

**SEMMELWEIS EGYETEM**  
**DOKTORI ISKOLA**

**Ph.D. értekezések**

**2265.**

**SZABÓ VANESSZA**

**Onkológia**  
című program

Programvezető: Dr. Kopper László, egyetemi tanár  
Témavezető: Dr. Paku Sándor, tudományos tanácsadó

# Kísérletes tüdőmetasztázisok érződésének vizsgálata

Doktori értekezés

**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

## Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék .....	5
1. Bevezetés .....	7
1.1. Vaszkulogenezis, angiogenezis .....	7
1.2. A tumor indukált angiogenezis .....	7
1.3.1. Sprouting angiogenezis.....	11
1.3.2. Intusszuszeptív angiogenezis .....	13
1.4. A tumorok ereződésének alternatív formái .....	16
1.4.1. Érinkorporáció .....	16
1.4.2. Glomeruloid testek képződése.....	17
1.4.3. Posztnatális vaszkulogenezis .....	18
1.4.4. Vaszkuláris mimikri .....	20
1.5. A gazdaszövet hatása a tumorok szerkezetére és beereződés mintázatára.....	21
1.6. A tüdő anatómiája.....	23
1.7. Tüdőmetasztázisok kezelése.....	26
2. Célkitűzések .....	28
3. Anyagok és módszerek.....	29
3.1. Tumorsejt vonalak .....	29
3.2. Állatkísérletek.....	29
3.2.1. Kísérletes tüdőmetasztázisok létrehozása intravénás oltással .....	30
3.2.2. C38 tumorok létrehozása különböző szövetekben .....	30
3.2.3. Kettős érfeltöltés.....	31
3.3. A tumorminták immunfluoreszcens és morfológiai vizsgálatai .....	33
3.3.1. Immunfluoreszcens vizsgálatok .....	33
3.3.2. A metastázisok méretének és az artériás metastázisok százalékának meghatározása .....	35

3.4. Proliferációs vizsgálatok.....	37
3.4.1. A különböző vérellátású metasztázisok tumorsejt proliferációs rátájának meghatározása BrdU inkorporációs módszerrel.....	37
3.4.2. A tumorsejtnövekedés oxigénfüggőségének meghatározása <i>in vitro</i> .....	38
3.4.3. Peri- és intratumorális endotélsejt proliferáció meghatározása.....	39
3.5. Elektronmikroszkópia.....	41
3.6. 3D rekonstrukció .....	41
3.7. Különböző lokalizációjú C38 tumorok kötőszövetes elemeinek morфомetriai analízise .....	41
3.8. QRT-PCR analízis .....	42
3.9. Statisztikai analízis .....	42
4. Eredmények .....	43
4.1. A kísérletes tüdőmetasztázisok ereződése.....	43
4.1.1. A tüdő alveoláris szerkezetének és a metasztázisok beereződésének kapcsolata a tumor perifériáján. ....	43
4.1.2. Az inkorporált erek és a tumorsejtek kölcsönhatása a metasztázisok belsejében. ....	48
4.2. Peri- és intratumorális endotélsejt proliferáció.....	53
4.3. A kötőszövet eloszlása az invazív növekedési mintázatot mutató tumorvonalak tüdőmetasztázisaiban.....	54
4.4. A C38 kolon adenokarcinóma kötőszövetes oszlopainak vizsgálata, valamint az inkorporáció összehasonlítása tüdő- és szubkután szövet esetében .....	56
4.5. A tüdőmetasztázisok vérellátásának eredete .....	64
5. Megbeszélés .....	70
5.1. A kísérletes tüdőmetasztázisok vaszkularizációs folyamata .....	70
5.2. Az inkorporáció mechanizmusa .....	71



5.3. C38 tüdőmetasztázisokban a vérellátást biztosító kötőszövetes oszlopok kialakulása .....	75
5.4. A gazdaszövet szerepe a tumorok beereződésében .....	76
5.5. A tüdőmetasztázisok arterializációja .....	77
5.6. A tüdőmetasztázisok klinikai kezelésének jelentősége .....	79
6. Következtetések, új megállapítások .....	81
7. Összefoglalás .....	82
8. Summary.....	83
9. Irodalomjegyzék .....	84
11. Saját publikációk jegyzéke .....	96
11.1. Az értekezés témájában megjelent publikációk.....	96
11.2. Egyéb közlemények.....	97

## **Rövidítésjegyzék**

ABC: avidin-biotin komplex  
ANG: angiopoietin  
bFGF: bázikus fibroblaszt növekedési faktor  
BrdU: bróm-dezoxi-uridin  
cDNS: komplementer dezoxiribonukleinsav  
CT: komputertomográfia  
CTGF: kötőszöveti növekedési faktor  
DAB: diaminobenzidin  
DNS: dezoxiribonukleinsav  
ECM: extracelluláris mátrix  
EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav  
EGFR: epidermális növekedési faktor receptor  
EPO: erythropoietin  
EPOR: erythropoietin receptor  
FBS: fetális szarvasmarha szérum  
FGF: fibroblaszt növekedési faktor  
GAPDH: gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz  
GIST: gasztrointesztinális stróma tumor  
HCl: sósav  
HIF-1: hipoxia indukáló faktor-1  
IFN: interferon  
IGF-2: inzulinszerű növekedési faktor-2  
IL: interleukin  
i.p.: intraperitoneális  
KOH: kálium-hidroxid  
NOS2: nitrogén oxid szintáz 2  
OsO<sub>4</sub>: ozmium tetroxid  
PBS: foszfát pufferelt sóoldat

PDGF: vérlemezke eredetű növekedési faktor

PDGFR: vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor

PFA: paraformaldehid

QRT-PCR: kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció

RNS: ribonukleinsav

SCID: súlyos kombinált immundeficiencia

$\alpha$ SMA:  $\alpha$ -simaizom aktin

TIE-1, 2: tirozin-kináz immunglobulin- és EGF-doménekkal 1, 2

TGF- $\beta$ : transzformáló növekedési faktor  $\beta$

TSP: trombospondin

VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

VEGFR: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor

## 1. Bevezetés

### 1.1. Vaszkulogenezis, angiogenezis

A felnőtt szervezet érrendszerét különböző funkciójú és méretű erek (artériák és vénák) alkotják. Az ereket belülről endotélsejtek borítják, ezeket pedig simaizom sejtek veszik körül. A nagy artériák fokozatosan ágaznak egyre kisebb erekké, prekapilláris arteriolákká, végül pedig kapillárisokká. A hajszálereket csupán endotélsejtek és bazális membrán alkotják, melybe periciták vannak beágyazva. A kapillárisok végül posztkapilláris venulákba vezetnek, melyek fokozatosan egyre nagyobb vénás rendszerekbe torkollanak<sup>1</sup>.

A szervezetben új erek képződése két különböző módon lehetséges: a vaszkulogenezis és az angiogenezis folyamataival<sup>2</sup>. A vaszkulogenezis érképződési forma az embrionális fejlődésben játszik fontos szerepet. Az érfejlődés legkorábbi szakaszában az eret későbbiekben bélelő endotélsejt prekursorok (angioblasztok) összeolvadásával történik egy kezdetleges érhálózat formálása<sup>3,4</sup>. Ez az érhálózat csupán endotélsejtekből áll, melyek homogén méretű, egymással összefüggő ereket alkotnak, ezzel kialakítva a primer kapilláris plexust. Az embriogenezis egy későbbi szakaszában ez az érhálózat egy másik folyamat, az úgynevezett angiogenezis során átalakul<sup>5</sup> és egy még érettebb, a már a különböző szövetekre, szervekre jellemző vaszkuláris mintázat alakul ki<sup>1</sup>.

### 1.2. A tumor indukált angiogenezis

A tumor indukált angiogenezis során a tumor a gazdaszervezet endotélsejtjeit és egyéb strómális sejtjeit aktiválja és ezzel új erek képződését indukálja. A folyamatot a tumorban termelődő növekedési faktorok segítik. Léteznek pro-angiogén faktorok, melyek az angiogenezist serkentik, és léteznek anti-angiogén faktorok, melyek gátolják a folyamatot. A legfontosabb pro-angiogén növekedési és differenciációs faktorok a vaszkuláris endoteliális faktor (VEGF), a bázikus fibroblaszt növekedési faktor (FGF), az angiopoetin 1 és 2 (ANG-1, -2), a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF) és a transzformáló növekedési faktor-béta (TGF-béta). Ezek a faktorok számos, az angiogenezist szabályozó jelátviteli utat aktiválnak a célsejtjeiken. A legjelentősebb

anti-angiogén hatású faktorok a trombospondin-1,-2 (TSP-1,-2), az interleukin-1 (IL-1) és az interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )<sup>6</sup>.

A VEGF (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor) az érfejlődés legfőbb mediátora. Heparinkötő, endotélsejt specifikus mitogén, mely indukálja az endotélsejtek proliferációját és migrációját<sup>7</sup>. Felfedezésekor vaszkuláris permeabilitási faktor VPF néven vált ismertté, mivel a tumor környezetében levő venulák permeabilitását növelte, ami angiogén fibrin/fibronectin mátrix kialakulásához vezetett<sup>8</sup>. Szerepet játszik a kardiovaszkuláris rendszer kialakításában és a normál érrendszer fiziológiájában. A VEGF-et sokféle tumorsejt típus termeli, és a vaszkularizáció elősegítésével jelentős szerepet játszik a tumor progressziójában<sup>9,10</sup>. A VEGF a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF) szupergén család tagja. Több splice variánsa létezik, amelyek eltérő receptorokon keresztül többféle sejt aktiválásában vesznek részt. A VEGF-A két receptorán keresztül (VEGFR-1, VEGFR-2) szabályozza az angiogenezist és az érpermeabilitást. Mindkettő egy tirozin-kináz receptor (RTK), szerkezetükben hasonlóak, a szekvenciájuk 43.2%-os homológiát mutat. Az extracelluláris ligandkötő doménjükben megtalálható a hét Ig-like motívum, ezen felül egy-egy transzmembrán-, juxtramembrán- és TK-doménokból, valamint a jelentősen különböző karboxyl terminusból állnak. A ligandkötés után homo- vagy heterodimerizálódnak, és így aktiválódik a TK-doménjük. Érdekesség, hogy a VEGFR-1 tirozin kináz aktivitása csekély, ellentétben a VEGFR-2-vel, ezért az előbbi heterodimereket képez a jelátvitel során<sup>11-13</sup>. Aktiválódásuk szerepet játszik a sejtproliferációban, a sejtmozgásban és a sejtek viabilitásában is. A VEGF-C és a VEGF-D, valamint receptoruk a VEGFR-3, a lymphangiogenezis szabályozásáért felelősek<sup>14</sup>. A VEGF expresszióját és szekrécióját elsősorban a sejtek részleges oxigénhiánya, a hipoxia idézi elő<sup>15</sup>. A hipoxiára adott sejtválaszok legfontosabb szabályozója a hipoxia indukáló faktor-1 (HIF-1), amely transzkripciós faktorként számos molekula szintézisét (EPO, EPOR, VEGF, VEGFR, EGFR, NOS2, IGF-2, glükóz metabolizmus génjei, stb.) befolyásolja<sup>16</sup>. A HIF-1 két alegységből áll ( $\alpha$  és  $\beta$ ), mindkettőnek van DNS-kötő doménje, transzkripciós aktivitásukat heterodimer formában fejtik ki. A béta alegység folyamatosan termelődik, az alfa viszont oxigén hatására ubiquitinálódik és lebomlik<sup>17</sup>. Tartós hipoxia hatására az alfa alegység is stabilizálódik, dimerizálódva a béta

alegységgel bejutnak a magba, ahol megindul a HIF-függő gének (köztük a VEGF-ek) átírása<sup>18</sup>.

A vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF) családba négyféle, diszulfidkötésekkel kapcsolódó homodimer (PDGF-A-D), valamint egy heterodimer (PDGF-AB) tartozik. A PDGF izoformák az  $\alpha$ - és a  $\beta$ -tirozin-kináz receptoraikon (PDGFR $\alpha$  és PDGFR $\beta$ ) keresztül hatnak. Fontos szerepet játszanak bizonyos sejttípusok (pl. mezenchimális őssejtek) növekedésének és túlélésének szabályozásában az embrionális fejlődés során (arcsontozat kialakulása, hajhagymák fejlődése, asztrociták képződése), valamint a felnőtt szervezetben a sebgyógyulás során. Szolid tumorok strómájának miofibroblasztjai, fibroblasztjai és az erek pericitái expresszálják a PDGF-receptorokat, és az ilyen sejtek PDGF-stimulálása elősegíti tumorok kialakulását (dermatofibroszarkóma, GIST, oligodendroglioma). A PDGF receptor jelátvitel gátlása bizonyítottan hasznos bizonyos ritka tumoros betegségek kezelésében (chordoma, meningeóma, oszteoszarkóma)<sup>19</sup>.

Az angiopoietinek (ANG) fontos szerepet játszanak az erek kialakulásában, átalakulásában és érésében<sup>20</sup>. Az ANG-1 és ANG-2 az endotélsejtek túléléseért, valamint az embrionális és posztnatális vaszkularizációért felelősek<sup>21</sup>. Az angiopoietinek receptorai a TK-aktivitású TIE-1 és TIE-2. A TIE-1-hez azonban nem kötnek közvetlenül az angiopoietinek, így egyfajta orfan receptorként működik. Az ANG-1/ANG-2 jelátviteli utak a TIE-2 receptoron keresztül aktiválódnak<sup>20</sup>, azonban hatásuk ellentétes és önmagukban is ellentmondásos. Az ANG-1 alapvetően proangiogén faktor<sup>22,23</sup>, azonban megnövekedett expressziója gátolhatja az angiogenezist<sup>21,24</sup>. Az ANG-2 az ANG-1 antagonistája, a TIE-2-n keresztül kifejtett anti-angiogén hatása abból ered, hogy a kötése a receptorhoz más mechanizmuson keresztül történik, mint az ANG-1-é. Ebben a receptor-ligand kötődésben szerepe van a TIE-1 receptor ektodoménjének is, befolyásolva az agonista vagy antagonisták hatásának kifejeződését. Amíg van működőképes TIE-1 receptor, addig az ANG-2 nem képes kapcsolódni a TIE-2 receptorhoz, így gátolt az anti-angiogén szignál<sup>25</sup>.

A TGF- $\beta$  egy multifunkcionális citokin, mely kulcsfontosságú szerepet játszik a sejtproliferációban, differenciációban, a túlélés és az apoptózis folyamataiban<sup>26</sup>. Kettős szerepe van a karcinogenezisben: a tumorprogresszió korai stádiumában tumorszuppresszorként, később tumor promóterként működik<sup>27</sup>. A TGF- $\beta$ 1,2

stimulálhatja a VEGF termelését, ezen keresztül az endotélsejteket és az angiogenezist<sup>26,27</sup>. A TGF- $\beta$ -aktivitás gátlás blokkolja a sejtmigrációt, a metasztázis képzést emlődaganatban, melanóma és prosztaták modellben<sup>26</sup>. Ugyanakkor leírták, hogy a fent említett ellentmondásos hatása többféle mechanizmuson keresztül szabályozódik. Az alacsony TGF- $\beta$ 1 koncentráció fokozza, míg a magas gátolja az endotélsejtek proliferációját, az erek érését, túlélését. Ezt a hatást főleg a VEGF expressziójának szabályozása révén éri el, de ezen felül számos más angiogén faktor expresszióját is szabályozza<sup>28,29</sup>. Az ellentétes hatás kialakulásában a TGF- $\beta$  két receptorának, az ALK1 és ALK5 mennyiségének az endotélsejtek felszínén, valamint az aktivitásának is fontos szerepe van. Az ALK5-Smad2/3 útvonal aktiválása serkenti több ECM protein (pl. fibronectin) termelését, ezáltal az erek érését. Ugyanakkor az ALK1-Smad1/5/8 útvonal angiosztatikus hatást eredményez<sup>28,30</sup>.

A bázikus fibroblaszt növekedési faktor (bFGF) serkenti az endotélsejt proliferációt, migrációt ezzel támogatva új erek kialakulását<sup>31</sup>. Emlősökben 18 FGF-et, és 4 TK aktivitású receptort (FGFR1-4) írtak le, amelyek közül a bázikus-FGF (vagy FGF2) a leginkább kutatott angiogén citokin<sup>32</sup>. Számos molekula (MMP-1, HGF, Bcl2, survivin, MMP-9 and MMP-13) expresszióját serkenti, amelyek anti-apoptotikus hatásúak, és befolyásolják többek között az endotélsejtek proliferációját is<sup>33,34</sup>.

Az endogén anti-angiogén faktorok közül az interferonokat (IFN) azonosították elsőként. Az interferonok, mint citokinek, gátolják az endotélsejtek proliferációját és migrációját<sup>35</sup>. Kimutatták, hogy az interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) és az interleukin-1 (IL-1) kombinációja gátolja a bFGF indukálta angiogenezist, csökkentve az FGF receptorok expresszióját. Megállapították azt is, hogy ez a két faktor szinergisztikusan gátolja az endotélsejtek proliferációját<sup>36</sup>. A trombospondin-1 (TSP-1) gátolja a VEGF felszabadulást, ezzel az endotélsejtek migrációját, indukálja az endotélsejtek apoptózisát, és csökkenti a keringő endotélsejt progenitorok számát<sup>37</sup>.

Judah Folkman a hetvenes években közölte forradalmian új elméletét, miszerint a daganatok növekedése új erek képződését igényli, vagyis a tumorok angiogenezis-függők<sup>38,39</sup>. Folkman szerint angiogenezis hiányában a tumorok növekedése limitált, nem képesek 1-2 mm<sup>3</sup>-nél nagyobbra nőni<sup>40</sup>. A daganatok anti-angiogén terápiájának még napjainkban is ez az alapja. A tumor indukált érképződés a legtöbb esetben nem játszik szerepet a tumorigenezis kezdeti szakaszában. Angiogén switch-nek nevezzük azt

a folyamatot, mely során a daganat angiogén fenotípusúvá válik, az érképződést serkentő molekulákat kezd termelni, és képes lesz  $1\text{ mm}^3$ -nél nagyobb méret elérésére is (a daganatok az 1-2 mm-es átmérő eléréséig avaszkulárisak maradhatnak). Ez a fenotípus váltás az adott daganattól függően már 3 hónap alatt végbemehet, de megjelenése gyakran egy évnél hosszabb ideig is tarthat. Amíg az angiogén switch meg nem történik, a daganatok mikroszkopikus méretűek, úgynevezett nyugvó fázisban vannak. Ezekben a tumorokban a sejtek magas proliferációs és apoptotikus potenciállal bírnak. Az önálló érhálózat kifejlődésével a továbbra is magas proliferációs ráta mellett az apoptózis csökken, tehát a tumor mérete növekedni kezd<sup>39</sup>.

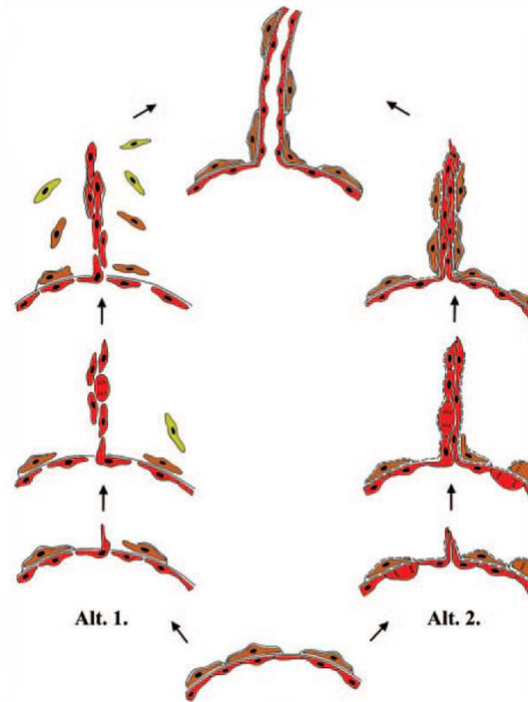
### 1.3. A tumorok ereződésének fő útjai

A malignus tumorok vérellátásának hatféle mechanizmusa ismert: érbimbózás (sprouting), intussuszceptív érképződés, érinkorporáció, glomeruloid érképződés, vaszkuláris mimikri és posztnatális vaszkulogenezis. A daganatok érhálózatának kialakulása igen összetett folyamat, előfordul, hogy a felsorolt mechanizmusok közül egyszerre többet is felhasznál a növekvő daganat a vérellátás biztosítására<sup>4</sup>.

#### 1.3.1. Sprouting angiogenezis

A sprouting, vagy másnéven bimbózó angiogenezis máig a legszélesebb körben ismert vaszkularizációs forma. A folyamat során a tumorok új kapilláris oldalágakat, bimbókat indukálnak a meglévő szöveti kapillárisok stimulálásával (**1. ábra**). A sprouting jelenségét először az 1970-es években írta le Ausprunk és Folkman<sup>41</sup>. Modelljük szerint a folyamat első lépéseként az angiogén stimulus hatására a posztkapilláris venulák kitágulnak, az endotélsejtek közötti sejtkapcsoló struktúrák fellazulnak, majd a bazális membrán lokális degradációját követően az endotélsejtek a környező szövetbe migrálnak. Az endotélsejtek a kötőszövetben történő vándorlásuk során bazális membránjukat és polaritásukat is elvesztik, egymás mögött elhelyezkedve hoznak létre éretlen kapilláris kezdeményeket. Ezt követően kezdődik meg az új lumen kialakítása. A lumenformálódás során az endotélsejtek külső felszínén új bazális membrán keletkezik, és az új kapilláris külső felszínére periciták vándorolnak<sup>42,43</sup>.





**1. ábra: Bimbózó („sprouting”) angiogenezis két alternatívájának sematikus ábrája.** A két alternatíva közötti fontos különbség, hogy az elsőben (Alt.1) a polaritásukat elvesztett endotélsejtek vándorlása és a lumen kialakítása után kezdődik a bazális membrán szintézise, valamint a periciták toborzása, míg a második esetben (Alt. 2) a kötőszövetbe vándorló endotélsejtek polaritásukat megtartják, a bazális membrán depozíciója az új ér kialakulásával folyamatosan történik. Az anyaér proliferáló pericitái az újonnan képződött bazális membrán mentén migrálnak. Endotélsejt: piros, pericita: barna, fibroblaszt: zöld. (Forrás: Döme B, Hendrix MJ, Paku S, Tóvári J, Tímár J. (2007) Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol*, 170: 1-15.)

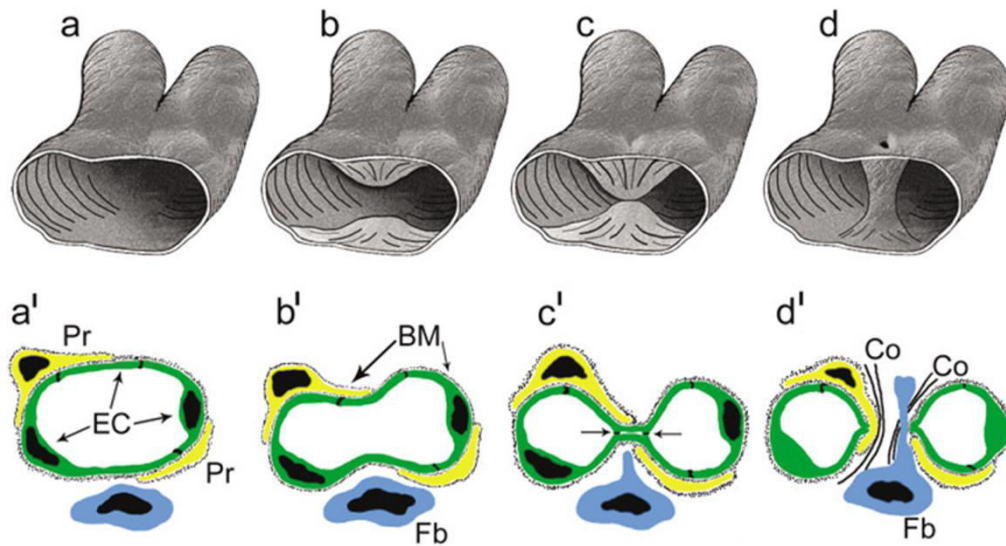
Az 1990-es évek elején egy másik sprouting modell került leírásra<sup>43</sup>, melynek első lépéseként a venulák bazális membránjának elektrondenzitása megváltozik, proteázok hatására gél-sol átalakuláson megy keresztül, így elektronmikroszkóppal nem detektálható. Immunhisztokémiai módszerekkel azonban kimutatható a bazális membrán három komponense: laminin, kollagén IV, fibronektin. A bazális membrán lokálisan degradálódik az endotélsejt nyúlványok környékén, és ezzel egyidejűleg megkezdődik az endotélsejt migráció a környező kötőszövetbe. Vándorlásuk parallel módon, bazális-luminális polaritásukat megtartva történik, mindeközben résszerű lument formálnak, megtartva összeköttetésüket a kiindulási anya-érrel. A modell újdonsága az elsőként említett modellel szemben, hogy itt a bazális membrán depozíciója az új ér képződésével folyamatosan történik, így csupán csak a képződő ér

csúcán elhelyezkedő endotélsejtek érintkeznek a kötőszövettel. Az osztódó periciták az anyaeér külső felszínéről migrálnak a még éretlen érszakaszok felszínére<sup>4,42</sup>.

### 1.3.2. Intussuszeptív angiogenezis

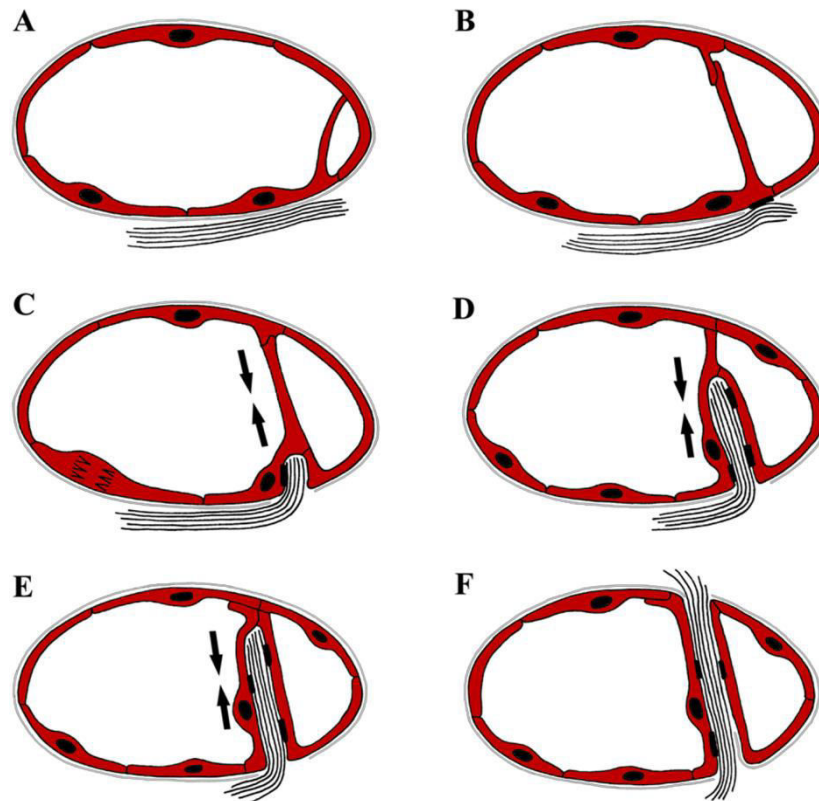
A sprouting angiogenezis mellett a másik alapvető érképződési forma az ún. intussuszeptív angiogenezis<sup>44</sup>. A bimbózó angiogenezishez hasonlóan ez a folyamat is kötőszövetes környezetet igényel, ami tulajdonképpen az érlumen kettéosztódását jelenti. Kötőszövetes oszlopok jelennek meg az érlumenben, így ez új erek létrehozására nem, csak a kapilláris hálózat komplexitásának fokozására képes. Az intussuszeptív angiogenezisnek is több formáját írták már le<sup>4</sup>.

Az egyik modell alapján az érosztódás úgy történik, hogy a külső felszínen elhelyezkedő fibroblasztok, vagy periciták hatására az érfal két ellentétes oldalán található endotélsejtek benyomódnak az érlumenbe, így a szemközti endotélsejtek érintkezésbe kerülnek egymással. Az interendoteliális kapcsolatok átrendeződésével megtörténik a kétrétegű érfal (kétrétegű endotél és kétrétegű bazális membrán) perforációja. Ezt követően a perforált részbe fibroblasztok vándorolnak<sup>42</sup>, melyek kollagén tartalmú extracelluláris mátrixot szintetizálnak, és ez kötőszövetes oszlopok kialakulásához vezet. A folyamat végeredményeként végül két különálló lumen képződik<sup>4</sup> (**2. ábra**).



**2. ábra: Intussuszeptív angiogenezis 1** Az intussuszeptív angiogenezisre jellemző kis kötőszövetes hidak (pillarak) kialakulásának három-dimenziós (a-d) és kétdimenziós (a'-d') ábrázolása. A folyamat a szemközi érfalak betüremkedésével (b, b') és a sejtközötti kapcsolatok átrendeződésével indul. Az érfal centrálisan perforálódik (c, c'), fibroblasztok vándorolnak be, az erek belsejében kötőszövetes hidak alakulnak, melyeket a fibroblasztok által termelt kollagén tartalmú mátrix stabilizál (d, d'). Pr: pericita, EC: endotélsejt, BM: bazális membrán, Fb: fibroblaszt, Co: kollagén. (Forrás: Burri PH, Tarek MR. (1990) A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat Rec*, 228: 35-45.)

Egy másik elmélet is ismert a kötőszövetes oszlopok kialakulására, mely szerint az endotélsejt nyúlványt bocsát a kapilláris lumenébe, majd az ér szemközi falát elérve kapcsolatot létesít az ott lévő másik endotélsejttel. Ezután az endotélsejtek a bazális membránt lokálisan lebontják, majd kötőszöveti kollagén köteghez tapadva áthúzzák azt az ér lumenén. Az ér belsejében keletkezett kötőszövetes oszlop így eleinte csupán egy kollagénkötegből és az azt kétoldról körülvevő endotélsejtekből áll. A későbbiekben kötőszövetet szintetizáló sejtek vándorolnak be a kollagén kötegbe, ami az oszlop méretének további növekedését eredményezi<sup>45</sup> (3. ábra). A folyamat során az endotélsejtek polaritása nem változik meg<sup>44</sup>, ezért inverz bimbózásnak is tekinthető.



**3. ábra: Intusszuszeptív angiogenezis 2. Inverz bimbózás.** (A) Intraluminális endotélhid kialakulása. (B) Az endotélhidak áthelyeződhetnek, illetve több endotélsejt is részt vehet a hidak kialakításában. A hidat alkotó endotélsejt bazális membránja lokálisan degradálódik, és a sejt egy kollagéneköteghez kapcsolódik. (C, D) Az endotélsejtek által kifejtett húzóerő a lumen túoldalára juttatja a kollagéneköteget. Nyilak jelzik az erő irányát. (E). Az interendoteliális kapcsolatokat átrendeződnek, de az endotélsejtek bazális-luminális polarizációja megmarad. (F) A kollagéneköteg átkerül az ér túoldalán lévő kötőszövetbe. A kialakult oszlop egyetlen kollagénekötegből és az azt körülvevő endotélsejtekből áll. Az oszlop további növekedését a fibroblasztok és periciták bevándorlása, valamint az extracelluláris mátrix szintetizálása biztosítja. Endotélsejt: piros, bazális membrán: szürke, kollagéneköteg: fekete vonalak. (Forrás: Paku S, Dezso K, Bugyik E, Tóvári J, Tímár J, Nagy P, Laszlo V, Klepetko W, Döme B. (2011) A new mechanism for pillar formation during tumor induced intussusceptive angiogenesis: inverse sprouting. *Am J Pathol*, 179:1573-85.)

A fő citokinek, melyek részt vesznek az intusszuszeptív angiogenezisben a PDGF, az angiopoetinek, az ephrinek és a TGF- $\beta$ <sup>4</sup>. A primer tumorok kialakulásának helyén (emlő, bél, bőr) általában nagy mennyiségű kötőszövet található, így az előbb

említett angiogenezis formák dominálnak, mivel ezek kötőszövetes mátrixot igényelnek<sup>45,46</sup>. A metasztázisképzés fő szerveiben (máj, agy és tüdő) azonban elsődlegesen nincs nagy mennyiségű kötőszövet, így az áttétek alternatív vaszkularizációs mechanizmusokkal érik el vérellátásukat<sup>47,48</sup>.

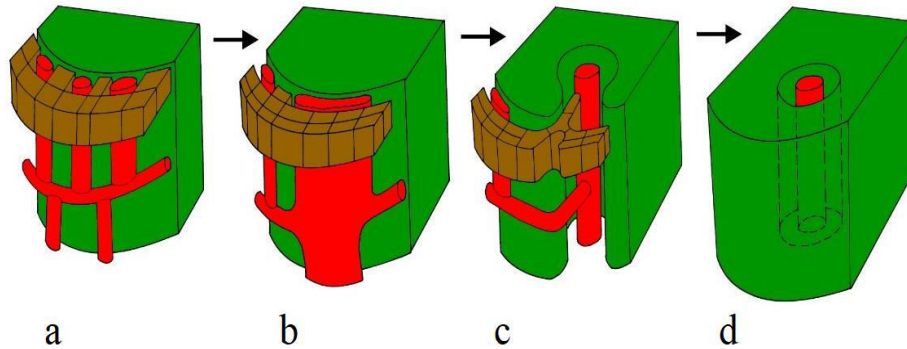
## 1.4. A tumorok ereződésének alternatív formái

### 1.4.1. Érinkorporáció

Az első alternatív tumor vaszkularizációs mechanizmust először Thompson fogalmazta meg 1987-ben, eszerint az érinkorporáció során a daganatnövekedés hatására a tumorok bekebelezik a környezetükben található ereket<sup>49</sup>. A folyamat során a környező szövet meglévő, illetve az újonnan képződött erei is inkorporációra kerülnek. Számos más esetben is igazolták az érinkorporáció jelentőségét. Döme és munkatársai humán és kísérletes melanómák esetében mutatták ki, hogy a daganatok felszínével párhuzamos lefutású, bimbózó angiogenezissel keletkező ereket és a bőr eredeti érhálózatát a daganat növekedése közben folyamatosan inkorporálja<sup>50</sup>. A kapilláris hálózat bekebelezése után, a tumor növekedésével az érdenzitás a tumor belseje felé folyamatosan csökken, és ez a csökkenő tendencia megfigyelhető az endotélsejt proliferáció esetében is. Tehát az érbimbózás a tumor belsejében megszűnik, ami valószínűleg annak az eredménye, hogy a tumor belsejében nem áll rendelkezésre megfelelő kötőszövetes környezet új kapillárisok képződéséhez. Azonban ezen a területen az endotélsejtek tovább proliferálnak, ami az inkorporált erek dilatációját eredményezi<sup>50</sup>.

A metasztázisképzés fő célszerveiben (máj, agy, tüdő) növekvő metasztázisok környezetében általában nincs neovaszkularizáció, feltehetően a már említett megfelelő mennyiségű kötőszövet hiánya, illetve a nagy érdenzitás miatt. Pezzella és mtsai. az 1990-es évek közepén kimutatták primer<sup>51</sup> és metasztatikus<sup>52</sup> tüdőtumorkok esetében, hogy a növekvő tumormassza intakt alveólus falak inkorporálására képes. Később Paku és mtsai. is leírták, hogy a pushing típusú kolorektális májmetasztázisok vaszkularizációja esetében a fuzionált szinuszoidok inkorporációja történik meg<sup>47</sup> (**4. ábra**). Holash és mtsai. szerint kísérletes glióma modellben az érinkorporáció csak a

tumornövekedés kezdetén figyelhető meg, ezt szekunder avaszkuláris állapot, majd robusztus angiogenezis követi a tumor perifériáján<sup>53</sup>.

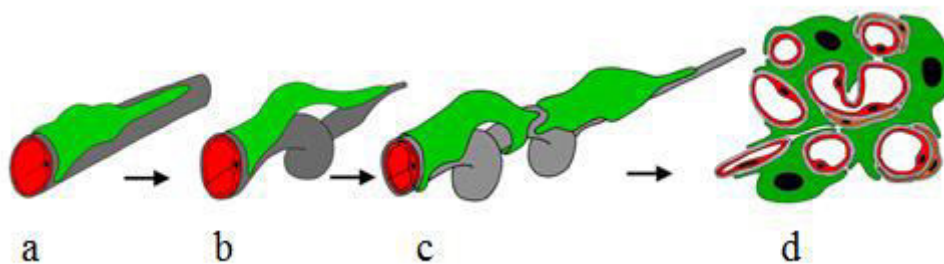


**4. ábra A pushing típusú májmetasztázisok érrendszerének kialakulása.** Az erek jobb láthatósága érdekében a hepatociták (barna) csak a képek felső részén láthatóak. A tumor fejlődésének korai szakaszában (a) még normál májszövet szerkezet figyelhető meg peritumorálisan. Ahogy a tumor (zöld) növekedése által kifejtett nyomás nő, úgy a hepatociták kiszorulnak ebből a régióból (b, c) és megtörténik a szinuszoidok fúziója (piros). A fuzionált erek az újonnan szintetizált kötőszövettel együtt inkorporálódnak a tumorszövetbe (c). Az ér hossz tengelye irányában továbbra is kapcsolódik a máj érrendszeréhez (d). (Forrás: Döme B, Hendrix MJ, Paku S, Tóvári J, Tímár J. (2007) Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol*, 170: 1-15)

#### 1.4.2. Glomeruloid testek képződése

A glomeruloid testek a vese glomerulusaihoz hasonló érgomolyagokból felépült jellegzetes érstruktúrák több helyütt megtalálhatóak, azonban leginkább a központi idegrendszerben figyelhetőek meg<sup>54</sup>. Kialakulásuk pontos mechanizmusa nem ismert<sup>44</sup>, de legérőszletesebben Dvorak és mtsai. vizsgálták agyszövetben, a tumormentes környezetben VEGF hatására kialakuló glomeruloid testeket. A folyamat elején tág anyarek alakulnak ki az agyszövetben, melyek falában endotélsejt- és pericitaproliferáció indul meg. A proliferáló sejtek az anyaeér lumenébe nyomulva számos lument alakítanak ki. Később ezek a struktúrák apoptózis útján egymástól elkülönülő, az eredeti erekkel összeköttetésben álló erekké differenciálódnak, így

kialakítva a glomeruloid testeket<sup>55</sup>. Egy másik modell szerint agyi mikrometasztázisokban a glomeruloid testek kialakulása közvetlenül a tumorsejt extravazációját követően kezdődik. A sejtek kiterülnek a kapillárisok bazális membránjának külső felszínén, aminek következtében a tumorsejtek kapillárisokra kifejtett húzóereje egyszerű hurkokat hoz létre a kapillárisokon. A tumor növekedése során a vese glomerulusaihoz hasonló bonyolult érhálózattal rendelkező elvékonyodott afferens és efferens érrel rendelkező tumorfészkek képződnek<sup>48</sup> (5. ábra).



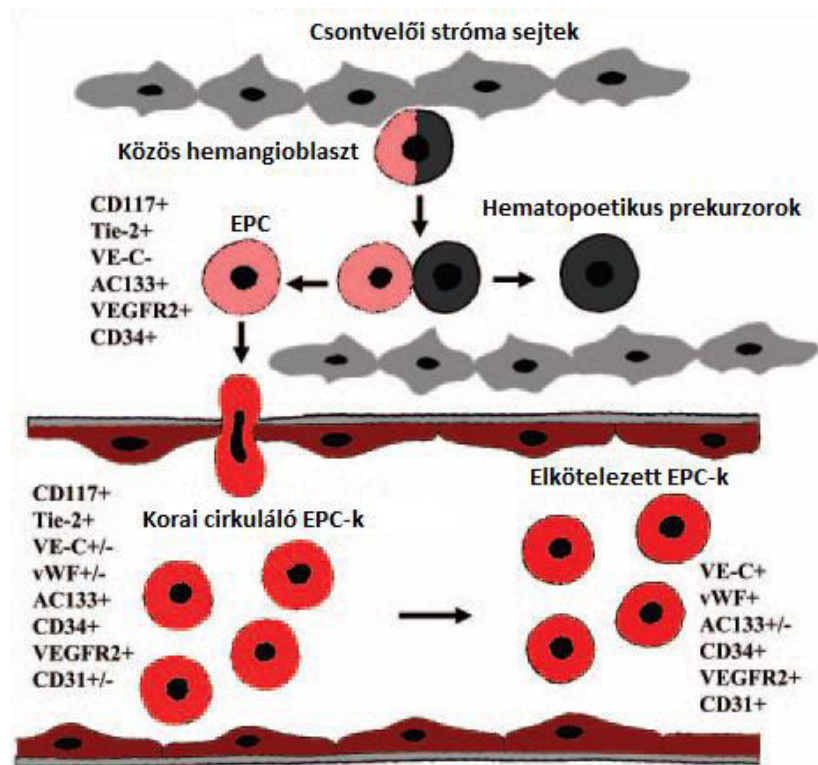
**5. ábra: Glomeruloid angiogenesis.** Extravazációt követően a tumorsejtek (zöld) szorosan a kapilláris bazális membránjának (szürke) külső felszínéhez tapadnak (a). A tumorsejt húzóerejének következményeként hurok keletkezik a kapillárison (b). A tumorsejtek szaporodása következtében további tumorsejtek tapadnak a kapilláris felszínéhez, ami további hurkok kialakulását eredményezi (c). Az utolsó ábra egy tumorsejt fészkek keresztmetszetét mutatja, melyben kaotikus elrendeződésű kapillárisok alkotják a glomeruloid testet (d). Endotélsejt: piros, Pericita: barna. (Forrás: Döme B, Hendrix MJ, Paku S, Tóvári J, Tímár J. (2007) Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol*, 170:1-15)

### 1.4.3. Posztnatális vaszkulogenezis

Egészen a közelmúltig úgy tartották, hogy a vaszkulogenezis csupán a korai embriogenezis során figyelhető meg, és feltehetően nem fordul elő felnőtt szervezetben, míg az angiogenezis mind a fejlődő embrióban, mind a posztnatális élet során jelen van<sup>56</sup>. A posztnatális vaszkulogenezis kulcselemei a csontvelőből származó endotél progenitor sejtek (EPC-k), melyek hozzájárulnak az ischaemia és a szövetkárosodás utáni neovaszkularizáció fokozásához<sup>57</sup>. Emellett bizonyos tumorok esetében hozzájárul az angiogén switch-hez (a tumornövekedés azon stádiuma, ahonnan már szükséges a



saját keringés kialakítása), ezáltal a daganat progressziójához<sup>58</sup>. Elsőként 1997-ben Asahara és munkatársai perifériás vérből izoláltak VEGFR2+ és CD34+ endoteliális prekursorokat. Az EPC-k, az endotélsejtek és a hematopoetikus őssejtek számos egyéb markert is expresszálnak. Az EPC-eket a különböző érési stádiumban lévő állapotuk alapján osztályozhatjuk: a primitív hemangioblasztoktól a teljesen differenciált endotélsejtekig<sup>59</sup> (6. ábra). A csontvelői progenitor sejteket a tumor által termelt citokinek mobilizálják, melyek a keringéssel eljutnak a primer tumor és a metasztázis helyeire, ahol elősegítik az új erek kialakulását<sup>42</sup>.

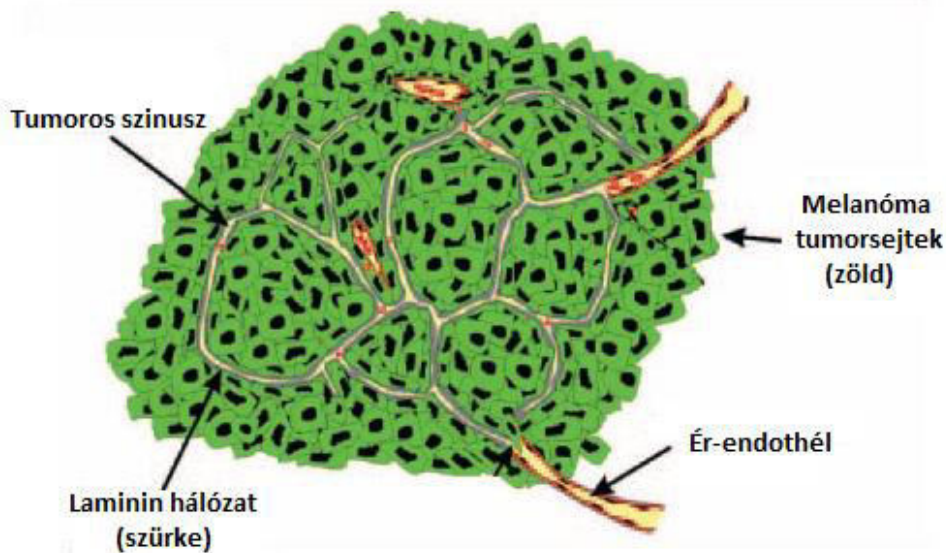


**6. ábra: Endoteliális progenitor sejtek.** Az EPC-eket osztályozhatjuk a korai hemangioblasztoktól a teljesen differenciált endotélsejtekig: a korai EPC-k (a csontvelőben lévő, vagy a közvetlenül keringésbe kerülő sejtek) AC133, CD34, VEGFR-2 pozitívak, míg a keringő EPC-k CD34 és VEGFR-2 pozitívak, AC133 negatívak, az érett sejtek pedig CD31, von Willebrand Factor és VE-cadherin pozitívak. (Forrás: Döme B, Hendrix MJ, Paku S, Tóvári J, Tímár J. (2007) Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol*, 170:1-15)



#### 1.4.4. Vaszkuláris mimikri

A vaszkuláris mimikri jelenségét először Maniotis és mtsai. írták le 1999-ben. Azt találták, hogy agresszív primer és metasztatikus melanómákban tumorsejtek által határolt összefüggő csatornák alakulnak, melyek kapcsolatban állnak a környező szövet érhálózatával és részt vesznek a tumorszövet oxigén- és tápanyagellátásban<sup>60</sup>. A vaszkuláris mimikri során a tumorsejtek fenotípusa endotél karakterű lesz, és ők maguk alkotják az „érfalat” (7. ábra), amit az endoteliális gének overexpressziója okoz. A vaszkuláris mimikri a melanóma mellett számos más daganatban is megfigyelhető, mint például a hámeredetű daganatok, prosztatata-, emlő-, petefészek-, chorio-, tüdőrák, illetve szarkómák esetében<sup>4</sup>.



**7. ábra: Vaszkuláris mimikri.** A tumorban (zöld) olyan csatornák (tumoros szinuszok) keletkeznek, melyeket csak tumorsejtek, vagy tumorsejtek és endotélsejtek határolnak. A tumoros szinuszok kapcsolatban állnak a környező szövet kapillárisaival. (Forrás: Döme B, Hendrix MJ, Paku S, Tóvári J, Tímár J. (2007) Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. Am J Pathol, 170:1-15)

### **1.5. A gazdaszövet hatása a tumorok szerkezetére és beereződés mintázatára**

Már régebben felmerült, hogy a tumorok vaszkuláris mintázatát a tumorok szövettani típusa határozza meg<sup>61</sup>. Konerding és munkatársai<sup>62</sup> megvizsgálták a szubkután tumorok vaszkuláris szerkezetét négy különböző szöveti eredetű sejtvonal alkalmazásával. Azt találták, hogy az érrendszer egyedi és az adott tumorra jellemző, továbbá kiderült, hogy a vaszkuláris struktúra nem függ a tumor méretétől vagy növekedési sebességétől, csak a tumor típusától. Ezzel szemben Solesvik és munkatársai<sup>63</sup> öt betegből származó humán malignus melanóma xenograftokat vizsgálva eltérő vaszkuláris struktúrákat találtak (ér hossz, felület és térfogat) ugyanazon szövettani típus esetében. A lassabban növé melanómákban, összehasonlítva a gyorsabban növé tumorokkal, kisebb érdenzitást találtak, ami a megfigyelt nagyobb nekrotikus területeknek volt köszönhető.

A tumor típusán kívül, a gazdaszövet extracelluláris mátrixa (kollagén és a bazális membrán szerkezete) is hatással van a tumorok szöveti struktúrájára és ereződésük jellegzetességére. Agymetasztázisokban például kimutatták, hogy az extravazált sejtek kitapadásának, migrációjának, és növekedésének elsődleges helye a kapillárisok bazális membránja<sup>48,64,65</sup>. A magas metasztázáló képességű 3LL-HH egér tüdő adenokarcinóma sejtek képesek szubsztrátként használni a bazális membrán sejtfelőli oldalát növekedésükhöz és terjedésükhöz a perifériás idegrendszer, valamint az izom- és zsírszövet inváziója során<sup>66</sup>. E folyamat során a normál sejteket a tumorsejtek leválasztják saját bazális membránjukról, az előbbieket végül degradálódnak, azonban a bazális membránjuk ép marad.

Májmetasztázisokban kimutatták, hogy a tumor differenciációs foka szintén befolyásolhatja a metasztázisok szövettani szerkezetét<sup>67,68</sup>. A kolorektális adenokarcinómák májmetasztázisaiban három különböző növekedési mintázatot írtak le. A 'replacement' növekedési mintázat (differenciálatlan tumorok) esetében retikulín festés alapján a máj megőrzi eredeti struktúráját. Azonban a dezmoplasztikus és 'pushing' típusú növekedési mintázatoknál (differenciáltabb tumorok) a máj struktúrája torzul. A két utóbbi növekedési mintázat esetében a metasztázisok körül a májparenchima komprimálódik. A dezmoplasztikus növekedés esetében, mely hasonló a

pushing növekedési formához, egy vaskos kötőszövetes tok választja el a májparenchimát a tumorszövettől<sup>67</sup>.

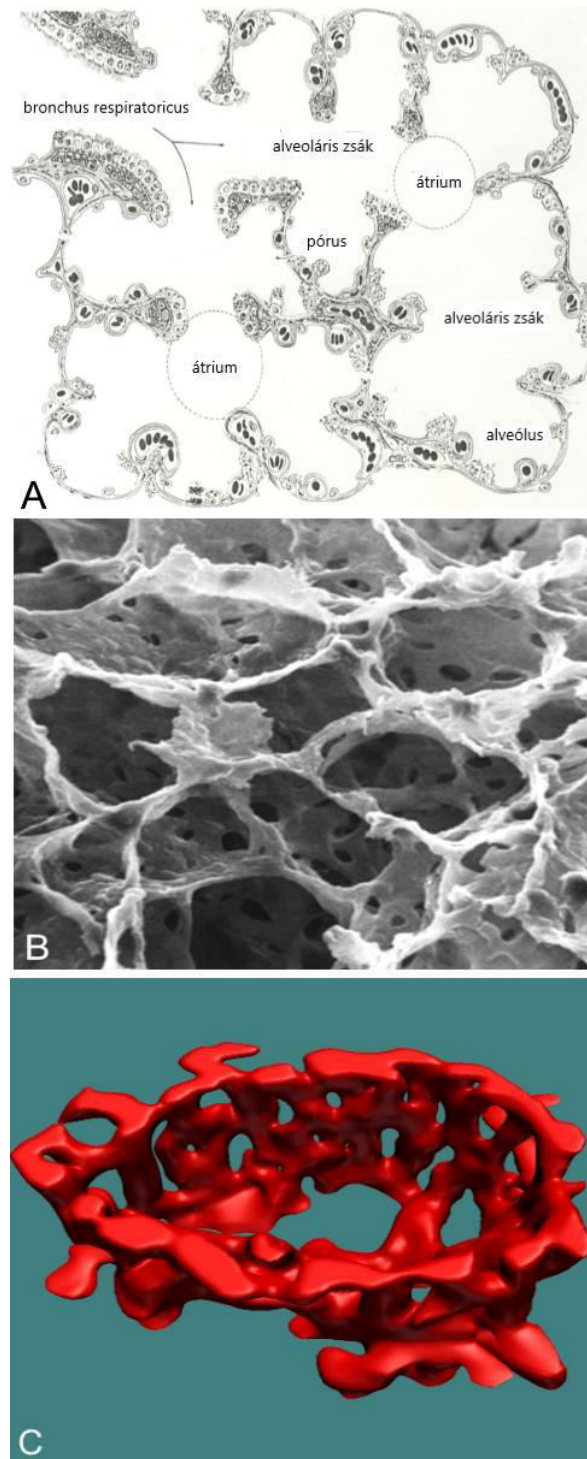
Munkacsoportunk korábban már leírta a vaszkularizáció folyamatát „pushing” típusú kísérletes kolorektális adenokarcinóma modellben (C38) a májban<sup>47</sup>. A metasztázisok növekedése során simaizom aktin ( $\alpha$ SMA) pozitív sejtek jelentek meg a tumor-parenchima határán, és ezzel együtt a hepatociták 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  $\alpha$ SMA-pozitív miofibroblasztok egyaránt bekebelezésre kerültek a növekvő tumor által. Az invaginációk tumorban legmélyebben elhelyezkedő része feltehetően a tumorszövet nyomása következtében levált a környező gazdaszövettől 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 (periszínuszoidális tér) 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 metasztázisban. A vizsgált tumortípus esetében kötőszövet lerakódás nem volt 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.

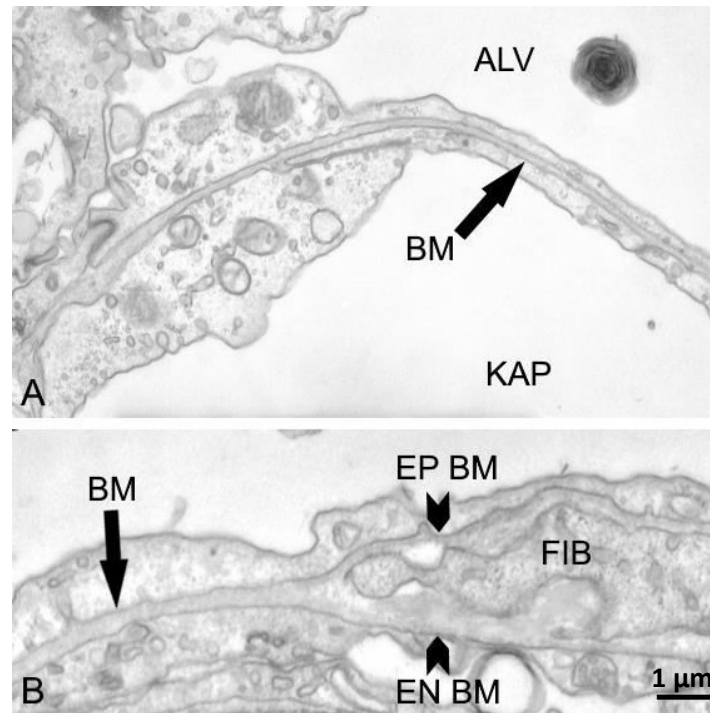
A tumorok kötőszövetes szerkezetét az is meghatározhatja, hogy a tumor környezetében található-e olyan sejtek, melyek képesek extracelluláris mátrix szintézisre, és ha igen a tumor milyen mértékben tudja aktiválni ezeket a sejteket. Ezzel összefüggésben megfigyeltük, hogy kísérletes agyi metasztázisokban nem történik meg kötőszövet lerakódása, mivel az agy parenchimájában nem található fibroblasztok<sup>69</sup>. A fentiek szerint a pushing, illetve dezmoplasztikus növekedési mintázatot mutató metasztázisok nagyobb mértékben aktiválják a fibroblasztokat, mint az invazív növekedést mutató tumorok.

