

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Új lehetséges biomarkerek és prognosztikai tényezők vizsgálata mellkasi daganatokban

Dr. Rényi-Vámos Ferenc



Semmelweis Egyetem, Mellkassebészeti Klinika

Országos Onkológiai Intézet, Mellkassebészeti Osztály

Országos Korányi Pulmonológiai Intézet, Mellkassebészeti Osztály

Budapest

2020.

Tartalomjegyzék

Az értekezésben használt rövidítések jegyzéke	5
Általános bevezető	7
Célkitűzések	8
I. A lymphangiogenesis mechanizmusainak és a nyirokerek szerepének vizsgálata kissejtes és nem-kissejtes tüdőrákban	10
I.1. Bevezetés	10
I.2. Betegek és Módszer	12
2/1. Beteganyag	12
2/2. Módszerek	14
I.3. Eredmények	15
3/1. A nyirokerek azonosítása normál tüdőszövetben LYVE-1 és D2-40 antitesttel.....	15
3/2. A nyirokerek karakterizálása NSCLC-ben.....	15
3/3. Nyirokér denzitás és terület NSCLC-ben.....	16
3/4. Túlélés	18
3/5. Lymphatikus proliferáció	20
3/6. VEGF expresszió NSCLC-ben	20
3/7. LVEPC szint meghatározás SCLC betegek perifériás vérében	20
3/8. Az LVEPC szint és a klinikopatológiai paraméterek összefüggései.....	21
3/9. VEGF-C szint SCLC betegek perifériás vérmintájában	22
I.4. Megbeszélés	22
4/1. A lymphangiogenesis vizsgálata és jelentősége NSCLC-ben	22
4/2. A lymphovaszkulogenesis (LVEPC-k) vizsgálata és jelentősége SCLC-ben	23
I.5. Következtetések	24
II. Prognosztikai faktorok mellkasi szoliter fibrózus tumorok esetén.....	25
II.1. Bevezetés	25
II.2. Betegek és Módszer	27
2/1. Beteganyag	27
2/2. Statisztikai analízis	29
II.3. Eredmények	29
3/1. Klinikai jellemzők és műtét utáni morbiditás, illetve mortalitás	29
3/2. Az eltávolított daganatok patológiai és immunhisztokémiai jellemzői	32
3/3. A klinikai és az immunhisztokémiai paraméterek prognosztikus jelentősége	33
3/4. Gyulladásos biomarkerek a vizsgált beteganyagban.....	34

3/5. A gyulladásos paraméterek és a szövettani jellemzők közötti összefüggések	34
3/6. Gyulladásos paraméterek, mint prognosztikai faktork.....	35
II.4. Megbeszélés.....	37
II.5. Következtetések	39
III. A primer tüdőadenocarcinoma lokalizációjának hatása az áttétek elhelyezkedésére és mintázatára vonatkozóan	41
III.1. Bevezetés.....	41
III.2. Betegek és Módszer	42
2/1. Vizsgálati populáció	42
2/2. Statisztikai módszerek.....	44
III.3. Eredmények.....	44
3/1. Klinikopatológiai paraméterek és a távoli szervi áttétek lokalizációja	44
3/2. Metasztatikus mintázat a távoli szervi áttétek időbeli és térbeli megjelenése szempontjából.....	46
3/3. A primer tumor lokalizációjának hatása a metastztatikus mintázatra	49
3/4. Klinikai eredmény	49
III.4. Megbeszélés	52
III.5. Következtetések	54
IV. A keringő komplement komponens 4d (C4d) összefüggése a tumor térfogattal, a kemoterápiás válasszal és a túléléssel malignus pleurális mezoteliómás betegekben	55
IV.1. Bevezetés	55
IV.2. Betegek és Módszer	56
2/1. Betegek.....	56
2/2. Vérminta gyűjtés	56
2/3. ELISA assay	57
2/4. Immunhisztokémia	57
2/5. Tumortérfogat mérése	58
2/6. Cut-off meghatározása	58
2/7. Statisztikai analízis.....	59
IV.3. Eredmények	59
3/1. A vizsgálati kohorsz klinikopatológiai jellemzői.....	59
3/2. A C4d plazmaszintje nem emelkedett MPM-es betegek esetében.....	60
3/3. Korreláció a radiológiaiilag meghatározott tumor térfogatával	61
3/4. Összefüggések a keringő gyulladásos markerek tekintetében	61
3/5. A C4d plazmaszintje összefügg az indukciós kezelésre adott válasszal	62
3/6. A C4d plazmaszint prognosztikai jelentősége MPM esetén	63

3/7. A keringő C4d korrelációja más komplement komponensekkel	64
IV.4. Megbeszélés	66
IV.5. Következtetések	68
V. Az apelin expresszió szerepe nem kissejtes tüdődaganatok angiogenezisében és prognózisában.....	69
V.1. Bevezetés.....	69
V.2. Betegek és Módszer.....	71
2/1. Beteganyag	71
2/2. Sejtvonalak	72
2/3. <i>In vitro</i> sejproliferációs teszt	73
2/4. Az apelin expressziójának és a mikroerek sűrűségének meghatározása humán és xenograft tumorokban	73
2/5. Sejtes apelin expresszió vizsgálata.....	74
2/6. Xenograft tumorok vizsgálata	75
2/7. Statisztikai számítások	75
V.3. Eredmények.....	76
3/1. Apelin expresszió vizsgálata szövettani mintákon és NSCLC sejtvonalakon	76
3/2. Exogén apelin kezelés és apelin expressziós vektorral történő transzfekció hatása az NSCLC vonalak növekedésére <i>in vitro</i>	79
3/3. Fokozott apelin expresszió hatása az NSCLC növekedésére <i>in vivo</i>	81
3/4. Humán NSCLC daganatminták apelin expressziójának, beereződésének és klinikai viselkedésének összehasonlítása	83
3/5. A megnövekedett apelin protein expresszió prognosztikus jelentősége	84
V.4. Megbeszélés	86
V.5. Következtetések.....	88
Az értekezés legfőbb megállapításai	89
Köszönetnyilvánítás	92
A disszertáció alapjául szolgáló saját közlemények jegyzéke	93
A disszertációban nem szereplő tudományos szakcikk, rövid közlemények	95
Az értekezésben felhasznált hivatkozások.....	105

Az értekezésben használt rövidítések jegyzéke

APJ	Humán apelin receptor
BAL	Bronchoalveolaris lavage
C4d	Keringő komplement komponens 4d
CHT	Kemoterápia
CI	Konfidencia intervallum
CRC	Kolorektális carcinoma
CRP	C-reaktív protein
CT	Számítógépes tomográfia
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EFS	Esemény nélküli túlélés
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPP	Extrapleurális pneumonektómia
FFPE	Formalin fixed and paraffin embedded, formalin fixált és paraffinba ágyazott
GPCR	G-protein kapcsolt receptor
HA	Hialuronsav
HR	Hazard ratio, kockázati arány
HV	Healthy volunteers, egészséges önkéntesek
IASCL	International Association for the Study of Lung Cancer
IGF	Insulin-like growth factor
IMIG	International Mesothelioma Interest Group
LEC	Lymphatic endothelial cell
LVD	Lymphatic vascular density, nyirokér denzitás
LVEPC	Lymphatic vascular endothelial progenitor cell
MBL	Mannose binding lectin, mannóz kötő lektin
MMT	Multimodális terápia
MPM	Malignus pleurális mezotelióma
MRI	Mágnesesrezonancia-képalkotás
NA	Not available, nem elérhető
NLR	Neutrofil-limfocita arány
NMPD	Non-malignant pleural disease, nem-malignus pleurális megbetegedés
NSCLC	Non-small cell lung cancer, nem kissejtes tüdőrák
OKPI	Országos Korányi Pulmonológiai Intézet

OR	Odds ratio
OS	Overall survival, teljes túlélés
PC	Pleural calcification, pleurális kalcifikáció
PD	Progressive disease, progrediáló betegség
RECIST	Response evaluation criteria in solid tumors
ROC	Receiver Operating Characteristics
RT	Sugárkezelés
SCLC	Small cell lung cancer, kissejtes tüdőrák
SD	Stable disease, stabil betegség
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results
SFT	Szoliter fibrózus tumor
TILA	Tumor indukálta lymphangiogenesis
VATS	Video-assisted thoracoscopic surgery, video-asszisztált mellkasi műtét
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WBC	White blood count, fehérvérsejt szám

Általános bevezető

A malignus mellkasi daganatok (beleértve a tüdődaganatokat és a malignus pleurális mezoteliómát) hazánkban és világviszonylatban is a vezető daganatos halálokok egyike. Tekintettel emelkedő incidenciájukra és agresszív mivoltukra, egyre jelentősebb az igény az új kezelési stratégiák kidolgozására, valamint olyan biológiai markerek azonosítására, melyek segíthetik a diagnosztikát és adott esetben lehetővé teszik a célzott terápiák bevezetését.

Az elmúlt két évtized orvosbiológiai kutatásainak hatására a daganatokkal kapcsolatos ismereteink rohamosan bővülnek és számos új diagnosztikai eljárás vonult be az egészségügyi ellátásba. Ugyanakkor, napjainkban egyre inkább előtérbe kerül a személyre szabott terápia is. Mindezek hatására felértékelődött azon molekulák jelentősége, melyek információt biztosítanak a betegeket kezelő orvosok számára a betegellátás hatékonyságára vonatkozóan. Következésképpen a biomarkerek (vagy biológiai markerek), olyan molekulák, melyek objektív információt szolgáltatnak a találati valószínűsége, a terápiás érzékenységre, valamint a prognózisra vonatkozóan, és elősegítik további molekuláris célopontok azonosítását is.

Tüdődaganatok esetén a biomarkerek szintén jelentős összefüggést mutatnak a célzott terápiák megjelenésével. Az EGFR tirozin-kináz-gátlók és az érképződés-gátló vegyületek mindennapi klinikai gyakorlatba történő bevezetése felértékelte a molekuláris mintázat (EGFR és a KRAS státusz) és az angiogenezisben (illetve a lymphangiogenezisben) résztvevő molekulák – mint lehetséges biomarkerek – szerepét. Az immunterápiák elterjedésével pedig kezdetét vette az immunellenőrzőpont-gátlók prediktív biomarkereinek azonosítása, valamint feltérképezése. Malignus pleurális mezotelióma esetén, szintén megemlíthető a PD-L1 expresszió, mint lehetséges prognosztikus biomarker, de egyéb molekulák (osteopontin, illetve fibulin-3) és paraméterek (neutrofil-limfocita arányszám) is támpontul szolgálhatnak a kezelésre adott válasz, valamint a túlélés meghatározásában. Ugyanakkor, a már azonosított biomarkerek mellett, számos egyéb molekula is létezik, melyek prediktív és prognosztikai jelentősége bár feltételezett, de mindmáig még nem tisztázott. Az új biomarkerek azonosítására különböző típusú megközelítések léteznek és használatosak a mindennapi gyakorlatban. Transzlációs jellegű vizsgálataink, új lehetséges biomarkerek (illetve prognosztikai tényezők) azonosítására és elemzésére irányult mellkasi daganatok esetében.

Célkitűzések

Vizsgálataink **öt** különböző témára irányultak, amelyeket a biomarkerek daganatos betegségekkel kapcsolatos szerepe köt össze. Tanulmányaink során célunk volt, ismert és új biomarkerek tesztelése különböző mellkasi daganatok esetén, beleértve a tüdőrákot (kissejtes és a nem-kissejtes tüdőrák), a malignus pleurális mezoteliómát, és a mellkasi szoliter fibrózus tumorokat. Ennek kapcsán be kívántuk mutatni a biomarkerek alkalmazásával kapcsolatos lehetőségeket és problémákat, támpontot nyújtva ezáltal mind a kutatóorvosoknak, mind a klinikus kollégáknak. Értekezésünk során az alábbi fő témákat érintjük és tárgyaljuk részletesen:

- A lymphangiogenesis mechanizmusainak és a nyirokerek szerepének vizsgálata kissejtes és nem-kissejtes tüdőrákban:
 - Tanulmányunk során elemeztük a nem-kissejtes tüdőrák nyirokérrendszerének felépítését, és vizsgáltuk, hogy a lymphangiogenesis mértéke összefüggésben van-e az angiogén fenotípussal és/ vagy a nyirokcsomó metasztázissal, valamint a betegek átlagos túlélésével.
 - Továbbá elsőként vizsgáltuk az LVEPC (Lymphatic Vascular Endothelial Progenitor Cell) klinikai jelentőségét és daganatprogresszióban betöltött szerepét kissejtes tüdőrákban.
- Prognosztikai faktorok mellkasi szoliter fibrózus tumorok esetén:
 - Tanulmányunkban olyan gyulladásos markerek jelentőségét vizsgáltuk, melyek segíthetnek a szoliter fibrózus tumorok megismerésében, diagnosztikájában, a prognózis megítélésében, és a terápiás terv felállításában.
- A primer tüdőadenocarcinoma lokalizációjának hatása az áttétek elhelyezkedésére és mintázataira vonatkozóan:
 - Vizsgálatunk célja az áttétképzési mintázat feltérképezése és a túlélési mutatók tanulmányozása volt a primer tumor elhelyezkedésének függvényében.
- A keringő komplement komponens 4d (C4d) összefüggése a tumor térfogattal, a kemoterápiás válasszal és a túléléssel malignus pleurális mezoteliómában:
 - Mivel a C4d komplement degradációs termék különösen fontos prognosztikus szereppel bír tüdő adenocarcinomákban, kutatásunkban a szöveti és a keringő C4d szinteket vizsgáltuk mezoteliomás betegekben a tumor tömeg, a kemoterápiás válasz, illetve a klinikopatológiai paraméterek összefüggésében.

- Továbbá vizsgáltuk a keringő C4d prognosztikai jelentőségét is.
- Az apelin expresszió szerepe nem kissejtes tüdődaganatok angiogenezisében és prognózisában:
 - Tanulmányunk során vizsgáltuk az apelin és receptora expresszióját nem-kissejtes tüdőrák sejtvonalakon és humán tumor mintákon, valamint elemeztük az apelin hatását a tumornövekedésre, az érdenzitásra és a mikroér-kerületre vonatkozóan.
 - Emellett célunk volt az apelin expresszió prognosztikus jelentőségének vizsgálata is.

I. A lymphangiogenezis mechanizmusainak és a nyirokerek szerepének vizsgálata kissejtes és nem-kissejtes tüdőrákban

I.1. Bevezetés

A leggyakrabban előforduló rosszindulatú daganat a tüdőrák (világszerte 1,35 millió új tüdőrákos beteget regisztrálnak évente). Sajnos növekvő tendenciát figyelhetünk meg az új megbetegedések számában, hiszen amíg 1980-ban 600 ezer új esetet jelentettek évente, 2000-ben ez a szám elérte az 1,2 milliót. Magyarországon évente mintegy 8000 új esetet regisztrálnak.

A nyirokcsomókban kialakult metasztázis a staging meghatározása és a kezelés módjának eldöntése szempontjából alapvető fontosságú. Továbbá, a nyirokcsomóáttétek – a stádium meghatározása mellett – jelentős prognosztikai szereppel is bírnak. Maga a nyirokúti invázió folyamata és a metasztázis kialakulása a regionális nyirokcsomókban, valamint az a kérdés, hogy a daganatok az angiogenezishez hasonlóan elősegítik-e a lymphangiogenezist (azaz új nyirokerek kialakulását), még nem tisztázott teljes mértékben.

A nyirokcsomó metasztázisokkal kapcsolatos ismeretek megszerzésének egyik fő akadálya egy olyan marker hiánya volt, amellyel a nyirok endothel specifikusan jelölhető és tanulmányozható. Az új nyirokér markerek nemrégiben történt azonosítása, amelyek segítségével a szövettani metszetekben pontosan el tudják különíteni a nyirokereket a vérerektől (LYVE-1, podopaplin, D2-40), új távlatokat nyitott az áttétképződés mechanizmusának megértésében. A LYVE-1 a hialuronsav (HA) nyirok-specifikus receptora. A mucin-típusú transzmembrán glikoprotein podopaplin egy fokozottan expresszált nyirok-specifikus gén a LEC-ben (lymphatic endothelial cell), míg a D2-40 egy új, monoklonális antitest, amely reakcióba lép a magzati csírasejtben jelenlévő onkofoetális antigénnel.

Ezen nyirokspecifikus markerek segítségével kezdetét vette – az angiogenezis és lymphangiogenezis mechanizmusának hasonlóságára alapozva – a tumor indukálta lymphangiogenezis igen összetett folyamatának tanulmányozása. A két lymphangiogén molekula, a VEGF-C (Vascular Endothelial Growth Factor-C) és VEGF-D érendotheliális növekedési faktorok, valamint receptoruk, a VEGFR3 a legrészletesebben tanulmányozott lymphangiogén jelátviteli tengelyt alkotó molekula-triász. A VEGF család tagjain kívül, egyéb

növekedési faktorokról – mint az FGF-2, Ang-1, Ang-2, PDGF-ek, nitrogén oxid, IGF, HGF, VEGF-A – szintén kimutatták, hogy *in vivo* lymphangiogenezist indukálnak.

Egyes tumorok lymphangiogenezis nélkül, az eredeti stromához tartozó nyirokerek inkorporációja révén tesznek szert nyirokhálózatra. Továbbá, a daganatos nyirokerek másik ismert keletkezési módja az „*in situ*” nyirokérképződés, amelynek során a már meglevő nyirokerek mintegy belenőnek a tumormasszába. 2003-ban pedig Salven és mtsai. leírtak egy újabb mechanizmust, miszerint, nem csak az angiogenezisben szerepet játszó vérér progenitor sejtek léteznek, hanem egy másik progenitor sejtpopuláció (Lymphatic Vascular Endothelial Progenitor Cell [LVEPC]) is kimutatható a csontvelőben. Az LVEPC-k szintén a nyirokérképződés folyamatában töltnek be kulcsszerepet, hasonlóan az érkapillárisok képződésénél leírt folyamathoz, ahol a daganatsejt által termelt angiogén faktor (VEGF) a csontvelőbe jutva progenitor sejt felszabadulást vált ki, majd ezen progenitor sejtek a véráram útján a daganatba jutnak és endothel sejtekké differenciálódnak. 2005-ben Religa és munkacsoportja egérdaganatok megfigyelése során bizonyította, hogy a lymphatikus progenitor sejtek beépülnek a nyirokérhálózatba, Kerjaschki pedig a modell működésének humán bizonyítékaul szolgálva vesetranszplantáción átesett betegek vizsgálata során leírta az LVEPC-k nyirokkapillárisba történő beépülését.

A közelmúltban elvégzett kísérletes tanulmányok azt sugallják, hogy a daganatok képesek új nyirokér kapillárisok képződését indukálni, elsősorban olyan citokinek termelésével, mint a VEGF család tagjai. Továbbá feltételezhető, hogy a TILA (Tumor Indukálta Lymphangiogenezis) aktivitása korrelál a nyirokcsomó metasztázisok számával. Ennek ellenére még mindig bizonytalan, hogy a nyirokúton történő daganatos progresszió az újonnan képződött nyirokér-kapillárisok tumoros invázióján keresztül, vagy a nyirokér-kapillárisok inkorporációján át működik (hasonlóan, mint ahogy leírták a daganatos vérérkapillárisokkal kapcsolatban). NSCLC (Non-Small Cell Lung Cancer, nem kissejtes tüdőrák) esetén egy úgynevezett nem angiogén és egy angiogén növekedési mintát írtak le. Angiogén típus esetén a daganatsejteknek az eredeti szöveti szerkezet elpusztítása után saját stroma kialakítására van szüksége, amelybe bele foglaltatnak a kapillárisok is. Ebben az esetben valódi érképződésről van szó. Ezzel ellentétben, nem angiogén típusban, a daganatsejtek újabb és újabb alveoláris tereket kitöltve növekednek anélkül, hogy új vérérkapillárisok képződését indukálnák. Ebben az esetben a daganatsejtek pusztán a már perzisztáló, az alveoláris septumokban futó gazdaszöveti kapillárisok nyújtotta oxigén- és tápanyagellátást használják, azokat mintegy kooptálva. Hipotézisünk szerint hasonlóság áll fenn az angiogenezis és a lymphangiogenezis

között NSCLC-ben. Ennek bizonyítására tisztázni akartuk a nyirokrendszer szerepét a tumor növekedése során. Elemeztük, hogyan épül fel az NSCLC nyirokérrendszere, és megvizsgáltuk, hogy a lymphangiogenesis mértéke összefüggésben van-e az angiogén fenotípussal (angiogén vs. nem angiogén) és/ vagy a nyirokcsomó metasztázissal, valamint a betegek átlagos túlélésével.

Ahogy azt a fentiekben már említettük, a malignus daganatok a vérerek rendszeréhez hasonlóan, nyirokerekre is több mechanizmus útján tehetnek szert. A nyirokér bimbózás (sprouting) mechanizmusán kívül az általunk is leírt nyirokér-inkorporáció és az LVEPC-k is nagy valószínűséggel részt vesznek a nyirokhálózatok kialakításában. Munkánk következő fázisában így arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon az LVEPC-knek van-e klinikai jelentősége a tüdőrákok másik gyakori típusában, a kissejtes tüdőrákban (SCLC, Small Cell Lung Cancer). Az LVEPC-k szerepe még tisztázatlan volt SCLC-ben, de feltételeztük a progresszióban való részvételüket, miután egy analóg sejtpopuláció-vizsgálat (hemangio endotheliális progenitor sejtek) során szignifikáns klinikai összefüggést észleltünk az LVEPC-k és az érképződés között különböző humán malignus betegségekből (beleértve az NSCLC-t is). Tanulmányunkban SCLC betegek perifériás vérében flow cytometriával mértük a keringő LVEPC-k szintjét és vizsgáltuk a sejtszám összefüggését a lymphangiogenesis kulcsfontosságú citokinjének, a VEGF-C-nek a szérumszintjével, valamint ennek hatását a nyirok metasztázisok kialakulására és a túlélésre vonatkozóan.

I.2. Betegek és Módszer

2/1. Beteganyag

Tanulmányunk első részébe, amelyben az angiogén és nem angiogén fenotípusok biológiai viselkedését hasonlítottuk össze, összesen 103, az Országos Korányi Pulmonológiai Intézetben (OKPI) NSCLC-vel kezelt beteget vontunk be. Továbbá, az LVEPC-k mérése céljából, perifériás vérminta-gyűjtést kezdeményeztünk 88 lokálisan kiterjedt stádiumú SCLC betegtől a kezelés megkezdése előtt. A kontroll csoportba 32 egészséges egyént vontunk be.

1. táblázat – A 103 NSCLC miatt – az OKPI-ben – kezelt beteg klinikopatológiai jellemzői.

	Betegek (%)
Összes beteg	103 (100%)
Kor (év)	60,4 ± 9,1
63<	59 (57%)
63≥	44 (36%)
Nem	
Férfi	62 (60%)
Nő	41 (39,8%)
Dohányzás	
Nem dohányzó	40 (39%)
Dohányzó	63 (61%)
Szövettani típus	
Laphámrák	53 (51,4%)
Adenocarcinoma	42 (41%)
Nagysejtes carcinoma	8 (7,6) %
Tumor differenciáció	
Rosszul	34 (33%)
Közepesen	42 (41%)
Jól	27 (26%)

2. táblázat – A 88 lokálisan kiterjedt stádiumú SCLC beteg klinikopatológiai jellemzői.

	Betegek (%)	CD34+/VEGFR3+		p érték
		LVEPC		
		Alacsony (%)	Magas (%)	
Kor (év)				
63<	43 (48,9%)	22 (50%)	21 (47,7%)	0,83
63≥	45 (51,1%)	22 (50%)	23 (52,3%)	
Dohányzás				
Nem dohányzó	13 (14,8%)	6 (13,7%)	7 (15,9%)	0,77
Dohányzó/ex-dohányzó	75 (85,2%)	38 (86,3%)	37 (84,1%)	
Nem				
Férfi	54 (61,4%)	25 (56,8%)	29 (65,9%)	0,38
Nő	34 (38,6%)	19 (43,2%)	15 (34,1%)	
N stádium				
N0-1	24 (27,3%)	21 (47,3%)	3 (6,8%)	<0,01
N2-3	64 (72,7%)	23 (52,7%)	41 (93,2%)	
T stádium				
T1	8 (9,1%)	6 (13,6%)	2 (4,5%)	0,14
T2-4	80 (90,9%)	38 (86,4%)	42 (95,5%)	
VEGF-C szint				
Magas	44 (50%)	22 (50%)	22 (50%)	1
Alacsony	44 (50%)	22 (50%)	22 (50%)	
Terápia				
EP	68 (77,3%)	37 (84.1%)	31 (70,5%)	0,13
EP+CEV	20 (22,7%)	7 (15.9%)	13 (29,5%)	

2/2. Módszerek

2/2/1. A nyirokrendszer karakterizálása immunhisztokémiai módszerekkel

Immunfluoreszcens festés céljából a metszeteket szimultán inkubáltuk a megfelelő primer (LYVE-1, D2-40, CD31, Ki67, VEGF-C) majd másodlagos antitestekkel. Végül háttérfestést végeztünk metilénzölddel. A VEGF-C státusz meghatározásához a mintákat pozitív és negatív csoportokba osztottuk, korábbi vizsgálatok cut-off értékeit használva. Amikor a tumorsejtek 30%-a egy adott anyagban pozitívan festődött, akkor tekintettük a mintát VEGF-C pozitívnak. Ellenkező esetben VEGF-C negatívnak tekintettük. A szeleteket Nikon Eclipse 80i mikroszkóppal vizsgáltuk és a digitális képeket SPOT digitális kamerával (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI), vagy Bio-Rad MRC-1024 konfokális lézer-szkennelésű mikroszkópos rendszerrel (Bio-Rad, Richmond, CA) készítettük.

2/2/2. A nyirokrendszer komputer-asszisztált morfolometriai analízise

A morfolometriai paramétereket a nyirokkapillárisok anti-humán LYVE-1 és anti-humán D2-40/podoplanin festésével határoztuk meg. Minden metszetben három különböző területet vizsgáltunk: tumor centrum, tumor periféria (1 mm széles tumorgyűrű, ami közvetlenül kapcsolódik az invazív rész széléhez), és peritumorális tüdőszövet (1 mm széles kötőszöveti gyűrű közvetlenül a tumor periféria mellett). Tumoronként három szeletet elemztünk a CUE-2 számítógépes képelemző rendszer (Olympus, Tokyo, Japan) segítségével.

2/2/3. SCLC betegek perifériás véréből történő LVEPC szám meghatározás

A keringő LVEPC sejtszám meghatározása flow cytometriás analízissel történt. Fluorochrom kötött izotóp kontrollokat használtunk minden festéshez. A megfelelő festődést követően a CD34+/VEGFR3+ kettős pozitív sejteket megszámloltuk és az adatokat sejtszám/vér ml-ben adtuk meg (CyFlow SL flow citométer és FlowMax szoftver - Partec).

2/2/4. Perifériás vér VEGF-C szint mérése

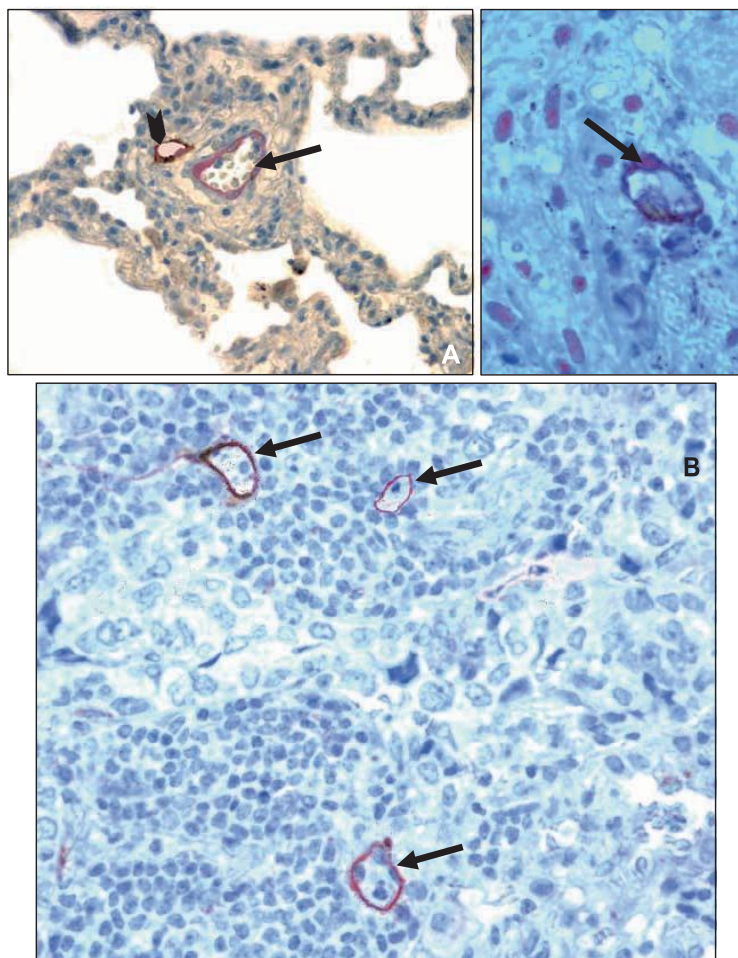
VEGF-C szint meghatározásához szérum mintát vettünk valamennyi egészséges kontroll egyén és a betegek perifériás véréből. A VEGF-C szint mérését gyári ELISA kit felhasználásával végeztük.

I.3. Eredmények

3/1. A nyirokerek azonosítása normál tüdőszövetben LYVE-1 és D2-40 antitesttel

A normál tüdőszövet immunfestése LYVE-1-gyel hasonló mintázatot adott, mint D2-40-nel. Pozitív festés volt megfigyelhető a vékonyfalú, vörösvértesteket nem tartalmazó nyirokkapillárisokban. A nyirok- és vérerek közötti különbséget tovább erősítette a kettős immunfestés LYVE-1-gyel vagy D2-40 podoplaninnal és a vérér kapilláris endothélt jelölő CD31. A LYVE-1 és D2-40 pozitív erek gyengén CD31 pozitívak is voltak, és ellenkezőleg, a vörösvértesteket tartalmazó CD31 pozitív erek LYVE-1 és D2-40 negatívak voltak.

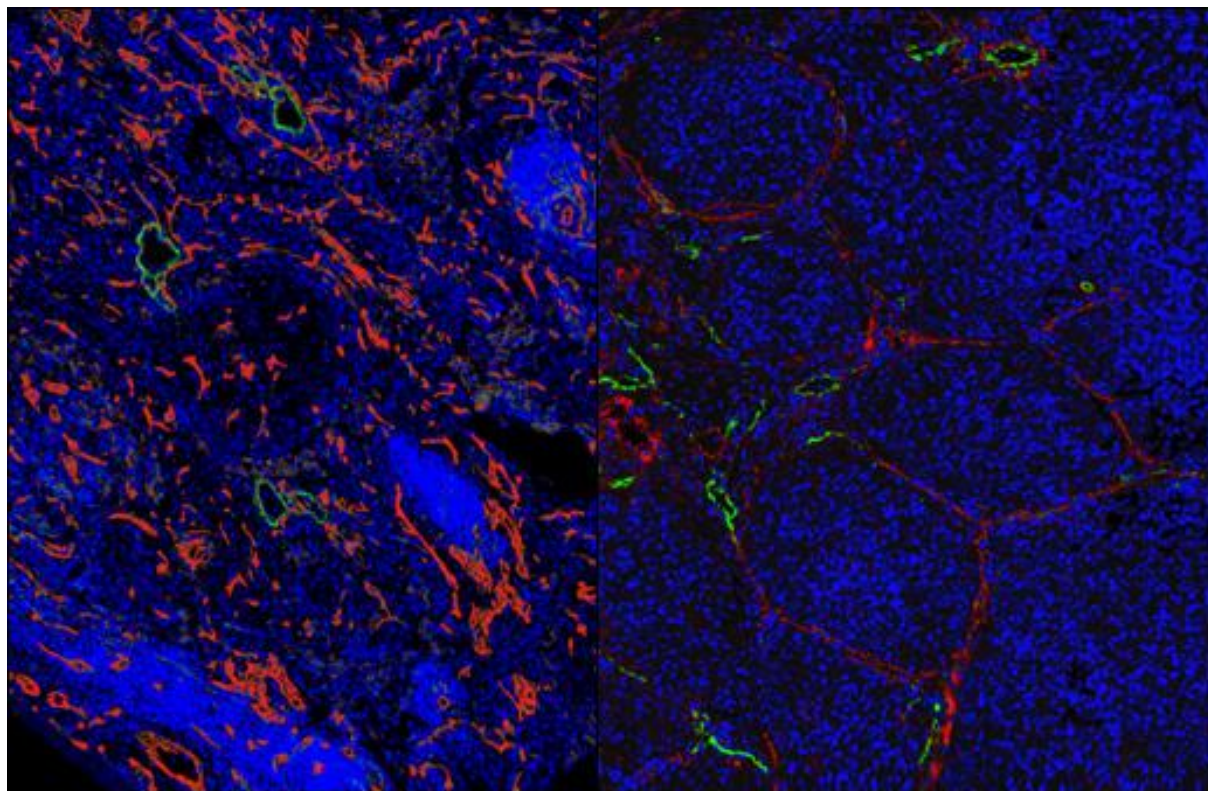
1. ábra – Nyirokkapillárisok normális tüdőszövetben és NSCLC-ben. **(Felül)** Nyirokerek (LYVE-1; barna, nyílhegy) immunfestése és erythrocytát tartalmazó vérkapilláris (CD31; rózsaszín, nyíl) normál tüdőszövetben. A LYVE-1-pozitív nyirokér gyengén CD31 pozitív. A vérér negatív LYVE-1-el. **(Alul)** Az NSCLC tumor perifériás szövetének LYVE-1-el és D2-40-al történő kettős immunfestése. LYVE-1 (barna) úgy tűnt, hogy csak a nyirokerek egy alcsoportját festette meg, amikor összehasonlítottuk D2-40-al (rózsaszín). A három látható nyirokkapillárisból (nyílak) csak egy volt LYVE-1 pozitív. Jobb, pozitív Ki67 festés (rózsaszín) látható a tumor sejtek nucleolusában és a nyirokkapillárisokban (barna), valamint az endotheliális sejtekben (nyíl).



3/2. A nyirokerek karakterizálása NSCLC-ben

Fenti célból immunfestést végeztünk LYVE-1 és D2-40 antitestekkel. Mindkét esetben pozitív nyirokkapillárisok helyezkedtek el a peritumorális tüdőszövetben és a tumorok periferiáján. A LYVE-1 festés hiányzott a tumorok centrumából, kivéve a nem angiogén, szöveti destrukció

nélkül növekvő tumorokat, ahol a LYVE-1-et expresszáló erek elsősorban a kooptált vérerek mentén helyezkedtek el. A D2-40 antitest vizsgálata során a tumor centrális területein azonban nyirokkapillárisokat fedeztünk fel homogénen elszórva a tumorokban. Ezekben az angiogén tumorokban a D2-40 pozitív nyirokerek véletlenszerűen oszlottak el a tumormasszában.

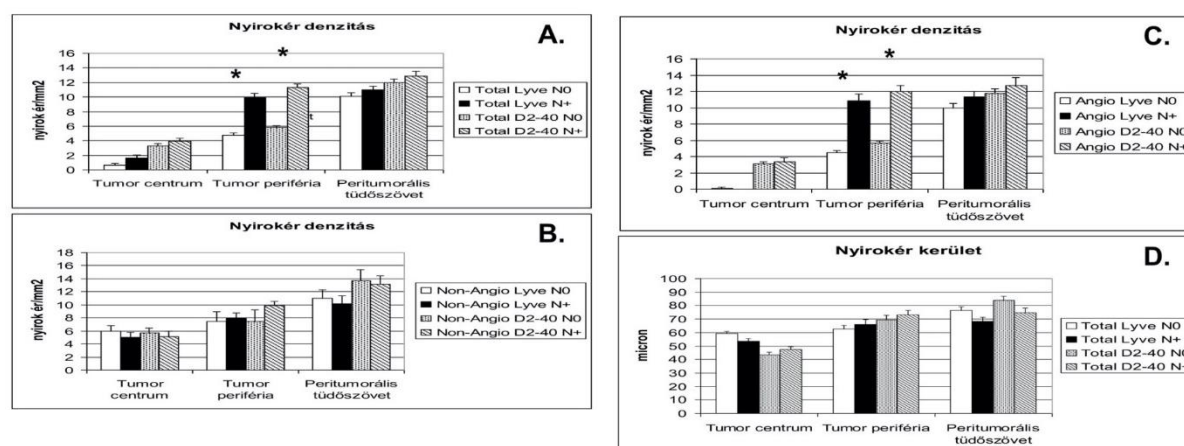


2. ábra – A nyirokerek eloszlása és példák a VEGF-C-t célzó immunfestésekre humán NSCLC-ben angiogén fenotípus alapján. **(Bal)** A destruktívan növekedő angiogén NSCLC-ben jelentős angiogenezis és magas intratumorális érszám észlelhető (CD31; piros fluoreszcencia), a nyirokerek pedig véletlenszerű eloszlást mutattak a tumormassza periferiáján (LYVE-1; zöld fluoreszcencia). **(Jobb)** A nem-angiogén NSCLC-ben a tumor sejtek kitöltik az alveolusokat az alveoláris fal destrukciója nélkül (ezek tartalmazzák a körülöttött vérereket [CD31; piros fluoreszcencia] és a nyirokkapillárisokat [LYVE-1; zöld fluoreszcencia]).

3/3. Nyirokér denzitás és kerület NSCLC-ben

Mivel az N1 és N2 csoportok nem különböztek az LVD (Lymphatic Vascular Density, nyirokér denzitás) tekintetében, ezért nyirokcsomó pozitív és nyirokcsomó negatív csoportokat állítottunk fel. Mind LYVE-1, mind D2-40 festéssel az összes alkalmazott kategóriában a tumor periferián, illetve a peritumorális kötőszövetben szignifikánsan több nyirokér helyezkedett el, mint a tumorok centrumában. Az LVD-k értékelése során (LYVE-1, vagy D2-40) a

peritumorális kötőszövet és a tumor centrum LVD és a nyirokcsomó status között nem igazolódott szignifikáns összefüggés. Ugyanakkor a perifériás LVD-k szignifikánsan magasabbak voltak a nyirokcsomó pozitív csoportban a nyirokcsomó negatív csoporthoz képest. Korábbi megfigyelések alapján, illetve a CD31 immunreaktivitást felhasználva a daganatok angiogén és nem angiogén tumorokra lettek felosztva. A nem angiogén tumorcsoportban az LVD értékek nem adtak prognosztikus információt egyik tumorterületből sem. Az angiogén tumorokban a tumor periféria LVD mind LYVE-1, mind D2-40 immunreaktivitás alapján szignifikánsan nagyobb volt a nyirokcsomó pozitív csoportban a nyirokcsomó negatívhoz képest. Bár az LVD kvantifikálása D2-40-nel pozitív korrelációt adott a tumorcentrum LVD és a nyirokcsomó metasztázisok között az angiogén tumorokban, ez a tendencia nem volt statisztikailag szignifikáns. Nem volt korreláció a tumorcentrum LVD és a nyirokcsomó status között az angiogén tumorcsoportban LYVE-1 immunfestéssel. Sem LYVE-1, sem D2-40 festés során nem igazolódott összefüggés a lymphatikus progresszió és a peritumorális LVD között.



