

Kísérletes tüdőmetasztázisok ereződésének vizsgálata

Doktori tézisek

Szabó Vanessza

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Paku Sándor DSc., tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók: Dr. Szász A. Marcell, Ph.D.,
kutatás koordináló főmunkatárs
Dr. Lőw Péter Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sótonyi Péter, MTA rendes tag,
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Réz Gábor Ph.D.,
nyugalmazott egyetemi docens
Dr. Lotz Gábor Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2018

BEVEZETÉS

A tumor indukált angiogenezis és a gazdaszövet hatása a tumorok ereződésére, valamint kötőszövetes szerkezetére

Judah Folkman a hetvenes években közölte forradalmian új elméletét, miszerint a daganatok növekedése új erek képződését igényli, vagyis a tumorok angiogenezis-függőek. Folkman szerint angiogenezis hiányában a tumorok növekedése limitált, nem képesek 1-2 mm³-nél nagyobbra nőni. Ez az elképzelés még napjainkban is a daganatok anti-angiogén terápiájának alapjául szolgál.

Mivel a különböző szövetek és szervek kötőszövetének és érhalózatának szerkezete eltérő, felmerül, hogy bennük a tumorok ereződése eltérően megy végbe. Olyan primer tumorok esetében (emlő, bél, bőr), melyek környezetében nagy mennyiségű kötőszövet található az angiogenezisnek két fő formája figyelhető meg: a „sprouting”, vagy bimbózó- és az intussuszeptív angiogenezis. Mindkét folyamat alapvetően endotélsejt proliferációval járó érdenzitás növekedést jelent. A metasztázisképzés fő szerveiben (máj, agy és tüdő) azonban elsődlegesen nem található nagy mennyiségben kötőszövet, így az áttétek alternatív vaszkularizációs mechanizmusokkal (érinkorporáció, glomeruloid angiogenezis, posztnatális vaszkulogenezis, vaszkuláris mimikri) tesznek szert vérellátásra.

Pezzella és mtsai. az 1990-es évek közepén kimutatták primer és metasztatikus tüdőtumorkok esetében, hogy a növekvő tumormassza intakt alveólusfalak inkorporálására képes.

Májmetasztázisokban kimutatták, hogy a tumor differenciációs foka szintén befolyásolhatja a metasztázisok szövettani szerkezetét. A kolorektális adenokarcinómák májmetasztázisaiban három különböző növekedési mintázatot írtak le. A „replacement” növekedési mintázat (differenciálatlan tumorok) esetében a máj megőrzi eredeti struktúráját. Azonban a „desmoplastikus” és „pushing” típusú növekedési mintázatoknál (differenciáltabb tumorok) a máj struktúrája torzul, a metasztázisok körül a májparenchima komprimálódik.

Munkacsoportunk korábban már leírta a vaszkularizáció folyamatát „pushing” típusú kísérletes kolorektális adenokarcinóma modellben (C38) a májban. A metasztázisok növekedése során simaizom aktin (α SMA) pozitív sejtek jelentek meg a tumor-parenchima határán, és ezzel együtt a hepatociták kiszorultak erről a területről. Mindez a tumorok széli részén a májszínuszoidok fúziójához vezetett, melynek eredményeképpen nagyméretű erek jelentek meg a metasztázisok felszínén. A fuzionált színuszoidok és a kollagén mátrixot termelő α SMA-pozitív miofibroblasztok egyaránt bekebelezésre kerültek a növekvő tumor által. Az invaginációk tumorban legmélyebben elhelyezkedő része feltehetően a tumorszövet

nyomása következtében levált a környező gazdaszövetről és a folyamat végeredményeként centrális helyzetű, funkcionális érrel rendelkező kötőszövetes oszlop alakult ki.