### 1.6. A tüdő anatómiája

Az emberi tüdő páros, lebenyekből álló szerv, a bal tüdőfél három, a jobb tüdőfél négy lebenyből áll. Felületét a mellhártya zsigeri lemeze vonja be. Mediasztinális felszínén tüdőkapunál található a főhörgők, a pulmonális artéria és véna, továbbá a bronchiális artéria és véna. Ugyancsak a tüdőkapun át lépnek ki a tüdő nyirokereji, és itt találjuk a tüdő idegeit is. Az egyes lebenyek kisebb részekre, bronchopulmonális szegmensekre, majd lebenyekékre, végül alveólusokra tagolódnak, melyekben a gázcsere zajlik<sup>70</sup> (**8. ábra A**). Az alveólusok falában pórusok találhatóak (Kohn pórusok), melyeken keresztül az alveólusok kommunikálnak egymással<sup>71</sup> (**8. ábra B, C**). Itt az alveólusokat bélelő tüdőhámsejtek (pneumociták), valamint az ereket borító endotélsejtek bazális membránjai összefeksznek, fúzionálnak (**9. ábra A**). Az alveólus falban, ahol kötőszövet található a két bazális membrán elválik egymástól (**9. ábra B**), ezen kívül a kötőszövet, melyet főként fibroblasztok és kollagén alkotnak, fiziológiásan a tüdőben csak igen kis mennyiségben fordul elő, főként a nagyobb erek és légutak körül<sup>72</sup> (**9. Ábra C**).



**8. ábra: A tüdő alveoláris szerkezete. (A)** Sematikus ábra egy acinus felépítéséről. **(B)** Az alveólusok falában található Kohn pórusok szkennning elektronmikroszkópos képe. **(C)** Alveólusfal kapilláris hálózata. Félvékony metszetek (29 darab) 3D rekonstrukciója. A kosárszerűen elhelyezkedő kapillárisok sűrű hálózatot alkotnak az alveólus falában.



**9. Ábra. Bazális membránok a tüdőben.** (A) Fúzionált (kettős) bazális membrán az endotélsejt és a pneumocita között. (B) Kettévált bazális membrán az alveólus falban, ahol kötőszövet található. Nyílhegyek jelölik az epitél- (EP BM) és az endotél bazális membránját (EN BM). FIB: fibroblaszt; BM: bazális membrán; ALV: alveoláris tér; KAP: kapilláris tér

A tüdő kettős vérellátású szerv: véredényei részben a légzés szolgálatában álló pulmonális artéria és véna, részben pedig a tüdőszövet alkotóelemeinek az anyagcseréjét biztosító bronchiális artéria és véna rendszeréhez tartoznak<sup>73</sup>. A pulmonális rendszer képviseli a tüdő keringésének 99%-át<sup>74</sup>.

A bronchiális artériák a tüdő úgynevezett tápláló (nutritív) erei, melyek az aorta descendensből erednek és egészen a bronchiolus respiratorikusokig a különböző szinteken elhelyezkedő bronchusokat látják el vérrel. A bronchiális artériákból erednek azok az artériák is, amelyek a pulmonális artéria falát, a nyirokcsomók parenchimáját és a pleurát hálózják be. A bronchiális vénák vére részben a tüdővénákba, részben a véna azygosba kerül<sup>73</sup>.

A két artériás rendszer nem különül el teljesen egymástól, mert a bronchiális artéria által szállított vér egy része a pulmonális vénába jut, illetve a humán tüdőben mikrovaszkuláris anasztomózisok vannak jelen a pulmonális artéria és a bronchiális artéria között. Elképzelhető, hogy ezen anasztomózisok feladata az, hogy a két rendszer

közül bármelyik véráramlásának csökkenése esetén a másik artéria a tüdő keringését fenntartsa. Ez különösen fontos lehet a pulmonális áramlás megingása esetén<sup>75</sup>.

Patkányokban jelen vannak a bronchiális artériák és a két rendszert összekötő prekapilláris anasztomózisok<sup>76</sup>, azonban az egerek tüdejében előforduló bronchiális artériák jelenlétével kapcsolatban az irodalom megosztott<sup>76-78</sup>.

Verloop különböző rágcslókban vizsgálta a bronchiális artériák, valamint az anasztomózisok jelenlétét. Színezett zselatinos folyadékkal töltötte fel az állatok érrendszerét. Patkány tüdőben a legkisebb bronchusok szintjéig sikerült igazolnia a bronchiális artériák jelenlétét, mindemellett prekapilláris anasztomózisokat is megfigyelt. Egérben azonban a feltöltés a szervek kis mérete miatt csupán egy alkalommal volt sikeres, a fő bronchusokat ellátó artériákat sikerült azonosítania<sup>76</sup>. Mitzner és mtsai. egér tüdőbe juttatott mikrogöngyökkel bronchiális artériákat nem véltek felfedezni<sup>77</sup>. Ezzel ellentétben Rajkumar és mtsai. mikrogöngyökkel,  $\mu$ CT-vel és Flat Panel CT-vel végzett kísérleteik során azonosítottak egér tüdőben bronchiális artériákat és bronchopulmonális anasztomózisokat<sup>78</sup>.

### 1.7. Tüdőmetasztázisok kezelése

A daganatos betegségekben a halálozás legfőbb oka az áttétképzés, ami a rosszindulatú sejtek primer helyről más szervekre történő áttérjedését jelenti. A tüdő is egy olyan szerv, amelybe az anatómiai sajátosságai miatt gyakran adnak áttétet más lokalizációjú daganatok<sup>79</sup>. Az extratorakális tumorok 20–54%-ában mutathatók ki tüdőáttétek<sup>80-82</sup>. Az egyetlen módszer, mely valódi potenciállal bír a tüdőmetasztázisos betegek kezelésében az a sebészi eltávolítás<sup>83</sup>. Sajnos azonban a tüdőmetasztázisban szenvedő betegek többsége nem alkalmas a műtéti beavatkozásra, ezért inkább kemo- (platinaszármazékok, taxánok) és/vagy célzott (anti-EGFR) terápiákkal kezelhető, amelyek hatékonysága még mindig nem megfelelő<sup>84-86</sup>. A metasztázisok növekedéséhez alapvető fontosságú a megfelelő vérellátáshoz való hozzáférés<sup>4</sup>, ezért a metasztázisok vaszkularizációjának tanulmányozása több okból is rendkívül fontos. Először is, bármelyik daganatellenes terápia szer hatékonysága függ attól, hogy eléri-e a tumort megfelelő koncentrációban, amit a gyakran inhomogén tumorális vérellátás nagyban befolyásol<sup>87</sup>. Másrészt a tumorok által kiváltott angiogenezis a daganatellenes terápia

célpontja is lehet. Az angiogenezist célzó hagyományos gyógyszerek (azaz az anti-angiogén hatóanyagok) azonban vegyes és gyakran elkeserítő eredményeket mutattak a betegek kezelésében<sup>88-91</sup>. Ezért az áttétekben történő vaszkularizációs folyamatok jobb megértése döntő fontosságú a metasztázisos betegek kezelésére szolgáló, sikerebb terápiás stratégiák kidolgozásában.



## 2. 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 vaszkularizációjának (bronchiális, pulmonális) meghatározása és hatásának vizsgálata a tumorsejtek proliferációjára.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Tumorsejt vonalak

HT1080 humán fibroszarkóma, HT25 humán kolon adenokarcinóma, A2058 humán melanóma, MAT-B-III patkány emlő adenokarcinóma, B16 egér melanóma, valamint C26 egér kolon adenokarcinóma sejteket *in vitro* RPMI-1640 médiumban (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Németország) tenyésztettük, melyhez 10% FBS-t (Sigma-Aldrich,) és gentamicint (160 mg/L, Sandoz International GmbH, Holzkirchen, Németország) adtunk. Az *in vitro* tenyésztett exponenciális növekedési fázisban lévő sejteket (a nem letapadó MAT-B-III sejtek kivételével) 1x Tripszin-EDTA-val (Sigma-Aldrich) 5 percen át 37°C-on történő inkubálással vittük szuszpenzióba, majd a reakció leállításához RPMI-1640 (+10% FBS, +gentamicin) médiumot használtunk. Mosást (szérum-mentes RPMI; Sigma-Aldrich) követően a sejteket megszámloltuk és lecentrifugáltuk (10 perc, 800 rpm, 4°C), majd szérum-mentes RPMI-ben vettük fel a sejteket az állatokba történő oltáshoz.

A C38 kolon karcinóma sejtvonalat sorozatos szubkután transzplantációkkal tartottunk fent. A szubkután tumorokat eltávolítottuk az állatokból és sóoldatban kis darabokra (~0,5 cm<sup>3</sup>) vágtuk. Egy kis bemetszést ejtettünk a hátbőrön és az olló hegyét bevezetve leválasztottuk a bőrt az izomról, így egy kis zsebet kialakítva. Egy tumordarabot helyeztünk a zseb mélyébe és a bemetszést bezártuk.

#### 3.2. Állatkísérletek

A kísérleti állatok tartása és kísérletbe vonása a Semmelweis Egyetem állatvédelmi szabályzata alapján az állattartási és kísérleti előírások betartása mellett történt (Állatkísérlet engedély Ikt. sz.: 22.1/1159/3/2010, PEI/001/2457-6/2015). Az állatok (C57Bl/6, Balb/c, SCID egerek és Fischer 344 patkány) a Semmelweis Egyetem I sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet tenyészetéből származtak. A kísérletek alatt az állatok a szükségleteiknek megfelelően folyamatosan fogyaszthattak rágcsáló tápot (Charles River, Wilmington, Massachusetts) és csapvizet. A kísérleti állatokat állandó hőmérséklet és nedvességtartalom, valamint 12 órás fény/sötétség napi váltakozást biztosító feltételek mellett tartottuk.

### 3.2.1. Kísérletes tüdőmetasztázisok létrehozása intravénás oltással

A következő tumorsejtvonalak intravénás (farokvéna) oltásával hoztunk létre tüdőmetasztázisokat: HT1080 humán fibroszarkóma, HT25 humán kolon adenokarcinóma (SCID egerekben), MAT-B-III patkány emlő adenokarcinóma SCID egerekben és F344 patkányokban, B16 egér melanóma C57Bl/6 egerekben, valamint C26 egér kolon adenokarcinóma Balb/c egerekben.

Különböző mennyiségű tumorsejtet oltottunk az állatok farokvénájába (**1. Táblázat**).

1. **Táblázat.** A beoltott tumorsejtek száma az egyes vonalak esetében.

Állatok	Sejtvonal	Sejtszám (db)	Térfogat (ml)
C57Bl/6 egér	B16	$10^5$	0,2
Balb/c egér	C26	$5 \times 10^5$	0,1
SCID egér	HT25	$10^6$	0,1
Fischer patkány	MAT-B-III	$7-10 \times 10^3$	0,5-0,9
SCID egér	MAT-B-III	$2 \times 10^4$	0,2

Az *in vitro* tenyésztett HT1080 sejtek az intravénás oltást követően nem képeztek tüdőkolóniákat, ezért  $2 \times 10^6$  sejtet fecskendeztünk szubkután a SCID egerekbe. Három héttel az oltást követően a szubkután kinőtt tumorokból 1 ml-es fecskendő segítségével kinyertük a tumorsejteket tartalmazó szövetmasszát, melyeket pengével homogenizáltuk, majd szérum-mentes RPMI-ben fecskendővel összeszuszpendáltuk a sejteket és négy réteg steril gézlapon átszűrtük, végül lecentrifugáltuk azokat (800 rpm, 10 perc). Az élő HT1080 sejteket leszámolva 0,1 ml térfogatban  $2 \times 10^5$  sejtet fecskendeztünk a SCID egerek farokvénájába.

### 3.2.2. C38 tumorok létrehozása különböző szövetekben

A szubkután nöövő tumorok létrehozásához  $0,05 \text{ cm}^3$  méretű C38 tumordarabokat transzplantáltunk az egerek hátbőre alá. A transzplantációt követő 21. napon termináltuk az állatokat.

Kísérletes tüdőmetasztázisok létrehozásához a szubkután fenntartott C38 tumorokat eltávolítottuk, szikével 1-2 mm-es darabokra vágtuk, majd 0,7 mg/ml

kollagenáz (Sigma-Aldrich) jelenlétében (szérum-mentes RPMI-1640 médiumban), 45 percen át 37°C-on, rázatás mellett inkubáltuk. Ezután a sejtszuszpenziót négy réteg steril gézlapon átszűrtük, majd lecentrifugáltuk (10 perc, 800 rpm, 4°C). Az állatok altatását ketamin-xylazin (Sigma-Aldrich, 80:12mg/kg dózis) intraperitoneális injekcióval végeztük. Mivel a szubkután fenntartott C38 tumorokból kinyert tumorsejtek az állatok farokvénájába oltása után nem képeztek tüdőmetasztázisokat, ezért ebben az esetben a spontán metasztázis modellben hoztuk létre a tüdőmetasztázisokat.  $5 \times 10^4$  sejtet injektáltunk az egér hátsó lábának talpába, majd az oltást követő 18-28 nappal később a tumort hordozó lábat amputáltuk. Tapasztalatok szerint ez a módszer felgyorsítja a mikrometasztázisok növekedését a célszervben. Az állatok terminálása a hátsó láb amputációját követő 5-8 héttel később történt.

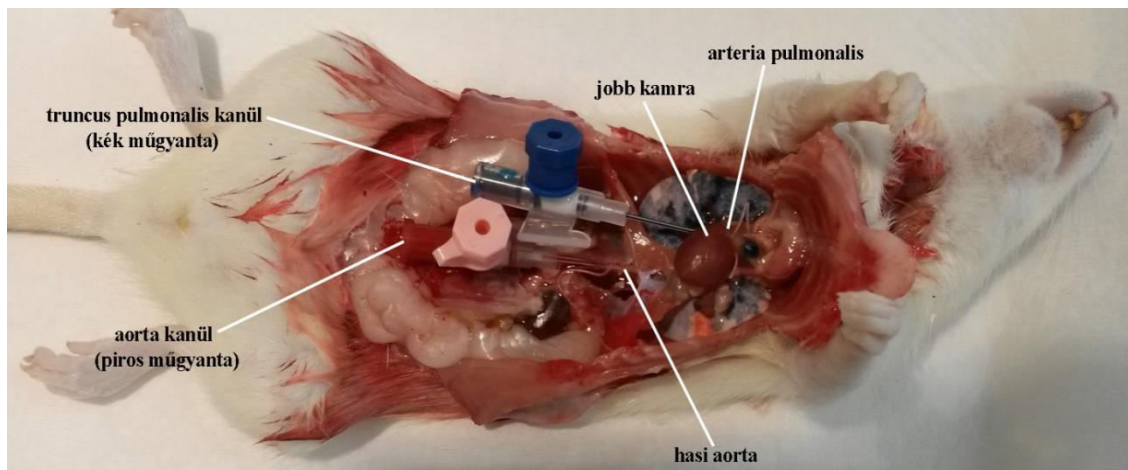
### 3.2.3. Kettős érfeltöltés

A tüdőmetasztázisok vérellátásának vizsgálatához Fischer patkányokban hoztunk létre metasztázisokat, a MAT-B-III emlő adenokarcinóma sejtvonal intravénás oltását követően. Azért használtunk kísérleteinkhez patkányokat, mert korábbi vizsgálataink, valamint egyes irodalmi adatok szerint<sup>76,77</sup> az egerek tüdejében nincs bronchiális keringés. Kettős érfeltöltési technikát alkalmaztunk, hogy megvizsgáljuk a patkány tüdőmetasztázis vérellátásának eredetét. A normál patkány tüdőben a pulmonális és bronchiális rendszer között jelen lévő anasztomózisok miatt, melyeket előkísérleteink során figyeltünk meg, először a pulmonális rendszert töltöttük fel műgyantával. Így megakadályoztuk, hogy az anasztomózisokon keresztül a bronchiális artéria rendszerébe injektált műgyanta a pulmonális artéria rendszerén keresztül jusson be a metasztázisokba, ami a metasztázisok vérellátásának eredetét tekintve téves következtetéseket eredményezhet.

A tumorsejtek beoltását követő harmadik héten az állatokat ketamin-xylazin intraperitoneális injekcióval elaltattuk. A hasüreget megnyitva felkerestük az aorta abdominalist és disztális részén kanüláltuk (20 G, Braun). A véna cava inferiort a máj alatt felkeresve átvágtuk, majd az érrendszert az aortakanülon keresztül heparinos PBS-sel átmostuk. Körülbelül 10 perc mosást követően az aortakanült az aorta abdominalis rekeszszárak közti szakaszára helyeztük át abból a célból, hogy a beadott műgyanta a hasüregi szervekhez futó artériákat ne töltse fel feleslegesen. A mellkast megnyitva az

aorta ascendenst eredésénél lekötöttük, ezzel megakadályozva az aortakanulón keresztül beadott műgyanta retrográd áramlását a tüdővénák felé. Az artéria carotis communisokat mindkét oldalon felkerestük és lekötöttük, hogy a gyantafelesleg ne kerüljön a fej- és nyaki erekbe. A truncus pulmonalist a jobb kamrán keresztül kanüláltuk (22 G, Braun).

A műgyantával való feltöltést a kék műgyanta (Mercox, Ladd Research, Williston, ND) injektálásával kezdtük, a truncus pulmonalis kanulón keresztül juttatva azt a pulmonális artéria rendszerébe. Mikroszkópos ellenőrzés mellett annyi gyantát juttattunk az érrendszerbe, amíg a kék szín a tüdő perifériás részén megjelent. Ehhez körülbelül 0,3 ml műgyantára volt szükség. A kék gyanta polimerizációja után az aortakanulón keresztül a bronchiális rendszert 1 ml piros műgyantával (Mercox, Ladd Reserach) töltöttük fel (**10. ábra**).



**10. ábra: Kettős érfeltöltési technika.** A pulmonális artériát a jobb szívkamrán keresztül kék, a bronchiális artériát a hasi aortán keresztül piros műgyantával töltöttük fel.

### 3.3. A tumorminták immunfluoreszcens és morfológiai vizsgálatai

#### 3.3.1. Immunfluoreszcens vizsgálatok

A különböző lokációjú (tüdő, szubkután) tumorokat eltávolítottuk, ezt követően folyékony nitrogénezen hűtött izopentánban (Sigma-Aldrich) lefagyasztottuk. A mintákból 15 µm vastag fagyasztott metszeteket készítettünk (Shandon kriomikrotóm, 0620M, Cambridgeshire, Anglia), melyeket -20°C-os metanolban (Molar chemicals) fixáltunk (10 perc). Ezután PBS-es (phosphate-buffered saline) mosást követően a megfelelő primer ellenanyaggal (**2. Táblázat**) történő 1 órás, szobahőmérsékletű inkubáció következett, amit a fél órás fluorokrómmal jelölt másodlagos ellenanyaggal (**3. Táblázat**; Life Technologies, Carlsbad, CA) történő inkubáció követett. Szükség esetén a sejtmagok festését is elvégeztük (**4. Táblázat**). A metszeteket fluoreszcens vizsgálatokra alkalmas fedőanyaggal fedtük le (Fluorescent Mounting Medium, Dako, Glostrup, Dánia). A mintákat konfokális lézer szkennelési mikroszkóppal (Bio-Rad, MRC-1024, München, Németország) vizsgáltuk.

**2.Táblázat:** Az immunhisztokémiai vizsgálatok során használt elsődleges ellenanyagok

<b>Ellenanyag</b>	<b>Faj/klonalitás</b>	<b>Gyártó</b>	<b>Kat. szám</b>	<b>Hígítás</b>
BrdU	Egér monoklonális	BD Pharmingen	347580	1:50
CD31	Patkány monoklonális	BD Pharmingen	550275	1:50
$\alpha$ SMA	Egér monoklonális	DAKO	M0851	1:200
Laminin	Nyúl poliklonális	DAKO	Z0097	1:200
Kollagén I	Nyúl poliklonális	Chemicon	AB765P	1:100
Konnexin 43	Nyúl poliklonális	Zymed Laboratories	71-0700	1:50
Podoplanin	Kecske poliklonális	R&D Systems	AF3244	1:200

**3. Táblázat:** Az immunhisztokémiai vizsgálatok során használt másodlagos ellenanyagok és fluoreszcens magfestékek

Ellenanyag	Faj/klonalitás	Gyártó	Kat. szám	Hígítás
Anti-egér IgG	Szamár poliklonális	Life Technologies	A21202	1:400
Anti-nyúl IgG	Szamár poliklonális	Life Technologies	A31572	1:400
Anti-patkány IgG	Szamár poliklonális	Life Technologies	A21208	1:400

**4. Táblázat:** A kísérletek során használt magfestékek.

Sejtmagfesték	Faj/klonalitás	Gyártó	Kat. szám	Hígítás
DAPI	-	Sigma-Aldrich	32670	1:500
TOTO-3	-	Invitrogen	T3604	1:500

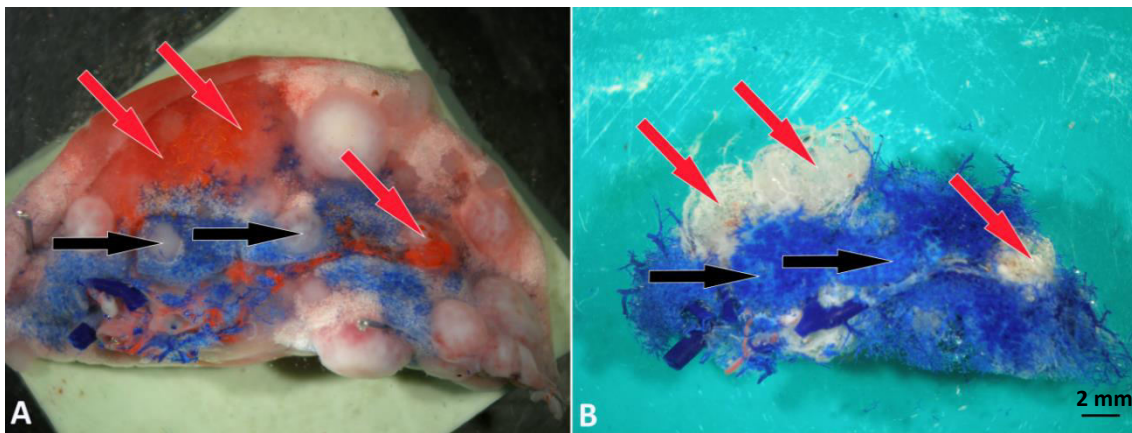
### 3.3.2. A metasztázisok méretének és az artériás metasztázisok százalékanak meghatározása

A metasztázisok méretének meghatározásához a kék és a piros gyanta pulmonális és bronchiális rendszerbe való juttatását követően, miután a gyanta megszilárdult a tüdőt eltávolítottuk és lebenyeire vágtuk. A jobb felső, jobb alsó és a baloldali lebenyek mindkét oldaláról fényképeket készítettünk (Olympus SZ61 sztereómikroszkóp, Olympus 7070 fényképezőgép, Olympus, Tokyo, Japán) és a fotókon lemértük a tüdőlebenyek felszínén lévő metasztázisok átmérőjét (Quick Photo Micro, Olympus). Ezután a lebenyeket 30%-os KOH (Molar Chemicals, Halásztelek,



Magyarország) oldatba helyeztük (12 óra, 45 °C). A korrodált készítményeket folyó víz alatt mostuk, majd desztillált vízbe helyeztük (**11. A ábra**).

A minták korróziós kezelése után az artériás vérellátású metasztázisok többségét teljesen kitöltötte a piros műgyanta, azonban néhány metasztázis esetében csak részleges volt a kitöltés. Ezen esetekben a korrodálatlan lebenyek felszínén a bronchiális rendszerbe injektált piros műgyanta nem minden esetben volt jól látható. Ezért a vérellátás eredetének pontos meghatározásához összehasonlítottuk a korrodálatlan lebenyek képét a már korrodált preparátumokkal (**11. B ábra**).



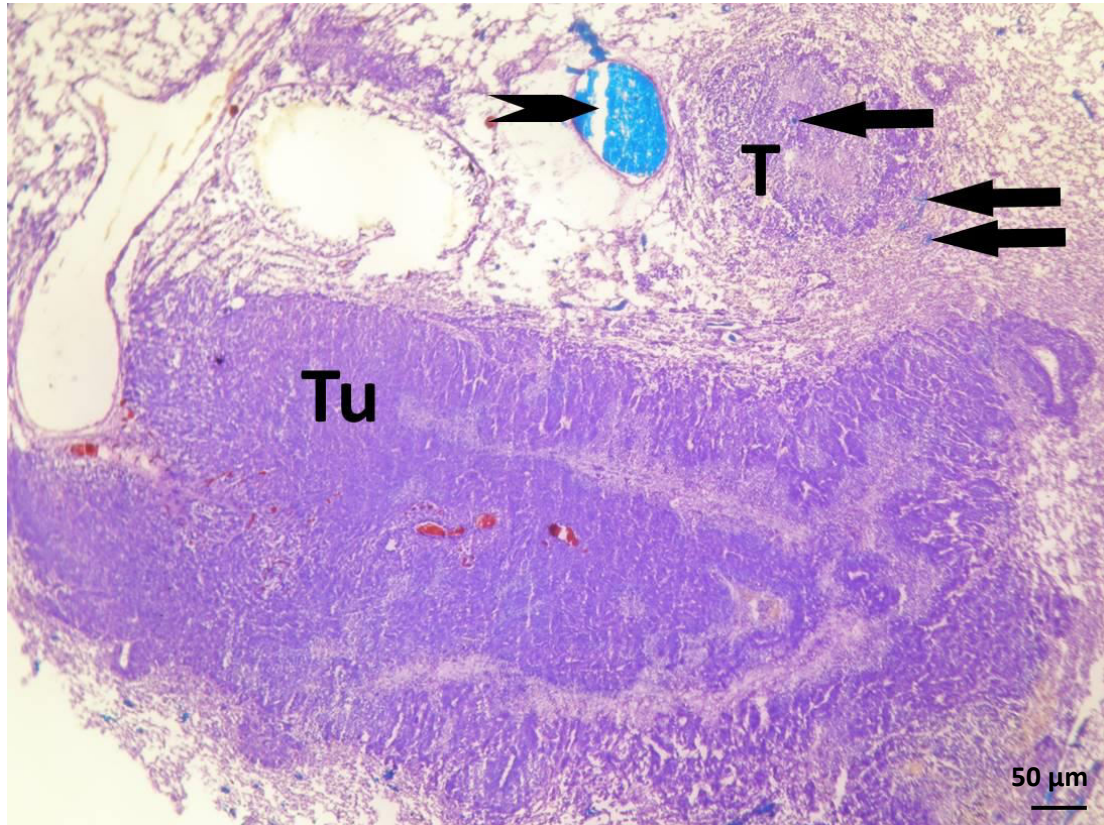
**11. ábra: Patkány tüdőlebeny kettős érfeltöltést követően, korrózió előtt és után.** (A) Metasztázisokat tartalmazó, gyantával feltöltött tüdőfél. (B) Ugyanazon lebeny korrodált képe. Azonos színű nyilak jelölik a metasztázisok helyzetét, korrózió előtt és után. Piros nyilak a bronchiális artéria által ellátott, tehát piros műgyantával kitöltött metasztázisokra mutatnak. A korróziót követően ezek fehér színűek, ami a korrózió során alkalmazott lúgos kezelés következménye. A fekete nyilak a pulmonális artéria (kék) által ellátott metasztázisokat jelzik.

A bronchiális vagy pulmonális vérellátást a korróziót követően a metasztázishoz futó erekben látott műgyanta színe alapján döntöttük el. A korróziós készítményeken azon metasztázisokat, melyek bármilyen mennyiségben is tartalmaztak piros gyantát és a bronchiális artérián keresztül közvetlenül kapcsolódtak a metasztázishoz "bronchiális" ellátásúnak tekintettük. Azon metasztázisok melyek nem bronchiális vérellátásúak voltak üregként jelentek meg a korróziós készítményeken. Néhány esetben a piros szín kifehéredett, vagy azért, mert a színrészecskék kiszűrődtek, vagy azért, mert a piros szín "kifakult" a korrózió során. A metasztázisok méretének és vérellátásuk eredetének közötti összefüggés vizsgálata során összesen 218 darab MAT-B-III emlő adenokarcinóma metasztázist vizsgáltunk.

### 3.4. Proliferációs vizsgálatok

#### 3.4.1. A különböző vérellátású metasztázisok tumorsejt proliferációs rátájának meghatározása BrdU inkorporációs módszerrel

A feltöltés előtt 1 órával az állatok BrdU (Sigma-Aldrich) injekciót kaptak (ip; 200 mg/kg dózis, fiziológias sóoldatban). A BrdU egy olyan timidin analóg, mely a sejtciklus S fázisában lévő sejtek DNS-ébe épül be, így megfelelő ellenanyaggal kimutatva alkalmas az osztódó sejtek megjelölésére. A műgyantával történő feltöltést követően a tüdőket eltávolítottuk és folyékony nitrogéneen hűtött izopentánban (Sigma-Aldrich) fagyasztott lebenyekből metszeteket készítettünk. A mintákból 10 darab 10 µm vastagságú fagyasztott metszeteket készítettünk, melyeket metanollal fixáltunk (10 perc, -20°C). Toluidinkék (0,5%, Sigma-Aldrich) festést követően fénymikroszkóp alatt, a tumor ereiben lévő műgyanta színe alapján meghatároztuk a bronchiális vagy pulmonális eredetet (**12. ábra**). Fixálást és mosást követően a mintákat 2N HCl-ban (Molar chemicals) inkubáltuk 10 percen át szobahőmérsékleten (a DNS denaturáció az ellenanyag bekötődésének feltétele). A DNS-be beépült BrdU-t indirekt immunhisztokémiai reakcióval tettük láthatóvá. Ismételt mosás (PBS, 3x5 perc) után primer anti-BrdU (**2. táblázat**) majd a megfelelő másodlagos ellenanyag (**3. táblázat**) segítségével tettük láthatóvá a BrdU jelzett sejteket. A sejtmagok jelölésére TOTO-3 magfestést (**3. táblázat**) használtunk. A metszetekről 40x objektívvel felvételeket készítettünk (Bio-Rad, MRC-1024). A proliferációs ráta meghatározását a felvételeken az ImageJ szoftverrel végeztük. A sejtmagfestés alapján meghatároztuk a teljes sejtszámot, valamint a BrdU jelölt sejteket. Az osztódó sejtek számát elosztva a teljes sejtszámmal, megkaptuk az adott metasztázis proliferációs indexét. 14 állatból 14 bronchiális- és 17 pulmonális artéria által ellátott metasztázist vizsgáltunk meg. Egy metasztázisról három kép készült, ami összesen 36000 µm<sup>2</sup>-nyi területnek felel meg. Az egyes metasztázisokban átlagosan 2000 sejtet számoltunk le.



**12. ábra: Bronchiális artéria által ellátott metasztázis (Tu) fagyasztott metszetének fénymikroszkópos képe (toluidinkék festés).** A metasztázis ereiben megfigyelhető a piros műgyanta, ami a bronchiális artéria általi ellátottságra utal. A kisebb metasztázis (T) körüli szövetben egy nagyobb, kék műgyantával kitöltött pulmonális artéria (nyílhegy) ábrázolódik. További nyilak jelölik a kék műgyantával kitöltött kisebb pulmonális ereket, melyek közül egy a metasztázisban helyezkedik el.

#### **3.4.2. A tumorsejtnövekedés oxigénfüggőségének meghatározása *in vitro***

*In vitro* kísérletünk során normoxiás és hipoxiás körülmények között vizsgáltuk az A2058 és a MAT-B-III sejtvonal sejtjeinek proliferációs képességét Alamar Blue teszt segítségével. Az Alamar Blue teszt alapja, hogy a resazurin egy kék színű, gyengén fluoreszkáló reagens a sejtekbe jut és az élő sejtek rózsaszínű fluoreszcens resorufinná redukálják. A kapott fluoreszcencia értékek alapján lehet detektálni a sejtek viabilitását és proliferációs aktivitását. Mindkettő sejtvonal esetében két csoportban 2000 és 5000 sejt osztódási rátáját vizsgáltuk hipoxiás (1% O<sub>2</sub>) és normoxiás (21% O<sub>2</sub>) oxigénkoncentrációjú térben tartva. 72 óra inkubálás után a sejtekhez 10μl Alamar Blue

reagenst (DAL1100, Invitrogen, Carlsbad, CA) adtunk. Négy óra eltelte után mértük a minták fluoreszcencia jelét (570 nm).

### 3.4.3. Peri- és intratumorális endotélsejt proliferáció meghatározása

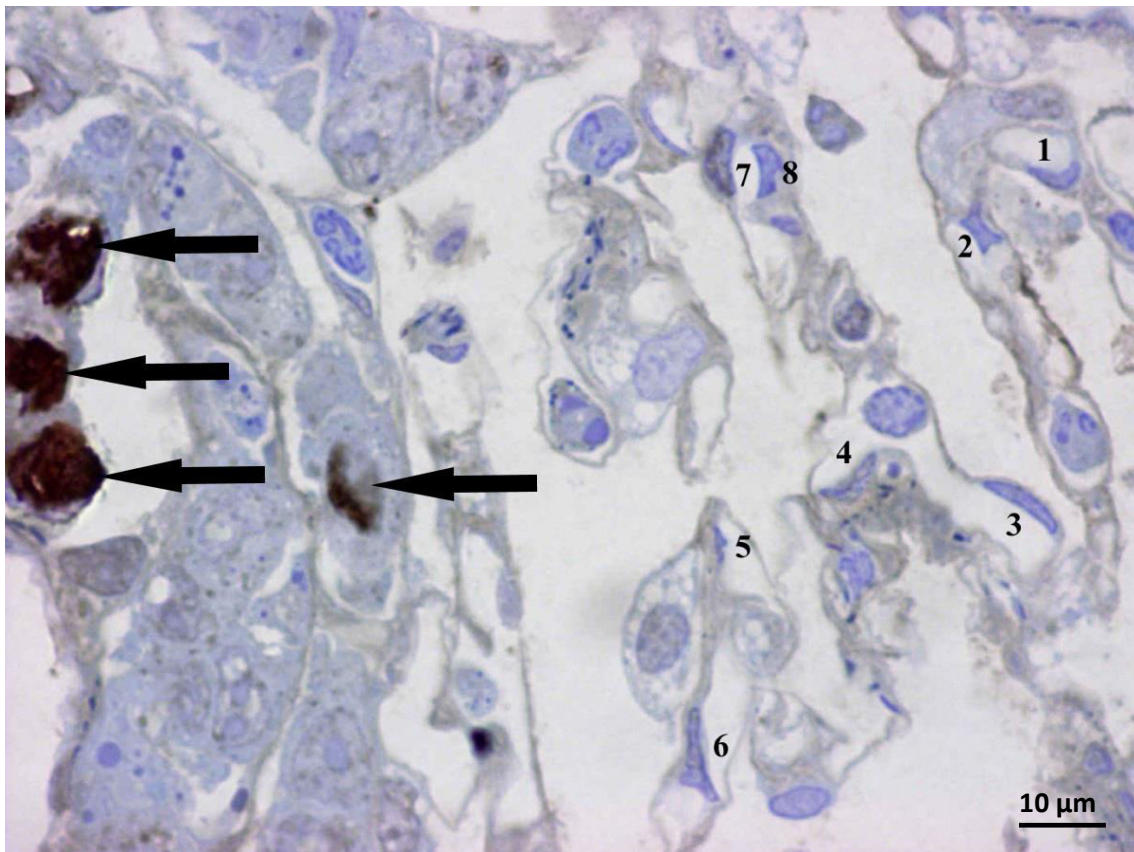
Az endotélsejt proliferációt (BrdU inkorporáció) patkány MAT-B-III metasztázisokban határoztuk meg, ugyanis ezen tumorok mérete bizonyosan meghaladta az 1-2 mm átmérőt, amit az angiogenezis megindulásához szükségesnek tartanak<sup>92</sup> (ennél kisebb méret esetén a tumorok tápanyagellátása diffúzióval biztosítható).

Az állatok a terminálás előtt egy órával 200 mg/kg BrdU-t kaptak intraperitoneálisan. Különböző módszereket alkalmazva határoztuk meg az intra- és peritumorális endotélsejtek proliferációs rátáját. Az intratumorális vizsgálatokhoz a korábban már leírt immunfluoreszcens technikát használtuk. A tumorban levő erős laminin jelzéssel körbehatárolt struktúrákon belüli (erek) BrdU pozitív sejteket tekintettük endotélsejteknek. 5 állatból származó, 14 metasztázisban, összesen 2300 sejtet számoltunk le.

A fagyasztott metszeteken a rendkívül sűrű hajsálérhálózat miatt lehetetlen meghatározni a BrdU pozitív sejtek pontos lokalizációját és eredetét a peritumorális szövetben. A számolást ebben az esetben az immunelektronmikroszkópiához használatos technika tette lehetővé. A tüdőmintákat perfúzióval fixáltuk annak érdekében, hogy a kapillárisok ne essenek össze. Az állatokat ketamin-xylazin intraperitoneális injekciójával altattuk és a bal kamrán keresztül PBS-sel (10 perc), majd 4% PFA-val (Reanal, Budapest, Hungary, pH 7.2, 15 perc) perfundáltuk. A tüdőt eltávolítottuk és 4%-os PFA-ban utófixáltuk (4°C, 2 óra). Ezután a tüdőt lebenyekre vágtuk és 24 órán át 15% szacharózban, ezt követően újabb 24 órán át 30% szacharózban történő inkubáció következett. A lebenyeket lefagyasztottuk és 30 µm-es fagyasztott metszeteket készítettünk, melyeket 1%-os kollodionnal borított tárgylemezre vettünk fel. A metszeteket száradás után PBS-sel mostuk és 10 percen át 2N HCl-ban inkubáltuk 20°C-on. PBS mosás után a metszeteket monoklonális anti-BrdU antitesttel (2 óra), majd biotinált anti-egér ellenanyaggal inkubáltuk (2 óra). Újabb mosást követően Avidin-Biotin kit-et használtunk (Vectastain Elite ABC-Peroxidase Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Az utolsó mosást követően a reakció előhívása diaminobenzidinnel (DAB, Vector Laboratories,) történt. A metszeteket a



reakciótermék denzitásának növelése érdekében ozmifikáltuk (1% OsO<sub>4</sub>, Sigma-Aldrich, PBS-ben), felszálló etanol sorral (50-70-90-100%, 30-30-30-3x30 perc) dehidráltuk és Spurr gyantával (Spurr Low Viscosity Embedding Kit, Sigma-Aldrich) feltöltött kapszulákat helyeztünk a metszetekre. A gyanta éjszakán át 56°C-on polimerizálódott. Ezt követően a kapszulákat metszettel együtt folyékony nitrogénbe merítve távolítottuk el. A metszeteket enyhén 0,5% toluidin késsel (pH 8.5) festettük. 3 állat 6 metasztázisának peritumorális szövetét vizsgáltuk meg. A félvékony metszeteket mikrotómmal (0,5µm, OmU2 Mikrotóm, Reichert, Ausztria) készítettük, 100x immerziós objektívvel vizsgáltuk és a kapillárisok, valamint venulák 329 endotélsejtjét analizáltuk (**13. ábra**).



**13. ábra: MAT-B-III metasztázis széli része és peritumorális tüdőszövet.** Jobb oldalt számokkal jelzett BrdU negatív nem proliferáló endotélsejtek láthatók, bal oldalt a BrdU pozitív proliferáló tumorsejtek (nyilak).

### 3.5. Elektronmikroszkópia

A C38, B16 és HT1080 tumoros tüdőminták egy részét elektronmikroszkópos vizsgálatok céljára készítettük elő. Ennek során az elaltatott állatokat heparinos PBS (10 perc), majd jégen hűtött 2%-os glutáraldehid (Merck, Darmstadt, Németország) tartalmú 0,05 mol/L Na-kakodilát puffer (Sigma-Aldrich) (pH 7.2, 15 perc, 20°C) oldattal perfundáltuk a bal kamrán keresztül. A tumort tartalmazó szövetet (tüdő, szubkután szövet) pengével 1-2 mm<sup>3</sup>-es darabokra vágtuk. A mintákat 2 órán át a fixáló oldatban (glutár-aldehid) hagytuk (4°C) majd PBS mosást (éjszakán át) követően 5 mg/ml K-ferrocianidot (K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], sárga vérlúgsó) tartalmazó 1% OsO<sub>4</sub> oldatban (Sigma-Aldrich) utófixáltuk (2 óra), ezután felszálló acetonsorban (50-70-90-100%, 30-30-30-3x30 perc) víztelenítettük. A beágyazáshoz Spurr gyantát (Spurr Low Viscosity Embedding Kit, Sigma-Aldrich) használtunk. Az ultravékony metszeteket (70-100 nm) ultramikrotómmal (RMC MT-7 Ultramikrotóm, Phoenix, AZ) készítettük, uranil-acéttal (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>U) és ólom nitráttal (Pb[NO<sub>3</sub>]<sub>2</sub>) kontrasztoltuk, és Philips CM10 (Philips Research, Eindhoven, Hollandia) elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

### 3.6. 3D rekonstrukció

A tüdőparenchima és a tumorszövet viszonyának szemléltetésére fagyasztott C38 tüdőmetasztázisból sorozatmetszeteket készítettünk, és azokon CD31 és laminin festést végeztünk. A felvételeket 10x-es nagyításon készítettük konfokális mikroszkóppal (BioRad). A tumorszövet határvonalainak kijelölése után a tumormassza rekonstrukcióját a Biovis3D (Montevideo, Uruguay) szoftvert használva készítettük el.

### 3.7. Különböző lokalizációjú C38 tumorok kötőszövetes elemeinek morfológiai analízise

A C38 tumorminták fagyasztott metszetein CD31 (endotélsejt) és laminin (bazális membrán) festést végeztünk. A metszetek szkennelését Panoramic Scannerrel (3D-Histech Ltd; Budapest, Magyarország), a morfológiai analízist Panoramic Viewer szoftverrel (3D-Histech Ltd.) végeztük. A tumorokban minden lokalizációban megtalálható jellegzetes kötőszövetes oszlopokat vizsgáltunk. Olyan kötőszövetes oszlopokat választottunk, melyek egy individuális eret tartalmaztak. Az ér mindkét

oldalán lemértük a távolságot ( $\mu\text{m}$ ) a centrális ér bazális membránja (CD31 pozitív erek laminin jelölése) és az oszlop körüli tumorsejtek által termelt laminin között. A tumorszöveten belül az oszlopok helyzete véletlenszerű volt, ami a metszeteken különböző ovalitású kivágott profilokat eredményezett. Emiatt a centrális ér és az oszlop széle közti legkisebb távolságot határoztuk meg, ami megegyezik az oszlop valós méretével. Tumorlokációnként legalább 5 állatot használtunk és minden tumorból 3 metszetet készítettünk. Metszetenként 10-20 kötőszövetes oszlopot vizsgáltunk. Minden állatban és minden tumorlokációban meghatároztuk az átlagot ( $\mu\text{m}$ ) és a szórást.

### 3.8. QRT-PCR analízis

$10^6$  B16 egér melanoma és  $2.5 \times 10^5$  C38 egér kolon carcinoma sejtekből teljes RNS-t izoláltunk Trizollal (Life Technologies, Waltham, Massachusetts). NanoDrop 1000 Spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Massachusetts) megmértük az RNS koncentrációt és mintánként  $1 \mu\text{g}$  RNS-t írtunk át cDNS-sé a Thermo Fisher Scientific reverz transzkripció kit-jét használva. A QRT-PCR-hez a Thermo Fisher Scientific TaqMan Gene Expression Assay (Ctgf: Mm01192931\_g1; Fgf2: Mm00433287\_m1; Tgfb1: Mm01178820\_m1; Tgfb2: Mm00436955\_m1; Tgfb3: Mm00436960\_m1; Pdgfb: Mm01298578\_m1) rendszerét használtuk a gyártó utasításai szerint. Endogén kontrollként Gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázt (GAPDH, Thermo Fischer Scientific) használtunk. Minden mintát triplikátumban futtattunk,  $20 \mu\text{l}$  reakciótérfogatban. Küszöbciklus (CT) értékek segítségével az expressziós szinteket  $\Delta\text{CT}$  módszerrel határoztuk meg.

### 3.9. Statisztikai analízis

Az adatok a számszerűsített eredmények átlagát ( $\pm\text{SD}$ ) reprezentálják. A csoportok közti különbségek statisztikai kiértékeléséhez kétmintás t-próbát alkalmaztunk. Eredményeinket  $p < 0.05$  értékek esetén tartottuk szignifikánsnak.

## 4. Eredmények

### 4.1. A kísérletes tüdőmetasztázisok ereződése

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

A vaszkularizáció folyamatát hat különböző kísérletes tüdőmetasztázis modellben vizsgáltuk. A kísérletes tüdőmetasztázisokat a HT1080, HT25, B16 és C26 sejtek egerekbe történő intravénás oltásával, a MAT-B-III esetében pedig egerekbe, illetve patkányokba történő intravénás oltásával hoztuk létre. A C38 tumor esetében egy spontán metasztázis modellt alkalmaztunk (mely során C38 sejteket injektáltunk egerek hátsó lábának talpába, amit a láb amputálása követett). A vizsgált tüdőmetasztázisok mérete 100 µm és néhány milliméter között volt (a MAT-B-III sejttekkel injektált patkányokban 5 mm-nél nagyobb átmérőjű tumorokat is megfigyeltünk) A vizsgált tumorok vaszkularizációjának mechanizmusa a tumorok méretétől független volt.

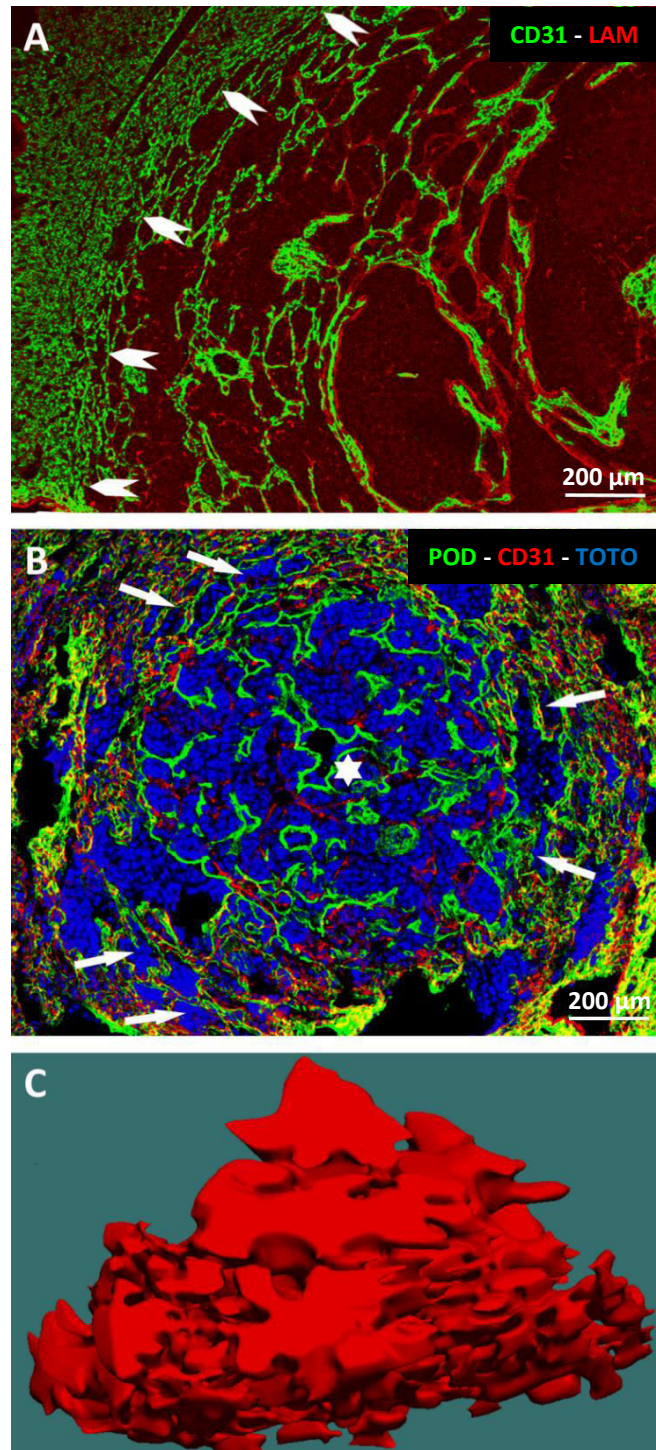
Irodalmi adatokból tudjuk<sup>93,94</sup>, hogy a tumorsejtek a célszervbe történő bejutást követően először az alveólusfalak kötőszövetébe extravazálnak. Itt kisebb kolóniák kialakítása után betörnek az alveoláris térbe. Az általunk vizsgált tumorok terjedésének alapvető módja mindegyik tumortípus esetében a proliferáló tumorszövet alveólusról-alveólusra történő „áramlása” volt (**14. ábra**), amely folyamat a korábban már Pezzella által humán primer és metasztatikus tüdőtumorkok esetében leírt alveoláris mintázat kialakulását eredményezi<sup>51</sup>.

A metasztázisok szélén elhelyezkedő, de már tumorszövet által kitöltött alveólusok falának szerkezete kezdetben megtartott volt (azaz intakt volt a pneumocita – kapilláris -pneumocita szerkezet; (**15. ábra A, B**). A tumorsejtek által kitöltött alveólusok falát ultrastrukturális szinten is megvizsgáltuk. Azt találtuk, hogy a normál tüdőben is jelen lévő vér-levegő gát – amely epitelsejt rétegből (PN), bazális membránból (BM) és endotelsejt rétegből (EN), áll – szerkezete a metasztázisok széli részein megtartott (**15. ábra C, D**).

Eredményeink 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

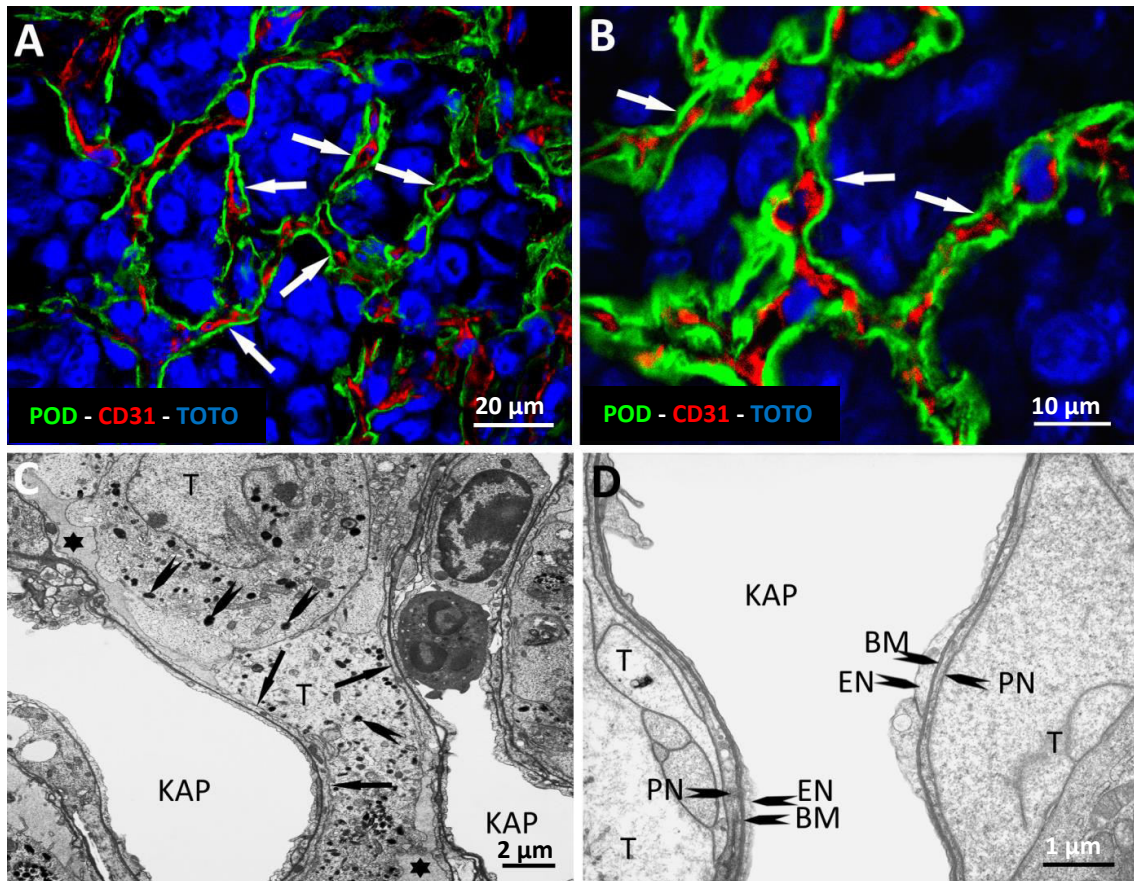


inkorporált kapillárisok lumenjében tumorsejtek nem találhatóak, a tumorsejtek és a pneumociták plazmamembránjai szoros kapcsolatban vannak.