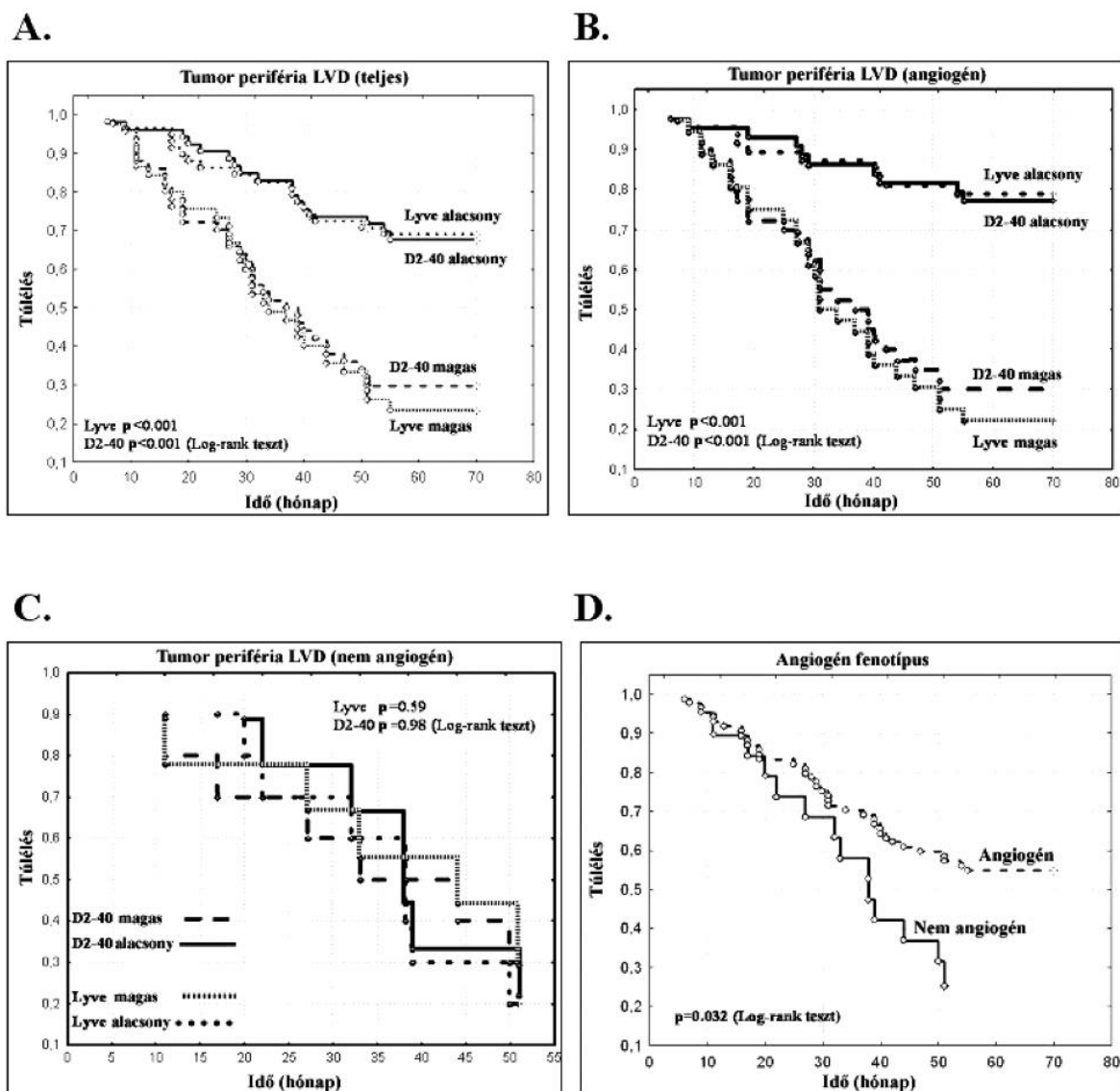
3. ábra – Az intra- és peritumorális nyirokerek morfológiai vizsgálatára LYVE-1 és D2-40 immunfestésre alapozva nem metasztatizáló (N0) vs. nyirokcsomó áttétet adó (N+) NSCLC-ben. A nyirokér denzitás (LVD) átlagos nyirokér szám per négyzetmilliméter-ben van kifejezve. A nyirokér terület micronokban van jelezve. **(A)** nyirokér denzitás értékek a teljes populációban *, $P < 0,005$ (vs. nem-metasztatikus csoportok), egy-irányú ANOVA, majd Neuman-Keuls többszörös összehasonlító teszt; $n = 103$. **(B)** Nyirokér denzitás értékek a nem angiogén tumorokban; $n = 19$. **(C)** Nyirokér denzitás értékek az angiogén tumorokban; *, $P < 0,005$ (vs. nem-metasztatikus csoportok), egy-irányú ANOVA, majd Neuman-Keuls többszörös összehasonlító teszt; $n = 84$. **(D)** a nyirokér terület értékek a teljes populációban; $n = 103$

3/4. Túlélés

Mivel a nyirokcsomó metasztázist adó NSCLC-re szignifikáns tumor periféria LVD emelkedés volt jellemző, Kaplan-Meier analízissel meghatároztuk az alacsony és magas tumor periféria LVD értékkel bíró betegek átlagos túlélését. Ezen besorolás az LVD-k középtékein alapult. Úgy találtuk, hogy a tumorperiférián tapasztalható fokozott lymphangiogenezis a rövidebb túlélés szignifikáns prognosztikai faktora volt. A betegek ötéves túlélési aránya magas LYVE-1-LVD-vel és alacsony LYVE-1-LVD-vel 23,3%, illetve 68,7 % volt ($p < 0,001$). A magas, illetve az alacsony D2-40 LVD szintekkel rendelkező betegek ötéves túlélési arányának az összehasonlítása 30%-ot, illetve 67,2 %-ot adott ($p < 0.001$). Ugyanakkor, amikor a daganatokat az angiogén fenotípusuk szerint osztályoztuk, ez a tendencia csak az angiogén daganatcsoport esetében volt szignifikáns és nem tudtunk statisztikailag szignifikáns következtetést levonni a nem angiogén daganatok LVD-iből.

Mivel úgy találtuk, hogy a nem angiogén fenotípus és a nyirokcsomó áttétek kialakulásának kockázata kapcsolatban áll egymással, a betegpopulációnk átlagos túlélését a daganatok angiogén fenotípusa szerint is kielemeztük és azt figyeltük meg, hogy a nem angiogén daganattal rendelkező betegeknek jelentősen rosszabb túlélési esélyeik voltak, mint az angiogén fenotípusú daganattal rendelkező betegeknek.

Megpróbáltunk továbbá összefüggést találni a SCLC-s betegek túlélése és perifériás vérben mért LVEPC szint között is. Tekintettel arra, hogy nyirokcsomó érintettséggel rendelkező SCLC betegeknél emelkedett LVEPC számot észleltünk, Kaplan-Meier analízissel tovább vizsgáltuk a teljes túlélést, két csoportra osztva a betegeket az észlelt alacsony, illetve magas LVEPC szintek alapján. Azt találtuk, hogy azoknál a betegeknél, akiknél alacsony kiindulási CD34+/VEGFR3+ szintet detektáltunk, szignifikánsan hosszabb volt a túlélés, mint a kezelés előtt mért magasabb keringő LVEPC sejtszámú betegeknél. A multivariáns analízis (bele foglalva a standard prognosztikai eltéréseket, mint az életkor, nem, tumor és nyirokcsomó stádium) szintén jelezte, hogy a kezelés előtti keringő LVEPC szint független prediktora ezen változóknak.



4. ábra – (A) Kaplan-Meier görbe – össztúlélés a teljes NSCLC populációban a tumor periféria nyirokér denzitás (LVD) függvényében (LYVE-1 és D2-40 festéssel meghatározva). (B) Kaplan-Meier görbe – össztúlélés az angiogén betegpopulációban, a tumor periféria nyirokér denzitás (LVD) függvényében (LYVE-1 és D2-40 festéssel meghatározva). (C) Kaplan-Meier görbe – össztúlélés a nem-angiogén NSCLC populációban a tumor periféria nyirokér denzitás (LVD) függvényében (LYVE-1 és D2-40 festéssel meghatározva). (D) Kaplan-Meier görbe – össztúlélés a teljes NSCLC populációban az angiogén fenotípus függvényében.

3/5. Lymphatikus proliferáció

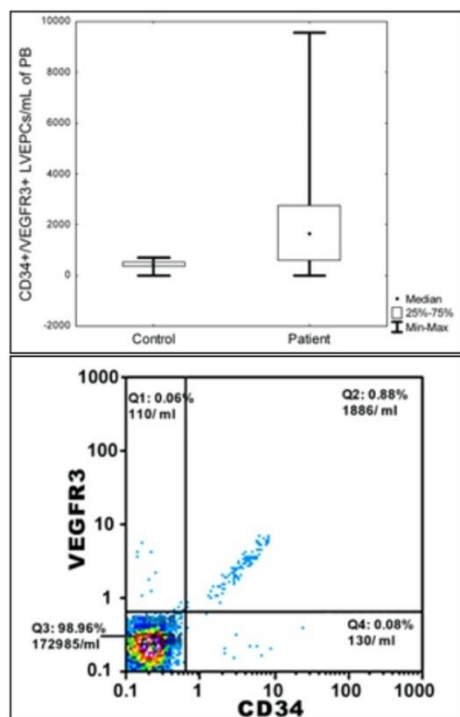
A nyirokerek proliferációs statusának vizsgálatára kettős immunfestést alkalmaztunk a D2-40, illetve Ki67 nukleáris fehérje ellenes antitestekkel. Az eredmények megerősítették, hogy a Ki67 magfestés, ahogy az várható volt az endothelsejtekben és daganatsejtekben is látható volt. Az endothelsejt jelölési index mindig a peritumorális kötőszövetben volt a legmagasabb és minden esetben alacsonyabb volt a tumor centrumban, mint a tumor periferián. A legszélsőségesebb helyzet a nem angiogén tumorcsoportban volt, ahol egy viszonylag alacsony számú osztódó endothelsejt volt észlelhető peritumorálisan, viszont nem volt Ki67 festés intratumorálisan. Ez azt jelenti, hogy a nem angiogén tumorokban elhelyezkedő intratumorális nyirokerek valójában a növekvő tumormassza által bekebelezett kapillárisok. Ezzel szemben az angiogén tumoroknál a nyirok endothelsejtek proliferációjának megfigyelése során minden vizsgált területen osztódó magokat láttunk.

3/6. VEGF expresszió NSCLC-ben

A 103 NSCLC daganatból 56 volt VEGF-C pozitív. Nem volt festődés normál tüdőszövetben. A VEGF-C-t gyakrabban expresszálták az angiogén tumorok, mint a nem angiogének. A festődési minta diffúz (döntően az angiogén tumoroknál) vagy fokális (döntően a nem angiogén tumoroknál) mintázatot mutatott. Nem találtunk összefüggést a kor, a nem, a szövettani típus vagy a dohányzási szokás és a VEGF-C expresszió között. Nem volt összefüggés a VEGF expresszió intenzitása és a nodalis status, vagy az LVD között sem podoplanin, sem LYVE-1 festéssel. Továbbá nem tudtunk összefüggést kimutatni a VEGF-C expresszió és az endothelsejt jelölési index között. Ezek alapján nem tudtuk a VEGF-C expresszió prognosztikai szerepét kimutatni multivariáns analízisben sem.

3/7. LVEPC szint meghatározás SCLC betegek perifériás vérében

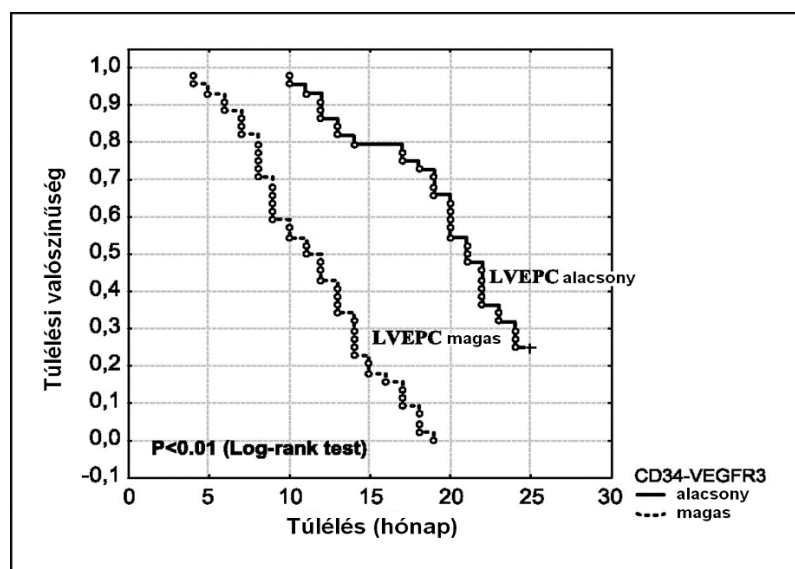
Munkánkban meghatároztuk a CD34+/VEGFR3+ kettős pozitív LVEPC sejteket 32 egészséges önkéntes kontroll egyénél és 88 SCLC betegnél flow cytometriával. A kontroll csoportban a CD34+/VEGFR3 keringő LVEPC sejtek átlag értéke 455/mL volt a perifériás vérmintákban. SCLC betegeknél ez az érték szignifikánsan magasabb volt, a középérték 1625/mL –nek felelt meg.



5. ábra – A keringő LVEPC kvantitatív elemzése flow citometriával. Felül, doboz diagram, amely a keringő CD34-pozitív/VEGFR3-pozitív LVEPC szintek medián, 25-75% kvartilis és a minimum/maximum értékét mutatja a kontrol csoportban (n = 32) és az SCLC betegeknél (n = 88). Alul, egy reprezentatív flowcitometriás analízis a CD34-pozitív/VEGFR3-pozitív LVEPC-re vonatkozóan.

3/8. Az LVEPC szint és a klinikopatológiai paraméterek összefüggései

Az LVEPC számot betegeink klinikopatológiai faktoraival összefüggésben is kiértékeltek. Statisztikailag szignifikáns összefüggést észleltünk az LVEPC szint és a nyirokcsomó metasztázisok között. További klinikai paraméterekkel, mint a nem, dohányzási szokás, életkor és a tumor stádium nem találtunk szignifikáns összefüggést.



6. ábra - Kaplan-Meier görbe – ösztülélés a teljes SCLC betegpopulációra vonatkoztatva, a perifériás vérben mért keringő CD34-pozitív /VEGFR3-pozitív LVEPC szintek függvényében.

3/9. VEGF-C szint SCLC betegek perifériás vérmintájában

Annak ellenére, hogy a VEGF-C szérumszint a betegeknél szignifikánsan emelkedett volt a kontroll (egészséges) egyénekéhez viszonyítva, szignifikáns kapcsolatot nem tudtunk kimutatni a kulcsfontosságú lymphangiogén molekula, a VEGF-C és a keringő CD34+/VEGFR3+ LVEPC szám között. Ezen felül, azon esetekben, amikor a VEGF-C szint emelkedett volt, szintén nem észleltünk szignifikáns összefüggést a betegek egyéb klinikopatológiai faktoraival (életkor, dohányzási szokás, nem, tumor stádium és a nyirokcsomó státusz) szempontjából sem.

I.4. Megbeszélés

4/1. A lymphangiogenezis vizsgálata és jelentősége NSCLC-ben

Az angiogén NSCLC-ben a nyirokerek a tumorok perifériáján fontosabb szerepet töltenek be a metasztatikus folyamatban, mint a peritumorális lymphatikus hálózat (melynek területén a lymphatikus hotspotok találhatóak), vagy a tönkretett és ezáltal nem funkcionáló tumor centrum nyirokerek.

Az úgynevezett nem angiogén tumorok rendkívül agresszívek és a bekebelezett tüdőnyirokerek kulcsszerepet játszhatnak a már perzisztáló vérér kapillárisok mellett. A bekebelezett nyirokerek jóval effektívebbek lehetnek, mint az újonnan képződtek, mivel a nem angiogén tüdődaganatokban a nyirok így közvetlenül a bekebelezett gazdaszöveti tüdő nyirokér hálózatba kerül, míg az angiogén tumorokban kizárólag a daganatok perifériájáról vezetnek nyirokerek a környező normál szövetbe. Nem angiogén tumorokban így módon a nyirokrendszeren át történő tumor disszemináció a korábban már meglévő nyirokutak segítségével történhet a teljes tumormasszából.

Munkacsoportunk megemelt VEGF-C immun-reaktivitást észlelt NSCLC-ben a normál tüdőszövethez képest, azonban nem volt kézzelfogható összefüggés a VEGF-C expresszió és az LVD értékek, a nyirokcsomó metasztázisok, vagy a betegek túlélése között. Továbbá nem tudtunk összefüggést kimutatni a VEGF-C expresszió és a lymphatikus endotheliális sejt jelölési indexe között. Ezért nehéz arra következtetni, hogy a lymphangiogenezis a humán tüdőrákban a VEGF-C hatásának az eredménye, ahogy azt korábbi kísérletes modellekben leírták. A mi eredményeink inkább azt sugallják, hogy a VEGF-C leginkább túlélési faktorként működik a tüdődaganatokban. Ezt a gondolatot tovább erősítette a megfigyelés, hogy a nem angiogén tumorokban, amelyek nem mutattak intratumorális nyirokér bimbózást, a VEGF-C

expresszió a bekebelezett nyirokerek közvetlen szomszédságára korlátozódott. Ugyanakkor valószínű, hogy hasonlóan, mint a tumor indukálta angiogenezis esetében, ahol több cytokin interakciója kontrollálja a tumor vaszkularizációt, a lymphangiogén faktorok egy dinamikus egyensúlya határozza meg a lymphangiogenezis aktivitását.

4/2. A lymphovaszkulogenezis (LVEPC-k) vizsgálata és jelentősége SCLC-ben

Munkánkban elsőként mutatjuk be, hogy az SCLC betegek perifériás vérében keringő CD34+/VEGFR3+ LVEPC sejtszám szignifikánsan emelkedett a tumormentes kontroll egyénekével összehasonlítva, és ezen sejtszint a nyirok metasztázis kialakulásával és így a klinikai viselkedéssel is összefüggésben áll. Az LVEPC sejtek hozzájárulhatnak mind a nyirok-, mind a vérer kapilláris kialakulásához humán SCLC-ben. Jelen tanulmány nem tette lehetővé sem az LVEPC sejtek vaszkulogén aktivitásának mérését, sem a vaszkulogenezishez, illetve lymphangiogenezishez való hozzájárulás arányának megállapítását. Azonban megfigyelhettük, hogy az LVEPC sejtek száma kapcsolatban állt a nyirokcsomó metasztázisok kiterjedésével. Ezek alapján feltételezhető, hogy ezen sejteknek potenciális szerepük van a lymphangiogenezis folyamatában, vagy hasonló mozgató rugója van az SCLC nyirokcsomó áttétek progressziójának és az LVEPC sejtek csontvelőből történő mobilizációjának. A fenti elmélet alapján feltételezhető, hogy megfigyelésünk (az emelkedett LVEPC szám) az emelkedett VEGF-C szint, valamint az emelkedett VEGFR3 ligand eredménye.

Munkánkban perifériás vérben vizsgáltuk a VEGF-C szintet és azt találtuk, hogy bár a koncentrációja szignifikánsan magasabb volt SCLC betegeknél a kontroll (egészséges) csoporthoz képest, statisztikailag nem volt szignifikáns kapcsolat a VEGF-C szint és a keringő LVEPC sejtszám között. Azon megfigyelésünkön túlmenően, miszerint SCLC betegeknél (összehasonlítva a kontroll csoporttal) emelkedett kezelés előtti keringő LVEPC sejtszámot észleltünk, ezen 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 utánkövetés alatt szignifikánsan magasabb halálozást észleltünk azoknál a betegeknél, akiknél magas LVEPC számot detektáltunk, összehasonlítva az alacsonyabb kiindulási LVEPC számú csoporttal. Mindez arra enged következtetni, hogy flow cytometriával a perifériás vérből mért LVEPC sejtszám korrelál a humán SCLC klinikai viselkedésével.

Bár az SCLC betegeknél emelkedett VEGF-C koncentrációt észleltünk a kontroll csoporthoz képest, nem találtunk jelentős összefüggést a VEGF-C szint és a betegek túlélése között. Továbbá szintén nem volt különbség a VEGF-C szint tekintetében a klinikopatológiai jellemzők, és az N1, illetve N2-3 betegség stádium függvényében sem.

I.5. Következtetések

Összefoglalva, a tüdőrák áttéteinek megjelenése egy kulcsesemény, amelyet gyakran prognosztikai faktorként használunk. A mi munkánk elsőként bizonyítja, hogy a lymphangiogenesis kizárólag az angiogén növekedési típusú tüdődaganatokban jelenik meg és, hogy az LVD összefügg a klinikai viselkedéssel és a nyirokcsomó státusszal ezen növekedési típussal rendelkező tüdődaganatban.

Továbbá szintén az első bizonyítéka annak, hogy a nyirokcsomó metasztázisok megjelenésének veszélye és a rövidebb túlélés valószínűbb a nem angiogén betegpopulációban, és hogy a nem angiogén tumorok elsősorban bekebelezik a gazdaszöveti nyirokereket növekedésük során ellenben az angiogén tumorokkal, amelyek folyamatos lymphangiogenesis kíséretében növekednek. Ez utóbbi azt sugallja, hogy tüdőrákban a bekebelezett nyirokerek fontosabbak a metasztatikus folyamatban, mint az újonnan képződöttek. Ez a feltevés ugyanakkor további vizsgálatokat és klinikai igazolást kíván.

Munkánkban ugyancsak elsőként bizonyítottuk, hogy SCLC betegek perifériás vérében szignifikánsan emelkedett a csontvelő eredetű LVEPC sejtek szintje, amely korrelál a nyirokcsomó metasztázissal és a rosszabb prognózissal. További kutatások szükségesek annak eldöntése érdekében, hogy ezen LVEPC sejtek targetálásával lehetővé válik-e az SCLC-vel diagnosztizált betegek gyógyítása, vagy mivel ezen sejtek képesek a daganatos nyirokérhálózatba beépülni, érdemesebb esetleg az LVEPC-k manipulálása (például toxinokkal történő összekapcsolás révén) a daganatsejtek elpusztítása céljából. Végül, mivel fenti eredményeink nem specifikusak SCLC-re vonatkozóan, számos új eljárás kidolgozásában segíthetnek a malignus tumorok elleni küzdelemben.

II. Prognosztikai faktorok mellkasi szoliter fibrózus tumorok esetén

II.1. Bevezetés

A szoliter fibrózus tumorok a test bármely területén előfordulhatnak. Leggyakrabban a mellkason belül, a mellhártyából indulnak ki, azonban előfordulhatnak még a fej-nyaki régióban, az emlőben, a vesében, a prosztatában, valamint a gerincvelőben is.

A mellkason belül elhelyezkedő (intrathoracalis) szoliter fibrózus tumorok a ritka előfordulású betegségek közé tartoznak. Kb. 80%-a a daganatoknak a zsigeri mellhártyából, míg 20%-a a mellkasfali mellhártyából indul ki. Az esetek megközelítőleg felében a daganatok semmilyen tünetet nem okoznak, és véletlenül kerülnek felfedezésre, egyéb okból elvégzett képalkotó vizsgálatok során. A tünetet okozó elváltozásoknál általában nagy méretük miatt alakulnak ki nyomási tünetek, mint nehézlégzés vagy mellkasi fájdalom. Néhány esetben a daganatok úgynevezett Doege-Potter szindrómát okozhatnak, melynek lényege, hogy a nagy méretű tumorok által termelt insulin-like growth factor (IGF-2) folyamatos hypoglikémiát okoz.

A betegkivizsgálási algoritmus hagyományosan mellkas röntgen felvétellel indul, melyen észlelik az elváltozást. Ezt követi a mellkas CT vizsgálat, a daganat elhelyezkedésének, méretének és a műtéti terv felállításának céljából. Amennyiben szükséges a nem egyértelmű esetek megítélésére, az elváltozások nem sebészi szövettani mintavétele is elvégezhető, mely leggyakrabban CT vezérelt percutan biopsziát jelent.

A múltban a daganatok kezelését bonyolította egyfelől az összetett (és a részben félrevezető terminológia), másfelől a diagnosztikai markerek és a hisztopatológiai jellemzők hiánya. Azonban a modern patológia és a genetikai vizsgálatok fejlődése, standardizált nevezéktanhoz és megnövekedett biológiai ismeretanyaghoz vezetett, így a diagnózis pontosabb lett, valamint klinikailag is jobban kezelhetővé vált.

A szoliter fibrózus tumorokat jelenleg mesenchymalis eredetű jóindulatú, illetve rosszindulatú daganatok két csoportjába szokás osztani. Ezen kívül a genomiális változásokat illetően a NAB2-STAT6 génfüzióról kiderült, hogy kifejezetten megkülönböztető genetikai jellemzője ennek a ritka betegségnek. NAB2-STAT6 génfüziós altípusai és a TERT gén promoterében lévő mutációk prognosztikai jelentőséget mutattak a szoliter fibrózus tumorokban, valamint a tumorszövetben immunhisztokémiai úton detektált STAT6 expresszió további hasznos markerként használható az intra- és extrathoracalis daganatok diagnózisának igazolására.

A daganatok molekuláris és patológiai jellemzésének legújabb eredményei ellenére sincsenek egységes klinikai irányelvek, a kezelési, és a nyomon követési stratégiákat illetően. A jelenlegi standard eljárás a kuratív műtét, lehetőség szerint a tumor teljes eltávolításával, a dignitástól és az egyén patofiziológiai jellemzőitől függetlenül. A műtéttel ellentétben, a hagyományos kemo-, illetve sugárterápia és a célzott molekuláris terápia szerepe még tisztázandó.

A szoliter fibrózus tumorok kimenetelének megítélése továbbra is nagy kihívást jelent. A daganatok 80%-a szövettanilag jóindulatúnak igazolódik. Mindazonáltal a jóindulatú daganatok is kiújulhatnak, illetve átalakulhatnak rosszindulatú daganatokká. Összességében az összes beteg 15-20%-ánál jelentkezik kiújulás a kezdeti terápia után.

Az egyéni hisztopatológiai paraméterek csak korlátozott prognosztikai értékkel bírnak szoliter fibrózus daganatok esetében, szemben más daganatokkal. Ennek megfelelően számos olyan pontrendszert fejlesztettek ki, amely a szövettani és klinikai paramétereket ötvözve a kiújulás és a túlélés megbecsülését szolgálja. Azonban a legtöbb információ mindmáig a patológiai leletekből származik, és jelenleg nem létezik megbízható, non-invazív prognosztikus biomarker. Ennek megfelelően szükséges minél hamarabb jobb kockázati rendszerek kidolgozása, melyek segítenek a betegség lefolyását megérteni, illetve támpontokat adnak a megfelelő terápiás terv felállításához. Következésképpen, azon túl, hogy ezen ritka daganatokat a klinikai és a patológiai paramétereik alapján karakterizáljuk, kutatásunk a vérből származó non-invazívan nyert rutin markerek – mint lehetséges prognosztikai faktorok – elemzésére is összpontosított.

A kutatócsoportunk korábban – másokkal együttműködve – bebizonyította, hogy a keringő gyulladásos biomarkerek, köztük a C-reaktív protein (CRP), a fibrinogén és a neutrofil-limfocita arány (NLR) prognosztikus, míg a fibrinogén, illetve a CRP – a multimodális terápia megítélése szemszögéből – prediktív értékkel is bír malignus pleurális mezotelióma esetén. Továbbá kimutattuk, hogy a gyulladásos állapot negatív hatással van azoknak a betegeknek a túlélésére, akik kuratív tüdőáttét eltávolításon (metastasectomián) estek át, áttétet adó rosszindulatú vastagbél daganatok esetén. Így feltételeztük a kutatásunk kezdetekor, hogy a gyulladásos biomarkerek a szoliter fibrózus daganatok esetén is prognosztikai szereppel bírnak.

II.2. Betegek és Módszer

2/1. Beteganyag

Öt nemzetközi, nagy beteganyaggal és magas műtéti számmal rendelkező centrum vett részt a vizsgálatban: A Pisai Egyetem (Università di Pisa) Mellkassebészeti Osztálya, a Bécsi Egyetemi Kórház (Allgemeine Krankenhaus der Stadt Wien) Mellkassebészeti Osztálya, a Gazi Orvostudományi Egyetemi Kórház (Gazi Üniversitesi Hastanesi) Mellkassebészeti Osztálya, illetve hazánkban az Országos Onkológiai Intézet és Országos Korányi Pulmonológiai Intézet Mellkassebészeti Osztálya. Kezdetben 162 beteget vontunk be a vizsgálatba. 14 beteget zártunk ki a vizsgálatból, mert ismételt kiújuló tumora volt és nem állt rendelkezésre megfelelő mennyiségű információ a korábbi daganatával kapcsolatban. 5 beteg nem esett át kuratív célú műtéten, ezért szintén nem lett végül bevonva a vizsgálatba. 12 beteget vesztettünk el az utánkövetés során, míg 6 beteg esetén a végső szövettan nem szoliter fibrózus tumort igazolt (két beteg esetén mesotheliomát, egy-egy betegnél pedig neurinomát, gyulladásos pseudotumort, fibrosarcomát, illetve synovialis sarcomát). Tekintettel az előbbieken részletezett kizárási kritériumoknak, a végső beteganyagban 125 beteget vizsgáltunk. Retrospektív adatgyűjtést végeztünk a nemzetközi és a helyi etikai törvényeknek megfelelően, melyek megfelelnek a Helsinkai Deklarációban leírtaknak és figyelembe vették a résztvevő intézetek gyakorlatát és lehetőségeit (3. táblázat).

3. táblázat - Résztvevő központok, etikai engedélyek és a bevont betegek száma.

Mellkassebészeti Osztály, Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet, Budapest, Magyarország	Magyar Orvosi Kutatási Tanács (52614– 4/2013 / EKV)	n = 35
Mellkassebészeti részleg, Pisai Egyetem, Olaszország	Bioetikai Bizottság, Pisai Egyetem (791/2015)	n = 28
Mellkassebészeti részleg, Bécsi Orvostudományi Egyetem, Ausztria	Bécsi Orvostudományi Egyetem Etikai Bizottság (1671/2014)	n = 24
Mellkassebészeti Osztály, Gazi Orvostudományi Egyetem, Ankara, Törökország	Gazi Egyetem Etikai Bizottsága 129/2015 20	n = 20
Mellkassebészeti Osztály, Országos Onkológiai Intézet, Budapest, Magyarország	Magyar Orvosi Kutatási Tanács (52614– 4/2013 / EKV)	n = 18

Mind a 125 bevont beteg kuratív célú sebészeti beavatkozáson esett át 1999. január és 2016. február között. Minden beteg szövettani- és immunhisztokémiai vizsgálatát az adott intézetben dolgozó, mellkasi daganatokban jártas patológus vizsgálta. Az átlagos utánkövetési idő a műtétet követően 50 hónap volt (3 és 202 hónap között váltakozva), és mindösszesen 7 betegnél (5,6%) volt kevesebb, mint 12 hónap. Ezen 7 beteg esetén 3 hónapra ($n = 1$) vagy 6 hónapra ($n = 5$) a műtét után volt a kontroll CT vizsgálat.

A daganatok szövettani értékelése a Perrot és mtsai. által meghatározott algoritmus szerint történt. Röviden összefoglalva, a 0 és 1-s de Perrot stádiumú daganatos betegek voltak azok akiknél hiányzott a rosszindulatúság szövettani jele mind peduncularis (0-s stádium) mind szesszilis (1-s stádium) jelleg esetén. De Perrot 2 vagy 3-s stádiumúnak számított a daganat, ha szövettanilag észlelhetőek voltak rosszindulatúság jelei peduncularis (2) vagy szesszilis (3) elváltozások esetén. Az áttétet adó daganatok pedig a De Perrot 4-s stádiumba tartoztak.

A rosszindulatúság kritériumait a következőképpen határoztuk meg az England kritériumok alapján: magas mitotikus aktivitás, magas sejttartalom, sejtelhalás és bevézés jelenléte, celluláris polimorfizmus.

Minden gyulladásos paramétert perifériás vénás vérből határoztunk meg a hazabocsátás napján, illetve hét nappal az első műtéti beavatkozás előtt, a rutin vérvétel részeként. A műtéthez legközelebb eső, de mindenképp a műtét előtti értéket vettük alapul. A CRP meghatározása – egy centrum kivétel – az összes résztvevő intézetben hasonlóan egységesített módon történt turbidimetriás immunassay technikával, mely esetén a klinikai választóvonal a 0,5 mg/dl-s érték volt. A török beteganyagban a CRP nephelometrikus technikával került kiszámításra. A fibrinogén szint minden centrumban Claus metódussal lett meghatározva és az emelkedett értéket 390 mg/dl felett határoztuk meg. Végül az NLR értéket a vérben található neutrofil granulocita és lymphocita értékek arányából számoltuk ki, és az 5-nél nagyobb értéket vettük emelkedettnek, csakúgy, mint korábban egy malignus pleurális mezoteliómával kapcsolatos tanulmányunkban.

Az átlagéletkor (59 év $\pm$ 12,2 év) alapján két csoportot különítettünk el. Korábbi tanulmányok eredményeit figyelembe véve, a tumorméret alapján a 10 cm-s átmérőt határoztuk meg klinikai választóvonalnak.

2/2. Statisztikai analízis

A folytonos változókat mindig a közép-, illetve a két szélsőérték figyelembe vételével adtuk meg. A nem parametrikus adatokat Mann-Whitney U tesztel, míg a parametrikus adatokat kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze. Kategorikus változók esetén a Khi-négyzet próbát és a Fisher-egzakt tesztet alkalmaztuk. Esemény nélküli túlélés (EFS) esetén minden túlélési analízis a műtét és a halál időpontja/tumor kiújulása között eltelt időt vette figyelembe. Amennyiben a betegnél egyik sem következett be, az utolsó kontroll időpontját vettük alapul. Az egyváltozós túlélési analízist Kaplan-Meier túlélési görbék alapján végeztük log-rank teszttel, míg többváltozós analízis esetén Cox-regressziós modellt alkalmaztunk (a hazard ratio [HR] és a konfidencia intervallumok [CI] meghatározása révén).

Tekintettel arra, hogy a de-Perrot stádium és a tumor dignitás szorosan összefüggött egymással, a multivariáns túlélési analízisek alkalmával két modellt vizsgáltunk. Az első model tartalmazta az életkort (59 év felett vagy alatt), a tumor dignitást (jó- vagy rosszindulatú), a tumor méretet (10 cm feletti vagy 10 cm-s, illetve alatti), a rezekciós szélet (pozitív vagy negatív), a fibrinogén szintet (magas vagy alacsony), valamint az NLR értéket (5 feletti vagy alatti). A második modell a következő paraméterek alapján került kiszámításra: életkor (<59 év vagy ≥ 59), de Perrot stádium (korai vagy késői), tumor méret (>10 cm vagy ≤ 10 cm), rezekciós szél (pozitív vagy negatív), fibrinogén szint (magas vagy alacsony) és NLR (<5 vagy ≥ 5). A statisztikai számításokhoz az SPSS 21 statisztikai programot használtuk, a nullhipotézis elvét pedig $p < 0,05$ esetén vetettük el.

II.3. Eredmények

3/1. Klinikai jellemzők és műtét utáni morbiditás, illetve mortalitás

A vizsgálat során összesen 74 nőt (59,2%) és 51 férfit (40,8%) vizsgáltunk, akiknek előzetes szövettani vizsgálat erősítette meg a mellkasi szoliter fibrózus tumorát. Az átlag életkor, illetve a standard deviáció $59 \pm 12,2$ év volt. A legfiatalabb beteg 25 éves, a legidősebb 86 éves volt. A résztvevő centrumok betegeinek legfontosabb klinikopatológiai jellemzői a 4-es táblázatban láthatóak. Körülbelül a vizsgált csoport fele sohasem dohányzott életében ($n = 55$; 44,8%), és érdekes módon 17 beteg (13,6%) szenvedett egyéb rosszindulatú daganatos betegségben a szoliter fibrózus tumor mellett. A betegek döntő többsége hagyományos, nyílt tüdőműtéten (thoracotomia) esett át ($n = 91$, 72,8%), míg azokat a betegeket, akik klasszikus

videothoracoscopos (azaz VATS [n = 32]), vagy robottal végzett műtéten (n = 2) estek át, összefoglalóan a VATS csoportba soroltuk (n = 34, 27,2 %). A VATS csoportnak szignifikánsan rövidebb volt a kórházi tartózkodási ideje szemben a hagyományos műtéten átesett betegekkel (átlagos kórházi tartózkodás VATS csoport esetén 5 nap, míg nyílt műtét esetén 7 nap volt, Mann Whitney U teszt, $p < 0,001$). Megjegyzendő azonban, hogy a VATS csoportba tartozó szoliter fibrózus tumorok jelentősen kisebbek voltak a nyílt műtéttel kezelt esetekhez képest (az átlagos méret a VATS csoportban 3,25 cm, míg a nyílt műtéti csoportban 8,3 cm volt, Mann Whitney U teszt $p < 0,001$), illetve minden esetben jóindulatúak voltak (21 rosszindulatú szoliter fibrózus tumort operáltak nyílt műtét során, míg VATS technikával 0-t, Khí-négyzet próba; $p = 0,002$).

4. táblázat - A páciensek jellemzői a teljes kohorsz vizsgálatban (n = 125).

Nem	Nő	74 (59,2%)
	Férfi	51 (40,8%)
Dohányzás	Soha nem dohányzott	56 (44,8%)
	Dohányzott	53 (42,4%)
	Nincs adat	16 (12,8%)
A betegség kiújulása	Nem újult ki	111 (88,8%)
	Kiújult	14 (11,2%)
Műtét típusa	VATS	34 (27,2%)
	Nyitott	91 (72,8%)
Kiegészítő terápia	Szisztémás terápia	6 (4,8%)
	Radioterápia	7 (5,6%)
	Kemo-radioterápia	2 (1,6%)
	Csak műtét	110 (88%)
Tumor dignitása	Benignus	104 (83,2%)
	Malignus	21 (16,8%)
Tumor mérete	≤10 cm	86 (68,8%)
	>10 cm	39 (31,2%)
Rezekciós szélek	Negatív	112 (89,6%)
	Pozitív	9 (7,2%)
	Nincs adat	4 (3,2%)
De Perrot stádium	0	49 (39,2%)
	1	38 (30,4%)
	2	14 (11,2%)
	3	19 (15,2%)
	4	1 (0,8%)
	Nincs adat	4 (3,2%)

CD34	Pozitív	125 (100%)
	Negatív	0
Bcl2	Pozitív	66 (52,8%)
	Negatív	0
	Nincs adat	59 (47,2%)
CD99	Pozitív	34 (27,2%)
	Negatív	0
	Nincs adat	91 (72,8%)
Medián CRP (tartomány) mg/dl (n = 62)		0,59 (0,2–35)
Medián Fibrinogén (tartomány) mg/dl (n = 79)		350 (200–1098)
Medián NLR (tartomány) (n = 111)		2.51 (0,93–16,38)

A teljes tumorszövet eltávolításának aránya (R0 rezekció) hasonló volt mindkét csoportban (31 szoliter fibrózus tumor esetében történt R0 rezekció a VATS csoportban [93,9%], míg 81 daganat esetében nyílt tüdőműtét során [92%], Fisher-egzakt teszt; $p = 1,000$). Ez arra enged következtetni, hogy kis méretű és jóindulatú szoliter fibrózus tumorok esetében a megfelelő eljárási mód a VATS, illetve a robot technika.

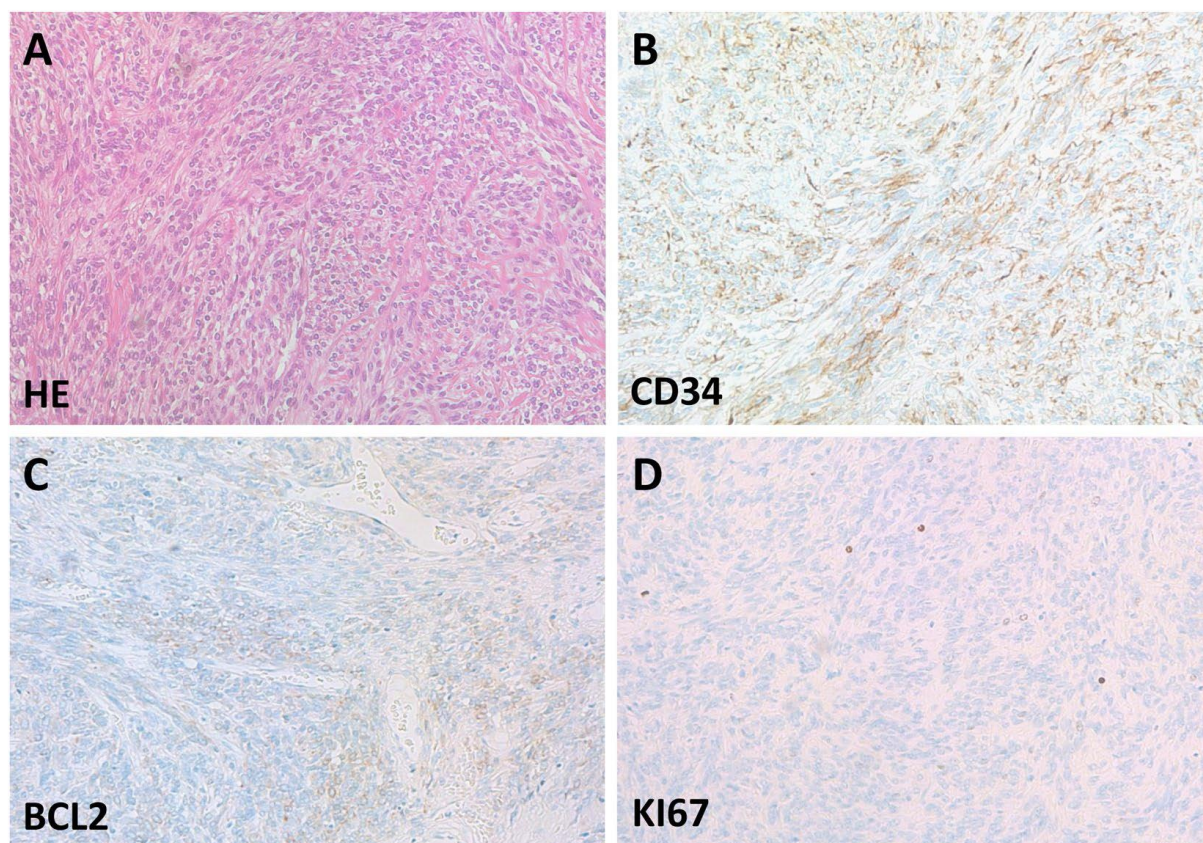
A posztoperatív időszakot tekintve, 15 beteg esetében (12%) lépett fel műtét utáni komplikáció (vérzés 7 betegnél, szívritmuszavar 2 betegnél, neurológiai komplikáció 2 betegnél, sebfertőzés 1 betegnél, tüdőgyulladás 1 betegnél, mellkasi folyadékgyülem légmellel 1 betegnél, illetve a géget beidegző ideg bénulása [nervus recurrens paresis] egy betegnél lépett fel). A számok alapján gyakoribb volt a műtét utáni szövődmény a nyílt műtéttel operált betegeknél ($n = 14$, 15,4% komplikációs ráta), mint a VATS csoportba tartozóknál ($n = 1$, 2,9% komplikációs ráta, Fisher-egzakt teszt; $p = 0,067$). A műtétet követő 30 napon belül mindössze egy beteg halt meg, akinél műtét után olyan súlyos vérzés lépett fel, hogy minden alkalmazott terápia ellenére a beteg életét veszítette.