Differenciálatlan tumorok esetében a májmetasztázisok ereződésének egyik lehetséges módja az izolált tumorsejtek migrációja a Disse-térben található bazális membrán mentén. A folyamat során a tumorsejtek leválasztják az endotélsejteket saját bazális membránjukról, melyek ezt követően proliferálni kezdenek és tág lumenű, kanyarultos lefutású ereket képeznek a metastázisban. Ezen tumortípus esetében nem volt kötőszövet lerakódás megfigyelhető a peritumorális területeken. Fontos megjegyezni, hogy sem a „pushing”, sem az invazív („replacement” növekedési mintázat) tumorok esetében peritumorálisan nem volt endotél proliferáció, és így angiogenezis sem volt megfigyelhető.

A tumorok kötőszövetes szerkezetét az is meghatározhatja, hogy a tumor környezetében található-e olyan sejtek, melyek képesek extracelluláris mátrix szintézisére, és ha igen a tumor milyen mértékben tudja aktiválni ezeket a sejteket. Ezzel összefüggésben megfigyeltük, hogy kísérletes agymetasztázisokban nem történik meg kötőszövet lerakódása, mivel az agy parenchimájában nem található fibroblasztok. A fentebb ismertetettek szerint a „pushing”, illetve dezmozplasztikus növekedési mintázatot mutató metastázisok nagyobb mértékben képesek aktiválni a fibroblasztokat, mint az invazív növekedést mutató tumorok.

Egér tüdő adenokarcinóma sejtek képesek szubsztrátként használni a bazális membrán sejtfeleli oldalát növekedésükhöz és terjedésükhöz a perifériás idegrendszer, valamint az izom- és zsírszövet inváziója során. E folyamat során a gazdas sejteket a tumorsejtek leválasztják saját bazális membránjukról, az előbbieket végül elpusztulnak, azonban a bazális membránjuk ép marad.

CÉLKITŰZÉSEK

A primer tumorok és metasztázisok vaszkularizációjának számos módját írták le különböző szövetekben, szervekben, azonban tüdőmetasztázisok ereződésének pontos mechanizmusa még a mai napig nem teljesen ismert. Ezért célkitűzéseink a következők voltak:

1. Kísérletes tüdőmetasztázisok vaszkularizációs mechanizmusainak meghatározása különböző szöveti eredetű tumorok esetében.
2. A kötőszövetes szerkezet kialakulásának vizsgálata különböző szöveti eredetű tumorvonalak invazív és nem invazív növekedési mintázatot mutató tüdőmetasztázisaiban.
3. C38 tumorok érinkorporációs mechanizmusának, kötőszövetes szerkezetének összehasonlítása tüdő metasztázisokban és szubkután szövetben.
4. Kísérletes tüdőmetasztázisok vérellátása eredetének (bronchiális, pulmonális) meghatározása és ennek hatása a tumorsejtek proliferációjára.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtvonalak

Vizsgálatainkban HT1080 humán fibroszarkóma, HT25 humán kolon adenokarcinóma, A2058 humán melanóma, MAT-B-III patkány emlő adenokarcinóma, B16 egér melanóma, valamint C26 és C38 egér kolon adenokarcinóma sejtvonalakat használtunk.

Állatmodellek

A kísérletekhez a Semmelweis Egyetem, I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet állatházi tenyészetéből származó, standard körülmények között tartott C57Bl/6, Balb/c, SCID egereket és Fischer 344 patkányokat használtunk.

Tüdőmetasztázisokat a daganatsejtek intravénás (farokvéna) oltásával hoztunk létre. Mivel a szubkután fenntartott C38 tumorokból kinyert tumorsejtek az állatok farokvénájába oltása után nem képeztek tüdőmetasztázisokat, ezért ebben az esetben a tumorsejteket az egér hátsó lábának talpába injektáltuk, majd az oltást követő 18-28 nappal később a tumort hordozó lábat amputáltuk (spontán metasztázis modellben).