**14. ábra: Tüdőmetasztázisok alveoláris terjedése.** (A) C38 tüdőmetasztázis fagyasztott metszete, melyen endotélsejt (CD31, zöld) és bazális membrán (laminin, piros) jelölést végeztünk. A kép bal oldalán a normál tüdőparenchima látható (nyílhegyek jelölik a metasztázis határát). A tumorsejtek elfoglalják az alveolusok lumenét és kitöltik azokat (sötétebb területek). A tumor centruma felé egyre tágabbak az alveoláris terek. (B) Kis nagyítású felvétel SCID egérbe oltott MAT-B-III tumorsejtek tüdőmetasztázisáról. A metszeten a tüdőszövetet podoplanin (pneumociták, zöld), és CD31 jelöléssel (endotélsejtek, piros) tettük láthatóvá. A tumor szövetet TOTO-3

magfestés jelzi (kék). A metasztázis szélén az alveólusok lumenében tumorsejtek vannak jelen (nyilak). Csillag jelzi a metasztázis centrumát. (C) C38 metasztázis 3 dimenziós képe, mely sorozatmetszetek (17 darab) alapján lett rekonstruálva. Látható, hogy az alveólusokat kitöltő tumor egy összefüggő masszát alkot. A kép felső részén helyezkedik el a tumor centruma.

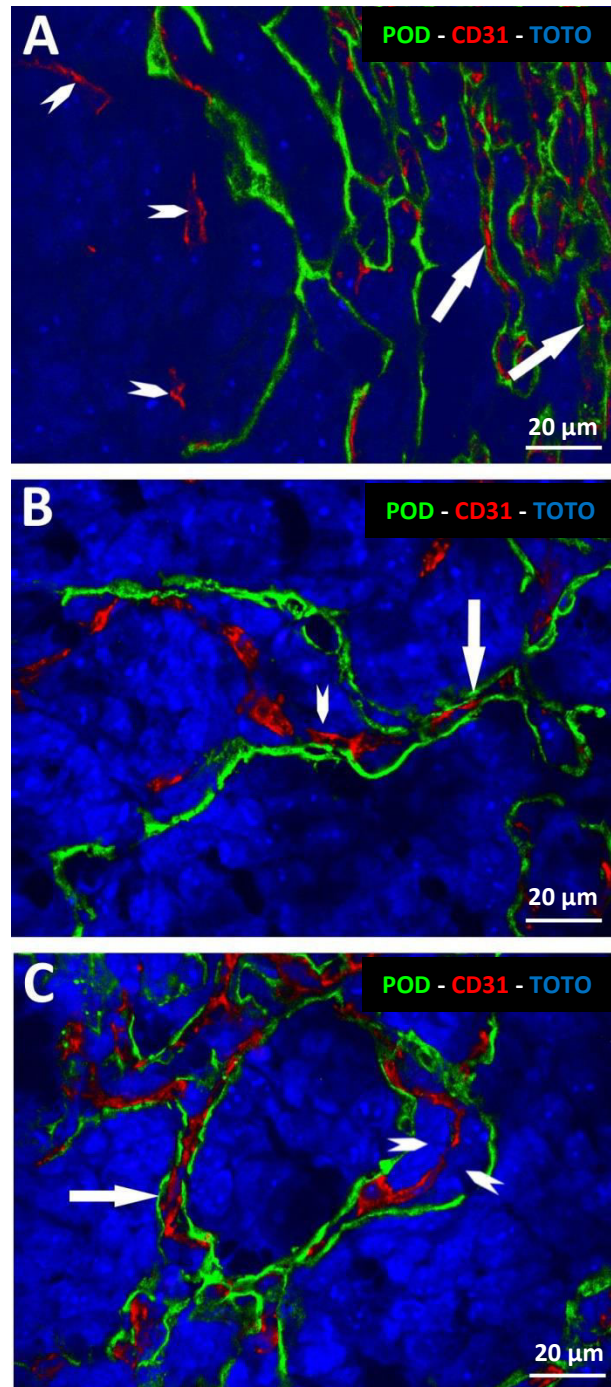


**15. ábra: Különböző tumorok által kitöltött alveólusok falának szerkezete.** (A) MAT-B-III tüdőmetasztázis széli része, melyen podoplanin (pneumociták, zöld), CD31 (endotélsejtek, piros) és TOTO-3 (magfestés, kék) jelzés látható. A tumorsejtek kitöltik az alveólusokat, melyet intakt pneumocita réteg bélel (nyilak). (B) Nagy nagyítású konfokális mikroszkópos kép egy HT1080 tüdőmetasztázis széli részéről, ahol podoplanin (zöld), CD31 (piros) és TOTO-3 (kék) jelzést használtunk. Az alveólusokat tumorsejtek töltik ki, azonban az alveólus falak megtartottak, látható a szabályos pneumocita-kapillaris-pneumocita szerkezet (nyilak). (C) Kis nagyítású elektronmikroszkópos felvétel egy B16 melanóma tüdőmetasztázis széléről. A tumorsejtek (T) könnyen felismerhetők a melanoszómák (nyílhegyek) jelenléte miatt. Látható, hogy a tumorsejtek kitöltik az alveoláris teret, míg a kapilláris lumenekben (KAP) nincsenek tumorsejtek. A jobb oldali kapilláris lumenében két fehérvérsejt található. A tumorsejt plazmamembránja nagy felületen szoros kapcsolatban van a pneumocita plazmamembránjával (nyilak). A csillag olyan területet jelöl, ahol az alveoláris lumen fehérjét tartalmazó folyadékkal van kitöltve. (D) Nagy nagyítású elektronmikroszkópos kép egy HT1080 tüdőmetasztázis széli részéről. A képen egy kapillárist (KAP) és az azt körülvevő tumorsejteket (T) látni. A kapillaris mindkét oldalán normál vér-levegő gát látható, pneumocita (PN), bazális membrán (BM) és endotélsejt (EN) rétegekkel.

#### **4.1.2. Az inkorporált erek és a tumorsejtek kölcsönhatása a metasztázisok belsejében.**

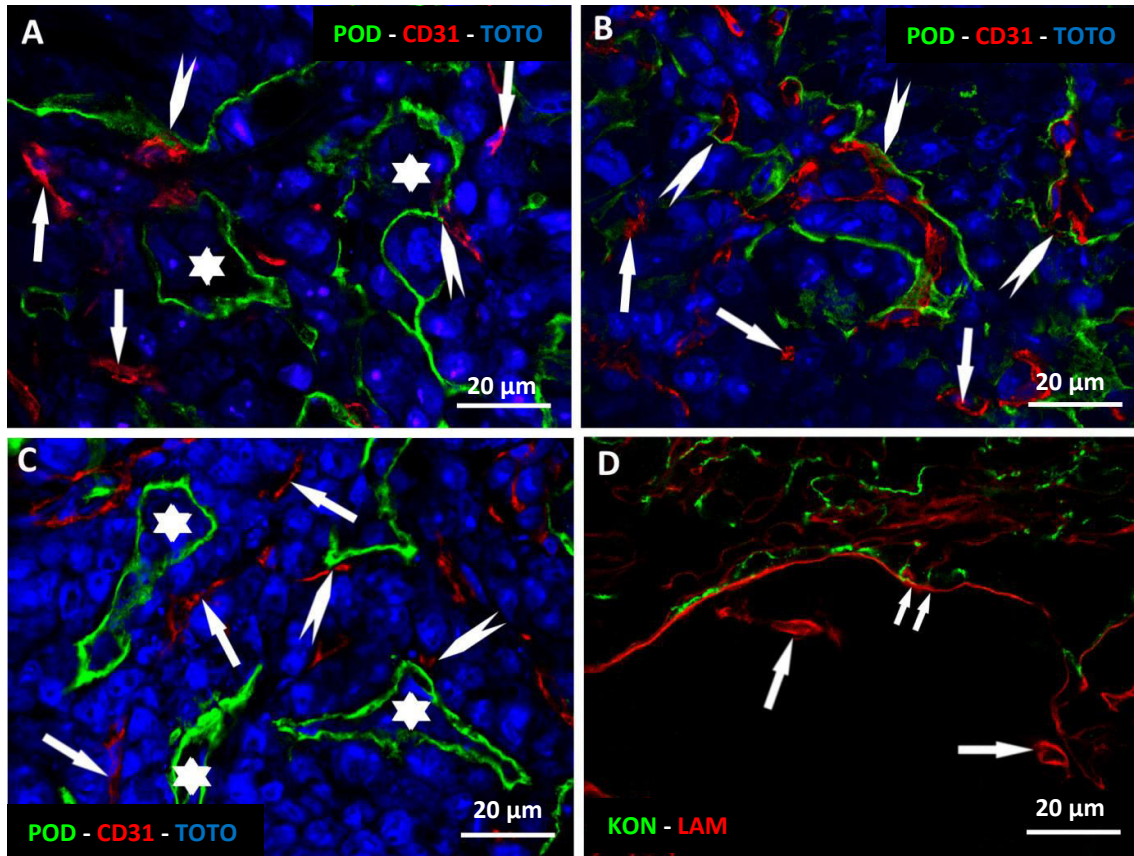
A vizsgált tumortípusok mindegyike (kivéve a C38 kolorektális adenokarcinóma, melynek vaszkularizációs mechanizmusát később ismertetjük) esetében azt a jelenséget figyeltük meg, hogy a tumor centruma felé az alveólusokat kitöltő tumorsejtek leválasztják az erekről a pneumocita réteget, ugyanis a vérerek körül nincsenek jelen pneumociták a metasztázisok invazív szélétől a centrum felé 100-200  $\mu\text{m}$ -re (**16. ábra A**). A pneumocita-mentes erek létrejöttét maguk a tumorsejtek indukálják egy sajátos módon. A tumorsejtek a folyamat során a tumormasszával kitöltött alveólusok lumenéből visszalépnek az alveólusok falában található kötőszövetes állományba, majd betörnek a kapillárisok és az alveólus epitélium közé azokon a területeken, ahol a pneumocitákat és az endotélsejteket csak a kettős bazális membrán választja el egymástól (vér-levegő gát). Ennek eredményeként a pneumociták leválnak az alattuk levő kapillárisokról (**16-19. ábrák**). Elektronmikroszkópot használva nagyobb felbontásban is vizsgáltuk a folyamatot így meg tudtuk állapítani, hogy a tumorsejtek hogyan választják le a pneumocitákat a kapillárisokról. Az egészséges tüdőszövetben az alveólusokat bélelő pneumociták és az ereket határoló endotélsejtek között a gázcsere területén vastagabb és valójában kettős bazális membrán található, tehát mindkét sejtfeleségnek megtartott a saját bazális membránja. Az alveólus falban, ahol kötőszövet található a két bazális membrán elválik egymástól. A tumorsejtek ezekről a helyekről indulva képesek beékelődni az epithél és az endotél bazális membránja közé (**19. ábra**). A folyamat során a vér-levegő gát bazális membránja szétvált egy endotél és egy epithél bazális membrán rétegre (**19. ábra**). 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 (**18. ábra**).



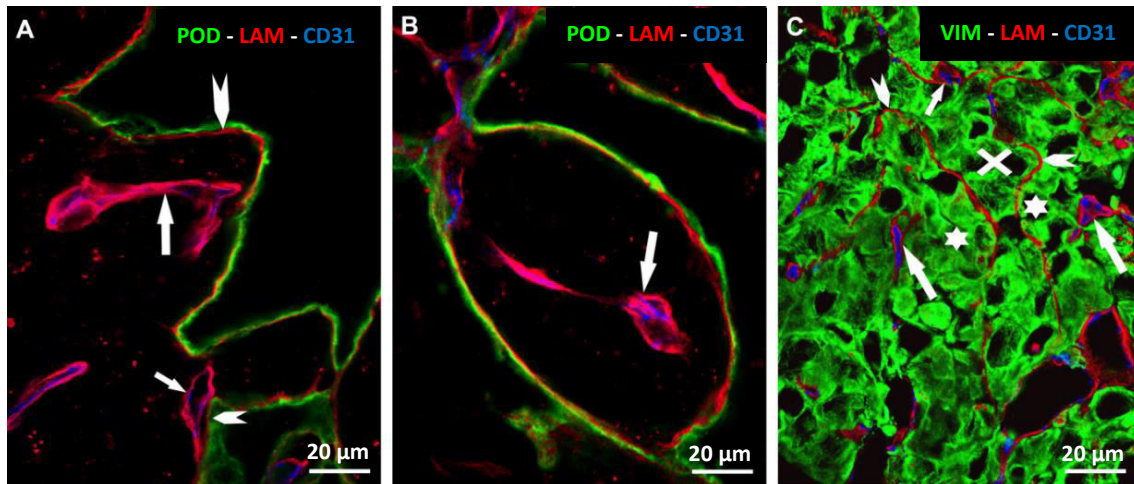


**16. ábra: A B16 tumorsejtek leválasztják az alveólus epitéliumot a bekebelezett erekről.** A B16 tüdőmetasztázis fagyasztott metszetén a pneumocitákat podoplanin (zöld), a kapillarisokat CD31 (piros), és a tumorsejteket TOTO-3 (kék) jelöléssel tettük láthatóvá. **(A)** A kép a bal oldalán a tumor centruma látható. A tumor széli részén (jobb oldal) az alveoláris tereket tumorsejtek töltik ki. Ezen a területen láthatóak a még intakt alveoláris falak (nyilak). Ezzel szemben bal oldalt a tumor belsejében már pneumocitáktól megfosztott ereket (nyílhegyek) látni. **(B)** Az alveólusfalba betört tumorsejtek leválasztják a pneumocitákat a kapillarisokról (nyílhegy). A nyíl a még intakt alveólus falat jelöli. A kép bal oldalán a tumor centruma felé eső terület látható.

(C) Nyílhegyek jelölik a kapillárisok és pneumociták között elhelyezkedő tumorsejteket. A kép bal oldalán még normál alveólusfal figyelhető meg (nyíl).

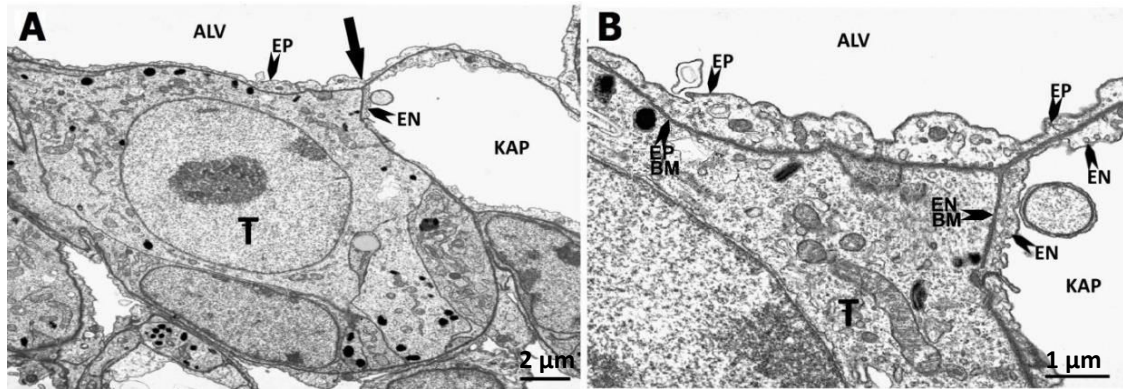


**17 ábra: Az alveólus epitélium leválasztása a kapillárisokról különböző tüdőmetasztázisokban:** HT25 (A), C26 (B), MAT-B-III sejtvonalak SCID (C) egerekben és MAT-B-III sejtvonala (D) F344 patkányban. Az (A-C) ábrákon a következő festések láthatók: podoplanin (pneumocita, zöld), CD31 (endotélsejt, piros), TOTO-3 (magfestés, kék). A nagyobb méretű nyilak mind a négy ábrán a teljesen lecsupaszított ereket jelölik. A nyílhegyek olyan erekre mutatnak, melyek még részleges epitél borítással rendelkeznek. Az (A) és (C) ábrán csillagok jelölik az „eredeti” alveoláris tereket, melyeket majdnem teljesen intakt epitélium határol és tumorsejtek töltnek ki. A C26 tumorban (B) az epitélium fragmentálódott. A (D) ábrán látható MAT-B-III metasztázis fagyasztott metszetén laminin (piros) és konnexin 43 (zöld) festést alkalmaztunk, hogy a patkányban is láthatóvá tegyük/jelöljük a pneumocitákat (konnexin 43 pozitivitás). A dupla nyíl jelöli az epitél bazális membránját. A fekete területek a tumorszövetet reprezentálják.



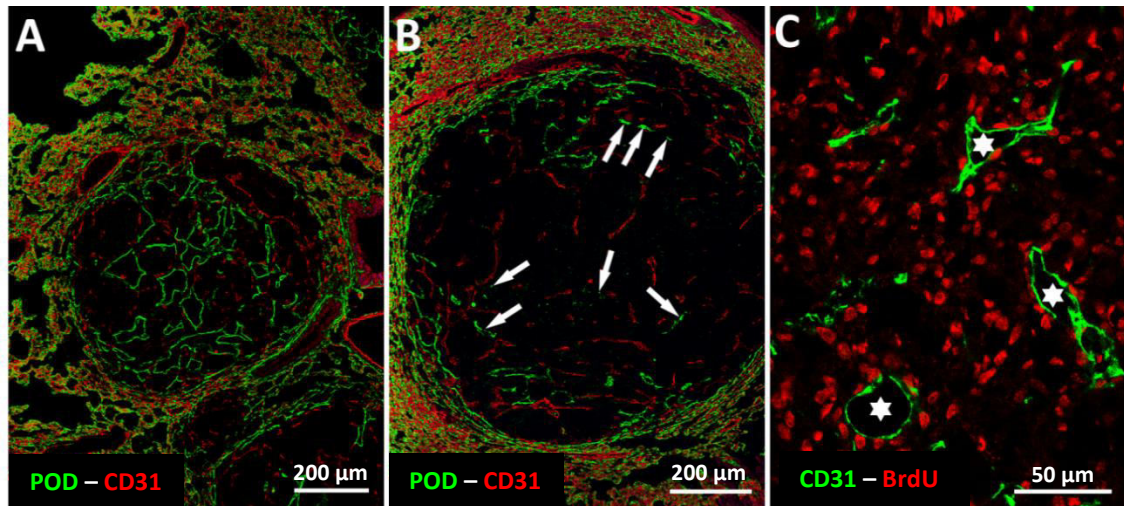
**18. ábra: HT1080 tumorsejtek kölcsönhatása a vér-levegő gát bazális membránjával.** (A, B) HT1080 tüdőmetasztázis fagyasztott metszete, melyen az erek (CD31, kék) a bazális membrán (laminin, piros) és a pneumociták (podoplanin, zöld) vannak jelölve. A fekete területeket tumorsejtek töltik ki. Az (A) ábra alján egy ér (kis nyíl) található, melynek laminin-pozitív bazális membránja (piros) még kapcsolatban van a szomszédos pneumocita réteggel (epitéliummal, kis nyílhegy). A nagy nyíl egy olyan eret jelöl, mely már teljesen szeparálódott az epitéliumtól és tumormassza veszi körbe. Látható, hogy a leválasztott alveólus epitélium (zöld) a saját bazális membránján (piros) fekszik (nagy nyílhegy). (B) HT1080 metasztázisban egy teljesen lecsupaszított ér (nyíl) látható. A CD31 pozitív endotélsejtek (kék) vastag bazális membránnal (laminin, piros) vannak körülvéve. Megfigyelhetjük mind az (A) mind a (B) ábrákon, hogy a bazális membrán réteg (laminin, piros), ami a podoplanin pozitív epitéliumhoz (zöld) tartozik, vékonyabb, mint ami a CD31 jelölt (kék) ereket határolja. A fekete részeket tumorsejtek töltik ki. (C) Az ábrán HT1080 tüdőmetasztázis látható, melyen a tumorsejtek (zöld) jelölésére vimentin, a bazális membrán (piros) demonstrálására laminin és az erek (kék) láthatóvá tételére CD31 immunfestést végeztünk. A nagy nyilak olyan ereket jelölnek, melyekről már teljesen levált az epitél réteg. A kis nyíl egy olyan eret jelöl, mely még kapcsolatban van az epitél bazális membránjával. Nyílhegyek jelölik a leválasztott epitél bazális membránját. X mutatja a korábbi alveoláris teret. Csillagok jelölik az erek és a leválasztott alveólus epitélium közti dilatált teret (a korábbi tüdő interstícium).





**19. ábra: B16 tumorsejtek kölcsönhatása a vér-levegő gát bazális membránjával.** Elektronmikroszkópia. (A) A képen egy tumorsejt (T) látható, mely egy kapilláris (KAP) felszínéről választja le az epitéliumot (EP). A tumorsejteket az egyik oldalon intakt epitél (EP) a másik oldalon intakt endotél sejtek (EN) fedik. A (B) ábrán, az (A) ábrán nyíllal jelölt rész látható nagyobb nagyításban. Látni lehet, ahogy a tumorsejt nyúlványa kettéhasítja az alveolus bazális membránját (BM) egy epitél-asszociált (EP) és egy endotél-asszociált (EN) bazális membránra. ALV: alveoláris tér; BM: bazális membrán; EP: epitélium; EN: endotél sejt; KAP: kapilláris lumen; T: tumorsejt.

A metasztázisokban található pneumociták száma és lokalizációja függött a metasztázis méretétől. Míg a kisebb metasztázisok közepén láthatunk pneumocitákat (20. ábra A), addig a nagyobb metasztázisok centrumában nincsenek jelen pneumociták (20. ábra B). Ennek oka, hogy a levált és tumorsejtek között elhelyezkedő epitélsejtek hosszabb ideig nem életképesek és a tumor nyomása következtében fragmentálódnak és elpusztulnak (20. ábra B). Ezzel szemben a lecsupaszított és inkorporált erek túlélnek és funkcionálisak maradnak, amit az erek körül elhelyezkedő tumorsejtek intenzív BrdU inkorporációja is alátámaszt. (20. ábra C).



**20. ábra: Pneumociták és erek elhelyezkedése különböző méretű metasztázisokban.** (A, B) Az ábrákon a pneumocitákat podoplanin (zöld) az ereket CD31 (piros) jelzéssel tettük láthatóvá. A kisebb metasztázisban (A) a kapillárisokon kívül a leválasztott epitélium rétegek is jelen vannak a metasztázis centrumában. Ezzel szemben a nagyobb metasztázisban (B) pneumociták csak a tumor periferiáján találhatók. Nyilak jelölik az epitélium fragmentálódott maradványait. (C) BrdU inkorporáció (piros) a HT1080 tüdőmetasztázisában. Az ereket CD31 (zöld) jelöli. BrdU pozitív tumorsejteket főként az erek (csillagok) körül látni, ami jelzi az inkorporált erek funkcionalitását.

#### 4.2. Peri- és intratumorális endotélsejt proliferáció

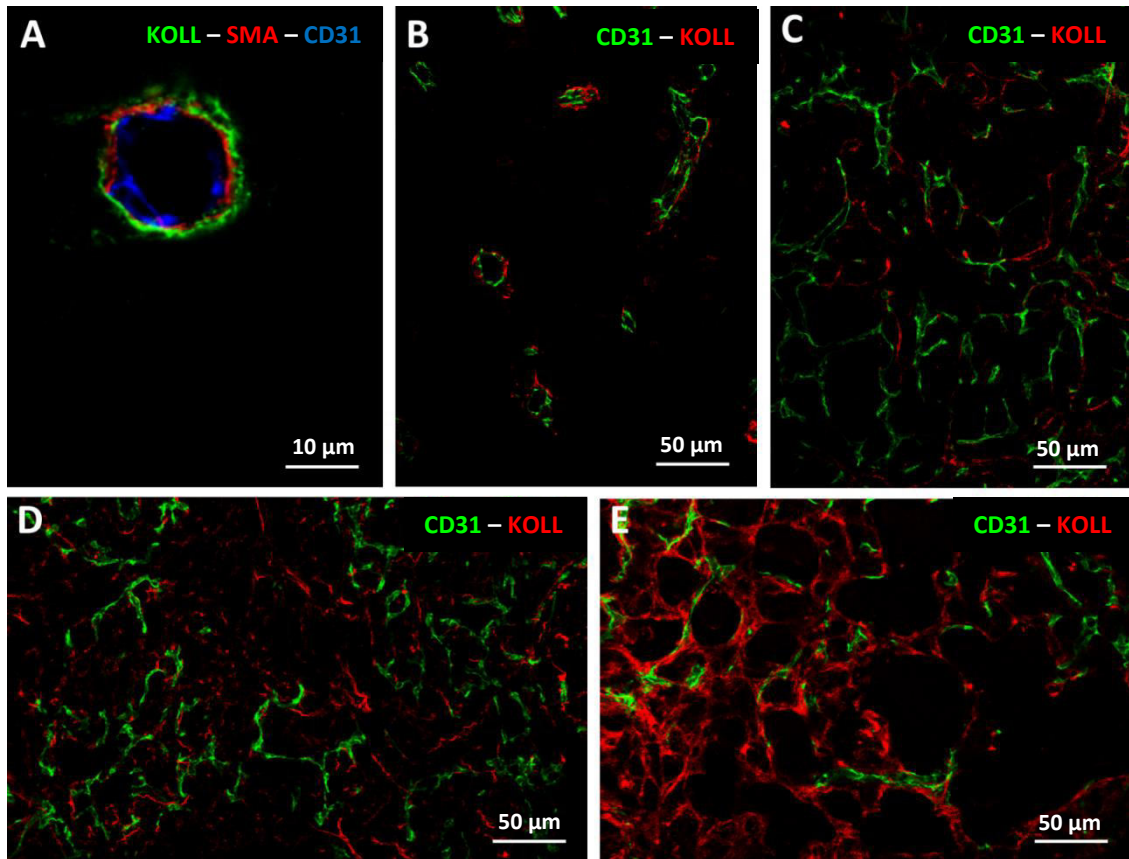
Az angiogén switch elmélet szerint a tumorok az 1-2 mm-es átmérő elérése után az endotél sejtek osztódásával járó érképződést indukálnak<sup>95</sup>. A kísérleteinkben vizsgált metasztázisok többsége nem érte el ezt a kritikus méretet, azonban a patkányban növekvő MAT-B-III tumorok meghaladták azt (átlagos átmérő  $3.36 \pm 2.23$  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 µm 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 lényegesen magasabb volt ( $12.8 \pm 3.2\%$ ). A proliferációs különbség statisztikailag szignifikáns volt ( $p < 0.05$ ). Emellett, a tumor centrumát összehasonlítva a periferiával az érdenziás intratumorálisan alacsonyabb, az erek kerülete viszont enyhén növekedett, ami azt jelzi, hogy az intratumorális endotélsejtek proliferációja az erek tágulását eredményezi.

### **4.3. A kötőszövet eloszlása az invazív növekedési mintázatot mutató tumorvonalak tüdőmetasztázisaiban**

A disszertáció bevezetőjében már említésre került, hogy a tumor típusán kívül, a gazdaszövet kötőszöveti sejtjei által termelt extracelluláris mátrix is hatással lehet a tumorok szöveti struktúrájára és érhalózatuk szerkezetére. Patológias körülmények között az aktivált fibroblasztok által termelt kollagén tartalmú mátrix biztosíthatja a tumorsejtek számára a tumor progresszióját elősegítő mikrokörnyezetet. Mindezek vizsgálatára  $\alpha$ SMA és kollagén I. jelölést végeztünk.

Az  $\alpha$ SMA pozitív miofibroblasztok, a kötőszövetes kollagén mennyisége és eloszlása a HT1080, HT25, B16, C26 és MAT-B-III 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  $\alpha$ SMA pozitív miofibroblasztokat, azonban a metasztázisok körül nem volt megfigyelhető dezmozis reakció (fibroblaszt aktiválás, kollagén termelés és depozíció). Az  $\alpha$ SMA pozitív miofibroblasztok vagy kapcsolatban maradtak az erek bazális membránjával, vagy a sejtek egy kisebb hányada a leválasztott epitélreteggel eltávolodott a kapillárisoktól. Az erekhez tapadó miofibroblasztok azonban nem tekinthetők pericitáknak, hiszen nem fedik őket bazális membrán.

A B16 melanóma és a HT1080 fibroszarkóma esetében az  $\alpha$ SMA pozitív sejtek száma nem növekedett a tumor centruma felé, a bekebelezett erek körül csak kis mennyiségű kollagén lerakódás volt megfigyelhető (**21. ábra A, B**). 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 (**21. ábra C-E**).

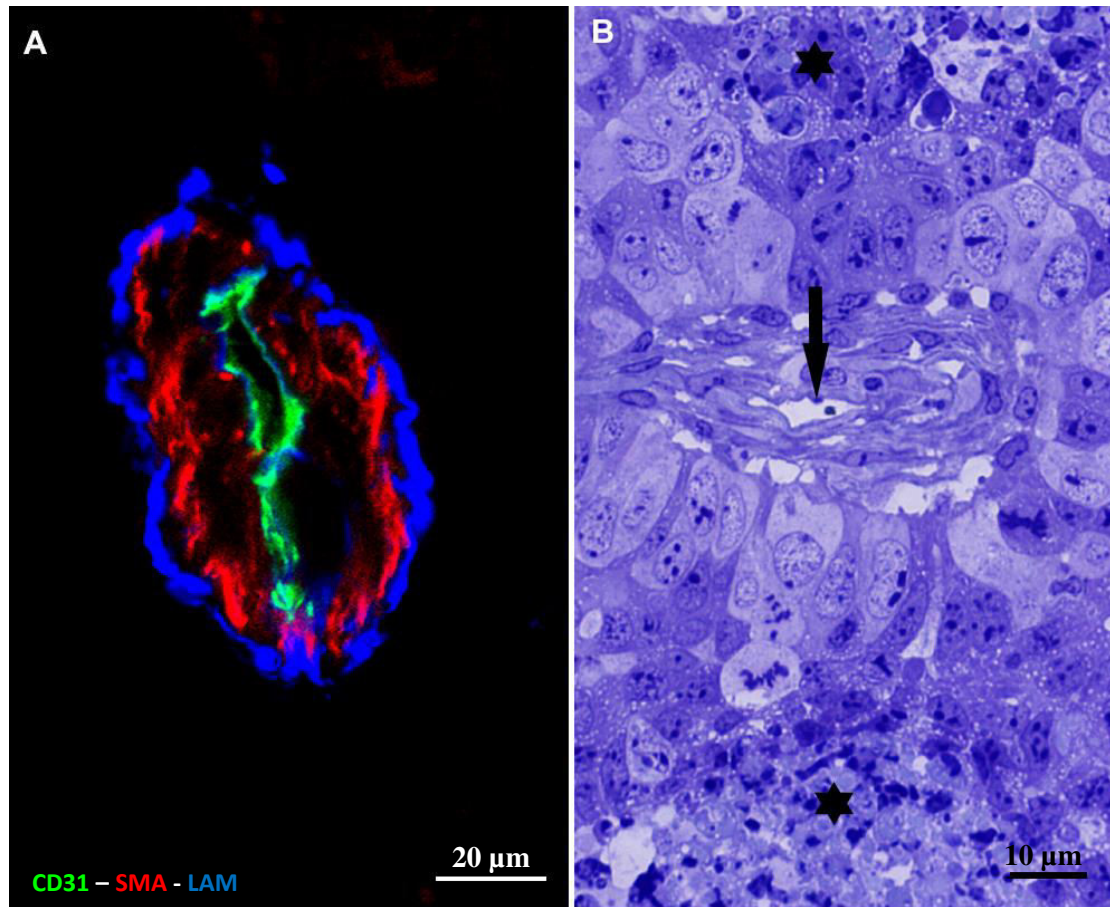


**21. ábra: A kötőszövet eloszlása különböző tumorsejtvonalak tüdőmetasztázisaiban (B16, HT1080, MAT-B-III, C26 és HT25).** (A) Intratumorális ér B16 metasztázisban. A képen kollagén I (zöld),  $\alpha$ SMA (piros) és CD31 (kék) jelölés látható. A miofibroblasztok kevés kollagén tartalmú mátrixot szintetizálnak, ami elsősorban az erek körül rakódik le. (B-E) CD31 (zöld) és kollagén I (piros) jelölés. A fekete területek tumorszövetet reprezentálnak. (B) A HT1080 fibroszarkómában hasonlóan a melanómához csak az erek körül figyelhető meg kis mennyiségű kollagén I. (C) A MAT-B-III patkány emlő adenokarcinómában a kollagén I nem asszociál kifejezetten az erekkel, elszórtan van jelen a tumorszövetben. (D) A C26 egér kolon adenokarcinómában már nagyobb mennyiségű kollagén I van jelen, szintén nagyrészt függetlenül az erektől. (E) A HT25 kolon adenokarcinómában a kollagén I pozitív kötőszövet tömör, összefüggő hálózatot képez a tumorszövetben.

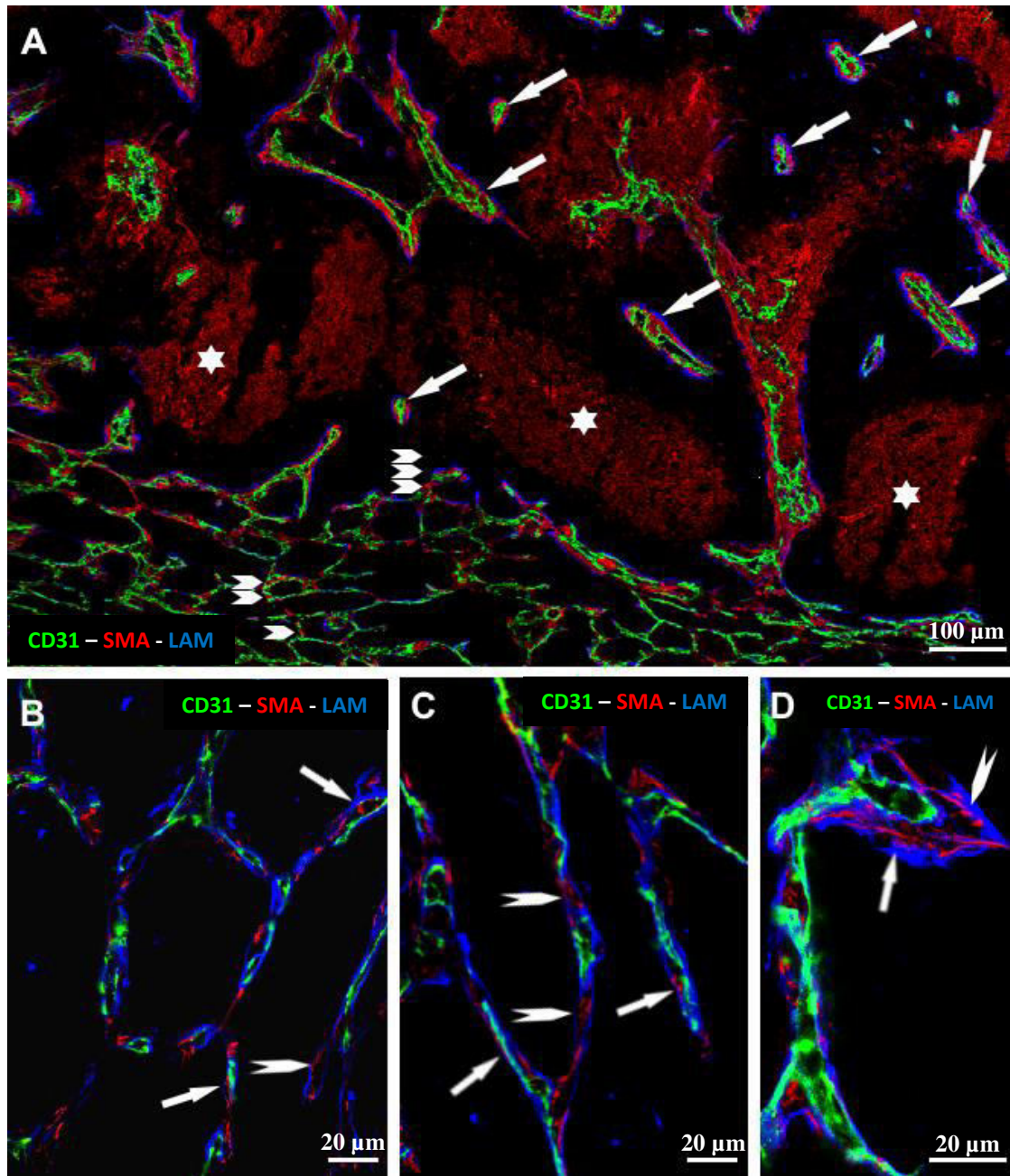
#### **4.4. A C38 kolon adenokarcinóma kötőszövetes oszlopainak vizsgálata, valamint az inkorporáció összehasonlítása tüdő- és szubkután szövet esetében**

Ahogy azt már fentebb említettem 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 (fibroblaszt aktiválás, kollagén termelés és depozíció). Ennek eredményeként a C38 metasztázisokban az alveólusfalak kötőszövetes oszlopokká alakulnak. Az oszlopok kollagén tartalmú mátrixba ágyazott, bazális membránnal körülvett centrális érből,  $\alpha$ SMA pozitív, aktivált fibroblasztokból és a mindezt körülvevő (a tumor által termelt) bazális membránból állnak (**22. ábra, 23. ábra A**). A kötőszövetes oszlopok fokozatosan alakulnak ki a perifériától a tumor centruma felé, (**23. ábra A, C, D**) melyet a következőképpen írhatunk le. Először azon alveólusok falában, melyek lumene tumorsejtekkel kitöltött,  $\alpha$ SMA-t expresszáló aktivált fibroblasztok jelentek meg. Ilyen sejtek nincsenek jelen a normál peritumorális tüdőszövetben, az arteriolákat és a légutakat kivéve. Az alveólusok falában az aktivált fibroblasztok száma és a kollagén mennyisége a tumor centruma felé fokozatosan nő (**23. A, C, D; 24. ábra**), így a kapillárisok és az epithélium közti távolság is növekszik. A kötőszövetes oszlopok kialakulása során a tumorsejtekkel közvetlen érintkező epithélium fokozatosan fragmentálódik (**25. ábra**). 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 (**22. ábra**).



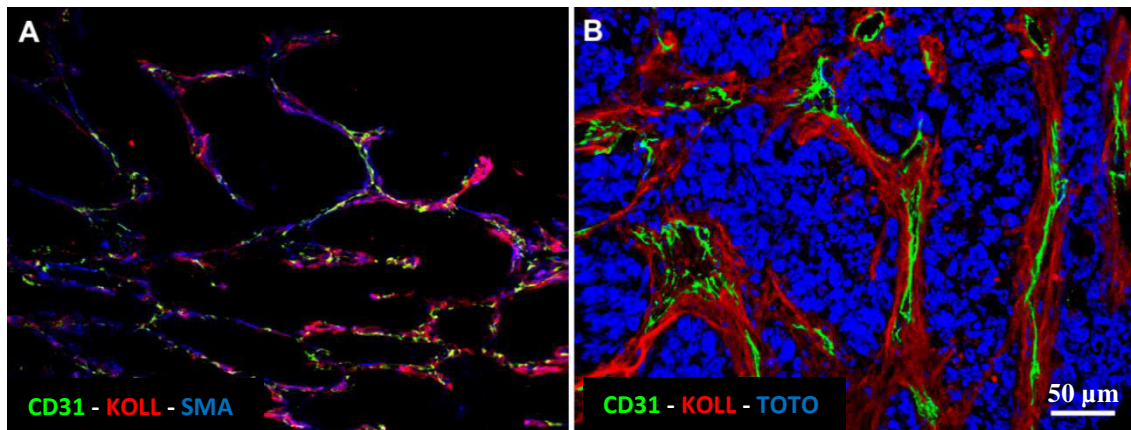


**22. ábra: Intratumorális kötőszövetes oszlop keresztmetszete C38 tüdőmetasztázisban.** (A) A maturált kötőszövetes oszlop egy központi érből (CD31 zöld, laminin kék), az ezt körülvevő  $\alpha$ SMA-t (piros) expresszáló miofibroblasztokból, illetve a tumor által szintetizált bazális membránból (laminin, kék) áll. A struktúrát körülvevő fekete színű terület tumorszövetet tartalmaz. (B) A félvékony metszet egy hasonló intratumorális oszlop keresztmetszetét mutatja. A központi ér körül (nyíl) számos fibroblaszt szerű, több rétegben körkörös elhelyezkedő sejt látható. Megfigyelhetjük, hogy az oszlop külső felszínéhez (mely az előző képen a külső bazális membrán rétegének felel meg) a tumorsejtek polarizált módon kapcsolódnak. Az oszloptól távolabb levő csillagokkal jelzett területeken már nekrotikus tumorszövet látható.



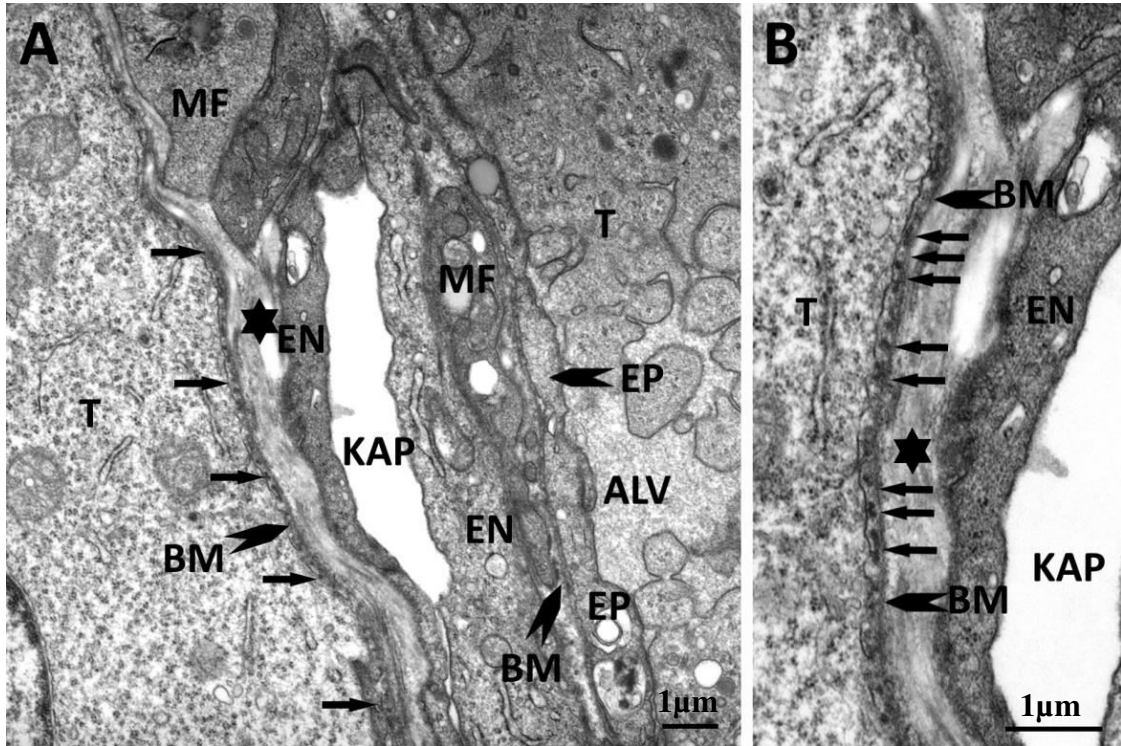
**23. ábra: C38 tüdőmetasztázisokban található kötőszövetes oszlopok kialakulásának folyamata.** CD31 (zöld),  $\alpha$ SMA (piros), laminin (kék) jelzés. A fekete színű területek élő tumorszövetet tartalmaznak. (A) A tumorszövetbe inkorporált alveólus falak fokozatosan alakulnak át kötőszövetes oszlopokká. A kép bal alsó sarkában tumorszövettel részlegesen kitöltött alveólusok láthatóak, melyek falában nem találhatóak miofibroblasztok. Az egybefüggő tumorszövet határához (hármás nyílhegy) közeledve az alveólusokat tumorszövet tölti és tágítja ki. Ezzel párhuzamosan növekszik az alveólusok falában az aktivált,  $\alpha$ SMA-t expresszáló fibroblasztok mennyisége is (piros). Az egybefüggő tumorszövetben nekrotikus területek jelennek meg (csillagok) az erekől meghatározott távolságban, melyek az ábrán piros színűek az anti-egér másodlagos ellenanyag nem specifikus kötődése miatt. A tumor belsejében számos, eltérő mennyiségű eret tartalmazó kötőszövetes oszlop látható (nyilak). (B-D)

Nagy nagyítású felvételek az (A) ábrán 1-3 nyílhegygel jelzett (egy nyílhegy B, kettős nyílhegy C, hármás nyílhegy D), a tumor centrumához egyre közelebb eső területekről. A miofibroblasztok száma növekszik a tumor centruma felé. (B, C) Jól látható, hogy az alveolus falában lévő  $\alpha$ SMA-t expresszáló miofibroblasztok (piros) az alveoláris epitél réteg bazális membránjai (kék) (nyílhegyek), vagy annak bazális membránja és a kapillárisok (CD31, zöld) között (nyilak) helyezkednek el. Az egybefüggő tumorszövet határán (D) a jelentősen megnövekedett számú  $\alpha$ SMA-t expresszáló fibroblasztok (piros) eltávolítják egymástól a kapilláris (nyílhegy) és az epitél réteg bazális membránját (nyíl).



**24. ábra: Az alveolusfalakban lerakódott kollagén mennyisége növekszik a C38 tüdőmetasztázis centruma felé. (A) C38 metasztázis széli része. A metszeten CD31 (zöld), kollagén I (piros) és  $\alpha$ SMA (kék) jelölés látható. Az alveolusokat tumorsejtek (fekete területek) töltik ki. Aktivált  $\alpha$ SMA-pozitív fibroblasztok (kék) vannak jelen az alveolusok falában. A jobb felső sarokban lévő tumor centruma felé egyre növekvő mennyiségű kollagén I (piros) lerakódás látható. A késsel jelölt  $\alpha$ SMA pozitív aktivált fibroblasztok és a kötőszövetes kollagén (piros) eloszlásából látszik, hogy a tumor periferiáján levő aktivált fibroblasztok megjelenése megelőzi a kollagén lerakódását. (B) C38 metasztázis centruma. A metszeten CD31 (zöld), kollagén I (piros) és TOTO-3 (kék) jelölések láthatóak. A kék magfestés mutatja a tumorszövetet. Masszív és egybefüggő kollagén I (piros) pozitív kötőszövetes szeptumok és oszlopok vannak a tumorban, melyek közül néhány egyetlen centrális eret tartalmaz.**

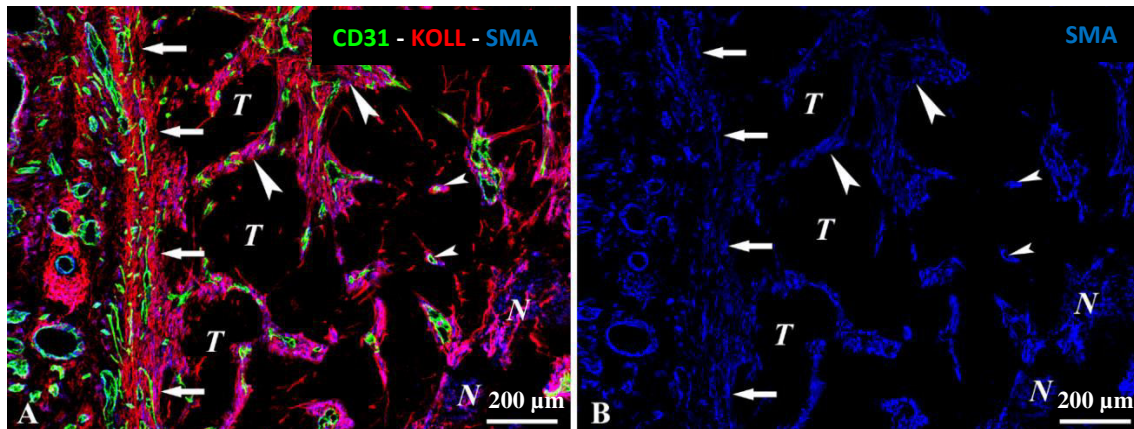




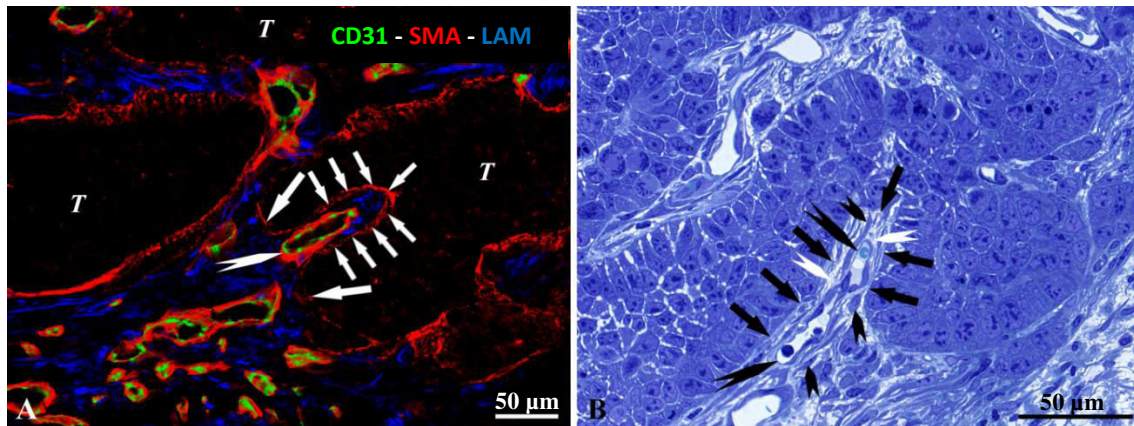
**25. ábra: C38 tüdőmetasztázisba inkorporált alveólusfal szerkezete.** (A) Elektronmikroszkópos felvétel egy alveólusfalról, amit C38 sejtek vesznek körül a metasztázis széli részén. Jobb oldalt az alveoláris teret (ALV) csak részlegesen töltik ki tumorsejtek (T). Ezen a területen az alveólusfalat intakt epitelsejtek (EP) borítják. Fragmentált epitélium (nyilak) van jelen az alveólusfal bal oldalán, ahol a tumorsejtek (T) az epiteliális bazális membrán (BM) közelében helyezkednek el. Az alveólusfalban a miofibroblasztok (MF) mellett kollagén (csillag) is jelen van. KAP: kapilláris, EN: endotél sejt (B) Az (A) ábrán látható bal oldali alveólusfal nagyobb nagyításban. Az epitélium fragmentjei (nyilak) láthatóak a C38 sejt (T) és a bazális membrán (BM) között.

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  $\alpha$ SMA-t expresszáló aktivált fibroblasztok (miofibroblasztok) és kollagén felhalmozódása (26. ábra). A tumorok felszínén különböző méretű invaginációk alakultak ki, melyek eltérő számban tartalmaztak ereket és az ereket körülvevő kötőszövetet (26. ábra). Az invaginációkat a tumor által

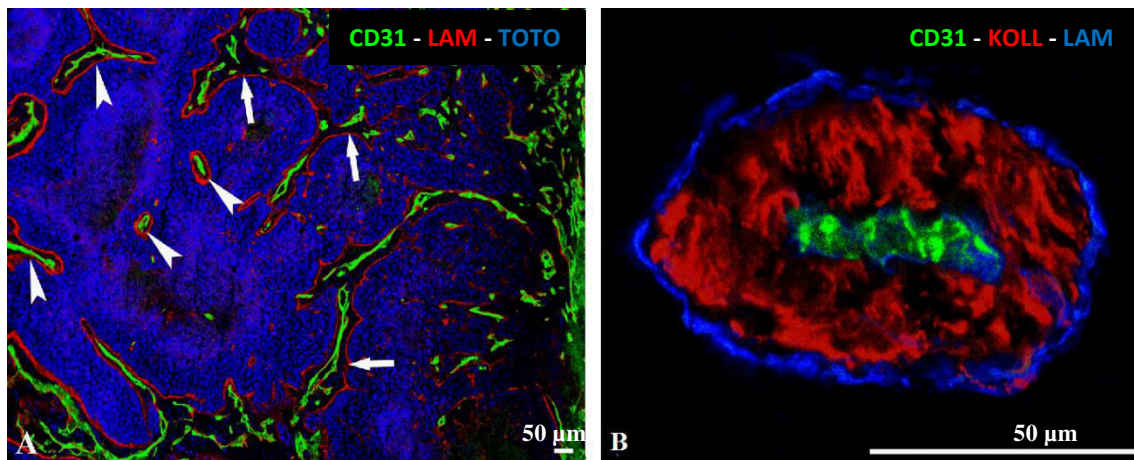
szintetizált bazális membrán (laminin) határolhatja (27. ábra). A több eret tartalmazó invaginációk a tumorszövet centruma felé további “érés folyamatokon” estek át, melynek során a tumorszövetben folyamatosan keletkező invaginációk újabb és újabb területeket/darabokat választanak le az inkorporált szövetről. Az érési folyamat végső eredményeképpen egyetlen centrális érrel rendelkező kötőszövetes oszlopok jönnek létre (28. ábra. B). Fontos megemlíteni, hogy a tumor centruma felé haladva a tumor által termelt és az inkorporált kötőszövet felszínén megjelenő bazális membrán mennyisége fokozatosan nő. A kötőszövetes oszlopok strukturális elemei belülről kifelé haladva: az érlument körbevevő endotélsejtek, az ér bazális membránja,  $\alpha$ SMA pozitív sejtek kollagént tartalmazó mátrixba ágyazva, a tumor bazális membránja (28. ábra B).



**26. ábra: Kötőszövet felhalmozódás és az érbekebelezés a C38 szubkután tumor felszínén.** (A), (B) C38 szubkután tumor (T). Nyilak jelölik a tumor felszínén felhalmozódó kollagén I-et (piros), és az  $\alpha$ SMA-t expresszáló (kék) miofibroblasztokat. A hármas festésű képen a kék  $\alpha$ SMA és a piros kollagén kolokalizációja lila színt eredményez, ezért ezt külön képen (B) mutatjuk. A tumor által a kötőszövettel együtt számos ér (CD31, zöld) kerül bekebelezésre. (nagy nyílhegyek). A tumoron belül az inkorporált kötőszövetből leválasztott kisebb, ereket tartalmazó kötőszövet fragmentumok is láthatóak (kis nyílhegyek). N: nekrosis.