A betegségmentes és a teljes túlélést illetően, összesen 14 betegnél (11,2%) volt kimutatható a daganat kiújulása a műtéti ellátást követően, és 16 beteg (12,8%) hunyt el a megfigyelés ideje alatt. Azon a betegknél, akiknél a daganat kiújult 9 beteg (64,3%) újabb műtéten esett át, míg 5 beteg (35,7%) esetében kemo-sugárterápia volt javallott.

3/2. Az eltávolított daganatok patológiai és immunhisztokémiai jellemzői

Az eltávolított szoliter fibrózus tumorok 73,6%-a ($n = 92$) benignus daganatnak bizonyult. Érdekes módon a rosszindulatú szövettani típus gyakrabban fordult elő idősebb betegekben: a malignus daganattal rendelkező betegek 76,2%-a ($n = 16$) idősebb volt, mint az átlagéletkor (59 év, Khí-négyzet próba; $p = 0,019$). Jellemzően a rosszindulatú szövettani típusok szignifikánsan gyakrabban fordultak elő a 10 cm-t meghaladó nagyságú daganatok között (Khí-négyzet próba; $p = 0,002$). Továbbá megjegyzendő, hogy a legtöbb a műtét után ismételt megjelenő daganat is a rosszindulatú szövettani csoportba tartozott. Ugyanakkor 5 esetben jóindulatú szoliter fibrózus tumor újult ki a sebészi beavatkozást követően (a kiújulási ráta a 8 rosszindulatú tumor esetén 38,1%, míg az 5 jóindulatú tumor esetében 5,4% volt, Fisher-egzakt teszt; $p < 0,001$). A de Perrot stádium és betegkohorsz többi klinikopatológiai jellemzői a 4-es táblázatban láthatóak. A beosztás a korai (de Perrot stádium 0 vagy 1, $n = 87$, 69,6%), illetve a késői (de Perrot stádium 2, 3, 4, 5 $n = 34$, 27,2%) csoportokat különíti el. 4 beteg esetében a de Perrot stádium ismeretlen volt.

Az immunhisztokémiai profilt figyelembe véve (7-es ábra), minden daganat CD34 pozitív volt. Általánosságban elmondható, hogy a CD34 felszíni marker mellett a szoliter fibrózus tumorok felszínén mind megtalálhatóak voltak a legfontosabb diagnosztikus markerek is különböző mértékben (Bcl-2 pozitív esetek száma: 66; CD99 pozitív esetek száma: 34). Kiegészítésnek megjegyzendő, hogy nem minden fontosabb felszíni markert vizsgáltak minden esetben a rutin szövettani vizsgálat során. A CD34 volt a leggyakrabban vizsgált felszíni fehérje (91,2%-a a vizsgált beteganyagban), azaz legtöbbször ezt használták, mint a szoliter fibrózus tumorokat egyértelműen azonosító felszíni marker az általános, hagyományos szövettani jellemzők mellett. Kiemelendő, hogy azoknál a betegeknél, akiknél elvégezték a Bcl-2 és a CD99 immunhisztokémiai meghatározásokat, minden esetben pozitivitást találtak az imént említett két markerre vonatkozóan. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy a cikk írásakor az újonnan felfedezett és fontosnak vélt STAT6 expressziót ebben a beteganyagban nem vizsgáltuk, mert a daganatok döntő többségének a szövettani vizsgálata ezen felszíni marker jelentőségének leírása előtt történt.



7. ábra - A szoliter fibrózus daganatok szövettani jellemzői. **(A)** A hematoxilin-eozin festés viszonylag egyenletes tumorsejt-eloszlást mutat, szorosan összefonódva a rostok között. **(B)** A CD34 diffúz immunfestése a betegség szövettani jellemzője. **(C)** BCL2 fokális jelölése az SFT tumorsejteken. **(D)** A ritka Ki67 pozitivitás az SFT szövetben osztódó sejtjeire jellemző.

3/3. A klinikai és az immunhisztokémiai paraméterek prognosztikus jelentősége

A medián esemény nélküli túlélést (EFS) egyik beteg esetében sem értük el a vizsgálati időszak végeztével sem, ami a szoliter fibrózus tumorok viszonylagos jó kimenetelére enged következtetni megfelelő kuratív sebészi ellátást követően. A 30 napos EFS a műtétet követően 99% volt, az 1, 3, 5, illetve 10 éves EFS pedig 98%-os, 90%-os, 77%-os, és 67%-os volt. Ha a klinikai és a patológiai jellemzők alapján vizsgáltuk a betegeket a következő paraméterekben volt szignifikáns különbség a daganatos betegség kimenetelét illetően: életkor (<59 év vs. ≥59 év), tumor dignitás (rosszindulatú vs. jóindulatú szoliter fibrózus tumor), tumor méret (≤10 cm vs. >10 cm), de Perrot stádium (korai vs. késői stádium), és sebészi rezekciós szél (pozitív vs. negatív szél). A műtét típusa (hagyományos nyílt műtét vs. VATS/ robot technikával történő műtét) nem befolyásolta szignifikánsan a túlélést.

3/4. Gyulladásos biomarkerek a vizsgált beteganyagban

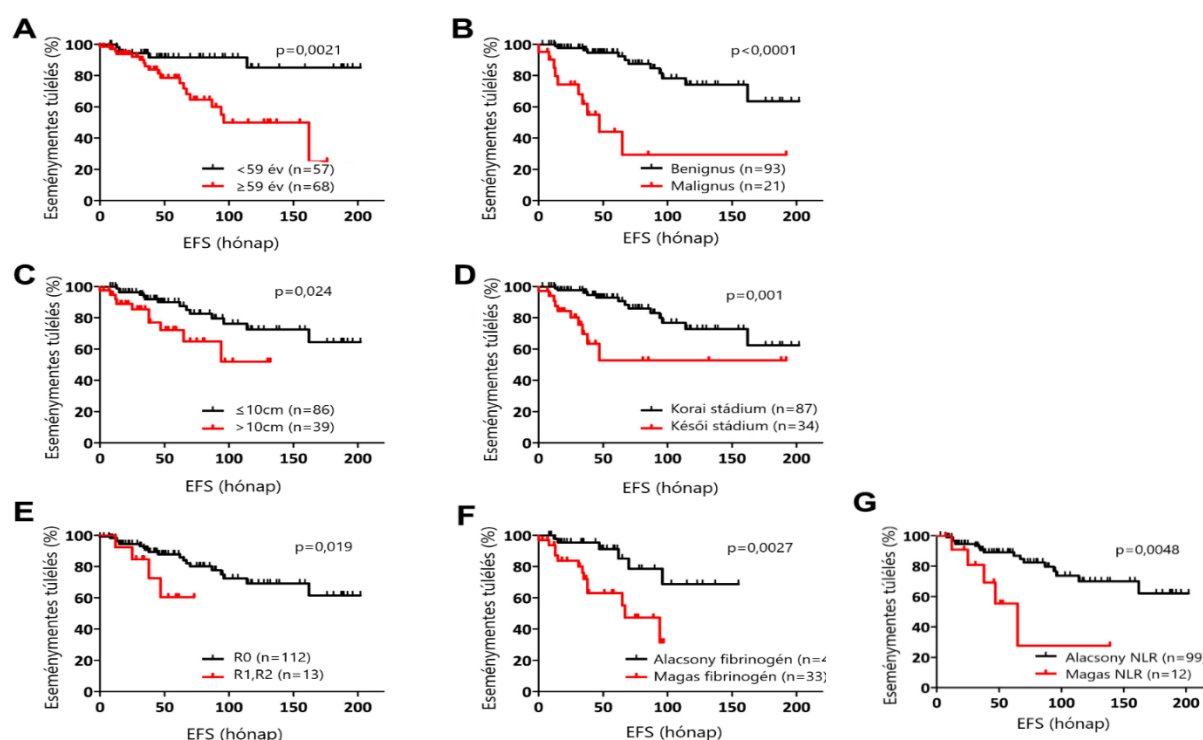
A CRP átlagos műtét előtti értéke 0,59 mg/dl (0,02 és 35 mg/dl szélsőértékek között változva), míg a fibrinogén szint középértéke 350 mg/dl (200 és 1098 mg/dl között változva) volt. Hangsúlyozandó azonban, hogy 63 beteg esetén (50,4%) nem állt rendelkezésünkre a műtét előtti CRP értéke, 45 beteg esetén pedig hiányosak voltak az adataink a fibrinogén szintet illetően is. A betegeket a fibrinogén szint alapján két csoportra osztottuk: egy 390 mg/dl-hez képest emelkedett fibrinogén szinttel rendelkező csoportra (n = 33, 26,4%), illetve egy normál tartományban lévő betegek csoportjára (n = 47, 37,6%). A vérben lévő fehérvérsejtek neutrophil-lymphocytá arányának (NLR) átlagos értéke 2,51 volt (0,93 és 16,38 között változva). A számszerűsített eloszlás alapján pedig a bevont betegek NLR értéke 99 (79,2%) esetben kisebb, 12 esetben (9,6%) pedig magasabb volt mint 5. N = 14 betegnél (11,2%) az arányszám legalább egyik összetevőjének értéke nem állt rendelkezésünkre, ezáltal pedig az NLR pontos értékét sem tudtuk meghatározni.

3/5. A gyulladásos paraméterek és a szövettani jellemzők közötti összefüggések

Ha figyelembe vesszük a tumorok dignitását, a rosszindulatú szoliter fibrózus tumorok gyakrabban társultak -igaz nem szignifikánsan, de- emelkedett fibrinogén szinttel ($p = 0,052$). A jó és rosszindulatú szövettani csoport között nem volt szignifikáns eltérés a műtét előtti CRP és NLR értékek tekintetében. Érdekes módon azonban, azon betegeknél, akiknél a műtét előtt emelkedett CRP értéket és magas fibrinogén szintet mértek, a tumor mérete jelentősen nagyobb volt a normál gyulladásos értékekkel rendelkező társaiknál (átlagos tumorméret az emelkedett és a normál CRP szinttel rendelkező betegek tekintetében, 10,15 vs. 4,95 cm, Mann-Whitney U teszt $p = 0,008$; emelkedett és normál fibrinogén szinttel rendelkező beteg közötti tumorméret, 11,0 vs. 6,5 cm, Mann-Whitney U teszt $p = 0,006$). Továbbá a korai és a késői de Perrot stádium szintén összefüggést mutatott az emelkedett fibrinogén értékkel (késői stádiumban 13 beteg [61,9%] esetén volt emelkedett ezen érték, Khí négyzet próba $p = 0,031$). A többi vizsgált paraméter közül sem a CRP ($p = 0,855$), sem az NLR ($p = 0,175$) esetében nem észleltünk szignifikáns összefüggést a de Perrot stádiumra vonatkozóan.

3/6. Gyulladásos paraméterek, mint prognosztikai faktorok

Az egyváltozós túlélési analízis eredményei alapján kijelenthető, hogy mind a fibrinogén szint (≥ 390 mg/dl vs. normál tartományban lévő, HR 4,001, CI 1,493-10,722, $p = 0,006$), mind az NLR (≥ 5 vs. < 5 , HR 3,906, CI 1,401-10,889, $p = 0,009$) jelentős prognosztikai szereppel bír szoliter fibrózus tumorok esetén. CRP esetében viszont nem észleltünk jelentős túlélésbeli különbséget ($p = 0,135$). Az értékek további vizsgálata céljából multivariáns túlélési analízist végeztünk. Ennek eredményei alapján megállapítható, hogy a fibrinogén szintje és a tumor dignitása független prognosztikai faktornak tekinthető (NLR esetén viszont nem szignifikáns összefüggéseket észleltünk a többváltozós modell alkalmazása során).



8. ábra - A szignifikáns prognosztikai paraméterek Kaplan-Meier grafikonjai. **(A)** Az 59 évesnél idősebb betegeknél szignifikánsan rövidebb volt az eseménymentes túlélés (EFS) a szoliter fibrózus tumor (SFT) kuratív műtete után, összehasonlítva a fiatalabb betegekkal (log rank teszt; $p = 0,002$). **(B)** A rosszindulatú SFT-t szignifikánsan rövidebb EFS jellemezte, összehasonlítva a jóindulatú SFT-vel (log rank teszt; $p < 0,001$). **(C)** A 10 cm-nél nagyobb daganattal rendelkező betegek szignifikánsan rosszabb prognózissal rendelkeztek a kisebb daganatokkal rendelkező betegekhez képest (log rank teszt; $p = 0,024$). **(D)** A de Perrot stádiumrendszer hatása az EFS-re (log rank teszt; $p = 0,001$). **(E)** A kuratív műtét utáni pozitív rezekciós szélekre a rövidebb EFS jellemző, összehasonlítva az ép rezekciós szélekkel (log rank teszt; $p = 0,019$). **(F)** A keringő fibrinogén szintnek prognosztikai jelentősége volt az SFT-ben (log rank teszt; $p = 0,003$). **(G)** A neutrofil-limfocita aránynak prognosztikai jelentősége volt az egyváltozós EFS elemzésben (log rank teszt; $p = 0,005$).

5. táblázat - Egyváltozós prognosztikai jellemzők.

Életkor ≥ 59 vs. < 59	4,231	1,561–11,465	0,005
Dignitás malignus vs. benignus	6,981	3,008–16,204	$< 0,001$
Tumor mérete > 10 cm vs. ≤ 10 cm	2,527	1,096–5,825	0,030
De Perrot stádium késői vs. korai	3,849	1,651–8,975	0,002
Rezekciós szél pozitív vs. negatív	4,172	1,147–15,169	0,030
Fibrinogén emelkedett vs. normál	4,001	1,493–10,722	0,006
NLR > 5 vs. < 5	3,906	1,401–10,889	0,009

6. táblázat - Többváltozós túlélési elemzések. Az 1. modell többváltozós Cox regressziója a következő jellemzőket tartalmazza: a beteg kora, a daganat dignitása, a daganat mérete, a műtéti rezekciós szélek, a fibrinogén és az NLR. A 2. modell az életkorból, a tumor méretéből, a De Perrot stádiumból, a daganat dignitásából, a műtéti rezekciós szélekből, a fibrinogén szintből és az NLR arányból áll.

	1-es modell (n = 71)		
Események száma	17		
Esemény nélkül	54		
Jellemzők	Kockázati arány	95% konfidenciaintervallum	p érték
Életkor: ≥ 59 vs. < 59	1,61	0,47–5,55	0,452
Dignitás: malignus vs. Benignus	4,66	1,22–17,80	0,024
Tumor mérete: > 10 vs. ≤ 10 cm	2,47	0,64–9,63	0,192
De Perrot stádium: késői vs. korai			
Rezekciós szél: pozitív vs. negatív	2,99	0,45–19,99	0,258
Fibrinogén: emelkedett vs. normál	4,55	1,20–17,17	0,026
NLR: ≥ 5 vs. < 5	2,50	0,49–12,88	0,274

	2-es modell (n = 67)		
Események száma	16		
Esemény nélkül	51		
Jellemzők	Kockázati arány	95% konfidenciaintervallum	p érték
Életkor: ≥ 59 vs. < 59	1,74	0,49–6,11	0,390
Dignitás: malignus vs. benignus			
Tumor mérete: > 10 vs. ≤ 10 cm	2,09	0,56–7,83	0,276
De Perrot stádium: késői vs. korai	4,31	0,95–19,49	0,058
Rezekciós szél: pozitív vs. negatív	2,98	0,46–19,09	0,250
Fibrinogén: emelkedett vs. normál	4,44	1,11–17,69	0,035
NLR: ≥ 5 vs. < 5	4,11	0,71–23,76	0,114

II.4. Megbeszélés

Ezen nemzetközi multicentrikus vizsgálatban, 125 szövettanilag igazolt szoliter fibrózus tumorral diagnosztizált és sebészileg kezelt beteg klinikopatológiai adatait és túlélését vizsgáltuk.

Megjegyzendő, hogy ez a – betegség előfordulásához képest viszonylag nagy esetszámot feldolgozó – tanulmány elsőként mutatja be, hogy a vérből származó biomarkerek független prognosztikai jelentőséggel bírnak mellkasi szoliter fibrózus daganatok esetén (beteganyagunk reprezentatívnek bizonyult mind a főbb klinikai, mind a patológiai jellemzők tekintetében). A jóindulatú daganatok a vizsgálat beteganyagának 73,6%-át tették ki, mely megközelítette a korábbi tanulmányok által is megállapított 80%-ot. Továbbá, mint azt már korábban leírták, a rosszindulatú altípus megnövekedett tumor mérettel és rosszabb prognózissal társult.

A tüdőrákkal ellentétben a betegek csak körülbelül fele volt dohányos, jelezve, hogy az intrathoracalis szoliter fibrózus tumorok patogenezise nem áll olyan egyértelmű összefüggésben a dohányzással, mint az ismert tüdőcarcinomák esetén. A szakirodalomhoz hasonlóan a daganatok nemek szerinti előfordulása közel azonos (enyhe női túlsúllyal [59,2% nő]) volt, és beteganyagunk átlagéletkora is hasonló a korábban publikált adatokkal. Azonban más rosszindulatú daganatokkal kapcsolatban, nem találtunk hasonlóan magas előfordulási százalékot (13,6 vs. 27%), mint ahogy azt korábbi publikációk hangsúlyozták. Érdekes módon két betegnek volt szinkron tüdő adenocarcinómája, amelyet mindkét esetben műtéttel, az elsődleges daganattal együtt eltávolítottak. Az egyik beteg a műtétet követő 5. évben elhunyt az adenocarcinoma kiújulása, illetve annak áttétei miatt. A másik beteg viszont 60 hónappal a műtétet követően is élt, a daganat kiújulása és a távoli szervi áttétek megjelenése nélkül. Fontos, hogy adataink arra utalnak, hogy a nyílt műtéthez viszonyítva a VATS technika biztonságos és hatékony módszer a jóindulatú szoliter fibrózus tumorok kezelésében kisebb tumorméret esetén. Továbbá VATS műtét esetén hasonló daganatmentes rezekciós szél biztosítható, rövidebb a kórházi tartózkodás és alacsonyabb a szövődmény ráta. Ezenkívül, meg kell említeni, hogy a kiújuló daganatos betegek kétharmada volt alkalmas az ismételt sebészi kezelésre, feltételezve, hogy a nyomon követést egy interdiszciplináris team felügyeli, amelyben pulmonológusok, radio-onkológusok, onkológusok és mellkassebészek is helyet kaptak. Ezért elsődlegesen, a tüdő parenchymát kímélő, de radikális rezekciót kell előnyben részesíteni, ahhoz, hogy a későbbiekben is fennmaradjon az ismételt műtét lehetősége.

A korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan, tanulmányunk során igazoltuk a de Perrot stádium prognosztikai értékét. Ezenkívül bebizonyítottuk, hogy a daganat dignitása prognosztikai szempontból független volt az életkortól, a daganat méretétől, a rezekciós szélektől, és a gyulladásos paraméterektől, de – a várakozásoknak megfelelően – szoros kapcsolatban állt a de Perrot stádiummal. Ugyanakkor, prognosztikai értéke jelentéktelenné vált, amikor mindkét patológiai paramétert belevettük egy többváltozós modellbe (ezen adatokat nem jelenítettük meg). Továbbá kimutattuk, hogy a tumormentes rezekciós szélek és a daganat nagysága jelentősen befolyásolja a posztoperatív kimenetelt az egyváltozós túlélési elemzésekben, amint azt korábban is bemutattuk.

Tanulmányunk első a nemzetközi szakirodalomban, mely a fibrinogén független prognosztikai értékét hangsúlyozza ezen ritka daganatok esetében. A fibrinogén értéke szignifikáns összefüggést mutatott továbbá a tumor méretével, a de Perrot stádiummal, és a tumor dignitásával egyaránt. Következésképpen a fibrinogén hasznos marker lehet a nyomonkövetési és kezelési stratégiák megtervezésében radikális rezekció után.

Ezek a megállapítások összhangban vannak más mellkasi rosszindulatú daganatokkal kapcsolatos korábbi tapasztalatainkkal. Azonban, szemben azokkal a tanulmányokkal, amiket főleg mezotelióma esetén végeztek, a CRP volt az egyetlen, olyan gyulladásos paraméter, amelynek nem tulajdonítottunk prognosztikai jelentőséget a szoliter fibrózus tumoros betegeknél az univariáns túlélési elemzések során, és így nem került további vizsgálatra a multivariáns analízisekben. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy a bevont betegeink egy részében nem állt rendelkezésünkre a CRP értéke (az olasz beteganyagban a CRP-t nem mérték a preoperatív vizsgálatok során). Normál tartományban lévő műtét előtti CRP-vel rendelkező betegek esetén valóban jellemzőbb volt a hosszabb esemény nélküli túlélés, különösen a hosszú távú nyomon követés során (log rank teszt; $p=0,115$, CRP magas vs. alacsony: egy-, három-, öt- és tízéves túlélés: 94 vs. 95; 80 vs. 89; 46 vs. 89, illetve 31 vs. 89%). Ez a tendencia szignifikáns lehet nagyobb kohorsz tanulmányokban, amennyiben több CRP értéket tudnak vizsgálni. Ezenkívül a CRP jelentős összefüggést mutatott a nagyobb daganatmérettel. Érdekes módon a CRP és a fibrinogén értékek erősen korreláltak egymással (Pearson-féle korrelációs együttható 0,676, $p < 0,001$), jelezve, hogy mindkét akut fázis fehérje hasonló biológiai háttérrel rendelkezik (az adatokat nem jelenítettük meg). Ugyanakkor az NLR és a két akut fázis fehérje közötti összefüggés nem volt olyan erős (Pearson-féle korrelációs együttható 0,262, $p = 0,047$ CRP és NLR esetén, valamint a Pearson-féle korrelációs együttható 0,253,

$p = 0,029$ fibrinogénre és NLR-re vonatkozóan). Ebből adódóan feltételezhető, hogy az NLR más gyulladásos útvonalon hat, mint a CRP és a fibrinogén.

Hasonlóan a korábbi megállapításunkhoz malignus pleurális mezotelióma esetén, a betegség késői stádiuma emelkedett fibrinogén szinttel jár. Továbbá az eredmények azt mutatják, hogy előrehaladottabb daganatok fokozott szisztémás gyulladásos választ váltanak ki, valamint, ha az átlagos tumorméretet (de Perrot stádium helyett) összehasonlítjuk a magas és az alacsony fibrinogén szinttel rendelkező csoportok között, szintén hasonló eredményt kapunk. A gyulladás kulcsfontosságú szerepet játszik számos rosszindulatú daganat kialakulásában és progressziójában. Következésképpen az immunrendszer és a tumor közötti kölcsönhatások meghatározzák a daganat jellemzőit, mint azt a legfrissebb publikációk is mutatják. A pontos mechanizmusok, amelyek a szisztémás gyulladásos paraméterek prognosztikai értékét meghatározzák a daganatos betegek esetében, jelenleg nem teljesen ismertek. Azonban köztudott, hogy a tumor és a gyulladásos reakciók számos közös útvonalon szabályozza az angiogenezist, valamint a sejtmigrációt- és proliferációt, új terápiás célpontokat kínálva ezáltal a gyulladáscsökkentő vegyületek számára a modern onkológiai kezelés során. Végül meg kell említeni, hogy a módosított immunválasz és a tumor menekülési útvonalak szintén új és ígéretes terápiás célpontok a különböző rosszindulatú daganatokban szenvedő betegek számára.

II.5. Következtetések

Összefoglalva, kutatócsoportunk számolt be először a gyulladásos markerek prognosztikai szerepéről intrathorakális szolier fibrózus tumorok esetében. Ezek az olcsó és széles körben elérhető vérben megtalálható biomarkerek, további prognosztikai információkat nyújthatnak a kuratív célú műtét után ebben a ritka betegségben. További adataink azt mutatják, hogy az aktivált szisztémás gyulladásos válasz, egy jóval agresszívabb daganat fenotípushoz társul. Megjegyzendő, hogy eredményeink arra engednek következtetni, hogy ezeket a gyulladásos markereket mellkason kívüli (extrathoracális) szoliter fibrózusos tumoros betegek esetén is fel kellene térképezni, továbbá vizsgálni kellene őket, a kiújulás és a progresszió viszonylatában. Továbbá mellkassebészeti szempontból megállapítottuk, hogy a tumor egészben történő eltávolítása magas betegségkontroll arányt eredményez. A VATS technika ígéretes posztoperatív eredményeket mutatott a kisméretű és főként jóindulatú daganatokban. Azonban a páciensek 11%-ánál kiújult a betegség a kuratív célú műtétet követően, így jobb kockázat felmérés és kezelés szükséges, ahhoz, hogy megalkossunk egy célravezető utánkövetési

stratégiát. A fibrinogén független prognosztikai értéket mutatott, és segíthet a klinikai kezelés megtervezésében tumoreltávolítást követően. Az eredményeink azonban további bizonyításra szorúlnak különösen prospektív kohorsz tanulmányok által, ahol a fentebb leírt paraméterek már a klinikai rutin részévé váltak.

III. A primer tüdőadenocarcinoma lokalizációjának hatása az áttétek elhelyezkedésére és mintázatára vonatkozóan

III.1. Bevezetés

A tüdőrák továbbra is az egyik leggyakrabban diagnosztizált daganatos megbetegedés világszerte, továbbá a daganatos halálozások legfőbb oka mind a férfiak, mind a nők körében. Ugyanakkor, a világon a tüdőrákos megbetegedések aránya mindkét nemben csökken, de a nőknél fele olyan gyorsan, mint a férfiaknál. Az évek során szoros összefüggést találtak a dohányzás és a nem kissejtes tüdőrák (NSCLC) kialakulása között. A primer tumor elhelyezkedése és a dohányzás közötti összefüggésről azonban ellentmondásos adatok állnak rendelkezésünkre. A dohányzást követően kialakult NSCLC-ről leírták, hogy gyakrabban alakulnak ki a felső lebenyben. Ezzel szemben más vizsgálatok azt találták, hogy a tüdő adenocarcinomák kialakulása általában a felső tüdő régiókban történik, és ez az összefüggés nem kapcsolódik a dohányzási előzményekhez. Egy közelmúltban megjelent SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) tanulmány 15 477 tüdőrákos beteg esetén vizsgálta a primer tumor lokalizációját. Eszerint a daganatok 65%-a felső lebenyi elhelyezkedést mutatott, míg 35%-ban jelentkeztek az alsó vagy a középső lebenyben. Az elhelyezkedés túlélésre gyakorolt hatására vonatkozóan pedig – két független retrospektív tanulmány eredményei alapján – megállapítható, hogy a primer tumor lokalizációja (azaz felső vagy alsó régió) nem befolyásolta a korai stádiumú NSCLC-s betegek túlélését a műtétet követően. Az imént említett tanulmányok szerzői ezért arra a következtetésre jutottak, hogy a lebenyi elhelyezkedés nem befolyásolja a kezelés kimenetelét és ugyanazon onkológiai elvek szerint kell minden esetben eljárni.

A lebenyi lokalizáción kívül fontos meghatározni, hogy az adenocarcinoma centrálisan vagy periférikusan növekszik, mivel az áttétek kialakulásának és a betegség kimenetelének tekintetében egyértelmű különbségek vannak. Egy nemrégiben végzett tanulmány, amely 417 tüdő adenocarcinomás esetet dolgozott fel, kimutatta, hogy a centrális elhelyezkedés gyakrabban társul regionális nyirokcsomó-áttéttel, magasabb szövettani fokozattal, előrehaladottabb stádiummal és rosszabb túléléssel (szemben a perifériás elhelyezkedés). Mindazonáltal más vizsgálatok, amelyek kisebb betegszámmal dolgoztak ellentmondó adatokat közöltek a szövettani altípus és az elsődleges tumor lokalizációjának metasztatikus helyekre gyakorolt hatásáról.

Jelen tudásunk szerint nem állnak rendelkezésünkre pontos adatok a tüdő adenocarcinoma áttétek kialakulásának időbeli eloszlására vonatkozóan. Fontos kijelenteni továbbá, hogy bár a távoli áttétek jelenléte rontja a prognózist, a metasztatikus mintázatot és annak a túlélésre gyakorolt hatását még nem vizsgálták részletesen a primer tumor elhelyezkedésének (lebenyi elhelyezkedés, és centrális vs. perifériás elhelyezkedés) függvényében. Ennélfogva célunk, az áttétképzési mintázat feltérképezése és a túlélési mutatók vizsgálata a primer tumor elhelyezkedésének függvényében tüdő adenocarcinoma esetén.

III.2. Betegek és Módszer

2/1. Vizsgálati populáció

Tanulmányunk retrospektív jellegű, nem intervenciós kohort vizsgálat, mely tartalmazza az összes olyan citológiai vagy szövettanilag igazolt tüdő adenocarcinomás beteget, akiket a vizsgálatban közreműködő 5 magyar szakintézményben diagnosztizáltak, kezeltek és követtek 2001 és 2014 között. Kizárólag bronchoszkópos vizsgálaton átesett betegeket válogattunk be, melynek következtében 1126 beteg bizonyult alkalmasnak a vizsgálatba történő bevonáshoz. Célkitűzéseinknek megfelelően előre meghatározott retrospektív adatokat gyűjtöttünk össze, összpontosítva a primer tumor és a távoli szervi áttétek pontos lokalizációjára, mind a diagnózis felállításakor, mind a betegség progressziója során (7. táblázat). A klinikopatológiai adatok szempontjából a következő paramétereket vizsgáltuk: nem, életkor, dohányzási anamnézis, ECOG teljesítmény státusz, elsődleges tumor lokalizáció, stádium, metasztázis helye és száma. Utánkövetés szempontjából a betegeket az elhalálozás időpontjáig vagy a vizsgálat lezárásáig (2014. december 31.) követtük. A betegek stádiumának meghatározásához a TNM stádiumbeosztás 7.-ik kiadását használtuk. A távoli szervi áttétek diagnózisa számítógépes tomográfia (CT), mágnesesrezonancia-képzés (MRI) és fizikális vizsgálat révén történt. Szubkután metasztázisok esetén aspirációs cytológiára is szükség volt a folyamat verifikálására.

A bronchoszkópos lelet megléte és elérhetősége a tanulmányba történő bevonás alapkritériuma volt. A daganat elhelyezkedése szempontjából az endoszkóposan látható tüdő adenocarcinómákat a centrális csoportba soroltuk, míg a többi perifériás elhelyezkedésűnek tekintettük. A szervi áttéteket mind a lokalizációjuk, mind az időbeli megjelenésük szempontjából osztályoztuk: a primer daganat diagnosztizálását követő 1 hónapon belül

kialakult áttéteket korai, míg az 1 hónapon túliakat késői metasztázisnak véleményyeztük. Továbbá, különbséget tettünk az egy szervet érintő és a több szervet érintő áttétek között is. A kezelési protokollokat tekintve, valamennyi beteg esetén az aktuális nemzeti és nemzetközi irányelvek szerint jártunk el (a részletes kezelési adatok elsősorban a 2. intézményből voltak elérhetőek [n = 860; 76%]). A bevont betegek klinikopatológiai adatait a kórházi elektronikus betegkezelő rendszerekből nyertük ki, majd egy anonimizált SPSS fájlban vezettük. A vizsgálati protokollt az Egészségügyi Világszövetség Helsinki Nyilatkozata által előírt etikai normák alapján, a Magyar Orvosi Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (ETT TUKEB 510/2013, 4/2013 EKV) hagyta jóvá.

7. táblázat - Általános klinikopatológiai jellemzők, tumor lokalizáció és metasztatikus eloszlás tüdő adenocarcinomás betegekben.

	Összes	Medián OS (hónap)	Egy szervet érintő áttét	Több szervet érintő áttét
Összes beteg	1126	15.9	435 (38%)	187 (16%)
Nem				
férfi	541 (48%)	13,6	210 (48%)	88 (47%)
nő	585 (52%)	18,7	225 (52%)	99 (53%)
Dohányzás				
soha	194 (17%)	20,3	72 (17%)	25 (13%)
korábban	327 (29%)	16,3	122 (28%)	54 (29%)
jelenleg is	534 (47%)	14,4	208 (48%)	92 (49%)
nincs adat	71 (6%)		33 (6%)	16 (6%)
Primer tumor lokalizáció (oldal)				
bal	432 (38%)	14,5	175 (40%)	69 (37%)
jobb	681 (60%)	17,1	250 (58%)	117 (63%)
Nincs adat	13 (2%)			
Primer tumor lokalizáció (centrális vs. perifériás)				
centrális	434 (39%)	10,6	180 (41%)	89 (48%)
perifériás	690 (61%)	18,8	254 (58%)	98 (52%)
Primer tumor lokalizáció (felső vs. alsó lebeny)				
felső	741 (66%)	17,6	271 (62%)	116 (62%)
alsó	374 (33%)	15,9	154 (35%)	70 (38%)
Stádium a diagnózisnál				
I	116 (10%)	58,2		
II	80 (7%)	37,9		
III	308 (28%)	17,3		
IV	622 (55%)	11,1		

Medián OS (hónap)			13.4	6.8
Intézmény				
#1	26 (2%)			
#2	860 (76%)			
#3	172 (16%)			
#4	33 (3%)			
#5	35 (3%)			

2/2. Statisztikai módszerek

A különböző metasztatikus mintázattal rendelkező betegcsoportok kategorikus paramétereit Khí négyzet próbával elemeztük. Az események kockázati előfordulását a hatásnagyság (odds ratio, OR) szempontjából vizsgáltuk és ennek megfelelően a 95%-os konfidencia intervallum (CI) szerint számoltuk. A túlélési görbék összehasonlítására a Kaplan-Meier megközelítést és a log-rank-tesztet alkalmaztunk, valamint a többváltozós analízishez Cox regressziót használtunk. A többváltozós modellt az életkor, a dohányzás, az ECOG pontszám, az általános stádium, a T faktor és az oligometasztatikus betegség jelenléte (IV. stádiumú esetek) szerint végeztük. A p értékeket mindig kétoldali formában adtuk meg, és $p < 0,05$ esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A folytonos változókat a megfelelő szórási tartomány szerint mindig mediánként vagy átlagként jellemeztük, míg a teljes túlélésre vonatkozó eredményeket hónapban fejeztük ki, és elsősorban a medián értékek (és a megfelelő 95%-os CI változók) szempontjából mutatjuk be. A szervi áttétek metasztatikus mintázatát, azaz a szervi párosítások előfordulási valószínűségét és ok-okozatiságát a szakirodalomban leírtak szerint vizsgáltuk valószínűségszámításon alapuló módszerekkel. A statisztikai számításokhoz a Python 3.4.2 verzióját (Python Software Foundation, 9450 SW Gemini Dr., ECM # 90772, Beaverton, OR 97008, USA), az R program 3.3.3 verzióját (R Foundation for Statistics Computing, Bécs, Ausztria), az SPSS Statistics 23. verzióját (IBM Corporation, New Orchard Road, Armonk, New York 10504, USA), valamint a GraphPad Prism 7. verzióját (GraphPad Software, Inc. 7825 Fay Avenue, Suite 230, La Jolla, CA 92037, USA) használtuk.

III.3. Eredmények

3/1. Klinikopatológiai paraméterek és a távoli szervi áttétek lokalizációja

A betegek alapvető klinikopatológiai jellemzőit és túlélési mutatóit a 8. táblázatban foglaltuk össze. Megállapítható, hogy a primer tumorok jobb oldalon gyakrabban fordulnak elő, mint a

baloldalon (60% vs. 40%, $p < 0,001$). Továbbá, a daganatok 66%-a a felső (azaz felső és középső lebeny), míg 33%-a az alsó régióban helyezkedik el ($p < 0,001$). Az endoszkópos láthatóságot tekintve pedig jelentősen gyakoribb a perifériás elhelyezkedés (61%) a centrális lokalizációhoz viszonyítva (39%) [$p < 0,001$]. A diagnózis idején összesen 435 (38%) esetben észleltek egy szervet érintő távoli szervi áttétet, míg 187 (16%) beteg esetében legalább két szervet érintő áttétes megbetegedésről számoltak be. Az utánkövetés során további 243 (22%) betegnél alakult ki áttét és az utánkövetési időszak végén már 865 (77%) áttétes beteg szerepelt az adatbázisunkban. A követési időszak végéig 918 (82%) beteg esetében állapították meg a halál beálltát. A tanulmány során észlelt áttétek leggyakoribb megjelenési helyei a következők: tüdő (33%), csont (28%), agy (25%), mellékvese (13%), mellhártya (13%), máj (12%) és bőr (3%) (8. táblázat). Perikardiális áttétet 19 betegnél (1,5%), más ritka áttétet (pl. lép, vese, hashártya stb.) pedig 29 (2,6%) betegnél észleltek.

8. táblázat - A távoli szervi áttétek előfordulásának gyakorisága a klinikopatológiai jellemzők függvényében tüdő adenocarcinómában.