Kettős érfeltöltés

A tüdőmetasztázisok vérellátásának vizsgálatához MAT-B-III modellt használtunk. A normál patkány tüdőben a pulmonális és bronchiális rendszer között jelen lévő anasztomózisok miatt, először a pulmonális rendszert töltöttük fel kék műgyantával. Így megakadályoztuk, hogy az anasztomózisokon keresztül a bronchiális artéria rendszerébe injektált műgyanta a pulmonális artéria rendszerén keresztül jusson be a metasztázisokba. A kék gyanta polimerizációja után aortakanülön keresztül a bronchiális rendszert piros műgyantával töltöttük fel.

A metasztázisok méretének és az artériás ellátású metasztázisok arányának meghatározása

A metasztázisok méretének meghatározásához a műgyantával feltöltött tüdőket eltávolítottuk és lebenyekre vágtuk. A jobb felső, jobb alsó és a baloldali lebenyek mindkét oldalán sztereomikroszkóppal készült felvételeken meghatároztuk a felszínen lévő metasztázisok átmérőjét.

A lebenyek 30%-os KOH oldatban történt korróziója után megállapítottuk az egyes metasztázisok vérellátását. Azon áttéteket, melyek bármilyen mennyiségben tartalmaztak piros műgyantát tehát a bronchiális artériához közvetlenül kapcsolódtak, "bronchiális" ellátásúnak tekintettük. Azon metasztázisok, melyek nem bronchiális vérellátásúak voltak, a

pulmonális artéria részleges feltöltése következtében üregként jelentek meg a korróziós készítményeken. A metasztázisok méretének és vérellátásuk eredetének közötti összefüggés vizsgálata során összesen 218 darab MAT-B-III emlő adenokarcinóma metasztázist vizsgáltunk.

Immunfluoreszcens vizsgálatok

A különböző lokalizációjú (tüdő, szubkután) tumorok fagyasztott metszetein immunfluoreszcens technikával CD31, α SMA, laminin, BrdU, konnexin43, kollagén I, podoplanin festést végeztünk. A mintákat konfokális lézer szkennig mikroszkóppal (Bio-Rad, MRC-1024, München, Németország) vizsgáltuk.

A különböző vérellátású metasztázisok tumor- és endotélsejt proliferációs rátájának meghatározása

A proliferáló sejteket BrdU-inkorporációs technikával azonosítottuk. Fagyasztott metszeteken a metasztázisok ereiben lévő műgyanta színe alapján meghatároztuk a bronchiális vagy pulmonális eredetet, majd anti-BrdU festéssel az osztódó tumorsejtek arányát. 14 állatból 14 bronchiális- és 17 pulmonális artéria által ellátott metasztázist vizsgáltunk meg.

Az intratumorális endotélsejt proliferáció meghatározásához anti-laminin és anti-BrdU jelölést végeztünk, míg a peritumorálishoz immun-elektronmikroszkópiát használtunk. 5 állatból származó, 14 metasztázisban, összesen 2300 sejtet számoltunk le intratumorálisan, míg a kapillárisok, valamint venulák 329 endotélsejtjét analizáltuk peritumorálisan.

A tumorsejtek proliferációja oxigénfüggőségének meghatározása *in vitro*

A2058 és MAT-B-III sejtek proliferációs képességét Alamar Blue tesztel vizsgáltuk *in vitro* hipoxiás (1% O₂) és normoxiás (21% O₂) körülmények között.

Elektronmikroszkópia

A C38, B16 és HT1080 tumort hordozó egereket 2%-os glutáraldehid tartalmú 0,05 mol/L Na-kakodilát pufferrel perfundáltuk a bal kamrán keresztül. A tumort tartalmazó szövetek (tüdő, szubkután szövet) 1-2 mm³-es darabjait glutár-aldehiddel és K-ferrocianidotot tartalmazó 1% OsO₄-al fixáltuk. Uranil-acetát és ólom nitrát kontrasztolás után Philips CM10 (Philips Research, Eindhoven, Hollandia) elektronmikroszkóppal vizsgáltuk a mintákat.

