature in “pushing-type” liver metastases of an experimental colorectal cancer. *Int J Cancer* 115: 893-902, 2005

12. Döme B, Tímár J, Paku S. A novel concept of glomeruloid body formation in experimental cerebral metastases. *J Neuropath Exp Neurol* 62:655-661, 2003

13. Döme B, Tímár J, Dobos J, Mészáros L, Rásó E, Paku S, Kenessey I, Ostoros Gy, Magyar M, Ladányi A, Bogos K, Tóvári J. Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 66:7341-7347, 2006

14. Rényi-Vámos F, Tóvári J, Fillinger J, Tímár J, Paku S, Kenessey I, Ostoros G, Agocs L, Soltész I, Döme B. Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 22:7344-7453, 2005
15. Döme B, Paku S, Somlai B, Tímár J. Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. *J Pathol* 197:355-362, 2002
16. Lőrincz T, Tímár J, Szendrői M. Alterations of microvascular density in bone metastases of adenocarcinomas. *Pathol Oncol Res* 10:149-153, 2004
17. Lőrincz T, Tóth J, Szendrői M, Tímár J. Microvascular density of breast cancer in bone metastasis: influence of therapy. *Anticancer Res* 25:3075-3082, 2005
18. Lövey J, Lukits J, Remenár É, Koronczay K, Kásler M, Németh Gy, Tímár J. Antiangiogenic effects of radiotherapy but not initial microvessel density predict survival in inoperable oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Strahlenther Onkol* 182:149-156, 2006
19. Dezső K, Bugyik E, Papp V, László V, Döme B, Tóvári J, Tímár J, Nagy P, Paku S: Development of arterial blood supply in experimental liver metastases. *Am J Pathol* 175: 835-843, 2009
20. Paku S, Dezső K, Bugyik E, Tóvári J, Tímár J, Nagy P, László V, Klepetko W, Döme B: A new mechanism for pillar formation during tumor-induced intussusceptive angiogenesis: Inverse sprouting. *Am J Pathol*, accepted for publication, 2011
21. Bogos K, Rényi-Vámos F, Dobos J, Kenessey I, Tóvári J, Tímár J, Strausz J, Ostoros Gy, Klepetko W, Ankersmit HJ, Láng Gy, Hoda MA, Nierlich P, Döme 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* 15: 1741-1746, 2009
22. Berta J, Kenessey I, Dobos J, Tóvári J, Klepetko W, Ankersmit HJ, Hegedus B, Rényi-Vámos F, Varga J, Lőrincz Zs, Paku S, Ostoros Gy, Rozsas A, Timar J, Dome B: Apelin expression in human non-small cell lung cancer: Role in angiogenesis and prognosis. *J Thorac Oncol* 5: 1120-1129, 2010
23. Lövey J, Bereczky B., Gilly R, Kenessey I, Rásó E, Simon E, Dobos J, Vágó A, Kásler M, Döme B, Tímár J, Tóvári J. Recombinant human erythropoietin-alpha improves the efficacy of radiotherapy of a human tumor xenograft, affecting tumor cells and microvessels. *Strahlenther Oncology* 184:1-7, 2008
24. Jain RK. *Normalization of tumor vasculature. An emerging concept in antiangiogenic therapy. Science* 307:58-62,2005.
25. Jubb AM, Harris AL. *Biomarkers to predict the clinical efficacy of bevacizumab in cancer. Lancet Oncology* 11:1172-1183,2010