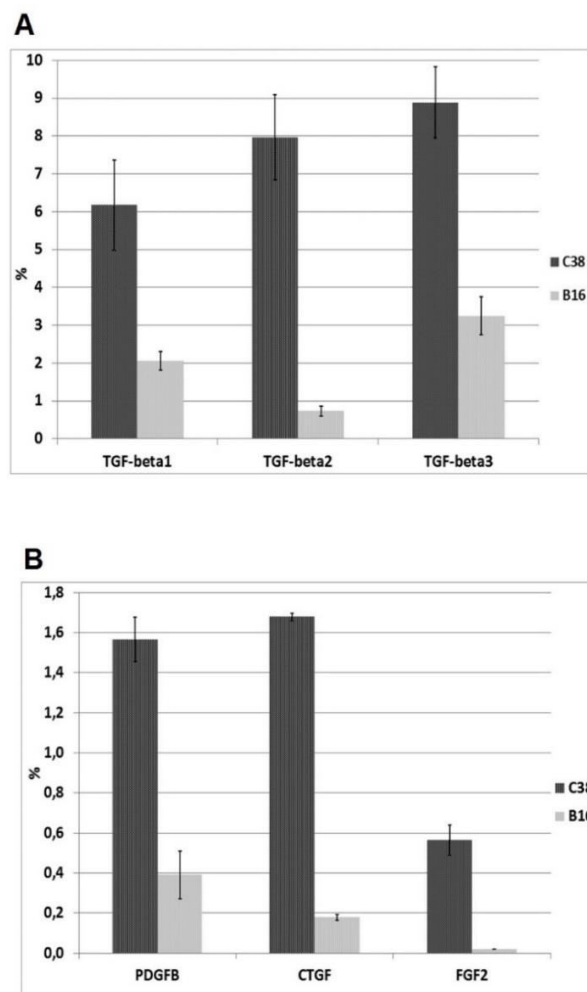


**27. ábra: Az inkorporáció folyamata.** (A) Szubkután tumorról készült fagyasztott metszet, melyen laminin (piros), CD31 (zöld) és  $\alpha$ SMA (kék) jelölés látható. A tumorszövetet (T), mely feketén látszik, a tumorsejtek által termelt laminin veszi körbe. A tumorszövet által képzett invaginációban (kis nyilak), egy nagyobb ér (nagy nyílhegy), illetve az azt körülvevő  $\alpha$ SMA pozitív kötőszöveti sejtek (kék) találhatóak. Az invagináció frontját nagy nyilak jelzik. Az invagináció mélyét folytonos laminin réteg fedi, míg a fronton kevesebb a lerakódott laminin mennyisége. (B) Szubkután C38 tumor félvékony metszete. A tumor egy véreret (nagy nyílhegyek) inkorporál (az invaginációt kis nyilak jelzik), a körülötte levő fibroblaszt szerű sejtekkel (kis nyílhegyek) és mátrix elemekkel együtt (fehér nyílhegyek).



**28. ábra: Az oszlopok érése és végleges formája.** (A) Szubkután C38 tumorból fagyasztott metszeten laminin (piros), CD31 (zöld) és sejtmag (TOTO-3, kék) festés látható. Az inkorporált kötőszövet érési folyamatát a jobb oldalon látható peritumorális szövet felől (mely nagy számú ér tartalmaz), a bal oldalon elhelyezkedő tumor centruma felé figyelhetjük meg. Az inkorporált kötőszövet körül a lerakódott laminin (tumor által termelt) mennyisége a perifériától a centrum irányába növekszik. Kezdetben az inkorporált kötőszövet több ér (nyilak) tartalmaz. Az érési folyamat során kialakulnak ez egyetlen centrális ér tartalmazó kötőszövetes oszlopok (nyílhegyek), melyek körül a legtöbb lerakódott laminin figyelhető meg. (B) Szubkután C38 tumorban lévő kötőszövetes oszlop (a fekete területeket tumorsejtek töltik ki). A már teljesen érett oszlop egy bazális membránnal rendelkező centrális ér tartalmaz (CD31, zöld), melyet a miofibroblasztok által termelt kollagén I kötőszövet (piros) és a tumor által termelt laminin (kék) vesz körül.

Miután a peritumorális fibroblasztok aktiválása és az ezt követő kollagén depozíció kulcsszerepet játszik a C38 tumorra jellemző kötőszövetes oszlopok kialakulásában, annak eldöntésére, hogy a tumor maga mennyiben lehet felelős ennek kiváltásáért, különböző növekedési és fibrotikus folyamatokban résztvevő faktorok (TGF-beta: **29. ábra A**; PDGFB, FGF2, CTGF: **29. ábra B**) expressziós szintjét vizsgáltuk mRNS szinten. Kontrol sejtvonalként a B16 melanóma vonalat használtuk, amely megfigyeléseink szerint nem indukálja kötőszövetes oszlopok létrejöttét növekedése során<sup>4,48,95</sup>. Az összes vizsgált faktor expressziója szignifikánsan magasabb volt a C38 sejtekben.

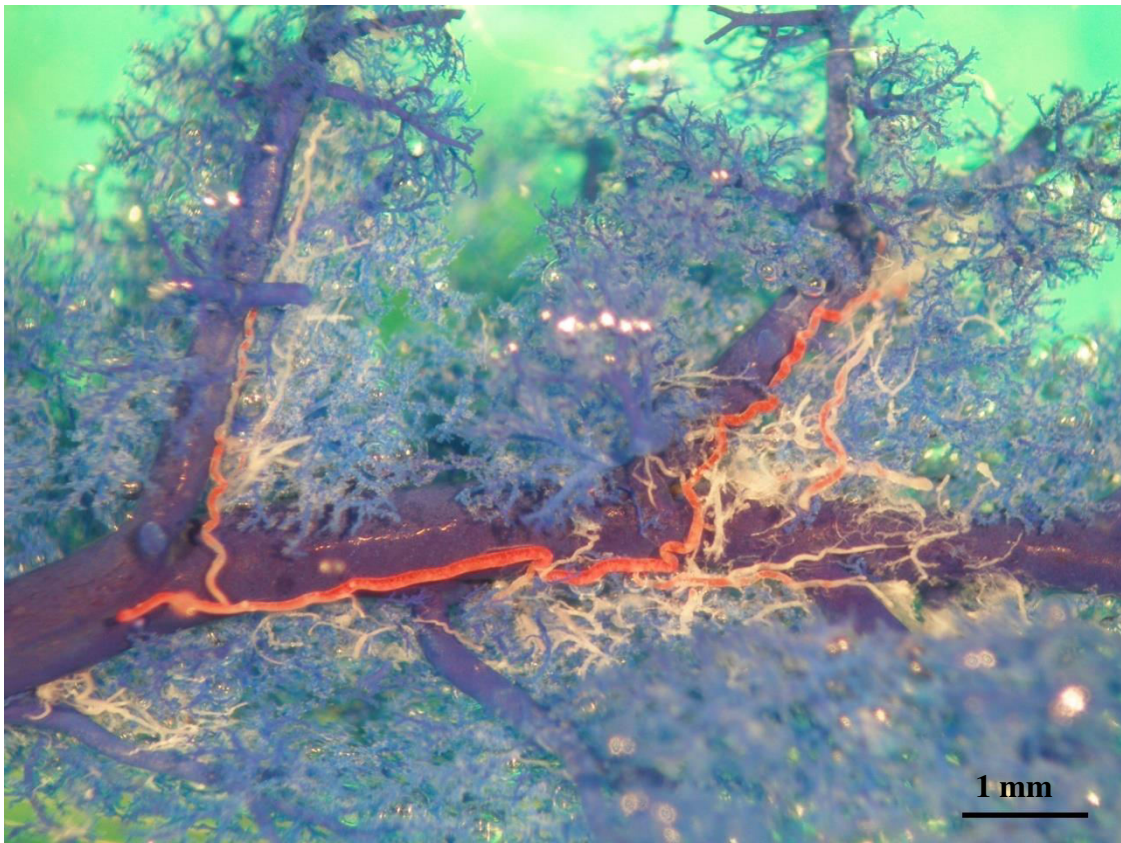


**29. ábra: QRT-PCR analízis. Fibrogén növekedési faktorok génexpressziójának QRT-PCR alapú vizsgálata C38 kolon adenokarcinóma és B16 melanóma sejtvonalakban. (A) TGF-béta 1-3 és (B) PDGFB, CTGF, FGF2 relatív expressziós szintjei a GAPDH-hoz viszonyítva (100%). Az oszlopok a  $2^{-\Delta CT}$  értékeket jelölik, a hibasávok a szórást mutatják.**



#### 4.5. A tüdőmetasztázisok vérellátásának eredete

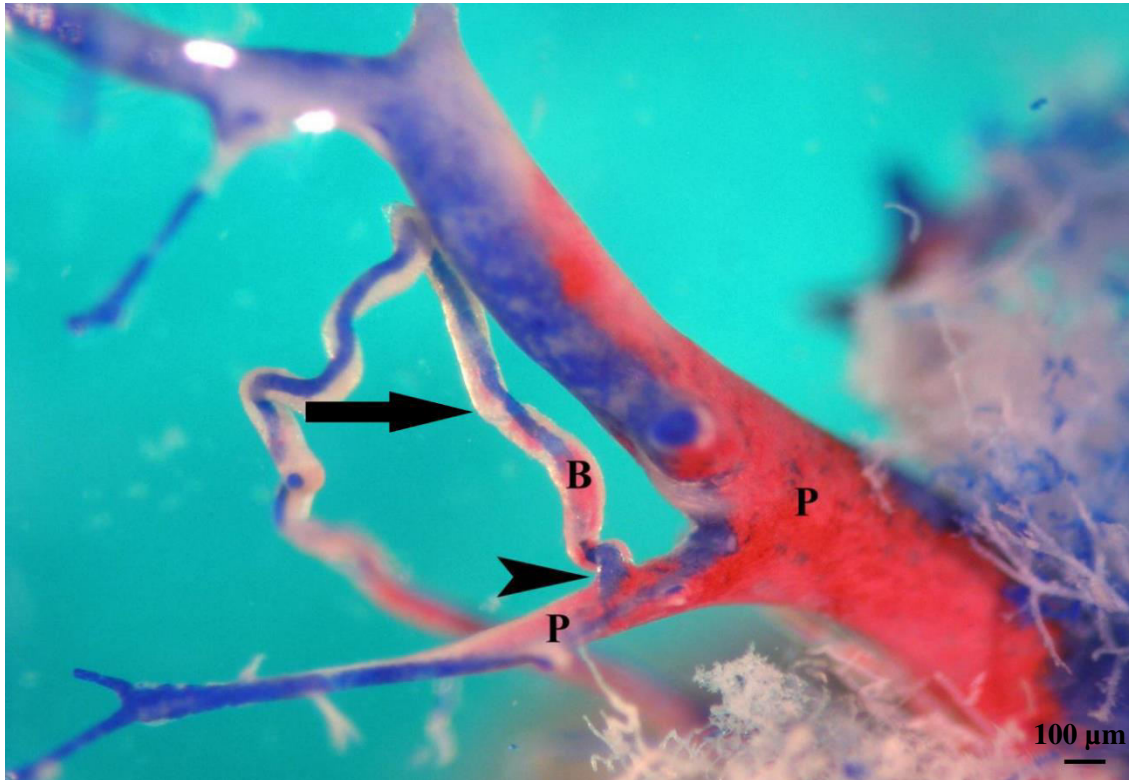
Mivel a tüdő kettős vérellátással rendelkezik hasonlóan a májhoz - melyre vonatkozó korábbi vizsgálataink azt mutatták, hogy a 2 mm-nél nagyobb egér májmetasztázisok artériás vérellátásúak<sup>96</sup> - megvizsgáltuk a tüdőmetasztázisok vérellátásának eredetét. Először kontrol, egereken végeztük kísérleteinket, azonban más kutatókkal szemben<sup>76,77</sup> nem tudtuk bizonyítani a bronchiális artéria létezését egérben. Ezután patkányokon végeztünk vizsgálatokat, ahol igazoltuk a bronchiális artéria jelenlétét (**30. ábra**).



**30. ábra:** A bronchiális artéria ágainak lefutása korrodált kontroll patkány tüdőben. A piros műgyantával feltöltött, kisebb átmérőjű bronchiális artéria a kék műgyantával feltöltött pulmonális artéria közvetlen közelében fut. A bronchiális artéria ágai azonban nem érik el a lebeny felszínét.

Anasztomózisokat találtunk a bronchiális és a pulmonális keringés között (**31. ábra**), melyek meglehetősen hasonlóak a korábban általunk megfigyelt egér májban lévő arterio-portális anasztomózisokhoz. A tüdőben ezért ugyanazon a módszeren

alapuló kettős érfeltöltési technikát alkalmaztuk, mint amit korábban a májmetasztázisok vérellátásának vizsgálata során. Ennek lényege, hogy először a pulmonális rendszert töltjük fel, így kizárjuk, hogy a bronchiális rendszerbe injektált műgyanta a pulmonális rendszeren keresztül jusson be a metastázisokba.

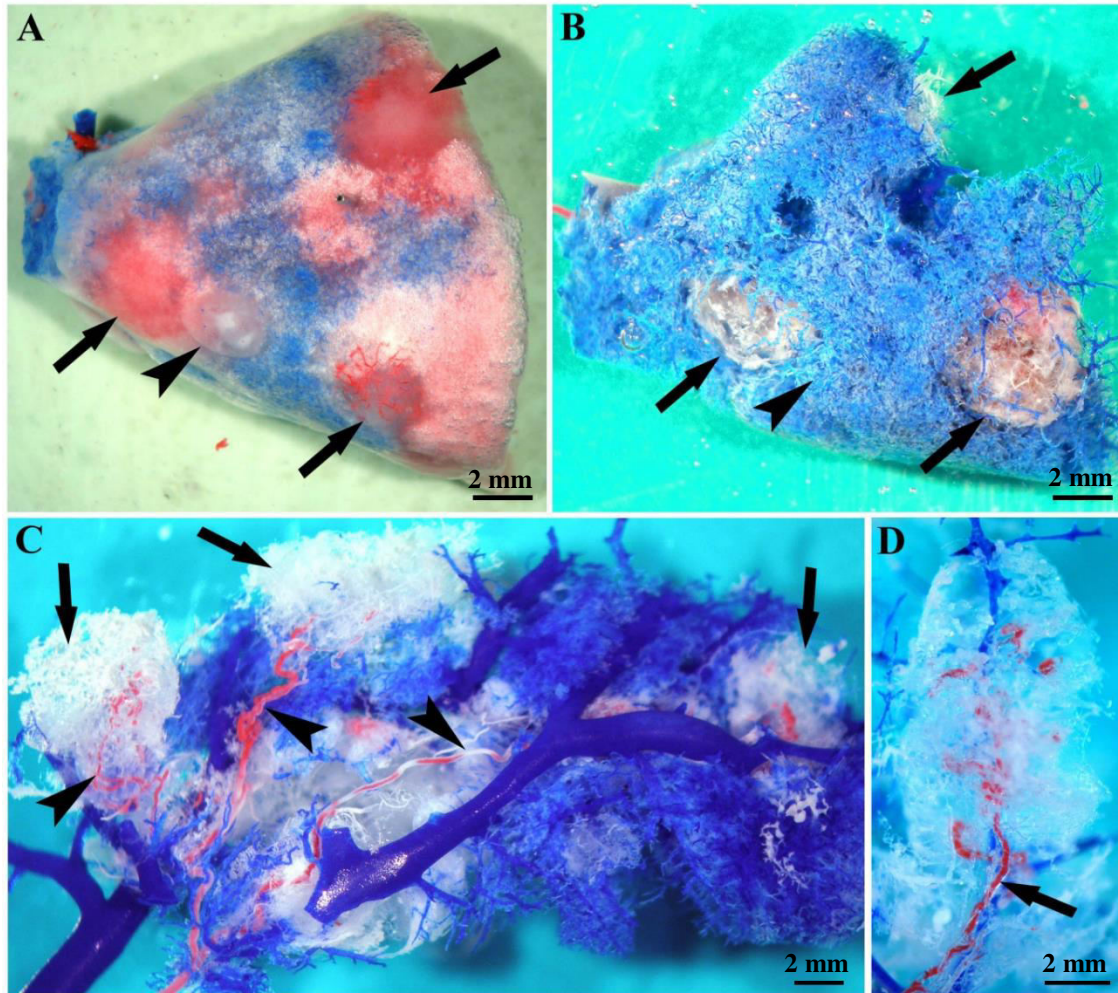


**31. ábra: Broncho-pulmonális anasztomózis korrodált patkány tüdőben.** Kezdeti kísérleteink során a pulmonális artériát (P) kitöltő kék, és a bronchiális artériát (B) kitöltő piros műgyanta keveredését tapasztaltuk, mely broncho-pulmonális anasztomózisok jelenlétére utalt. A bronchiális artéria kis ága (nyíl) egy nagyobb pulmonális artéria ágába torkollik (nyílhegy). Az anasztomózison keresztül a két műgyanta keveredik annak következtében, hogy a pulmonális artériába beadott műgyanta még nem szilárdult meg kellő mértékben.

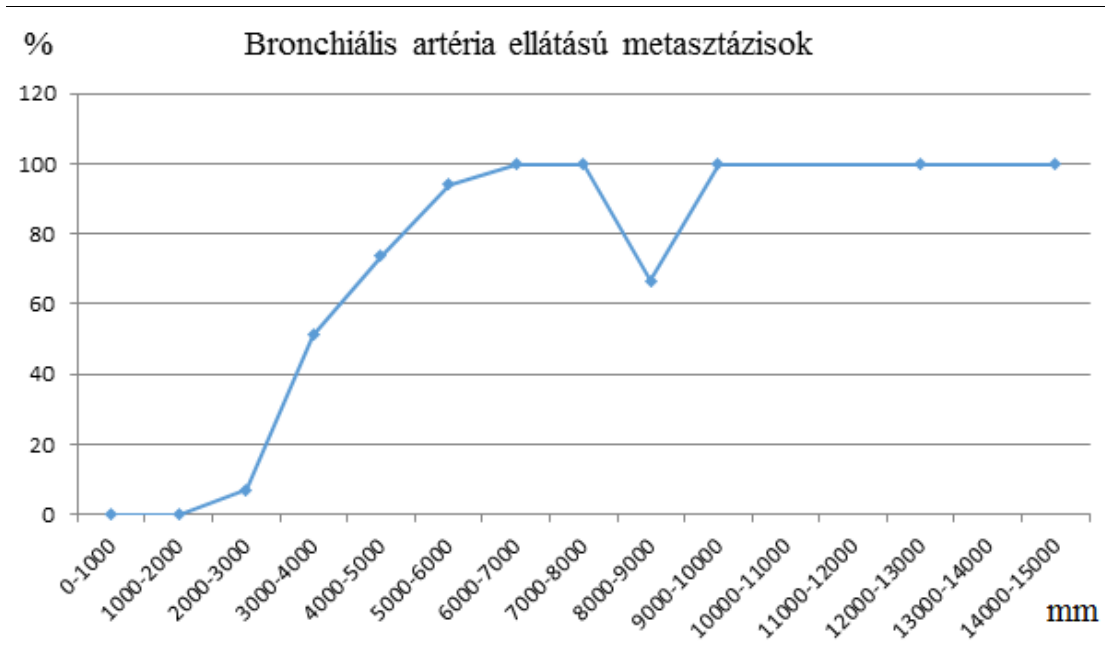
A patkány tüdőben csak a fő artéria ágakat lehetett műgyantával feltölteni, így nem volt lehetséges eldönteni, hogy a szegmentális hörgők rendelkeznek-e artériás vérellátással. A tüdőmetasztázisok vérállatásának meghatározásához a MAT-B-III patkány emlő adenokarcinóma rendszert használtuk. Különböző méretű metastázisokban a vérellátás eredetét vizsgálva azt találtuk, hogy az 5 mm-nél nagyobb átmérőjű metastázisok 95%-a artériás vérellátású (bronchiális artérián keresztül), a 3 mm-nél kisebb metastázisok 97%-a pedig vénás (pulmonális artérián keresztül)



vérellátású (32. ábra A, B, 33. ábra). A metasztázisokat ellátó arteriolák 65%-a centrális helyzetű (32. ábra C, D).



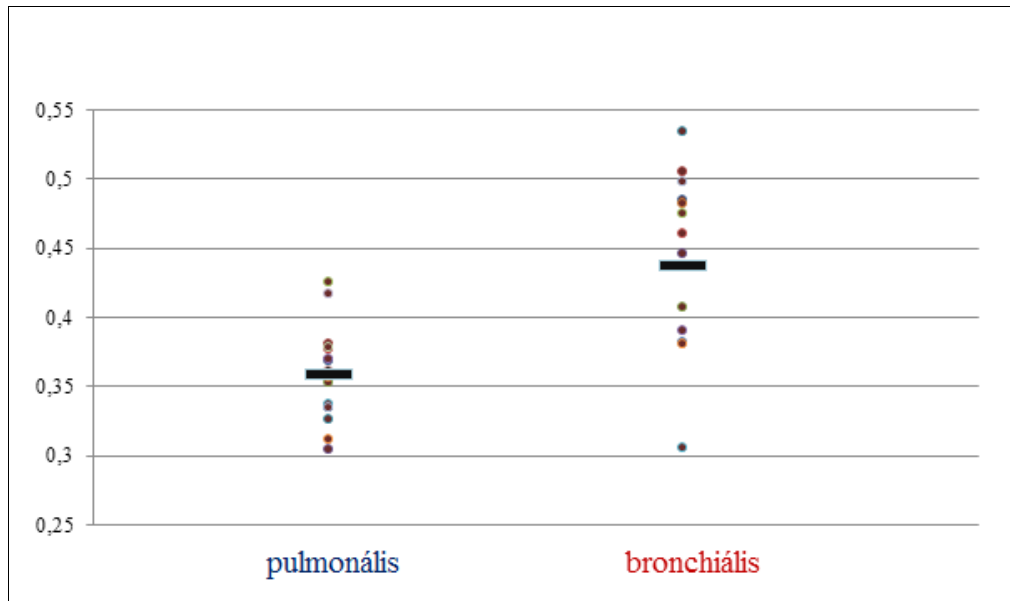
**32. ábra: Tüdőmetasztázisok artériás vérellátásra tesznek szert. (A-D) MAT-B-III emlő adenokarcinóma metasztázisokat tartalmazó tüdőszövet korróziós készítményei. Az (A) és (B) ábrákon a jobb alsó tüdőlebeny látható korrózió előtt (A), illetve korrózió után (B). A tüdő elsőként a pulmonális artérián keresztül lett feltöltve kék műgyantával, melynek megszilárdulása után történt a piros műgyanta bejuttatása a bronchiális artériába. A lebenyben három olyan metasztázis látható, melyeket a bronchiális artéria lát el (nyilak) és egy olyan metasztázis látható, melyet a pulmonális artéria lát el (nyílhegy). Ennek a metasztázisnak csak a helye (üreg a tüdőszövetben, B, nyílhegy) látható, mivel a pulmonális artéria rendszere csak részlegesen került feltöltésre. A kép felső részén lévő metasztázisnak csak egy részét töltötte ki a bronchiális artériába injektált műgyanta, ami a korrózió utáni képen jól látható. (C) A bal tüdőlebeny metasztázisai korrózió után. A jobb láthatóságért a pulmonális artéria ágait részben eltávolítottuk. Három metasztázis látható, melyeket bronchiális artéria lát el (nyilak). Mindegyik metasztázishoz külön bronchiális artéria ág vezet (nyílhegyek). (D) Artériás ellátású metasztázis. A metasztázist ellátó artéria centrális elhelyezkedésű (nyíl).**



**33. ábra: Bronchiális artéria ellátású MAT-B-III metasztázisok százalékos aránya a metasztázis mérethez viszonyítva. 5 mm felett a metasztázisok 95%-a bronchiális ellátású.**

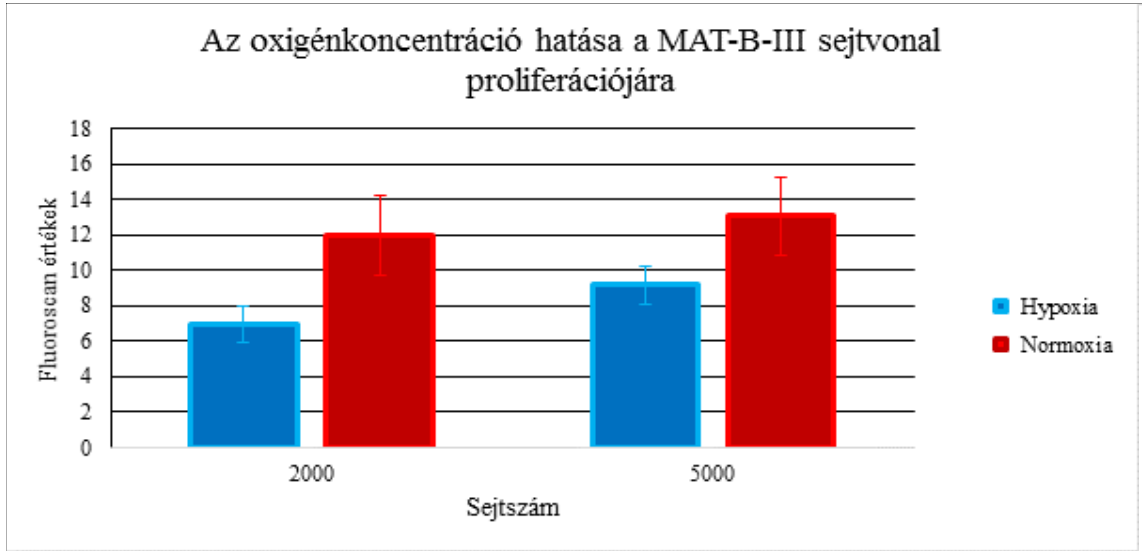
A különböző vérellátású metasztázisok tumorsejtjeinek proliferációs rátáját is összehasonlítottuk. A bronchiális vérellátású metasztázisok tumorsejtjeinek proliferációs indexe szignifikánsan magasabb volt, mint a pulmonális vérellátásúaké ( $43.5 \pm 6.1\%$  vs.  $35.3 \pm 2.5\%$ ; átlag $\pm$ szórás;  $p < 0.05$ ) (**34. ábra**).





**34. ábra: A bronchiális artéria és a pulmonális artéria ellátású MAT-B-III metasztázisok proliferációs indexei.** A pulmonális artéria által ellátott metasztázisok jelzési indexe (BrdU inkorporáció) átlagosan  $35,3 \pm 2,5\%$ , a bronchiális artéria által ellátott metasztázisok jelzési indexének átlaga szignifikánsan magasabb,  $43,5 \pm 6,1\%$ ,  $p < 0,05$ .

Az észlelt magasabb proliferáció és az oxigén koncentráció összefüggésének igazolására *in vitro* hipoxiás és normoxiás körülmények között proliferációs tesztet végeztünk. A normoxiás körülmények között tartott MAT-B-III sejtek esetében a 2000 sejtes csoportban 1,72-szer, az 5000 sejtes csoportban 1,42-szer magasabb proliferációs indexet mértünk, mint a hipoxiás körülmények között tartott sejteknél (**35. ábra**). A normoxiás körülmények között tartott A2058 sejtek esetében a 2000 sejtes csoportban 2,8-szor, 5000 sejt esetében 1,73-szor nagyobb jelet észleltünk, mint az alacsonyabb oxigén koncentráción tartott sejtek esetében. Az eredményeink alapján a magasabb oxigénkoncentráción tartott sejtek szignifikánsan nagyobb mértékben proliferáltak, mint az alacsonyabb oxigénkoncentráción tartott sejtek.



**35. ábra: Az oxigén koncentráció hatása a MAT-B-III sejtvonál proliferációjára.** 2000 és 5000/lyuk kiindulási sejtszám esetében is szignifikánsan nagyobb mértékben proliferáltak a magasabb oxigén koncentráción tartott sejtek.  $p < 0,05$

## 5. Megbeszélés

### 5.1. A kísérletes tüdőmetasztázisok vaszkularizációs folyamata

Az angiogenezisnek, mely tulajdonképpen új erek képződése a már meglévőkből, régóta fontos szerepet tulajdonítanak a tumorok növekedésében<sup>38,95,97,98</sup>. Mára azonban már nyilvánvaló, hogy a tumorok alternatív mechanizmusok útján is képesek szert tenni a vérellátásra<sup>4</sup>. Ilyen alternatív mechanizmusok az érbekebelezés<sup>50</sup>, a glomeruloid angiogenezis<sup>48</sup>, a posztnatális vaszkulogenezis<sup>99</sup> és a vaszkuláris mimikri<sup>60</sup>. Több tanulmány látott napvilágot, amelyek demonstrálják, hogy a tüdőben kialakuló metasztázisokban is megfigyelhetők az alternatív vaszkularizációs mechanizmusok, amelyek magyarázhatják az anti-angiogén terápiák hatástalanságát. Tanaka és munkatársai kimutatták, hogy a glomeruloid érképződés agresszív fenotípussal társul, mely jelentősen csökkenti a nem kissejtes tüdőrákos betegek túlélését<sup>100</sup>. Wu és munkatársai nem kissejtes tüdőrákos páciensek 35%-ában vaszkuláris mimikrit azonosítottak és bebizonyították, hogy a vaszkuláris mimikri összefüggésbe hozható a malignitás növekedésével<sup>101</sup>. Összességében azonban a humán tüdődaganatok kapcsán végzett kutatások alapján az érbekebelezés a leggyakoribb vaszkularizációs forma<sup>51,52,102-105</sup>.

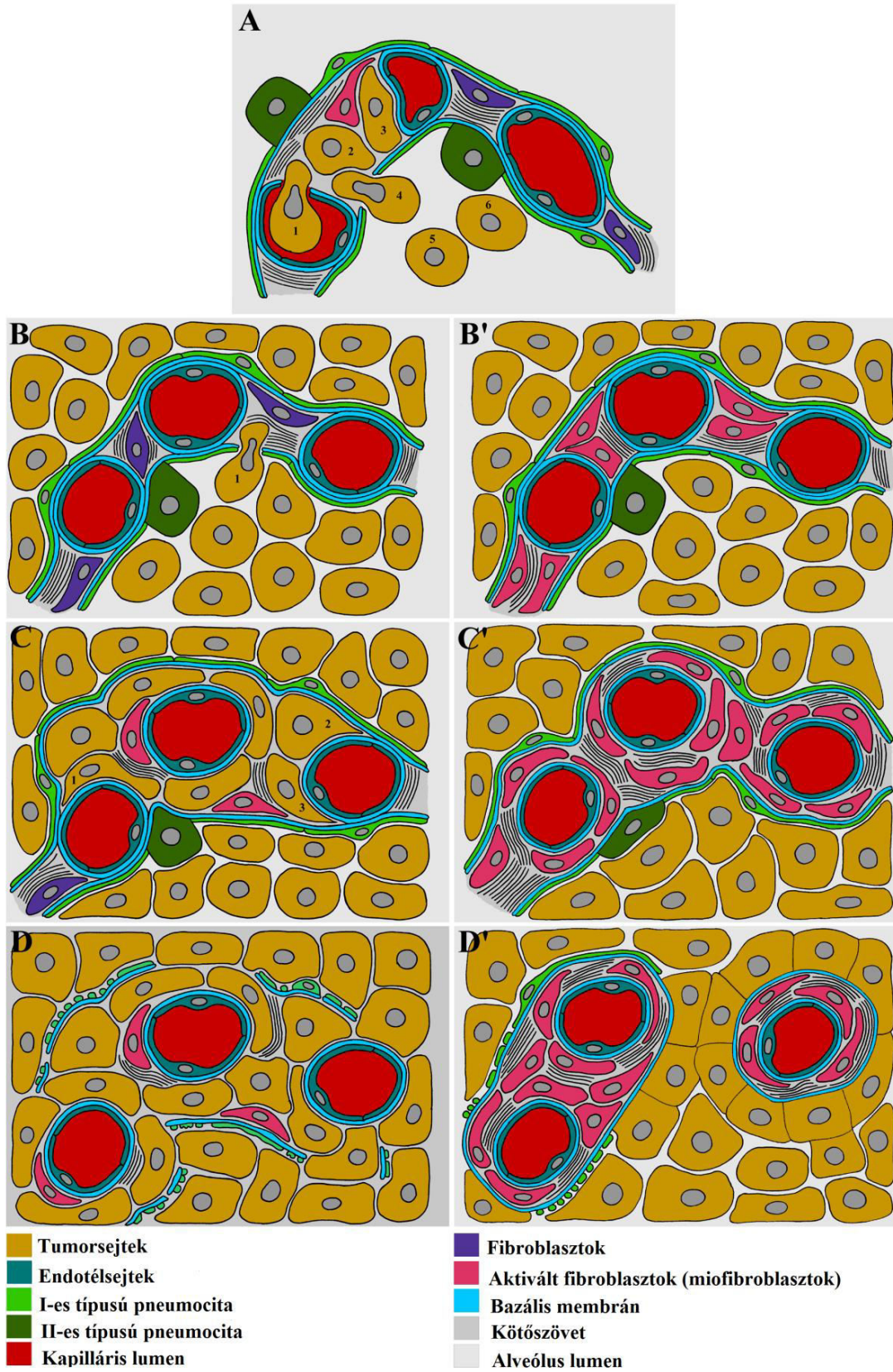
A PhD munkám során kísérletes tüdőmetasztázis modellben vizsgáltuk a vaszkularizáció folyamatát. Hat eltérő szöveti eredetű tumorvonalat használtunk. Mindegyik tumortípus esetében a tumorok elsődlegesen érbekebelezéssel tettek szert vérellátásukra. A tumorok terjedésének alapvető módja minden tumorvonal esetében a tumorszövet alveólusról–alveólusra történő „áramlása” volt, ami minden bizonnyal az alveólusok falában található pórusokon keresztül történt (Kohn pórusok). A folyamat során a tumorok a gazdaszövet alveólusfalakon belüli meglévő kapillárisait inkorporálta, úgy, hogy eközben aktív peritumorális endotélsejt bimbózás, vagyis érdenzitás növekedés nem történt. Mindezt alátámasztja vizsgálatunk, mely szerint a peritumorális endotélsejtek proliferációs rátája alacsony volt. Peritumorális kapilláris sprouting valószínűleg egyrészt azért nem volt megfigyelhető, mert eleve magas a tüdőszövetben lévő kapillárisok denzitása, másrészt a megfelelő mennyiségű kötőszövetes mátrix hiánya az alveólusfalakban is megakadályozhatja az érbimbózást<sup>106,107</sup>. Lehetséges azonban, hogy az intratumorális kapilláris sprouting a tumor növekedés későbbi stádiumában előfordul (feltéve, ha megfelelő mennyiségű

kötőszövet képződik a metasztázisok belsejében). Ezt a feltételezést támasztja alá az a megállapításunk, hogy a MAT-B-III patkány emlő adenokarcinóma metasztázisokban szignifikánsan emelkedett a kötőszövet mennyisége és az intratumorális endotélsejt proliferáció a tumor centruma felé (szemben a peritumorális tüdőszövetben mértékkel). Mindazonáltal az emelkedett endotélsejt proliferáció új kapillárisok képződése mellett, az erek dilatációját is eredményezheti. Ez utóbbi jelenséget vizsgálva kísérletes melanómákon végzett morфомetriai vizsgálatok során úgy találták, hogy a növekvő tumorok inkorporálják a felszínükkel párhuzamos lefutású, sprouting angiogenezissel kialakult ereket, illetve a bőr eredeti érhalózatát. A mérések szerint az érdenzitás a peritumorális szövetben és a daganat periferiáján sokkal nagyobb, mint a tumor centrumában, ezzel szemben az erek mérete ellenkezőleg változik, a tumor centrumában nagyobb átmérőjű erek találhatóak, mint a periferián. Ennek magyarázata lehet, hogy miután ebben a tumor típusban (B16) nem termelődik nagyobb mennyiségű kötőszövet a tumor belsejében az érképződés leáll, a proliferáló tumorszövet mintegy felhigítja az intratumorális érhalózatot. Az endotélsejtek proliferációja kizárólag az intratumorális erek tágulását eredményezi<sup>50</sup>.

## 5.2. Az inkorporáció mechanizmusa

Megállapítottuk, hogy a tumorsejtek az általuk bekebelezett kapillárisokról invazív képességük következtében le tudják választani az epitélréteget. Ezt a jelenséget megfigyeltük a B16, HT1080, HT25, C26 és MAT-B-III modellekben egyaránt. Ezen tumor típusokban a malignus sejtek betörnek az alveólus falba és az endotél és epitél rétegek között elhelyezkedő kettős bazális membránt kettéválasztva migrálnak (**36. ábra A-D**). Az alveólusok bazális membránjának kettéválasztása a tumorsejtek által egy érdekes jelenség, amelyről nem találtunk irodalmi említést. A folyamat pontos molekuláris mechanizmusa és annak szabályozása egyelőre nem tisztázott, de feltehetőleg a tumorsejtek és a bazális membrán közötti adhézió alapszik, továbbá olyan proteázok expresszióján, melyek szelektíven emésztik a bazális membrán komponenseit. Az erekről leválasztott epitélsejtek komprimálódtak és fragmentálódtak majd elpusztultak a tumorszövetben. Azonban az epitélsejtmentes erek funkcionálisak maradtak és a metasztázisok vérellátását biztosították. Az invazív módon növekvő metasztázisokban az alveólusfalak fibroblasztjainak nagy része kapcsolatban marad a

kapillárisokkal. Azonban nem gondoljuk, hogy ezen fibroblasztok pericitaként funkcionálnak, ugyanis nem rendelkeznek bazális membránborítással. Ehelyett inkább azt feltételezzük, hogy ezek a sejtek a metasztázisokban megjelenő kötőszövet termeléséért felelősek. A megállapítás, hogy a tumorban elhelyezkedő ereket nem veszik körül periciták, fontos lehet a metasztázisok kezelésében esetlegesen alkalmazott anti-vaszkuláris terápia során, mivel kimutatták, hogy a pericitamentes erek sérülékenyebbek lehetnek a VEGF koncentrációjának csökkenése esetén, mint a normális pericitaborítással rendelkező erek<sup>108</sup>. Ezzel összefüggésben azonban azt is kimutatták, hogy a periciták maguk is támadási pontot jelenthetnek, ami növelheti az anti-angiogén/anti-vaszkuláris terápia hatékonyságát. A vizsgálatok szerint a VEGF és PDGFR jelátviteli útvonalak kombinált célzott terápia gátolja a B16 egér melanóma tumorok növekedését, csökkenti az érdenzitást és az erek méretét, ezen kívül növeli azon  $\alpha$ SMA és PDGFRB-pozitív periciták számát, melyek már részlegesen elvesztették kapcsolatukat az endotéliummal<sup>108</sup>.



**36. ábra: A vaszkularizációs folyamat vázlatos bemutatása a tüdőmetasztázisokban. (A)** Az ábrán a különféle tüdőmetasztázis modellekben megfigyelt vaszkularizációs folyamatoknak a közös lépései láthatóak. A tüdő kapillárisban lévő tumorsejtek extravazálnak az alveólus interstíciumába (tumorsejt #1). Az alveólus fal kötőszövetében kisebb kolóniák (tumorsejtek #2 és #3) kialakítása után a tumorsejtek betörnek az alveólus lumenbe (tumorsejt #4) és ott tovább proliferálnak (tumorsejtek #5 és #6). A tumormassza az egyik alveólus lumenből a másikba átjutva terjed. Megfigyelhetjük, hogy azon alveólus falakban, melyekben kötőszövet található, a vér-levegő gát bazális membránja szeparálódik egy endotél és egy epitél bazális membrán rétegre az alveólusfal tumorsejt mentes területén is. A **(B-D, B'-D')** képeken ábrázolt események olyan alveólusokban történnek, melyek távol helyezkednek el az eredetileg inkorporált alveólustól vagyis az extravazáció helyétől.

**(B-D)** Az invazív módon növekvő tumorsejtvonalak (B16, HT1080, HT25, C26 és MAT-B-III) vaszkularizációs folyamata. **(B)** A tumorsejtek intenzíven proliferálnak az alveólus lumenben és később ismét betörnek az alveólusfal kötőszövetébe (tumorsejt #1). **(C)** Az alveólusfalban elhelyezkedő tumorsejtek leválasztják az epitéliumot a kapillárisokról. A folyamat során a tumorsejtek nyúlványaikkal kettéválasztják a vér-levegő gát bazális membránját egy epiteliális és egy endoteliális bazális membránra (tumorsejtek #1-3). Végeredményben tumorsejtek által közvetlenül körülvelt (lecsupaszított) kapillárisok jelennek meg a tumorszövetben (középső kapilláris). Az ábra két szélén látható kapilláris még részlegesen borított az epitélium által. **(D)** Teljesen lecsupaszított, tumorsejtekkel körülvelt kapillárisok láthatóak. A töredezett epitélium maradványai elszórtan vannak jelen a tumormasszában.

**(B'-D')** A C38 kolon adenokarcinóma vaszkularizációja során az inkorporált alveólusok falában dezmozplasztikus reakciót vált ki. **(B')** A metasztázis széli részén a tumorsejtek proliferálnak az alveólus lumenben. A tumorsejtek által körbevett alveólus falában fibroblasztok aktiválódnak ( $\alpha$ SMA-t expresszáló miofibroblasztok), de a kollagén lerakódás még nem figyelhető meg. **(C')** A tumor centruma felé haladva megfigyelhető az alveólusok falában a dezmozplasztikus reakció: a miofibroblasztok száma nő, valamint egyre nagyobb mennyiségű kollagént tartalmazó kötőszövetes matrix lerakódása látható. **(D')** Az inkorporált alveólus falak „érés” folyamaton mennek keresztül a metasztázis belsejében, melynek során a tumor az inkorporált szövetet kisebb darabokra osztja. A folyamat végeredményeképpen egyetlen eret tartalmazó kötőszövetes oszlopok jelennek meg a tumorban. A pneumociták fragmentálódnak (ez látható a kép bal oldalán lévő kötőszövetes oszlop felszínén), a tumorsejtek a pneumociták megmaradt bazális membránjához kapcsolódnak vagy a saját bazális membránjukat szintetizálják a kötőszövetes oszlop extracelluláris mátrixának felszínére. Az ábrákon a párhuzamos fekete vonalak a kötőszövetben lévő kollagénekötegeket ábrázolják.

### 5.3. C38 tüdőmetasztázisokban a vérellátást biztosító kötőszövetes oszlopok kialakulása

A C38 tüdőmetasztázis modellben is megfigyeltük, hogy a tumormassza inkorporálja az alveólusokat. Azonban ezen tumortípusnál a tumorsejtek nem léptek vissza az alveólusok interstíciumába, hanem dezmozplasztikus reakciót váltottak ki az inkorporált alveólusok falában, melynek eredményeként kötőszövetes oszlopok jelentek meg a tumorban (**36. Ábra B'-D'**) Az intersticiális fibroblasztok (és a velük együtt járó kollagén mátrix depozíció) aktivációja és megnövekedett száma a két bazális membrán (endotél- és epitél) közti tér fokozatos növekedéséhez vezetett a tumor periferiája felől a tumor centruma felé. Ez a folyamat azt feltételezi, hogy ebben a tumortípusban a vérlevegő gát bazális membránjának két rétegre történő hasadását a proliferáló miofibroblasztok váltják ki, amely hasonló az invazív tumorsejtek esetében megfigyeltekhez. Ezzel párhuzamosan az alveólusok epitéliuma fragmentálódik, majd eltűnik és így a C38 sejtek a bazális membránhoz közvetlenül tudnak csatlakozni. A kötőszövetes oszlopok kialakulásának ebben a stádiumában nem tisztázott, hogy az intratumorális kötőszövetes oszlopok körüli bazális membrán az az epitélium eredeti bazális membránja vagy a C38 sejtek a saját bazális membránjukat újonnan szintetizálják az eredeti bazális membránra. Bár nincsenek specifikus antitestjeink ezen bazális membránok megkülönböztetésére, de az utóbbi feltételezés a valószínűbb, mivel a C38 tumorsejtek szubkután szövet esetében, de más szövetekben is saját bazális membránt szintetizálnak az inkorporált kötőszövet felszínére<sup>47</sup>. Tehát az alveólusfalak átalakulása során a C38 modellben végül olyan kötőszövetes oszlopok jelennek meg, amelyek közepén egy centrális ér található. Ezeknek a struktúráknak a kialakulása a tüdőszövet esetében összefüggésben lehet az alveólusok felépítésével (pórusok az alveólusok falában). Az inkorporáció kezdeti szakaszában a tumormassza feltehetőleg csak az alveólus lumenét tölti ki, így a tumorba inkorporálódott alveólusfalban számos kapilláris helyezkedik el. A későbbiekben a pórusokba behatoló és proliferáló tumorsejtek eltávolítják egymástól az egyes kapillárisokat, melyek körül már korábban kötőszövet szaporodott fel. Végül a centrális érrel rendelkező kötőszövetes oszlopokat (alveólus fal részleteket) mindenütt tumorszövet veszi körül. Fontos megjegyezni, hogy a kötőszövetes oszlopokban felhalmozódott kollagén mátrix elég teret biztosíthat a



„sprouting” típusú angiogenezis beindulásához, ahogy ezt már korábban munkacsoportunk demonstrálta a C38 tumor májmetasztázisaiban<sup>47</sup>.

#### **5.4. A gazdaszövet szerepe a tumorok beereződésében**

Munkacsoportunk korábban máj- és agymetasztázisok, valamint bélfalba oltott tumorok esetében is vizsgálta a C38 tumor ér és kötőszöveti szerkezetét<sup>47,67,69</sup>. Mindegyik szöveti lokalizációban megfigyelhető volt a centrális érrel rendelkező kötőszövetes oszlopok megjelenése a daganatokon belül. Egér agyszövetben azonban csak azokon a területeken voltak ezek a struktúrák detektálhatóak, ahol a tumor elérte az agy felszínét. A tény, hogy az agyszövet a vizsgált szövetek közül az egyetlen szövet melynek parenchimájában nem található fibroblasztok, arra utal, hogy a tumorszerkezet kialakulásának (centrális érrel rendelkező kötőszövetes oszlopok megjelenése) elengedhetetlen feltétele az aktivált fibroblasztok ( $\alpha$ SMA pozitivitás, kollagén szintézis) jelenléte és felszaporodása a tumor közvetlen közelében. Ezzel magyarázható, hogy a C38 agymetasztázisok esetében csak azon területeken voltak jelen ezek a jellegzetes kötőszövetes oszlopok, ahol a tumor elérte az agy felszínét, ahol a meningeális fibroblasztok találhatóak<sup>69</sup>.

A disszertációmban tüdő- és szubkután szövetekben növekvő tumorok esetében vizsgáltuk és hasonlítottuk össze az ér- és a kötőszövet szerkezet kialakulását, illetve az inkorporáció mechanizmusát. Miután mindkét szövetben található fibroblasztok, melyek kollagént termelő és proliferáló miofibroblasztokká transzformálódtak a tumorok környezetében, a tumorok végső szerkezete a két szövetben hasonló volt, és a kialakult kötőszövetes oszlopok struktúrája megegyezett a májszövet és a bélfal esetében megfigyeltekkel. Az inkorporáció módja a tüdőszövet sajátos struktúrájának következtében eltért a két vizsgált szövetben. A szubkután szövetben a tumor felszínén invaginációk keletkeztek, melyek eltérő mennyiségű kötőszövetet (kollagén és miofibroblasztok) és eltérő számú eret tartalmaztak. A kötőszövet “érése” a tumor belsejében folytatódott, ami abban nyilvánult meg, hogy újabb és újabb invaginációk képződésével a tumor egyre kisebb darabokat választ le az inkorporált szövetből, mely folyamat az egyetlen eret tartalmazó kötőszövetes oszlopok kialakulásával végződik. A tüdő esetében az alveolus falakban található kapillárisok a Kohn pórusok jelenléte miatt már nagyrészt el vannak választva egymástól, a proliferáló tumormassza behatolása

ezekbe a terekbe csak eltávolítja egymástól az egyre nagyobb mennyiségű kötőszövetet és kapillárisokat tartalmazó alveolusfal részeket.

A fibroblasztok stimulációja és transzformációja miofibroblasztokká a tumor növekedése következtében fellépő mechanikai nyomás<sup>109</sup> mellett, fibrogén növekedési faktorok szintézise és szekréciója által történhet. Ez utóbbi elképzelést támasztja alá az az eredményünk, hogy a kötőszövetes oszlopokat képző C38 sejtek a fibrogén kapacitással rendelkező növekedési faktorokat (TGF-béta, FGF2, PDGF és CTGF<sup>45,60,99</sup>) nagyobb mértékben expresszálják<sup>45,60,99</sup>, mint a B16 melanóma, mely különböző szöveti lokalizációkban oszlopokat nem képez, kis mennyiségű kollagén csak az intratumorális erek körül rakódik le<sup>48,50,95</sup>.

A kötőszövetes oszlopok szubkután szövetben megfigyelt kialakulási folyamata alátámasztja a tumorok ereződésének alapvető mechanizmusát is, miszerint nem az erek nőnek bele a tumorba, hanem tumorszövet inkorporálja a peritumorális érhálózatot. A tumor által létrehozott oszlopokban lévő kötőszövet mennyisége, valamint az ezek felszínére lerakódott (tumorsejtek által szintetizált) bazális membrán vastagsága és integritása a tumor centruma felé nőtt, ami azt mutatja, hogy a tumor centrumában lévő struktúrák hosszabb ideje vannak a tumorszövetben (“öregebbek”), mint a periférián levők<sup>38,97,98,110</sup>.

Összegezve, a tumor mikrokörnyezetében a megfelelő sejttípusok jelenléte, valamint a tumorsejtek által szintetizált fibrogén faktorok a tumorok hasonló hisztológiai szerkezetét eredményezik, függetlenül a gazdászövet típusától.

### **5.5. A tüdőmetasztázisok arterializációja**

Munkacsoportunk egy korábbi tanulmányban már leírta, hogy kísérletes egér májmetasztázisok a 2 – 2,5 mm körüli mérettartományban arterializálódnak<sup>96</sup>. Az általunk vizsgált patkány tüdőmetasztázis modellben kapott eredmények azt igazolják, hogy a tüdőmetasztázisok is artériás vérellátásra tesznek szert. A növekvő tumor inkorporálja a nagy nyomású bronchiális ereket, melyek hasonlóan a máj arteriolákhoz gyakran centrális helyzetűek a metasztázison belül. Ez a folyamat valószínűleg tisztán mechanikai jellegű és feltehetően az artériás rendszerben uralkodó nyomás által szabályozott.

A tüdőmetasztázisok arterializálódása 5 mm méret felett történt meg a metasztázisok döntő többségében. A jelentős eltérés oka az arterializálódott máj és a tüdő metasztázisok méretében abban kereshető, hogy a patkánytüdő perifériáján adataink alapján nincs artériás ellátás (szemben az egér májjal, ahol az artériás rendszer a szerv minden területét ellátja), így a periférián kialakuló metasztázisok csak nagyobb méret esetén érik el és inkorporálják az artériás rendszert.

Az artériás vérellátású MAT-B-III metasztázisok proliferációs rátája jelentősen magasabb, mint a pulmonális vérellátású tumoroké. Nem teljesen világos a mechanizmus, mely a pulmonális vérellátású metasztázisok viszonylag alacsony tumorsejt proliferációs rátáját okozza, de számos tanulmány azt igazolja, hogy a hipoxia lelassíthatja, vagy akár teljesen gátolhatja is a tumorsejtek proliferációját *in vitro* és *in vivo* egyaránt<sup>111-113</sup>. Érdekes, hogy a 3LL-HH és C38 májmetasztázisok sejtjeinek jelzési indexe nem emelkedett meg artériás vérellátás esetén. Ennek oka lehet, hogy e két tumorvonal jelzési indexe normál körülmények között is igen magas (50-55%), amit a magasabb oxigén koncentráció már nem képes növelni. Ezzel szemben a májmetasztázis modellben vizsgált A2058 humán melanóma<sup>96</sup> és a tüdőmetasztázis modellben vizsgált patkány MAT-B-III emlő adenokarcinóma sejtvonaltumorainak viszonylag alacsony volt a jelzési indexük, ami növekedett, ha portális (34,1%) helyett artériás (38,3%), illetve, ha pulmonális (35,3%) helyett bronchiális (43,5%) vérellátásra tettek szert.

Az *in vitro* kísérleteink során mindkét vizsgált kiindulási sejtszám (2000 és 5000/lyuk) esetében úgy találtuk, hogy a magasabb oxigénszinten tartott sejtek szignifikánsan nagyobb mértékben proliferáltak, mint az alacsonyabb oxigén koncentráción tartott sejtek.

*In vivo* és *in vitro* eredményeink egyaránt azt mutatták, hogy a magasabb oxigén koncentráció, ami a tüdőben a bronchiális artéria által ellátott metasztázisokban található, a metasztázis számára növekedési előnyt biztosít. Vagyis nem csak a nagyobb méretből következik a bronchiális artéria általi ellátottság az artéria inkorporációja révén, hanem ezt követően a magasabb oxigénellátás fokozott növekedési rátát biztosít.

Eredményeink felvetik, hogy a bronchiális artérián keresztül adott lokális kezelés növelheti pulmonális daganatok elleni kemoterápia hatásosságát.

### 5.6. A tüdőmetasztázisok klinikai kezelésének jelentősége

A tüdő a metasztázisképzés során a harmadik leggyakrabban érintett célszerv, ezért a metasztázisok érhálózatának vizsgálata alapvető jelentőséggel bír<sup>83-86,114,115</sup>.

Kísérletes rendszerünknek köszönhetően lépésről lépésre tanulmányozhattuk a tüdőmetasztázisok vaszkularizációjának folyamatát különböző eredetű tumorvonalak esetében. A vaszkularizáció folyamatának legfontosabb eleme a tüdő meglévő ereinek bekebelezése, illetve az alveólus falak invazív és nem invazív növekedési mintázatot mutató tumorvonalak esetében eltérő mechanizmusok alapján történő módosítása úgy, hogy az inkorporált erek biztosítsák a metasztázisok vérellátását. Eredményeink azonban nem csupán arra szolgáltatnak bizonyítékot, hogy a jellegzetes „alveoláris növekedési mintázatot”, melyet humán tüdőmetasztázisok esetében írtak le<sup>52,105</sup>, megfelelően modellezhetjük kísérletes *in vivo* rendszerben, hanem komoly kérdéseket vet fel a tüdőmetasztázisok esetében az anti-angiogén szerek terápiás használatával kapcsolatban. A konvencionális anti-angiogén szereket, mint a bevacizumab és a sunitinib, úgy tervezték, hogy a sprouting angiogenezis folyamatát célozzák az endotélsejtek proliferációjának gátlásán keresztül. Felmerül tehát a kérdés, hogy ezen terápiák hogy lehetnek sikeresek a tüdőmetasztázisok esetében, melyek a szerv meglévő érhálózatának bekebelezésével tesznek szert vérellátásukra.