3D rekonstrukció

A tüdőparenchima és a tumorszövet viszonyának szemléltetésére fagyasztott C38 tüdőmetasztázisból sorozatmetszeteket készítettünk, és azokból anti-CD31 és -laminin festés után a tumormassza rekonstrukcióját a Biovis3D szoftverrel készítettük el.

Különböző lokalizációjú C38 tumorok kötőszövetes elemeinek morfometriai analízise

Az anti-CD31 és -laminin jelzett C38 tumorminták szkennelt metszetein végzett morfometriai analízissel meghatároztuk az egy individuális eret tartalmazó kötőszövetes oszlopokban az ér mindkét oldalán a távolságot (μm) a bazális membrán és az oszlop körüli tumorsejtek által termelt laminin között. Tumorlokációként legalább 5 állatból származó, 3-3 metszeten, metszetenként 10-20 kötőszövetes oszlopot vizsgáltunk.

QRT-PCR analízis

10^6 B16 egér melanóma és 2.5×10^5 C38 egér kolon karcinóma sejtekből teljes RNS-t izoláltunk. Mintánként 1 μg RNS-t írtunk át cDNS-sé a Thermo Fisher Scientific reverz transzkripció kit-jét használva. Endogén kontrollként Gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH, Thermo Fisher Scientific) használtunk. Minden mintát triplikátumban futtattunk, 20 μl reakciótérfogatban. Küszöbciklus (CT) értékek segítségével az expressziós szinteket ΔCT módszerrel határoztuk meg.

Statisztikai analízis

A csoportok közti különbségek statisztikai kiértékeléséhez kétmintás t-próbát alkalmaztunk. Eredményeinket $p < 0.05$ értékek esetén tartottuk szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

A kísérletes tüdőmetasztázisok ereződése

A tüdő alveoláris szerkezetének és a metasztázisok beereződésének kapcsolata a tumor perifériáján.

A vaszkularizáció folyamatát hat különböző kísérletes tüdőmetasztázis modellben vizsgáltuk. A metasztázisok mérete 100 μm és néhány milliméter között volt (a MAT-B-III sejtekkel injektált patkányokban 5 mm-nél nagyobb átmérőjű tumorokat is megfigyeltünk) A vizsgált tumorok vaszkularizációjának mechanizmusa a tumorok méretétől független volt.

A metasztázisok szélén elhelyezkedő, de már tumorszövet által kitöltött alveólusok falának szerkezete kezdetben megtartott volt (azaz intakt volt a pneumocita – kapilláris - pneumocita szerkezet). Ultrastrukturális vizsgálataink azt mutatták, hogy a normál tüdőben jelen lévő vér-levegő gát – amely epitelsejt rétegből, bazális membránból és endotelsejt rétegből áll – szerkezete a metasztázisok széli részein megtartott.

Ezen eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a metasztázisok növekedésük első fázisában úgy tesznek szert az érrendszerükre, hogy bekebelezik a meglévő alveólusokat és ezzel együtt az alveólusok falában elhelyezkedő kapillárisokat. Az inkorporált kapillárisok lumenjében tumorsejtek nem találhatók, a tumorsejtek és a pneumociták plazmamembránjai szoros kapcsolatban vannak.