Metasztázis helye	Összes	Tüdő	Csont	Agy	Vese	Pleura	Máj	Bőr	Szív-burok
Betegszám	1126	380	319	278	149	143	141	36	19
Nem									
Férfi	541 (48%)	172 (45%)	155 (49%)	124 (45%)	67 (45%)	64 (45%)	70 (50%)	18 (50%)	7 (37%)
Nő	585 (52%)	208 (54%)	164 (51%)	154 (55%)	82 (55%)	79 (55%)	71 (50%)	18 (50%)	12 (63%)
Dohányzás									
soha	194 (17%)	71 (19%)	67 (21%)	45 (16%)	15 (10%)	39 (27%)	23 (16%)	5 (14%)	3 (16%)
ex	327 (29%)	106 (28%)	84 (26%)	77 (28%)	36 (24%)	42 (29%)	43 (31%)	9 (25%)	6 (32%)
Jelenleg is	534 (47%)	174 (46%)	139 (44%)	136 (49%)	86 (58%)	51 (36%)	63 (45%)	19 (53%)	9 (47%)
Nincs adat	71 (6%)	29 (8%)	29 (9%)	20 (7%)	12 (8%)	11 (8%)	12 (9%)	3 (8%)	1 (5%)
Primer tu. lokalizáció (oldal)									
bal	432 (38%)	135 (35%)	125 (39%)	109 (39%)	57 (38%)	55 (39%)	51 (36%)	19 (53%)	9 (47%)
jobb	681 (60%)	235 (62%)	193 (60%)	167 (60%)	90 (61%)	88 (61%)	90 (64%)	17 (47%)	10 (53%)
Nincs adat	13 (2%)	10 (3%)	1 (1%)	2 (1%)	2 (1%)	0	0	0	0

Primer tu. lokalizáció (BRFSC)									
centrális	434 (39%)	129 (34%)	155 (49%)	119 (43%)	69 (46%)	59 (41%)	62 (44%)	18 (50%)	11 (58%)
perifériás	690 (61%)	251 (66%)	164 (51%)	159 (57%)	80 (54%)	83 (58%)	79 (56%)	18 (50%)	8 (42%)
Primer tu. lokalizáció (régión)									
felső/közép	741 (66%)	237 (63%)	205 (64%)	188 (68%)	98 (66%)	75 (52%)	88 (62%)	22 (61%)	12 (63%)
alsó	374 (33%)	133 (37%)	113 (36%)	88 (32%)	49 (33%)	68 (48%)	53 (38%)	14 (39%)	7 (37%)
Stádium									
I	116 (10%)	34 (9%)	18 (6%)	19 (7%)	6 (4%)	9 (6%)	10 (7%)	1 (3%)	2 (11%)
II	80 (7%)	12 (3%)	4 (1%)	12 (4%)	3 (2%)	1 (1%)	7 (5%)	0	0
III	308 (27%)	37 (10%)	59 (19%)	56 (20%)	17 (11%)	15 (11%)	20 (14%)	5 (14%)	1 (5%)
IV	622 (55%)	297 (78%)	238 (75%)	191 (69%)	123 (83%)	118 (82%)	104 (74%)	30 (83%)	16 (84%)
Szervi áttét megjelenés									
korai	622 (55%)	286 (75%)	164 (75%)	114 (41%)	110 (73%)	100 (69%)	71 (50%)	19 (52%)	11 (58%)
késői	243 (22%)	94 (25%)	155 (25%)	164 (59%)	39 (27%)	43 (31%)	70 (50%)	17 (48%)	8 (42%)
Szervi eloszlás									
egy szervi	435	195 (66%)	124 (52%)	127 (67%)	54 (44%)	70 (59%)	41 (39%)	13 (43%)	7 (43%)
több szervi	187	102 (34%)	114 (48%)	64 (33%)	69 (56%)	48 (41%)	63 (61%)	17 (57%)	9 (57%)
Medián OS egy szervi		17,3	10,1	10,5	12,8	10,1	14,1	6,9	7,4
Medián OS több szervi		9,7	6,0	4,6	5,7	5,2	6,8	1,8	5,6

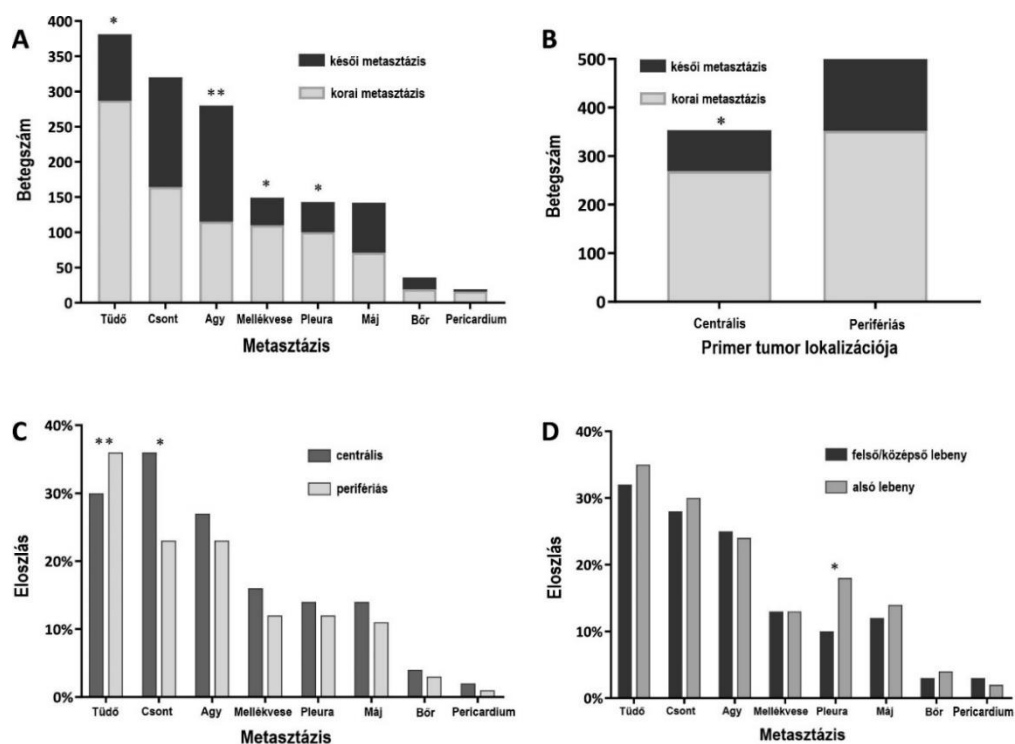
3/2. Metasztatikus mintázat a távoli szervi áttétek időbeli és térbeli megjelenése szempontjából

A tüdő ($p < 0,001$), a mellhártya ($p < 0,001$) és a mellékvese ($p < 0,001$) áttétekre elsősorban a korai, míg az agyi metasztatizisokra a késői megjelenés jellemző ($p = 0,002$; 9. ábra) [a csont-, máj- és szubkután metasztatizisokat korai, és késői megjelenés szerint sem tudtuk osztályozni]. A metasztatikus mintázat részletes elemzése során a következő összefüggéseket találtuk: Az agyi áttétek gyakran a csont ($N_{ij} = 81$) és a tüdő ($N_{ij} = 84$) áttétekkel együtt jelennek meg, míg a csont áttétek a tüdő ($N_{ij} = 98$) áttétek jelenlétét valószínűsítik (10.A. ábra). Megjegyzendő

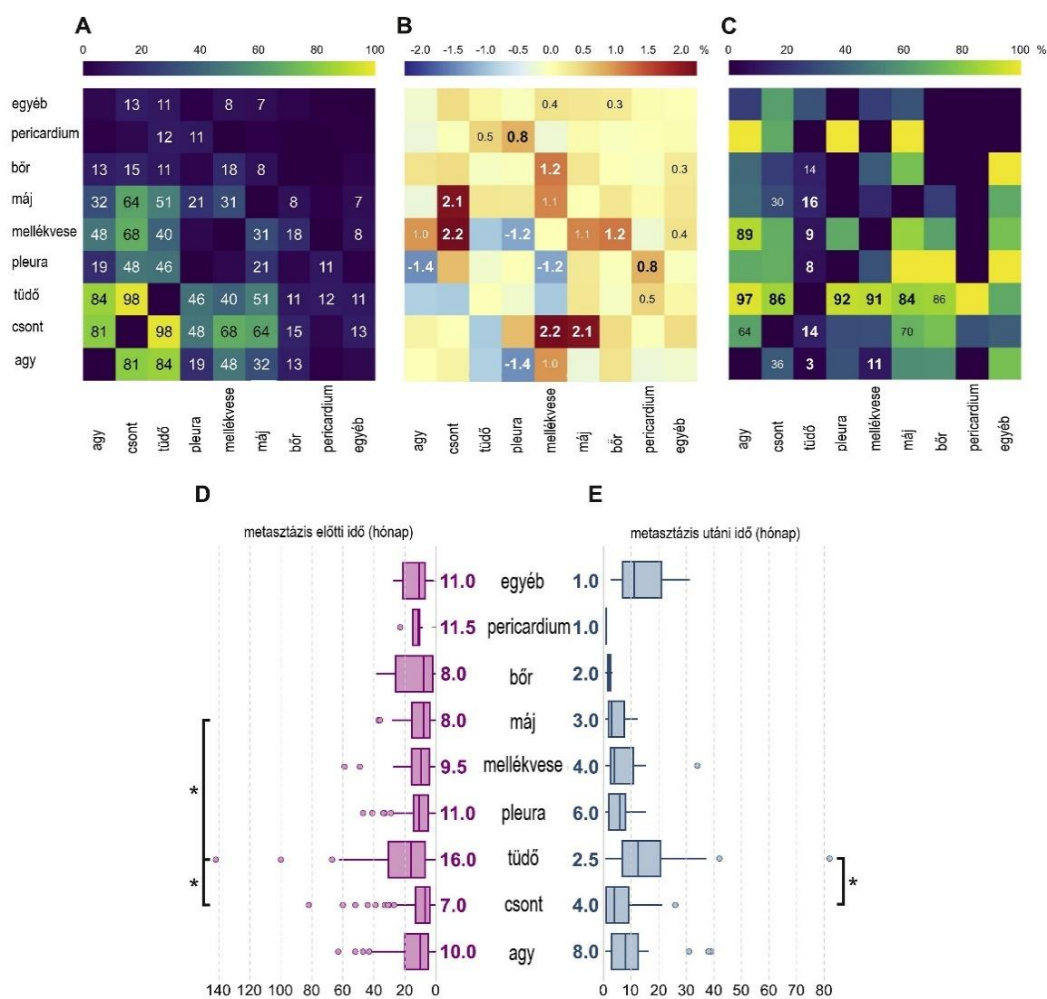
továbbá, hogy a csontáttét jelenléte a mellékvese ($N_{ij} = 68$) és máj ($N_{ij} = 64$) érintettségével is nagy valószínűséggel fordul együtt elő. A 10.B. ábra mutatja az i és j szervekben megjelenő áttétek együttes előfordulásának tényleges esélye és az elméleti esély közötti különbséget (d_{ij}), tekintettel arra, hogy az áttétek egymástól függetlenül fordulnak elő. Ezek alapján megállapítható, hogy a csontáttétes betegeknél a vártnál nagyobb volt mind a mellékvese áttét ($d_{ij} = 2,2\%$), mint a májáttét ($d_{ij} = 2,1\%$) megjelenési valószínűsége. Másrészt a pleurális áttéttel rendelkező betegeknél a vártnál alacsonyabb volt az agyi ($d_{ij} = -1,4\%$), vagy a mellékvese ($d_{ij} = -1,2\%$) áttét kialakulásának esélye. Sőt, mind a mellhártya és a szívburok ($d_{ij} = 0,8\%$), mind a bőr és a mellékvese ($d_{ij} = 1,2\%$) metasztázis párok lényegesen gyakrabban jelentek meg együtt, mint ahogy az várható volna, ha a metasztázis párok egymástól függetlenül jelentkeznének. Kiemelendő, hogy az előbbieken részletezett eredmények Bonferroni korrekció alkalmazása után is szignifikánsnak bizonyultak.

A metasztázis párok szervspecifikus időbeli megjelenését a 10.C. ábrán szemléltetjük az S_{ij} sorrend-preferencia értékek alapján. A tüdőben előforduló áttétek általában megelőzik az agy (az esetek 97%-a), a csont (az esetek 86%-a) vagy a máj (az esetek 84%-a) áttétek megjelenését. A májmetasztázisok általában később jelentkeznek, mint a pleurális metasztázisok (az esetek 100% -a). A mellékvese áttétek pedig jelentősen megelőzik az agyi áttétek kialakulását (az esetek 89% -a). Ezen eredmények szintén szignifikánsnak bizonyultak a Bonferroni korrekció alkalmazása után is.

A metasztázis pároktól független megjelenési mintázat szempontjából megállapítható, hogy a tüdő áttétek kialakulásának ideje az előző áttét megjelenése után jelentősen hosszabb (medián: 16,0 hónap), mint csont- (medián: 7,0 hónap) vagy máj áttét (medián: 8,0 hónap) esetén. Továbbá, a tüdőáttét megjelenése és az azt követő újabb áttét megjelenése között eltelt idő (medián: 12,5 hónap) szintén hosszabb, mint a csont metasztázis megjelenése és az azt követő áttét megjelenése között eltelt idő (medián: 4,0 hónap) [10.D-E ábra]. Az eredmények Bonferroni korrekció után is szignifikánsnak bizonyultak.



9. ábra - Primer adenocarcinoma lokalizáció és metastázis mintázat (1126 beteg).



10. ábra - Metasztázisok együttes előfordulása, valamint kialakulási ideje

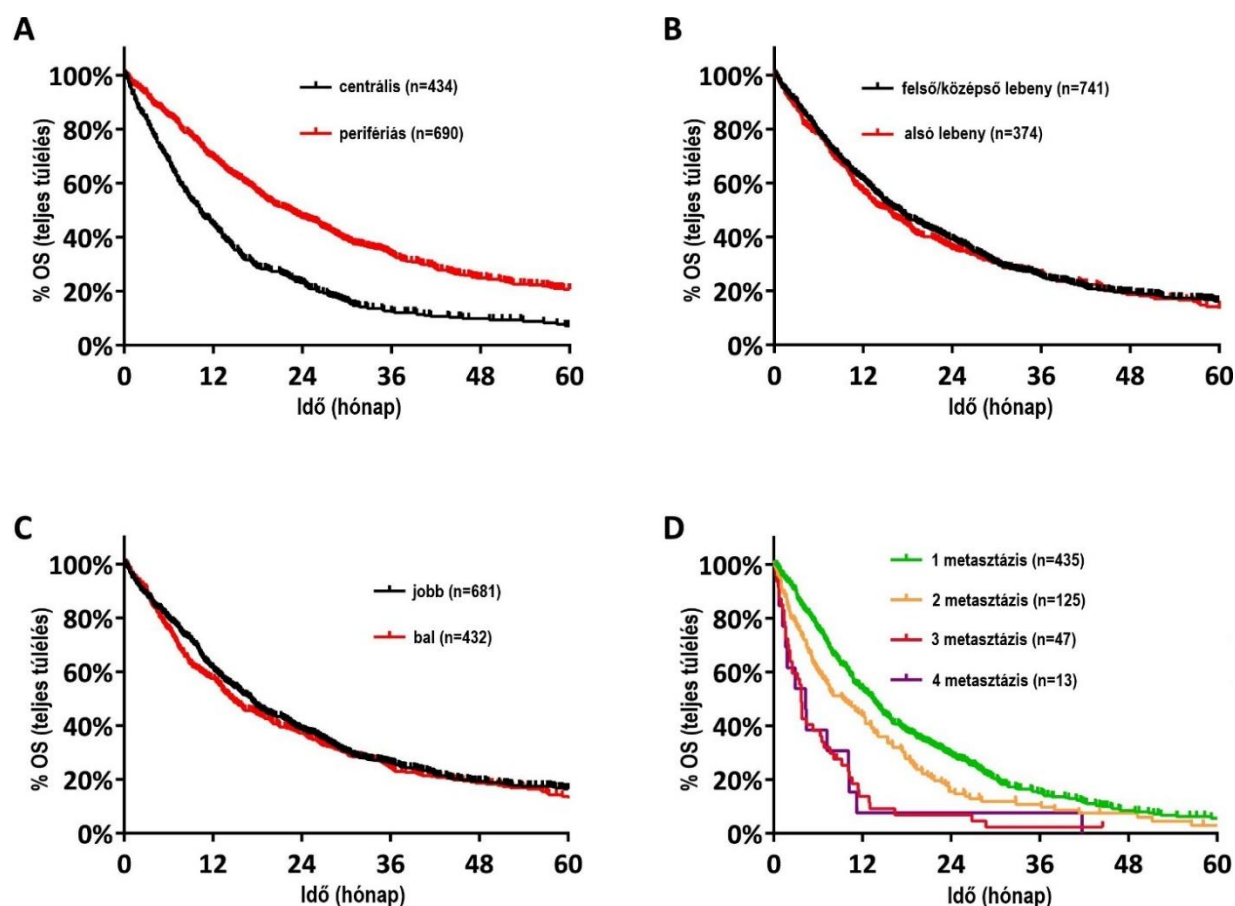
3/3. A primer tumor lokalizációjának hatása a metasztatikus mintázatra

A bronchoszkópos láthatóság alapján 690 (61%) beteg esetén perifériás, míg 434 (39%) beteg esetén centrális elhelyezkedésű adenocarcinoma volt észlelhető. A centrális primer daganatok korai metasztázisokkal társultak (szemben a perifériás daganatokkal; OR 1,43, 95% CI 1,061-1,951, $p = 0,02$, 9.B ábra). Fontos megjegyezni, hogy a csontáttétek gyakoribbak voltak centrális lokalizáció esetén (OR 1,86, 95% CI 1,39-2,50, $p = 0,017$), míg a perifériás daganatok tüdő metasztázisokkal társultak (OR 1,35, 95% CI 1,04-1,74, $p = 0,015$, 9.C. ábra). Ugyanakkor, vizsgálataink során nem észleltünk összefüggést a primer tüdő adenocarcinoma elhelyezkedése (azaz centrális vagy perifériás) és az áttétes szervek száma (azaz az egy- vagy több szervet érintő metasztatikus terjedés) között. Érdekes módon a pleurális metasztázisok gyakrabban jelentek meg az alsó lebenyi daganatokkal diagnosztizált betegeknél (OR 1,97, 95% CI 1,38-2,82, $p = 0,001$, 9.D. ábra).

3/4. Klinikai eredmény

Perifériás elhelyezkedésű adenocarcinoma esetén jelentősen hosszabb volt a medián teljes túlélés (overall survival, OS) a centrális tumorall rendelkező esetekhez képest (22,2 vs. 10,2 hónap, HR 2,075, 95% CI 1,792-2,402, $p = 0,001$, 11.A. ábra). Hangsúlyozandó, hogy ha a betegeket onkológiai stádium szerint osztályozzuk, a perifériás elhelyezkedés továbbra is kedvező prognosztikai tényezőnek bizonyult mind az I-III. ($n = 504$), mind a IV. stádiumú ($n = 622$) alcsoportokban ($p = 0,001$). Nem volt megfigyelhető szignifikáns különbség a medián OS értéket tekintve a felső vs. az alsó régió (11.B. ábra), illetve a jobb vs. a bal oldali (11.C. ábra) lokalizáció között. A Cox regressziós elemzése (bevonva a szokásos prognosztikai paramétereket, mint például a betegek életkorát, dohányzási állapotát, ECOG teljesítmény státuszát, betegség stádiumát és T faktort) azt is kimutatta, hogy az elsődleges tumor lokalizációja (azaz a centrális vagy perifériás) más változóktól függetlenül jósolta meg a betegség kimenetelét (HR 1,558, $p < 0,001$, 9. táblázat). A központi lokalizáció mellett negatív prognosztikai tényezőnek bizonyult továbbá a tumor stádium és a T faktor (9. táblázat). $n = 622$ (55%) betegnél szervi áttétek voltak jelen már a tüdő adenocarcinoma diagnózisakor. Ezek közül 435 (69%), 125 (10%), 47 (7,5%), illetve 13 (2%) beteg rendelkezett egy, kettő, három, illetve négy távoli szervi áttéttel (7. táblázat). A két metasztatikus hellyel rendelkező betegek medián OS értéke jelentősen alacsonyabb volt az egy szervet érintő esetekhez képest (9,4 vs. 13,4 hónap, HR 1,339, 95% CI 1,087-1,648, $p = 0,006$, 11.D ábra). Továbbá a 3

metasztázissal rendelkező betegek túlélése szintén rövidebb volt a 2 szervi áttétellel rendelkezőkkel szemben (3,7 vs. 9,4 hónap, HR 1,917, 95% CI 1,347-2,727, $p = 0,001$, 11.D ábra). Nevezetesen a 4 és 5 metasztatikus helyel rendelkező betegek medián OS értéke 4,3, illetve 3,8 hónap volt ($p = 0,385$), ami hasonló volt a 3 metasztatikus áttétellel rendelkező betegekhez képest (11.D ábra). Egy további Cox regressziós elemzés, amely a diagnózis felállításakor IV. stádiumú betegségben szenvedő betegeket tartalmazott ($n = 622$), kimutatta, hogy mind az oligometasztatikus betegség (szemben a két vagy több metasztatikus hely érintettségével; HR 1,555, $p < 0,001$), mind a perifériás primer tumor lokalizáció (vs. központi; HR 1,457, $p < 0,001$) -az életkortól, a dohányzási állapottól, az ECOG-teljesítmény státusztól és a T-státusztól- független pozitív prognosztikai tényező.



11. ábra - Tanulmányunk Kaplan-Meier teljes túlélési görbéi

9. Táblázat - Klinikai faktorok vizsgálata a teljes túlélés függvényében.

Összes beteg (n = 1126)				
	Változó	HR	95% CI	p érték
Kor	folyamatos	1,008	0,999-1,016	0,075
Dohányzás	jelenleg is/ex	1		
	soha	0,828	0,683-1,004	0,055
ECOG	0-1	1		
	2-4	1,273	0,956-1,695	0,098
Stádium	teljes			< 0,001
	I	1		
	II	1,226	0,815-1,844	0,327
	III	2,063	1,529-2,782	< 0,001
	IV	3,643	2,740-4,844	< 0,001
T faktor	teljes			0,047
	T1	1		
	T2	1,370	1,072-1,751	0,012
	T3	1,473	1,112-1,952	0,007
	T4	1,131	0,999-1,728	0,051
Primer tumor lokalizáció	perifériás centrális	1 1,558	1,331-1,822	< 0,001
Beteg IV-es stádiummal (n = 622)				
Kor	folyamatos	1,009	0,998-1,019	0,122
Dohányzás	Jelenleg is/ex	1		
	soha	0,707	0,541-0,925	0,011
ECOG	0-1	1		
	2-4	1,330	0,962-1,838	0,085
T faktor	teljes			0,163
	T1	1		
	T2	1,366	0,690-1,942	0,083
	T3	1,563	1,060-2,306	0,024
	T4	1,394	0,962-2,020	0,079
Primer tumor lokalizáció	perifériás centrális	1 1,457	1,176-1,805	< 0,001
Metasztázis	1 2 vagy több	1 1,555	1,265-1,912	< 0,001
Beteg I-III-as stádiummal (n = 504)				
Kor	folyamatos	1,012	0,999-1,025	0,077
Dohányzás	Jelenleg is/ex	1		
	soha	0,945	0,721-1,240	0,683
ECOG	0-1	1		
	2-4	1,209	0,672-2,175	0,526
Stádium	teljes			< 0,001
	I	1		
	II	1,570	1,040-2,396	0,032
	III	2,395	1,784-3,217	< 0,001
Primer tumor lokalizáció	perifériás centrális	1 1,607	1,239-2,085	< 0,001
Késői metastázis	nem igen	1 1,506	1,206-1,881	< 0,001

III.4. Megbeszélés

A primer tumor lokalizációjának hatását a metasztázisok prognózisára és helypreferenciájára vonatkozóan több korábbi tanulmány is vizsgálta. Példaként említenénk a kolorektális carcinomát (CRC), ahol a bal és a jobb oldali daganatok különböző daganatos entitásokat képviselnek mind az epidemiológiai jellemzők, mind a biológiai viselkedés terén. Számos -nem metasztatikus CRC-re összpontosító- tanulmány kimutatta, hogy a jobb oldali elhelyezkedés rosszabb prognózissal társul. Továbbá megfigyelhető, hogy a primer CRC elhelyezkedése hatással van a metasztatikus mintázatra még a IV. stádiumú betegek esetén is. A jobboldali primer CRC-k ugyanis alacsonyabb áttétképződési rátát mutatnak (főként a lényegesen kevesebb pulmonalis metasztázisok miatt), míg a bal oldali daganatok esetén megfigyelték, hogy lényegesen nagyobb a májáttétek előfordulási esélye. Ami a hasnyálmirigy adenocarcinomáját illeti, kimutatták, hogy a test és a farok primer daganatai kevésbé rosszindulatúak, mint azok, amelyek a hasnyálmirigy fejében helyezkednek el. Mielőtt megvitatnánk eredményeinket a tüdő adenocarcinoma esetében, fontos megemlíteni, hogy nincs standard meghatározási módszer a központi és a perifériás tüődaganatok elkülönítésére. Ketchedian és mtsai. centrálisként kezelték azon daganatokat, melyek a tüdőtér belső harmadában voltak láthatóak a CT-felvételen, vagy bronchoszkópos vizsgálat során vizualizálták. Más kutatók a mellhártya és a daganat közötti távolságot, vagy az első intrapulmonalis oszláshoz viszonyított helyzetet használták az elhelyezkedés meghatározása céljából. Mivel a bronchoszkópiás jelentések minden páciensünktől elérhetőek voltak, jelen tanulmányban a primer daganat lokalizációját elsősorban az endoszkópos láthatóság alapján határoztuk meg.

A tüdőrák TNM osztályozásának legújabb (8.) kiadásában a Nemzetközi Tüdőrák Tanulmányi Szövetség (IASCL) 33,115 NSCLC betegből álló átfogó kohorsz vizsgálatot elemzett a megfelelő prognosztikus T kategóriák azonosítása érdekében. Érdekes, hogy ezen adatbázis szerint az endobronchialis T3 daganatokban szenvedő betegeknél a carinától 2 cm-nél kisebb távolságra lévő (azt nem érintve) daganatnak ugyanolyan a prognózisa, mint a perifériás T2 daganatoknál. Így jobb prognózisuk miatt a tanulmány szerzői ezen endobronchialis T3 daganatok átminősítését javasolták T2 daganatokká. Mindazonáltal az elsődleges tüdőrák elhelyezkedése és a hematogén metasztázisok szervpreferenciája közötti összefüggést még soha nem vizsgálták az IASLC adatbázisában, és csak kevés adat áll rendelkezésre a tüdőcarcinoma prognózisára vonatkozóan az elhelyezkedés függvényében (jobb vs. bal, alsó vs. felső régió, centrális vs. perifériás). Ito és mtsai. megállapította, hogy a központi pN2

NSCLC-ben szenvedő betegeknel az OS szignifikánsan hosszabb volt, sőt, ez a túlélési előny független volt a N1 (skip) metasztázis jelenlététől. Ezzel szemben a centrális primer tumor lokalizációja szignifikánsan rosszabb eredménnyel járt. Más kutatók összefüggést találtak a centrális tumor lokalizációja és a mediastinalis nyirokcsomó-áttétek között, valamint a felső tüdőtumorkban az ellenoldali felső tüdőmetasztázisok tendenciája között.

A jelenlegi tanulmány az első a szakirodalomban, amely arról számol be, hogy a centrális primer tüdő adenocarcinómákban szenvedő betegek hajlamosak a korai áttétek kialakítására. Továbbá megállapítottuk, hogy centrális elhelyezkedés esetén gyakoribbak a csontmetasztázisok, míg a perifériás lokalizáció a tüdőmetasztázisok megjelenésére hajlamosít. Ezenkívül láthatjuk, hogy a pleurális metasztázisok gyakrabban jelennek meg az alsó lebenyi adenocarcinómáknál. Megállapításaink klinikai jelentősége az egyénre szabott kezelési protokollok szükségességét hangsúlyozza figyelembe véve mind a primer tumor lokalizációját, mind az áttétképzési mintázatot. A daganatok helyének meghatározását tekintve eredményeink összhangban vannak a jelenlegi diagnosztikai- és stádium-guidelineokkal. Ezenkívül a bemutatott adatok arra utalnak, hogy a szervi áttétek közötti helyspecifikus eltérések és a túlélési mutatók közötti különbségek nem változnak a bal és a jobb oldali adenocarcinómák között. Ezért előfordulhat, hogy ezek a daganatok nem különböző entitásokat képviselnek, és ugyanazon onkológiai elvek alkalmazásával kell őket kezelni. A távoli áttétek jelenléte a tüdőrák kedvezőtlen prognózisának fő tényezője. Számos csoport, köztük az IASLC Lung Cancer Staging Project kutatói nemrégiben kimutatták, hogy a tüdőrákos betegeknel az egy szervet érintő multiplex metasztázisok esetén az OS szignifikánsan rosszabb, mint az egyszeri metasztázisoknál. Ennek megfelelően a legfrissebb IASLC iránymutatás azt javasolja, hogy az extrathoracalis áttétben szenvedő betegeket több alkategóriákba soroljuk. Tanulmányunkban szintén megfigyelhető az OS értékek közötti szignifikáns eltérés a szervi áttétek számának függvényében.

Vizsgálatunk gyenge pontjai között elsőként kiemelendő a tanulmány retrospektív jellege, mely megnehezítette az adatgyűjtést, valamint a hiányzó adatok pótlását. Továbbá, a másodlagos feltáró elemzések és a tesztek sokasága szintén befolyásolhatja az adatokat. A stádiummeghatározás céljából -az esetek döntő többségében- a patológiai TNM helyett a klinikai TNM-t használtuk. Az áttétek kizárólag a standard képalkotó eljárásokkal voltak diagnosztizálva (nem alkalmazva például FDG PET-CT-t), melyek nem teszik lehetővé a mikrometasztázisok felfedezését mintegy alábecsülve ezáltal az áttétes helyek számát.

Összességében, figyelembe véve az összes fent említett lehetséges tanulmányi korlátozást, óvatosságra van szükség a jelenlegi tanulmány következtetéseinek levonása során.

Adatbázisunk nem tartalmaz információkat a tüdőadenocarcinoma specifikus szövettani altípusairól. A tüdőadenocarcinoma jelenlegi besorolását 2011-ben tették közzé, és számos tanulmány arról számolt be, hogy szolid vagy mikropapilláris növekedési mintázattal rendelkező tüdőadenocarcinomák rossz prognózissal rendelkeznek. Továbbá bebizonyosodott, hogy a szolid domináns vagy mikropapilláris altípus jelenléte további kockázati tényezőt jelent az N1/2 nyirokcsomó érintettségben és a korai kiújulásban. A szövettani altípus és a primer tumor lokalizációja közötti összefüggés azonban javarészt mindmáig ismeretlen. Tanulmányunkban nem vizsgáltuk a lehetséges összefüggéseket az elsődleges tüdőadenocarcinomák elhelyezkedése és mutációs státusza között sem. Nevezetesen azonban, Tseng és munkatársai 1171 ázsiai tüdő adenocarcinomás beteg adatai alapján, arról számoltak be, hogy az EGFR-t aktiváló mutációval rendelkező daganatok gyakoribbak nőkben, soha nem dohányzóknak és a felső lebenyi daganatokban. Ezenkívül azt találták, hogy az EGFR L858R mutációk gyakrabban fordultak elő felső lebenyi daganatokban (szemben a 19. exon deléciókkal és a vad típusú EGFR daganatokkal). Mindennek fényében indokolt lehet az onkogén aktiváló mutációk metasztázis mintázatra gyakorolt hatásának vizsgálata is.

III.5. Következtetések

Összefoglalva, tanulmányunk első a nemzetközi szakirodalomban, mely a tüdő adenocarcinoma lokalizációjának túlélésre gyakorolt hatását, valamint metasztatikus mintázatát vizsgálta. Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a centrális elhelyezkedés esetén gyakoribbak a korai áttétek megjelenése, valamint jelentősen rosszabb a prognózis. Következésképpen tanulmányunk, az egyénre szabott kezelési protokollok fontosságát hangsúlyozza a primer tumor lokalizációja és a metasztatikus mintázat függvényében. Ugyanakkor hangsúlyozandó, hogy eredményeinek igazolása érdekében további prospektív vizsgálatok szükségesek.

IV. A keringő komplement komponens 4d (C4d) összefüggése a tumor térfogattal, a kemoterápiás válasszal és a túléléssel malignus pleurális mezoteliómás betegekben

IV.1. Bevezetés

A malignus pleurális mezotelióma (MPM) szorosan összefügg az azbeszt expozícióval. Rendkívül agresszív daganatos megbetegedés lévén, a betegek teljes túlélése (Overall Survival; OS) 9-12 hónap a diagnózis megállapításától számítva. Tekintettel a betegség emelkedő incidenciájára egyre jelentősebb az igény a diagnosztikai és a terápiás fejlesztésekre, valamint olyan biomarkerek azonosítására, melyek segíthetik a diagnosztikát és adott esetben lehetővé teszik a célzott terápiák bevezetését. A komplement kaszkád kulcsfontosságú szereplője a veseszületett immunitásnak, és nélkülözhetetlen része az immunvédekezésnek, a sejt homeosztázisnak, valamint a szöveti regenerációnak. Ugyanakkor, az is egyre nyilvánvalóbb, hogy a komplement rendszer részt vesz a daganatok kialakulásában és progressziójában. A C4d egy komplement kapcsolt degradációs protein, mely egy stabil hasadási terméke a C4-nek, és a klasszikus, valamint a lectin útvonalak aktivációja során keletkezik. Ennélfogva, a C4d megjelenése a szövetekben a komplement kaszkád aktiválódásának indirekt jele. Klinikai jelentősége elsősorban abban nyilvánul meg, hogy amellet, hogy a C4d stabilan kapcsolódik az adott célmolekulához, a keringésben is megjelenik. Mindezekon túl, a C4d-t már rutinszerűen alkalmazzák a vesetranszplantációban az allograft-rejekció monitorizálása céljából. A C4d több tumor esetében is prognosztikus markernek bizonyult. Ajona és mtsai. tanulmányaikban igazolták, hogy adenocarcinomás betegekben emelkedett a C4d szint a plazmában és a bronchoalveolaris lavage-ban (BAL) egyaránt. Azon betegeknek pedig, akiknek emelkedett volt a keringő, illetve a tumorszöveti C4d szintjük, rosszabb volt a prognózisuk. Továbbá a C4d expresszió összefüggést mutatott a betegség stádiumával, illetve a rossz prognózissal több tumortípus esetében is, köztük az asztrocitómákban, valamint az orofaringeális laphám carcinómában.

Keveset tudunk azonban a komplement rendszer szerepéről az azbeszt expozíció vonatkozásában, illetve a MPM kialakulásában. Galani és mtsai. 2002-ben a korábban azbeszt expozíciónak kitett betegek esetében vizsgálta a pleurális kalcifikáció (Pleural Calcifications, PCs) jelenlétét vagy hiányát a C4-el összefüggésben. Azon betegeknek, akiknél jelen volt a PCs, a BAL-ban kimutatható volt a C4 jelenléte (míg PCs hiánya esetén nem sikerült a C4-t kimutatni a BAL-ból). A PCs-el rendelkező alanyok esetében az MPM ritkábban alakult ki.

Zerva és mtsai. azbeszt expozíciónak kitett pácienseknél több faktort vizsgáltak a humorális immunitással összefüggésben. Azt találták, hogy ezen betegeknek a PCs jelenlététől függetlenül szignifikánsan magasabb volt a C3 szérum szintje az egészséges kontrolokéval összevetve. Habár az aktivált C4 célmolekulája a C3 protein, furcsa módon a C4 értékek nem mutattak különbséget az előbb vizsgált csoportokban. Sajnálatos módon a szerzők nem vizsgálták az aktivációs marker C4d-t. A pleurális folyadékok vizsgálata során Nabi és mtsai. igazolták, hogy a C3b-hasítást korlátozó komplement H faktor kemotaktikus funkcióval bír, azaz vonzza a monocytákat és granulocytákat, melyek segítik a malignus sejtek fagocitózist. Mivel a C4d komplement degradációs termék különösen fontos prognosztikus szereppel bír tüdő adenocarcinómákban, kutatásunkban a szöveti és a keringő C4d szinteket vizsgáltuk MPM betegekben a tumor tömeg, a kemoterápiás válasz, illetve a klinikopatológiai paraméterek összefüggésében. Végezetül megvizsgáltuk a keringő C4d prognosztikai jelentőségét is.

IV.2. Betegek és Módszer

2/1. Betegek

Ötvenöt szövettanilag igazolt MPM beteg plazma mintáit és klinikai adatait gyűjtöttük össze a diagnózis pillanatában (n = 30) vagy indukciós kemoterápia utáni sebészeti beavatkozást követően. A bevont betegek mindegyikét a Bécsi Orvostudományi Egyetemen kezelték 2011. májusa és 2014. decembere között. Az infekció kizáró tényező volt a mintagyűjtés időpontjában. Tizenkét betegből a diagnózis felállításának időpontjából, illetve a sebészeti beavatkozás előtről van plazma mintánk. Továbbá 32 esetben formalin fixált és paraffinba ágyazott (formalin fixed and paraffin embedded, FFPE) minták is rendelkezésünkre álltak. Kontrollcsoport gyanánt, 21, életkorban megfelelő egészséges önkéntes, illetve 14 nem-malignus pleurabetegségben szenvedő beteget is bevontunk a vizsgálatba. A résztvevők írásos beleegyezésüket adták a vizsgálatba való bevonáshoz. A kutatást a Bécsi Orvostudományi Egyetem Etikai Bizottsága engedélyezte (#904/2009).

2/2. Vérminta gyűjtés

A vérmintákat 10 ml EDTA-s csövekbe perifériás vérétel során vettük az MPM, illetve a kontroll betegektől egyaránt. A mintavétel időpontjától számított 30 percen belül centrifugálásra kerültek a minták. A plazma felülúszót -80 °C-on tároltuk a feldolgozásig.

2/3. ELISA assay

C4d és C3 fragmentum enzimhez kötött immunoszorbens analízist (enzyme-linked immunosorbent assay ELISA) végeztünk. A C4d és C3a vizsgálathoz a minták 1:70 és 1:200-ra voltak hígítva, a gyártó előírásainak megfelelően.

2/4. Immunhisztokémia

Ahhoz, hogy a C4d szöveti előfordulását és annak mértékét össze tudjuk hasonlítani a keringő C4d szintekkel, 32 FFPE MPM szövettani mintát gyűjtöttünk C4d immunhisztokémiai vizsgálatra. Mindezekén túl, C1q immunhisztokémiai festéseket is végeztünk 14 FFPE szövetszövetmintán, melyek magas (n = 7) és alacsony (n = 7) keringő C4d szinttel bírtak. Miután a metszeteket deparafinizáltuk és rehidráltuk az endogén peroxidázt 0,3%-os H₂O₂-os foszfát pufferrel blokkoltuk. A primer antitesteket (anti-human C4d, Biomedicina, Vienna, Austria és anti-human C1q; ab71089, Abcam, Cambridge, UK) 1:500-ra és 1:1000-re hígítottuk, illetve inkubáltuk 60 percet. A színek megjelenítését DAB-bal értük el, amelyet hematoxin-ellenfestés követett. A mintákat egy patológus értékelte.

10. táblázat - A vizsgálatba bevont MPM betegek klinikopatológiai jellemzői a keringő C4d szintek szerint osztályozva, 1.5 µg/mL-es cut-off mellett. MMT, multimodális terápia; EPP, extrapleurális pneumonektómia; CHT, chemoterápia; RT, radioterápia; NA, nem elérhető (not available).

		Összesen (n=55)	C4d alacsony (n=37)	C4d magas (n=18)	p érték
Nem	Férfi	40	28	12	0,529
	Nő	15	9	6	
Kor	Átlag±SD	62,0±12,3	64,6±11,4	56,8±12,6	0,02
Dohányzás (NA = 9)	Jelenleg is	15	9	6	0,700
	Korábban	24	17	7	
	Nem dohányzó	7	4	3	
Szövettan	Epitheloid	41	29	6	0,002
	Non-epitheloid	14	8	12	
IMIG stádium (NA = 11)	Korai (I/II)	12	11	1	0,035
	Késői (III/IV)	32	18	14	
Kezelés (NA = 6)	CHT +/- RT	15	9	10	0,028
	MMT	34	24	6	

EPP	Igen	31	23	8	0,255
	Nem	24	14	10	
CHT (NA = 1)	Indukciós CHT	35	25	10	0,372
	Nincs indukció	19	11	8	

2/5. Tumortérfogat mérése

Ötvenöt beteg közül 20 esetben volt lehetőség a tumor térfogat mérésére. A térfogatméréseket digitális CT dokumentációval rendelkező betegek esetében végeztük el a kemoterápiát megelőzően és/vagy azután. A mellkas CT képeket a korábban leírtak szerint dedikált szoftverek segítségével elemeztük félautomata szegmentálással és lineáris interpolációval (Myrian; Intrasure, Párizs, Franciaország). Összefoglalva, a szegmentáció és a tumor tömeg meghatározás a következő lépéseket tartalmazta: a normál a tüdőszövetet, beleértve a hörgőket és az ereket is fél-automatikusan jelöltük a küszöbértéknek megfelelően. Ezt követően a pleurális folyadékgyülemet és az atelektázias tüdőterületeket is kijelöltünk mágneses lasso technikával. A normális tüdőszövet meghatározását követően a pleurális folyadékgyülemet, az atelektázias tüdőterület és a pleura külső részét fél-automatikusan szegmentáltuk. Lineáris algoritmus alkalmazásával a megjelölt szeletek között automatikus interpolációt alkalmaztunk. Végül a daganattérfogatot a voxelek összegének szorzatával számoltuk. Az adatokat két radiológus egymástól függetlenül elemezte.

2/6. Cut-off meghatározása

A keringő C4d plazmaszintek szerepének vizsgálatához először a 3 µg/ml cut-off értéket használtuk, melyet a korábbi – tüdő adenocarcinomával kapcsolatos – kutatások is alkalmaztak. Mivel csak egy páciens C4d plazmaszintje volt a diagnózis időpontjában 3 µg/ml fölött, így ezen a cut-off érték nem volt megfelelő MPM esetében. Mikor azonban az 1,5 µg/ml cut-off érték mellett elemeztük a korai és késői stádiumú betegek keringő C4d értékeit egyértelmű különbséget találtunk. Ezért az alábbiakban ismertetett számításokat 1,5 µg/ml cut-of mellett végeztük.

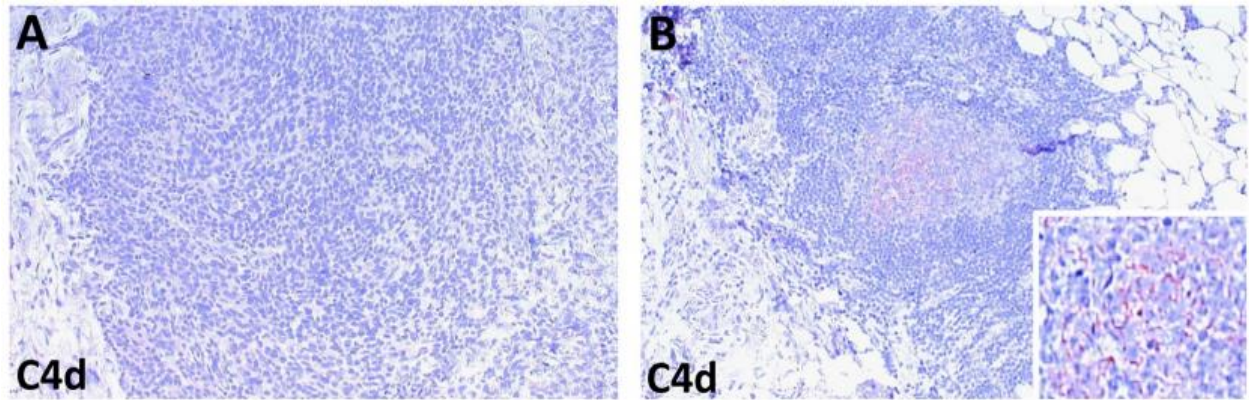
2/7. Statisztikai analízis

A kategorikus változókat Fisher-egzakt tesztel vagy Khí-négyzet próbával hasonlítottuk össze, míg folytonos változók esetén a Mann-Whitney U tesztet használtuk. A lehetséges korelláció szignifikanciáját Pearson-korreláció segítségével vizsgáltuk. A teljes túlélést (Overall survival, OS) az MPM diagnózisának időpontja és a halál dátuma vagy az utolsó kontroll időpontja között eltelt idő szerint határoztuk meg. Az OS-t Kaplan-Meier megközelítéssel vizsgáltuk, a csoportok közötti túlélési különbségeket pedig log-rank tesztel elemeztük. A C4d túlélést meghatározó szerepét, illetve az erre vonatkozó különbségeket MPM és a nem malignus pleurális betegséggel diagnosztizált betegek között a Receiver Operating Characteristics (ROC) görbe révén elemeztük. Minden cut-off értékhez meghatároztuk a megfeleltetett Youden-index-et (érzékenység + specifikusság). Valamennyi eredményt statisztikailag szignifikánsnak tekintettük, ha a $p < 0,05$ volt. Az elemzéseket az SPSS Statistics 23.0 csomag (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) és a GraphPad Prism 5.0 alkalmazásával végeztük.