Egy tanulmány során vizsgálták a tumor vaszkularizáció mechanizmusait 164 humán tüdőmetasztázis mintában (emlő, kolorektális és vese tumor tüdőmetasztázis) és kísérletes modellekben. Négy különböző szövettani növekedési mintázatot (alveoláris, intersticiális, perivaszkuláris, pushing) azonosítottak, melyek mindegyike különbözőképpen vaszkularizált. Három esetben érinkorporációval történt a vaszkularizáció, azonban a negyedik típus, melyre a pushing típusú növekedési mintázat volt jellemző, sprouting angiogenezissel tett szert vérellátására. Kísérletes modellekben, amikor szubkután nőttek a daganatok, minden esetben hatásos volt a sunitinib kezelés: kisebb tumor méreteket és kisebb érdenzitást mértek. Ennek hátterében az áll, hogy ebben a lokalizációban a tumorok szövettani eredetüktől függetlenül nagyrészt sprouting angiogenezissel tesznek szert érhálózatukra. Azonban, amikor a sejteket intravénás oltással juttatták az állatokba, ezzel tüdőkolóniákat formálva, azt tapasztalták, hogy két vonal esetében, ahol érinkorporációval tettek szert a tumorok az ereikre, a sunitinibnek semmilyen hatása nem volt a tumorok érződésére, és a

növekedésére. Azonban az egyik vonal esetében, ahol angiogén pushing típusú növekedési mintázat is megfigyelhető volt a tumor növekedése során, az anti-angiogén terápia hatásosnak mutatkozott az erek számának csökkentésében. Viszont a sunitinib terápia eredményeként a tumor növekedésében megfigyelhető volt egyfajta váltás, az érinkorporáció szerepe nőtt meg, a tumor rezisztens lett az anti-angiogén terápiára<sup>116</sup>. Ezt a feltételezést támasztják alá más klinikai megfigyelések is. Kolorektális adenokarcinóma májmetasztázisban, valamint humán emlőrák májmetasztázisban szenvedő betegeknél az anti-angiogén bevacizumab (anti-VEGF antitest) terápia eredményei nem biztatóak. Preklinikai vizsgálatok azt támasztják alá, hogy ilyen típusú daganatos betegek kezelése során az angiogenezis és az érinkorporáció együttes/kombinált gátlása lehet a megfelelő terápiás stratégia<sup>117</sup>.

Nemrég új invazív stratégiákat dolgoztak ki a tüdőmetasztázis klinikai kezelésének javítására, mint például a katéteres kemoembolizációt. Nem teljesen tisztázott, hogy a primer és a metasztatikus tüdőtumornak pulmonális és/vagy bronchiális vérellátásuk van. Emiatt nincs elfogadott kemoembolizációs protokoll, először meg kell állapítani, hogy a tumorokat a pulmonális vagy a bronchiális rendszeren keresztül katéterezzék, vagy perfundálják<sup>86,118</sup>. Eredményeink azt mutatják, hogy a tumormérettől függ, hogy a tüdőmetasztázis bronchiális vagy pulmonális vérellátású, ez pedig fontos szempont lehet a katéteres kemoembolizációs terápiák jövőbeni alkalmazását illetően. Úgy gondoljuk, hogy az általunk megállapított 5 mm-es kritikus méret az artériás ellátás (bronchiális) kialakulására humán vonatkozásban nagyon kicsinek tekinthető, a tüdőmetasztázisok döntő többsége már meghaladja ezt a méretet a felismeréskor, tehát az artériás kemoembolizáció hatékony terápiának bizonyulhat.

## 6. Következtetések, új megállapítások

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 inkorporácót 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 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.

## 7. Összefoglalás

Kutatásainkban kísérletes tüdőmetasztázisok vaszkularizációját vizsgáltuk hat különböző szöveti eredetű tumorsejtvonal (B16: egér melanóma; HT1080: humán fibroszarkóma; HT25: humán vastagbélrák; C26 és C38: egér vastagbélrák; MAT-B-III: patkány emlőrák) esetében. A tumorsejtek az extravazációt követően kisebb kolóniákat alakítottak ki az alveólusfalak kötőszövetében. Ezt követően betörték az alveoláris térbe, és ott növekedtek tovább. Minden tumorvonal esetében a terjedés módja a alveólusról alveólusra történő „áramlás” volt. A tumorok a terjedésnek ebben a szakaszában inkorporálják az intakt alveólusfalakat a bennük levő kapillárisokkal együtt. A metasztázisok szélén elhelyezkedő, de már tumorszövet által kitöltött alveólusok falának szerkezete kezdetben megtartott volt (pneumociták–kettős bazális membrán–endotélium). A peritumorális szövetben új erek nem képződnek. A C38 kivételével a többi vonal esetében a tumorsejtek később újra belépnek az alveólusok falába, és az epiteliális és endoteliális bazális membrán között migrálva leválasztják a pneumocitákat bazális membránjukkal együtt az erekről. A lecsupaszított erek azonban funkcionálisak maradnak és biztosítják a tumor vérellátását. A nem invazív C38 tumorok dezmozplasztikus reakciót váltanak ki az alveólusfalban, melynek következményeként funkcionális ereket tartalmazó kötőszövetes oszlopok alakulnak ki. Ezek a struktúrák a tumor növekedési helyétől függetlenül (tüdő, szubkután szövet, máj, bélfal) ugyanolyan szerkezetűek. Létrejöttükért a tumor körüli aktiválódott fibroblasztok és a tumorsejtek által termelt fibrogén faktorok felelősek. A C38 tumor növekedése során a környező ereket és az azokat körülvevő, kötőszövetet szintetizáló sejteket bekebelezi. Az 5 mm-nél nagyobb átmérőjű metasztázisok 95%-a artériás vérellátású (bronchiális artérián keresztül), a 3 mm-nél kisebb metasztázisok 97%-a pedig vénás vérellátású (pulmonális artérián keresztül). A magasabb oxigénkoncentráció, ami a tüdőben a bronchiális artéria által ellátott metasztázisokban található, a metasztázis számára növekedési előnyt biztosít, és ezt a megfigyelést *in vitro* kísérletekben is igazoltuk.

Eredményeink szerint a tüdőmetasztázisok ereződésének alapmechanizmusa a gazdaszerv ereinek inkorporációja, szemben az endotélsejt proliferációval járó bimbózással, ami felelős lehet a klasszikus anti-angiogén terápiák hatástalanságáért a metasztázisok kezelésében.



## 8. Summary

We investigated the vascularization of experimental lung metastases in six different tumor models of various tissue origins (B16 murine melanoma; HT1080 human fibrosarcoma; HT25 human colon carcinoma; C26 and C38 murine colon carcinomas; MAT-B-III rat breast carcinoma). Tumor cells, after extravasation formed small colonies in the connective tissue of the alveolar walls. Then they invaded into the alveolar space and continued to grow there. For all tumor lines, the basic mechanism of the spread was the "flow" of the tumor tissue from alveolus to alveolus. During this process the tumor mass incorporated the intact alveolar walls together with the capillaries located in them. The alveolar walls retained their normal structure (pneumocytes – double basal membrane – endothelium). In the peritumoral tissue no new blood vessels are formed. Tumor cells, except the C38 colon carcinoma, later reentered into the walls of the alveoli and migrated between the epithelial and endothelial basal membranes separating the pneumocytes from the capillaries. The denuded vessels remain functional and provided blood supply for the tumor. The non-invasive C38 tumor induced a desmoplastic reaction in the alveolar walls, which process culminated in the appearance of connective tissue columns with central vessels in the metastases. We investigated the development of these columns in different tissues and organs and found that these structures had identical structure in all investigated sites (lung, subcutaneous tissue, liver, intestinal wall). The development of the columns was dependent on the presence of fibroblasts in the tumor microenvironment and on the fibrogenic factors produced by the tumor. As a result, collagen producing activated fibroblasts appeared peritumorally which together with vessels were incorporated by the tumor mass. Examining the origin of blood supply in pulmonary metastases, we found that 95% of metastases with a diameter larger than 5 mm had arterial (via bronchial artery) and 97% of metastases with a diameter less than 3 mm had venous (pulmonary arteries) supply. Tumor cells of metastases with arterial supply showed enhanced proliferation rate which suggests that elevated oxygen concentration provides growth advantage. This observation was confirmed in *in vitro* experiments as well. According to our results, the basic mechanism of vascularization of pulmonary metastases is the incorporation of the host vessels, which may be responsible for the inefficiency of classical anti-angiogenic therapies in the treatment of the lung metastases.

## 9. Irodalomjegyzék

- <sup>1</sup> Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J. (1998) Vasculogenesis, Angiogenesis and Growth Factors: Ephrins Enter the Fray at the Border. *Cell*, 93: 661-664.
- <sup>2</sup> Patan S. (2000) Vasculogenesis and Angiogenesis as Mechanisms of Vascular Network Formation, Growth and Remodeling. *J Neurooncol*, 50: 1-15.
- <sup>3</sup> Risau W. (1995) Differentiation of endothelium. *Faseb Journal*, 9: 926-933.
- <sup>4</sup> Döme B, Hendrix MJ, Paku S, Tóvári J, Tímár J. (2007) Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol*, 170: 1-15.
- <sup>5</sup> Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Ekblom P, Kemler R, Doetschman T. (1988) Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development*, 102: 471-478.
- <sup>6</sup> Tonini T, Rossi F, Claudio PP. (2003) Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene*, 22: 6549-6556.
- <sup>7</sup> Ferrara N. (1999) Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med (Berl)*, 77: 527-543.
- <sup>8</sup> Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, Berse B, Nagy JA, Sotrel A, Manseau EJ, Van de Water L, Senger DR. Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. *J Exp Med*. 1991 Nov 1;174(5):1275-1278.
- <sup>9</sup> Karl H. Plate, Georg Breier, Herbert A. Weich & Werner Risau. (1992) Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 359: 845–848.
- <sup>10</sup> Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HE, Ferrara N. (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362: 841–844.

- <sup>11</sup> Rahimi N, Dayanir V, Lashkari K. (2000) Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem.* 275: 16986–16992.
- <sup>12</sup> Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Communi D, Shibuya M, Collen D, Conway EM, Carmeliet P. (2003) Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med.* 9: 936–943.
- <sup>13</sup> Neagoe PE, Lemieux C, Sirois MG. (2005) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165-induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor-1 and -2 heterodimer. *J Biol Chem.* 280: 9904–9912.
- <sup>14</sup> Shibuya M. (2011) Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis. A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer*, 2: 1097–1105.
- <sup>15</sup> Krock BL, Skuli N, Simon MC. (2011) Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil. *Genes Cancer*, 2: 1117-1133.
- <sup>16</sup> Semenza GL. (2000) HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol.* 88: 1474–1480.
- <sup>7</sup> Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is mediated by an O<sub>2</sub>-dependant degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 7987–7992.
- <sup>8</sup> Réz G. (2002) A daganatok érendszere. *Természet Világa*, 133.évfolyam, 11.szám, 2002. november. 490.
- <sup>19</sup> Heldin CH. (2013) Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Commun Signal*, 11: 97.
- <sup>20</sup> Machein MR, Knedla A, Knoth R, Wagner S, Neuschl E, Plate KH. (2004) Angiopoietin-1 promotes tumor angiogenesis in a rat glioma model. *Am J Pathol*, 165: 1557-1570.

- <sup>21</sup> Stoeltzing O, Ahmad SA, Liu W, McCarty MF, Wey JS, Parikh AA, Fan F, Reinmuth N, Kawaguchi M, Bucana CD, Ellis LM. (2003) Angiopoietin-1 Inhibits Vascular Permeability, Angiogenesis, and Growth of Hepatic Colon Cancer Tumors. *Cancer Res*, 63: 3370-3377.
- <sup>22</sup> Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, Sato TN, Yancopoulos GD. (1998) Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science*, 282: 468-471.
- <sup>23</sup> Hayes AJ, Huang WQ, Mallah J, Yang D, Lippman ME, Li LY. (1999) Angiopoietin-1 and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. *Microvasc Res*, 58: 224-237.
- <sup>24</sup> Ahmad SA, Liu W, Jung YD, Fan F, Wilson M, Reinmuth N, Shaheen RM, Bucana CD, Ellis LM. (2001) The effects of angiopoietin-1 and -2 on tumor growth and angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Res*, 61:1255-1259.
- <sup>25</sup> Tania M. Hansen,<sup>a</sup> Harprit Singh,<sup>b</sup> Tariq A. Tahir,<sup>a</sup> and Nicholas P.J. (2010) Brindle effects of angiopoietins-1 and -2 on the receptor tyrosine kinase Tie2 are differentially regulated at the endothelial cell surface. *Cell Signal*. 22: 527–532.
- <sup>26</sup> Kaminska B, Wesolowska A, Danilkiewicz M. (2005) TGF beta signalling and its role in tumour pathogenesis. *Acta Biochim Pol*, 52: 329-337.
- <sup>27</sup> Pardali E, ten Dijke P. (2009) Transforming growth factor-beta signaling and tumor angiogenesis. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14: 4848-4861.
- <sup>28</sup> Tian M, Neil JR, Schiemann WP. (2001) Transforming growth factor-beta and the hallmarks of cancer. *Cellular Signalling*. 23: 951–962.
- <sup>29</sup> Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoogendam J, van Der Bent C, Papapoulos SE, van Der Bent C, Papapoulos SE, Löwik CW. (2002) Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology*. 143: 1545–1553.
- <sup>30</sup> Rossant J, Howard L. (2002) Signaling pathways in vascular development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 18: 541–73.

- <sup>31</sup> Montesano R, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R, Orci L. (1986) Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83: 7297-7301.
- <sup>32</sup> Okada-Ban M, Thiery JP, Jouanneau J. (2000) Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol* 32: 263–267.
- <sup>33</sup> Nishida T, Kubota S, Aoyama E, Janune D, Maeda A, Takigawa M. (2011) Effect of CCN2 on FGF2-induced proliferation and MMP9 and MMP13 productions by chondrocytes. *Endocrinology* 52: 4232–4241.
- <sup>34</sup> Kim HR, Heo YM, Jeong KI, Kim YM, Jang HL, LEE KY, Yeo CY, Kim SH, Lee HK, Kim SR, Kim EG, Choi JK. (2012) FGF-2 inhibits TNF- $\alpha$  mediated apoptosis through upregulation of Bcl2-A1 and Bcl-xL in ATDC5 cells. *BMB Rep* 45: 287–292.
- <sup>35</sup> Lindner DJ. (2002) Interferons as antiangiogenic agents. *Curr Oncol Rep*. 4: 510-514.
- <sup>36</sup> Norioka K, Mitaka T, Mochizuki Y, Hara M, Kawagoe M, Nakamura H. (1994) Interaction of interleukin-1 and interferon-gamma on fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *Jpn J Cancer Res*, 85: 522-529.
- <sup>37</sup> Lawler PR, Lawler J. (2012) Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2: a006627.
- <sup>38</sup> Folkman J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285: 1182-1186.
- <sup>39</sup> Folkman J. (1972) Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg*, 175: 409-416.
- <sup>40</sup> Folkman J, Cotran R. (1976) Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev Exp Pathol*, 16: 207-248.
- <sup>41</sup> Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. (1977) *Microvasc Res*. 14: 53-65.
- <sup>42</sup> Tímár J, Paku S, Tóvári J, Döme B. (2006) Az antivaszkuláris terápia elvi alapjai, *Magyar Onkológia*, Budapest, 2: 141-151.

- <sup>43</sup> Paku S, Paweletz N. (1991) First steps of tumor-related angiogenesis. *Lab Invest*, 65: 334-346.
- <sup>44</sup> Paku S, Sebestyén A, Kopper L. (2015) Angiogenesis, antiangiogenesis, *Klinikai Onkológia*, Budapest, 2: 185-199.
- <sup>45</sup> Paku S, Dezso K, Bugyik E, Tóvári J, Tímár J, Nagy P, Laszlo V, Klepetko W, Döme B. (2011) A new mechanism for pillar formation during tumor induced intussusceptive angiogenesis: inverse sprouting. *Am J Pathol*, 179: 1573-1585.
- <sup>46</sup> Hlushchuk R, Riesterer O, Baum O, Wood J, Gruber G, Pruschy M, Djonov V. (2008) Tumor recovery by angiogenic switch from sprouting to intussusceptive angiogenesis after treatment with PTK787/ZK222584 or ionizing radiation. *Am J Pathol*, 173: 1173-1185.
- <sup>47</sup> Paku S, Kopper L, Nagy P. (2005) Development of the vasculature in "pushing-type" liver metastases of an experimental colorectal cancer. *Int J Cancer*, 115: 893-902.
- <sup>48</sup> Döme B, Tímár J, Paku S. (2003) A novel concept of glomeruloid body formation in experimental cerebral metastases. *J Neuropathol Exp Neurol*, 62: 655-661.
- <sup>49</sup> Thompson WD, Shiach KJ, Fraser RA, McIntosh LC, Simpson JG. (1987) Tumors acquire their vasculature by vessel incorporation, not vessel ingrowth. *J Pathol*, 151: 323-332.
- <sup>50</sup> Döme B, Paku S, Somlai B, Tímár J. (2002) Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. *J Pathol*, 197: 355-362.
- <sup>51</sup> Pezzella F, Pastorino U, Tagliabue E, Andreola S, Sozzi G, Gasparini G, Menard S, Gatter KC, Harris AL, Fox S, Buyse M, Pilotti S, Pierotti M, Rilke F. (1997) Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am J Pathol*, 151: 1417-1423
- <sup>52</sup> Pezzella F, Di Bacco A, Andreola S, Nicholson AG, Pastorino U, Harris AL. (1996) Angiogenesis in primary lung cancer and lung secondaries. *Eur J Cancer*, 32A: 2494-2500.

- <sup>53</sup> Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. (1999) Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*, 284: 1994-1998.
- <sup>54</sup> Straume O, Chappuis PO, Salvesen HB, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Goffin JR, Bégin LR, Foulkes WD, Akslen LA. (2002) Prognostic importance of glomeruloid microvascular proliferation indicates an aggressive angiogenic phenotype in human cancers. *Cancer Res*, 62: 6808-6811.
- <sup>55</sup> Stiver SI, Tan X, Brown LF, Hedley-Whyte ET, Dvorak HF. (2004) VEGF-A angiogenesis induces a stable neovasculature in adult murine brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, 63: 841-855.
- <sup>56</sup> Ribatti D, Vacca A, Nico B, Roncali L, Dammacco F. (2001) Postnatal vasculogenesis. *Mech Dev*, 100: 157-163.
- <sup>57</sup> Balaji S, King A, Crombleholme TM, Keswani SG. (2013) The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2: 283-295.
- <sup>58</sup> Gao D, Nolan D, McDonnell K, Vahdat L, Benezra R, Altorki N, Mittal V. (2009) Bone marrow-derived endothelial progenitor cells contribute to the angiogenic switch in tumor growth and metastatic progression.. *Biochim Biophys Acta*, 1796: 33-40.
- <sup>59</sup> Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275: 964-967.
- <sup>60</sup> Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. (1999) Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol*, 155: 739-752.
- <sup>61</sup> Milne EN, Margulis AR, Noonan CD, Stoughton JT. (1967) Histologic type-specific vascular patterns in rat tumors. *Cancer*, 20: 1635-1646.



- <sup>62</sup> Konerding MA, Malkusch W, Klapthor B, van Ackern C, Fait E, Hill SA, Parkins C, Chaplin DJ, Presta M, Denekamp J. (1999) Evidence for characteristic vascular patterns in solid tumours: quantitative studies using corrosion casts. *Br J Cancer*, 80: 724-732.
- <sup>63</sup> Solesvik OV, Rofstad EK, Brustad T. (1982) Vascular structure of five human malignant melanomas grown in athymic nude mice. *Br J Cancer*, 46: 557-567.
- <sup>64</sup> Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, Klinkert WE, Goldbrunner R, Herms J, Winkler F. (2010) Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med*, 16: 116-122.
- <sup>65</sup> Carbonell WS, Ansorge O, Sibson N, Muschel R. (2009) The vascular basement membrane as "soil" in brain metastasis. *PLoS One*, 4: 5857.
- <sup>66</sup> Paku S, Timár J, Lapis K. (1990) Ultrastructure of invasion in different tissue types by Lewis lung tumour variants. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 417: 435-442.
- <sup>67</sup> Vermeulen PB, Colpaert C, Salgado R, Royers R, Hellemans H, Van Den Heuvel E, Goovaerts G, Dirix LY, Van Marck E. (2001) Liver metastases from colorectal adenocarcinomas grow in three patterns with different angiogenesis and desmoplasia. *J Pathol*, 195: 336-342.
- <sup>68</sup> Stessels F, Van den Eynden G, Van der Auwera I, Salgado R, Van den Heuvel E, Harris AL, Jackson DG, Colpaert CG, van Marck EA, Dirix LY, Vermeulen PB. (2004) Breast adenocarcinoma liver metastases, in contrast to colorectal cancer liver metastases, display a non-angiogenic growth pattern that preserves the stroma and lacks hypoxia. *Br J Cancer*, 90: 1429-1436.
- <sup>69</sup> Bugyik E, Dezso K, Reiniger L, László V, Tóvári J, Tímár J, Nagy P, Klepetko W, Döme B, Paku S. (2011) Lack of angiogenesis in experimental brain metastases. *J Neuropathol Exp Neurol*, 70: 979-991.
- <sup>70</sup> Réz G, Péczely P. (2007) Összehasonlító anatómiai praktikum II. Zboray Géza (Szerk.) Nemzeti Tankönyvkiadó, 2007. Budapest, 197-271.
- <sup>71</sup> Desplechain C, Foliguet B, Barrat E, Grignon G, Touati F. (1983) The pores of Kohn in pulmonary alveoli. *Bull Eur Physiopathol Respir*. 19:59-68.

- <sup>72</sup> Szentágothai J, Réthelyi M. (2006) *Funkcionális Anatómia*. nyolcadik kiadás Medicina Kiadó Rt., Budapest, 2006. 375-379.
- <sup>73</sup> Horváth L. (2004) *Funkcionális anatómia*. Nemzeti Tankönyvkiadó Rt., Budapest, 2004. 209-217.
- <sup>74</sup> Walker CM, Rosado-de-Christenson ML, Martínez-Jiménez S, Kunin JR, Wible BC. (2015) Bronchial arteries: anatomy, function, hypertrophy, and anomalies. *Radiographics*, 35: 32-49.
- <sup>75</sup> Hasegawa I, Kobayashi K, Kohda E, Hiramatsu K. (1999) Bronchopulmonary arterial anastomosis at the precapillary level in human lung. Visualization using CT angiography compared with microangiography of autopsied lung. *Acta Radiol*, 40: 578-584.
- <sup>76</sup> Verloop, MC. (1949) On the arteriae bronchiales and their anastomosing with the arteria pulmonalis in some rodents; a micro-anatomical study. *Acta Anat (Basel)*. 7: 1-32.
- <sup>77</sup> Mitzner W, Lee W, Georgakopoulos D, Wagner E. (2000) Angiogenesis in the mouse lung. *Am J Pathol*, 157: 93-101.
- <sup>78</sup> Savai R, Wolf JC, Greschus S, Eul BG, Schermuly RT, Hänze J, Voswinkel R, Langheinrich AC, Grimminger F, Traupe H, Seeger W, Rose F. (2005) Analysis of tumor vessel supply in Lewis lung carcinoma in mice by fluorescent microsphere distribution and imaging with micro- and flat-panel computed tomography. *Am J Pathol*, 167: 937-946.
- <sup>79</sup> Krishnan K, Khanna C, Helman LJ. (2006) The molecular biology of pulmonary metastasis. *Thorac Surg Clin*, 16: 115-124.
- <sup>80</sup> Snyder BJ, Pugatch RD. (1998) Imaging characteristics of metastatic disease to the chest. *Chest Surg Clin N Am*, 8: 29-48.
- <sup>81</sup> Davis SD. (1991) CT evaluation for pulmonary metastases in patients with extrathoracic malignancy. *Radiology*, 180: 1-12.

- <sup>82</sup> Crow J, Slavin G, Kreel L. (1981) Pulmonary metastasis: a pathologic and radiologic study. *Cancer*, 47: 2595-2602.
- <sup>83</sup> Schweiger T, Lang G, Klepetko W, Hoetzenecker K. (2014) Prognostic factors in pulmonary metastasectomy: spotlight on molecular and radiological markers. *Eur J Cardiothorac Surg*, 45: 408-416.
- <sup>84</sup> Bar J, Herbst RS, Onn A. (2009) Targeted drug delivery strategies to treat lung metastasis. *Expert Opin Drug Deliv*, 6: 1003-1016.
- <sup>85</sup> Zheng Y, Fernando HC. (2010) Surgical and nonresectional therapies for pulmonary metastasis. *Surg Clin North Am*, 90: 1041-1051.
- <sup>86</sup> Vogl TJ, Shafinaderi M, Zangos S, Lindemayr S, Vatankhah K. (2013) Regional chemotherapy of the lung: transpulmonary chemoembolization in malignant lung tumors. *Semin Intervent Radiol*, 30: 176-184.
- <sup>87</sup> Minchinton AI, Tannock IF. (2006) Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer*, 6: 583-592.
- <sup>88</sup> Moreno Garcia V, Basu B, Molife LR, Kaye SB. (2012) Combining antiangiogenics to overcome resistance: rationale and clinical experience. *Clin Cancer Res*, 18: 3750-3761.
- <sup>89</sup> Mountzios G, Pentheroudakis G, Carmeliet P. (2014) Bevacizumab and micrometastases: revisiting the preclinical and clinical rollercoaster. *Pharmacol Ther*, 141: 117-124.
- <sup>90</sup> Ebos JM, Kerbel RS. (2011) Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nat Rev Clin Oncol*, 8: 210-221.
- <sup>91</sup> Vasudev NS, Reynolds AR. (2014) Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis*, 17: 471-494.
- <sup>92</sup> Folkman J, Cotran R. Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev Exp Pathol* 16: 207-248. 1976.

- <sup>93</sup> Knierim M, Paku S, Paweletz N, Spiess E. Ultrastructural studies on the lung colonization by nonmetastatic rat tumor cells. (1986) *Anticancer Res.* 6: 669-682.
- <sup>94</sup> Paku S, Paweletz N, Spiess E, Aulenbacher P, Werling HO, Knierim M. Ultrastructural analysis of experimentally induced invasion in the rat lung by tumor cells metastasizing lymphatically. (1986) *Anticancer Res.* 6: 957-966.
- <sup>95</sup> Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. (1971) Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 133: 275-288.
- <sup>96</sup> Dezso K, Bugyik E, Papp V, László V, Döme B, Tóvári J, Tímár J, Nagy P, Paku S. (2009) Development of arterial blood supply in experimental liver metastases. *Am J Pathol*, 175: 835-843.
- <sup>97</sup> Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? (1990) *J Natl Cancer Inst* 82: 4-6.
- <sup>98</sup> Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674.
- <sup>99</sup> Dome B, Timar J, Ladanyi A, Paku S, Renyi-Vamos F, Klepetko W, Lang G, Dome P, Bogos K, Tovari J. (2009) Circulating endothelial cells, bone marrow-derived endothelial progenitor cells and proangiogenic hematopoietic cells in cancer: From biology to therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*, 69: 108-124.
- <sup>100</sup> Tanaka F, Oyanagi H, Takenaka K, Ishikawa S, Yanagihara K, Miyahara R, Kawano Y, Li M, Otake Y, Wada H. (2003) Glomeruloid microvascular proliferation is superior to intratumoral microvessel density as a prognostic marker in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 63: 6791-6794.
- <sup>101</sup> Wu S, Yu L, Wang D, Zhou L, Cheng Z, Chai D, Ma L, Tao Y. (2012) Aberrant expression of CD133 in non-small cell lung cancer and its relationship to vasculogenic mimicry. *BMC Cancer*, 12: 535.

- <sup>102</sup> Adighibe O, Micklem K, Campo L, Ferguson M, Harris A, Pozos R, Gatter K, Pezzella F. (2006) Is nonangiogenesis a novel pathway for cancer progression? A study using 3-dimensional tumour reconstructions. *Br J Cancer*, 94: 1176-1179.
- <sup>103</sup> Pezzella F, Manzotti M, Di Bacco A, Viale G, Nicholson AG, Price R, Ratcliffe C, Pastorino U, Gatter KC, Harris AL, Altman DG, Pilotti S, Veronesi U. (2000) Evidence for novel non-angiogenic pathway in breast-cancer metastasis. *Lancet*, 355: 1787-1788
- <sup>04</sup> Yousem SA. (2009) Peripheral squamous cell carcinoma of lung: patterns of growth with particular focus on airspace filling. *Hum Pathol*, 40: 861-867.
- <sup>105</sup> Sardari Nia P, Hendriks J, Friedel G, Van Schil P, Van Marck E. (2007) Distinct angiogenic and non-angiogenic growth patterns of lung metastases from renal cell carcinoma. *Histopathology*, 51: 354-361.
- <sup>106</sup> Low FN. (1971) Extracellular components of the pulmonary alveolar wall. *Arch Intern Med*, 127: 847-852.
- <sup>107</sup> Rosario EJ, Lewis CW, Gureenberg SD, Kennedy JH. (1973) The architecture of the alveolar wall: an ultrastructural study in man. *Cardiovasc Res Cent Bull*, 12: 13-20.
- <sup>108</sup> Erber R, Thurnher A, Katsen AD, Groth G, Kerger H, Hammes HP, Menger MD, Ullrich A, Vajkoczy P. (2004) Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB J*, 18: 338-340.
- <sup>109</sup> Burri PH, Tarek MR. A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat Rec* 1990; 228: 35-45.
- <sup>110</sup> Caduff JH, Fischer LC, Burri PH. (1986) Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *Anat Rec* 216: 154-164.
- <sup>111</sup> Giaccia AJ. (1996) Hypoxic Stress Proteins: Survival of the Fittest. *Semin Radiat Oncol*, 6: 46-58.
- <sup>112</sup> Siemann DW, Keng PC. (1988) Characterization of radiation resistant hypoxic cell subpopulations in KHT sarcomas. (II). Cell sorting. *Br J Cancer*, 58: 296-300.

<sup>113</sup> Tannock IF. (1968) The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour. *Br J Cancer*, 22: 258-273.

<sup>114</sup> Budczies J, von Winterfeld M, Klauschen F, Bockmayr M, Lennerz JK, Denkert C, Wolf T, Warth A, Dietel M, Anagnostopoulos I, Weichert W, Wittschieber D, Stenzinger A. (2015) The landscape of metastatic progression patterns across major human cancers. *Oncotarget*, 6: 570-583.

<sup>115</sup> Pastorino U, Buyse M, Friedel G, Ginsberg RJ, Girard P, Goldstraw P, Johnston M, McCormack P, Pass H, Putnam JB Jr; International Registry of Lung Metastases. (1997) Long-term results of lung metastasectomy: prognostic analyses based on 5206 cases. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 113: 37-49.

<sup>116</sup> Bridgeman VL, Vermeulen PB, Foo S, Bilecz A, Daley F, Kostaras E, Nathan MR, Wan E, Frentzas S, Schweiger T, Hegedus B, Hoetzenecker K, Renyi-Vamos F, Kuczynski EA, Vasudev NS, Larkin J, Gore M, Dvorak HF, Paku S, Kerbel RS, Dome B, Reynolds AR. (2017) Vessel co-option is common in human lung metastases and mediates resistance to anti-angiogenic therapy in preclinical lung metastasis models. *J Pathol*. 241:362-374.

<sup>117</sup> Frentzas S, Simoneau E, Bridgeman VL, Vermeulen PB, Foo S, Kostaras E, Nathan M, Wotherspoon A, Gao ZH, Shi Y, Van den Eynden G, Daley F, Peckitt C, Tan X, Salman A, Lazaris A, Gazinska P, Berg TJ, Eltahir Z, Ritsma L, Van Rheenen J, Khashper A, Brown G, Nystrom H, Sund M, Van Laere S, Loyer E, Dirix L, Cunningham D, Metrakos P, Reynolds AR. (2016) Vessel co-option mediates resistance to anti-angiogenic therapy in liver metastases. *Nat Med*, 22: 1294-1302.

<sup>118</sup> Mallick R, Demmy T. Regional lung chemotherapy techniques. *Innovations (Phila)* 2011; 6: 1-9.

## 11. Saját publikációk jegyzéke

### 11.1. 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



### 11.2. 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 Jan 1;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

## 12. 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.

# Mechanism of tumour vascularization in experimental lung metastases

Vanessza Szabo,<sup>1</sup> Edina Bugyik,<sup>1</sup> Katalin Dezso,<sup>1</sup> Nora Ecker,<sup>1</sup> Peter Nagy,<sup>1</sup> Jozsef Timar,<sup>2,3</sup> Jozsef Tovari,<sup>4,5</sup> Viktoria Laszlo,<sup>6</sup> Victoria L Bridgeman,<sup>7</sup> Elaine Wan,<sup>7</sup> Sophia Frentzas,<sup>7</sup> Peter B Vermeulen,<sup>7,8</sup> Andrew R Reynolds,<sup>7,\*†</sup> Balazs Dome<sup>5,6,9,10,†\*</sup> and Sandor Paku<sup>1,2,\*†</sup>

<sup>1</sup> 1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Budapest, Hungary

<sup>2</sup> Tumor Progression Research Group, Hungarian Academy of Sciences–Semmelweis University, Budapest, Hungary

<sup>3</sup> 2nd Department of Pathology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

<sup>4</sup> Department of Experimental Pharmacology, National Institute of Oncology, Budapest, Hungary

<sup>5</sup> Department of Thoracic Surgery, Semmelweis University–National Institute of Oncology, Budapest, Hungary

<sup>6</sup> Department of Thoracic Surgery, Medical University of Vienna, Austria

<sup>7</sup> Tumour Biology Team, Breakthrough Breast Cancer Research Centre, The Institute of Cancer Research, London, UK

<sup>8</sup> Translational Cancer Research Unit, GZA Hospitals Sint-Augustinus, Antwerp, Belgium

<sup>9</sup> National Koranyi Institute of Pulmonology, Budapest, Hungary

<sup>10</sup> Department of Biomedical Imaging and Image-guided Therapy, Medical University of Vienna, Austria

\*Correspondence to: Andrew R Reynolds, PhD, Breakthrough Breast Cancer Research Centre, The Institute of Cancer Research, 237 Fulham Road, London SW3 6JB, UK. E-mail: andrew.reynolds@icr.ac.uk

Or Balazs Dome, MD, PhD, Department of Thoracic Surgery, Medical University of Vienna, Waehringer Guertel 18-20, A-1090 Vienna, Austria. E-mail: balazs.dome@meduniwien.ac.at

Or Sándor Paku, PhD, 1st Institute of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University Üllői út 26, H-1085, Budapest, Hungary. E-mail: paku@korf1.sote.hu

†ARR, BD, and SP are co-senior and co-corresponding authors to this study.

## Abstract

The appearance of lung metastases is associated with poor outcome and the management of patients with secondary pulmonary tumours remains a clinical challenge. We examined the vascularization process of lung metastasis in six different preclinical models and found that the tumours incorporated the pre-existing alveolar capillaries (ie vessel co-option). During the initial phase of vessel co-option, the incorporated capillaries were still sheathed by pneumocytes, but these incorporated vessels subsequently underwent different fates dependent on the model. In five of the models examined (B16, HT1080, HT25, C26, and MAT B-III), the tumour cells gradually stripped the pneumocytes from the vessels. These dissected pneumocytes underwent fragmentation, but the incorporated microvessels survived. In the sixth model (C38), the tumour cells failed to invade the alveolar walls. Instead, they induced the development of vascularized desmoplastic tissue columns. Finally, we examined the process of arterialization in lung metastases and found that they became arterialized when their diameter grew to exceed 5 mm. In conclusion, our data show that lung metastases can vascularize by co-opting the pulmonary microvasculature. This is likely to have important clinical implications, especially with respect to anti-angiogenic therapies.

Copyright © 2014 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords:** lung metastasis; vessel co-option; arterialization; angiogenesis

Received 20 August 2014; Revised 3 October 2014; Accepted 13 October 2014

No conflicts of interest were declared.

## Introduction

Metastasis – the dissemination of malignant cells from a primary tumour to distant sites – is the main cause of death in many cancers, including breast, colorectal, melanoma, pancreatic, renal, and ovarian cancer. The lung is a frequently involved site in metastatic disease [1], with metastases found in 20–54% of extrathoracic tumours [2–4]. The only method that so

far has demonstrated a real potential to treat patients with lung metastasis is surgical metastasectomy [5]. A report summarizing the data of more than 5000 patients identified resectability, the number of metastases, disease-free interval after surgery, and histology as important prognostic factors for lung metastasectomy [6]. Unfortunately, however, most patients with lung metastasis are not eligible for surgery and are managed with systemic or locoregional chemo- and/or targeted therapies, the efficacy of which is still modest [7–9].

Access to a sufficient blood supply is considered essential for the growth of metastases [10]. The study of the tumour vasculature in metastases is important for several reasons. Firstly, the effective delivery of any given anti-cancer drug is dependent on the presence of an efficient tumoural blood supply and is influenced by heterogeneities in the blood supply between different intratumoural areas [11]. Secondly, conventional drugs designed to target the tumour vasculature (ie anti-angiogenic agents) have shown mixed and often disappointing results in the treatment of metastatic cancer [12–15]. Therefore, a better understanding of the tumour vascularization process in metastases is critical for the development of more successful therapeutic strategies for treating metastatic disease.

Based on early observations on tumours growing in artificial locations such as the subcutaneous space, tumour vascularization had been long considered to require sprouting angiogenesis [16–18]. The first description of a so-called alternative (ie non-sprouting) tumour vascularization mechanism [10] dates back to the mid-1990s, when Pezzella *et al* published their groundbreaking work on non-angiogenic primary [19] and metastatic [20] lung tumours that grow by exploiting the pre-existing lung vasculature. These studies in human pathology provided evidence that both non-small cell lung cancer (NSCLC) [19] and pulmonary metastases of breast cancer [20] can develop and progress in the absence of neo-angiogenesis by co-opting the alveolar capillaries. Subsequent human studies from Pezzella and co-workers [21,22] and other groups [23,24] have confirmed the phenomenon of vessel co-option in non-angiogenic primary and secondary lung tumours and, moreover, in various other primary and metastatic human malignancies (reviewed in ref 25). Nevertheless, the exact mechanism of vessel co-option in lung metastasis has been largely unexplored.

Here, by using confocal microscopy, electron microscopy, and a two-colour corrosion casting technique, we studied the tumour vascularization process in six different preclinical models of lung metastasis. Our results provide the first direct experimental evidence that pulmonary metastases can vascularize via co-opting the pre-existing pulmonary vasculature. Our study also presents the detailed mechanism of this process and, moreover, demonstrates that lung metastases develop a bronchial (ie arterial) blood supply during their growth. These findings are likely to have important implications with respect to the treatment of lung metastasis.

## Materials and methods

### Tumour cell lines and experimental lung metastases

The HT1080 human fibrosarcoma, HT25 human colon carcinoma, C26 murine colon carcinoma, MAT-B-III rat mammary carcinoma, and B16 mouse melanoma cell lines were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (catalogue

Nos R8758 and F4135, respectively; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). C38 murine colon carcinoma cells were maintained by serial subcutaneous transplantations in C57Bl/6 mice. A detailed description of the pulmonary metastasis models may be found in the Supplementary materials and methods.

### Immunofluorescence analysis, tumour and endothelial cell proliferation, and electron microscopy

The immunofluorescence methods and electron microscopic analysis of lung metastases performed on B16 and HT1080 tumour lines may be found in the Supplementary materials and methods and Supplementary Table 1.

### Vascular corrosion casting: determination of the percentage of arterial metastases and the size of the metastases

In contrast to the mouse lung, which does not have a functional intraparenchymal bronchial arterial vasculature, the existence of such a circulatory system in the rat lungs is proven [26,27]. Consequently, these experiments were carried out in rats carrying pulmonary metastases of MAT-B-III cells. To determine the size of the metastases and to investigate the origin of their blood supply, we used a two-colour corrosion casting procedure described previously [28] and presented in the Supplementary materials and methods.

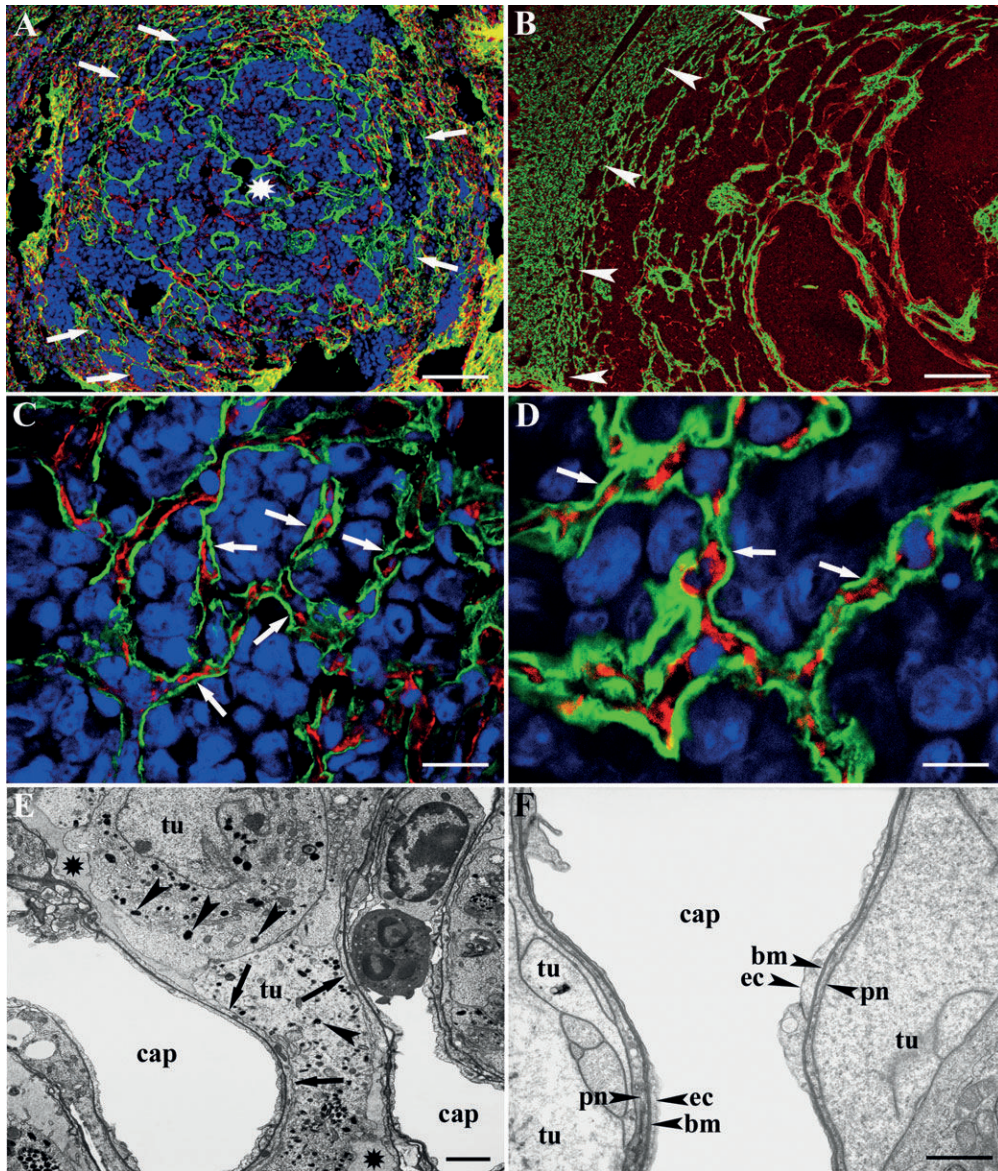
## Results

### Preservation of alveolar architecture in the peripheral regions of lung metastases that is indicative of vessel co-option

We studied the process of tumour vascularization in six different models of experimental lung metastasis. Experimental lung metastases were generated by injecting HT1080, HT25, B16 or C26 cells intravenously into mice or, in the case of MAT-B-III, into mice or rats. Experimental lung metastases of C38 cells were generated using a spontaneous model of lung metastasis involving the injection of tumour cells into the footpad of the hind leg. The size of the metastatic lung nodules that we studied ranged from 100 µm up to several millimetres. Larger tumours (>5 mm in diameter) were observed in rats injected with MAT-B-III. The mechanism of vascularization that we observed was independent of tumour size.

After extravasation and forming small interstitial colonies (ie growth of tumour cells within the alveolar walls), tumour cells proceeded to enter the alveolar air spaces. The expansion from one alveolar space to another was the default pattern for all of the tumour cell lines studied (Figures 1A and 1B). This was evident because the normal structure of the alveolar walls, which





**Figure 1.** Preservation of alveolar architecture in the peripheral regions of lung metastases that is indicative of vessel co-option. (A) Low-power micrograph of a MAT-B-III lung metastasis from a SCID mouse. The section is stained for the pneumocyte marker podoplanin (green), the EC marker CD31 (red), and TOTO-3 (blue), which highlights the tumour mass. The alveolar air spaces are filled with tumour cells at the tumour periphery (arrows). An asterisk marks the centre of the metastasis. Scale bar = 200  $\mu$ m. (B) Micrograph of a C38 lung metastasis stained for CD31 (green) and laminin (red) from a C57BL/6 mouse. Normal lung parenchyma is present on the left (arrowheads mark the border of the metastasis). Tumour cells occupy the alveolar air spaces and expand them. Accordingly, the closer the alveolus is to the tumour centre, the larger the lumen becomes. Scale bar = 200  $\mu$ m. (C) Periphery of a MAT-B-III metastasis in a mouse lung stained for podoplanin (green), CD31 (red), and with TOTO-3 (blue). Tumour cells fill the alveoli. Pneumocytes line the surface of the alveoli in a regular manner (arrows). Scale bar = 20  $\mu$ m. (D) High-power confocal micrograph of the periphery of an HT1080 lung metastasis formed in a SCID mouse stained for podoplanin (green), CD31 (red), and with TOTO-3 (blue). Note that intact alveolar walls with regular layering (pneumocyte–capillary–pneumocyte) are present (arrows). Scale bar = 10  $\mu$ m. (E) Low-power electron micrograph captured at the periphery of a B16 lung metastasis from a C57BL/6 mouse. Tumour cells (tu), which are recognizable due to the presence of melanocytic granules (arrowheads), are seen filling the alveolar air space, whilst the adjacent capillary lumens (cap) are free of tumour cells. Two white blood cells are visible in the lumen of the capillary on the right. The plasma membrane of a tumour cell makes close contact with the pneumocyte plasma membrane over a large surface area (arrows). Asterisks mark areas where the alveolar lumen is filled with protein-containing liquid. Scale bar = 2  $\mu$ m. (F) High-power electron micrograph at the periphery of an HT1080 lung metastasis from a SCID mouse showing a capillary (cap) surrounded by tumour cells (tu). On both sides of the capillary, a normal blood–gas barrier is present consisting of a pneumocyte layer (pn), a basement membrane (bm), and an endothelial layer (ec). Scale bar = 1  $\mu$ m.

are composed of blood vessels and a sheathing layer of pneumocytes on either side, was strikingly preserved at the periphery of the tumour mass (Figures 1C and 1D). Alveolar walls present within the tumour were also examined at the electron microscopy level. We found

that the blood–gas barrier of the normal lung, which consists of an endothelial cell (EC) layer, a basement membrane (BM), and an epithelial layer, was preserved at the peripheral tumour areas (Figures 1E and 1F). The lumens of the incorporated capillaries were free of

tumour cells (Figures 1E and 1F). These data indicate that the tumour cells gained access to a vascular supply by co-opting the normal alveolar capillaries.

Tumour cells strip the alveolar epithelium from co-opted vessels

In all the models examined but one (the C38 colorectal cancer model, described later), 'naked' microvessels surrounded by tumour cells (ie blood capillaries not sheathed by a layer of pneumocytes) could be detected 100–200  $\mu\text{m}$  inwards from the invasive edge of the metastases (Supplementary Figure 1A). The appearance of these pneumocyte-free blood capillaries occurred due to a unique process instigated by the tumour cells themselves. Tumour cells infiltrated into the alveolar walls and invaded in between the capillaries and the alveolar epithelium (Supplementary Figure 1B). This resulted in detachment of the pneumocytes from the underlying capillaries (Supplementary Figures 1C and 1E). We used electron microscopy to examine this process at higher resolution and observed tumour cells in the process of separating pneumocytes from ECs. For example, a B16 melanoma cell could be seen extending a protrusive structure that physically drives a wedge between the pneumocyte and the adjacent EC (Figures 2A and 2B). During this process, the BM of the blood–gas barrier was separated into an EC-associated BM layer and an epithelial-associated BM layer (Figures 2A and 2B). After splitting occurred, the tumour cells attached firmly to both the EC-associated BM layer and the epithelial-associated BM layer (Figures 2A and 2B).

The separation of the pneumocyte layer from the endothelial layer was further examined by staining for the BM component, laminin. In Figure 2C, a capillary (blue) can be seen (small arrow) which still shares its laminin-positive BM (red) with the adjacent pneumocyte layer (arrowhead). However, complete detachment of the epithelium from this capillary is observed at the other end of the vessel. In Figures 2C and 2D and also in Supplementary Figure 3A, further capillaries can be observed (large arrows) from which the adjacent pneumocyte layer has been completely detached. It should be noted that whilst both the naked vessel and the adjacent detached pneumocyte layer are associated with a laminin-positive BM, the BM associated with the naked vessel is thicker than the pneumocyte-associated BM and this can be seen clearly in Figures 2C and 2D.

We also examined the presence of pneumocytes in the metastases as a function of the lesion size. Whilst the central area of smaller metastases contained pneumocytes (Figure 2E), the central area of larger metastases was generally devoid of alveolar epithelial cells (Figure 2F). It is apparent that after they were detached from the microvessels, these alveolar epithelial cells underwent fragmentation and disappeared (Figure 2F). In contrast, the denuded and incorporated microvessels survived. These vessels appear to be functional as

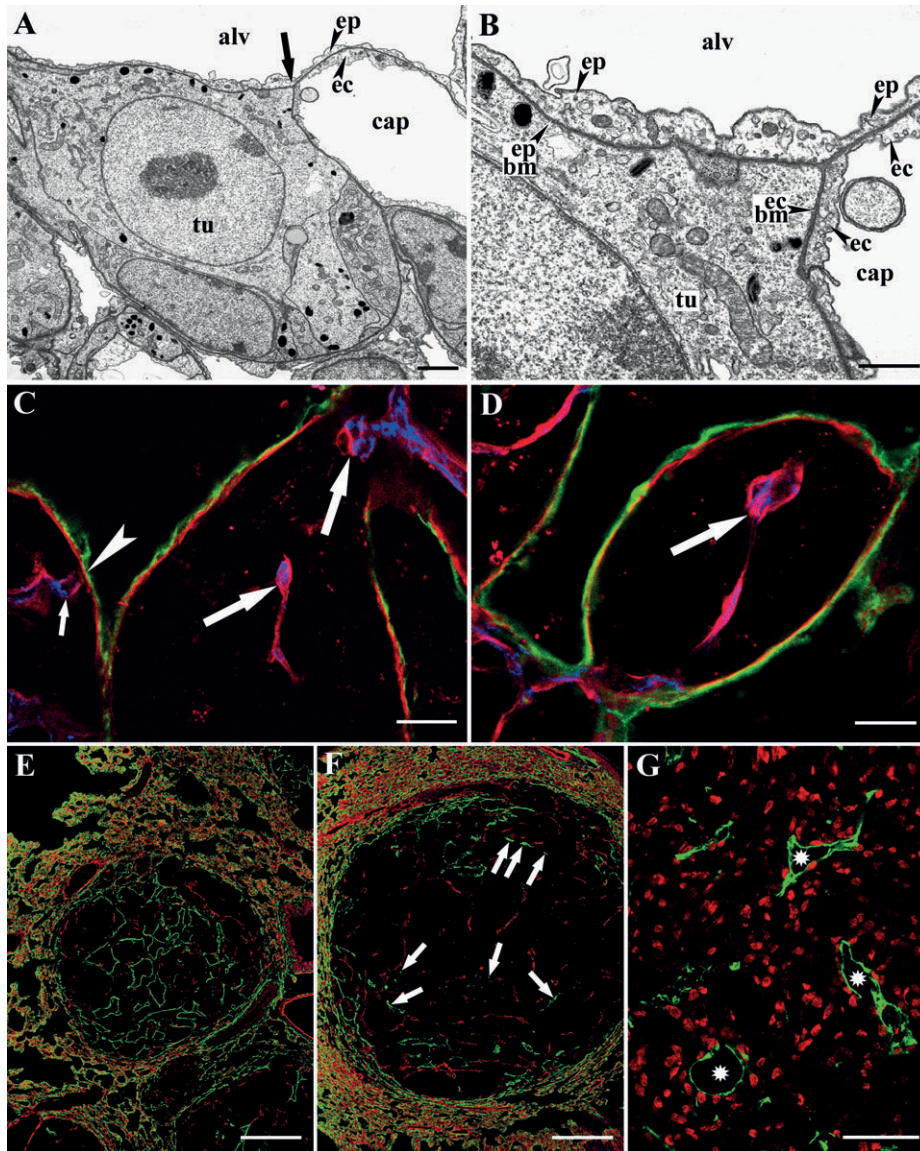
extensive BrdU incorporation was observed in tumour cells surrounding these microvessels even in central tumour areas (Figure 2G).

According to the angiogenic switch theory, tumours must activate new vessel growth to grow beyond 1–2 mm in size [18]. Although the majority of the metastases that we studied in the mouse did not reach this critical size, MAT-B-III tumours growing in rat lung did exceed this size limit (mean diameter  $3.36 \pm 2.23$  mm; range 0.3–14.8 mm; median 2.8 mm). To determine whether these tumours activated the growth of new vessels, we examined these tumours for EC proliferation. We compared the proliferation rate of ECs in the peritumoural region (a band of normal lung tissue 100  $\mu\text{m}$  wide that was directly adjacent to the metastases) versus intratumoural regions of MAT-B-III rat lung metastases. Peritumoural ECs showed a negligible proliferation rate ( $1.73 \pm 0.8\%$  of ECs), but the proliferation of ECs was moderately increased intratumourally ( $12.8 \pm 3.2\%$ ). The difference in proliferation was statistically significant ( $p < 0.05$ ). However, we detected a slight increase in microvessel perimeters towards the tumour core compared with the periphery, suggesting that EC proliferation may result in vessel dilatation (data not shown).