Az inkorporált erek és a tumorsejtek kölcsönhatása a metasztázisok belsejében

A vizsgált tumortípusok mindegyike (kivéve a C38 kolorektális adenokarcinóma) esetében azt a jelenséget figyeltük meg, hogy a tumor centruma felé az alveólusokat kitöltő tumorsejtek leválasztják az erekről a pneumocita réteget, ugyanis a vérerek körül nincsenek jelen pneumociták a metasztázisok invazív szélétől a centrum felé 100-200 μm -re. A pneumocita-mentes erek létrejöttét maguk a tumorsejtek indukálják úgy, hogy a tumormasszával kitöltött alveólusok lumenéből a tumorsejtek visszalépnek az alveólusok falában található kötőszövetes állományba, majd betörnek a kapillárisok és az alveólus epitélium közé azokon a területeken, ahol a pneumocitákat és az endotelsejteket csak a kettős bazális membrán választja el egymástól (vér-levegő gát). Ennek eredményeként a pneumociták leválnak a kapillárisokról. Elektronmikroszkópiával megállapítottuk, hogy a tumorsejtek az alveólusok kötőszövetet tartalmazó területeiről kiindulva képesek szétválasztani a normál gázcsere helyén, az epitél- és az endotél sejtek közötti található kettős bazális membránt. A szétválás után a pneumocita réteg, mely saját bazális membránján

helyezkedik el, a tumorsejtek szaporodásának következtében eltávolodik a kapilláristól. A folyamat végeredményeképpen a tumorsejtek teljesen körbeveszik a kapillárisokat.

A metasztázisokban található pneumociták száma és lokalizációja függött a metasztázis méretétől. Míg a kisebb metasztázisok közepén láthatunk pneumocitákat, addig a nagyobb metasztázisok centrumában nincsenek jelen pneumociták. Ennek oka, hogy a levált és tumorsejtek között elhelyezkedő epitelsejtek hosszabb ideig nem életképesek és a tumor nyomása következtében fragmentálódnak és elpusztulnak. Ezzel szemben a lecsupaszított és inkorporált erek túlélnek és funkcionálisak maradnak, amit az erek körül elhelyezkedő tumorsejtek intenzív BrdU inkorporációja is alátámaszt.

Peri- és intratumorális endotélsejt proliferáció

Az angiogén switch elmélet szerint a tumorok az 1-2 mm-es átmérő elérése után az endotélsejtek osztódásával járó érképződést indukálnak. A kísérleteinkben vizsgált metasztázisok többsége nem érte el ezt a kritikus méretet, azonban a patkányban növekvő MAT-B-III tumorok meghaladták azt (átlagos átmérő 3.36 ± 2.23 mm; tartomány 0.3–14.8 mm; medián 2.8 mm). Ahhoz, hogy megállapítsuk, hogy ezen tumorokban, illetve környezetükben zajlik-e angiogenezis, összehasonlítottuk a tüdőmetasztázisok intratumorális és peritumorális régiójában (közvetlenül a metasztázis melletti 100 μ m szélességű ép tüdőszövetben) lévő endotélsejtek proliferációs rátáját. A peritumorális endotélsejtek elhanyagolható mértékű proliferációs rátát mutattak ($1.73 \pm 0.8\%$), azonban az intratumorális endotélsejtek proliferációs rátája szignifikánsan magasabb volt ($12.8 \pm 3.2\%$, $p < 0.05$). Emellett, a tumor centrumát összehasonlítva a perifériával az érdenzitás intratumorálisan alacsonyabb, az erek kerülete viszont enyhén növekedett, ami azt jelzi, hogy az intratumorális endotélsejtek proliferációja az erek tágulását eredményezi.

A kötőszövet eloszlása az invazív növekedési mintázatot mutató tumorvonalak tüdőmetasztázisaiban

Patológias körülmények között az aktivált fibroblasztok által termelt kollagén tartalmú mátrix biztosíthatja a tumorsejtek számára a tumor progresszióját elősegítő mikrokörnyezetet. Az α SMA pozitív miofibroblasztok, a kötőszövetes kollagén mennyisége és eloszlása a vizsgált kísérletes tumorokban eltéréseket mutatott. Az alveólus falak inváziója során minden tumor típus esetében az ott található fibroblasztok miofibroblaszttá alakultak. A metasztázisok az alveólusok kapillárisaival együtt bekebeleztek az alveólusok falában elhelyezkedő α SMA pozitív miofibroblasztokat, azonban a metasztázisok körül nem volt megfigyelhető dezmozplasztikus reakció (fibroblaszt aktiválás, kollagén termelés és depozíció). Az α SMA

pozitív miofibroblasztok egy része kapcsolatban maradt az erek bazális membránjával, azonban ezen sejtek nem tekinthetők pericitáknak, hiszen nem fedi őket bazális membrán.