IV.3. Eredmények

3/1. A vizsgálati kohorsz klinikopatológiai jellemzői

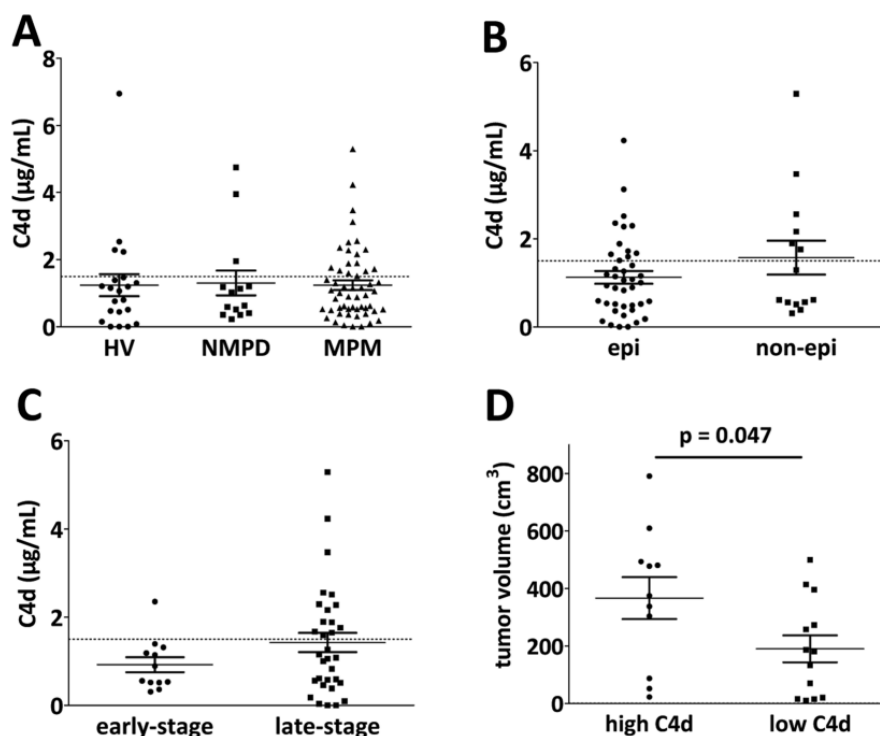
A bevont betegek klinikopatológiai paramétereit a 10. táblázatban foglaltuk össze. Összesen 34 beteg (61,8%) részesült multimodális kezelésben: platina alapú indukciós kemoterápia, majd radikális sebészi rezekció adjuváns intenzitás-modulált sugárterápiával vagy nélküle. Ezen betegek közül 31 (91,2%) esetben végeztünk extrapleurális pneumonektómiát (extrapleural pneumonectomy, EPP). Neo-adjuváns kemoterápiát 35 betegnél (63,6%) alkalmaztunk, mely 3-4 platina alapú kemoterápiás ciklusból állt. Tizenöt beteg (38,2%) kapott kemoterápiát és/vagy sugárterápiát a diagnózis időpontjában lévő előrehaladott betegség miatt. A klinikai és/vagy patológiai stádiumokat a legújabb IMIG stádiumrendszer szerint határoztuk meg.



12. ábra - A C4d szöveti expressziója MPM-ben. (A) Nem találtunk C4d-t az MPM sejtekben. (B) Azonban erős C4d expressziót figyeltünk meg az ectopiás limfoid struktúrák csíráközpontjában.

3/2. A C4d plazmaszintje nem emelkedett MPM-es betegek esetében

A keringő C4d potenciális diagnosztikai biomarkerként való jelentőségének vizsgálatához összehasonlítottuk az MPM betegek ($n = 55$), az egészséges önkéntesek (healthy volunteers, HV) [$n = 21$], valamint a nem-malignus pleurális megbetegedésben (non-malignant pleural disease, NMPD) szenvedő betegek ($n = 14$) C4d plazmaszintjét (13.A. ábra). Érdekes módon nem találtunk szignifikáns különbségeket e három kohorsz között (MPM vs. HVs: $1,24 \pm 0,14$ vs. $1,17 \pm 0,34$ $\mu\text{g/ml}$, $p = 0,833$; MPM vs. NMPD-k: $1,24 \pm 0,14$, szemben $1,30 \pm 0,37$ $\mu\text{g/ml}$, $p = 0,851$, 13.A. ábra). A C4d szintek viszont sokkal heterogénebbek voltak az MPM betegek esetében, mint HV-ben (18 [33%] MPM betegnél volt a C4d szint $1,5$ $\mu\text{g/ml}$ fölött, míg HV esetén csak 4 [20%] esetben volt $1,5$ $\mu\text{g/ml}$ felett). Az epithelioid altípussal rendelkező MPM betegeknél alacsonyabb volt a keringő C4d szint (epithelioid vs. non epithelioid: $1,12 \pm 0,14$ vs. $1,57 \pm 0,39$ $\mu\text{g/ml}$, $p = 0,182$, 13.B. ábra). Mindezek mellett az előrehaladott betegségben szenvedő betegeknél magasabb keringő C4d plazmaszintet mértünk a korai stádiumú betegekkal összehasonlítva (IMIG I. vagy II. stádium, illetve III. vagy IV. stádium összehasonlítva: $0,92 \pm 0,17$, szemben $1,43 \pm 0,22$ $\mu\text{g/ml}$, $p = 0,079$, 13.C. ábra). Érdekes módon a megállapított $1,5$ $\mu\text{g/ml}$ -es cut-off érték mellett szinte az összes HV, NMPD, valamint MPM beteg keringő C4d-szintje megegyezett. A C4d értékeket más jelentős klinikopatológiai paraméterek szempontjából is vizsgáltuk, beleértve a nemet, az életkort, dohányzási státuszt, illetve a terápiás megközelítést. Epithelioid altípusú, IMIG I/II stádiumú, idős betegek esetében, vagy azoknál, akik multimodális kezelésben részesültek, szignifikánsan gyakrabban volt a C4d szint $1,5$ $\mu\text{g/ml}$ alatt (10. táblázat).



13. ábra - A C4d plazmaszintje különböző betegcsoportokban.

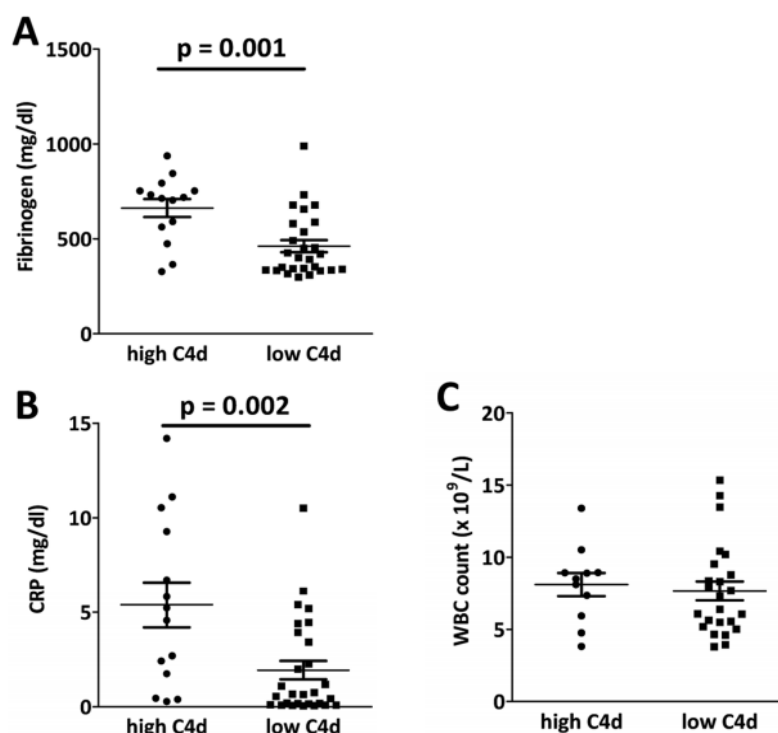
3/3. Korreláció a radiológiailag meghatározott tumor térfogatával

Mivel a keringő C4d szintek korreláltak a betegség stádiumával megvizsgáltuk, hogy a tumor volumetria alapján mért tumor méret összefügg-e a C4d szinttel (a CT vizsgálat és a vérvétel közötti átlagos időtartam 21,5 nap volt). Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a magas keringő C4d-szint szignifikánsan gyakoribb volt nagyobb tumorméret esetén (magas C4d vs. alacsony C4d: $366,7 \pm 72,7 \text{ cm}^3$ vs. $190,3 \pm 46,7 \text{ cm}^3$, $p = 0,047$, 13.D. ábra). Ezt követően, korreláltattuk a keringő C4d plazmaszinteket a tumor térfogattal és – nem szignifikáns – de pozitív lineáris korrelációt véltünk felfedezni a C4d szintje és a tumor térfogata között (Pearson $r: 0,34$; $p = 0,099$, az adatok nincsenek ábrázolva). Megjegyzendő, hogy ez utóbbi eredményünk nem szignifikáns mivolta a relatív kis esetszámnak is tulajdonítható.

3/4. Összefüggések a keringő gyulladásos markerek tekintetében

Az ectopiás limfoid struktúrák csíráközpontjában megfigyelt C4d expresszió alapján arra voltunk kíváncsiak, hogy a C4d plazmaszintje korrelál-e a különböző, fertőzéssel összefüggő biomarkerekkel. A magasabb keringő C4d szintek emelkedett plazma fibrinogén (Pearson $r:$

0,48, $p = 0,002$; Mann-Whitney U-teszt dikotomizált C4d-vel, $p = 0,001$; 14.A. ábra) és C reaktív fehérje (CRP) (Pearson r : 0,44, $p = 0,004$; Mann-Whitney U-teszt dichotomizált C4d-vel, $p = 0,002$; 14.B. ábra) szintekkel társultak. A C4d és a fehérvérsejtszám (white blood count, WBC) között ugyanakkor nem találtunk összefüggést (Pearson r : $-0,14$, $p = 0,41$; Mann-Whitney U teszt dikotomizált C4d-vel, $p = 0,697$; 14.C. ábra).



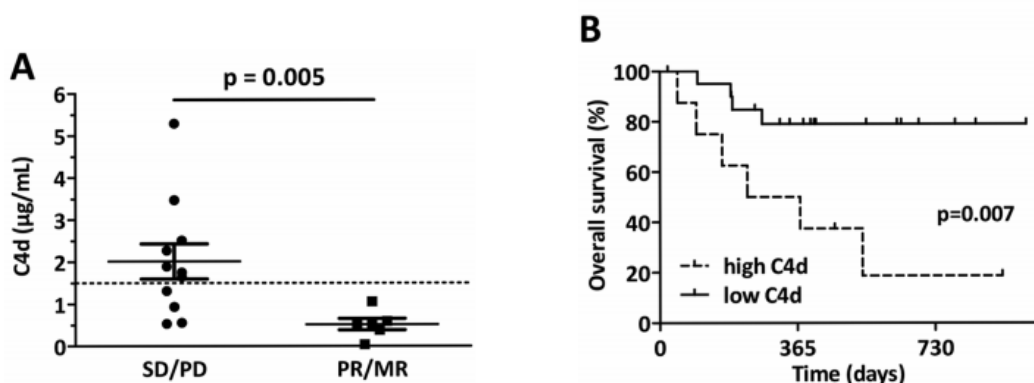
14. ábra - Összefüggések a keringő C4d szintek és más gyulladásal kapcsolatos biomarkerek között.

3/5. A C4d plazmaszintje összefügg az indukciós kezelésre adott kemoterápiás válasszal

A kemoterápia keringő C4d szintre gyakorolt hatásának vizsgálatához platina alapú neo-adjuváns kemoterápiát kapott betegek C4d szintjeit értékeltük. Azt tapasztaltuk, hogy kemoterápiát követően stabil (SD) vagy progrediáló betegség (PD) esetén szignifikánsan magasabb volt a C4d szint, mint a részleges vagy jelentős kemoterápiás választ adó betegek esetében (PR/MR) [SD/PD vs. PR/MR: $2,02 \pm 0,42$ vs. $0,52 \pm 0,13$ $\mu\text{g/ml}$, $p = 0,005$, 15.A. ábra). A gyulladásos markerek, köztük az fibrinogén és a CRP, nem mutattak szignifikáns korrelációt a kemoterápiás válasszal (az adatok nincsenek ábrázolva).

Tizenkét beteg esetében megmértük a C4d értékeket az indukciós kemoterápia előtt és után. Érdekes módon az SD/PD betegeknek nem szignifikáns módon emelkedett a keringő C4d-szintjük kemoterápiát követően, míg a PR/MR betegek esetén gyenge csökkenési tendencia volt

megfigyelhető (relatív különbségek a kemoterápia előtti és utáni C4d szintek között, SD/PD: $0,39 \pm 0,37$ vs. PR/MR: $-0,10 \pm 0,21$ $\mu\text{g/ml}$, $p = 0,300$; az adatok nincsenek ábrázolva).



15. ábra - A keringő C4d plazmaszint összefüggést mutat a kemoterápiás válasszal és az MPM prognózisával.

3/6. A C4d plazmaszint prognosztikai jelentősége MPM esetén

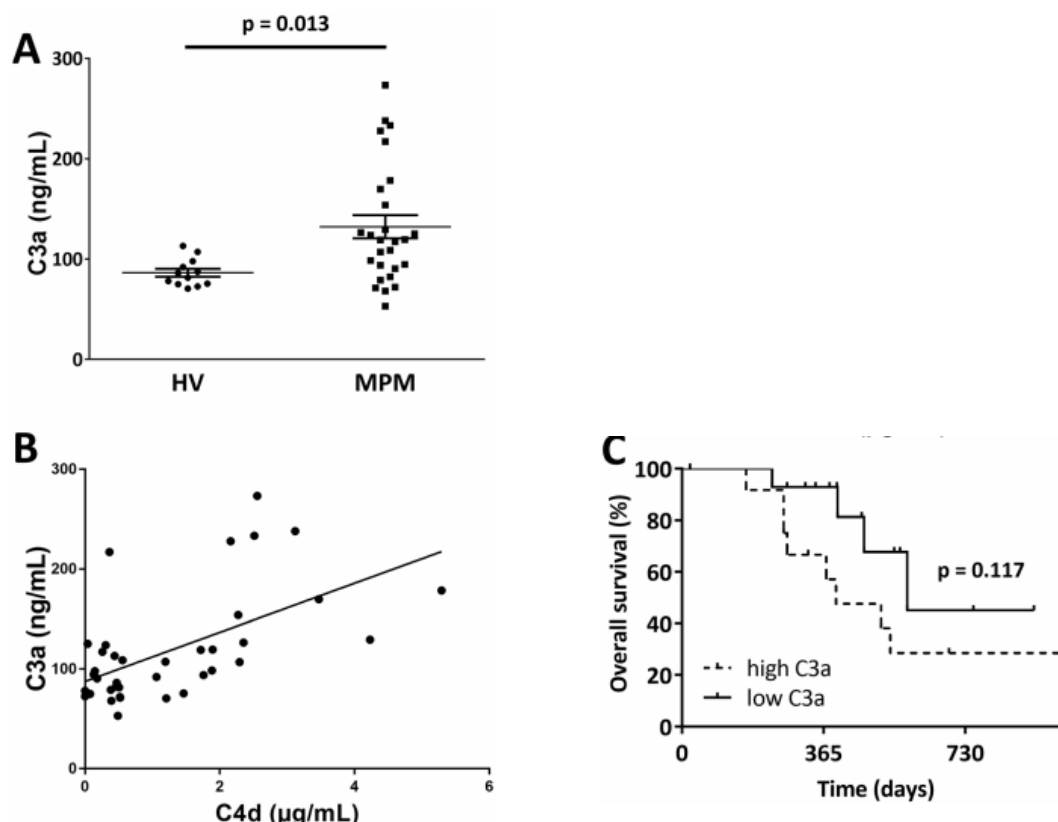
A keringő plazma C4d-szint prognosztikai relevanciájának vizsgálatához kohorszunkat a diagnózis időpontjában mért magas ($\geq 1,5$ $\mu\text{g/ml}$; $n = 9$) és alacsony ($< 1,5$ $\mu\text{g/ml}$; $n = 21$) C4d-szinttel rendelkező csoportokra osztottuk. Magas plazma C4d szinttel rendelkező betegek esetén szignifikánsan rosszabb volt a prognózis, mint az alacsony plazmaszintű betegek esetében (HR 7,33, CI 1,71–31,44, $p = 0,007$, 15.B. ábra). Többváltozós Cox regressziós elemzéssel feltártuk, hogy a plazma C4d szint a diagnózis felállításakor (alacsony vs. magas; HR 0,263, 95% CI 0,096–0,725, $p = 0,01$) befolyásolta a teljes túlélést a szövettani altípustól (epithelioid vs. nem epithelioid; HR 0,695, 95% CI 0,25–1,935, $p = 0,486$), az IMIG stádiumtól (korai vs. késő; HR 0,711, 95% CI 0,176–2,875, $p = 0,633$) és a kezelés típusától (multimodális terápia, beleértve a radikális műtétet kontra egyéb; HR 0,277, 95% CI 0,011–0,761, $p = 0,013$, 11. táblázat) függetlenül.

11. táblázat - Az MPM betegek OS értékét befolyásoló klinikai tényezőkhez igazított többváltozós Cox-regressziós vizsgálat. MMT, multimodális kezelés; CHT, kemoterápia; RT, sugárkezelés; NA, nem áll rendelkezésre; HR, veszély hányados; CI, konfidencia intervallum.

		HR	95% CI	p érték
Szövettan	Epitheloid	0,695	0,250-1,935	0,486
	Non-epitheloid	1		
IMIG stádium (NA = 11)	Korai (I/II)	0,711	0,176-2,875	0,633
	Korai (III/IV)	1		
Kezelés (NA = 6)	MMT	0,277	0,101-0,761	0,013
	CHT és/vagy RT	1		
Plazma C4d	Alacsony	0,263	0,096-0,725	0,010
	Magas	1		

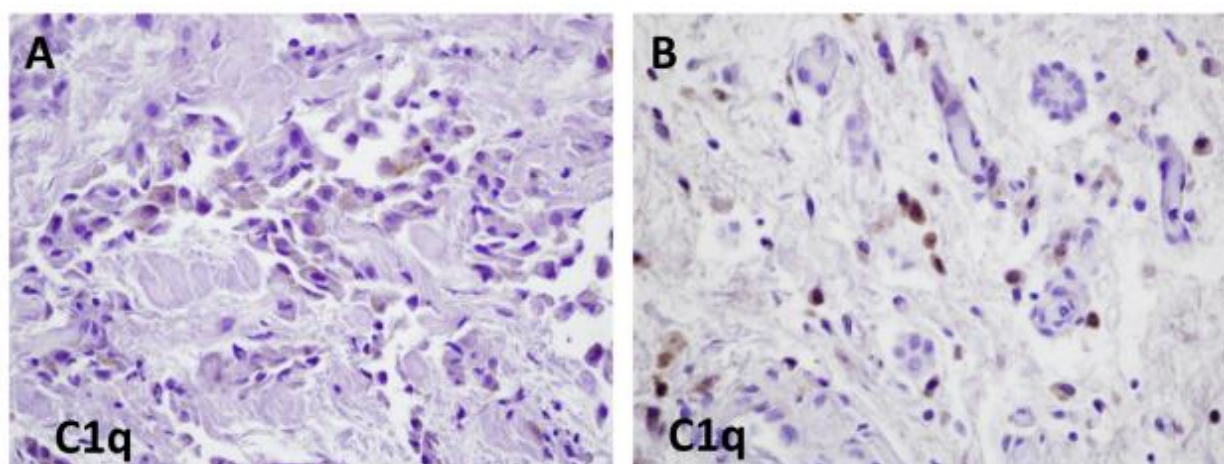
3/7. A keringő C4d korrelációja más komplement komponensekkel

A C4d a C4 aktiválódás terméke. A C4 bomlástermékek a C2a-val együtt képezik a C3 konvertázt, amely hasítja a C3-at, felszabadítva ezáltal a C3a-t. A keringő C4d specifikitásának vizsgálatához, mint reprezentatív komplement aktivációs marker, megmértük a plazma C3a szinteket magas (n = 14) és alacsony (n = 13) keringő C4d plazmaszintek esetében, valamint a HV-knél is (n = 12). Kohorszunkban a plazma C3a szintje szignifikánsan magasabb volt az MPM-es betegeknél (MPM vs. HV: $132,30 \pm 11,47$ vs. $86,45 \pm 3,98$ $\mu\text{g/ml}$, $p = 0,013$, 16.A. ábra). Az MPM kohorszban belül ugyanakkor, a C3a szint nem korrelált sem a szövettani altípussal (epitheloid vs. non epitheloid, $122,70 \pm 13,01$ vs. $151,50 \pm 22,24$ $\mu\text{g/ml}$, $p = 0,244$, az adatok nincsenek ábrázolva), sem a stádiummal (IMIG I/II vs. III/IV, $119,90 \pm 21,82$ vs. $144,10 \pm 15,69$ $\mu\text{g/ml}$, $p = 0,406$, az adatok nem láthatók) sem az életkorral (Pearson r : $-0,05$; $p = 0,807$, az adatok nincsenek ábrázolva). Szignifikáns korrelációt találtunk viszont a keringő C3a és C4d plazmaszint között (Pearson r : $0,57$; $p < 0,001$, 16.B. ábra). Végül annak megvizsgálása érdekében, hogy a C3a a C4d-hez hasonlóan megbízható prognosztikai markernek tekinthető-e MPM-ben, a C3a alcsoportot felosztottuk alacsony (n = 14) és magas (n = 13) C3a kategóriákra a medián plazma C3a szintet használva cut-off-ként (119 ng/ml). Amint az várható volt, a magas keringő C3a szint csökkent túlélési mutatókkal társult (C3a plazmaszint > 119 ng/ml, HR 2,52, CI 0,75–8,38, $p = 0,117$, 16.C. ábra).



16. ábra - A C3a plazmaszintje MPM-es betegeknél

A C4 aktiválható a klasszikus komplement útvonalon, C1q útján, vagy a lektin útvonalon mannóz kötő lektinnel (mannose binding lectin, MBL). A kapott C4d proteolitikus hasítási termék csak egy része szabadul fel. Amint azt a fentiekben leírtuk, a C4d-t a tumorminták immunsejtjeiben, nem pedig a tumorsejtben mutattuk ki. Azt meghatározandó, hogy a keringő C4d szintek összefüggést mutatnak-e a tumorszövet immuninflációjának mértékével, 14 FFPE szövetmintát választottuk ki magas ($n = 7$) és alacsony ($n = 7$) keringő C4d szinttel rendelkező betegektől. A hematoxin-eozinnal festett metszeteken nem találtunk összefüggést a keringő C4d szintek és a gyulladásos sejtek inflációja között (az adatok nincsenek ábrázolva). A fent említett 14 minta C1q immunhisztokémiai vizsgálata során a daganatok szinte minden esetben negatívak voltak a C1q-ra nézve (csak két MPM minta mutatott C1q festést, és mindkettő alacsony keringő C4d plazmaszinttel rendelkező betegtől származott; 17.A. ábra). A gyulladásos sejtek pozitív festődést mutattak C1q-ra, de a festés intenzitása független volt a keringő C4d-értékektől (17.B. ábra). Együtt ezek az adatok határozottan arra utalnak, hogy az MPM késői stádiumában talált megemelkedett C4d-szintek összefüggenek a komplement kaskád aktiválódásával.



17. ábra - C1q szöveti expressziója MPM-ben. (A) Enyhén pozitív tumorsejteket csak két betegnél találtunk (mindkettő alacsony keringő C4d szint csoportban tartozott). (B) Pozitív festődés (gyulladásos sejtek) a C1q esetében minden esetben megtalálható volt.

IV.4. Megbeszélés

Számos esetben bizonyítást nyert, hogy a komplement-kaszád fehérjéi szerepet játszanak különböző daganatok progressziójában. Legjobb tudomásunk szerint ez az első tanulmány, amely MPM betegcsoportban vizsgálja a plazma C4d prognosztikai jelentőségét. Megjegyzendő, hogy MPM-val diagnosztizált betegek esetében alacsonyabb C4d plazmaszintek voltak mérhetőek a korábbi tanulmányban vizsgált tüdő adenocarcinomás betegek plazmaszintjeihez képest, így kohorszunkban az 1,5 µg/ml-t határoztunk meg cut-off értéként (ellentétben a mások által használt 3,0 µg/ml-vel). Ezen különbség összefüggésben lehet azzal a ténnyel, hogy a tüdőrákos sejtek képesek közvetlenül aktiválni a klasszikus komplement útvonalat C1q kötése révén, míg MPM-ben a komplement kaszkád lehetséges aktivációs mechanizmusait nem vizsgálták.

A mellkasi malignus daganatokban más keringő biomarkerekhez képest a keringő C4d szint jobb prognosztikai markernek bizonyult az OS vonatkozásában. Azonban a többi keringő markerrel ellentétben MPM-ben a C4d szintek nem különböztek szignifikánsan a betegek és az egészséges kontroll csoport között, és így nem bírnak diagnosztikus értékkel.

A tüdő adenocarcinomával ellentétben, immunhisztokémiai módszerrel nem tudtunk kimutatni C4d pozitivitást MPM sejtekben. Megjegyzendő, hogy számos daganat esetében a C4d tumorsejtekben való expressziója korrelál a prognózissal, a betegség stádiumával és/vagy a lymphoid invázió mértékével. Ugyanakkor, például a limfómákban szintén kimutatható a C4d

tumor-specifikus expressziója. A C4d expresszió/depozíció hiánya MPM sejtekben arra utal, hogy a komplement kaszkádot nem direkt módon aktiválják a malignus sejtek. Fontos megjegyezni, hogy a daganatok ektópiás limfoid csíráközpontjaiban találtunk C4d pozitivitást. Továbbá jelen tanulmányunkban bemutattuk, hogy a keringő C4d szintek szorosan korrelálnak más szisztémás gyulladásos markerekkel, úgy, mint a CRP-vel és a fibrinogénnel.

Mivel a C4 a klasszikus komplement útvonalon C1q-vel aktiválódik, a C1q festési mintázatát vizsgáltuk MPM tumor mintákban. Csak két beteg esetében találtunk szerény tumor-specifikus C1q expressziót a 14 vizsgált esetből. Ezen adatok összhangban vannak egy MPM sejtvonallal foglalkozó korábbi tanulmánnyal, mely kimutatta a C1q-kötő fehérje (a C1q negatív szabályozója) up-regulációját a normál mezoteliális sejtvonalakhoz képest.

Amint azt tüdő adenocarcinomában, laphámsejtes carcinomákban és asztrocitómákban is megfigyelték, vizsgálatunkban is bizonyítást nyert, hogy a keringő C4d szint korrelál az MPM betegség stádiumával. Továbbá, vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a magas keringő C4d szint jelentősen gyakoribb nagyobb tumorméret esetén. Ennek megfelelően tanulmányunk az első, amelyben bizonyítást nyert a keringő C4d szint és a primer tumor térfogata közti összefüggés MPM-ban. Eredményeink azt sugallják, hogy az előrehaladott betegség, valamint a nagyobb tumortérfogat hozzájárulhat a komplement rendszer amplifikációján keresztül a rosszindulatú sejtek opszonizációjához. Feltételezzük továbbá, hogy nem maguk az MPM tumorsejtek, hanem – legalábbis részben – a lokális infiltratív immunsejtek felelősek a komplement rendszer klasszikus aktivációjáért. A nagyobb tumorméret az abszolút immunsejt szám növekedéséhez vezethet, amely végezetül emelkedett keringő C4d-szintet eredményez az MPM előrehaladott stádiumaiban. Ugyanakkor további tényezők is hozzájárulhatnak az előrehaladott betegségben megfigyelt megnövekedett keringő C4d-szinthez. Lupuszos és atherosclerosisos betegeken végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a komplement aktiváció kiváltható keringő apoptotikus és nekrotikus sejtekkel is. Ez a feltételezés megmagyarázhatja a tumor méret és a komplement aktiválódáshoz kapcsolódó C4d bomlástermék szintje közötti összefüggést.

A keringő C4d specifikus tanulmányozása céljából (mint a komplement aktiváció markere) vizsgáltuk a plazma C3a szint értékét is. A C4d-hez hasonlóan a C3a egy komplement-specifikus hasítási termék, mely koncentrációja a komplement aktiválása során növekszik. A plazma C3a-szint emelkedett volt az MPM-es betegeknél (a HV-khez képest), és összefüggést mutatott a C4d szintjével. A C3a szint a – C4d-hez hasonlóan – prognosztikai jelentőséggel is bírt azon alcsoporton belül, ahol mindkét komponens mérhető volt. Ezek a megfigyelések

tovább erősítik a komplement-aktiváció klinikai jelentőségét MPM-ben. Fontos megjegyezni ugyanakkor, hogy míg a további C3a és C1q markerek vizsgálata növeli a C4d, mint biomarker specifikusságának jelenőségét, ezek a korrelatív vizsgálatok nem tárják fel a komplement aktiválás pontos mechanizmusát MPM-ben.

A C4d-hez hasonlóan az MPM-ben lévő más keringő biomarkerek, mint a mezotelin és az aktivin A, hasonló összefüggést mutattak a tumor mérettel és a betegség stádiumával. A mai napig nincs olyan keringő biomarker, mely lehetővé tenné a különböző szövettani MPM altípusok megkülönböztetését. Vizsgálatunkban csak enyhén volt magasabb a nem-epithelioid altípusok esetében mért C4d plazma szint (az epithelioid szövettanú betegekkel összehasonlítva).

IV.5. Következtetések

A biomarker vizsgálatok többsége a diagnózis idején és/vagy sebészeti mintavételt megelőző mintagyűjtésekre összpontosított. Kutatásunk során lehetőségünk volt elemezni a keringő C4d értékeket egyéni kemoterápiás válasz szempontjából az indukciós kemoterápiát követően. Figyelemre méltó, hogy azon esetekben, ahol kemoterápiát követően progresszió volt megfigyelhető a keringő C4d szint szignifikánsan magasabb volt azon betegekhez képest, akik jól reagáltak a kemoterápiára. A C4d szint mérése kemoterápiát követően segítheti a betegek újboli stádiumbeosztását és értékelését. Ez fontos lenne, mivel az MPM hajlamos „héjként” növekedni a mellhártya felszínén, és a RECIST kritériumok alapján továbbra is kihívást jelent a terápiás válasz és a daganat kiterjedésének megítélése. Jelen tanulmányunk az első, amely összefüggést talált a keringő C4d szintek és a tumor méret, valamint a kemoterápiás válasz között. Ezért a terápiás válasz hagyományos értékelése mellett a C4d szint mérése is megkönnyítheti az egyénre szabott terápia meghatározását.

V. Az apelin expresszió szerepe nem kissejtes tüdődaganatok angiogenezisében és prognózisában

V.1. Bevezetés

Az elmúlt évtizedben az onkológiai kutatásokban a molekulárisan célzott terápiák kerültek a középpontba, köztük az érhalózatra ható szerek. Az egyre hatékonyabb antiangiogén szerek fejlesztésének elengedhetetlen része az újabban felfedezett angiogén molekulák alapos tanulmányozása, beleértve az apelinerg jelátviteli rendszert. A humán apelin receptort (APJ) [mely egy 377 aminosav hosszú G-protein-kapcsolt receptor (GPCR)] 1993-ban azonosították O'Dowd és mtsai, míg az apelin receptor ligandja 1998-ban került izolálásra szarvasmarha gyomor homogenátumból (Tatemoto és mtsai. által). Ez utóbbi peptidet nevezték el apelinnek. Az apelin előalakot proteázok hasítják, hogy létrehozzák a – jelentősen rövidebb – biológiailag aktív formákat, így az apelin-36, -17, -16, -13, -12 molekulákat és az apelin-13 pyroglutamáttal módosított alakját, a Pyr1-apelin-13-at. Ez utóbbi molekula esetében a poszttranszlációs módosítást a glutaminil cikláz katalizálja, és ez ellenállóbbá teszi a peptidet az enzimatisz degradációval szemben.

Élettani szempontból az APJ/apelin rendszer szerepe összetett és igen sokoldalú. Mivel az apelin és receptora intenzíven expresszálódik a hypothalamus szupraoptikus és paraventriculáris magjaiban, feltételezhetjük, hogy az APJ/apelin rendszer részt vesz a hypothalamus-hypophysis tengely – és ezáltal a folyadék homeosztázis – szabályozásában. Ugyanakkor fontos, hangsúlyozni, hogy az ezzel kapcsolatos eredmények javarészt ellentmondásosak, hiszen míg egyesek szerint apelin adása patkányokban a vízfogyasztás csökkenésével jár, addig mások szerint épp a vízfogyasztás növekedését váltja ki. Az apelin egy másik lehetséges szerepe az anyagcserefolyamatok szabályozásában keresendő: hiperinzulinémiás elhízott egérben megfigyelték a plasma és az adipocyták apelin szintjének növekedését, ugyanakkor alacsony inzulin szintnél és éheztetés során csökkent a zsírszjek által szekretált apelin mennyisége. Tekintettel arra, hogy a szekréció gyorsan helyreállt táplálék felvétele után, arra következtethetünk, hogy az apelin szekréció mértékét az inzulin növeli és a zsírszjek jelenthetik a keringő apelin fő forrását.

A fiziológiai folyamatok mellett, az apelin/APJ rendszernek szerepe lehet a gyulladásos folyamatokban (például gyulladásos bélbetegségek) is, és májcirrózis esetén is aktiválódhat.

Továbbá *in vivo* tanulmányokban leírták, hogy az apelin vérnyomáscsökkentő hatással is rendelkezik a perifériás vénák tágítása és a nitrogén-monoxid termelődésének serkentése révén.

Onkológiai szempontból, az apelin fokozott expressziója több daganattípus esetén is megfigyelhető. Immunhisztokémiai vizsgálatokon alapuló tanulmányok kimutatták, hogy invazív duktális vagy lobuláris emlőcarcinoma rosszindulatú tumorsejtjei jelentős mértékben expresszálják az apelint. Szájüregi laphámrák esetén szintén megfigyelhető apelin expresszió, sőt prognosztikus értékkel is bír ezen daganattípus esetén. Az angiogenezis szempontjából kiemelő, hogy rágszáló emlőrák és melanóma modell esetén az apelin nagymértékű kifejeződése serkenti a tumorok beereződését és *in vivo* növekedését. Glioblastoma multiforme esetében pedig az angiogén tumor érhálózatában fokozottan expresszálódik az apelin receptor és ligandja, amely autokrin szabályozási módra utal a tumor beereződésének a folyamatában. Végezetül pedig kiemelő, hogy az apelin receptor nagymértékű kifejeződése megfigyelhető mind a colon26 rágszáló adenocarcinoma, mind a Lewis tüdő adenocarcinoma endotél sejtjein is. Ez utóbbi daganattípus esetén a receptor és ligandjának koexpressziója figyelhető meg a tumor vérereiben. Apelint túltermelő colon26 sejtekből fejlődő tumorokban a vérerek belső átmérője nagyobb volt a kontroll tumorokhoz képest, és a vérerek belső átmérőjének – apelin hatására történő – növekedéséről írnak humán PC3 prosztata ráksejtekből és B16 egér melanóma sejtekből kifejlődő tumorokban is. Tekintettel arra, hogy az apelinerg rendszer szerepe és az apelin expresszió szabályozásának molekuláris mechanizmusa még nem teljesen ismert NSCLC esetén, tanulmányunk célja:

- az apelin és receptora expressziójának vizsgálata NSCLC sejtvonalakon és humán tumor mintákon (mRNS szinten kvantitatív PCR-rel, fehérje szinten immunhisztokémiával, immunfluoreszcens jelöléssel, valamint ELISA-val)
- az apelin NSCLC-re kifejtett hatásának vizsgálata *in vitro* (exogén apelin kezelés és apelin expressziós vektorral történő transzfekció révén)
- a fokozott apelin expresszió NSCLC-re kifejtett hatásának vizsgálata *in vivo* (a tumornövekedés, az érdenzitás és a mikroér-kerület szempontjából)
- humán NSCLC daganatminták apelin expressziójának, beereződésének és klinikai viselkedésének összehasonlító/átfogó vizsgálata
- a megnövekedett apelin protein expresszió prognosztikus jelentőségének vizsgálata

V.2. Betegek és Módszer

2/1. Beteganyag

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz összesen 94, NSCLC-vel diagnosztizált beteget választottunk ki, akiket 1997. januárja és 2001. decembere között kezeltek az Országos Korányi Pulmonológiai Intézetben (OKPI). Közülük 68 férfi- és 26 nőbeteg volt (medián: 63 év [intervallum: 44-81 év]). A formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) NSCLC minták az OKPI Patológiai Osztályáról származtak, az Etikai Bizottság jóváhagyásával és az Orvosok Világszövetségének Helsinki Deklarációjában megfogalmazott etikai irányelvek figyelembe vételével. A szövettani diagnózist és az N-stádiumot hematoxylin és eozinnal festett mintákon határoztuk meg. Ez alapján 54 adenocarcinómát, 35 laphámrákot, és 5 nagysejtes tüdőcarcinómát különítettünk el. A mintákból tumormentes tüdőszövetet is eltávolítottunk. A stádiumokat az American Joint Committee on Cancer TNM klasszifikációja alapján határoztuk meg a műtéti és a patológiai leletek alapján.

A molekuláris vizsgálatokhoz (polimeráz láncreakció) 46 NSCLC-vel kezelt beteg sebészi úton frissen eltávolított tumoros és normál tüdőszövetét használtuk. A sebészi rezekciót követően, a tumoros mintákat félbevágtuk, majd a minták egyik felét paraffinba ágyaztuk, a rutin szövettani vizsgálat, valamint az apelin pozitív tumorsejtek százalékanak immunhisztokémiai jelöléssel való meghatározása céljából. A minták másik felét folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és -80°C-on tároltuk az mRNS izolálásáig. Minden tumoros és normál tüdőszövet sebészi úton lett eltávolítva, és egyik bevont beteg sem részesült neoadjuváns terápiában.

12. táblázat - Klinikopatológiai jellemzők az apelin expresszió függvényében

	Betegszám (%)	Apelin expresszió		p érték
		Alacsony (%)	Magas (%)	
Betegek	94 (100%)	30 (31,91%)	64 (68,09%)	
Kor (évek)				
63<	45 (47,87%)	11 (36,67%)	34 (53,13%)	
63≥	49 (52,13 %)	19 (63,33%)	30 (46,87%)	0,14
Dohányzás				
Nem dohányzó	21 (22,34%)	7 (23,33%)	14 (21,88%)	
Jelenleg/korábban	73 (77,66%)	23 (76,67%)	50 (78,12%)	0,87
Nem				
Férfi	68 (72,34%)	21 (70%)	47 (73,44%)	
Nő	26 (27,66%)	9 (30%)	17 (26,56%)	0,73

N stádium				
N0	35 (37,23%)	12 (40%)	23 (35,94%)	0,94
N1	30 (31,92%)	10 (33,33%)	20 (31,25%)	0,63
N2	29 (30,85%)	8 (26,67%)	21 (32,81%)	0,56
T stádium				
T1	37 (39,36%)	13 (43,33%)	24 (37,5%)	0,36
T2	32 (34,04%)	8 (26,67%)	24 (37,5%)	0,37
T3	25 (26,6%)	9 (30%)	16 (25%)	0,94
Szövettan				
ADC	54 (57,45%)	18 (60%)	36 (56,25%)	0,64
SCC	35 (37,23%)	10 (33,33%)	25 (39,06%)	0,6
LCC	5 (5,32%)	2 (6,67%)	3 (4,69%)	0,76
MVD				
Alacsony	51 (54,26%)	21 (70%)	30 (46,87%)	
Magas	43 (45,74%)	9 (30%)	34 (53,13%)	0,04

2/2. Sejtvonalak

Az NSCLC sejtvonalak közül a H358, a H1650, a H1975 és HTB182 vonalak az American Type Culture Collection-től (Virginia, USA), míg az LCLC-I03H és HCC-15 vonalak a German Collection of Microorganisms and Cell Cultures-től (Braunschweig, Németország) származtak. Az előírásoknak megfelelően, a sejtvonalakat 37⁰C-on, 5% CO₂-ot tartalmazó atmoszférában, és RPMI 1640 tápfolyadékban (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) tároltuk, ami 10% főtális borjúsavót (FCS; Sigma Chemical Co.) és 1% penicillin/streptomycint (Sigma Chemical Co.) tartalmazott.