Increased desmoplastic reaction towards the centre of C38 metastases results in the transformation of alveolar walls into intratumoural tissue columns

As mentioned above, the C38 model of lung metastasis demonstrated a different behaviour to the other models. C38 tumour cells did not reinvade the alveolar walls and thus they could not detach the pneumocytes from the alveolar capillaries; instead, these tumours incorporated the alveolar walls 'as a whole' and induced a desmoplastic response in them. As a result, in C38 metastases, alveolar walls were continuously transformed into intratumoural tissue columns (centrally located capillaries embedded in connective tissue collagen and  $\alpha\text{SMA}$ -expressing activated fibroblasts surrounded by a BM) (Figures 3A and 4B). These structures developed gradually in the direction from the periphery towards the tumour centre (Figure 3A–3D). First, in the walls of alveoli (of which the lumens were filled with tumour mass),  $\alpha\text{SMA}$ -expressing activated fibroblasts appeared (of note, no such cells – except within the arterioles and airways – were present in the peritumoural normal lung parenchyma). The number of activated fibroblasts increased towards the tumour centre (Figures 3A–3D). Consequently, the amount of deposited connective tissue collagen and, in turn, the space between the capillaries and the epithelium (Figures 4A and 4B) also increased. Importantly, C38 cells did not invade this space (ie the tissue columns); they remained in the alveolar lumens (Figure 4C). During the development of connective tissue columns, the epithelium facing the tumour





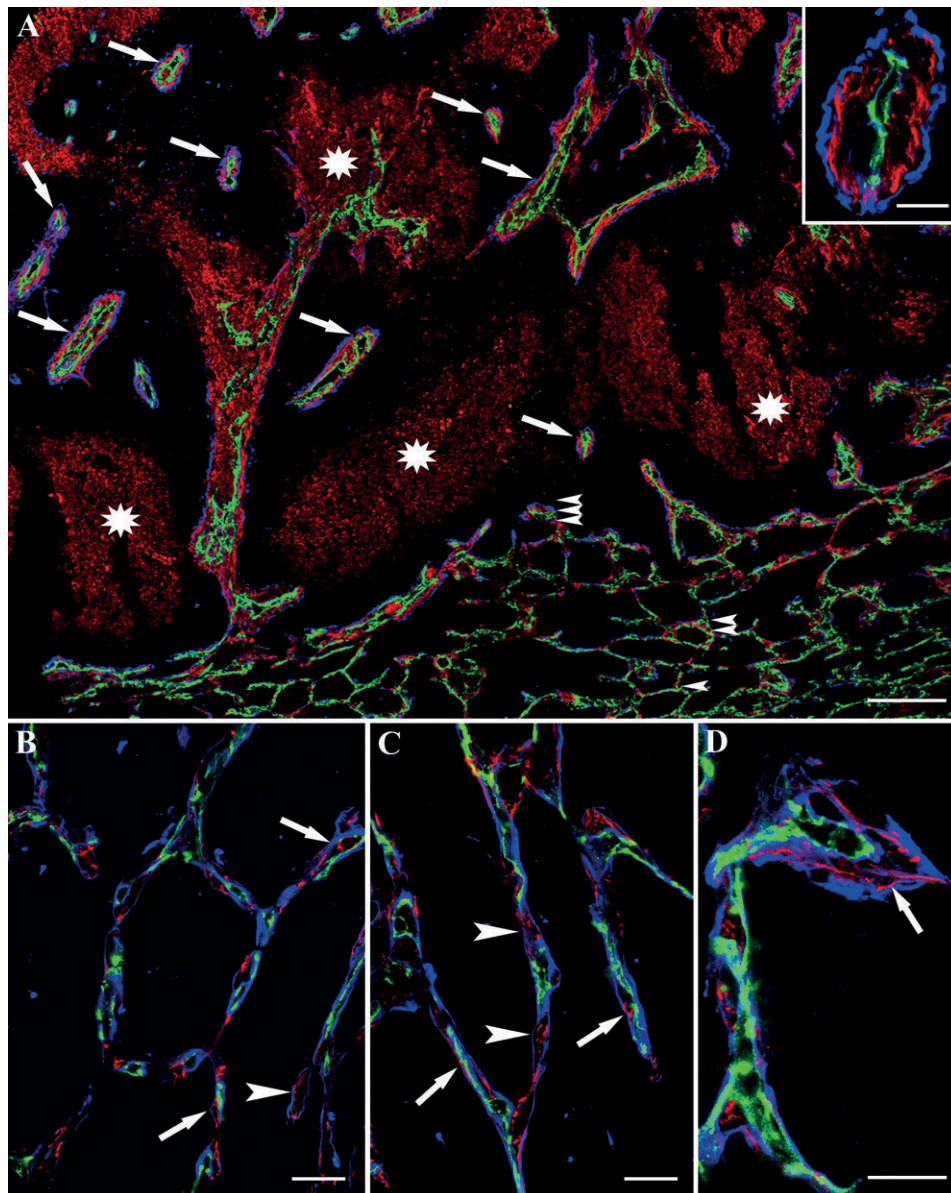
**Figure 2.** Tumour cells split the basement membrane of the co-opted blood–gas barrier. (A, B) Electron micrographs of a B16 lung metastasis. In A, a tumour cell (tu) is shown in the process of detaching the epithelium from the surface of a capillary. A wedge-shaped cellular process of the tumour cell is advancing between the epithelial (ep) and EC (ec) layers (arrow). In B, the area where the arrow is pointing in A is shown at high power. Note how the wedge-shaped process splits the alveolar BM into an EC-associated BM and an epithelial-associated BM. alv = alveolar space; bm = basement membrane; ep = epithelium; ec = endothelial cell; cap = capillary lumen; tu = tumour cell. Scale bars: (A) 2  $\mu$ m; (B) 1  $\mu$ m. (C, D) Images of an HT1080 lung metastasis stained formicrovessels (CD31, blue), BM (laminin, red), and pneumocytes (podoplanin, green). The black areas are filled with tumour cells (the presence of tumour cells in these black areas within an HT1080 metastasis is demonstrated in Supplementary Figures 3A–3C). In C, on the left-hand side, a microvessel (small arrow) can be seen that is still associated with the epithelium (arrowhead). In C, microvessels marked by large arrows are completely separated from the epithelium and are surrounded by the tumour mass. Note that the detached alveolar epithelium (green) lies on its own BM (red). (D) A completely denuded microvessel (arrow) within an HT1080 metastasis is shown. CD31-positive ECs (blue) are surrounded by a thick BM (laminin, red). Note that in both C and D, the BM layer (laminin, red) that supports the podoplanin-positive epithelium (green) is thinner than the BM layer (laminin, red) that supports the microvessels (CD31, blue). Scale bars = 20  $\mu$ m. A similar area of an HT1080 metastasis stained for vimentin, laminin, and CD31 is shown in Supplementary Figure 3A. (E, F) Image of a small (E) and a large (F) B16 metastasis stained for podoplanin (green) and CD31 (red). In addition to the presence of blood capillaries, the smaller metastasis (E) contains centrally located sheets of alveolar epithelium. In contrast, pneumocytes are present only at the tumour periphery in the larger metastasis (F). Arrows indicate fragmented epithelium. The presence of numerous centrally located microvessels (red) raises the possibility of neo-angiogenesis. Scale bars = 200  $\mu$ m. H&E staining of a B16 metastasis is shown in Supplementary Figure 3D. (G) BrdU labelling (red) of an HT1080 lung metastasis. Microvessels are highlighted by CD31 (green). BrdU-positive tumour cells are preferably localized around the microvessels (asterisks). Scale bar = 50  $\mu$ m.

became gradually fragmented (Figures 4C and 4D). It is unclear whether the BM surrounding the intratumoural connective tissue columns was the original epithelial BM or whether it was newly synthesized by the tumour.

Presence of stromal fibroblasts and connective tissue within the other lung metastasis models

Importantly, the distribution of  $\alpha$ SMA-positive myofibroblasts and connective tissue collagen was different

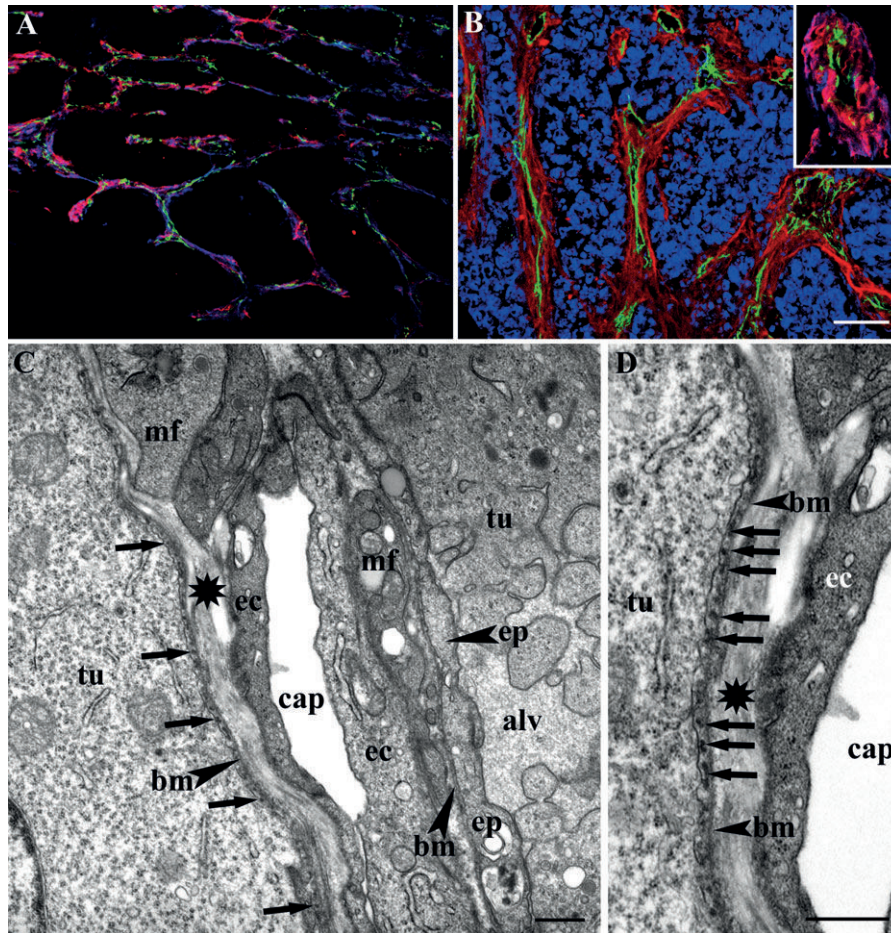




**Figure 3.** Increased desmoplastic reaction towards the centre of C38 metastases results in the transformation of alveolar walls into intratumoural tissue columns (I). (A) C38 metastasis stained for CD31 to mark vessels (green),  $\alpha$ SMA to mark activated myofibroblasts (red), and laminin to mark the BM (blue). Black areas represent viable tumour tissue throughout the picture. Asterisks mark areas of necrotic tissue that also appear red due to non-specific binding of the anti-mouse secondary antibody. The growing tumour is continuously incorporating and transforming the alveolar walls (in the lower part of the picture) into tissue columns (arrows) with central microvessel(s). Within these tissue columns, vascular remodelling and sprouting angiogenesis might also be present [43]. Note that no necrosis can be seen at the tumour periphery where alveoli are still visible. In the alveolar walls shown in the lower right area of the picture,  $\alpha$ SMA-positive cells cannot be detected. Such cells appear gradually towards the tumour centre. The inset shows a column at high power with a single central capillary. Scale bars: (A) 100  $\mu$ m; (A, inset) 20  $\mu$ m. (B–D) High-power micrographs of the regions marked by a single arrowhead (B), double arrowheads (C), and triple arrowheads (D) in A. Alveolar lumens are filled with tumour cells (black areas represent the tumour mass). The number of  $\alpha$ SMA-positive cells (red) within the alveolar walls increases towards the centre of the tumour through B–D. These cells are present within the alveolar walls between the epithelial BM (laminin, blue) and the capillary (CD31, green) (arrows) or between the epithelial BMs (laminin, blue) (arrowheads). In D, note the increased number of  $\alpha$ SMA-expressing fibroblasts (red) between the epithelial and capillary BM layers (arrow). Scale bar: (B–D) 20  $\mu$ m. The presence of tumour cells in black areas within a C38 metastasis is shown in Supplementary Figures 3E–3G.

in HT1080, HT25, B16, C26, and MAT-B-III compared with the C38 model. In these former models, an extensive desmoplastic reaction was not observed.  $\alpha$ SMA-positive myofibroblasts did become incorporated into the metastases in association with the alveolar capillaries; however, they did not participate in the development of intratumoural tissue columns. The

$\alpha$ SMA-positive myofibroblasts were in close contact with the BM of the microvessels (Supplementary Figures 2A and 2B). A minority of these cells, however, were denuded from the microvessels along with the alveolar epithelial BM (Supplementary Figure 2A). The number of  $\alpha$ SMA-positive cells did not increase towards the centre of the tumour in the B16 melanoma



**Figure 4.** Increased desmoplastic reaction towards the centre of C38 metastases results in the transformation of alveolar walls into intratumoural tissue columns (II). (A) Periphery of a C38 metastasis. The section is stained for CD31 (green), collagen I (red), and  $\alpha$ SMA (blue). The alveoli are filled with tumour cells (black areas).  $\alpha$ SMA-positive activated fibroblasts (blue) are present in the walls of the alveoli. Collagen I (red) is deposited in an increasing amount towards the centre of the tumour (on the left). The distribution of the  $\alpha$ SMA-expressing cells and the connective tissue collagen shows that the appearance of the activated fibroblasts at the tumour periphery precedes the deposition of collagen. (B) Centre of a C38 metastasis. The section is stained for CD31 (green), collagen I (red), and TOTO-3 (blue), which highlights tumour cells. Massive and contiguous collagen I-positive connective tissue septa and columns are present within the tumour. These structures might provide a suitable environment for sprouting angiogenesis [43]. The inset shows the co-localization of  $\alpha$ SMA-expressing activated fibroblasts (blue), collagen I-positive connective tissue (red), and CD31-positive ECs (green). Scale bar: (A, B) 50  $\mu$ m. (C) Electron micrograph of an alveolar wall surrounded by C38 cells. The alveolar space (alv) on the right is partially filled by tumour cells (tu). Epithelial cells (ep) cover the alveolar wall at this location. Fragmented epithelium (arrows) is present on the alveolar wall on the left where the tumour cell (tu) is located close to the epithelial BM (bm). In the alveolar wall beside the myofibroblast (mf), connective tissue collagen (asterisk) is also present. cap = capillary. Scale bar = 1  $\mu$ m. (D) The alveolar wall shown in C. Fragments of the epithelium (arrows) are visible between the C38 cell (tu) and the BM (bm). Scale bar (C, D): 1  $\mu$ m.

and HT1080 fibrosarcoma. In contrast, the number of activated fibroblasts increased from peritumoural lung tissue towards the tumour centre in MAT-B-III, C26, and especially in HT25 colon carcinoma metastases (data not shown).

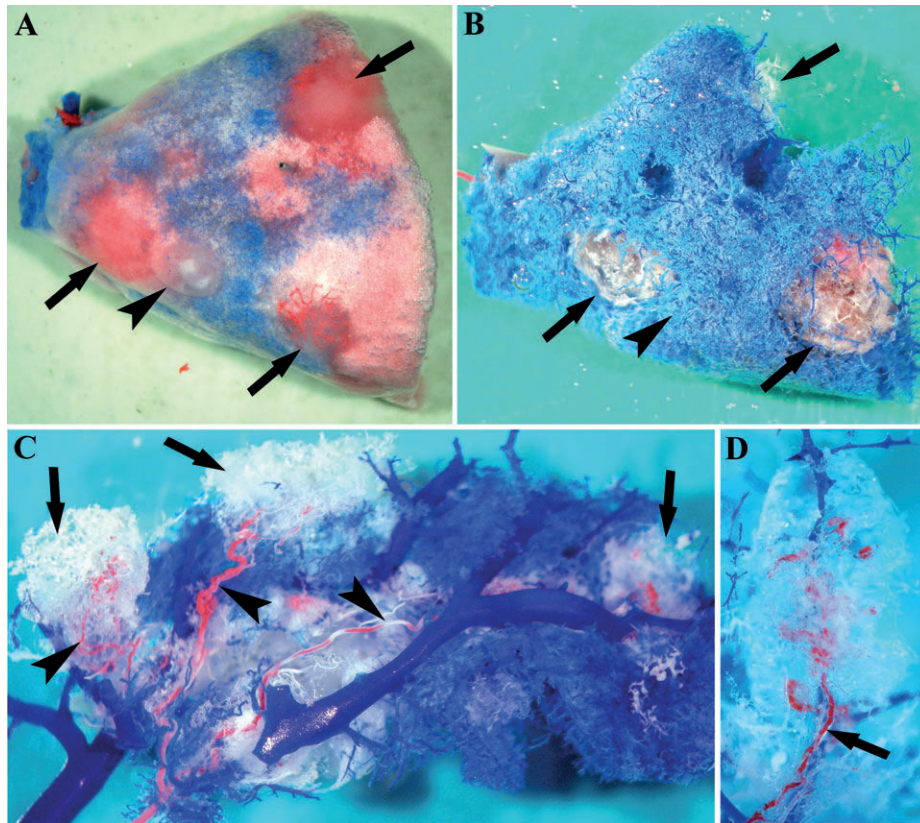
In all tumour types, the  $\alpha$ SMA-positive activated fibroblasts co-distributed with connective tissue collagen (Supplementary Figure 2C and inset of Figure 4B). A small amount of connective tissue collagen was always deposited around the incorporated microvessels in the B16 melanoma and HT1080 fibrosarcoma (Supplementary Figures 2C and 2D). Scattered collagen I positivity could also be observed in the MAT-B-III mammary carcinoma and C26 colon carcinoma metastases (Supplementary Figures 2E and 2F). The HT25 colon carcinoma metastases contained larger amounts

of collagenous connective tissue (Supplementary Figure 2G).

#### Lung metastases develop an arterial blood supply

Because the lung has a dual circulation system, we also analysed the origin of the blood supply of lung metastases. The anastomosis system between the bronchial and the pulmonary circulation is quite similar to that observed previously by us in the mouse liver [28]. Accordingly, we applied the same corrosion casting method [28]. In accordance with other investigators [26,27], we could not identify bronchial arteries downstream from the main bronchi in mice (data not shown). Therefore, we used the MAT-B-III rat mammary carcinoma system. In the rat lung, only the main arterial





**Figure 5.** Lung metastases develop an arterial blood supply. (A–D) Corrosion casting of MAT-B-III mammary carcinoma metastases within rat lungs. A and B show the right lower pulmonary lobe with metastases before (A) and after (B) corrosion. The lung was filled first through the pulmonary artery (blue), followed by filling through the bronchial arterial system (red). The lobe contains three metastases with and one without a bronchial arterial blood supply (arrows and arrowhead, respectively). Because the metastasis in the upper part of the picture was incompletely filled, only part of it is visible after corrosion. (C) The left pulmonary lobe with metastases after corrosion. For better visibility, branches of the pulmonary system were removed. Three metastases with a bronchial arterial blood supply (arrows) are visible. Each has its own branch of the bronchial artery (arrowheads). (D) Metastasis with an arterial blood supply. Note the central position of the feeding artery (arrow).

branches could be filled and thus it was not possible to decide whether segmental bronchi have an arterial blood supply. Investigating the origin of the blood supply in metastases with different sizes, we found that 95% of the metastases with a diameter greater than 5 mm had an arterial blood supply and that 97% of the metastases with a diameter less than 3 mm had a pulmonary blood supply (Figures 5A and 5B). Sixty-five per cent of the arterioles supplying the tumour cells were centrally positioned in the metastases (Figures 5C and 5D). We also compared the proliferation rate of the metastatic cells: the tumour cell labelling index of metastases with a bronchial blood supply was significantly higher than that of metastases with a pulmonary blood supply ( $43.5 \pm 6.1\%$  versus  $35.3 \pm 2.5\%$ , respectively; mean  $\pm$  SD;  $p < 0.05$ ).

## Discussion

Experimental lung metastases can vascularize using vessel co-option

Angiogenesis (the development of new blood vessels from pre-existing ones) has long been regarded as crucial for tumour growth [16–18,29]. However, it is

today obvious that tumours can acquire their blood supply via alternative (non-sprouting) mechanisms [10], including glomeruloid microvessel growth [30], vasculogenic mimicry [31], intussusceptive microvascular growth [32], postnatal vasculogenesis [33], and vessel co-option [34]. In particular, there are also reports on the presence and clinical significance of alternative vascularization mechanisms in the lungs. Tanaka *et al* demonstrated that glomeruloid vessel formation was associated with an aggressive angiogenic phenotype and significantly reduced survival in NSCLC patients [35]. Wu *et al* identified vasculogenic mimicry in 35% of NSCLC patients and, furthermore, provided evidence for an association of vasculogenic mimicry with clinical outcome in this malignancy [36]. Although intussusceptive microvascular growth was first observed in the growing postnatal lung [37,38] and then also during postpneumonectomy lung growth [39], there are no reports on this mechanism in pulmonary malignancies. Altogether, however, vessel co-option is the most frequently reported vascularization mechanism in human lung tumour pathology studies [19–24].

In the present study, we analysed the vascularization process in six different experimental models of

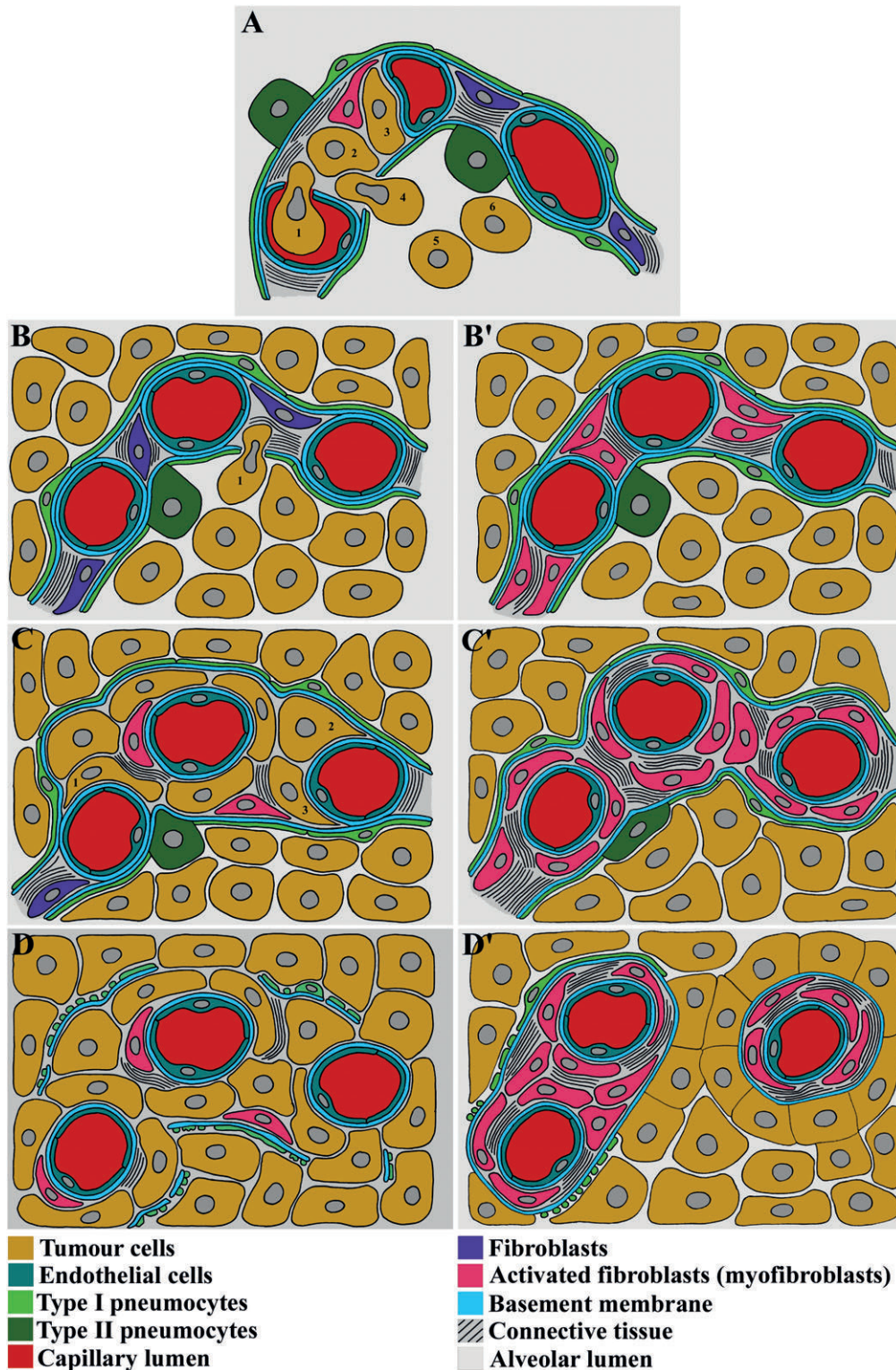


Figure 6. Legend on the next page.

lung metastasis. Strikingly, in all models utilized, the tumours became vascularized via the process of vessel co-option. All of the investigated cell lines incorporated the pre-existing host tissue capillaries within the alveolar walls, without morphological signs of active peritumoural EC sprouting. This latter finding is further supported by our observation that peritumoural ECs exhibited a low proliferation rate. The absence of

peritumoural EC sprouting is most probably due to the high pulmonary tissue capillary densities and, moreover, to the lack of a suitable amount of connective tissue matrix in the alveolar walls [40,41]. It is possible, however, that intratumoural EC sprouting may occur at later stages of tumour development (provided that suitable connective tissue is available within the more central areas of the metastases). This assumption is supported



by our finding of significantly elevated intratumoural EC proliferation (versus the peritumoural lung) in the MAT-B-III rat mammary carcinoma metastases. Nevertheless, in addition to providing a source of new capillary production, the elevated EC proliferation may merely lead to vessel dilatation. In support of this, we previously showed that something similar occurs in a murine skin melanoma model [34].

Tumour cells of experimental lung metastases can strip the epithelium from co-opted blood vessels

A striking finding from this study is the observation that tumour cells can strip the epithelium from the co-opted alveolar walls. This was observed in the B16, HT1080, HT25, C26, and MAT-B-III models. In these tumour types, malignant cells were observed to invade into the alveolar walls and migrate between the endothelial and epithelial layers (Figure 6). After splitting occurred, the tumour cells attached firmly to both the endothelial-associated BM layer and the epithelial-associated BM layer. The stripped epithelial cells were highly compressed and then underwent a process of fragmentation and disappeared from the metastasis, whereas the denuded capillaries remained functional and were able to ensure the blood supply of the metastases. The split of the alveolar BM by cancer cells is an unusual phenomenon which we do not believe has been described before. The exact molecular mechanism through which this process occurs is currently unclear, but presumably involves selective adhesion between the tumour cells and the BM of the blood–gas barrier, as well as the expression of proteases that may be acting to digest the BM in a highly selective fashion to split the BM in two.

In the invasively growing cell lines, the majority of alveolar wall fibroblasts remained associated with the capillaries. However, we do not believe that they

were functioning as pericytes as they did not have BM coverage. Instead, we propose that they were only responsible for collagen deposition within the metastases. This finding might be important because pericyte-free capillaries may be more vulnerable against VEGF withdrawal than their normal counterparts [42].

Generation of desmoplastic tissue columns in the C38 lung metastasis model

Tumour cells of the C38 lung metastasis model also incorporated the alveolar walls. However, instead of re-invading the alveolar interstitium, these cells elicited a desmoplastic response within the incorporated alveolar walls resulting in the transformation of alveolar walls into microvessel-containing connective tissue columns. The activation and increased number of interstitial fibroblasts (and the accompanying collagenous matrix deposition) at the tumour periphery led to the gradual widening of the space between the two BM layers (endothelial and epithelial/tumoural) towards the tumour centre. This process assumes that the BM of the blood–gas barrier in this tumour type is dissected into two layers by the proliferating myofibroblasts. In parallel, the alveolar epithelium became fragmented and disappeared and thus C38 cells could attach directly to the BM left over by the epithelial cells. It is also possible that C38 cells synthesized their own BM material onto the original BM. Although we do not have specific antibodies against these BMs, the latter scenario is indeed more probable as C38 cells in other locations always synthesize their own BM onto the surface of the incorporated connective tissue [43]. In either case, C38 cells use BM material as a substrate for their growth.

All in all, the transformation process of the alveolar walls in the C38 model culminated in the appearance of connective tissue columns with a single

**Figure 6.** Schematic representation of the vascularization process in lung metastases. (A) The common steps of the vascularization process among the different lung metastasis models utilized in this study are shown. A tumour cell arrested in a lung capillary extravasates into the alveolar interstitium (tumour cell #1). After forming small colonies in the interstitial connective tissue (tumour cells #2 and #3), tumour cells enter the alveolar lumen (tumour cell #4) and proliferate further there (tumour cells #5 and #6) (also see refs 50–54). Note that where connective tissue material is present in the alveolar walls, the BM of the blood–gas barrier is separated into an endothelial BM layer and an epithelial BM layer also in the tumour cell-free part of the alveolar wall. Of note, since the tumour mass advances from one alveolar lumen to another, the events depicted in B–D take place in alveoli distant from the first entrapped alveolus. (B–D) The invasively growing tumour cell lines (B16, HT1080, HT25, C26, and MAT-B-III) acquire their blood vasculature by stripping the alveolar capillaries from the epithelium. (B) Tumour cells proliferate intensively in the occupied alveolar lumens and (re-)invade the alveolar wall connective tissue (tumour cell #1). (C) Tumour cells in the alveolar walls start to detach the epithelium (together with the epithelial BM) from the capillaries (tumour cells #1–3). This process culminates in the appearance of completely denuded capillaries (middle capillary) surrounded by tumour cells. The two other capillaries are still partly covered by the epithelium. (D) Capillaries are denuded and completely surrounded by tumour cells. Remnants of the fragmented epithelium are scattered within the tumour mass. (B'–D') Vascularization of C38 colon cancer metastases is accompanied by a desmoplastic response in the co-opted alveolar walls. In B'–D', the alveolar spaces depicted are distant from the initial extravasation place; B'–D' represent areas in the direction from the periphery towards the centre of the metastases. (B') C38 cells proliferate in the alveolar lumens at the periphery of the metastases. In the walls of the occupied alveolar spaces, fibroblasts become activated ( $\alpha$ SMA-expressing myofibroblasts) but deposition of collagen is not yet started. (C') Towards the centre of the metastases, a desmoplastic response is elicited in the alveolar walls: the number of myofibroblasts increases and collagenous connective tissue matrix is deposited. (D') As the incorporated alveolar walls get closer to the centre of the metastases, they undergo further 'processing'. The tumour mass divides the desmoplastic alveolar wall into pieces, leading to the appearance of separate intratumoural connective tissue columns. Pneumocytes are fragmented (this process can be seen on the surface of the connective tissue column on the left side of the picture) and the tumour cells attach to the residual BM of the pneumocytes or synthesize their own BM onto the surface of the extracellular matrix of the tissue columns. Throughout the drawings, parallel black lines represent collagen bundles in the connective tissue.

central microvessel. Although the final steps of tissue column development are unclear, one possibility is that the originally incorporated alveolar walls with more microvessels are further 'processed' by the tumour, which may split the tissue columns into more parts until the single microvessel stage is reached. However, this assumes continuous myofibroblast proliferation and connective tissue deposition. It is also important to mention that sprouting of connective tissue column capillaries following collagenous matrix deposition is also possible, as demonstrated previously by our group in C38 liver metastases [43].

### Arterialization of lung metastases

In a recent study, we found that mouse liver metastases inevitably become arterialized [28]. The results of the present study suggest that pulmonary metastases develop an arterial blood supply as well. The growing tumour incorporates a high-pressure bronchial vessel which, akin to hepatic arterioles, frequently acquires a central intratumoural position. Thus, the process is similar to that of the hepatic metastases, where it is purely mechanical in nature, governed by the pressure relationships in the liver vasculature. The key step in the process of liver metastasis arterialization is the fusion of the sinusoids at the tumour–liver parenchyma interface [28]. Although we could not confirm a similar phenomenon (ie capillary fusion) in the present study, chances are that where the disruption of sphincters between the sinusoids and terminal arterioles resulted in an increase in the intratumoural blood pressure, metastatic tumour cells were also likely to damage the Sperr arteries (short arterial segments that can connect the bronchial and pulmonary circulation) [44,45], which in turn may let the high-pressure bronchial arterial bloodstream enter the vascular system of the metastases.

MAT-B-III cells of arterialized metastases had a significantly higher proliferation rate than those of tumours supplied with pulmonary blood. Although the mechanisms that result in the relatively lower tumour cell proliferation rate in the metastases with a pulmonary blood supply are not completely understood, a possible explanation can be deduced from several studies demonstrating that hypoxia can slow down or even completely inhibit tumour cell proliferation both *in vitro* and *in vivo* [46–48]. It is also important to note that there should be other factors influencing the proliferation rate of metastatic cells besides the origin of the blood supply. For example, the proliferation rate of 3LL-HH and C38 cells of liver metastases with a baseline labelling index above 50% was not accelerated further by arterial blood [28]. In contrast, hepatic A2058 melanoma metastases [28] and pulmonary MAT-B-III breast cancer metastases had a relatively lower labelling index which could be further increased by a switch from portal to arterial and from a pulmonary to a bronchial blood supply, respectively.

### Consequences for the clinical management of lung metastases

Metastasis to the lungs is a key event in malignant disease outcome and the treatment of pulmonary metastases remains a major clinical challenge [5–9]. Our study describes the mechanism of vascularization of pulmonary metastases and provides the first experimental evidence that similar to primary human non-small cell lung cancers [19,21] and lung metastases of human breast, colorectal, and renal cancer [20,22,24], these tumours can co-opt the host alveolar capillaries during their growth. Our study, however, does not only provide evidence that the characteristic 'alveolar growth pattern' described in human pulmonary metastases [20,24] can be mimicked in appropriate *in vivo* models but also raises serious questions regarding the utility of using anti-angiogenic agents for the treatment of lung metastases. The conventional generation of anti-angiogenic agents, such as bevacizumab and sunitinib, is designed to target the process of sprouting angiogenesis and it is unclear whether these therapies would be successful against lung metastases that vascularize via vessel co-option.

Novel invasive strategies including transcatheter chemoembolization therapies have been developed recently to improve the clinical management of pulmonary metastases [9,49]. Importantly, it is unclear if primary and secondary lung tumours have a pulmonary and/or a bronchial blood supply. Accordingly, there is no established protocol for chemoembolization in these settings (ie it remains to be investigated if these tumours should be catheterized/perfused via the pulmonary or the bronchial system) [9,49]. Our results show that tumour size influences the extent of the pulmonary versus arterial blood supply that a lung metastasis receives, which may be an important consideration for the future application of transcatheter chemoembolization therapies in secondary lung tumours.

### Acknowledgments

We were supported by KTIA AIK 12-1-2013-0041 (EB, JTo, VL, BD, SP); TÁMOP 4.2.4.A/1-11-1-2012-0001 (KD); OTKA K109626, OTKA K108465 (BD), and OTKA K84173 (JTo); the National Development Agency under the Research and Technology Innovation Fund (EUREKA\_HU\_12-1-2012-0057; BD); and the Vienna Fund for Innovative Interdisciplinary Cancer Research (BD, VL). AR, SF, EW, and VB acknowledge support from Breakthrough Breast Cancer and the NIHR Royal Marsden/Institute of Cancer Research Biomedical Research Centre.

### Author contributions statement

PBV, ARR, BD, JTo, JTi, PN, and SP conceived the study and/or contributed to the interpretation of the data.

BD, SP, and ARR wrote the manuscript. VL, VS, NE, and KD were responsible for generating the *in vivo* lung metastases and assessed tumour and endothelial cell proliferation rates. EB, VLB, EW, and SF performed the corrosion casting and the confocal and electron microscopic analysis. All authors read and approved the manuscript.

## References

- Krishnan K, Khanna C, Helman LJ. The molecular biology of pulmonary metastasis. *Thorac Surg Clin* 2006; **16**: 115–124.
- Snyder BJ, Pugatch RD. Imaging characteristics of metastatic disease to the chest. *Chest Surg Clin N Am* 1998; **8**: 29–48.
- Davis SD. CT evaluation for pulmonary metastases in patients with extrathoracic malignancy. *Radiology* 1991; **180**: 1–12.
- Crow J, Slavin G, Kreef L. Pulmonary metastasis: a pathologic and radiologic study. *Cancer* 1981; **47**: 2595–2602.
- Schweiger T, Lang G, Klepetko W, *et al.* Prognostic factors in pulmonary metastasectomy: spotlight on molecular and radiological markers. *Eur J Cardiothorac Surg* 2014; **45**: 408–416.
- Pastorino U, Buyse M, Friedel G, *et al.* Long-term results of lung metastasectomy: prognostic analyses based on 5206 cases. The International Registry of Lung Metastases. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; **113**: 37–49.
- Bar J, Herbst RS, Onn A. Targeted drug delivery strategies to treat lung metastasis. *Expert Opin Drug Deliv* 2009; **6**: 1003–1016.
- Zheng Y, Fernando HC. Surgical and nonresectional therapies for pulmonary metastasis. *Surg Clin North Am* 2010; **90**: 1041–1051.
- Vogl TJ, Shafinaderi M, Zangos S, *et al.* Regional chemotherapy of the lung: transpulmonary chemoembolization in malignant lung tumors. *Semin Intervent Radiol* 2013; **30**: 176–184.
- Dome B, Hendrix MJ, Paku S, *et al.* Alternative vascularization mechanisms in cancer: pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol* 2007; **170**: 1–15.
- Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nature Rev Cancer* 2006; **6**: 583–592.
- Moreno Garcia V, Basu B, Molife LR, *et al.* Combining antiangiogenics to overcome resistance: rationale and clinical experience. *Clin Cancer Res* 2012; **18**: 3750–3761.
- Mountzios G, Pentheroudakis G, Carmeliet P. Bevacizumab and micrometastases: revisiting the preclinical and clinical rollercoaster. *Pharmacol Ther* 2014; **141**: 117–124.
- Ebos JM, Kerbel RS. Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nature Rev Clin Oncol* 2011; **8**: 210–221.
- Vasudev NS, Reynolds AR. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis* 2014; **17**: 471–494.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; **285**: 1182–1186.
- Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; **82**: 4–6.
- Folkman J, Merler E, Abernathy C, *et al.* Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971; **133**: 275–288.
- Pezzella F, Pastorino U, Tagliabue E, *et al.* Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am J Pathol* 1997; **151**: 1417–1423.
- Pezzella F, Di Bacco A, Andreola S, *et al.* Angiogenesis in primary lung cancer and lung secondaries. *Eur J Cancer* 1996; **32A**: 2494–2500.
- Adighibe O, Micklem K, Campo L, *et al.* Is nonangiogenesis a novel pathway for cancer progression? A study using 3-dimensional tumour reconstructions. *Br J Cancer* 2006; **94**: 1176–1179.
- Breast Cancer Progression Working Party. Evidence for novel non-angiogenic pathway in breast-cancer metastasis. *Lancet* 2000; **355**: 1787–1788.
- Yousem SA. Peripheral squamous cell carcinoma of lung: patterns of growth with particular focus on airspace filling. *Hum Pathol* 2009; **40**: 861–867.
- Sardari Nia P, Hendriks J, Friedel G, *et al.* Distinct angiogenic and non-angiogenic growth patterns of lung metastases from renal cell carcinoma. *Histopathology* 2007; **51**: 354–361.
- Donnem T, Hu J, Ferguson M, *et al.* Vessel co-option in primary human tumors and metastases: an obstacle to effective anti-angiogenic treatment? *Cancer Med* 2013; **2**: 427–436.
- Mitzner W, Lee W, Georgakopoulos D, *et al.* Angiogenesis in the mouse lung. *Am J Pathol* 2000; **157**: 93–101.
- Verloop MC. On the arteriae bronchiales and their anastomosing with the arteria pulmonalis in some rodents; a micro-anatomical study. *Acta Anat (Basel)* 1949; **7**: 1–32.
- Dezso K, Bugyik E, Papp V, *et al.* Development of arterial blood supply in experimental liver metastases. *Am J Pathol* 2009; **175**: 835–843.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144**: 646–674.
- Dome B, Timar J, Paku S. A novel concept of glomeruloid body formation in experimental cerebral metastases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; **62**: 655–661.
- Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, *et al.* Vascular channel formation by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999; **155**: 739–752.
- Paku S, Dezso K, Bugyik E, *et al.* A new mechanism for pillar formation during tumor-induced intussusceptive angiogenesis: inverse sprouting. *Am J Pathol* 2011; **179**: 1573–1585.
- Dome B, Timar J, Ladanyi A, *et al.* Circulating endothelial cells, bone marrow-derived endothelial progenitor cells and proangiogenic hematopoietic cells in cancer: from biology to therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009; **69**: 108–124.
- Dome B, Paku S, Somlai B, *et al.* Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. *J Pathol* 2002; **197**: 355–362.
- Tanaka F, Oyanagi H, Takenaka K, *et al.* Glomeruloid microvascular proliferation is superior to intratumoral microvessel density as a prognostic marker in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2003; **63**: 6791–6794.
- Wu S, Yu L, Wang D, *et al.* Aberrant expression of CD133 in non-small cell lung cancer and its relationship to vasculogenic mimicry. *BMC Cancer* 2012; **12**: 535.
- Burri PH, Tarek MR. A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat Rec* 1990; **228**: 35–45.
- Caduff JH, Fischer LC, Burri PH. Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *Anat Rec* 1986; **216**: 154–164.
- Ackermann M, Houdek JP, Gibney BC, *et al.* Sprouting and intussusceptive angiogenesis in postpneumonectomy lung growth: mechanisms of alveolar neovascularization. *Angiogenesis* 2014; **17**: 541–551.
- Low FN. Extracellular components of the pulmonary alveolar wall. *Arch Intern Med* 1971; **127**: 847–852.
- Rosario EJ, Lewis CW, Gureenberg SD, *et al.* The architecture of the alveolar wall: an ultrastructural study in man. *Cardiovasc Res Cent Bull* 1973; **12**: 13–20.
- Erber R, Thurnher A, Katsen AD, *et al.* Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB J* 2004; **18**: 338–340.



43. 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.
44. Hayek Hv. *The Human Lung*. Hafner Pub Co: New York, 1960.
45. Schraufnagel DE, Pearse DB, Mitzner WA, et al. Three-dimensional structure of the bronchial microcirculation in sheep. *Anat Rec* 1995; **243**: 357-366.
46. Giaccia AJ. Hypoxic stress proteins: survival of the fittest. *Semin Radiat Oncol* 1996; **6**: 46-58.
47. Siemann DW, Keng PC. Characterization of radiation resistant hypoxic cell subpopulations in KHT sarcomas. (II). Cell sorting. *Br J Cancer* 1988; **58**: 296-300.
48. Tannock IF. The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour. *Br J Cancer* 1968; **22**: 258-273.
49. Mallick R, Demmy T. Regional lung chemotherapy techniques. *Innovations (Phila)* 2011; **6**: 1-9.
50. Knierim M, Paku S, Paweletz N, et al. Ultrastructural studies on the lung colonization by nonmetastatic rat tumor cells. *Anticancer Res* 1986; **6**: 669-682.
51. Lapis K, Paku S, Liotta LA. Endothelialization of embolized tumor cells during metastasis formation. *Clin Exp Metastasis* 1988; **6**: 73-89.
52. Paku S, Dome B, Toth R, et al. Organ-specificity of the extravasation process: an ultrastructural study. *Clin Exp Metastasis* 2000; **18**: 481-492.
53. Paku S, Paweletz N, Spiess E, et al. Ultrastructural analysis of experimentally induced invasion in the rat lung by tumor cells metastasizing lymphatically. *Anticancer Res* 1986; **6**: 957-966.
54. Machado EA, Gerard DA, Mitchell JR, et al. Arrest and extravasation of neoplastic cells. An electron microscopy study of serial sections at sequential stages. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1982; **396**: 73-89.

### SUPPORTING INFORMATION ON THE INTERNET

The following supporting information may be found in the online version of this article:

Supplementary materials and methods.

**Table S1.** Primary antibodies and fluorescent dyes used for immunofluorescence.

**Figure S1.** Tumour cells strip the alveolar epithelium from co-opted vessels.

**Figure S2.** Connective tissue localization within lung metastasis of HT1080, B16, MAT-B-III, C26, and HT25 cell lines.

**Figure S3.** Relationship between the metastatic tumor mass and the fine structure of the lungs.

## 50 Years ago in the *Journal of Pathology*...

### The fate of *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* in the mouse kidney

R. H. Gorrill

### Cystic fibrosis and acinar ectasia of the pancreas: Histochemical comparison of the intraluminal secretions

M. N-I. Walters and D. G. A. Gibb

To view these articles, and more, please visit:

[www.thejournalofpathology.com](http://www.thejournalofpathology.com)

Click 'ALL ISSUES (1892 - 2011)', to read articles going right back to Volume 1, Issue 1.

**The Journal of Pathology**  
*Understanding Disease*



ORIGINAL ARTICLE

Open Access



# Role of (myo)fibroblasts in the development of vascular and connective tissue structure of the C38 colorectal cancer in mice

Edina Bugyik<sup>1</sup>, Vanessza Szabó<sup>1</sup>, Katalin Dezső<sup>1</sup>, András Rókusz<sup>1</sup>, Armanda Szücs<sup>1</sup>, Péter Nagy<sup>1</sup>, József Tóvári<sup>2</sup>, Viktória László<sup>4,5</sup>, Balázs Döme<sup>3,4,5,6\*</sup> and Sándor Paku<sup>1,7\*</sup>

## Abstract

**Background:** It remains unclear if the vascular and connective tissue structures of primary and metastatic tumors are intrinsically determined or whether these characteristics are defined by the host tissue. Therefore we examined the microanatomical steps of vasculature and connective tissue development of C38 colon carcinoma in different tissues.

**Methods:** Tumors produced in mice at five different locations (the cecal wall, skin, liver, lung, and brain) were analyzed using fluorescent immunohistochemistry, electron microscopy and quantitative real-time polymerase chain reaction.

**Results:** We found that in the cecal wall, skin, liver, and lung, resident fibroblasts differentiate into collagenous matrix-producing myofibroblasts at the tumor periphery. These activated fibroblasts together with the produced matrix were incorporated by the tumor. The connective tissue development culminated in the appearance of intratumoral tissue columns (centrally located single microvessels embedded in connective tissue and smooth muscle actin-expressing myofibroblasts surrounded by basement membrane). Conversely, in the brain (which lacks fibroblasts), C38 metastases only induced the development of vascularized desmoplastic tissue columns when the growing tumor reached the fibroblast-containing meninges.

**Conclusions:** Our data suggest that the desmoplastic host tissue response is induced by tumor-derived fibrogenic molecules acting on host tissue fibroblasts. We concluded that not only the host tissue characteristics but also the tumor-derived fibrogenic signals determine the vascular and connective tissue structure of tumors.

**Keywords:** Metastasis, Vasculature, Myofibroblasts, Incorporation

## Introduction

The mechanism of vascularization in primary and metastatic tumors has long been debated. The tumor vascular pattern has been proposed to be indicative of the histologic type of the tumor [1]. Konerding et al. [2] examined the vascular structure of subcutaneous tumors using

four tumor cell lines of different origins. They found that the vascular structure is characteristic of the individual tumor and showed that the vascular structure does not depend on the size and/or the rate of lesion growth but rather on the tumor type. In contrast, Solesvik et al. [3] investigated human malignant melanoma xenografts, and despite the identical histological type, different vascular patterns were found. They also observed that slow-growing melanomas had higher necrotic fractions and lower vessel volume per intact tumor volume than rapidly growing tumors.

\*Correspondence: balazs.dome@meduniwien.ac.at; paku@korb1.sote.hu

<sup>1</sup> First Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Budapest, Üllői út 26, 1085, Hungary

<sup>4</sup> Department of Thoracic Surgery, Medical University of Vienna, Waehringer Guertel 18-20, 1090 Vienna, Austria

Full list of author information is available at the end of the article



In addition to tumor type, the extracellular matrix (collagen and basement membrane) structure of the host tissue can also have an influence on the vascular and connective tissue structure of the tumor. It was demonstrated that in brain metastases, the capillary basement membrane (BM) is the primary substrate for adhesion, migration and growth of the extravasated cells [4–6]. It was shown that the highly metastatic Lewis lung carcinoma (3LL-HH) tumor cell line uses the cellular side of the BM as a substrate for spreading during invasion of muscle, peripheral nerve and adipose tissue [7]. During this process, host cells are detached from their BM and become degraded; however, their BM remains intact. Tumor cell migration on the cellular side of the BM also plays an important role in the vascularization of 3LL-HH liver metastases [8].

In liver [9, 10], brain [11] and lung [12] metastases, it was shown that the differentiation grade of the tumor can also have an impact on the histologic structure of the metastases. Three different growth patterns were described in liver metastases of colorectal adenocarcinomas [9]. In the replacement growth pattern (high grade), the structure of the liver is preserved. However, in desmoplastic and pushing growth patterns, the structure of the liver is disturbed. In the pushing growth pattern, liver plates are pushed aside. As a result, compressed liver parenchyma surrounds the metastases. In the desmoplastic growth, a robust fibrous capsule separates the liver parenchyma from the tumor tissue.

Earlier, we described the development of the vasculature in a “pushing-type” experimental colorectal carcinoma model (C38) in the liver [13]. During the growth of metastases, smooth muscle actin (SMA)-positive cells appeared at the tumor-parenchyma interface, while hepatocytes disappeared from this region. This process resulted in the appearance of vascular lakes formed by the fusion of hepatic sinusoids at the border of the metastases. Fused sinusoids and collagenous matrix-producing SMA-positive myofibroblasts became incorporated into the growing tumor. The deepest part of the invagination was separated from the surrounding host tissue, and the process culminated in the formation of connective tissue columns with a centrally located, functional vessel. We believe that the formation of these columns is a characteristic feature of the C38 tumor. However, in experimental brain metastases, these structures were not present. Instead, the brain microvessels were directly surrounded by the tumor cells. This raises the question of whether the appearance of vessel-containing columns is a consequence of the host tissue’s microenvironmental effects on the tumor or, alternatively, whether these structures are intrinsic characteristic features of certain tumor types. Thus, their presence is independent from the target host

tissue microenvironment. The main goal of the present study was to clarify whether the vascular and connective tissue structure of tumors are intrinsically determined by the tumor type or, alternatively, if these features are defined by the host tissue. We generated experimental tumors (C38 colon cancer) at five different locations (skin, cecal wall, liver, brain and lung) and analyzed their vascular and connective tissue structures. As the formation and remodeling of myofibroblast-containing connective tissue columns require active fibrogenesis, we also investigated the possible role of fibrogenic growth factors during column formation.

## Materials and methods

### Animals and tumor cell line

Eight-week-old male C57Bl/6 mice were obtained from the animal facility of the First Department of Pathology and Experimental Cancer Research of Semmelweis University (Budapest, Hungary). The animal study protocols were conducted according to National Institute of Health (NIH) guidelines for animal care and were approved by the Animal Care and Use Committee of Semmelweis University (PEI/001/2457-6/2015). The C38 colorectal carcinoma cell line was maintained *in vivo* by serial subcutaneous transplantations, as described previously [13]. Subcutaneous tumors were removed and cut into small pieces (~0.5 cm<sup>3</sup>) and were implanted under the skin of C57Bl/6 mice.

### In vivo experiments

To generate experimental tumors (subcutaneous tissue, cecal wall, brain, liver, and lung), subcutaneously growing C38 tumor tissue was removed, cut into small pieces (~2 mm<sup>3</sup>), and digested in RPMI-1640 medium (Cat. No.: R8758, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) supplemented with 0.7 mg/mL collagenase (Cat. No.: C5138, Sigma-Aldrich) at 37 °C, for 45 min. After filtration through fourfold sterile gauze, cells were centrifuged (800 rpm, 10 min, 4 °C). The pellet was resuspended in 10 mL of RPMI-1640 medium without any supplement, and the number of viable tumor cells was counted using the trypan blue exclusion test. Mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine–xylazine (Cat. No.: K113, 80:12 mg/kg; Sigma-Aldrich).

In the orthotopic primary tumor model, a midline incision was made in the abdomen, and the cecum was gently exteriorized onto gauze impregnated with saline. Cells were injected into the cecal wall of mice with a 30-gauge needle (Braun, Melsungen, Germany) in ~5 µL volume (~2 × 10<sup>4</sup> cells). The cecum was returned to the abdominal cavity, and the incision was closed.

Cells were injected heterotopically into the brain, spleen, and footpad of the mice. Brain tumors were

produced as described previously [11]. Briefly, the right parietal bone was drilled with a 21-gauge needle (Braun) 2 mm posterior to the coronal suture and 1 mm lateral to the sagittal suture. Ten thousand cells in a volume of 2  $\mu$ L were slowly injected using a 10  $\mu$ L Hamilton syringe. Liver metastases were produced by injecting tumor cells ( $2 \times 10^5$  cells in a volume of 50  $\mu$ L) into the spleen of mice as described previously [13]. To produce lung metastases, cell suspension ( $5 \times 10^4$  cells in a volume of 20  $\mu$ L) was injected into the footpads of the hind legs of the mice. The legs were amputated 18–28 days following tumor cell injection.

Subcutaneous tumors were generated by implanting 0.5 cm<sup>3</sup> tumor pieces under the skin of the mice.

Animals were sacrificed 7–10 days after intracranial injection, 15–18 days after intrasplenic injection, 15–21 days after subcutaneous transplantation, 21 days after orthotopic injection, and 5–8 weeks after hind leg amputation.

#### Immunofluorescence analysis

Tumors from the five different locations were removed and frozen in isopentane (Sigma-Aldrich) chilled with liquid nitrogen. Frozen sections (15  $\mu$ m) were fixed in methanol (–20 °C) for 10 min and incubated at room temperature (1 h) with a mixture of primary antibodies (Table 1). After washing, sections were incubated (30 min) with appropriate secondary antibodies (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) (Table 1). Samples were analyzed by confocal laser scanning microscopy using a Bio-Rad MRC-1024 system (Bio-Rad, Richmond, CA, USA).