A B16 melanóma és a HT1080 fibroszarkóma esetében az α SMA pozitív sejtek száma nem növekedett a tumor centruma felé, a bekebelezett erek körül csak kis mennyiségű kollagén lerakódás volt megfigyelhető. Ezzel ellentétben az aktivált fibroblasztok száma és a kollagén mennyisége nőtt a peritumorális tüdőszövetből a tumor centruma felé a MAT-B-III, C26 és különösképp a HT25 kolon adenokarcinóma metasztázisok esetében.

A C38 kolon adenokarcinóma kötőszövetes szerkezetének és ereződésének vizsgálata tüdő- és szubkután szövet esetében

A C38 tumor a többi tumormodelltől eltérő módon lép kapcsolatba a tüdőszövettel, így ereződése is eltérő módon zajlik. Az alveoláris tereken keresztül terjedő tumorsejtek nem lépnek vissza az alveólusok interstíciumába és így nem választják le a pneumocitákat az alveólusok kapillárisairól, ehelyett dezmozplasztikus reakciót váltanak ki az alveólusok falában. Ennek eredményeként a C38 metasztázisokban az alveólusfalak kötőszövetes oszlopokká alakulnak. Az oszlopok kollagén tartalmú mátrixba ágyazott, bazális membránnal körülvett centrális érből, α SMA pozitív, aktivált fibroblasztokból és a mindezt körülvevő (a tumor által termelt) bazális membránból állnak. A kötőszövetes oszlopok fokozatosan alakulnak ki a perifériától a tumor centruma felé. Először azon alveólusok falában, melyek lumene tumorsejtekkel kitöltött, α SMA-t expresszáló aktivált fibroblasztok jelentek meg, melyek száma és a lerakódott kollagén mennyisége a tumor centruma felé fokozatosan nő, így a kapillárisok és az epitélium közti távolság is növekszik. A kötőszövetes oszlopok kialakulása során a tumorsejtekkel közvetlen érintkező epitélium fokozatosan fragmentálódik. A tumorsejtek szaporodása következtében az inkorporált alveólusfalak kapillárisai a körülöttük kialakult kötőszövettel fokozatosan egyre távolabb kerülnek egymástól. A folyamat végeredményeképpen a tumor centruma felé kialakulnak az egyetlen centrális kapillárisal rendelkező kötőszövetes oszlopok.

Az inkorporáció mechanizmusának pontosabb meghatározása érdekében szubkután szövetben is megvizsgáltuk a C38 tumorvonal ér- és kötőszövet szerkezetének kialakulását. Ennek a modellnek az előnye a tüdőszövettel szemben, hogy a pushing típusú növekedési mintázatot mutató tumor esetében a tumor gazdaszövet határa jól elkülöníthető, így az inkorporáció jelensége jól vizsgálható. Ahogy a C38 tüdőmetasztázis esetében, úgy a szubkután szövetben növekvő C38 tumorok széli részein is megfigyelhető az α SMA-t expresszáló aktivált fibroblasztok (miofibroblasztok) és kollagén felhalmozódása. A tumorok felszínén különböző méretű invaginációk alakultak ki, melyek eltérő számban tartalmaztak ereket és az ereket körülvevő kötőszövetet. Az invaginációkat a tumor által szintetizált bazális

membrán (laminin) határolhatja. A több eret tartalmazó invaginációk a tumorszövet centruma felé további "érés folyamatokon" estek át, melynek során a tumorszövetben folyamatosan keletkező invaginációk újabb és újabb területeket/darabokat választanak le az inkorporált szövetről. Az érési folyamat végső eredményeképpen egyetlen centrális érrel rendelkező kötőszövetes oszlopok jönnek létre. A kötőszövetes oszlopok strukturális elemei belülről kifelé haladva: az érlument körbevevő endotélsejtek, az ér bazális membránja, α SMA pozitív sejtek kollagént tartalmazó mátrixba ágyazva, a tumor bazális membránja, ami megegyezik a tüdőben megfigyelt kötőszövetes oszlopok szerkezetével.