2/2/1. Stabil transzfektáns sejtvonalak létrehozása

A humán apelin komplementer DNS-t az OriGene-től rendeltük (Rockville, USA). A kódoló régiót a következő primerekkel amplifikáltuk: 5'-CGC GAA TTC GGC ATG AAT CTG CGG CTC TG-3' és 5'-GCG CTC GAG TCA GAA AGG CAT GGG TCC-3'. A PCR termékeket pcDNA 3.1 vektorba szubklónoztuk *EcoRI* és *XhoI* restrikciós enzimek segítségével (Invitrogen). Az expressziós vektor nukleotid szekvenciáját DNS szekvenálással erősítettük meg. A H358 és H1975 sejtvonalakat transzfektáltuk a kontroll, illetve apelin-kódoló pcDNA 3.1 vektorokkal a FuGENE 6 transzfekciós reagenssel (Roche Diagnostic, Mannheim,

Németország), majd a stabil transzfektánsokat geneticin rezisztenciájuk alapján szelektáltuk (400 µg/ml; Gibco, Paisley, UK).

2/3. *In vitro* sejproliferációs teszt

Az NSCLC sejtvonalaink esetében, a 96-lyukú szövettenyésztő edényekbe 10^4 sejtet tettünk ki lyukanként RPMI/FCS-ben, majd 24 óra elteltével szérumban jelenlétében vagy anélkül kezeltük őket apelin-36-tal (Phoenix Pharmaceuticals) a következő koncentrációkban: 0, 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} M. A sejtek inkubációs ideje 72 óra volt, majd kolorimetriásan meghatároztuk a relatív sejtdenzitást. Lyukanként 0,5 mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-ot (Sigma-Aldrich Co.) adtunk a sejtekhez, amelyet 4 óra elteltével, 37°C -on történő inkubálást követően óvatosan leöntöttünk, és az élő sejtekben keletkezett formazán-kristályokat DMSO-ban oldottuk. Az abszorbanciát 570 nm-en mértük ELISA Microplate Readerrel (Bio-Rad). A kísérleteket háromszor ismételtük.

2/4. Az apelin expressziójának és a mikroerek sűrűségének meghatározása humán és xenograft tumorokban

Az immunhisztokémiai jelölést 10%-os neutrális pufferolt humán FFPE mintákon végeztük. Az 5 µm-es metszeteket először deparaffináltuk, majd blokkoltuk az endogén peroxidázokat 3%-os metanolos H_2O_2 -oldattal 15 percig. Ezt követően antigénfeltárást végeztünk 0,1 M-os, pH 6-os citrát pufferben 800 W-os mikrohullámmal 15 percig. Ezután a metszeteket inkubáltuk 15-15 percet 0,1%-os avidinnal, valamint 0,01%-os biotinnal (Vector Laboratories), az endogén avidin és biotin blokkolása céljából. A nem specifikus proteinkötések blokkolása céljából a metszeteket 0,05%-os caseinnel (Sigma Chemical Co.), 0,05% Tween-20-szal és PBS-sel inkubáltuk 30-30 percet. A következő elsődleges antitesteket használtuk: egér anti-humán CD31 (DakoCytomation, Carpinteria, USA) és nyúl anti-humán apelin-36 (Phoenix Pharmaceuticals). Másodlagos antitestként biotinált anti-egér IgG-t (Vector Laboratories) és sertés anti-nyúl IgG F(ab')₂ fragmentet (DakoCytomation) használtunk, majd streptavidin-tormaperoxidázzal (DakoCytomation) és 3-amino-9-ethylcarbazollal (DakoCytomation) detektáltunk. A magfestés hematoxylinnal történt.

Az apelinrel jelölt minták esetében az apelin-expresszió mértékére a pozitív NSCLC sejtek hányadából következtettünk. A pozitívitás szempontjából, a metszeteket a pozitív tumorsejtek

százalékos eloszlása alapján osztályoztuk: (-) nincsenek pozitív tumorsejtek, (1+) 1-10% a pozitív sejtek aránya, (2+) 10-50% pozitív sejt, (3+) >50% pozitív sejt. A metszetek elemzéséhez a Nikon Eclipse 80i mikroszkópot használtuk, míg a fotókat SPOT digitális kamerával (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA) készítettük.

Humán minták esetében, a mikroerek sűrűségének és területének meghatározásához a vérereket egér anti-humán CD31 (DakoCytomation) antitesttel jelöltük, míg egér tumorokban patkány anti-egér CD31 (Pharmingen) antitestet használtunk. Másodlagos antitestként biotinált anti-egér, illetve anti-patkány antitesteket (Vector Laboratories) használtunk, melyeket fluoreszcens streptavidinnel (Jackson ImmunoResearch) jelöltünk. Tumoronként három-három területet értékeltünk a CUE-2 komputerizált képanalizáló rendszer segítségével (Olympus, Tokyo, Japán).

2/5. Sejtes apelin expresszió vizsgálata

A vad típusú humán NSCLC vonalak (H358, H1650, HCC15, LCLC-I03H, H1975 és A549) és a kontroll vagy apelin expressziós vektorral stabilan transzfektált H358 és H1975 sejtek tenyésztésének felülűszóját 72 óra múlva eltávolítottuk. A minták apelin koncentrációját – a kereskedelmi forgalomban kapható – apelin-36 ELISA kittel (Phoenix Pharmaceuticals) határoztuk meg, a gyártó előírásainak megfelelően. Ugyanakkor kiemelendő, hogy ezen kit 100%-os keresztreaktivitást mutat az apelin-36-al, az apelin-13-al és az apelin-12-el egyaránt. Az eredményeinket összevetettük a standard görbékkel, és az alsó detektálási limit 0,08 ng/ml volt. A méréseket háromszor ismételtük.

2/5/1. Apelin és receptora expressziójának vizsgálata reverz transzkripció PCR-rel

Az össz-RNS-t a humán NSCLC vonalak 2D-s és 3D-s tenyészeiből és a nyirok endotél sejtekből Trizol reagenssel (Invitrogen), míg a 46 NSCLC beteg frissen fagyasztott tumoros és normál tüdőszövetéből Qiagen RNeasy Mini kittel (Qiagen, Maryland, USA) izoláltuk. A maradék DNS-tartalmat RNase-free DNase kittel (Applied Biosystems, California, USA) távolítottuk el. Az össz-RNS 3-3 mikrogrammjából reverz transzkripcióval cDNS-t készítettünk az alábbi reakcióeleggyel: deoxy-NTP (0,5 mM), random primer és oligo-dT keveréke (3 μ M végkoncentráció) (Applied Biosystems), RNasin ribonukleáz-inhibitor (20 U/reakció; Promega, Wisconsin, USA), reverz transzkripció puffer (500 mM Tris-HCl, pH

8.3, 500 mM KCl, 30 mM MgCl₂ és 50 mM ditiotritol), M-MLV reverz transzkriptáz (Sigma-Aldrich, 200 U/reakció) és DEPC-kezelt víz. Az átírás eredményét és az RNS-minták tisztaságát β -aktin amplifikálásával ellenőriztük.

Kvalitatív PCR-t apelinre és β -aktinra készítettünk. Az amplifikálást AmpliTaq Gold kittel (Applied Biosystems) végeztük, a PCR reakció pedig 42 ciklusból állt a következő hőmérsékletekkel: 1 percig 94°C, 1 percig 55°C és 2 percig 72°C. A kvantitatív – valós idejű – PCR reakciót Applied Biosystems 7500 Real-time PCR System készüléken futtattuk meg. Ehhez reverz transzkripcióval átírt cDNS mintákat használtunk, TaqMan Universal PCR Master mixszel (Applied Biosystems) és Taqman apelin (Hs00175572_m1), illetve APJ (Hs00270873_s1) génexpressziós esszével (Applied Biosystems) megsokszorozva az apelin, illetve receptora génjét. A real-time PCR analízis eredményeinek standardizálása érdekében a megsokszorozódott géneket a β -aktin háztartási génhez viszonyítottuk.

2/6. Xenograft tumorok vizsgálata

Az apelint kifejező, transzfektált NSCLC sejtek növekedését xenograft tumorokban összevetettük a kontroll vektort expresszáló sejtek növekedésével 6 hetes nőstény athymias nude egerekben. Az intézményi állatjóléti szabályoknak megfelelően az egereket 12 órás fény-sötét ciklusban tartottuk patogénmentes körülmények között mikroizolátor ketrecekben (engedélyszám: 22.1/1268/3/2010). Az apelint stabilan expresszáló, illetve a kontroll vektorral transzfektált H358 és H1975 sejteket 80%-os konfluenciánál tripszinizáltuk, majd kétszer mostuk. A xenograftok létrehozásához tízmillió sejtet oltottunk be egerenként Matrigelben szubkután. A tumorok méretét 4 naponta mértük, és mm³-ben fejeztük ki az alábbi képlet alapján: hosszúság x szélesség² $\pi/6$. A tumorokat 32 nappal a beoltás után eltávolítottuk, és frissen fagyasztottuk folyékony nitrogénben.

2/7. Statisztikai számítások

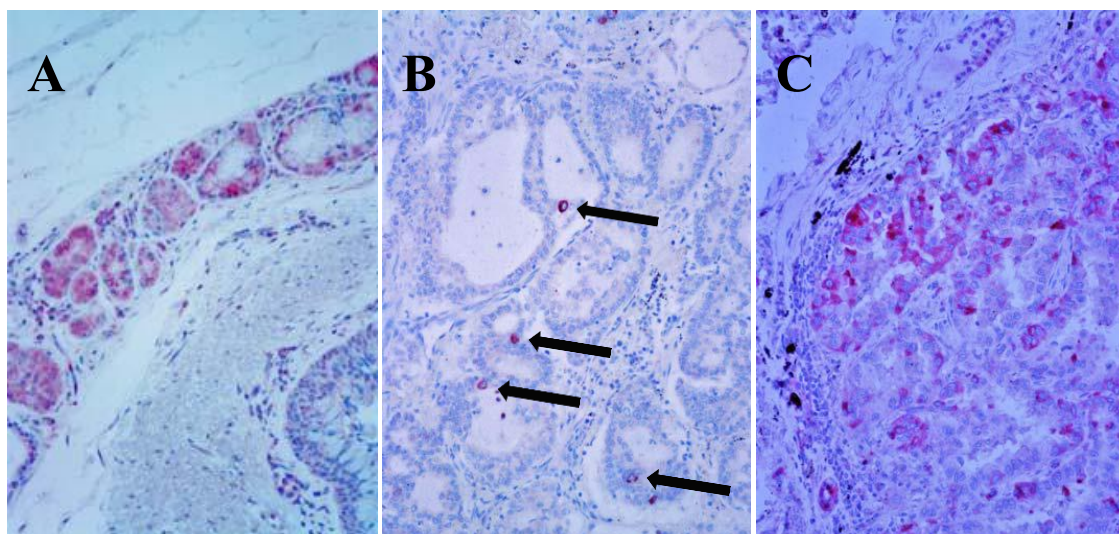
A folytonos változókat – normál eloszlás esetén – kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze, míg nem-normál eloszlás esetén a Mann-Whitney U tesztet használtuk. A kategorikus adatokat Fisher-egzakt teszttel vagy Khí-négyzet próbával elemeztük (az esetszám függvényében). Az apelin fehérje-, és mRNS-szintű expressziója közti korreláció kimutatásához Spearman-féle

rangkorrelációs tesztet használtunk. A túlélési görbék összehasonlítására a Kaplan-Meier megközelítést és a log-rank-tesztet alkalmaztunk, valamint a többváltozós analízishez Cox regressziót használtunk. Az összefüggéseket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak. A statisztikai analízisek elvégzéséhez a Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Oklahoma, USA) programot használtuk.

V.3. Eredmények

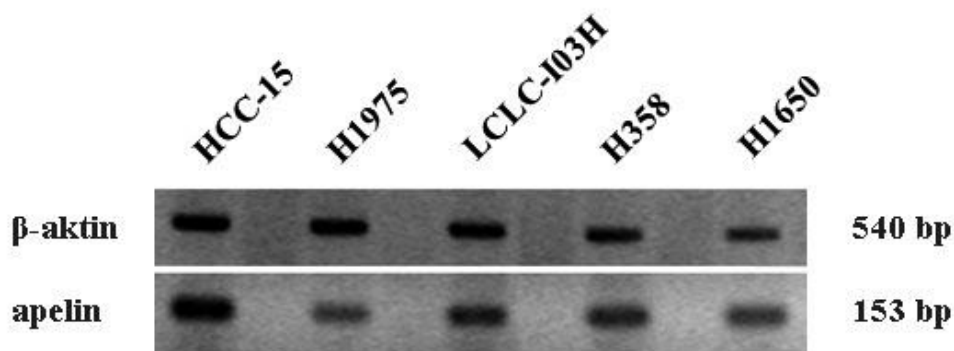
3/1. Apelin expresszió vizsgálata szövettani mintákon és NSCLC sejtvonalakon

Az FFPE mintákon ($n = 94$) végzett immunhisztokémiai vizsgálatok során, az apelin megjelenése citoplazmás mintázatot mutatott. Az apelin protein főként a humán bronchiális mirigyekben és a tumorról határos epitheliumban fejeződött ki, míg az alveoláris sejtek negatívak voltak.



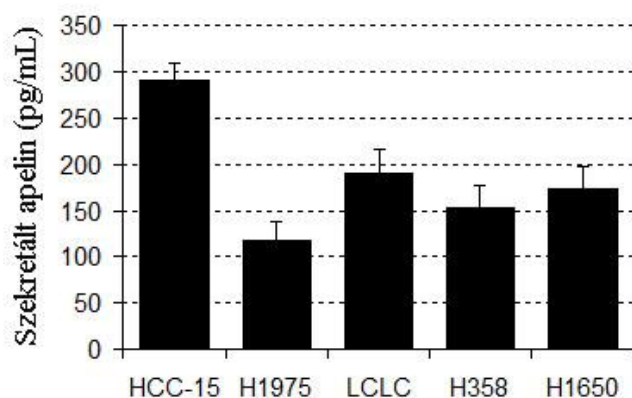
18. ábra - Normál tüdő- és NSCLC szövetek immunhisztokémiai jelölése az apelin expressziójának vizsgálatára. (A) Apelin immunjelölés a bronchiális mirigyekben a normál tüdőszövetben. (B,C) Immunhisztokémiai példák a fokális (B) és diffúz (C) apelin jelölődési mintázatokra (ami megfelel az alacsony és magas apelin expressziónak). A nyilak apelint kifejező tumorsejteket hivatottak jelölni.

Sejtvonalaink – mRNS szintű – apelin expresszióját RT-PCR-al vizsgáltuk, és a termékeket megfuttatva látható, hogy az apelin expresszálódik mind az öt vizsgált NSCLC vonalban (19. ábra).



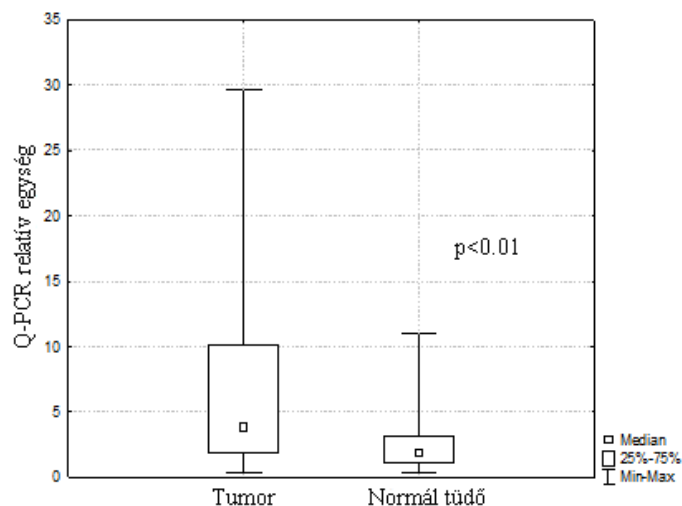
19. ábra. - RT-PCR az apelin mRNS kimutatására humán NSCLC sejtvonalakban

A sejtenyésző médiumba szekretált apelin meghatározásához ELISA-t használtunk. Eredményeink igazolták, hogy a sejtvonalak mindegyike szekretálta az apelin proteint, a mért értékek pedig 100-300 pg/mL tartományon belül voltak minden NSCLC vonal esetében (20. ábra).



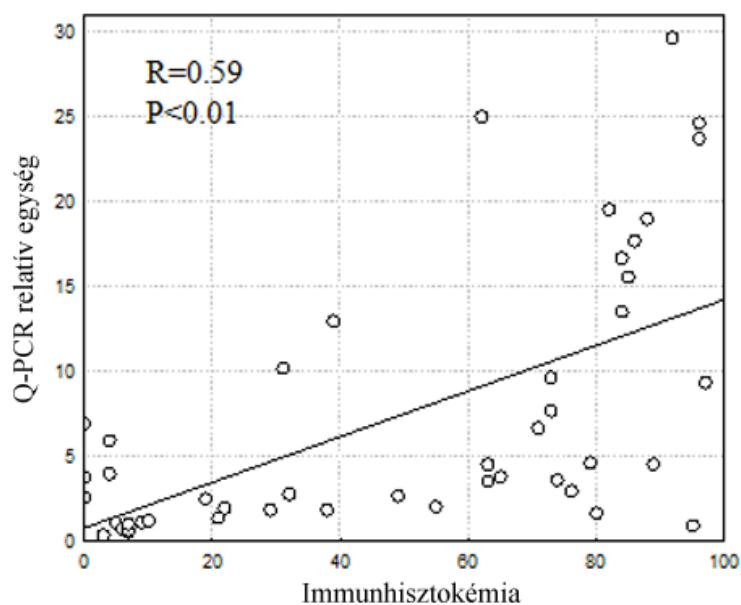
20. ábra - ELISA a szekretált apelin detektálására NSCLC sejtenyészetek kondicionált médiumában. Mindegyik sejtvonal szekretálta az apelint. Az oszlopok 3 kísérlet átlagát mutatják $\pm$ SD.

Az NSCLC sejtvonalaink mellett humán rezekciós mintákban is vizsgáltuk az apelin expressziót mRNS szinten. Ehhez a sebészi úton frissen eltávolított tumoros és normál szöveti mintákat használtuk ($n = 46$). A 46 nem tumoros és tumoros mRNS extraktum-pár kvantitatív valós idejű PCR analízise szerint az apelin expressziós szintek szignifikánsan magasabbak voltak a tumoros mintákban (vs. a nem tumoros [azaz normal tüdőszövetet tartalmazó] minták, $p < 0,01$; 21. ábra).



21. ábra - Kvantitatív valós idejű PCR analízis a tumoros és normál tüdőszövet apelin mRNS szintjének összehasonlítására. Az apelin expresszió lényegesen magasabb volt a tumoros mintákban ($p < 0,01$; $n = 46$).

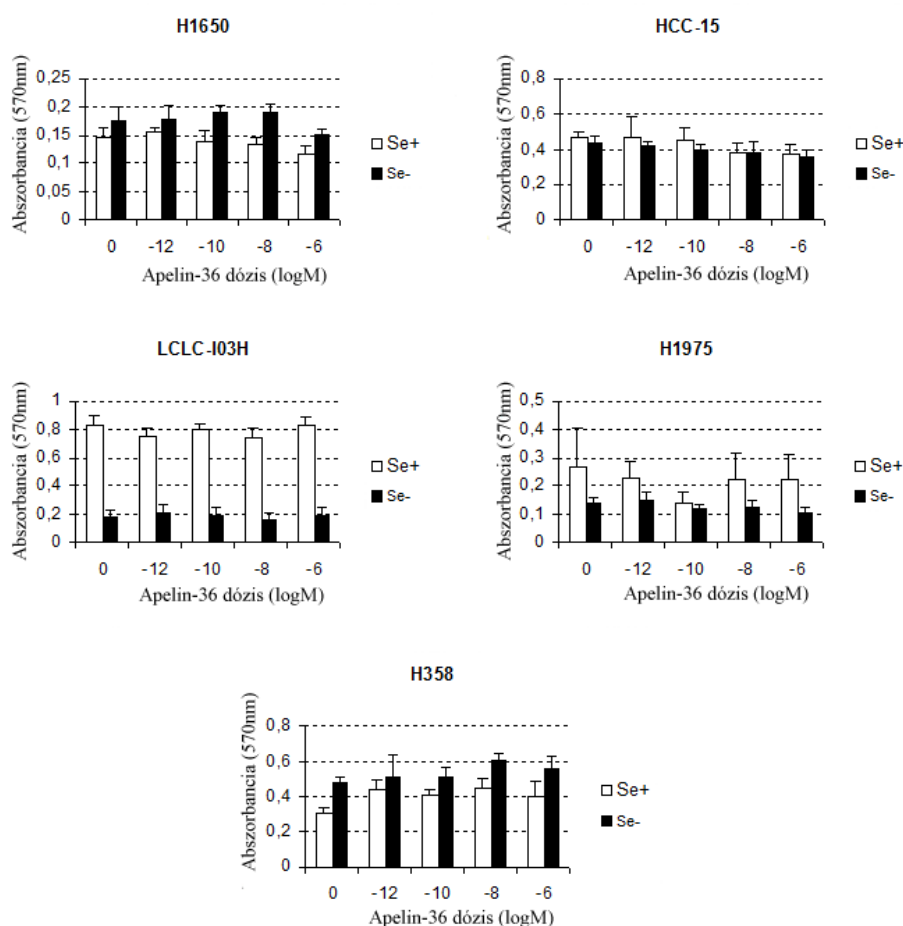
Ezt követően összehasonlítottuk az NSCLC mintákban mért apelin mRNS szinteket az immunhisztokémiával detektált protein expressziós szintekkel, és szignifikáns mértékű pozitív lineáris korrelációt találtunk ($r = 0,59$, $p < 0,01$; 22. ábra).



22. ábra – Korrelációs analízis a humán NSCLC minták kvantitatív RT-PCR-rel mért és immunhisztokémiával meghatározott apelin expressziójára vonatkozóan. Szignifikáns pozitív lineáris korrelációt találtunk az mRNS szint és a protein expressziós szintek között ($n = 46$, $R = 0,59$, $p < 0,01$).

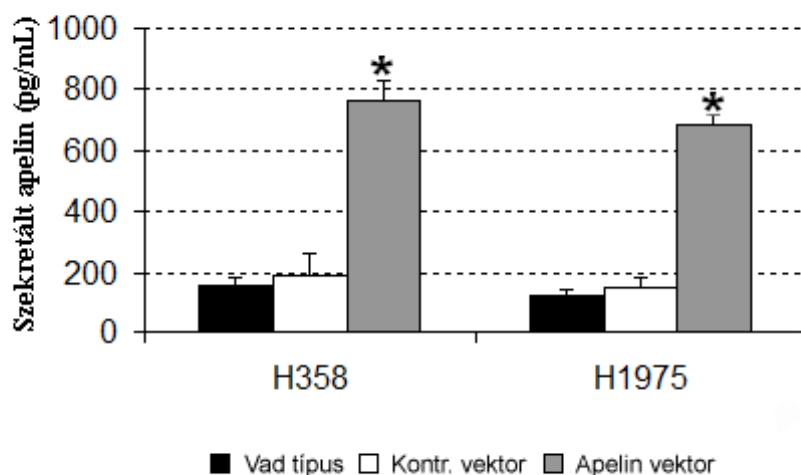
3/2. Exogén apelin kezelés és apelin expressziós vektorral történő transzfekció hatása az NSCLC vonalak növekedésére *in vitro*

Az apelin – különböző koncentrációval történő – kezelés hatását NSCLC sejtvonalakon proliferációs tesztek segítségével vizsgáltuk. Célunk, az apelin autokrin hatásainak feltérképezése volt, az NSCLC sejtvonalak növekedését illetően. Az exogén apelin kezelés egyik koncentrációban sem befolyásolta a sejtek *in vitro* proliferációs képességét a kezeletlen sejtekhez képest a 72 órás kísérletben sem szérumos, sem szérummentes közegben (23. ábra).



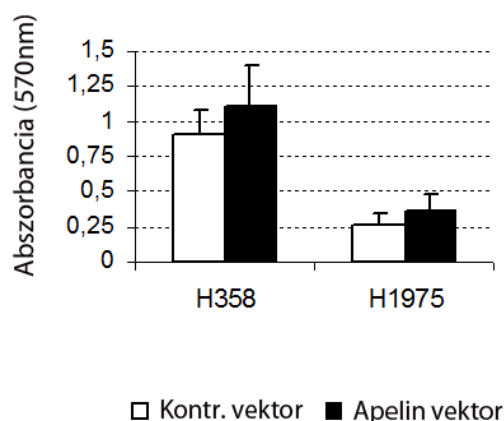
23. ábra - *In vitro* proliferációs teszt NSCLC sejtvonalakkal. Az exogén apelin kezelés nem befolyásolta jelentősen a vad típusú sejtek (H1650, HCC-15, LCLC-I03H, H1975 és H358) *in vitro* proliferációs képességét. Az oszlopok 3 kísérlet átlagát mutatják $\pm$ SD.

A továbbiakban, a viszonylag alacsony apelin expressziós szinttel rendelkező H358 és H1975 sejteket stabilan transzfektáltuk apelin expressziós vektorral, hogy megnöveljük az apelin kifejeződésének mértékét. A transzfekciót követően az apelin celluláris szekréciójának mértékét ELISA-val ellenőriztük. A vizsgált sejtvonalak genetikai módosítása a szekretált apelin szintjének szignifikáns emelkedését eredményezte (mindkét sejtvonal esetében, $p < 0,05$; 24. ábra).



24. ábra - ELISA az apelin túltermelés hatásainak kimutatására apelin vagy kontroll vektorral stabilan transzfektált H358 vagy H1975 sejtek kondicionált médiumában a vad típusú sejtekhez hasonlóan. Az apelin vektorral stabilan transzfektált sejtvonalak apelin szekréciója a többszörösére emelkedett. Az oszlopok 3 kísérlet átlagát mutatják $\pm$ SD; * $p < 0,05$ vs. kontroll.

Ezt követően proliferációs tesztek révén vizsgáltuk az apelin protein expressziós szint emelkedésének – a sejtek növekedésére kifejtett – hatását *in vitro*. Eredményeink alapján, egyik apelint túltermelő sejtvonal sem mutatott megnövekedett proliferációt a kontroll vektorral transzfektált sejtekhez képest ($p > 0,05$ mindkét sejtvonalnál; 25. ábra).

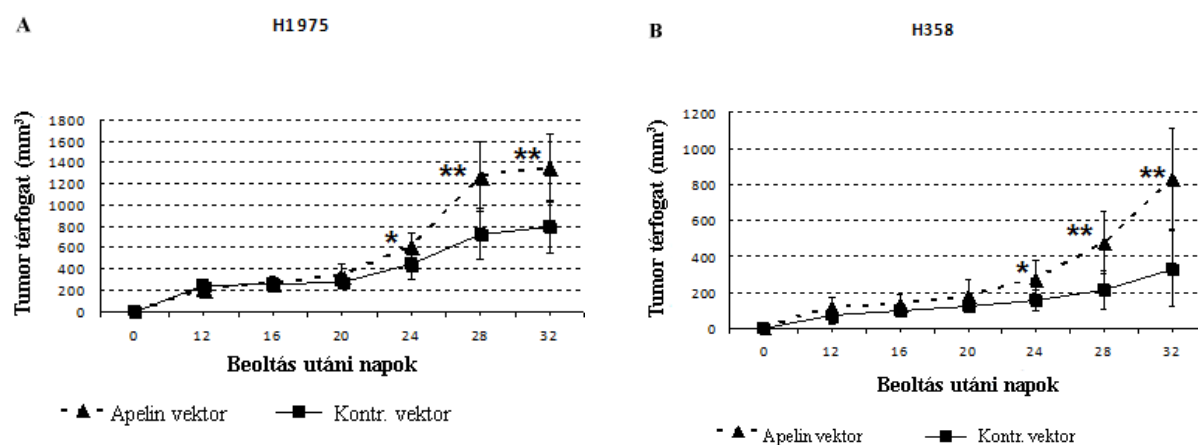


25. ábra – Nem észleltünk szignifikáns eltérést a kontroll vagy apelin expressziós vektorral transzfektált H358 és H1975 sejtek proliferációjában az *in vitro* proliferációs tesztek során. Az oszlopok 3 kísérlet átlagát mutatják $\pm$ SD.

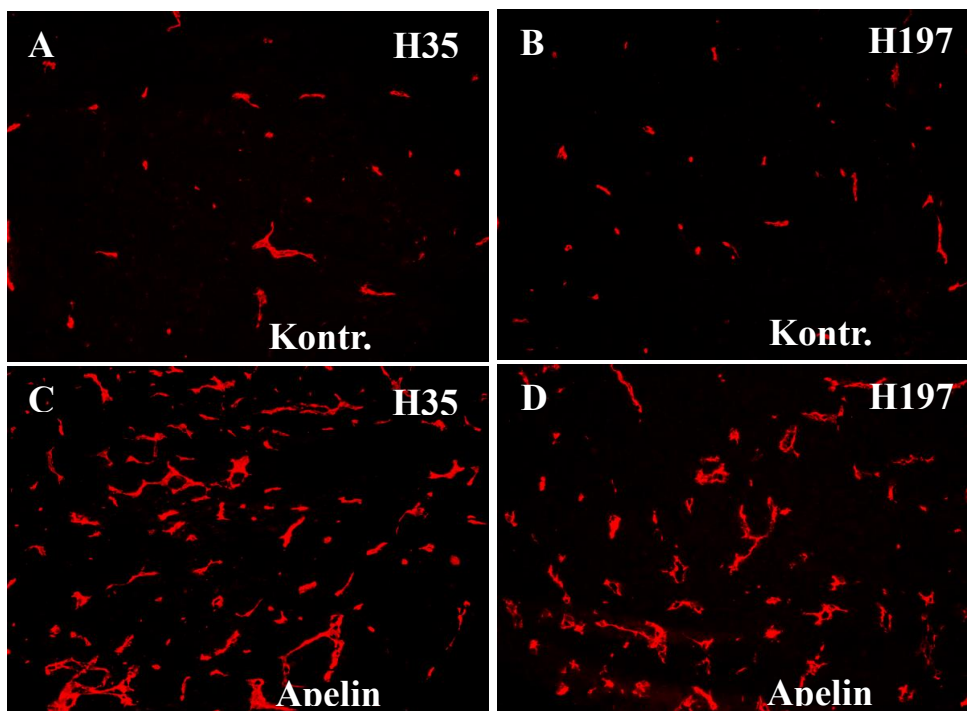
3/3. Fokozott apelin expresszió hatása az NSCLC növekedésére *in vivo*

Ahogy már fentebb leírtuk, az exogén apelin (23. ábra), illetve az apelin túltermelése (25. ábra) nem befolyásolta az NSCLC sejtek növekedését *in vitro*. Az apelin *in vivo* hatásaiak vizsgálata céljából, szubkután injektáltuk az apelin vagy kontroll vektorral transzfektált H358 vagy H1975 sejteket immundeficiens egerekbe. Ezt követően összevetettük a tumorok *in vivo* növekedését, és azt tapasztaltuk, hogy a tumorok növekedése gyorsabb volt az apelint túltermelő sejtekkel beoltott egerekben, a kontroll vektorral transzfektált sejteket hordozó egerekhez viszonyítva. A beoltást követő 24. napon, mindkét sejtvonal esetében szignifikánsan nagyobb tumortérfogatokat mértünk az apelin vektorral transzfektált vonalaknál a kontroll vektorral transzfektált vonalakhoz képest (26. ábra).

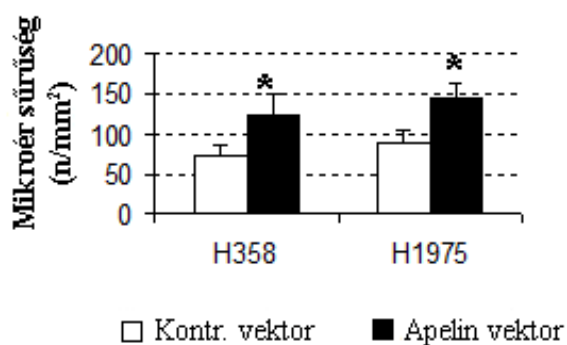
26. ábra - A genetikai módosítást követő apelin túltermelés serkenti a humán NSCLC vonalak *in vivo* növekedését. A beoltást követő 24. napon már szignifikáns az eltérést észleltünk mindkét sejtvonal esetében. (■) és (▲) csoportonként 8 egér átlagát mutatja $\pm$ SD; $p < 0,05$ és $p < 0,01$ vs. kontroll.



Megfigyelésünk, mely szerint az apelin túltermelése serkenti a humán NSCLC vonalak *in vivo* növekedését, alátámasztja más tanulmányok eredményeit, amelyek az apelin molekula lehetséges angiogén hatásáról számolnak be különböző *in vitro* és *in vivo* kísérleti rendszerekben. Ennek okán mi is vizsgáltuk az apelin érzékelésre kifejtett hatását xenotranszplantált humán NSCLC sejtvonalakban *in vivo*. A morfometriai analízis, amelynek során CD31-et használtunk az endotélsejtek jelölésére (27. ábra), szignifikánsan nagyobb mikroér sűrűséget mutatott az apelin-túltermelő tumorokban (vs. kontroll tumorok képest, $p < 0,05$ a H358 és H1975 sejtvonal esetében is).

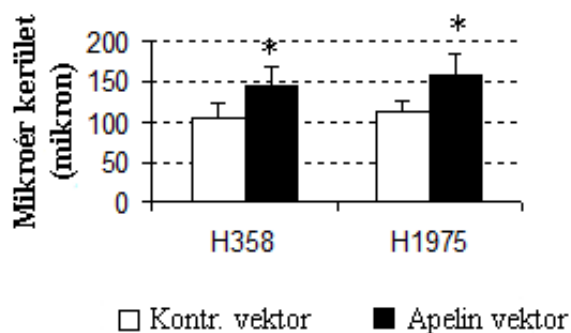


27. ábra - Az apelin túltermelése serkenti az NSCLC angiogenezisét *in vivo*. 32 napos apelin-túltermelő H358 (C) és H1975 (D) tumorok, valamint kontroll H358 (A) és H1975 (B) tumorok fagyasztott metszeteit CD31 endotélsejt markerrel jelöltük (piros fluoreszcencia). 200x-os nagyítás.



28. ábra - Apelin túltermelő, valamint kontroll H358 és H1975 tumorok mikroér sűrűsége a 32. napon. Mindkét sejtvonal esetében az apelin túltermelő tumorok mikroér sűrűsége szignifikánsan nagyobb a kontroll tumorokhoz képest. Az oszlopok 8 egér átlagát mutatják csoportonként $\pm$ SD; * $p < 0,05$ vs. kontroll.

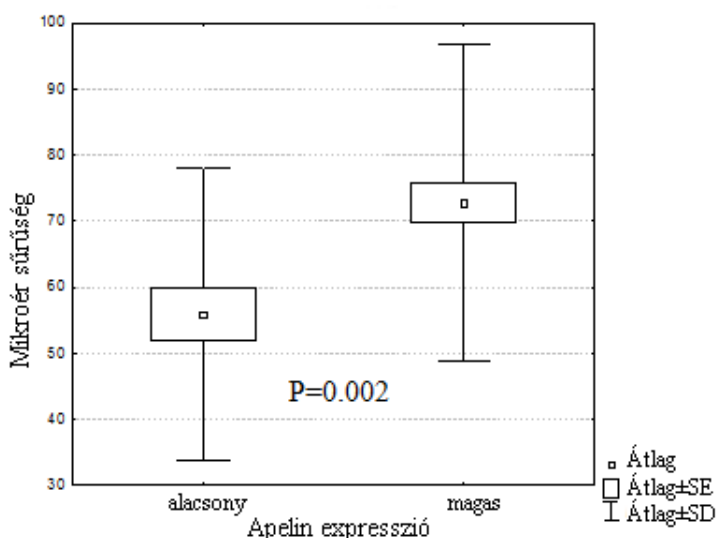
Ezenkívül összehasonlítottuk a tumorkapillárisok területét is, és azt tapasztaltuk, hogy az apelin transzfektált tumorok esetén szignifikánsan nagyobb volt tumorkapillárisok területe (vs. kontroll vektorral transzfektált tumorok, $p < 0,05$; 29. ábra).



29. ábra - Apelin túltermelő és kontroll H358 vagy H1975 tumorok mikroér kerülete a 32. napon (mikrométerekben kifejezve). Mindkét sejtvonal esetében szignifikánsan nagyobb az apelin túltermelő tumorokban a kontroll tumorokhoz képest. Az oszlopok 8 egér átlagát mutatják csoportonként $\pm$ SD; * $p < 0,05$ vs. kontroll.

3/4. Humán NSCLC daganatminták apelin expressziójának, beereződésének és klinikai viselkedésének összehasonlítása

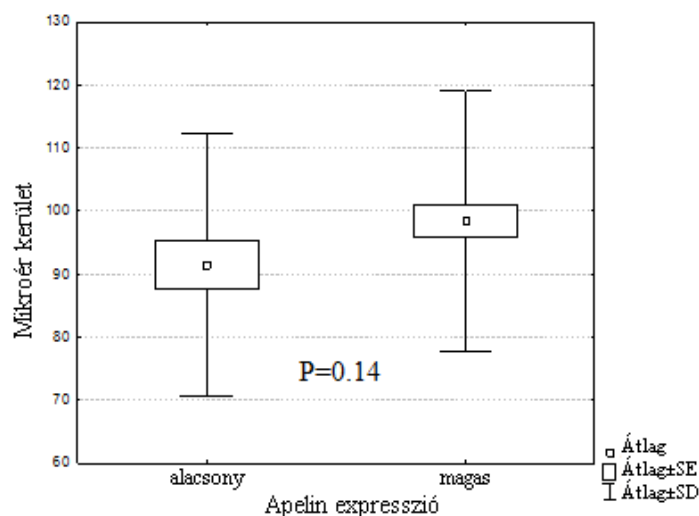
A bevont betegek klinikopatológiai változóit az apelin expresszió függvényében a 12. táblázat foglalja össze. Nem találtunk szignifikáns összefüggést az apelin expresszió és az életkor, a nem, a dohányzás, a tumor stádium (T), a nyirokcsomó stádium (N) és a szövettani típus tekintetében sem. Ugyanakkor az apelin lehetséges angiogén tulajdonságára utal, hogy magas apelin expresszió szignifikánsan gyakrabban párosult nagy érdenzitással ($p = 0,04$; 12. táblázat). Továbbá kimutattuk, hogy a vérerekapillárisok átlagos száma (anti-CD31 jelöléssel) szignifikánsan nagyobb a magas apelin expresszáló tumorokban (vs. alacsony apelin expressziójú tumorok, $p = 0,002$; 30. ábra).



30. ábra - A CD31 jelöléssel meghatározott mikroér sűrűség összehasonlítása az alacsony vs. magas apelin expressziójú NSCLC mintákban ($n = 94$). Magas apelin expresszió esetén lényegesen magasabb a mikroér sűrűség ($p < 0,002$). A mikroér sűrűség a vérerek számát jelenti négyzetmilliméterenként.

Tanulmányoztuk továbbá az összefüggést az apelin expresszió és az angiogén aktivitás mértéke között is a kapilláris kerületek meghatározása révén. Bár nem találtunk statisztikailag

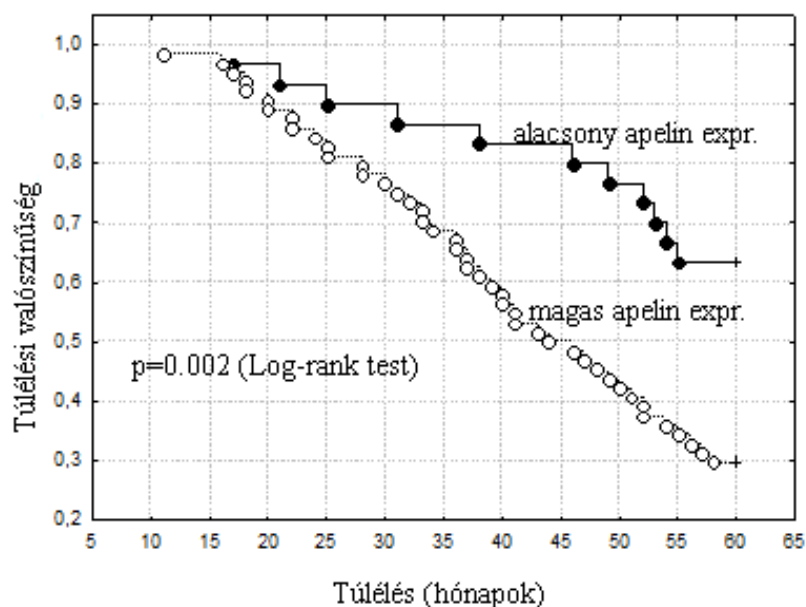
szignifikáns összefüggést a magas vs. alacsony apelin expressziót mutató tumorok között, a mikroerek kerülete nagyobb volt a magas apelin expressziójú tumorok esetében. ($p = 0,14$; 31. ábra).