#### Morphometric analysis

Frozen sections of tumor samples from all locations were stained for CD31 and laminin. Sections were scanned using Panoramic Scanner (3D-Histech Ltd., Budapest, Hungary), and a morphometric analysis was performed using Panoramic Viewer software (3D-Histech Ltd.). Only the columns containing one individual vessel were used during measurements. The distance between the

basement membrane (BM) of the central vessel and the laminin deposited by the tumor cells around the column was measured at two sides of the vessel. The orientation of the columns in the tumor tissues was random, resulting in cut profiles of different ovality. Therefore, we always determined the smallest distance between the central vessel and the column edge. At least 5 mice/tumor location and three slides from each tumor were used. Ten to twenty vessels/slide were measured.

#### Electron microscopy

Tumor-bearing mice were anesthetized and perfused via the left ventricle with 1 $\times$  phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min and with a mixture of 4% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in PBS (pH 7.2) for 15 min at room temperature. Tissues containing tumors (cecal wall, brain, liver, lung, and subcutaneous tissue) were removed, cut into 1–2 mm pieces, and immersed in the same fixative for an additional 2 h. Pieces were post-fixed in 1% OsO<sub>4</sub> and 0.5% K-ferrocyanide in PBS for 2 h, dehydrated in a graded series of acetone, and embedded in Spurr's mixture. Semi-thin sections of samples stained by 0.5% toluidine blue (pH 8.5) were analyzed. Ultrathin sections cut by an RMC MT-7 ultramicrotome (Research and Manufacturing Co, Tucson, AZ) were contrasted with uranyl-acetate and lead citrate and analyzed using a Philips CM10 electron microscope (Philips, Eindhoven, The Netherlands).

#### Cell lines

B16 mouse melanoma cells were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), and  $1 \times 10^6$  tumor cells were collected in lysis buffer.

To obtain a cell culture from the dissociated C38 tumor,  $2.5 \times 10^5$  viable tumor cells were seeded into T-25 flasks containing 5 ml of complete media and incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. The cells were subcultured every 3 days by a conventional trypsinization method, and  $1 \times 10^6$  tumor cells were collected in lysis buffer.

**Table 1 Antibodies and fluorescent dye used for immunofluorescence**

Antibody	Species	Manufacturer	Catalog number	Dilution
CD31	Rat monoclonal	BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA	550275	1:50
Laminin	Rabbit polyclonal	DAKO, Glostrup, Denmark	Z0097	1:200
Collagen I	Rabbit polyclonal	Chemicon, Billerica, MA, USA	AB765P	1:100
SMA	Mouse monoclonal	DAKO, Glostrup, Denmark	M0851	1:200
panCK-FITC	Mouse monoclonal	DAKO, Glostrup, Denmark	F0859	1:100
TOTO-3		Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	T3604	1:500

(See figure on next page.)

**Fig. 1** Accumulation and incorporation of vessels and connective tissue at the tumor surface. **A, B** Subcutaneously growing C38 tumor. The accumulation of collagen I (*red*)- and smooth muscle actin (SMA)-expressing myofibroblasts (*blue*) is present at the tumor surface (*arrows*). Black areas represent viable tumor mass (*T*) beneath the tumor surface. For clarity, **B** shows the blue (SMA) channel separately. Numerous vessels (CD31, *green*) are being incorporated (together with connective tissue) by the tumor (*large arrowheads*). Smaller connective tissue columns separated from the incorporated connective tissue are visible within the tumor tissue (*small arrowheads*). *N* necrosis. **C, D** C38 tumor (*T*) growing in the liver. In the left upper part of **c**, the peritumoral liver parenchyma—with the dense CD31-positive network of sinusoids (*green*)—is visible. The tumor-parenchyma interface is indicated by arrows. Here, accumulation of SMA-positive cells can be observed (see also **D**, for the separate blue channel). These cells are also present in the invaginations (*large arrowheads*) and in the incorporated host connective tissue deep within the tumor (*small arrowheads*). The invaginations and the incorporated host tissue pieces are delineated by the laminin (*red*) deposited by the tumor cells. Inset: high-power micrograph of the surface of a C38 liver metastasis, demonstrating the accumulation of SMA-positive cells (*blue*). Tumor tissue is present on the left side (*black area*). On the right side, pan-cytokeratin-expressing hepatocytes (*green*) and CD31-positive vessels (*red*) are visible. Between the hepatocytes and the tumor tissue, SMA-positive cells (*blue*) can be observed. **E, F** A C38 brain metastasis (**E**) is highlighted and bordered by laminin (*red*), which is deposited by tumor cells. CD31-positive vessels (*green*) appear yellowish because of their close proximity of the basement membrane (*red*) (**E**). No SMA accumulation is present at the periphery of the tumor, as can be seen on the separate blue (SMA) channel (**F**). The peritumoral vessels are smaller than the intratumoral vessels, which are surrounded by SMA-positive pericytes (*blue*). SMA-positive cells are not found around the peritumoral vessels, excluding the arterioles. *N* necrosis, *T* tumor tissue

### Gene expression analysis

Total RNA was isolated with Trizol (Cat. No.: 15596–018, Life Technologies, Waltham, MA, USA). RNA concentration was measured by a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE), and 1  $\mu$ g RNA per sample was converted into cDNA.

A high capacity cDNA reverse transcription kit (Cat. No.: 4368814, Thermo Fisher Scientific) was used for cDNA synthesis as recommended by the supplier. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed by the ABI Quant Studio3 (Thermo Fisher Scientific) sequence detection system using Thermo Fisher Scientific TaqMan gene expression assays (connective tissue growth factor (Ctgf): Mm01192931\_g1; Fibroblast growth factor 2 (Fgf2): Mm00433287\_m1; Transforming growth factor- $\beta$  1 (Tgfb1): Mm01178820\_m1; Transforming growth factor- $\beta$  2 (Tgfb2): Mm00436955\_m1; Transforming growth factor- $\beta$  3 (Tgfb3): Mm00436960\_m1; Platelet-derived growth factor- $\beta$  Pdgfb: Mm01298578\_m1) according to the manufacturer's instructions. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, Thermo Fischer Scientific, Cat No.: 4352932E) was used as an endogenous control. All samples were run in triplicate in a 20  $\mu$ L reaction volume. The results were obtained as threshold cycle (CT) values. Expression levels were calculated using the  $\Delta$ CT method. The values were calculated as the mean values of three independent measurements, and the expression levels of mRNA in all samples were defined as ratios to GAPDH expression (%).

### Statistical analysis

Data are represented as the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments. The statistical significance of differences between groups was analyzed with Student's *t* test. Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant (GraphPad Software, La Jolla, CA).

### Results

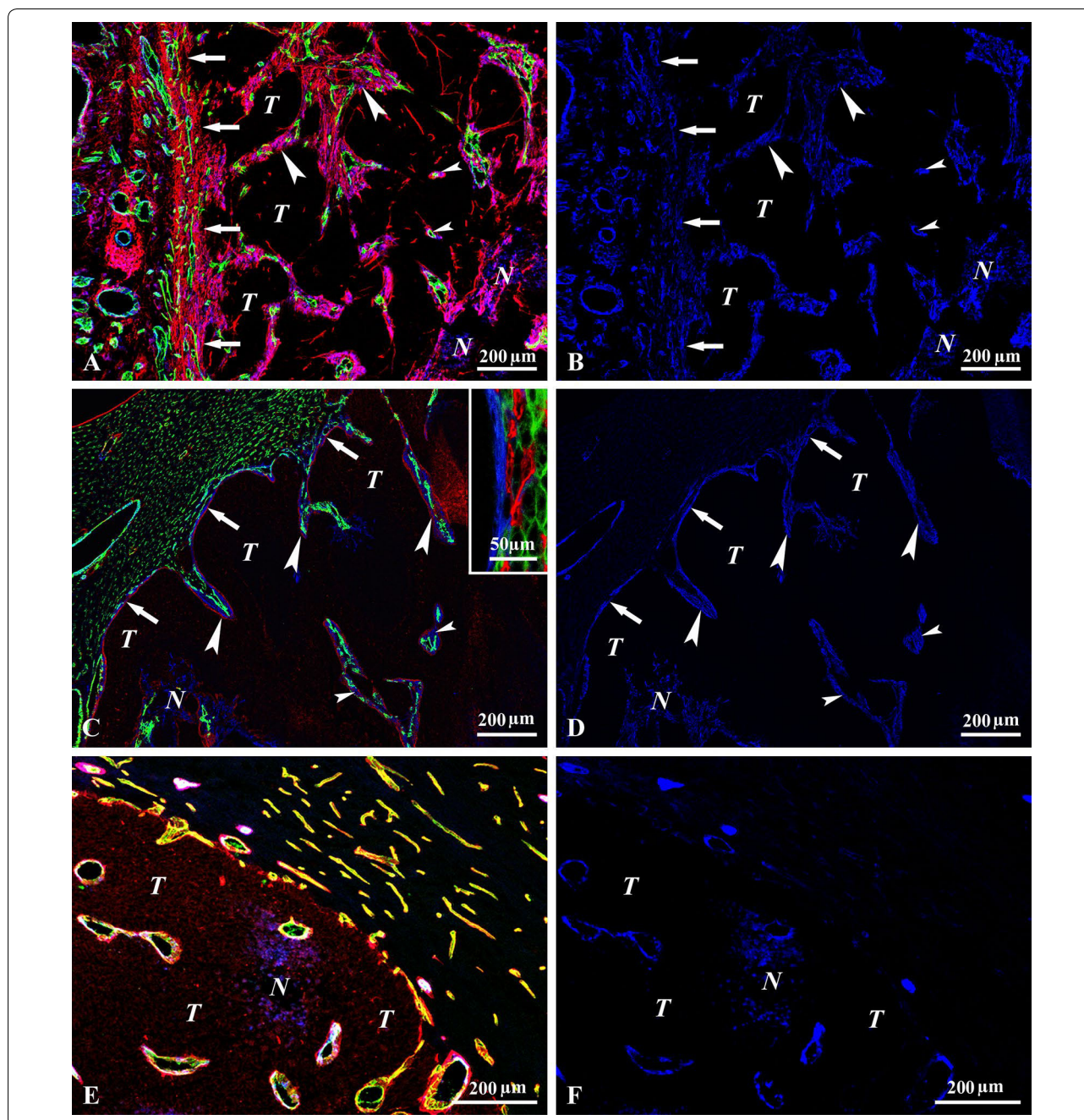
#### Incorporation of vessels and connective tissue at the tumor surface

At the periphery of C38 tumors growing in subcutaneous tissue, liver, colon, and lung, we found smooth muscle actin (SMA)-expressing activated fibroblasts (myofibroblasts) and the consequently accumulated collagen (Fig. 1A–D). However, there was no myofibroblast or collagen accumulation around tumors growing in the brain, as only the pericytes of the intratumoral vessels were SMA-positive (Fig. 1E, F). Accordingly, although C38 tumors acquired their vasculature by the incorporation of the peritumoral host tissue at all tumor sites, the incorporation process in the brain was different from the incorporation process in the skin, colon, liver, and lung. For the latter organs, where SMA-positive cells and collagen accumulated around the tumors, invaginations of different sizes were formed at the surface of the tumors containing vessels and perivascular connective tissue (Figs. 1A, C, 2A–C). BM deposited by the tumor delineated the invaginations (Fig. 2A).

The situation was slightly different in the lung tissue, where the tumor mass advanced through the alveoli, thereby incorporating the alveolar walls (with all of its components). This process resulted in invagination-like structures in the tumor (Fig. 3D).

In contrast, in tumors growing in the brain, the parenchyma (astrocytes) was completely separated from the vessels and excluded from the tumor (Fig. 2D). However, pericytes maintained their original position, and invaginations did not develop in the brain. Instead, the tumor tissue engulfed the cerebral capillaries one by one at the advancing margin. The tumor cells attached tightly to the capillary BM, and no deposited collagen could be observed between the vessels and the tumor cells (Fig. 2E).



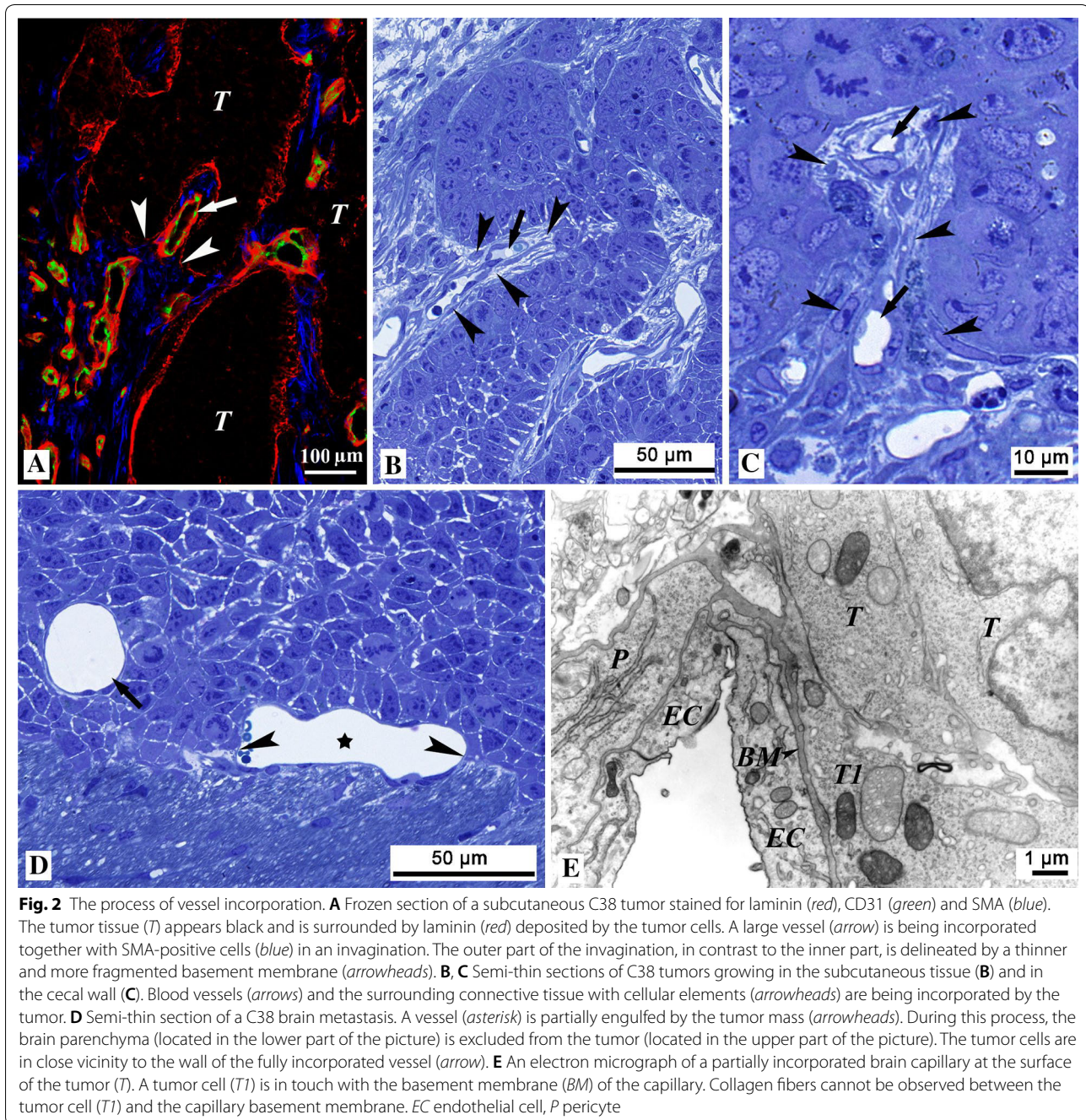


### Maturation of the columns

In early invaginations, the number of incorporated vessels and the amount of connective tissue were dependent on the size of the vessels and the invaginations (Figs. 1A, C, 3A–D, 4A). As invaginations with multiple capillaries moved deeper into the tumor tissue, tumor cells separated the microvessels from each other. This “maturation” process culminated in the appearance of connective tissue columns with a single central vessel (Figs. 3A–D, 4A–E). In detail, the cross-sectional view of the columns showed the

following structural elements from inside out: endothelial layer, capillary BM, SMA-positive cells embedded in collagen-containing matrix, and BM of the tumor (Fig. 4B–F). We observed that both the size of the connective tissue columns and the amount of deposited perivascular BM material increased from the peritumoral host tissue towards the tumor center (Fig. 4A). We found the thickest connective tissue columns in subcutaneous tumors ( $18.9 \pm 1.9 \mu\text{m}$ ), whereas the diameter of the columns at other locations (liver:  $15.5 \pm 1.7 \mu\text{m}^*$ , lung:  $12.2 \pm 2.3 \mu\text{m}^*$ ,





cecal wall:  $13.2 \pm 2.1 \mu\text{m}^*$ ) were significantly smaller (\*t test,  $P \leq 0.05$ ). The final consequence of the maturation process was that at all locations (where collagen and SMA-positive cells accumulated around the tumors), the same connective tissue and vascular structure developed.

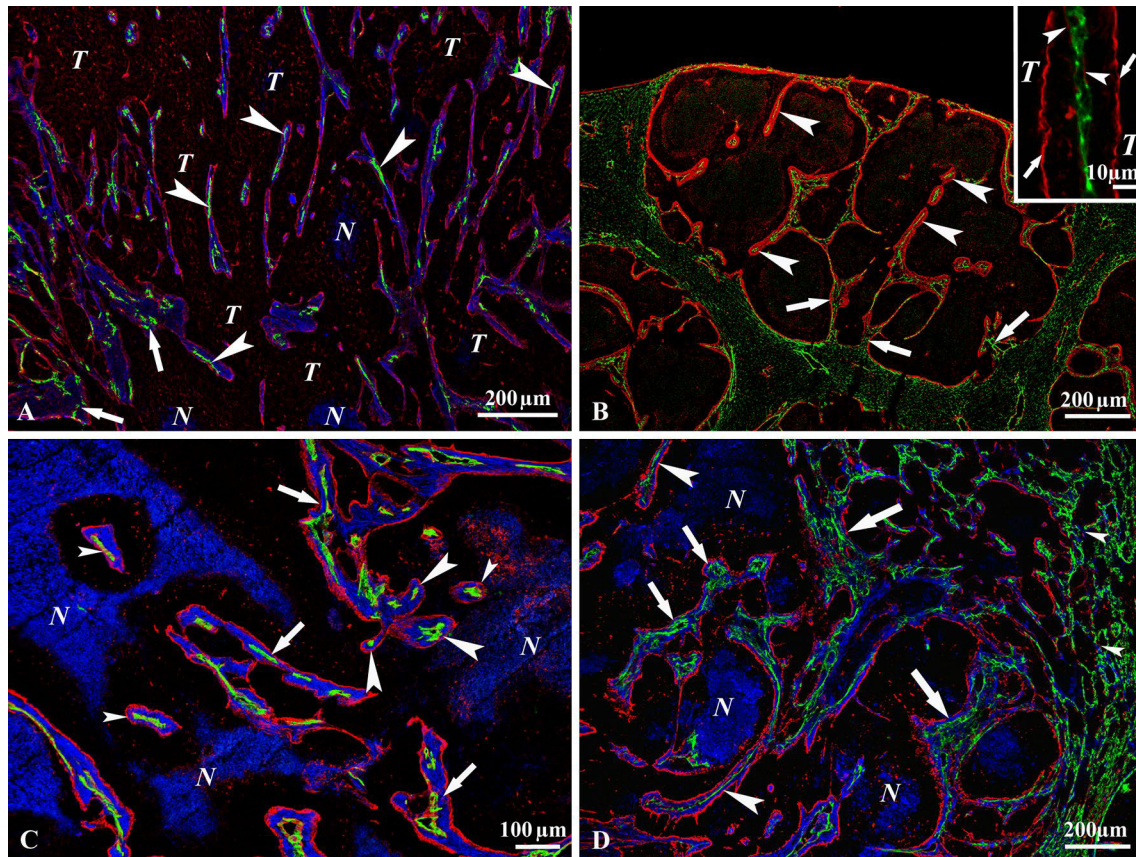
As the brain parenchyma lacks fibroblasts, no connective tissue columns were produced in this location. However, we occasionally observed connective tissue columns also in the C38 cerebral metastases when the growing tumor reached the meningeal fibroblasts (Fig. 4F).

However, we could only minimally detect columns that reached the single-vessel stage during their development.

#### Relative gene expression analysis of fibrogenic growth factors

In our earlier work, we analyzed in detail the vascularization of primary (intracutaneous) and metastatic (lung) B16 melanoma and found no accumulation of collagen at the tumor periphery or around the incorporated vessels (i.e., we did not observe intratumoral tissue columns



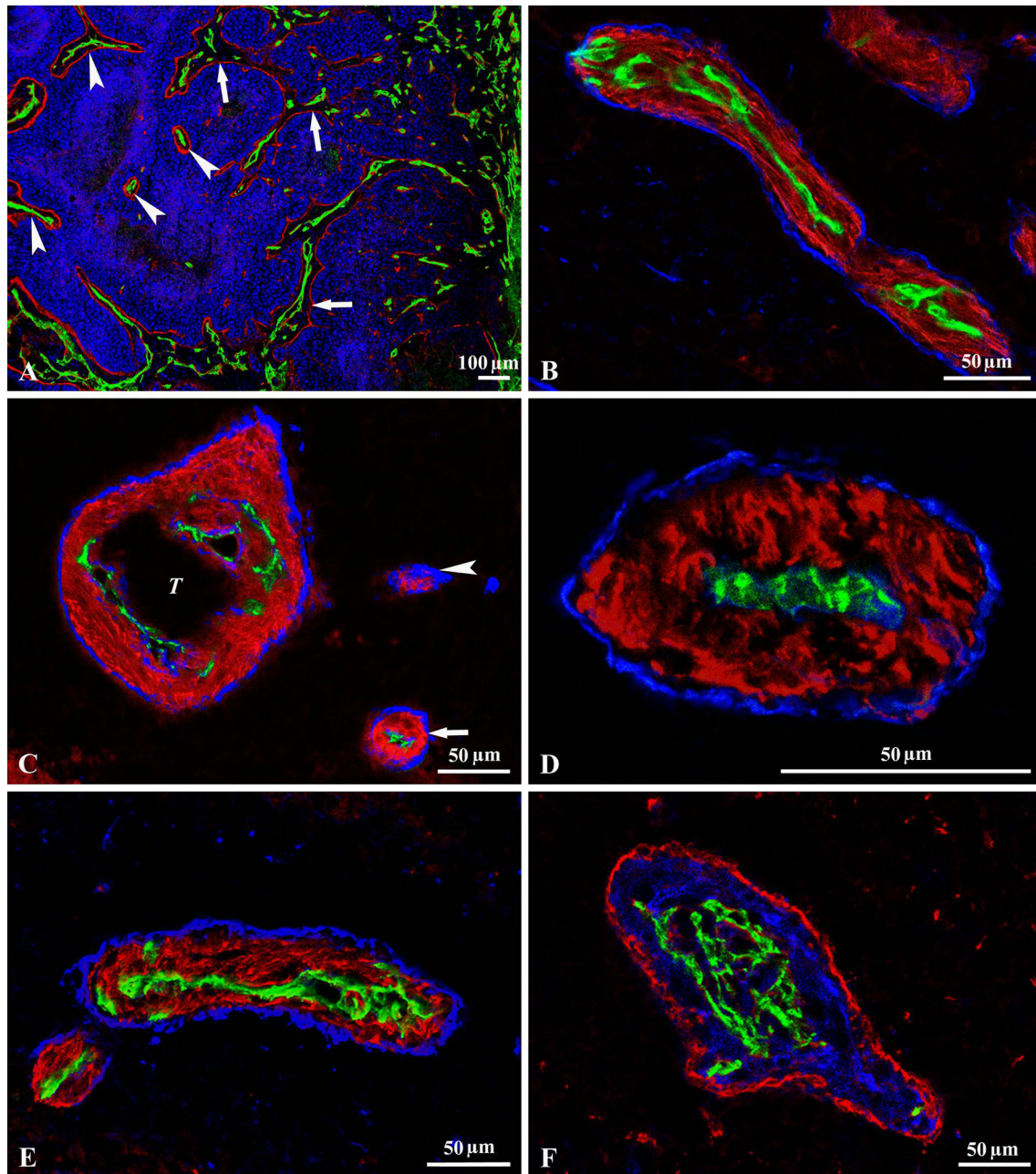


**Fig. 3** “Processing” of the invaginations. **A** A C38 tumor growing in the cecal wall. Incorporated connective tissue, which contains myofibroblasts (SMA, blue) and numerous vessels (CD31, green) (arrows) is visible throughout the tumor mass. All blue areas represent the columns, excluding necrotic areas (marked by N). Necrotic tissue is also highlighted by the nonspecific binding of the anti-mouse secondary antibody (used to detect the mouse monoclonal primary antibody against SMA) to these areas. Note the high number of advanced-stage connective tissue columns that contain only one single vessel (*arrowheads*). The columns are delineated by laminin (red) containing basement membrane produced by the tumor (T). **B** C38 metastasis in the liver. The early-stage incorporations contain numerous vessels (CD31, green) (*arrows*). Advanced-stage connective tissue columns, which contain single central vessels, are present intratumorally (*arrowheads*). Laminin (red) deposited by the tumor cells borders the incorporated tissue and the columns. The inset shows the fine structure of a longitudinally sectioned column containing a single central vessel (CD31, green). The basement membrane of the vessel is marked by small arrowheads. The basement membrane marked by small arrows is deposited by the tumor (T) at the surface of the column. **C** Subcutaneous C38 tumor. In addition to columns filled with myofibroblasts (SMA, blue) (*small arrowheads*) and containing a single central vessel (CD31, green), there are areas containing connective tissue columns with numerous vessels (*arrows*). Note the columns (*large arrowheads*) separated only partially from a larger connective tissue mass during the final steps of the maturation process. The incorporated connective tissue and the columns are bordered by laminin (red) deposited by the tumor cells. N marks areas of necrotic tissue that also appear blue, although this staining is due to the nonspecific binding of the anti-mouse secondary antibody used to detect the anti-SMA antibody. **D** C38 lung metastasis. The section is labeled with anti-CD31 (green), anti-laminin (red) and anti-SMA antibodies (blue). There are no SMA-positive cells (blue) in the alveolar walls of the normal lung tissue far from the metastasis (right edge of the micrograph). SMA-positive cells begin to appear in the peritumoral lung tissue (*small arrowheads*), but the number of these cells only notably increases intratumorally. Large early-stage connective tissue columns are present at the tumor periphery (*large arrows*), from which smaller tissue pieces containing different numbers of vessels are detaching (*small arrows*). *Large arrowheads* indicate mature columns with single vessels. N marks areas of necrotic tissue that also appear blue, although this staining is due to the nonspecific binding of the anti-mouse secondary antibody used to detect the anti-SMA antibody

in B16 tumors) [12, 14, 15]. Therefore, we used the B16 cell line as a control to compare the expression levels of fibrogenic factors with those of the column-inducing C38 tumor line. We found that the relative expression levels of *Pdgfb*, *Fgf2*, *Ctgf* (Fig. 5a) and *Tgf- $\beta$*  (Fig. 5b) mRNAs were significantly higher in C38 cells.

## Discussion

In the present study, we analyzed the vascular and connective tissue structures of C38 colon carcinoma growing in different host tissues. The cecal wall represents the primary tumor site, whereas the skin, liver, lung, and brain tissues can be considered metastatic locations.

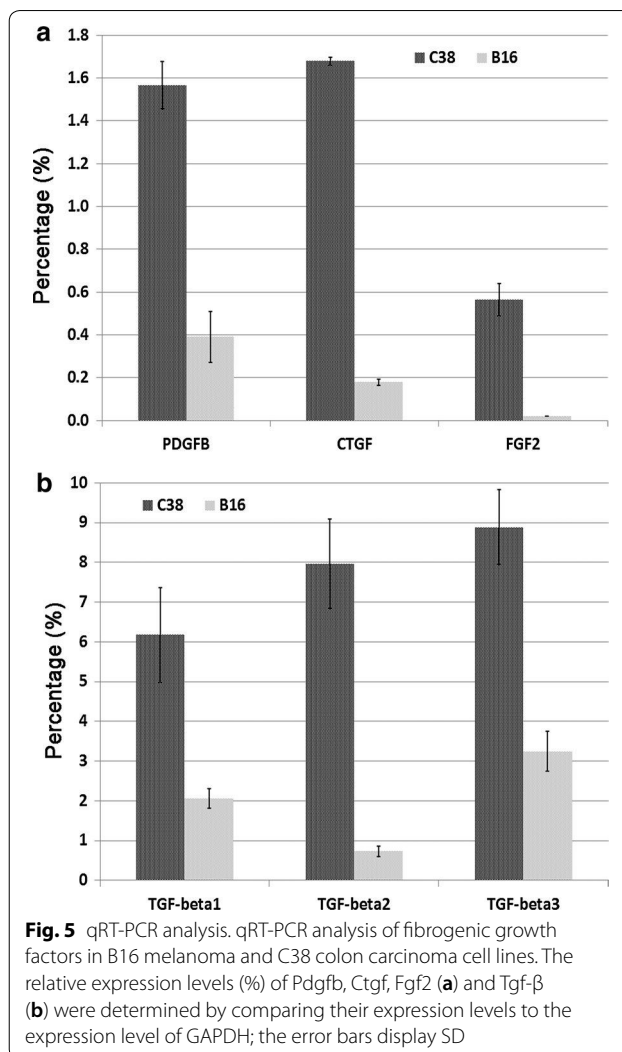


**Fig. 4** Maturation and final form of the columns. **A** Frozen section of a subcutaneous C38 tumor labeled for laminin (red), CD31 (green) and cell nuclei (TOTO-3, blue). The maturation process of the columns can be observed as we move from the peritumoral host tissue (right side of the picture) towards the center of the tumor (left side): the size of the columns and the amount of the deposited laminin increase from the periphery towards the tumor center. The newly incorporated connective tissue columns contain more vessels (arrows). After “processing” by tumor cells, they contain only a single vessel (arrowheads). **B** Tissue column in an orthotopically growing C38 tumor (black areas). The centrally located vessel (CD31, green) is surrounded by SMA-positive myofibroblasts (red) and enclosed by laminin (blue). **C** The frozen section of a C38 liver metastasis labeled with CD31 (green), SMA (red) and laminin (blue). Black areas represent tumor tissue. As maturation of the tissue columns progresses, the central part of the large column containing multiple vessels is invaded by the tumor (T). The tumor mass present within the column is not delineated by laminin, which indicates an early phase of invasion. At the lower right, a mature column is visible (arrow) containing a single vessel located centrally. Note the presence of a “misprocessed” column (arrowhead) that contains no vessels. **D** Connective tissue column in a subcutaneous C38 tumor (tumor cells fill the outer black area). The completely matured column contains a single central vessel (CD31, green) surrounded by connective tissue, which contains collagen I (red) and laminin deposited by the tumor cells (blue). **E** C38 lung metastasis. The black area represents tumor tissue. The column shows the same structure as in other locations. A central vessel can be seen (CD31, green), surrounded by SMA-positive cells (red) and laminin (blue). **F** C38 metastasis (black areas) reaching the brain surface. A connective tissue column that contains numerous vessels (CD31, green) surrounded by SMA-positive cells (blue) and laminin (red) produced by the tumor can be observed at this location



Tumor structure is dependent on the availability of tumor-derived fibrogenic factors and host tissue fibroblasts. Subcutaneous, cecal, hepatic, and pulmonary fibroblasts were peritumorally transformed into collagen-producing myofibroblasts. The evolution of tumorous connective tissue in these organs culminated in the appearance of intratumoral connective tissue columns with central vessels. The structure of these columns was identical in all of the aforementioned locations, resulting in a similar histological appearance of the tumors independent of the host organ. Therefore, it can be concluded that the tumor cells activate the peritumoral host tissue fibroblasts, which then participate in the formation of connective tissue columns. The activation of fibroblasts may be stimulated by the synthesis and secretion of tumor cell-derived “fibrogenic” factors. This concept, although requiring further studies, is supported by our observation that column-inducing C38 cells express higher levels of fibrogenic factors (e.g., Tgf-betas, Fgf2, Pdgfb, and Ctgf) [16–18] than B16 cells, which do not form tissue column-containing tumors in any locations [12, 14, 15]. In further support of our aforementioned findings, we observed that no intratumoral connective tissue columns developed in the brain (which lacks fibroblasts); instead, the capillaries of C38 cerebral metastasis were surrounded exclusively by tumor cells. Although previous studies suggest that pericytes can play an active role in connective tissue production [19–21], according to our results, mouse brain capillary pericytes did not produce connective tissue in the experimental conditions we used. It is also important to mention that intratumoral tissue columns were detected in cerebral C38 tumors when the metastatic tissue reached the meninges, where fibroblasts are located. In summary, the presence of the appropriate cell type (i.e., fibroblasts) in the tumor microenvironment and the synthesis of fibrogenic factors by the tumor cells can result in the same histological appearance of the tumor, regardless of the origin of the host tissue.

The early invaginations inevitably produced at the surface of the growing tumor spheres generally contain numerous incorporated vessels. Deeper in the tumor, the invaginations are “processed” (the tumor tissue pinches off connective tissue pieces, including vessels) down to the single-vessel stage (i.e., the connective tissue column produced contains only a single vessel). Although the size of these columns was fairly uniform in the different organs, we found significantly larger tissue columns in the skin compared with other organs. We cannot provide a reasonable explanation for this difference, as one would expect the diameter of the columns to be determined by the diffusion of oxygen and nutrients. However, tissue columns with the largest diameter can provide sufficient blood supply for several rows of tumor cells around the



columns. It is also worth noting that the generation of intratumoral columns with such a regular structure is a unique characteristic of C38 tumors. Nevertheless, other tumor types also incorporate and process connective tissue (including the blood vessels) into rather irregular networks that are still able to provide tumors with oxygen and nutrients (unpublished data).

We found that the amount of connective tissue present in the columns and the integrity and thickness of the BM deposited by the tumor increased towards the tumor center, suggesting that the structures in the center of the tumor are older than those at the periphery. This finding is in line with the notion that “for tumor survival the edge is the future and the center is history” [22] and, moreover, provides additional proof that vascularization occurs by vessel incorporation, not vessel ingrowth [11–13, 23–31].

In conclusion, in the current study, we examined the microanatomy and the vascularization process of C38

colon carcinoma in five different organs using confocal and electron microscopy. Our results suggest that the vascular and connective tissue structures of tumors are determined by both the primary tumor type (i.e., the production of tumor-derived fibrogenic factors) and the host tissue microenvironment (i.e., the availability of suitable connective tissue elements).

#### Authors' contributions

SP, BD, JT, PN, and EB wrote the manuscript. EB, VS, and KD performed the animal experiments and immunofluorescence analysis. EB performed the morphometric analysis. SP performed the electron microscopic studies. AS was responsible for the in vitro cell cultures. AR, AS, and VL performed the gene expression analysis and the statistics. All authors read and approved the final manuscript.

#### Author details

<sup>1</sup> First Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Budapest, Üllői út 26, 1085, Hungary. <sup>2</sup> Department of Experimental Pharmacology, National Institute of Oncology, Budapest 1122, Hungary. <sup>3</sup> Department of Thoracic Surgery, Semmelweis University-National Institute of Oncology, Budapest 1122, Hungary. <sup>4</sup> Department of Thoracic Surgery, Medical University of Vienna, Waehringer Guertel 18-20, 1090 Vienna, Austria. <sup>5</sup> Department of Biomedical Imaging and Image-guided Therapy, Medical University of Vienna, 1090 Vienna, Austria. <sup>6</sup> National Koranyi Institute of Pulmonology, Budapest 1122, Hungary. <sup>7</sup> Tumor Progression Research Group, Hungarian Academy of Sciences-Semmelweis University, Budapest 1085, Hungary.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

#### Consent for publication

Not applicable.

#### Ethics approval and consent to participate

The animal study protocols were conducted according to National Institute of Health (NIH) guidelines for animal care and were approved by the Animal Care and Use Committee of Semmelweis University (PEI/001/2457-6/2015).

#### Funding

KD is the recipient of the Bolyai fellowship of the Hungarian Academy of Sciences and received support from the National Excellence Program (TÁMOP 4.2.4. A/1-11-1-2012-0001). BD acknowledges support from the Hungarian NRDl Office (K109626, K108465, KNN121510 and SNN114490). SP and VL acknowledge support from the Hungarian NRDl Office (ANN125583). JT acknowledges support from the National Research, Development and Innovation Office (NKFIH116295). EB is the recipient of postdoctoral fellowship from the Hungarian Academy of Sciences.

Received: 29 August 2017 Accepted: 26 June 2018

Published online: 05 July 2018

#### References

- Milne EN, Margulis AR, Noonan CD, Stoughton JT. Histologic type-specific vascular patterns in rat tumors. *Cancer*. 1967;20(10):1635–46.
- Konerding MA, Malkusch W, Klapthor B, van Ackern C, Fait E, Hill SA, et al. Evidence for characteristic vascular patterns in solid tumours: quantitative studies using corrosion casts. *Br J Cancer*. 1999;80(5–6):724–32.
- Solesvik OV, Rofstad EK, Brustad T. Vascular structure of five human malignant melanomas grown in athymic nude mice. *Br J Cancer*. 1982;46(4):557–67.
- Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, Klinkert WE, Goldbrunner R, Herms J, et al. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med*. 2010;16(1):116–22.
- Dome B, Timar J, Paku S. A novel concept of glomeruloid body formation in experimental cerebral metastases. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003;62(6):655–61.
- Carbonell WS, Ansorge O, Sibson N, Muschel R. The vascular basement membrane as "soil" in brain metastasis. *PLoS ONE*. 2009;4(6):e5857.
- Paku S, Timar J, Lapis K. Ultrastructure of invasion in different tissue types by Lewis lung tumour variants. *Virchows Archiv A Pathol Anat Histo-pathol*. 1990;417(5):435–42.
- Paku S, Lapis K. Morphological aspects of angiogenesis in experimental liver metastases. *Am J Pathol*. 1993;143(3):926–36.
- Vermeulen PB, Colpaert C, Salgado R, Royers R, Hellemans H, Van Den Heuvel E, et al. Liver metastases from colorectal adenocarcinomas grow in three patterns with different angiogenesis and desmoplasia. *J Pathol*. 2001;195(3):336–42.
- Stessels F, Van den Eynden G, Van der Auwera I, Salgado R, Van den Heuvel E, Harris AL, et al. Breast adenocarcinoma liver metastases, in contrast to colorectal cancer liver metastases, display a non-angiogenic growth pattern that preserves the stroma and lacks hypoxia. *Br J Cancer*. 2004;90(7):1429–36.
- Bugyik E, Dezso K, Reiniger L, Laszlo V, Tovari J, Timar J, et al. Lack of angiogenesis in experimental brain metastases. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2011;70(11):979–91.
- Szabo V, Bugyik E, Dezso K, Ecker N, Nagy P, Timar J, et al. Mechanism of tumour vascularization in experimental lung metastases. *J Pathol*. 2015;235(3):384–96.
- 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.
- Alino SF, Hilario E. Nodular organization and differential intrametastatic distribution of the fluorescent dye Hoechst 33342 in B16 melanoma liver metastasis. *Exp Cell Biol*. 1989;57(5):246–56.
- Dome B, Paku S, Somlai B, Timar J. Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. *J Pathol*. 2002;197(3):355–62.
- Anderberg C, Li H, Fredriksson L, Andrae J, Betsholtz C, Li X, et al. Paracrine signaling by platelet-derived growth factor-CC promotes tumor growth by recruitment of cancer-associated fibroblasts. *Can Res*. 2009;69(1):369–78.
- Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF-beta: the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(6):325–38.
- Darby IA, Zakuan N, Billet F, Desmouliere A. The myofibroblast, a key cell in normal and pathological tissue repair. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(6):1145–57.
- Goritz C, Dias DO, Tomilin N, Barbacid M, Shupliakov O, Frisen J. A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science*. 2011;333(6039):238–42.
- Soderblom C, Luo X, Blumenthal E, Bray E, Lyapichev K, Ramos J, et al. Perivascular fibroblasts form the fibrotic scar after contusive spinal cord injury. *J Neurosci*. 2013;33(34):13882–7.
- Makihara N, Arimura K, Ago T, Tachibana M, Nishimura A, Nakamura K, et al. Involvement of platelet-derived growth factor receptor beta in fibrosis through extracellular matrix protein production after ischemic stroke. *Exp Neurol*. 2015;264:127–34.
- Thompson WD. Tumour versus patient: vascular and tumour survival versus prognosis. *J Pathol*. 2001;193(4):425–6.
- Thompson WD, Shiach KJ, Fraser RA, McIntosh LC, Simpson JG. Tumours acquire their vasculature by vessel incorporation, not vessel ingrowth. *J Pathol*. 1987;151(4):323–32.
- Pezzella F, Pastorino U, Tagliabue E, Andreola S, Sozzi G, Gasparini G, et al. Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am J Pathol*. 1997;151(5):1417–23.
- Pezzella F, Di Bacco A, Andreola S, Nicholson AG, Pastorino U, Harris AL. Angiogenesis in primary lung cancer and lung secondaries. *Eur J Cancer*. 1996;32A(14):2494–500.
- Adighibe O, Micklem K, Campo L, Ferguson M, Harris A, Pozos R, et al. Is nonangiogenesis a novel pathway for cancer progression? A study using 3-dimensional tumour reconstructions. *Br J Cancer*. 2006;94(8):1176–9.
- Pezzella F, Manzotti M, Di Bacco A, Viale G, Nicholson AG, Price R, Ratcliffe C, Pastorino U, Gatter KC, Harris AL, Altman DG. Evidence for novel

- non-angiogenic pathway in breast-cancer metastasis. Breast cancer progression working party. *Lancet*. 2000;355(9217):1787–8.
28. Yousem SA. Peripheral squamous cell carcinoma of lung: patterns of growth with particular focus on airspace filling. *Hum Pathol*. 2009;40(6):861–7.
  29. Sardari Nia P, Hendriks J, Friedel G, Van Schil P, Van Marck E. Distinct angiogenic and non-angiogenic growth patterns of lung metastases from renal cell carcinoma. *Histopathology*. 2007;51(3):354–61.
  30. Frentzas S, Simoneau E, Bridgeman VL, Vermeulen PB, Foo S, Kostaras E, et al. Vessel co-option mediates resistance to anti-angiogenic therapy in liver metastases. *Nat Med*. 2016;22(11):1294–302.
  31. Bridgeman VL, Vermeulen PB, Foo S, Bilecz A, Daley F, Kostaras E, et al. Vessel co-option is common in human lung metastases and mediates resistance to anti-angiogenic therapy in preclinical lung metastasis models. *J Pathol*. 2017;241(3):362–74.

**Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:**

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

**At BMC, research is always in progress.**

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



# Tumorsejt-invázió/migráció szerepe kísérletes tüdőmetasztázisok ereződésében

Szabó Vanessza<sup>1</sup>, Bugyik Edina<sup>1,2</sup>, Dezső Katalin<sup>1</sup>, Tóvári József<sup>2,3</sup>, Döme Balázs<sup>2,3,5</sup>, Paku Sándor<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet; <sup>2</sup>Országos Onkológiai Intézet; <sup>3</sup>Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézet; <sup>4</sup>MTA-SE Molekuláris Onkológia Kutatócsoport, Budapest; <sup>5</sup>Bécsi Orvostudományi Egyetem, Mellkassebészeti Osztály, Bécs

## Kutatási támogatások:

A munka témájában folytatott kutatásainkat a KTIA AIK 12-1-2013-0041, OTKA-K109626, OTKA-K108465, OTKA-SNN114490, OTKA-K116151 és OTKA-K116295 számú pályázatokból fedezzük.

*Napjainkban is nagy kihívást jelent a tüdőáttétes betegek kezelése. A terápiák egy lehetséges célpontja a metasztázisok ereződésének gátlása. Vizsgálataink célja az volt, hogy a különböző eredetű tumorok esetében meghatározzuk a kísérletes tüdőmetasztázisok vaszkularizációjának lehetséges mechanizmusait. Öt tumorsejtvonal (HT1080, HT25, B16, C26 és MATB) intravénás oltásával hoztunk létre tüdőáttéteket. Mindegyik sejtvonal ugyanazt a vaszkularizációs formát mutatta. A tumorok a meglévő alveoláris kapillárisok bekebelezésével tettek szert saját érhálózatra. A tumorsejtek inváziójuk/migrációjuk során leválasztották a pneumocitákat a kapillárisokról úgy, hogy az azok között található kettős bazális membránt szétválasztották. A folyamat előrehaladtával a tumor belsejében található, erősen komprimált pneumociták degradálódtak, de a bekebelezett és lecsupaszított erek funkcionálisak maradtak, így képesek maradtak a metasztázis vérellátását biztosítani. Magyar Onkológia 59:319–323, 2015*

**Kulcsszavak:** tüdőmetasztázis, ereződés, érbekebelezés, tumorsejt-migráció

*Treatment of patients with lung metastases remains a major challenge. A possible target for therapies is the inhibition of vascularization of metastases. Our study aimed to determine the possible mechanisms of the experimental lung metastasis vascularisation for tumours of various origins. We created lung metastases by intravenous injection of five tumour cell lines (HT1080, HT25, B16, C26 and MATB). Each cell line showed the same vascularisation type. Tumours gained vasculature by advancing through the alveolar spaces thereby incorporating the pre-existing alveolar capillaries (i.e. vessel co-option). From the alveolar spaces tumours entered into the alveolar walls. The tumour cells during the invasion/migration separated the pneumocytes from the capillaries. During this process the basement membrane was split into an epithelial and an endothelial layer. The heavily compressed pneumocytes inside the tumour became fragmented but the incorporated and stripped vessels remained functional, so they were able to provide blood supply for the metastases.*

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. *Hungarian Oncology* 59:319–323, 2015

**Keywords:** lung metastasis, vascularization, vessel co-option, tumour cell migration

Levelezési cím: Szabó Vanessza, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Angiogenezis munkacsoport, H-1085 Budapest, Üllői út 26. Tel.: +361 459-1500/54428, e-mail: nesszy20@gmail.com

Közlésre érkezett: 2015. szeptember 1. • Elfogadva: 2015. október 10.

## BEVEZETÉS

Számos daganatos betegségben (mell-, vastagbélrák, melanoma, hasnyálmirigy-, vese-, petefészekrák) a halálos végkimenetel fő oka az áttétképzés, ami a rosszindulatú sejtek primer helyről más szervekre történő áttérjedését jelenti. A tüdő is egy olyan szerv, amibe gyakran adnak áttétet más lokalizációjú daganatok (1), az extratorakális tumorok 20–54%-ában mutathatóak ki tüdőáttétek (2–4). Az angiogenezis fogalmán endotélsejt-proliferációval járó érdenzitás-növekedést értünk. Széles körben elfogadott, hogy az angiogenezis fontos szerepet tölt be a primer és metasztatikus tumorok növekedésében (5). A daganatellenes terápiák egy lehetséges célpontja a tumorok ereződésének gátlása. Folkman 1971-ben fogalmazta meg hipotézisét, amely napjainkban is széles körben elfogadott, miszerint a tumorok növekedése angiogenezisfüggő (6). Azonban az a felfedezés, hogy a tumorok angiogenezis nélkül, a meglévő erek bekebelezésével is képesek növekedésre szert tenni állati és humán rendszerekben egyaránt, megmutatta, hogy ez a hipotézis nem minden esetben helytálló. Ezek a megfigyelések új aspektusba helyezik az erek és tumorok közti kölcsönhatásokat, és bizonyítják, hogy léteznek olyan tumorok, melyek angiogenezis nélkül is képesek növekedni, ami megkérdőjelezi az antiangiogén terápiák jelentőségét ezekben az esetekben. Metasztázisok nagy arányban vannak jelen a tüdőben, de eddig nem állt rendelkezésre elég adat arról, hogy a tumorsejtek hogyan lépnek kapcsolatba az ép/normális tüdőszövet ereivel. Korábbi vizsgálataink alapján felmerült, hogy a metastázisok ereződése, a célszervek nagy érdenzitása következtében, másképpen zajlik (7, 8), mint a primer tumoroké (9), ami új terápiák kidolgozását teheti szükségessé. Vizsgálataink célja az volt, hogy a különböző eredetű tumorok esetében meghatározzuk a kísérletes tüdőmetasztázisok vaszkularizációjának lehetséges mechanizmusait.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

### Kísérleti állatok és sejtvonalak

A kísérleti állatok tartása és kísérletbe vonása a Semmelweis Egyetem állatvédelmi szabályzata (Állatkísérlet engedély Ikt. sz.: 22.1/1155/3/2010) alapján az állattartási és kísérleti előírások betartása mellett történt. Az állatok a kísérlet során szükségletüknek megfelelően fogyasztottak rágcsálótápot (Charles River) és csapvizet. A kísérleti állatokat állandó hőmérséklet és nedvességtartalom, valamint 12 órás fény/sötét-ség napi váltakozást biztosító feltételek mellett tartottuk.

A kísérletekhez SCID, C57BL/6, Balb/c egér és Fischer 344 patkány beltenyésztett rágcsálótörzseket használtunk. A tüdőmetasztázisokat öt tumorsejtvonal intravénás ol-

tásával hoztuk létre: a HT1080 humán fibroszarkómát, a HT25 humán kolonkarcinómát és a MATB III patkány emlőkarcinómát SCID egerekben és F344 patkányokban, a B16 egér melanómát C56BL/6 egerekben, a C26 egér kolonkarcinómát Balb/c egerekben.

Az exponenciális növekedési fázisban lévő HT25, HT1080, B16, C26, valamint MATB III sejteket *in vitro* tenyésztettük RPMI-1640 médiumban, melyhez 10% FBS-t és gentamicint adtunk. A sejteket T75-ös flaskában, termosztátban 37 °C-on, 5%-os CO<sub>2</sub>-koncentráció mellett tartottuk. A tenyészetben tartott, exponenciális növekedési fázisban lévő sejteket (a MATB III sejtek kivételével) 1× tripszin-EDTA-val 5 percen át 37 °C-on történő inkubálással vittük szuszpenzióba, majd az enzimet 5 ml RPMI-1640 (+10% FBS, + gentamicin) médiummal állítottuk le. Mosást (szérummentes RPMI) követően a sejteket megszámloltuk és lecentrifugáltuk (10 perc, 800 rpm), majd szérummentes RPMI-ben vettük fel a pelletet. Az oltások során tumorsejttípustól függően a következő sejtszámokat használtuk: HT25 10<sup>6</sup>/0,1 ml, B16 10<sup>5</sup>/0,2 ml, C26 5×10<sup>5</sup>/0,1 ml, MATB III 2×10<sup>4</sup>/0,2 ml. Az *in vitro* tenyésztett HT1080 sejtek az állatokba való oltásuk során nem tudtak kolonizálni a tüdőszövetbe, ezért 2×10<sup>6</sup> sejtet fecskendeztünk szubkután a SCID egerekbe, majd 3 héttel az oltást követően a szubkután kinőtt tumorok felapritása és átszűrése után sejtsuszpenziót készítettünk. Az élő HT1080 sejteket leszámolva 0,1 ml térfogatban 2×10<sup>5</sup> sejtet fecskendeztünk a SCID egerek farokvénájába. Az állatokat 4 héttel a HT25, 3 héttel a B16, MATB, HT1080, 2 héttel a C26 sejtek oltását követően öltük le.

### Immunfluoreszcens vizsgálatok

Az állatok tüdejét az eltávolítást követően folyékony nitrogénen hűtött izopentánban lefagyasztottuk. A mintákból 15 µm-es fagyasztott metszeteket készítettünk, melyeket –20 °C-os hőmérsékletű metanolban fixáltunk. Ezután PBS-es mosást követően a megfelelő primer ellenanyaggal (1. táblázat) történő 1 órás, szobahőmérsékletű inkubáció következett, amit a félórás, Alexa fluor 488 fluorokrómmal jelölt szamar poliklonális másodlagos ellenanyaggal (Life Technologies, 400-szoros hígítás) történő inkubáció köve-

**1. táblázat.** Az immunhisztokémiai vizsgálatok során használt elsődleges ellenanyagok

Ellenanyag	Faj/klonalitás	Gyártó	Kat. szám	Hígítás
BrdU	Egér monoklonális	BD Pharmingen	347580	1:50
CD31	Patkány monoklonális	BD Pharmingen	550275	1:50
Podoplanin	Kecske poliklonális	R&D Systems	AF3244	1:200
Laminin	Nyúl poliklonális	Dako	Z0097	1:200



tett. Végül PBS-es mosás után 10 perces inkubációs idővel magfestést (TOTO-3, Invitrogen, kat. szám: T3604, 500-szoros hígítás) végeztünk a metszeteken. A mintákat konfokális lézer szkennings mikroszkóppal (Bio-Rad MRC-1024) vizsgáltuk.

### Elektronmikroszkópia

A B16 és HT1080 tumoros tüdőminták egy részét elektronmikroszkópos vizsgálatok céljára készítettük elő. Ennek során az elaltatott állatokat heparinos PBS (10 perc), majd jégen hűtött 2%-os glutáraldehid-tartalmú 0,05 mol/l Na-kakodilat puffer (pH 7,2, 15 perc, 20 °C) oldattal perfundáltuk. A tumort tartalmazó szövetet pengével 1-2 mm<sup>3</sup>-es darabokra vágtuk. A mintákat 2 órán át a fixálóoldatban hagytuk (4 °C), majd PBS-es mosást (éjszakán át) követően 5 mg/ml K-ferrocianidot tartalmazó 1% OsO<sub>4</sub>-oldatban utófixáltuk (2 óra), ezután felszálló acetonsorban víztelenítettük. A beágyazáshoz Spurr-gyantát használtunk. Ezt követően a mintákból félvékony (0,5 µm), majd ultravékony (70–100 nm) metszeteket készítettünk. Az ultravékony metszetek vizsgálata Philips CM10 (Philips Research, Eindhoven, Netherlands) elektronmikroszkóppal történt.