A peritumorális fibroblasztokat a tumorsejtek aktiválják, amit a vizsgált fibrotikus faktorok (TGF- β ; PDGFB, FGF2, CTGF) emelkedett mRNS expressziója igazolt.

A tüdőmetasztázisok vérellátásának eredete

Mivel a tüdő kettős vérellátással rendelkezik hasonlóan a májhoz - melyre vonatkozó korábban megállapítottuk, hogy a 2 mm-nél nagyobb egér májmetasztázisok artériás vérellátásúak-, megvizsgáltuk a tüdőmetasztázisok vérellátásának eredetét. A patkány tüdőben (ahol igazoltuk a bronchiális artéria jelenlétét) csak a fő artéria ágakat lehetett műgyantával feltölteni, így nem volt lehetséges eldönteni, hogy a szegmentális hörgők rendelkeznek-e artériás vérellátással. Különböző méretű MAT-B-III patkány emlő adenokarcinóma tüdőmetasztázisokban a vérellátás eredetét vizsgálva azt találtuk, hogy az 5 mm-nél nagyobb átmérőjű metasztázisok 95%-a artériás vérellátású (bronchiális artérián keresztül), a 3 mm-nél kisebb metasztázisok 97%-a pedig vénás (pulmonális artérián keresztül) vérellátású. A metasztázisokat ellátó arteriolák 65%-a centrális helyzetű.

A különböző vérellátású metasztázisok tumorsejtjeinek proliferációs rátáját is összehasonlítottuk. A bronchiális vérellátású metasztázisok tumorsejtjeinek proliferációs indexe szignifikánsan magasabb volt, mint a pulmonális vérellátásúaké ($43.5 \pm 6.1\%$ vs. $35.3 \pm 2.5\%$; átlag \pm szórás; $p < 0.05$). *In vitro* kísérletekben is igazoltuk, hogy a magasabb oxigén koncentrációban szignifikánsan nagyobb a tumorsejtek proliferációs rátája.

KÖVETKEZTETÉSEK

A disszertáció fő megállapításai a következők:

1. A tumorok terjedésének alapvető módja minden vizsgált tumorvonal esetében a tumorszövet alveólusról–alveólusra történő „áramlása” volt. Ennek eredményeként mindegyik tumortípus az alveólusokban lévő kapillárisokat inkorporálta aktív peritumorális érképződés nélkül.
2. Az inkorporációt követően az invazív tumorok infiltrálják az alveólus falat, és leválasztják a pneumocitákat a kapillárisokról. A folyamat során a tumorsejtek az alveólusfal bazális membránját egy epiteliális és egy endoteliális rétegre választják szét. Ugyanakkor a lecsupaszított erek funkcionálisak maradnak.
3. A nem invazív C38 tumorvonal dezmozplasztikus reakciót vált ki az alveólus falban, melynek következményeként centrális érrel rendelkező, a tumorszövet vérellátását biztosító, kötőszövetes oszlopok alakulnak ki a metasztázisban.
4. Tüdőben és szubkután szövetben növekvő C38 tumorok széli részein fibroblaszt aktiváció (miofibroblaszt) és kollagén depozíció zajlik, amelyért legnagyobb valószínűséggel a tumorsejtek által termelt fibrogén faktorok felelősek. Az inkorporáció folyamatának végső eredménye (mely szubkután szövetben invaginációk képződésével, míg tüdőben az alveoláris terek és a Kohn pórusok kitöltésével történik meg), hogy mindkét szövetben ugyanolyan kötőszövet szerkezet és érrendszer (centrális érrel rendelkező kötőszövetes oszlopok) fejlődik ki, mint amit korábban máj metasztázisokban és bélfalban növekvő tumorok esetében már megfigyeltünk. Megállapíthatjuk tehát, hogy minden olyan lokalizációban létrejönnek a jellegzetes, a vérellátást biztosító struktúrák, ahol a tumornövekedés korai stádiumában jelen vannak fibroblasztok a tumor környezetében.
5. Patkány tüdőben a metasztázisok 5 mm felett bronchiális artéria eredetű vérellátásra tesznek szert. A magasabb oxigén koncentráció, ami a tüdőben a bronchiális artéria által ellátott metasztázisokban található, a tumorsejtek számára növekedési előnyt biztosít, melyet in vitro kísérletekben is igazoltunk.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában megjelent publikációk