31. ábra - Mikroér kerületek összehasonlítása az alacsony vs. magas apelin expressziójú humán NSCLC mintákban ($n = 94$). A magas apelin expresszió nagyobb mikroér kerülettel járt, de eredményeink nem érték el a szignifikancia szintet ($p < 0,14$). A mikroér kerület mikrométerben van kifejezve.

3/5. A megnövekedett apelin protein expresszió prognosztikus jelentősége

Ahogy a korábbiakban részleteztük, a 94 NSCLC tumormintán immunhisztokémiai jelöléssel vizsgáltuk az apelin kifejeződését, és az apelin expressziójának mértéke alapján -, 1+, 2+ és 3+ kategóriákba soroltuk azokat. Azt találtuk, hogy a - vagy 1+ csoportokba ($\leq 10\%$ apelin pozitív tumorsejt; alacsony apelin expresszió) tartozó betegek túlélési ideje szignifikánsan hosszabb volt a 2+ vagy 3+ kategóriákba ($> 10\%$ apelin pozitív tumorsejt; magas apelin expresszió) sorolt betegekhez képest. Az öt éves túlélési ráta magas apelin expresszió esetén 29,9%, míg alacsony expressziós szint esetén 63,3% volt ($p = 0,002$, log-rank teszt; 32. ábra).



32. ábra - Kaplan-Meier görbék a bevont betegek túlélésére vonatkozóan az apelin koncentráció függvényében. A magas apelin koncentrációjú tumorok lényegesen rosszabb prognózissal rendelkeznek (vs. alacsony apelin koncentrációjú tumorok, $p = 0,002$).

Ezt követően többváltozós túlélési analízist végeztünk a standard prognosztikus paraméterek (tumor kiterjedés, nyirokcsomó stádium és életkor) függvényében, és azt tapasztaltuk, hogy az apelin expresszió prognosztikus értéke független a többi változótól ($p = 0,021$; 13. táblázat). A nyirokcsomó stádium szintén független prognosztikai tényezőnek bizonyult ($p < 0,01$; 13. táblázat).

13. táblázat - Többváltozós túlélési analízis az apelin expresszió és a standard klinikopatológiai változók függvényében ($n = 94$).

Prognosztikus faktor	RR	95% CI	p érték
Életkor (<63 vs. >63)	1,577	0,9-2,761	0,111
Nem (férfi vs. nő)	0,547	0,289-1,036	0,064
Szövettan (ADC vs. SCC/LCC)	1,015	0,65-1,585	0,946
Patológiás T-stádium (T1 vs. T2-3)	0,94	0,711-1,243	0,664
Patológiás N-stádium (N0 vs. N1-2)	5,974	2,888-12,357	<0,001
Apelin-36 (alacsony vs. magas)	2,354	1,135-4,883	0,021

V.4. Megbeszélés

A molekulárisan célzott terápiák jelentősége az elmúlt évek során felértékelődött az onkológiai gyakorlatban. Ezek javarészt olyan kismolekulák vagy ellenanyagok melyek az onkogén fehérjéket, vagy az angio- és lymphangiogenezist képesek gátolni. Így az érdeklődés középpontjába kerültek az újonnan felfedezett angiogén molekulák is, melyek közé tartozik az apelin molekula. Az apelin jelentősége továbbá abban nyilvánul meg, hogy serkenti az endotél növekedését különböző *in vitro* és *in vivo* kísérleti rendszerekben és jelentős mértékben expresszálódik mind a humán daganatokban, mind a rágszáló tumorkban. Ennek ellenére az apelinerg rendszer szerepe az NSCLC beereződésében javarészt ismeretlen, és nem állnak rendelkezésünkre adatok az apelin klinikopatológiai jelentőségére vonatkozóan sem. Legjobb tudásunk szerint, tanulmányunk során elsőként vizsgáltuk az összefüggést az apelin expressziója és egy humán daganattípus beereződése és klinikai kimenetele között.

A tüdőrák az egyik leggyakrabban diagnosztizált daganatos megbetegedés világszerte, és a daganatos halálozások legfőbb oka mind a férfiak, mind a nők körében, így mindkét nem esetében egyike a klinikai onkológia fő kihívásainak. NSCLC esetében még a műtétilag kezelhető, kevésbé előrehaladott stádiumú betegek esetében is, az esetek több mint felében áttét fejlődik ki öt éven belül. Bár az NSCLC különösen rossz prognózisának hátterében álló mechanizmusok még nem teljesen ismertek, preklinikai tanulmányok alapján feltételezhető, hogy szoros kapcsolat áll fenn az agresszív biológiai viselkedés és az angiogenezis különböző formái között. Ennek megfelelően számos olyan molekulát vizsgáltak, melyek az NSCLC érhálózatát célozza. Az antivaszkuláris gyógyszerekkel végzett klinikai vizsgálatok eredményei azonban ellentmondásosak, így ezen terápiák sikeréhez kétségtelenül mélyebb ismeretekre van szükségünk az NSCLC-t kontrolláló angiogén faktorok klinikai jelentőségét illetően.

Az apelin jelentős mértékben expresszálódik normál tüdőszövetben és, és különféle szolid tumorokban egyaránt (beleértve a tüdőrákot). Tanulmányunk során vizsgáltuk az apelin kifejeződését mind a normál, mind a tumoros humán tüdőszövetben (21. ábra). A kvantitatív RT-PCR eredményei alapján megállapítottuk, hogy az apelin overexpresszálódik a frissen fagyasztott NSCLC mintákban mRNS szinten, és ez korrelál a megfelelő FFPE minták – immunhisztokémiával detektálható – protein expressziós szintjével (22. ábra). Bár az NSCLC sejtvonalakban genetikai módosítással megnövelt apelin expresszió fokozott tumornövekedést eredményezett *in vivo* (26. ábra), sem az exogén apelin kezelés (23. ábra), sem az apelin transzfekció (25. ábra) nem befolyásolta a sejtek proliferációs képességét *in vitro*. Így Sorli és

mtsai. eredményeivel összhangban – akik egér melanóma és emlőkarcinóma esetén vizsgálták az apelin jelentőségét – mi is arra a következtetésre jutottunk, hogy az apelin szerepet játszik az NSCLC progressziójának serkentésében is *in vivo*, bár ez a serkentő hatás nem egy autokrin szabályozási mechanizmus révén valósul meg.

Saját eredményeink és az apelin jól dokumentált angiogén funkciói alapján feltételeztük, hogy az apelin molekula serkenti az NSCLC tumorok növekedését a vérerek kapillárisokra gyakorolt stimuláló hatása révén. Ennek okán megvizsgáltuk az összefüggést az apelin kifejeződés mértéke és az NSCLC-vel kezelt betegek tumoros mintáinak angiogén fenotípusa között. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a mikroerek száma szignifikánsan nagyobb volt a nagymértékű apelin-expressziót mutató tumorokban (az apelint kismértékben kifejezőkkel szemben [30. ábra]). Ezt az eredményt alátámasztotta azon megfigyelésünk is, miszerint a transzfektált humán NSCLC sejtvonalak apelin túltermelése szignifikánsan megnövelte nude egerekben a szubkután tumorok intratumorális mikroereinek számát (27. ábra).

Hangsúlyozandó továbbá, hogy az apelin-túltermelő kísérleti tumorokban nemcsak az intratumorális kapillárisok fordultak elő nagyobb számban, de az erek kerülete is szignifikánsan nagyobb volt (29. ábra). Bár azokban a tumorokban ahol nagyfokú apelin protein expressziót detektáltunk, nagyobb méretűek voltak az intratumorális vérerek (összehasonlítva azokkal, ahol az apelin expresszió kismértékű volt), ez a tendencia nem mutatkozott statisztikailag szignifikánsnak (31. ábra). Ennek háttérében a szubkután növekvő kísérleti és a humán tumorok mikrokönyezete közötti esetleges különbségek állhatnak (például az extracelluláris mátrix komponensek vagy mechanikai erők). Az apelin indukálta angiogenezis lehetőségét és jelentőségét több – kísérleti tumor modellen – alapuló tanulmány is vizsgálja, ugyanakkor jelen tanulmány az első mely klinikai minták elemzése során vizsgálta az apelin expresszió jelentőségét. Eredményeink alapján nem állítható biztosan, hogy a vérerek növekedése kizárólag az apelin hatásának következménye a vaszkularizációs folyamatok során humán NSCLC-ben. Megfigyeléseink alapján, inkább azt feltételezhetjük, hogy az apelin elsősorban "elágaztató" faktorként hat a vaszkularizáció folyamatában. Erre utalnak más szerzők chorioallantois membrán kísérletekben kapott eredményei is, amelyekben például az apelin jelentősen serkentette a kapilláris elágazást a kontrollhoz képest.

Az apelin kifejeződés mértéke és a tumorok angiogén fenotípusa között megfigyelt összefüggéseink, valamint az eddigi kísérleti és klinikai bizonyítékok alapján, felmerült a kérdés, hogy van-e kapcsolat az apelin expressziójának mértéke és a betegek klinikopatológiai jellemzői között. Az öt éves követési periódus alatt szignifikánsan magasabb volt az NSCLC

okozta halálozás azon betegeknél, akiknél nagymértékű apelin expresszió találtunk (összevetve azon betegekkel, ahol kismértékű volt a tumoros apelin expresszió, 32. ábra). Kiemelendő, hogy a magas apelin expresszió függetlenül prognosztikai tényezőnek bizonyult a többváltozós analízis során is (2. táblázat). Így tanulmányunk elsőként számol be az apelin expresszió mértékéről és prognosztikai értékéről humán NSCLC esetében. Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy a szolid tumorok beereződési folyamata a proangiogén faktorok és inhibitorok ellentétes hatásai által szabályozott, mely hatások egyensúlya változhat a tumor progressziójának folyamata során. Ezen elképzelést támasztja alá az a megfigyelés, miszerint a retinában az apelin molekula együttműködve a VEGF-fel vagy az FGF-fel szabályozza a patológiás beereződést. Így további vizsgálatok szükségesek, hogy igazoljuk a kapcsolatot az apelin és más angiogén molekulák között nemcsak NSCLC esetében, de más humán szolid tumorokban is. Mindemellett új eredményeink alapján az NSCLC-re jellemző angiogén molekulák csoportja bővül az apelinnel, és így a jövő feladata lehet az apelin jelátvitelt megcélzó terápiák fejlesztése.

V.5. Következtetések

A vizsgált NSCLC sejtvonalaink jelentős mértékű apelin expresszióval rendelkeztek, viszont az exogén apelin kezelés és az apelin kódoló vektorral történő transzfekció nem befolyásolta a proliferációjukat. Az apelint kifejező transzfektált sejtek subcutan tumorai szignifikánsan gyorsabban nőttek *in vivo*, és az intratumorális erek száma és átmérője is szignifikánsan nagyobb volt a kontroll tumorokhoz képest. Humán NSCLC mintákban jelentősen emelkedett apelin expressziót észleltünk a normál tüdőszövethez képest. A magas apelin-expresszió továbbá megnövekedett érdenzitással és rosszabb túléléssel is párosult. Összefoglalva, eredményeink, az apelin, mint egy új angiogén faktor jelentőségét hangsúlyozzák humán NSCLC-ben. Tanulmányunk során elsőként mutattunk ki kapcsolatot az apelin expresszió és egy humán daganattípus klinikai viselkedése között.

Az értekezés legfőbb megállapításai

Transzlációs vizsgálataink során új lehetséges biomarkerek (illetve prognosztikai tényezők) jelentőségét vizsgáltuk kissejtes és nem-kissejtes tüdőrákban, malignus pleurális mezoteliómában, valamint mellkasi szoliter fibrózus tumorokban. Az értekezésben bemutatott klinikai-kísérletes munka legfőbb megállapításai a következőkben foglalhatók össze:

A lymphangiogenesis mechanizmusainak és a nyirokerek szerepének vizsgálata kissejtes és nem-kissejtes tüdőrákban:

- Munkánk elsőként bizonyítja, hogy lymphangiogenesis kizárólag az angiogén növekedési típusú tüdődaganatokban jelenik meg és a nyirokér denzitás összefügg a klinikai viselkedéssel, valamint a nyirokcsomó státusszal ezen növekedési típus esetén.
- A nyirokcsomó metasztázisok megjelenésének veszélye és a rövidebb túlélés valószínűbb a nem angiogén betegpopulációban. A nem angiogén tumorok elsősorban bekebelezik a gazdaszöveti nyirokereket növekedésük során, míg az angiogén tumorok folyamatos lymphangiogenesis kíséretében növekednek.
- Tanulmányunk során szintén elsőként bizonyítottuk, hogy SCLC betegek perifériás vérében szignifikánsan emelkedett a csontvelő eredetű LVEPC sejtek szintje, amely korrelál a nyirokcsomó metasztázissal és a rosszabb prognózissal.

Prognosztikai faktorok mellkasi szoliter fibrózus tumorok esetén:

- Igazoltuk, hogy a szoliter fibrózus tumorok dignitása önálló prognosztikai faktor, mely független az életkortól, a tumorméretől, a rezekciós széltől és a gyulladásos paraméterektől, de szoros kapcsolatban áll a de Perrot stádiummal.
- A hagyományos vagy minimál-invazív műtéti behatolás nem befolyásolja jelentős mértékben az eseménymentes túlélést, de utóbbi kevesebb szövődémmel és rövidebb kórházi tartózkodással jár.
- Kutatásunk során először sikerült igazolni, hogy gyulladásos paraméterek prognosztikai értékkel bírnak szoliter fibrózus tumorok esetén. Ezek közül is kiemelendő a fibrinogén, mely önálló prognosztikai faktornak bizonyult. Továbbá, a fibrinogén értéke szignifikáns összefüggést mutatott a tumor méretével, a de Perrot stádiummal, és a

tumor dignitásával egyaránt. Ez alapján megállapítható, hogy a fibrinogén szint hasznos lehet sebészi rezekciót követően a betegek utánkövetésében és a kezelési stratégia megválasztásában.

A primer tüdőadenocarcinoma lokalizációjának hatása az áttétek elhelyezkedésére és mintázatára vonatkozóan:

- A centrális primer tüdő adenocarcinomákban szenvedő betegek hajlamosak a korai áttétek kialakítására. Továbbá megállapítottuk, hogy centrális elhelyezkedés esetén gyakoribbak a csontmetasztázisok, míg a perifériás lokalizáció a tüdőmetasztázisok megjelenésére hajlamosít. A túlélési analízisek eredményei alapján pedig kijelenthető, hogy perifériás elhelyezkedésű adenocarcinoma esetén jelentősen hosszabb a betegek túlélése.
- A metasztatikus mintázat szempontjából megállapítható, hogy a tüdő, a mellhártya és a mellékvese áttétekre elsősorban a korai, míg az agyi metastázisokra a késői megjelenés jellemző. Az agyi áttétek gyakran a csont és a tüdő áttétekkel együtt jelennek meg, míg a csont áttétek a tüdő áttétek jelenlétét valószínűsítik. Megjegyzendő továbbá, hogy a csontáttét jelenléte a mellékvese és máj érintettséggel is nagy valószínűséggel fordul együtt elő.

A keringő komplement komponens 4d (C4d) összefüggése a tumor térfogattal, a kemoterápiás válasszal és a túléléssel malignus pleurális mezoteliómában:

- Immunhisztokémiai módszerekkel nem tudtunk kimutatni C4d pozitivitást az MPM sejtekben, mely arra enged következtetni, hogy a malignus sejtek nem közvetlenül aktiválják a komplement rendszert. A tumor állományában lévő ectopiás lymphoid struktúrák viszont erős C4d pozitivitást mutattak.
- Vizsgálatunkban bizonyítást nyert, hogy a keringő C4d szint korrelál az MPM betegség stádiumával, és megállapítottuk, hogy a magas keringő C4d szint jelentősen gyakoribb nagyobb tumorméret esetén.
- Azon betegek esetében, ahol kemoterápiát követően progresszió volt megfigyelhető a keringő C4d szint szignifikánsan magasabb volt azokhoz az esetekhez képest, akik jól reagáltak a kemoterápiára. Következésképpen, a C4d szint mérése kemoterápiát követően segítheti a betegek újboli stádiumbeosztását és értékelését.

Az apelin expresszió szerepe nem kissejtes tüdődaganatok angiogenezisében és prognózisában:

- Eredményeink, az apelin, mint egy új angiogén faktor jelentőségét hangsúlyozzák humán NSCLC-ben.
- A daganatos mintákban jelentősen emelkedett apelin expresszió észlelhető a normál tüdőszövethez képest, és a magas apelin-expresszió megnövekedett érdenzitással és rosszabb túléléssel párosul. Következésképpen, kutatásunk elsőként bizonyítja, hogy direkt összefüggés van az apelin expresszió és a klinikai kimenetel között NSCLC-ben.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Kásler Miklósnak, aki minden szakmai és tudományos törekvésemet támogatta, pályámat tanácsaival, észrevételeivel egyengette.

Köszönöm Prof. Dr. Merkely Bélának, hogy barátságával megtisztelt és mindenben segített.

Köszönöm Prof. Dr. Polgár Csabának, hogy gyerekkorom óta barátom és mindig mellettem állt.

Köszönettel tartozom Dr. Döme Balázsnak, aki megismertette velem a tudományos kutatás szépségeit.

Hálás vagyok Dr. Köves Istvánnak és Dr. Jankovich Mihálynak, hogy beavattak a sebészet rejtelmeibe.

Prof. Dr. Walter Klepetko a szervátültetés csodáját mutatta meg nekem és személyében közelről láthattam a világ mellkassebészetének élvonalát.

Barátommal és harcostársammal, Prof. Dr. Lang Györggyel örökre összeköt minket az első Magyarországon elvégzett tüdőátültetés felejthetetlen élménye.

Dr. Elek Jenő nélkül az Országos Onkológiai Intézet Mellkassebészeti Osztálya és a Transzplantációs Program sem működne.

Büszke vagyok rá, hogy olyan tehetséges fiatalokkal dolgozhatok együtt, mint Dr. Megyesfalvi Zsolt, aki a klinika tudományos kutatásának egyik fő motorja.

Köszönöm munkatársaimnak, Dr. Agócs Lászlónak, Dr. Kocsis Ákosnak, Dr. Fazekas Leventének, Dr. Bogyó Leventének, Dr. Török Klárának, Dr. Mészáros Lászlónak, Dr. Gieszer Balázsnak, Dr. Farkas Attilának, Dr. Ghimessy Áronnak, Dr. Radeczky Péternek, Dr. Csende Kristófnak, Dr. Tallósy Bernadettnek, Dr. Tihanyi Hannának, Erdőfi-Nagy Évának és Bíró Beatrixnek.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm feleségemnek, Beának és lányaimnak, Bibinek, Lilinek, Fanninak a sok szeretetet és biztatást, valamint türelmet, amit munkám során tőlük kaptam.

A disszertáció alapjául szolgáló saját közlemények jegyzéke

Renyi-Vamos, F*; Tovari, J*; Fillinger, J; Timar, J; Paku, S; Kenessey, I; Ostoros, G; Agocs, L; Soltesz, I; Dome, B. Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer CLINICAL CANCER RESEARCH 11: 20 pp. 7344-7353., 10 p. (2005)

* megosztott első szerzők

Bogos, K*; **Rényi-Vámos, F***; Dobos, J; Kenessey, I; Tóvári, J; Tímár, J; Strausz, J; Ostoros, G; Klepetko, W; Ankersmit, HJ et al. High VEGFR-3-positive circulating lymphatic/vascular endothelial progenitor cell level is associated with poor prognosis in human small cell lung cancer CLINICAL CANCER RESEARCH 15: 5 pp. 1741-1746., 6 p. (2009)

* megosztott első szerzők

Ghanim, B; Hess, S; Bertoglio, P; Celik, A; Bas, A; Oberndorfer, F; Melfi, F; Mussi, A; Klepetko, W; Pirker, C; Berger, W; Harmati, I; Farkas, A; Jan Ankersmit, H; Dome, B; Fillinger, J; Aigner, C; Hegedus, B; **Renyi-Vamos, F***; Lang G*. Intrathoracic solitary fibrous tumor - an international multicenter study on clinical outcome and novel circulating biomarkers. SCIENTIFIC REPORTS; 7:12557. (2017)

* megosztott utolsó szerzők

Klikovits, T; Stockhammer, P; Laszlo, V; Dong, Y; Hoda, MA; Ghanim, B; Opitz-Schmitt, I; Frauenfelder, T; Nguyen-Kim, TDL; Weder, W; Berger, W; Grusch, M; Aigner, C; Klepetko, W; Dome, B; **Renyi-Vamos, F**; Oehler, R; Hegedus, B. Circulating complement component 4d (C4d) correlates with tumor volume, chemotherapeutic response and survival in patients with malignant pleural mesothelioma. SCIENTIFIC REPORTS; 16456 (2017).

Klikovits, T; Lohinai, Z; Fábíán, K; Gyulai, M; Szilasi, M; Varga, J; Baranya, E; Pipek, O; Csabai, I; Szállási, Z; Tímár, J; Hoda, MA; Laszlo, V; Hegedűs, B; **Rényi-Vamos, F**; Klepetko,

W; Ostoros, G; Döme, B; Moldvay, M. New insights into the impact of primary lung adenocarcinoma location on metastatic sites and sequence: A multicenter cohort study LUNG CANCER 126 pp. 139-148., 10 p. (2018)

Berta, J; Kenessey, I; Dobos, J; Tovari, J; Klepetko, W; Ankersmit, HJ; Hegedus, B; **Renyi-Vamos, F**; Varga, J; Lorincz, Zs et al. Apelin expression in human non-small cell lung cancer: Role in angiogenesis and prognosis JOURNAL OF THORACIC ONCOLOGY 5: 8 pp. 1120-1129., 10 p. (2010)

A disszertációban nem szereplő tudományos szakcikkek, rövid közlemények

Gieszer, B*; Megyesfalvi, Z*; Dulai, V; Papay, J; Kovalszky, I; Timar, J; Fillinger, J; Harko, T; Pipek, O; Teglas, V; Regos, E; Papp, G; Szallasi, Z; Laszlo, V; **Rényi-Vamos, F**; Galffy, G; Bodor, C; Dome, B[#]; Moldvay, J[#]. EGFR variant allele frequency predicts EGFR-TKI efficacy in lung adenocarcinoma: a multicenter study. Transl Lung Cancer Res. [In press]

Radeczky, P; Megyesfalvi, Z; Laszlo, V; Fillinger, J; Moldvay, J; Raso, E; Schlegl, E; Barbai, T; Timar, J; **Rényi-Vamos, F**; Dome, B*; Hegedus, B*. The effects of bisphosphonate and radiation therapy in bone-metastatic lung adenocarcinoma: the impact of KRAS mutation. Transl Lung Cancer Res. [In press]

Ghimessy, A*; Radeczky, P*; Laszlo, V; Hegedus, B; **Rényi-Vamos, F**; Fillinger, J; Klepetko, W; Lang, C; Dome, B[#]; Megyesfalvi, Z[#]. Current therapy of KRAS-mutant lung cancer. CANCER AND METASTASIS REVIEWS 39 : 4 pp. 1159-1177. 18 p. (2020)

Megyesfalvi, Z; Bárány, N; Valkó, Z; Bugyik, E; Paku, S; Berta, J; Lantos, A; Fillinger, J; Moldvay, J; Bogos, K; **Rényi-Vámos, F**, et al. A kissejtes tüdőrák heterogenitásának biológiai és klinikopatológiai jelentősége. MAGYAR ONKOLÓGIA 64 : 3 pp. 243-253., 11 p. (2020)

Radeczky, P; Ghimessy, Á; Berta, J; László, V; Hegedüs, B; **Rényi-Vámos, F**; Fillinger, J; Megyesfalvi, Z; Döme, B. A KRAS-mutáns tüdő-adenokarcinóma kezelési lehetőségei MAGYAR ONKOLÓGIA 64 : 3 pp. 231-241., 11 p. (2020)

Agócs, L; **Rényi-Vámos, F**. A tüdőrák sebészi kezelése, van új a nap alatt? MAGYAR ONKOLÓGIA 64 : 3 pp. 190-195., 6 p. (2020)

Kerti, M; Bohacs, A; Madurka, I; Elek, J; Gieszer, B.; **Rényi-Vamos, F**; Varga, J. The effectiveness of pulmonary rehabilitation in connection with lung transplantation in Hungary. ANNALS OF PALLIATIVE MEDICINE 2020 p. In press (2020)

Barabás, JI; Ghimessy, ÁK; **Rényi-Vámos, F**; Kocsis, Á; Agócs, L; Mészáros, L; Pukacsik, D; Andi, J; Laki, A; Vörös, F et al. Innovációs lehetőségek a medicinában: 3D tervezési és 3D nyomtatási lehetőségek a felnőtt szív- és mellkassebészeti betegellátásban : Magyarországi tapasztalatok ORVOSI HETILAP 160 : 50 pp. 1967-1975. , 9 p. (2019)

Bohács, A; Eszes, N; Kováts, Zs; Nagy, A; Kis, A; Halász, A; Csiszér, E; Schönauer, N; Tóth, K; Madurka, I. et al. Tüdőtranszplantáció cystás fibrosisban (hazai tapasztalatok) MUCOVISCIDOSIS HUNGARICA 5 : 1 pp. 272-277. , 6 p. (2019)

Bohács, A; Eszes, N; Kováts, Zs; Csiszér, E; Vincze, K; Lázár, Zs; Nagy, A; Kis, A; Csernus, K; Gieszer, B. et al. Tüdőtranszplantáció: fókuszban a betegek utógondozása ORVOSTOVÁBBKÉPZŐ SZEMLE 26 : 7-8 pp. 25-30. , 6 p. (2019)

Dorogi, B; Bukovszky, B; Mátrai, T; Sávolt, Á; Polgár, C; Kelemen, P; Kovács, T; **Rényi-Vámos, F**; Ivády, G; Kovács, E et al. Mapping of the functional anatomy of lymphatic drainage to the axilla in early breast cancer: A cohort study of 933 cases EUROPEAN JOURNAL OF SURGICAL ONCOLOGY 45 : 2 pp. 103-109. , 7 p. (2019)

Fazekas, L; Ghimessy, Á; Gieszer, B; Radeczky, P; Mészáros, L; Török, K; Bogyó, L; Hartyánszky, I; Pólos, M; Daróczy, L. et al. Lung Transplantation in Hungary From Cardiac Surgeons' Perspective TRANSPLANTATION PROCEEDINGS 51 : 4 pp. 1263-1267. , 5 p. (2019)

Ghimessy, AK; Gellert, A; Schlegl, E; Hegedus, B; Raso, E; Barbai, T; Timar, J; Ostoros, Gy; Megyesfalvi, Zs; Gieszer, B; Moldvay, J; **Rényi-Vamos F** et al. KRAS Mutations Predict

Response and Outcome in Advanced Lung Adenocarcinoma Patients Receiving First-Line Bevacizumab and Platinum-Based Chemotherapy Cancers 11 : 10 Paper: 1514 , 15 p. (2019)

Ghimessy, ÁK; Farkas, A; Gieszer, B; Radeczky, P; Csende, K; Mészáros, L; Török, K; Fazekas, L; Agócs, L; Kocsis, Á et al. Donation After Cardiac Death, a Possibility to Expand the Donor Pool: Review and the Hungarian Experience TRANSPLANTATION PROCEEDINGS 51 : 4 pp. 1276-1280. , 5 p. (2019)

Gieszer, B; Ghimessy, Á; Radeczky, P; Farkas, A; Csende, K; Bogyó, L; Fazekas, L; Kovács, N; Madurka, I; Kocsis, Á et al. First 3 Years of the Hungarian Lung Transplantation Program TRANSPLANTATION PROCEEDINGS 51 : 4 pp. 1254-1257. , 4 p. (2019)

Gieszer, B; Radeczky, P; Farkas, A; Csende, K; Mészáros, L; Török, K; Fazekas, L; Bogyó, L; Agócs, L; Kocsis, Á. et al. Lung Transplant Patients on Kilimanjaro TRANSPLANTATION PROCEEDINGS 51 : 4 pp. 1258-1262. , 5 p. (2019)

Kas, J; Csekeő, A; Fehér, C; Karskó, L; Kecskés, L; Molnár, M; Vágvolgyi, A; Varga, JT; Bede, A; Rozgonyi, Z et al. A komplettáló pneumonectomia javallatai és perioperatív eredményei MAGYAR SEBÉSZET 72 : 4 pp. 149-160. , 12 p. (2019)

Madurka, IE; Elek, JJ; Kocsis, Á; Agócs, L; **Rényi-Vámos, F.** Venovenózus extrakorporális membránoxigenizáció (ECMO)-val végzett mellkassebészeti műtétek tapasztalatai Magyarországon: Retrospektív klinikai tanulmány ORVOSI HETILAP 160 : 42 pp. 1655-1662. , 8 p. (2019)

Radeczky, P; Ghimessy, ÁK; Farkas, A; Csende, K; Mészáros, L; Török, K; Fazekas, L; Agócs, L; Kocsis, Á; Bartók, T. et al. Antibody-Mediated Rejection in a Multiple Lung Transplant Patient: A Case Report TRANSPLANTATION PROCEEDINGS 51 : 4 pp. 1296-1298. , 3 p. (2019)

Varga, J; Kelemen, K; Bohacs, A; Czebe, K; Madurka, I; Lang, G; **Rényi-Vamos, F**. Pre- and post-lung transplant pulmonary rehabilitation between 2012 and 2019 in Hungary. EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL, SUPPLEMENT 54 : suppl.63. pp. &-&. Paper: PA 517 (2019)

Agócs, L; Bajcsay, A; Horváth, Á; Ostoros, Gy; **Rényi-Vámos, F**; Strausz, J; Szőke, J. Tüdőrák In: Kásler, Miklós (szerk.) Az onkológia alapjai : Egyetemi tankönyv Budapest, Magyarország : Medicina Könyvkiadó Zrt., pp. 837-882. , 46 p. (2018)

Bajcsay, A; Gálffy, G; Török, K; **Rényi-Vámos, F**. Tüdődaganatok kezelése In: Polgár, Cs (szerk.) Onkológia és sugárterápia. Budapest, Magyarország : Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió, pp. 190-204. , 15 p. (2018)

Farkas, A; Kocsis, Á; Andi, J; Sinkovics, I; Agócs, L; Mészáros, L; Török, K; Bogyó, L; Radecky, P; Ghimessy, Á et al. Nem tapintható tüdőgócok drót- és izotópjelölés segítségével történő minimálinvazív műtéti eltávolítása ORVOSI HETILAP 159 : 34 pp. 1399-1404. , 6 p. (2018)

Gieszer, B; Radeckzy, P; Ghimessy, Á; Farkas, A; Csende, K; Bogyó, L; Fazekas, L; Kovács, N; Madurka, I; Kocsis, Á et al. A magyar tüdőtranszplantációs program indulása és első eredményei ORVOSI HETILAP 159 : 46 pp. 1859-1868. , 10 p. (2018)

Rényi-Vámos, F; Horváth, Á; Csekeő, A; Nagy, T; Fillinger, J; Ostoros, Gy;Tóth, E; Tóth, L. Mellüregi daganatok In: Kásler, Miklós (szerk.) Az onkológia alapjai : Egyetemi tankönyv. Budapest, Magyarország : Medicina Könyvkiadó Zrt., pp. 883-904. , 22 p. (2018)

Agócs, L; **Rényi-Vámos, F**; Lang, Gy. A mellkasfal, a mediastinum és a tüdő elsődleges sarcomái. In: Szendrői, Miklós; Sági, Zoltán; Pápai, Zsuzsa (szerk.) Malignus légyszöveti tumorok diagnosztikája és kezelése

Bata, OS; **Rényi-Vámos F**; Lang, Gy; Elek, J; Gődény, M. Első hazai tapasztalatok a tüdőtranszplantációval. MAGYAR RADIOLÓGIA ONLINE 8 : 2 p. & (2017)

Bridgeman, VL; Vermeulen, PB; Foo, S; Bilecz, A; Daley, F; Kostaras, E; Nathan, MR; Wan, E; Frentzas, S; Schweiger, T et al. Vessel co-option is common in human lung metastases and mediates resistance to anti-angiogenic therapy in preclinical lung metastasis models. JOURNAL OF PATHOLOGY 241 : 3 pp. 362-374. , 13 p. (2017)

Klikovits, T; Lohinai, Z; Fabian, K; Gyulai, M; Szilasi, M; Varga, J; Baranya, E; Pipek, O; Csabai, I; Szallasi, Z et al. Primary location of lung adenocarcinoma correlates with metastatic site and sequence - central tumors cause early metastases, bone involvement and decreased survival WIENER KLINISCHE WOCHENSCHRIFT: MIDDLE EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINE 129 : 19-20 pp. 775-776. , 2 p. (2017)

Lohinai, Z*; Klikovits, T*; Moldvay, J; Ostoros, G; Raso, E; Tímár, J; Fábíán, K; Kovalszky, I; Kenessey, I; Aigner, C et al. KRAS-mutation incidence and prognostic value are metastatic site-specific in lung adenocarcinoma: poor prognosis in patients with KRAS-mutation and bone metastasis SCIENTIFIC REPORTS 7 Paper: 39721 , 8 p. (2017)

Madurka, I; Elek, J; Schonauer, N; Bartok, T; Kormosoi-Toth, K; Radeczky, P; Gieszer, B; Ghimesy, A; Lang, G; Klepetko, W et al. Early Postoperative Problems After Lung Transplantation: First-Year Experiences in Light of the Newly Established National Hungarian Lung Transplantation Program. TRANSPLANTATION PROCEEDINGS 49 : 7 pp. 1538-1543. , 6 p. (2017)

Madurka, I; Elek, J; Schonauer, N; Bartok, T; Kormosoi-Toth, K; Zollei, E; Ghimesy, A; Lang, G; Klepetko, W; **Rényi-Vámos, F**. Urgent Lung Transplantation in Severe Acute Respiratory

Failure Based on Rapidly Progressive Interstitial Lung Disease: A Case Report
TRANSPLANTATION PROCEEDINGS 49 : 7 pp. 1544-1548. , 5 p. (2017)

Paku, S*; Laszlo, V*; Dezso, K; Nagy, P; Hoda, MA; Klepetko, W; **Rényi-Vamos, F**; Timar, J; Reynolds, AR; Dome, B. The evidence for and against different modes of tumour cell extravasation in the lung: diapedesis, capillary destruction, necroptosis and endothelialisation.
JOURNAL OF PATHOLOGY 241 : 4 pp. 441-447. , 7 p. (2017)

Pálfi, T; Lang, G; Rényi-Vámos, F; Andi, J; Madurka, I; Fillinger, J; Éles, K; Tóth, E; Balázs, Gy; Gálffy, G et al. ROS1 pozitív tüdőrák COPD miatt tüdőtranszplantált betegben In: Szalai, Zsuzsanna; Gálffy, Gabriella Onkopulmonológia. Budapest, Magyarország : SpringMed Kiadó, pp. 196-200. , 5 p. (2017)

Rényi-Vamos, F; Hartyanszky, I; Szabolcs, Z; Lang, G. Breakthrough in the Transplantation of Thoracic Organs in Hungary. TRANSPLANTATION PROCEEDINGS 49 : 7 pp. 1515-1516. , 2 p. (2017)

Rényi-Vamos, F; Radeczky, P; Gieszer, B; Ghimesy, A; Czebe, K; Torok, K; Dome, B; Elek, J; Klepetko, W; Lang, G et al. Launching the Hungarian Lung Transplantation Program
TRANSPLANTATION PROCEEDINGS 49 : 7 pp. 1535-1537. , 3 p. (2017)

Rényi-Vámos, F; Agócs, L; Lang, Gy. Metastasectomy, tüdőáttétek sebészete In: Szendrői, Miklós; Sági, Zoltán; Pápai, Zsuzsa (szerk.) Malignus lágyrésztumorkok diagnosztikája és kezelése. Budapest, Magyarország : Medicina Könyvkiadó Zrt., pp. 173-177. , 5 p. (2017)

Bugyik, E*; **Rényi-Vamos, F***; Szabo, V; Dezso, K; Ecker, N; Rokusz, A; Nagy, P; Dome, B; Paku, S. Mechanisms of vascularization in murine models of primary and metastatic tumor growth CHINESE JOURNAL OF CANCER 35 : 1 Paper: 19 , 8 p. (2016)

Gieszer, B; Török, K; Radeczky, P; Farkas, A; Ghimessy, Á; Mészáros, L; Bogyó, L; Filkorn, R; Benedek, A; Kocsis, Á et al. Primer idiopathiás chylopericardium MEDICINA THORACALIS (BUDAPEST) 69 : 2 pp. 100-102. , 3 p. (2016)

Hoda, MA*; Rozsas, A*; Lang, E; Klikovits, T; Lohinai, Z; Torok, S; Berta, J; Bendek, M; Berger, W; Hegedus, B et al. High circulating activin A level is associated with tumor progression and predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma ONCOTARGET 7 : 12 pp. 13388-13399. , 12 p. (2016)

Rényi-Vámos, F. Mediastinum In: Gaál, Csaba (szerk.) Sebészet. Budapest, Magyarország : Medicina Könyvkiadó Zrt., pp. 595-602. , 8 p. (2016)

Rényi-Vámos, F. Mellhártya. In: Gaál, Csaba (szerk.) Sebészet. Budapest, Magyarország : Medicina Könyvkiadó Zrt., pp. 560-569. , 10 p. (2016)

Ghanim, B*; Klikovits, T*; Hoda, MA; Lang, G; Szirtes, I; Setinek, U; Rozsas, A; Renyi-Vamos, F; Laszlo, V; Grusch, M et al. Ki67 index is an independent prognostic factor in epithelioid but not in non-epithelioid malignant pleural mesothelioma: a multicenter study BRITISH JOURNAL OF CANCER 112 : 5 pp. 783-792. , 10 p. (2015)

Hegedus, B; Moldvay, J; Berta, J; Lohinai, Z; Rozsas, A; Cserepes, MT; Fabian, K; Ostoros, G; Tovari, J; **Rényi-Vámos, F** et al. Szemelvények a Semmelweis Egyetem, az Országos Onkológiai Intézet és az Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézet együttműködésén alapuló tüdőrák-kutatási programból MAGYAR ONKOLÓGIA 59 : 4 pp. 282-285. , 4 p. (2015)

.