1. **Szabo V**, Bugyik E, Dezso K, Ecker N, Nagy P, Timar J, Tovari J, Laszlo V, Bridgeman VL, Wan E, Frenzas S, Vermeulen PB, Reynolds AR, Dome B, Paku S. Mechanism of tumour vascularization in experimental lung metastases. *J Pathol.* 2015 235(3): 384-396. IF.: 7,381
2. Bugyik E, Renyi-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. *Chin J Cancer.* 2016 35: 19. Review. IF.: 4,111
3. Szabó V, Bugyik E, Dezső K, Tóvári J, Döme B, Paku S. Role of tumour cell invasion/migration in the vascularisation of experimental lung metastases. *Magy Onkol.* 2015 59(4): 319-323.
4. Bugyik E, Szabó V, Dezső K, Rókusz A, Szücs A, Nagy P, Tóvári J, László V, Döme B, Paku S. Role of (myo)fibroblasts in the development of vascular and connective tissue structure of the C38 colorectal cancer in mice. *Cancer Commun.* 2018 38(1):46. IF.: 3,822

Egyéb közlemények

1. Papp V, Rókusz A, Dezső K, Bugyik E, Szabó V, Pávai Z, Paku S, Nagy P. Expansion of hepatic stem cell compartment boosts liver regeneration. *Stem Cells Dev.* 2014 23(1):56-65. IF.: 3,727
2. Rókusz A, Bugyik E, Szabó V, Szücs A, Paku S, Nagy P, Dezső K. Imatinib accelerates progenitor cell-mediated liver regeneration in choline-deficient ethionine-supplemented diet-fed mice. *Int J Exp Pathol.* 2016 97(5):389-396. IF.: 1,780

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék nyilvánítani azoknak, akik hozzájárultak disszertációm elkészüléséhez. Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Paku Sándornak segítségét és tanítását, valamint, hogy szakmai tudását átadta, amellyel tudományos munkám eredményességéhez jelentősen hozzájárult. Köszönöm kollégáimnak, dr. Bugyik Edinának és dr. Dezső Katalinnak mindazt a szakmai támogatást, amellyel segítettek munkám során.

Köszönöm Prof. Dr. Matolcsy András igazgató úrnak, hogy lehetővé tette, és támogatta kutatásaimat az I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben.

Köszönöm az állatház munkatársának, Sztodola Andrásnak az állatkísérletek kivitelezésében nyújtott pótolhatatlan segítségét, odaadó munkáját.

Köszönöm Csorba Gézáné Marica lelkiismeretes munkáját, valamint, hogy mindig mosolyt csalt az arcomra.

Köszönetemet fejezem ki munkacsoportunk nélkülözhetetlen külsős tagjainak, dr. Tóvári Józsefnek és dr. Döme Balázsnak.

Köszönöm Édesanyámnak és Édesapámnak, hogy gyermekkorom óta támogattak és a tudomány világa felé tereltek. Köszönetet szeretnék mondani Mamónak, hogy mindig hitt Bennem. Köszönöm családom minden tagjának és Szerelmemnek, hogy támogatásukkal segítették disszertációm elkészültét.