Berta, J*; Hoda, MA*; Laszlo, V; Rozsas, A; Garay, T; Torok, S; Grusch, M; Berger, W; Paku, S; **Rényi-Vámos, F** et al. Apelin promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis. ONCOTARGET 5 : 12 pp. 4426-4437. , 12 p. (2014)

Janik, S; Schiefer, AI; Mullauer, L; Bekos, C; Scharrer, A; Mildner, M; **Rényi-Vamos, F**; Klepetko, W; Ankersmit, HJ; Moser, B. The local and systemic role of RAGE in thymic epithelial tumors, thymic hyperplasia and thymic physiology WIENER KLINISCHE WOCHENSCHRIFT: MIDDLE EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINE 126 : 19-20 pp. 681-681.,1 p. (2014)

Moser, B; Janik, S; Schiefer, AI; Mullauer, L; Bekos, C; Scharrer, A; Mildner, M; **Rényi-Vamos, F**; Klepetko, W; Ankersmit, HJ. Expression of RAGE and HMGB1 in thymic epithelial tumors, thymic hyperplasia and regular thymic morphology. PLOS ONE 9 : 4 Paper: e94118 , 14 p. (2014)

Bak, M; Hidvegi, J; Andi, J; Bahery, M; Kovacs, E; Schneider, F; Kostic, S; **Rényi-Vamos, F**; Szoke, J; Nyari, T et al. A CT-vezérelt vékonytű-aspirációs citológiai vizsgálat minőségbiztosítása a tüdődaganatok diagnosztikájában ORVOSI HETILAP 154 : 1 pp. 28-32., 5 p. (2013)

Lang, G; Czebe, K; Gieszer, B; **Rényi-Vamos, F**. Tüdőtranszplantáció magyar betegek számára ORVOSI HETILAP 154 : 22 pp. 868-871. , 4 p. (2013)

Rényi-Vámos, F; Lang, G. Kombinált szív-tüdő átültetés In: Perner, Ferenc; Petrányi, Győző (szerk.) Szervátültetés. Budapest, Magyarország : Medicina Könyvkiadó Zrt., pp. 413-415. , 3 p. (2013)

Rozsas, A; Berta, J; Rojko, L; Horvath, LZ; Keszthelyi, M; Kenessey, I; Laszlo, V; Berger, W; Grusch, M; Hoda, MA et al. Erythropoietin receptor expression is a potential prognostic factor in human lung adenocarcinoma. PLOS ONE 8 : 10 Paper: e77459 , 9 p. (2013)

Kocsis, A; Agocs, L; Kostic, S; Torok, K; Molnar, M; Levay, B; Toth, F; Vadasz, P; **Renyi-Vamos, F.** Egyedi műtéti megoldás fiatal férfi betegen manubriumresectio után Grade II chondrosarcomában MAGYAR SEBÉSZET 65 : 6 pp. 430-432. , 3 p. (2012)

Kocsis, A; Agocs, L; Kostic, S; Levay, B; Torok, K; **Renyi-Vamos, F.** Bilateralis endoscopos thoracalis sympathectomia (ETS) palmaris és axillaris hyperhydrosis esetén - 22 eset összefoglalása. Egynapos sebészeti lehetőség a mellkassebészetben? MAGYAR SEBÉSZET 65 : 5 pp. 380-382. , 3 p. (2012)

Lang, G; Taghavi, S; Aigner, C; **Renyi-Vamos, F.**; Jaksch, P; Augustin, V; Nagayama, K; Ghanim, B; Klepetko, W. Primary lung transplantation after bridge with extracorporeal membrane oxygenation: a plea for a shift in our paradigms for indications TRANSPLANTATION 93 : 7 pp. 729-736. , 8 p. (2012)

Torok, S; Cserepes, T M; **Renyi-Vamos, F.**; Dome, B. Nintedanib (BIBF 1120) a szolid daganatok kezelésében: biológia és klinikai tapasztalatok áttekintése MAGYAR ONKOLÓGIA 56 : 3 pp. 199-208. , 10 p. (2012)

Zimmermann, M; Nickl, S; Lambers, C; Hacker, S; Mitterbauer, A; Hoetzenecker, K; Rozsas, A; Ostoros, G; Laszlo, V; Hofbauer, H et al. Discrimination of clinical stages in non-small cell lung cancer patients by serum HSP27 and HSP70: a multi-institutional case-control study CLINICA CHIMICA ACTA 413 : 13-14 pp. 1115-1120. , 6 p. (2012)

Kovats, Z; Sutto, Z; Murakozy, G; Bohacs, A; Czebe, K; Lang, G; **Renyi-Vamos, F.**; Klepetko, W; Muller, V. Airway Pathogens During the First Year after Lung Transplantation: A Single-Center Experience. TRANSPLANTATION PROCEEDINGS 43 : 4 pp. 1290-1291. , 2 p. (2011)

Kunos, L; Kovats, Z; Murakozy, G; Sutto, Z; Bohacs, A; Czebe, K; Lang, G; **Renyi-Vamos, F.**; Klepetko, W; Muller, V. Severe mixed sleep apnea after bilateral lung transplantation in a

cystic fibrosis patient: a case report. TRANSPLANTATION PROCEEDINGS 43 : 4 pp. 1292-1293. , 2 p. (2011)

Döme, B; Tímár, J; Ladányi, A; Paku, S; **Rényi-Vámos, F**; Klepetko, W; Lang, 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 CRITICAL REVIEWS IN ONCOLOGY HEMATOLOGY 69 : 2 pp. 108-124. , 17 p. (2009)

Bogos, K; **Rényi-Vámos, F**; Kovacs, G; Tovari, J; Dome, B Role of retinoic receptors in lung carcinogenesis JOURNAL OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL CANCER RESEARCH 27 Paper: 18 , 7 p. (2008)

Dome, B; Timar, J; Ostoros, G; Meszaros, L; Dobos, J; Raso, E; **Rényi-Vámos, F**; Bogos, J; Agocs, L; Tovari, J The role of circulating endothelial progenitor cells in non-small cell lung cancer LUNG CANCER 49 : Suppl. 2 pp. S368-S369. (2005)

Az értekezésben felhasznált hivatkozások

A lymphangiogenesis mechanizmusainak és a nyirokerek szerepének vizsgálata kissejtes és nem-kissejtes tüdőrákban

1. Sihoe AD, Yim AP. Lung cancer staging. *J Surg Res* 2004;117:92-106.
2. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBOJ* 1996;15:1751.
3. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *NatMed* 2001;7:192-8.
4. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *NatMed* 2001;7:186-91.
5. Dome B, Paku S, Somlai B, Timar J. Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. *JPathol* 2002;197:355-62.
6. Thompson WD, Shiach KJ, Fraser RA, et al. Tumours acquire their vasculature by vessel incorporation, not vessel ingrowth. *J Pathol* 1987; 151:323-32.
7. Pezzella F, Pastorino U, Tagliabue E, et al. Non-smallcell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *AmJ Pathol* 1997; 151:1417-23.
8. Mountain FC. Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest* 1997;111:1710-7.
9. Arinaga M, Noguchi T, Takeno S, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 in patients with NSCLC. *Cancer* 2003;97:457-64.
10. Nakashima T, Huang CL, Liu D, et al. Expression of vascular endothelial growth factor-A and vascular endothelial growth factor-C as prognostic factors for NSCLC. *Med Sci Monit* 2004; 10:BR157-65.
11. Paku S, Kopper L, Nagy P. Development of the vasculature in “pushing-type” liver metastases of an experimental colorectal cancer. *Int J Cancer* 2005; 115:893-902.
12. Hamilton PW, Allen DC. Morphometry in histopathology. *JPathol* 1995;175:369-79.
13. Banerji S, Ni J, Wang SX, et al. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 1999; 144:789-801.
14. Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, et al. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *AmJPathol* 2005;166:913-21.

15. Passalidou E, Trivella M, Singh N, et al. Vascular phenotype in angiogenic and non-angiogenic lung nonsmall cell carcinomas. *BrJCancer* 2002;86:244-9.
16. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. LYVE-1 immunohistochemical assessment of lymphangiogenesis in endometrial and lung cancer. *JClin Pathol* 2005;58:202-6.
17. Rubbia-Brandt L, Terris B, Giostra E, Dousset B, Morel P, Pepper MS. Lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor-C expression correlate with malignant behavior in human pancreatic endocrine tumors. *Clin Cancer Res* 2004;10:6919-28.
18. Kitadai Y, Kodama M, Cho S, et al. Quantitative analysis of lymphangiogenic markers for predicting metastasis of human gastric carcinoma to lymph nodes. *IntJCancer* 2005;115:388-92.
19. Bono P, Wasenius VM, Heikkila P, et al. High LYVE-1-positive lymphatic vessel numbers are associated with poor outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:7144- 9.
20. Beasley NJ, Prevo R, Banerji S, et al. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res* 2002;62: 1315-20.
21. Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, et al. Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *AmJPathol* 2003;162:1951-60.
22. Padera TP, Kadambi A, diTomaso E, et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 2002;296:1883-6.
23. Pastorino U, Andreola S, Tagliabue E, et al. Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis. *JClin Oncol* 1997;15:2858-65.
24. Sedivy R, Beck-Mannagetta J, Haverkamp C, et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C correlates with the lymphatic microvessel density and the nodal status in oral squamous cell cancer. *J Oral Pathol Med* 2003;32: 455-60.
25. Tsurusaki T, Kanda S, Sakai H, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *BrJCancer* 1999;80:309-13.
26. Kitadai Y, Amioka T, Haruma K, et al. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in human esophageal squamous cell carcinomas. *IntJCancer* 2001;93:662-6.
27. Schietroma C, Cianfarani F, Lacal PM, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression correlates with lymph node localization of human melanoma metastases. *Cancer* 2003;98:789-97.
28. Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, et al. Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:1823-9.
29. Li Q, Dong X, Gu W, et al. Clinical significance of co-expression of VEGF-C and VEGFR-3 in non-small cell lung cancer. *Chin Med J (Engl)* 2003; 116:727-30.

30. Ogawa E, Takenaka K, Yanagihara K, et al. Clinical significance of VEGF-C status in tumour cells and stromal macrophages in non-small cell lung cancer patients. *BrJCancer* 2004;91:498-503.
31. Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* 2001;61:1786-90.
32. Skobe M, Hamberg LM, Hawighorst T, et al. Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am J Pathol* 2001;159:893-903.
33. Govindan R, Page N, Morgensztern D, et al. 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;24:4539-44.
34. Simon GR, Turrisi A; American College of Chest Physicians. Management of small cell lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007;132:324-39S.
35. Dome B, Hendrix MJ, Paku S, et al. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol* 2007; 170:1 - 15.
36. Achen MG, Mann GB, Stacker SA. Targeting lymphangiogenesis to prevent tumour metastasis. *Br J Cancer* 2006;94:1355-60.
37. Van der Auwera I, CaoY, Tille JC, et al. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *Br J Cancer* 2006;95:1611-25.
38. Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J* 2002;16:922-34.
39. Salven P, Mustjoki S, Alitalo R, et al. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood* 2003;101:168-72.
40. Kerjaschki D, Huttary N, Raab I, et al. Lymphatic endothelial progenitor cells contribute to de novo lymphangiogenesis in human renal transplants. *Nat Med* 2006;12:230-4.
41. Religa P, Cao R, Bjorndahl M, et al. Presence of bone marrow-derived circulating progenitor endothelial cells in the newly formed lymphatic vessels. *Blood* 2005;106:4184-90.
42. Ho JW, Pang RW, Lau C, et al. Significance of circulating endothelial progenitor cells inhepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2006;44:836-43.
43. Massa M, Rosti V, Ramajoli I, et al. Circulating CD34+, CD133+, and vascular endothelial growth factor receptor 2-positive endothelial progenitor cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *JClin Oncol* 2005;23:5688-95.
44. Furstenberger G, vonMoos R, Lucas R, et al. Circulating endothelial cells and angiogenic serum factors during neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer. *BrJ Cancer* 2006;94:524-31.

45. Zhang H, Vakil V, Braunstein M, et al. Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance. *Blood* 2005;105: 3286-94.
46. Dome B, Dobos J, Tovari J, et al. Circulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells: Characterization, mobilization, and therapeutic considerations in malignant disease. *Cytometry A* 2008;73: 186 - 93.
47. Dome B, Timar J, Dobos J, et al. Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2006;66:7341- 7.
48. Pircher A, Kachel CM, Skvortsov S, et al. 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- 52.
49. Stahel R, Ginsberg R, Havemann K, et al. Staging and prognostic factors in small cell lung cancer: a consensus report. *Lung Cancer* 1989;5:119-26.
50. Fadini GP, Schiavon M, Cantini M, et al. Circulating progenitor cells are reduced in patients with severe lung disease. *Stem Cells* 2006;24:1806-13.
51. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2007. Available from: <http://www.goldcopd.org>.
52. Schemper M, Smith TL. A note on quantifying follow-up in studies of failure time. *Control Clin Trials* 1996;17:343-6.
53. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J CellMolMed* 2004;8:498-508.
54. Eguchi M, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Clin Exp Nephrol* 2007;11:18-25.
55. Shepherd FA, Crowley J, Van Houtte P, et al. The International Association for the Study of Lung Cancer lung cancer staging project: proposals regarding the clinical staging of small cell lung cancer in the forthcoming (seventh) edition of the tumor, node, metastasis classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007;2:1067-77.
56. Jackson DG. Lymphatic markers, tumour lymphangiogenesis and lymph node metastasis. *Cancer Treat Res* 2007;135:39- 53.
57. Sundar SS, Ganesan TS. Role of lymphangiogenesis in cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:4298-307.
58. Su JL, Yen CJ, Chen PS, et al. The role of the VEGF/VEGFR-3 axis in cancer progression. *Br J Cancer* 2007;96:541-5.
59. He Y, Kozaki K, Karpanen T, et al. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:819-25.
60. Khakoo AY, Finkel T. Endothelial progenitor cells. *Annu RevMed* 2005;56:79-101.

61. Liew A, Barry F, O'Brien T. Endothelial progenitor cells: diagnostic and therapeutic considerations. *Bio-Essays* 2006;28:261-70.
62. Sedivy R, Beck-Mannagetta J, Haverkamp C, et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C correlates with the lymphatic microvessel density and the nodal status in oral squamous cell cancer. *J Oral Pathol Med* 2003;32: 455-60.
63. Tsurusaki T, Kanda S, Sakai H, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *Br J Cancer* 1999;80:309-13.
64. Kitadai Y, Amioka T, Haruma K, et al. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001;93:662-6.
65. Schietroma C, Cianfarani F, Lacal PM, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression correlates with lymph node localization of human melanoma metastases. *Cancer* 2003;98:789-97.
66. Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, et al. Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:1823-9.
67. 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; 116:727-30.
68. Naumnik W, Izyski T, Swidzin´ska E, Ossolin´ska M, Chyczewska E. Serum levels of VEGF-C, VEGF-D, sVEGF-R2 in patients with lung cancer during chemotherapy. *Oncol Res* 2007;16:445-51.
69. Kimura H, Kato H, Tanaka N, et al. Preoperative serum vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) levels predict recurrence in patients with esophageal cancer. *Anticancer Res* 2008;28:165-9.
70. Wang TB, Deng MH, Qiu WS, et al. 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;13:1794-7.
71. Yu XM, Lo CY, Lam AK, et al. Serum vascular endothelial growth factor C correlates with lymph node metastases and high-risk tumor profiles in papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg* 2008;247: 483-9.
72. Vihinen PP, Hilli J, Vuoristo MS, et al. Serum VEGF-C is associated with metastatic site in patients with malignant melanoma. *Acta Oncol* 2007;46:678-84.
73. Tamura K, M, Ohta Y. Serum vascular endothelial growth factor-C level in patients with primary non-small cell lung carcinoma: a possible diagnostic tool for lymph node metastasis. *Cancer* 2003;98:1217-22.

Mellkasi szoliter fibrózus tumorok prognosztikai faktorai

1. Abu Arab W. Solitary fibrous tumors of the pleura. *Eur J Cardiothorac Surg* 2012;41:587–597.
2. Thway K., Ng W., Noujaim J., et al. The Current Status of Solitary Fibrous Tumor: Diagnostic Features, Variants, and Genetics. *Int J Surg Pathol* 2016:24.

3. Dagrada GP, Spagnuolo RD, Mauro V *et al.* Solitary fibrous tumors: loss of chimeric protein expression and genomic instability mark dedifferentiation. *Mod Pathol*, 2015;28:1074–1083.
4. Robinson DR, Wu Y, Kalyana-Sundaram S *et al.* Identification of recurrent NAB2-STAT6 gene fusions in solitary fibrous tumor by integrative sequencing. *Nat Genet* 2013;45, 180–185.
5. Akaike K, Kurisaki-Arakawa A, Hara K *et al.* Distinct clinicopathological features of NAB2-STAT6 fusion gene variants in solitary fibrous tumor with emphasis on the acquisition of highly malignant potential. *Human pathology* 2015;46:347–356.
6. Bahrami A, Lee S, Scafer I *et al.* TERT promoter mutations and prognosis in solitary fibrous tumor. *Mod Pathol* 2016;29:1511–1522.
7. Berghoff AS, Kresl P, Bienkowski M *et al.* Validation of nuclear STAT6 immunostaining as a diagnostic marker of meningeal solitary fibrous tumor (SFT)/ hemangiopericytoma. *Clin Neuropathol*, 2017;36:56-59.
8. Vogels RJ, Vlenterie M, Versleijen-Jonkers YMH *et al.* Solitary fibrous tumor - clinicopathologic, immunohistochemical and molecular analysis of 28 cases. *Diagn Pathol* 2014;9:224.
9. Boddaert G, Guiraudet P, Grand B *et al.* Solitary fibrous tumors of the pleura: a poorly defined malignancy profile. *Ann Thorac Surg* 2015;99:1025–1031.
10. Levard A, Derbel O, Mécus P *et al.* Outcome of patients with advanced solitary fibrous tumors: the Centre Leon Berard experience. *BMC Cancer* 2013;13:109.
11. Demicco EG, Park MS, Araujo DM *et al.* Solitary fibrous tumor: a clinicopathological study of 110 cases and proposed risk assessment model. *Mod Pathol* 2012;25:1298-1306.
12. Tapias LF, Mercier O, Ghigna MR *et al.* Validation of a Scoring System to Predict Recurrence of Resected Solitary Fibrous Tumors of the Pleura. *Chest* 2015;147:216-223.
13. Tapias LF, Mino-Kenudson M, Lee H *et al.* Risk factor analysis for the recurrence of resected solitary fibrous tumors of the pleura: a 33-year experience and proposal for a scoring system. *Eur J Cardiothorac Surg* 2013;44:111-117
14. de Perrot M, Fischer S, Brundler MA, *et al.* Solitary fibrous tumors of the pleura. *Ann Thorac Surg* 2002;74:285–293.
15. England DM, Hochholzer L, McCarthy MJ. Localized benign and malignant fibrous tumors of the pleura. A clinicopathologic review of 223 cases. *Am J Surg Pathol* 1989;13:640–658.
16. Bylicki O, Rouviere D, Cassier P *et al.* Assessing the multimodal management of advanced solitary fibrous tumors of the pleura in a routine practice setting. *J Thorac Oncol* 2015;10:309–315.
17. Ghanim B, Hoda MA, Klikovits T *et al.* Circulating fibrinogen is a prognostic and predictive biomarker in malignant pleural mesothelioma. *Br J Cancer* 2014;110:984–990.

18. Ghanim B, Hoda MA, Winter M *et al.* Pretreatment serum C-reactive protein levels predict benefit from multimodality treatment including radical surgery in malignant pleural mesothelioma: a retrospective multicenter analysis. *Ann Surg* 2012;256:357–362.
19. Ghanim B, Klikovits T, Hoda MA *et al.* Ki67 index is an independent prognostic factor in epithelioid but not in non-epithelioid malignant pleural mesothelioma: a multicenter study. *Br J Cancer* 2015;112:783–792.
20. Kao SC, Klebe S, Henderson DW *et al.* Low calretinin expression and high neutrophil-to-lymphocyte ratio are poor prognostic factors in patients with malignant mesothelioma undergoing extrapleural pneumonectomy. *J Thorac Oncol* 2011;6:1923–1929. (2011).
21. Ghanim B, Schweiger T, Jedamzik J *et al.* Elevated inflammatory parameters and inflammation scores are associated with poor prognosis in patients undergoing pulmonary metastasectomy for colorectal cancer. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2015;21:616-623
22. DeVito N, Henderson E, Han G *et al.* Clinical Characteristics and Outcomes for Solitary Fibrous Tumor (SFT): A Single Center Experience. *PLoS One* 2015;10.
23. Lahon B, Mercier O, Fadel E *et al.* Solitary fibrous tumor of the pleura: outcomes of 157 complete resections in a single center. *Ann Thorac Surg* 2012;94:394-400.
24. Torok S, Hegedus B, Laszlo V *et al.* Lung cancer in never smokers. *Future Oncol* 2011;7:1195–1211.

A primer tüdőadenocarcinoma lokalizációjának hatása az áttétek elhelyezkedésére és mintázatára vonatkozóan

1. Youlten DR, Cramb SM, Baade PD *et al.* The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. *J Thorac Oncol* 2008;3:819-31.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A, Cancer Statistics 2017. *CA Cancer J Clin* 2017;67:7-30.
3. Jemal A, Thun MJ, Ries LA *et al.* Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:1672-94.
4. Giovino GA, Mirza SA, Samet JM *et al.* Tobacco use in 3 billion individuals from 16 countries: an analysis of nationally representative cross-sectional household surveys. *Lancet* 2012;380:668-79.
5. Lee BW, Wain JC, Kelsey KT *et al.* Association of cigarette smoking and asbestos exposure with location and histology of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:748-55.
6. Kinsey CM, Estepar RS, Zhao Y *et al.* Invasive adenocarcinoma of the lung is associated with the upper lung regions. *Lung Cancer* 2014;84:145-150.
7. Tseng CH, Chen KC, Hsu KH *et al.* EGFR mutation and lobar location of lung adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2016;37:157-162.
8. Byers TE, Vena JE, Rzepka TF. Predilection of lung cancer for the upper lobes: an epidemiologic inquiry. *J Natl Cancer Inst* 1984;72:1271-1275.

9. Puri V, Garg N, Engelhardt EE et al. Tumor location is not an independent prognostic factor in early stage nonsmall cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2010;89:1053-1059.
10. Whitson BA, Groth SS, Andrade RS et al. T1/T2 non-small-cell lung cancer treated by lobectomy: does tumor anatomic location matter?. *J Surg Res* 2012;177:185-190.
11. Sun W, Yang X, Liu Y et al. Primary Tumor Location Is a Useful Predictor for Lymph Node Metastasis and Prognosis in Lung Adenocarcinoma. *Clin Lung Cancer* 2017;18:49-55.
12. Mujoomdar A, Austin JH, Malhotra R et al. Clinical predictors of metastatic disease to the brain from non-small cell lung carcinoma: primary tumor size, cell type, and lymph node metastases. *Radiology* 2007;242:882-888.
13. Fábíán K, Gyulai M, Furák J et al. Significance of Primary Tumor Location and Histology for Brain Metastasis Development and Peritumoral Brain Edema in Lung Cancer, *Oncology* 2016;91:237-242.
14. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* 2007;2:706-714.
15. von Elm E, Altman DG, Egger M et al. Initiative, The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology ACCEPTED MANUSCRIPT 19 (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *Lancet* 2007;370:1453-1457.
16. Hansen IO, Jess P. Possible better long-term survival in left versus right-sided colon cancer - a systematic review. *Dan Med J* 2012;59.
17. Snaebjornsson P, Jonasson L, Jonsson T et al. Colon cancer in Iceland--a nationwide comparative study on various pathology parameters with respect to right and left tumor location and patients age. *Int J Cancer* 2010;127:2645-2653.
18. Suttie SA, Shaikh I, Mullen R et al. Outcome of rightand left-sided colonic and rectal cancer following surgical resection. *Colorectal Dis* 2011;13:884-889.
19. Weiss JM, Pfau PR, O'Connor ES et al. Mortality by stage for right- versus left-sided colon cancer: analysis of surveillance, epidemiology, and end results--Medicare data. *J Clin Oncol* 2011;29:4401-4409.
20. Benedix F, Kube R, Meyer F et al. C.R.C.P.T.S. Group, Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Dis Colon Rectum* 2010;53:57-64.
21. Meguid RA, Slidell MB, Wolfgang CL et al. Is there a difference in survival between right- versus left-sided colon cancers?. *Ann Surg Oncol* 2008;15:2388-2394.
22. Brulé SY, Jonker DJ, Karapetis CS et al. Location of colon cancer (right-sided versus left-sided) as a prognostic factor and a predictor of benefit from cetuximab in NCIC CO.17. *Eur J Cancer* 2015;51:1405-1414.

23. Amri R, Bordeianou LG, Sylla P. et al. Variations in Metastasis Site by Primary Location in Colon Cancer. *J Gastrointest Surg* 2015;19:1522-1527.
24. Qiu M, Hu J, Yang D et al. Pattern of distant metastases in colorectal cancer: a SEER based study. *Oncotarget* 2015;6:38658-38666.
25. Augestad KM, Bakaki PM, Rose J et al. Metastatic spread pattern after curative colorectal cancer surgery. A retrospective, longitudinal analysis. *Cancer Epidemiol* 2015;39:734-744.
26. Ling Q, Xu X, Ye P et al. The prognostic relevance of primary tumor location in patients undergoing resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget* 2017;8.15159-15167.
27. Ketchedjian A, Daly BD, Fernando HC et al. Location as an important predictor of lymph node involvement for pulmonary adenocarcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;132:544-548.
28. Ito M, Yamashita Y, Miyata Y et al. Prognostic impact of the primary tumor location based on the hilar structures in non-small cell lung cancer with mediastinal lymph node metastasis. *Lung Cancer* 2012;76:93-97.
29. Onn A, Choe DH, Herbst RS et al. Tumor cavitation in stage I non-small cell lung cancer: epidermal growth factor receptor expression and prediction of poor outcome. *Radiology* 2005;237:342-347.
30. Rami-Porta R, Bolejack V, Crowley J et al. IASLC Staging and Prognostic Factors Committee, The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revisions of the T 21 Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2015;10:990-1003.
31. Moon Y, Lee KY, Sung SW et al. Differing histopathology and prognosis in pulmonary adenocarcinoma at central and peripheral locations. *J Thorac Dis* 2016;8:167-177.
32. Hu P, Wang G, Cao H et al. Haemoptysis as a prognostic factor in lung adenocarcinoma after curative resection. *Br J Cancer* 2013;109:1609-1617.
33. Huang YH, Hsu KH, Tseng JS et al. Predilection of contralateral upper lung metastasis in upper lobe lung adenocarcinoma patients. *J Thorac Dis* 2016;8:86-92.
34. Vansteenkiste J, De Ruysscher D, Eberhardt WE et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013;24:89-98.
35. Vansteenkiste J, Crinò L, Doooms C et al. 2nd ESMO Consensus Conference on Lung Cancer: early-stage non-small-cell lung cancer consensus on diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2014;25:1462-1474.
36. Vilman P, Frost Clementsen P, Colella S et al. Combined endobronchial and esophageal endosonography for the diagnosis and staging of lung cancer: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline, in cooperation with the European Respiratory Society (ERS) and the European Society of Thoracic Surgeons (ESTS). *Eur J Cardiothorac Surg* 2015;48:1-15.
37. Ettinger DS, Wood DE, Akerley W et al. N.c.c. network, Non-Small Cell Lung Cancer. Version 6.2015. *J Natl Compr Canc Netw* 2015;13:515-524.

38. De Ruyscher D, Wanders R, van Baardwijk A et al. Radical treatment of non-small-cell lung cancer patients with synchronous oligometastases: long-term results of a prospective phase II trial (Nct01282450). *J Thorac Oncol* 2012;7:1547-1555.
39. Tanvetyanon T, Robinson LA, Schell MJ et al. Outcomes of adrenalectomy for isolated synchronous versus metachronous adrenal metastases in non-small-cell lung cancer: a systematic review and pooled analysis. *J Clin Oncol* 20008;26:1142-1147.
40. Gray PJ, Mak RH, Yeap BY et al. Aggressive therapy for patients with non-small cell lung carcinoma and synchronous brain-only oligometastatic disease is associated with long-term survival. *Lung Cancer* 2014;85:239-244.
41. Eberhardt WE, Mitchell A, Crowley J et al. International Association for Study of Lung Cancer Staging and Prognostic Factors Committee, and Participating Institutions, The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the M Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2015;10:1515-1522.
42. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2011;6:244-285.
43. Ujiie H, Kadota K, Chaft JE et al. Solid Predominant Histologic Subtype in Resected Stage I Lung Adenocarcinoma Is an Independent Predictor of Early, Extrathoracic, Multisite Recurrence and of Poor Postrecurrence Survival. *J Clin Oncol* 2015;33:2877-2884.
44. Motono N, Matsui T, Machida Y et al. Prognostic significance of histologic subtype in pStage I lung adenocarcinoma. *Med Oncol* 2017;34.
45. Park JK, Kim JJ, Moon SW et al. Lymph node involvement according to lung adenocarcinoma subtypes: lymph node involvement is influenced by lung adenocarcinoma subtypes. *J Thorac Dis* 2017;9:3903-3910.
46. Yu Y, Jian H, Shen L et al. Lymph node involvement influenced by lung adenocarcinoma subtypes in tumor size ≤ 3 cm disease: A study of 2268 cases. *Eur J Surg Oncol* 2016;42:1714-1719.

A keringő komplement komponens 4d (C4d) összefüggése a tumor térfogattal, kemoterápiás válasszal és a túléléssel malignus pleurális mezoteliómás betegeknél

1. Jantz MA, Antony VB. Pathophysiology of the pleura. *Respiration* 2008;75:121–133.
2. Jones JS. The pleura in health and disease. *Lung* 2001;179:397–413.
3. Lin RT, Takahashi K, Karjalainen A et al. Ecological association between asbestos-related diseases and historical asbestos consumption: an international analysis. *Lancet* 2007;369:844–849.

4. Robinson BW, Musk AW, Lake RA. Malignant mesothelioma. *Lancet* 2005;366:397–408.
5. Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J et al. Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol* 2003;21:2636.
6. Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane Aj et al. Cancer and the complement cascade. *Mol Cancer Res* 2010;8:1453–1465.
7. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010;11:785–797.
8. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860–867
9. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002;3:991–998.
10. Mantovani A, Allavena P, Sica A et al. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008;454:436–444.
11. Markiewski MM., Lambris JD. Is complement good or bad for cancer patients? A new perspective on an old dilemma. *Trends Immunol* 2009;30:286–292.
12. Ajona D, Pajares MJ, Corrales L et al. Investigation of complement activation product c4d as a diagnostic and prognostic biomarker for lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2013;105:1385–1393.
13. Makela K, Helen P, Haapasalo H et al. Complement activation in astrocytomas: deposition of C4d and patient outcome. *BMC Cancer* 2012;12.
14. Feucht HE. Complement C4d in graft capillaries—the missing link in the recognition of humoral alloreactivity. *Am J Transplant* 2003;3:646–652.
15. Murata K, Baldwin WM. 3rd Mechanisms of complement activation, C4d deposition, and their contribution to the pathogenesis of antibody-mediated rejection. *Transplant Rev (Orlando)* 2009;23:139–150.
16. Ajona D, Razquin C, Pastor MD et al. Elevated levels of the complement activation product C4d in bronchial fluids for the diagnosis of lung cancer. *PLoS One* 2015;10.
17. Ajona D, Pajares MJ, Chiara MD et al. Complement activation product C4d in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 2015;21:899–904.
18. Galani V, Constantopoulos S, Manda-Stachouli C et al. Additional proteins in BAL fluid of Mesothelioma environmentally exposed to asbestos: more evidence of “protection” against neoplasia? *Chest* 2002;121:273–278.
19. Zerva LV, Constantopoulos SH, Moutsopoulos HM. Humoral immunity alterations after environmental asbestos exposure. *Respiration* 1989;55:237–241.
20. Nabil K, Jaurand MC, Vignaud JM et al. Identification of human complement factor H as a chemotactic protein for monocytes. *Biochem J* 1997;326:377–383.
21. Frauenfelder T, Tutic M, Weder W et al. Volumetry: an alternative to assess therapy response for malignant pleural mesothelioma? *Eur Respir J* 2011;38:162–168.

22. Rusch VW. A proposed new international TNM staging system for malignant pleural mesothelioma from the International Mesothelioma Interest Group. *Lung Cancer* 1996;14:1–12.
23. Bu X, Zheng Z, Wang C et al. Significance of C4d deposition in the follicular lymphoma and MALT lymphoma and their relationship with follicular dendritic cells. *Pathol Res Pract* 2007;203:163–167.
24. Ghanim B, Hoda MA, Klikovits T et al. Circulating fibrinogen is a prognostic and predictive biomarker in malignant pleural mesothelioma. *Br J Cancer* 2014;110:984–990.
25. Ghanim B, Hoda MA, Winter MP et al. Pretreatment serum C-reactive protein levels predict benefit from multimodality treatment including radical surgery in malignant pleural mesothelioma: a retrospective multicenter analysis. *Ann Surg* 2012;256:357–362.
26. Hoda MA, Dong Y, Rozsas A et al. Circulating activin A is a novel prognostic biomarker in malignant pleural mesothelioma - A multi-institutional study. *Eur J Cancer* 2016;63:64–73.
27. Jing X, Huang C, Zhou H et al. Association between serum C-reactive protein value and prognosis of patients with non-small cell lung cancer: a metaanalysis. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:10633–10639.
28. Kim KH, Park TY, Lee JY et al. Prognostic significance of initial platelet counts and fibrinogen level in advanced non-small cell lung cancer. *J Korean Med Sci* 2014;29:507–511.
29. Seder CW, Hartojo W, Lin L et al. Upregulated INHBA expression may promote cell proliferation and is associated with poor survival in lung adenocarcinoma. *Neoplasia* 2009;11:388–396.
30. Mohr S, Bottin NA, Micillino MC et al. Immune Signature of Malignant Pleural Mesothelioma as Assessed by Transcriptome Analysis. *Cancer genomics proteomics* 2005;2:12.
31. Birmingham DJ, Hebert LA. The Complement System in Lupus Nephritis. *Semin Nephrol* 2015;35:444–454.
32. Martin M, Blom AM. Complement in removal of the dead - balancing inflammation. *Immunol Rev* 2016;274:218–232.
33. Speidl WS, Kastl SP, Huber K et al. Complement in atherosclerosis: friend or foe? *J Tromb Haemost* 2011;9:428–440.
34. Hollevoet K, Reitsma JB, Creaney J et al. Serum mesothelin for diagnosing malignant pleural mesothelioma: an individual patient data meta-analysis. *J Clin Oncol* 2012;30:1541–1549.
35. Kirschner MB, Pulford E, Hoda MA et al. Fibulin-3 levels in malignant pleural mesothelioma are associated with prognosis but not diagnosis. *Br J Cancer* 2015;113:963–969.
36. Robinson BW, Creaney J, Lake R et al. Mesothelin-family proteins and diagnosis of mesothelioma. *Lancet* 2003;362:1612–1616.
37. Byrne MJ, Nowak AK. Modified RECIST criteria for assessment of response in malignant pleural mesothelioma. *Ann Oncol* 2004;15:257–260.

Az apelin expresszió szerepe nem kissejtes tudódaganatok angiogenezisében és prognózisában

1. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998;251(2):471-476.
2. Bělowski J. Apelin and visfatin: unique "beneficial" adipokines upregulated in obesity? *Med Sci Monit*. 2006;12(6):RA112-119.
3. Falcão-Pires I, Ladeiras-Lopes R, Leite-Moreira AF. The apelinergic system: a promising therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets*, 2010;14(6):633-645.
4. Medhurst AD, Jennings CA, Robbins MJ, et al. Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J Neurochem*, 2003;84(5):1162-1172.
5. Reaux A, De Mota N, Skultetyova I, et al. Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J Neurochem*, 2001;77(4):1085-1096.
6. Ladeiras-Lopes R, Ferreira-Martins J, Leite-Moreira AF. The apelinergic system: the role played in human physiology and pathology and potential therapeutic applications. *Arq Bras Cardiol*, 2008;90(5):343-9.
7. Castan-Laurell I, Boucher J, Dray C, et al. Apelin, a novel adipokine over-produced in obesity: friend or foe? *Mol Cell Endocrinol*, 2005;245(1-2):7-9.
8. Taheri S, Murphy K, Cohen M, et al. The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002;291(5):1208-1212.
9. Boucher J, Masri B, Daviaud D, et al. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology*, 2005;146(4):1764-1771.
10. Han S, Wang G, Qiu S, et al. Increased colonic apelin production in rodents with experimental colitis and in humans with IBD. *Regul Pept*, 2007;142(3):131-137.
11. Principe A, Melgar-Lesmes P, Fernández-Varo G, et al. The hepatic apelin system: a new therapeutic target for liver disease. *Hepatology*, 2008;48(4):1193-1201.
12. Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, et al. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept*, 2001;99(2-3):87-92.
13. Cheng X, Cheng XS, Pang CC. Venous dilator effect of apelin, an endogenous peptide ligand for the orphan APJ receptor, in conscious rats. *Eur J Pharmacol*, 2003;470(3):171-175.
14. Földes G, Horkay F, Szokodi I, et al. Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003;308(3):480-485.
15. Habata Y, Fujii R, Hosoya M, et al. Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochim Biophys Acta*, 1999;1452(1):25-35.
16. Masri B, Lahlou H, Mazarguil H, et al. Apelin activates extracellular signal-regulated kinases via a PTX-sensitive G protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002;290(1):539-545.

17. Masri B, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin signalling: a promising pathway from cloning to pharmacology. *Cell Signal*, 2004;17(4):415-426.
18. Yue P, Jin H, Xu S, et al. Apelin decreases lipolysis via G(q), G(i), and AMPK-Dependent Mechanisms. *Endocrinology*, 2011;152(1):59-68.
19. Attané C, Daviaud D, Dray C, et al. Apelin stimulates glucose uptake but not lipolysis in human adipose tissue ex vivo. *J Mol Endocrinol*, 2011;46(1):21-28.
20. Szokodi I, Tavi P, Földes G, et al. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res*, 2002;91(5):434-440.
21. Masri B, Morin N, Pedebornade L, et al. The apelin receptor is coupled to Gi1 or Gi2 protein and is differentially desensitized by apelin fragments. *J Biol Chem*, 2006;281(27):18317-18326.
22. Zhou N, Zhang X, Fan X, et al. The N-terminal domain of APJ, a CNS-based coreceptor for HIV-1, is essential for its receptor function and coreceptor activity. *Virology*; 2003;317(1):84-94.
23. Lee DK, Lança AJ, Cheng R, et al. Agonist-independent nuclear localization of the Apelin, angiotensin AT1, and bradykinin B2 receptors. *J Biol Chem*, 2004;279(9):7901-7908.
24. Tang SY, Xie H, Yuan LQ, et al. Apelin stimulates proliferation and suppresses apoptosis of mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1 via JNK and PI3K/Akt signaling pathways. *Peptides*, 2007;28(3):708-718.
25. Xie H, Tang SY, Cui RR, et al. Apelin and its receptor are expressed in human osteoblasts. *Regul Pept*, 2006;134(2-3):118-25.
26. Hu PF, Chen WP, Tang JL, et al. Apelin plays a catabolic role on articular cartilage: in vivo and in vitro studies. *Int J Mol Med*, 2010;26(3):357-63.
27. Zeng X, Yu SP, Taylor T, et al. Protective effect of apelin on cultured rat bone marrow mesenchymal stem cells against apoptosis. *Stem Cell Res*, 2011;8(3):357-367.
28. Liu C, Su T, Li F, et al. PI3K/Akt signaling transduction pathway is involved in rat vascular smooth muscle cell proliferation induced by apelin-13. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2010;42(6):396-402.
29. Kidoya H, Takakura N. Biology of the apelin-APJ axis in vascular formation. *J Biochem*, 2012;152(2):125-131.
30. Kälén RE, Kretz MP, Meyer AM, et al. Paracrine and autocrine mechanisms of apelin signaling govern embryonic and tumor angiogenesis. *Dev Biol*, 2007;305(2):599-614.
31. Wang Z, Greeley GH Jr, Qiu S. Immunohistochemical localization of apelin in human normal breast and breast carcinoma. *J Mol Histol*, 2008;39(1):121-124.
32. Sorli SC, van den Berghe L, Masri B, et al. Therapeutic potential of interfering with apelin signalling. *Drug Discov Today*, 2006;11(23-24):1100-1106.

33. Sorli SC, Le Gonidec S, Knibiehler B. Apelin is a potent activator of tumour neoangiogenesis. *Oncogene*, 2007;26(55):7692-7699.
34. Heo K, Kim YH, Sung HJ, et al. Hypoxia-induced up-regulation of apelin is associated with a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol*, 2012;48(6):500-506.
35. Kidoya H, Kunii N, Naito H, et al. The apelin/APJ system induces maturation of the tumor vasculature and improves the efficiency of immune therapy. *Oncogene*, 2012;31(27):3254-3264.
36. Ameri K, Luong R, Zhang H, et al. Circulating tumour cells demonstrate an altered response to hypoxia and an aggressive phenotype. *Br J Cancer*, 2010;102(3):561-569.
37. Eyries M, Siegfried G, Ciumas M, et al. Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circ Res*, 2028;103(4):432-440.
38. Mountain FC. Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest*, 1997;111:1710-1717.
39. Tóvári J, Gilly R, Rásó E, et al. Recombinant human erythropoietin alpha targets intratumoral blood vessels, improving chemotherapy in human xenograft models. *Cancer Res*, 2005;65(16):7186-7193.
40. Paku S, Kopper L, Nagy P. Development of the vasculature in "pushing-type" liver metastases of an experimental colorectal cancer. *Int J Cancer*, 2005;115(6):893-902.
41. Cox CM, D'Agostino SL, Miller MK, et al. Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Dev Biol*, 2006;296(1):177-189.
42. Kleinz MJ, Davenport AP. Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells. *Regul Pept*, 2004;118(3):119-125.
43. Masri B, Morin N, Cornu M, et al. Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *FASEB J*, 2004;18(15):1909-1911.
44. Kasai A, Shintani N, Oda M, et al. Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004;325(2):395-400.
45. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011;61(2):69-90.
46. Giaccone G. The potential of antiangiogenic therapy in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2007;13(7):1961-1970.
47. Amir E, Mandoky L, Blackhall F, et al. Antivascular agents for non-small-cell lung cancer: current status and future directions. *Expert Opin Investig Drugs*, 2009;18(11):1667-1686.
48. Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, et al. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim Biophys Acta*, 2001;1538(2-3):162-171.
49. Kidoya H, Ueno M, Yamada Y, et al. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J*, 2008;27(3):522-534.

50. Rayalam S, Della-Fera MA, Krieg PA, et al. A putative role for apelin in the etiology of obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008;368(3):815-819.
51. Amir E, Hughes S, Blackhall F, et al. Targeting blood vessels for the treatment of non-small cell lung cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008;8(5):392-403.
52. Döme B, Hendrix MJ, Paku S, et al. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol*, 2007;170(1):1-15.
53. Kasai A, Shintani N, Kato H, et al. Retardation of retinal vascular development in apelin-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008;28(10):1717-1722.