### Peri- és intratumorális endotélsejt-proliferáció meghatározása

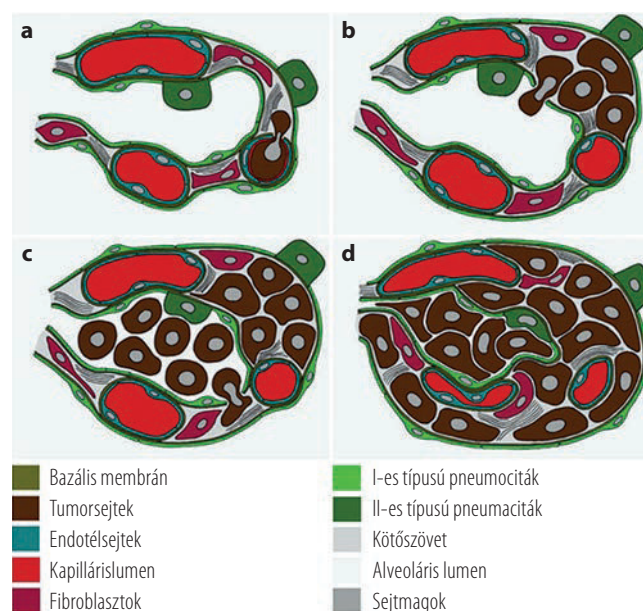
Az endotélsejt-proliferáció mérését (BrdU-inkorporáció) patkány MATB metasztázisokban végeztük, ugyanis e tumorok mérete bizonyosan meghaladta az 1-2 mm átmérőt, amit az angiogenezis megindulásához szükségesnek tartanak (6).

Az állatok a terminálás előtt egy órával 200 mg/kg brómdezoxiuridint (BrdU) kaptak intraperitoneálisan. Különböző módszereket alkalmazva határoztuk meg az intra- és peritumorális endotélsejtek (EC) proliferációs rátáját. Az első esetben a korábban már leírt immunfluoreszcens technikát használtuk. A fagyasztott metszeteket BrdU és laminin ellenanyagokkal inkubáltuk. A tumorban levő, erős lamininjelzéssel körbehatárolt BrdU-pozitív sejteket tekintettük endotélsejteknek. Öt állatból származó 14 metasztázisból 2300 sejtet számoltunk le. Fixálást és mosást követően a mintákat 2 N HCl-ben inkubáltuk 10 percen át szobahőmérsékleten (a DNS-denaturáció az ellenanyag bekötődésének feltétele).

A fagyasztott tüdőmetszeteken a rendkívül sűrű hajszálérhálózat miatt lehetetlen meghatározni a BrdU-pozitív endotélsejtek pontos lokalizációját a peritumorális szövetben, ezért egy másik módszert alkalmaztunk, a tüdőmintákat perfúzióval fixáltuk annak érdekében, hogy a kapillárisok ne essenek össze. Az állatokat ketaminxilazin (80:12 mg/kg dózis, Sigma) intraperitoneális in-

jekciójával altattuk és a bal kamrán keresztül PBS-sel (10 perc), majd 4% PFA-val (pH 7,2, 15 perc) perfundáltuk az állatokat. A tüdőmetasztázisokat eltávolítottuk és 4%-os PFA-ban inkubáltuk (4 °C, 2 óra). Ezután a tüdőt lebenyekre vágtuk és 24 órán át 15% szacharózban, ezt követően újabb 24 órán át 30% szacharózban történő inkubáció következett. A lebenyeket lefagyasztottuk és 30 µm-es fagyasztott metszeteket készítettünk, melyeket 1%-os collodionnal borított tárgylemezre vettünk fel. A metszeteket száradás után PBS-sel mostuk és 10 percen át 2 N HCl-ben inkubáltuk 20 °C-on. PBS-es mosás után a metszeteket monoklonális anti-BrdU antitesttel (2 óra), majd biotínált anti-egér ellenanyaggal inkubáltuk (2 óra). Kromogénként diaminobenzidint használva az ABC-reakció által színes csapadék keletkezett. A metszeteket ozmifikáltuk (1% OsO<sub>4</sub> PBS-ben), felszálló etanolsorral dehidráltuk és Spurr-gyantával feltöltött kapszulákat helyeztünk rájuk. A kapszulákat metszettel együtt folyékony nitrogénbe merítve távolítottuk el. Beágyazott metszetekből félvékony sorozatmetszeteket készítettünk, hogy meg-

**1. ábra.** a) A vaszkularizáció folyamata. A tumorsejtek extravazálnak az alveolusok interstíciumába. b) A tumorsejtek szaporodásnak indulnak, kisebb kolóniák kialakítása után betörnek az alveolus lumenébe. Ezután a tumorsejtek intenzív szaporodásnak indulnak. c) Később a tumorsejtek ismét belépnek az alveolusfal kötőszövetébe. Ezzel megkezdődik az epitélium leválasztása a kapillárisokról. d) A folyamat során történik meg a bazális membrán szétválása egy alveoláris és egy endoteliális rétegre, melynek eredményeképpen a tumorsejtek által körbezárt és ezzel teljesen lecsupaszított kapillárisok jönnek létre



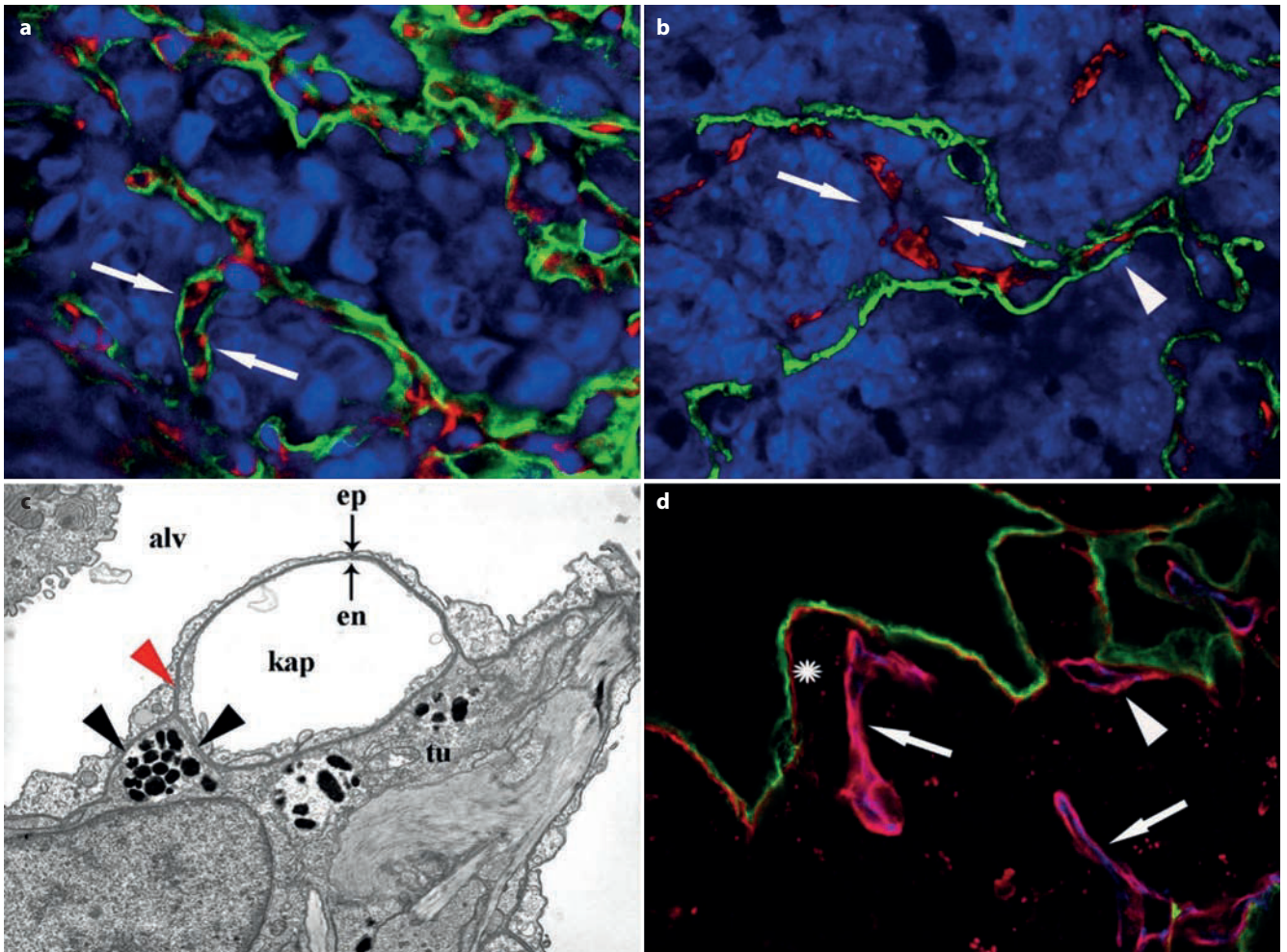


találjuk a reakcióterméket tartalmazó részt. A metszeteket enyhén, 0,5% toluidinkékkel (pH 8,5) festettük. Három állat 6 metasztázisának peritumorális szövetét vizsgáltuk meg. A félvékony metszeteket 100-szoros immerziós objektívvel vizsgáltuk, és a kapillárisok, valamint venulák 329 endotélsejtjét analizáltuk.

## EREDMÉNYEK

Mind az öt sejtvonal esetében a tüdőmetasztázis ugyanazt a vaszkularizációs formát mutatta. A tumorok növekedésének alapvető módja a proliferáló tumorszövet alveolusról alveolusra történő „áramlása” volt, amely folyamat a ko-

**2. ábra.** a) HT1080 metasztázis periferiája. A pneumocitákat podoplanin (zöld), a kapillárisokat CD31 (piros), a tumorsejteket TOTO (kék) festés jelzi. Az alveoláris tereket tumorsejtek töltik ki, de még megtartott a pneumocita-kapillaris-pneumocita szerkezet (nyilak). b) B16 metasztázis széli része, melyen a pneumociták podoplanin (zöld), a kapillárisok CD31 (piros), a tumorsejtek sejtmagjai TOTO (kék) festéssel vannak jelölve. A tumorsejtek kitöltik az alveolusok lumenét. Nyilak jelölik azokat a tumorsejteket, melyek az endotélsejtek (CD31) és a pneumociták (podoplanin) között helyezkednek el. Nyílhegy jelöli a még intakt alveolusszerkezetet. c) Elektronmikroszkópos felvétel egy B16 tumorsejtről (tu), amely az alveolus falában helyezkedik el. A tumorsejt inváziója/migrációja során úgy választja le az epitéliumot a kapillárisról, hogy az azok között lévő bazális membránt szétválasztja egy epitél és egy endotél bazális membrán rétegre (fekete nyílhegyek). Piros nyílhegy jelöli a még nem szétválasztott kettős bazális membránt (ep: epitélium; en: endotélium; alv: alveoláris tér; kap: kapillárislumen). d) HT1080 metasztázis lecsupaszított, pneumocitamentes (podoplanin, zöld) kapillárisa (CD31, kék, nyilak), melyet már minden oldalról tumorsejtek (fekete területek) határolnak. A nyílhegy egy másik érre mutat, aminek egy része még kapcsolatban van az epitéliummal, itt még nem teljes a leválasztás. A leválasztott pneumociták bazális membrán rétegen nyugszanak (laminin, piros, csillag), mely vékonyabb, mint az ereket körülvevő bazális membrán



rábban már Pezzella által humán primer és metasztatikus tüdőtumorkok esetében leírt alveoláris mintázat kialakulását eredményezi (10). A folyamat első lépéseként az intravénásan oltott tumorsejtek az alveolusfalak kötőszövetébe extravazáltak. Itt kisebb kolóniák kialakítása után betörték az alveoláris térbe, majd ott is szaporodásnak indultak (1. ábra). A metasztázisok szélén elhelyezkedő, de már tumorszövet által kitöltött alveolusok falának szerkezete kezdetben megtartott volt (pneumociták – kettős bazális membrán – endotélium) (2.a ábra).

A tumorsejtek által borított alveolusfalakat elektronmikroszkópos szinten is megvizsgáltuk. Az inkorporált kapillárisok lumenjében tumorsejtek nincsenek, a tumorsejt és a pneumocita plazmamembránjai szoros kapcsolatban vannak. A kapilláris mindkét oldalán a szabályos szerkezetű vér-gáz gát van jelen a pneumocita, bazális membrán és endotéliumrétegekkel.

A peritumorális szövetben elhelyezkedő kapillárisok endotéliumsejtjeinek proliferációs aktivitása csak csekély mértékben emelkedett, ami azt mutatja, hogy érképződés nem zajlik ebben a régióban. Az éreződés folyamata azonban nem fejeződik be az alveolusok lumenének elfoglalásával. A különböző eredetű proliferáló tumorsejtek az alveoláris térből a pneumociták rétegén keresztül behatolnak az intersticiumba, ahol tovább szaporodnak és inváziójuk/migrációjuk során leválasztják a pneumocitákat a kapillárisok felszínéről (2.b,c ábra), aminek végeredményeképpen a tumorsejtek elfoglalják a kapillárisok teljes felszínét. Ennek következményeként lecsupaszított – pneumocitamentes – erek jelennek meg a metasztázisok belsejében (2.d ábra). A tumorsejtek a pneumociták leválasztását a kapillárisokról az endotéliumsejtek és a pneumociták között található kettős bazális membrán szétválasztásával érik el (2.c ábra). A folyamat előrehaladtával a tumor belsejében található, erősen komprimált pneumociták degradálódnak, de a bekebelezett és lecsupaszított erek funkcionálisak maradnak, így képesek a metasztázis vérellátását biztosítani.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Megállapítottuk, hogy a vizsgált tumorvonalak (B16, HT1080, HT25, C26 és MATB) a tüdőszövetben alveolusról alveolusra terjednek, így a terjedés kezdeti szakaszában

inkorporálják az intakt alveolusfalakat a bennük levő kapillárisokkal együtt. A bekebelezés folyamatának kezdetén a kapillárisok körül még jelen vannak a pneumociták. A tumorsejtek később belépnek az alveolusok falába, és az epiteliális és endoteliális bazális membrán között migrálva leválasztják a pneumocitákat bazális membránjukkal együtt az erekről. A leválasztott pneumociták fragmentálódnak a tumor belsejében. A lecsupaszított erek azonban funkcionálisak maradnak és képesek biztosítani a tumor vérellátását.

Összefoglalva, az adatok azt mutatják, hogy a tüdőmetasztázisok vaszkularizációja a pulmonális érhálózat bekebelezésével történik. Mindezen információ a jövőben fontos klinikai jelentőséggel bírhat az antiangiogén terápia hatékonyságának megítélésében, illetve antivaszkuláris terápia kidolgozásában.

## IRODALOM

1. Krishnan K, Khanna C, Helman LJ. The molecular biology of pulmonary metastasis. *Thorac Surg Clin* 16:115–124, 2006
2. Snyder BJ, Pugatch RD. Imaging characteristics of metastatic disease to the chest. *Chest Surg Clin N Am* 8:29–48, 1998
3. Davis SD. CT evaluation for pulmonary metastases in patients with extrathoracic malignancy. *Radiology* 180:1–12, 1991
4. Crow J, Slavin G, Kreel L. Pulmonary metastasis: a pathologic and radiologic study. *Cancer* 47:2595–2602, 1981
5. Döme B, Hendrix MJ, Paku S, et al. Alternative vascularization mechanisms in cancer: pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol* 170:1–15, 2007
6. Folkman J, Cotran R. Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev Exp Pathol* 16:207–248, 1976
7. Dezso K, Bugyik E, Papp V, et al. Development of arterial blood supply in experimental liver metastases. *Am J Pathol* 175:835–843, 2009
8. Bugyik E, Dezso K, Reiniger L, et al. Lack of angiogenesis in experimental brain metastases. *J Neuropathol Exp Neurol* 70:979–991, 2011
9. Döme B, Paku S, Somlai B, et al. Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. *J Pathol* 197:355–362, 2002
10. Pezzella F, Pastorino U, Tagliabue E, et al. Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am J Pathol* 151:1417–1423, 1997

REVIEW

Open Access



# Mechanisms of vascularization in murine models of primary and metastatic tumor growth

Edina Bugyik<sup>1,2,3†</sup>, Ferenc Renyi-Vamos<sup>2†</sup>, Vanessza Szabo<sup>1</sup>, Katalin Dezso<sup>1</sup>, Nora Ecker<sup>1</sup>, Andras Rokusz<sup>1</sup>, Peter Nagy<sup>1</sup>, Balazs Dome<sup>2,4,5</sup> and Sandor Paku<sup>1,6\*</sup>

## Abstract

Directed capillary ingrowth has long been considered synonymous with tumor vascularization. However, the vasculature of primary tumors and metastases is not necessarily formed by endothelial cell sprouting; instead, malignant tumors can acquire blood vessels via alternative vascularization mechanisms, such as intussusceptive microvascular growth, vessel co-option, and glomeruloid angiogenesis. Importantly, in response to anti-angiogenic therapies, malignant tumors can switch from one vascularization mechanism to another. In this article, we briefly review the biological features of these mechanisms and discuss on their significance in medical oncology.

**Keywords:** Vascularization, Primary tumor, Metastasis, Angiogenesis

## Background

Angiogenesis refers to the proliferation of vascular cells (endothelial cells and pericytes) and the increase of vessel density. It has a pivotal role in the nutrition of tumors. In the 1970s, Folkman et al. [1] found that, without angiogenesis, solid tumors cannot grow beyond the limits of diffusion (1 mm<sup>3</sup>). Above this size, the so-called angiogenic switch occurs; currently, anti-angiogenic therapies are based on this assumption. In this article, we review and compare our data on the vascularization mechanisms of primary and metastatic tumors with the findings of other groups. We also discuss the potential reasons for failure of anti-angiogenic therapies [2, 3].

## Angiogenic processes during vascularization of tumors

The two basic forms of angiogenesis are endothelial sprouting [1] and intussusceptive angiogenesis [4]. Both processes require connective tissue and participate in the formation of the tumor vasculature. Many primary tumors (e.g., melanoma, colon cancer, and breast cancer) are surrounded by provisional connective tissue that

develops because of the vascular permeability-enhancing effect of vascular endothelial growth factor (VEGF). This connective tissue contains fibronectin/fibrin and collagen, which enables the continuous development of new capillaries by sprouting or intussusceptive angiogenesis [5].

Two models of sprouting angiogenesis have been described. According to the first model, interendothelial contacts of the venules closest to the tumors become weakened [6]. This phenomenon is caused by angiogenic factors released by tumor cells. After local degradation of basement membrane, non-polarized endothelial cells migrate into the connective tissue. This is followed by the formation of the lumen, synthesis of the new basement membrane, and the appearance of pericytes around the newly formed capillaries. The disadvantage of this model is the inability to identify the stimulus required for lumen formation.

The second model suggests that interendothelial contacts remain intact, and after the degradation of the basement membrane, polarized endothelial cells migrate into the connective tissue [7]. During this process, parallel migration of polarized endothelial cells enables the prompt formation of a split-like lumen that is continuous with the lumen of the mother vessel. The basement membrane is continuously deposited by the endothelial cells. Only the very tip of the growing capillary bud is free of

\*Correspondence: paku@korkb1.sote.hu

†Edina Bugyik and Ferenc Renyi-Vamos contributed equally as first authors to this study

<sup>1</sup> 1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Üllői út 26, Budapest 1085, Hungary  
Full list of author information is available at the end of the article



basement membrane and is in connection with the connective tissue collagen. Migrating along the basement membrane deposited by the endothelial cells, proliferating pericytes of the mother vessel appear later around the immature capillaries.

Intussusceptive angiogenesis (i.e., “vessel division”) is another mode to increase vessel density. This process enhances the complexity and density of the vessel network, thus providing additional surface for further vessel sprouting [4]. Intussusceptive angiogenesis increases vessel density faster than sprouting angiogenesis and plays a pivotal role in the formation of the developing lung vasculature [4]. There are two different modes of intussusceptive angiogenesis. According to the first model, endothelial cells of the opposite vessel walls establish contact because of the pressure generated by connective tissue cells or pericytes; this is followed by the reorganization of intercellular junctions leading to the perforation of the endothelial bilayer. Collagen-producing cells enter the perforation in the vessel lumen. These cells and the synthesized collagen build up the connective tissue pillar in the lumen of the vessel (1–5  $\mu\text{m}$  in diameter), which is a characteristic of intussusceptive angiogenesis. Further growth of the pillar results in the complete division of the lumen [4].

The formation of intraluminal pillars may also occur by another mechanism, the first step of which is the formation of endothelial bridges in the lumen. Here, degradation of the basement membrane takes place, and bridging endothelial cells attach to connective tissue collagen bundles and transport them through the lumen. The collagen bundles are covered by endothelial cells; thus, initially, the nascent pillars are built up by two endothelial cells and a single collagen bundle. Fibroblasts migrate into this pillar and synthesize additional connective tissue, which results in pillar maturation [8]. Of note, similar to sprouting angiogenesis (model two; see above), the polarity of endothelial cells does not change in either case. Accordingly, this type of pillar formation can be called inverse sprouting since the connective tissue (surrounded by the endothelium) is located in the vessel lumen. In contrast, during sprouting angiogenesis, the lumen is located in the connective tissue.

Numerous schematic depictions in various studies suggested that, during vascularization, the nearby vessels grow into the tumor [1, 9, 10]. However, in 1987, Thompson et al. [11] found that mouse tumors grow by incorporating the host tissue microvasculature. A subsequent human study by Pezzella et al. [12] in 1997 confirmed the phenomenon of vessel incorporation in “non-angiogenic” primary non-small cell lung cancers. Subsequently, our research group proved in experimental and human melanomas that vessels that develop by sprouting

angiogenesis in the connective tissue surrounding the tumors become incorporated. Because of the growth of the tumor, the vessel density of the incorporated vascular network decreases (becomes diluted) [13]. This phenomenon occurs because of the lack of branching activity of the intratumoral vessels. The low proliferation of endothelial cells solely supports the dilatation of the tumoral vessels [13]. An insufficient amount of collagen-containing connective tissue within the tumors results in the termination of sprouting angiogenesis. In both human and experimental melanomas, the capillary network is arranged in parallel with the surface of the tumor. This phenomenon itself supports the notion that melanomas do not acquire their vasculature by vessel ingrowth [13].

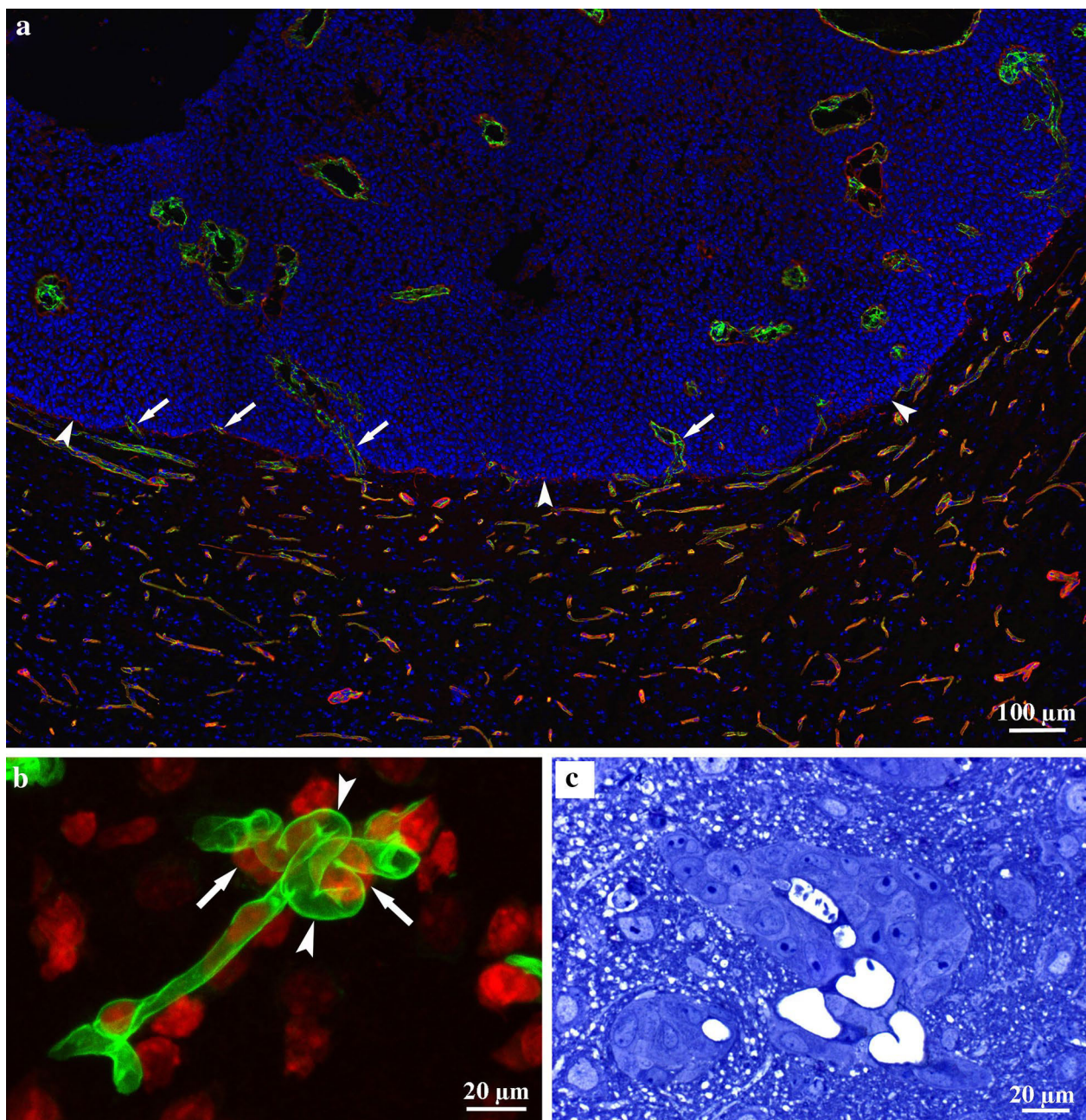
#### Vascularization of metastases

In clinical oncology, treatment of metastases is a great challenge. Angiogenesis is a possible target for the treatment of tumors. Since the most frequent sites for metastasis formation (the brain, liver, and lung) contain dense capillary networks and a relatively small amount of connective tissue, it is likely that vascularization of metastases develops differently from primary tumors.

#### The brain

It is widely accepted that angiogenesis occurs in primary and metastatic brain tumors and in other pathologic disorders [14]. It has been reported that vascularization of metastases can occur by the incorporation of brain capillaries [15]. We analyzed the vascularization of experimental brain metastases in detail using five different tumor cell lines. Tumor cells were inoculated directly into the brain parenchyma to enable tumors to reach the size at which angiogenic switch is thought to occur (1  $\text{mm}^3$ ). We found no new vessel formation in the close vicinity of tumors. Vessel density and bromodeoxyuridine (BrdU) labeling index of vascular cells did not change significantly. Tumors became vascularized exclusively by the incorporation of host vessels (Fig. 1a). During incorporation, the tumor mass “flowed” around the vessels while tumor cells detached astrocytes from their surfaces. The growth pattern of the metastases is associated with the number and size of incorporated vessels. Tumors with infiltrative growth incorporated more vessels than expansively growing tumors (pushing type). We also found a negative correlation between the intratumoral vessel density and BrdU labeling index of vascular cells. Therefore, tumors with low levels of vessel incorporation may enhance blood supply by increasing vessel surface through vessel dilatation [16].

Glomeruloid bodies (GBs) are characteristics mainly of primary brain tumors, but they appear in brain



**Fig. 1** Vessel incorporation and glomeruloid body formation in the brain. **a** Frozen section of an experimental brain metastasis of the C38 colorectal carcinoma cell line. The section is stained for CD31 (vessels, green), laminin (basement membrane, red), and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; cell nuclei, blue). The DAPI staining shows that the tumor is located in the upper part of the picture. Arrowheads show the tumor-parenchyma interface. The tumor mass "flows" around the vessels, thereby incorporating them (arrows). Vessel density is significantly lower and vessel diameter is larger in the intratumoral region than in the peritumoral tissue. Scale bar 100  $\mu\text{m}$ . **b** Glomeruloid body formation after injection of tumor cells into the carotid artery. Simple loops (arrowheads) of the capillary (laminin, green) that develop in the vicinity of tumor cells (arrows) can be observed. Cell nuclei are stained by propidium iodide (red). Scale bar 20  $\mu\text{m}$ . **c** Semi-thin cross section stained by toluidine-blue represents a glomeruloid body formed in a colony of human melanoma cells. There are several capillary lumens within the small tumor cell group. Scale bar 20  $\mu\text{m}$

metastases and in other tumors as well [17]. GBs acquired their name because of their superficial resemblance to renal glomeruli. Until recently, the mechanism

of GB formation was largely unknown. Stiver et al. [18] performed a detailed analysis of GBs that were developed in a tumor-free environment using a VEGF-coding vector



injected into brain tissue. The first step in the process was the appearance of dilated mother vessels. In the vessel wall, pericytes and endothelial cells started to proliferate and formed numerous lumens within the lumen of the mother vessel. Next, these structures differentiated into distinct daughter vessels through apoptosis of endothelial cells. Our group described another much simpler process in brain micrometastases [19]. According to this model, after injection of tumor cells into the carotid artery, tumor cells extravasate and adhere to the external surface of the basement membrane of capillaries. Following this, even a single cell is able to produce simple loops on capillaries (Fig. 1b), presumably because of the forces exerted by the actin cytoskeleton of tumor cells attached tightly to the surface of the basement membrane. Later, the force exerted by the proliferating and migrating tumor cells results in the appearance of more complex GBs as tumor cells pull new vessel segments into the tumor nests (Fig. 1c). This process leads to the thinning and eventual rupturing of capillary segments located between tumor nests. Proliferation of endothelial cells is only slightly elevated during this process; therefore, the increase of the vessel density is simply the consequence of the remodeling of the existing vasculature in the brain tissue.

#### **The liver**

Vermeulen et al. [20] described liver metastases with different growth patterns. The first type is the so-called “replacement” growth pattern where the liver structure is preserved and the liver trabeculae are replaced by tumor cells. In the second important growth pattern (“pushing”), the liver structure is distorted, liver cells on the surface of metastases are compressed, and connective tissue is deposited around the tumor. Replacement growth is a characteristic of undifferentiated metastases, whereas pushing growth is a characteristic of differentiated metastases.

We examined experimental liver metastases that were produced by the injection of Lewis lung carcinoma cells into the spleen of C57Bl/6 mice. In this model, tumor cells reached the liver via the portal vein and formed colonies. Our studies on anaplastic Lewis lung carcinoma liver metastases showed that tumor cells migrated in the space of Disse during the invasion, at the tumor periphery, thereby detaching the endothelial cells from their basement membrane (structured basement membrane could not be observed in the sinusoids, but immunoelectron microscopic observations revealed several basement membrane elements between the microvilli of hepatocytes) [21]. Endothelial cells that get into the tumors start to proliferate and form functional vessels with wide lumen and vulnerable, convoluted walls (sinusoidal type metastases) [21]. We also observed another type of Lewis

lung carcinoma metastasis that was located in portal spaces or in their close vicinity (portal-type metastases). These metastases are characterized by numerous small vessels that stained positively for basement membrane components. These vessels presumably evolved during sprouting angiogenesis within the connective tissue of portal spaces. Notably, the ratio of portal-type metastases was higher when tumor cells reached the liver via the arterial system. However, tumor cells entering the liver from the direction of the portal system produced more sinusoidal metastases. These results suggest that a proportion of the tumor cells delivered via the arterial route are more likely to be trapped in the capillaries of the peribiliary plexus [21].

Our analysis of the pushing-type metastases produced by using C38 colon carcinoma cells showed that even in the early stages of metastasis development, proliferation of myofibroblasts and accumulation of connective tissue occur in the close vicinity of the metastases [22]. In parallel, liver cells are displaced, which leads to the fusion of sinusoids on the surface of the liver metastases (Fig. 2a, b). Fused sinusoids become incorporated together with the connective tissue, and the inner part of the invagination is pinched off by the tumor tissue. As a result, connective tissue columns containing a central vessel will appear; these structures are able to provide blood supply for the tumor. Tumor cells surround these structures in a polarized manner and synthesize basement membrane onto the surface of the connective tissue (Fig. 2b).

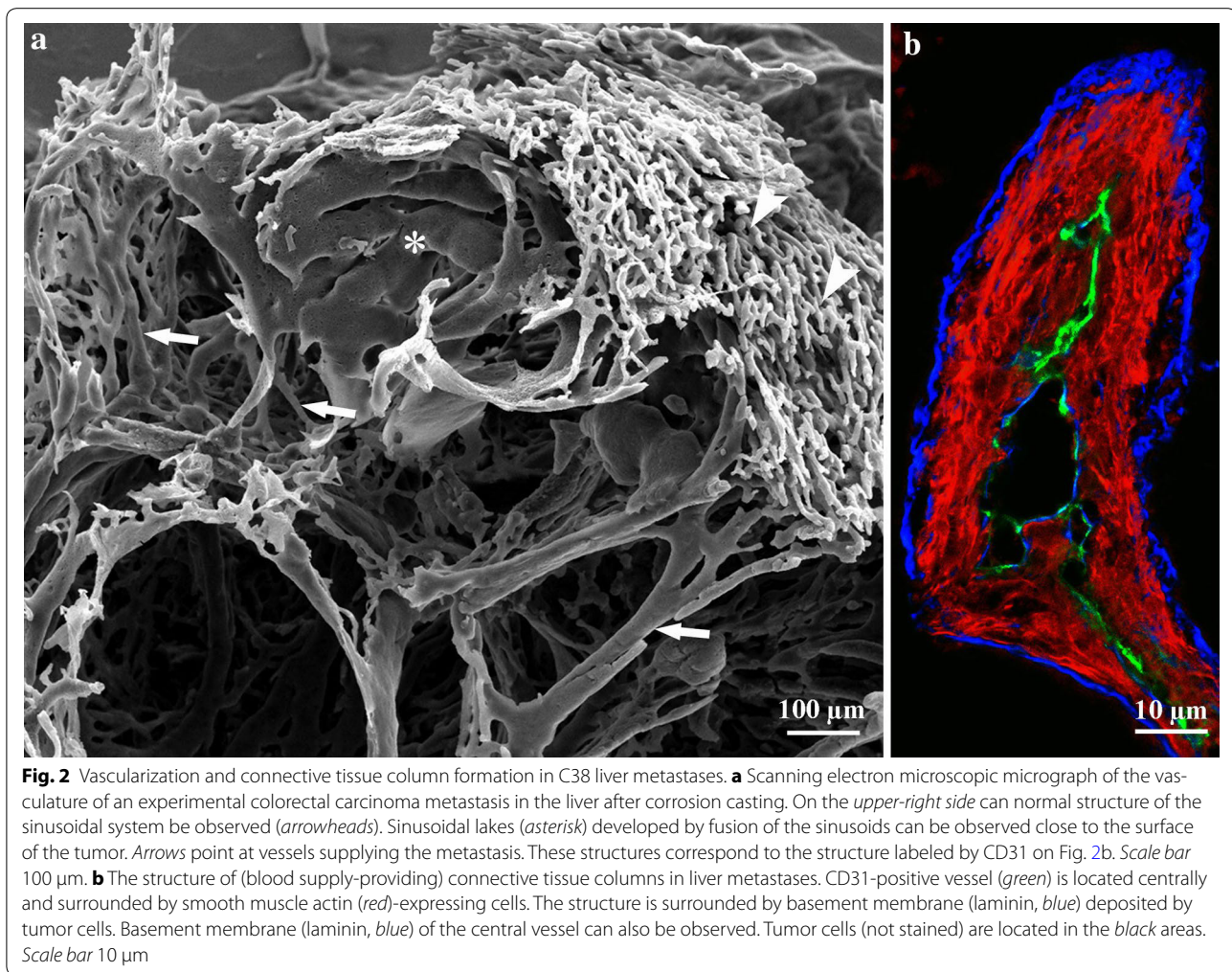
Finally, it is noteworthy that in neither sinusoidal (replacement) nor pushing-type metastases does angiogenesis take place in the peritumoral liver parenchyma.

#### **The lung**

In earlier studies, we found that the default growth type of experimental lung metastases is the “flow” of proliferating tumor cells from alveolus to alveolus [23] (Fig. 3a, b). This process leads to the formation of the alveolar pattern in primary human and metastatic lung tumors (non-angiogenic tumors), described previously by Pezzella et al. [12, 24]. Note that in the intact lung tissue around the metastases, proliferation of endothelial cells only slightly increases. This suggests that angiogenesis does not occur in this region. However, we found that vascularization of tumors is not completed by the occupation of the alveoli. Instead, it continues by different mechanisms in undifferentiated versus differentiated (desmoplastic) tumors [23].

Cells of undifferentiated tumors enter into the alveolar walls, and during their invasion/migration they detach pneumocytes from the surface of capillaries (Fig. 3c). As a result, tumor cells co-opt the capillaries that were formerly responsible for the gas exchange. Incorporated





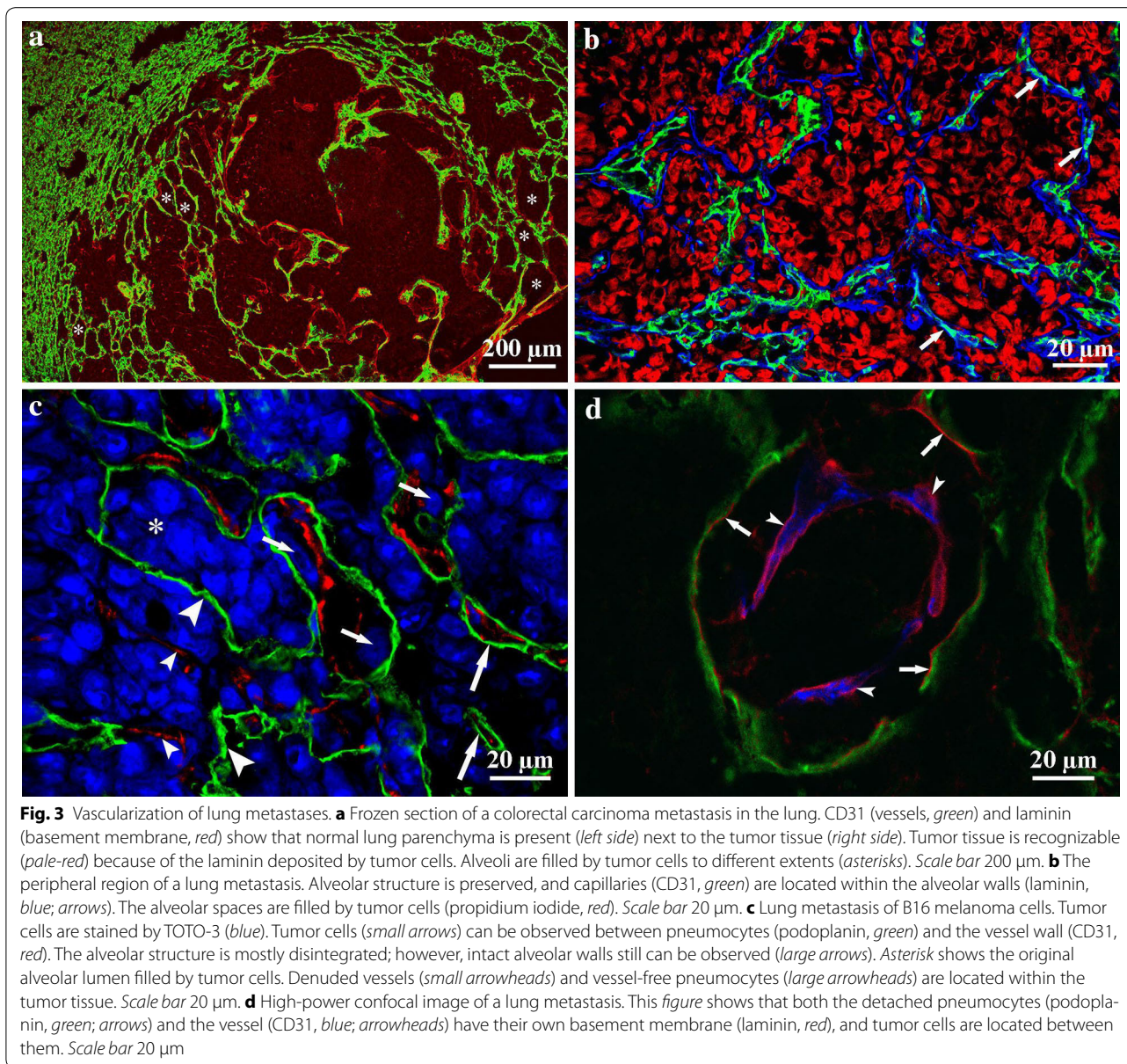
capillaries remain functional and provide blood supply for the tumor. Interestingly, tumor cells detach pneumocytes from the capillaries together with their basement membrane; thus, tumor cells actually migrate between the endothelial and epithelial basement membranes (Fig. 3d). Of note, the presence of basement membrane is not sufficient to support the survival of pneumocytes, which vanish by fragmentation within the tumor tissue.

Polarized tumor cells of well-differentiated C38 colon tumor do not migrate back into the alveolar walls from the alveolar space; instead, they induce a desmoplastic reaction in the alveolar wall. During this reaction, the fibroblasts present in the alveolar wall are transformed into smooth muscle actin (SMA)-expressing and connective tissue collagen-synthesizing myofibroblasts. Alveolar walls being incorporated into the tumor gradually widen, resulting in the development of connective tissue columns (centrally located microvessels embedded in connective tissue collagen and SMA-expressing activated fibroblasts surrounded by a basement membrane). The

structure of these columns corresponds completely to the structure of connective tissue columns in the liver metastases of this same tumor (Fig. 2b). The accumulated connective tissue within the metastases and the significantly elevated proliferation index of intratumoral endothelial cells may indicate the initiation of angiogenesis within the columns.

#### Blood supply of metastases

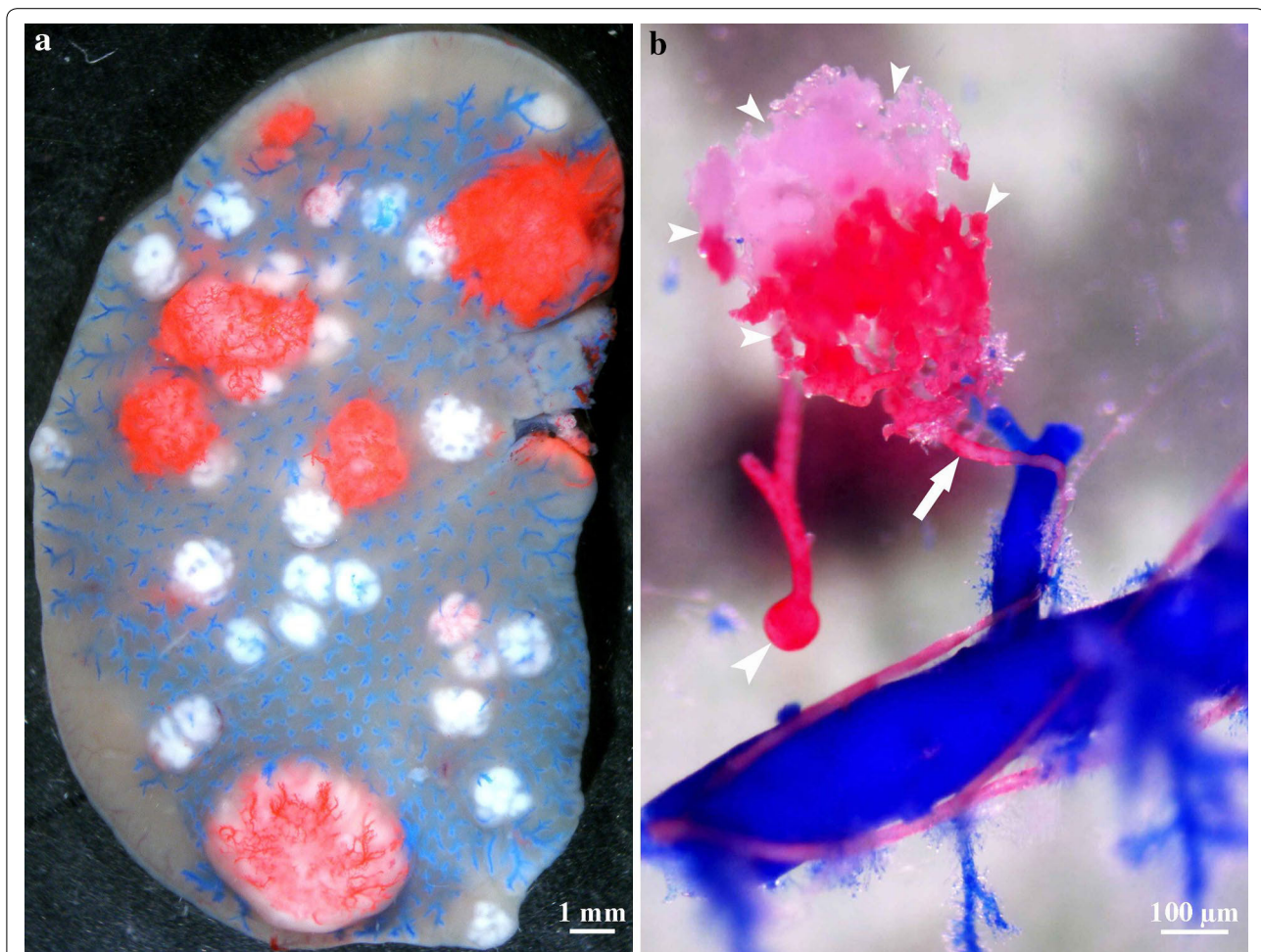
In organs with dual blood supply (the liver and lung), the origin of the blood supply of metastases has been long debated. Most analyses have been done in the liver (including both animal and human samples). These experiments were performed by the injection of colored resin or India ink into the vasculature [25–27]. However, these studies neglected the relation of the arterial to the portal system and the anatomical differences between murine and human liver. Contrary to the human liver, mouse and rat livers have an extensive system of anastomoses between the arterial and portal system at



every level of the vascular network. Moreover, rat lung has anastomoses between the bronchial and pulmonary arteries as well, which makes it difficult to determine the origin of blood supply. This problem can be solved by injecting casting solution into the portal vein or pulmonary artery up to the sinusoids or capillaries observed on the surface of the organs so the anastomoses between the two systems are blocked. Under these conditions, the resin injected into the arterial system will appear only in metastases that are directly connected to arterioles or arteries (Fig. 4a). We observed that liver metastases larger than 2.5 mm in diameter become arterially supplied [28]. However, in rat lung metastases, the

bronchial artery is responsible for the blood supply of metastases larger than 5 mm only [23]. Supplying arteries are located mainly centrally, so it is likely that the blood flows from the center to the periphery (Fig. 4b). The difference regarding the tumor size in these two organs may be owing to the fact that, in the rat lung, bronchial arteries do not expand to the periphery of the lung, so the metastases growing in this organ reach the arterial system only when they get larger. The key step in the process of arterialization may be that low-pressure vessels (portal and central veins and pulmonary arteries and veins) are pushed aside by the tumor mass, whereas elements of the high-pressure arterial system become incorporated.





**Fig. 4** Blood supply of liver metastases. **a** Stereomicroscopic image of colorectal carcinoma liver metastases after two colored casting procedure. Blue resin was injected into the portal vein and red resin was injected into the arterial system. Smaller metastases supplied by the portal system appear white (since the portal system was filled up to the level of terminal portal venules, the resin does not enter the sinusoids and, consequently, it does not enter the small metastases). Red resin appears in metastases that are in direct connection with the arterial system. Note that all of these metastases are larger than those that appear white. Scale bar 1 mm. **b** An arterial metastasis after corrosion of liver tissue. The artery (red) runs next to the portal venule (blue) and enters the metastasis (small arrowheads) centrally (arrow). Moderate dilatation of the artery can be observed near the entry site (arrow). The red resin injected into the arterial system appears also in the central vein (large arrowhead). Scale bar 100  $\mu$ m

Consequently, regarding delivery of chemotherapeutic agents into the metastases, the arterial system may play an important role in both organs.

### Conclusions

We conclude that the incorporation of both the pre-existing host vasculature (which can be modified by the tumor) and the newly formed vessels plays an important role in the vascularization of tumors. The incorporation process is basically biomechanical in nature. We think that anti-angiogenic therapies should be given mainly to patients with primary tumors in which endothelial proliferation is present. The perimetastatic region cannot be targeted by anti-angiogenic therapies because

angiogenesis does not occur in the adjacent host tissues of tumor metastases (possibly because of the lack of sufficient connective tissue). However, when sufficient connective tissue is synthesized in the more central part of the lesions in a later phase of metastasis development, intratumoral angiogenesis is possible. This requires the presence of connective tissue cells in the target organ that are able to transform into collagen-synthesizing myfibroblasts.

### Authors' contributions

SP is the corresponding author. SP, EB, FRV, and BD wrote the manuscript. SP, PN, FRV, and BD participated in study design and coordinated and supervised the study. EB, VSZ, KD, NE, and AR collected the samples, carried out the experiments, and interpreted the data. All authors made important contributions to

the conception and design of the study and reviewed the results. All authors read and approved the final manuscript.

#### Author details

<sup>1</sup> 1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Üllői út 26, Budapest 1085, Hungary. <sup>2</sup> Department of Thoracic Surgery, Semmelweis University-National Institute of Oncology, Budapest 1122, Hungary. <sup>3</sup> Hungarian Academy of Sciences Postdoctoral Research Programme, Budapest 1051, Hungary. <sup>4</sup> Department of Thoracic Surgery, Medical University of Vienna, 1090 Vienna, Austria. <sup>5</sup> Department of Biomedical Imaging and Image-guided Therapy, Medical University of Vienna, 1090 Vienna, Austria. <sup>6</sup> Tumor Progression Research Group, Joint Research Organization of the Hungarian Academy of Sciences and Semmelweis University, Budapest, Hungary.

#### Acknowledgements

The study was supported by the Grants from KTI/AIK 12-1-2013-0041; Semmelweis University Start-Up Grant 40148-11658; OTKA K109626, OTKA SNN114490, OTKA K100931, OTKA PD109201, EUREKA\_HU\_12-1-2012-0057; TÁMOP 4.2.4.A/1-11-1-2012-0001; ÖNB Jubiläumsfondsprojekt Nr. 14043 and Nr. 14574, and the Vienna Fund for Innovative Interdisciplinary Cancer Research.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 7 October 2015 Accepted: 6 January 2016

Published online: 12 February 2016

#### References

- Folkman J, Cotran R. Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev Exp Pathol*. 1976;16:207–48.
- Sennino B, McDonald DM. Controlling escape from angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(10):699–709. doi:10.1038/nrc3366.
- Vasudev NS, Reynolds AR. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis*. 2014;17(3):471–94. doi:10.1007/s10456-014-9420-y.
- Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn*. 2004;231(3):474–88. doi:10.1002/dvdy.20184.
- Dvorak HF. Rous-Whipple Award Lecture. How tumors make bad blood vessels and stroma. *Am J Pathol*. 2003;162(6):1747–57.
- Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res*. 1985;43:175–203.
- Paku S, Paweletz N. First steps of tumor-related angiogenesis. *Lab Invest*. 1991;65(3):334–46.
- Paku S, Dezso K, Bugyik E, Tovari J, Timar J, Nagy P, et al. A new mechanism for pillar formation during tumor-induced intussusceptive angiogenesis: inverse sprouting. *Am J Pathol*. 2011;179(3):1573–85. doi:10.1016/j.ajpath.2011.05.033.
- Gordon MS, Mendelson DS, Kato G. Tumor angiogenesis and novel antiangiogenic strategies. *Int J Cancer*. 2010;126(8):1777–87. doi:10.1002/ijc.25026.
- Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, Parikh A, Ahmad SA, Jung YD, et al. Angiogenesis and antiangiogenic therapy of colon cancer liver metastasis. *Ann Surg Oncol*. 2003;10(7):722–33.
- Thompson WD, Shiach KJ, Fraser RA, McIntosh LC, Simpson JG. Tumours acquire their vasculature by vessel incorporation, not vessel ingrowth. *J Pathol*. 1987;151(4):323–32. doi:10.1002/path.1711510413.
- Pezzella F, Pastorino U, Tagliabue E, Andreola S, Sozzi G, Gasparini G, et al. Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am J Pathol*. 1997;151(5):1417–23.
- Dome B, Paku S, Somlai B, Timar J. Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. *J Pathol*. 2002;197(3):355–62. doi:10.1002/path.1124.
- Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Cancer*. 2007;8(8):610–22. doi:10.1038/nrn2175.
- Leenders WP, Kusters B, Verrijp K, Maass C, Wesseling P, Heerschap A, et al. Antiangiogenic therapy of cerebral melanoma metastases results in sustained tumor progression via vessel co-option. *Clin Cancer Res*. 2004;10(18 Pt 1):6222–30. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0823.
- Bugyik E, Dezso K, Reiniger L, Laszlo V, Tovari J, Timar J, et al. Lack of angiogenesis in experimental brain metastases. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2011;70(11):979–91. doi:10.1097/NEN.0b013e318233afd7.
- Straume O, Chappuis PO, Salvesen HB, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Goffin JR, et al. Prognostic importance of glomeruloid microvascular proliferation indicates an aggressive angiogenic phenotype in human cancers. *Cancer Res*. 2002;62(23):6808–11.
- Stiver SI, Tan X, Brown LF, Hedley-Whyte ET, Dvorak HF. VEGF-A angiogenesis induces a stable neovasculature in adult murine brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004;63(8):841–55.
- Dome B, Timar J, Paku S. A novel concept of glomeruloid body formation in experimental cerebral metastases. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003;62(6):655–61.
- Vermeulen PB, Colpaert C, Salgado R, Royers R, Hellemans H, Van Den Heuvel E, et al. Liver metastases from colorectal adenocarcinomas grow in three patterns with different angiogenesis and desmoplasia. *J Pathol*. 2001;195(3):336–42. doi:10.1002/path.966.
- Paku S, Lapis K. Morphological aspects of angiogenesis in experimental liver metastases. *Am J Pathol*. 1993;143(3):926–36.
- 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. doi:10.1002/ijc.20886.
- Szabo V, Bugyik E, Dezso K, Ecker N, Nagy P, Timar J, et al. Mechanism of tumour vascularization in experimental lung metastases. *J Pathol*. 2015;235(3):384–96. doi:10.1002/path.4464.
- Pezzella F, Di Bacco A, Andreola S, Nicholson AG, Pastorino U, Harris AL. Angiogenesis in primary lung cancer and lung secondaries. *Eur J Cancer*. 1996;32A(14):2494–500.
- Lin G, Lunderquist A, Hagerstrand I, Boijesen E. Postmortem examination of the blood supply and vascular pattern of small liver metastases in man. *Surgery*. 1984;96(3):517–26.
- Haugeberg G, Strohmeyer T, Lieser W, Bocker W. The vascularization of liver metastases. Histological investigation of gelatine-injected liver specimens with special regard to the vascularization of micrometastases. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1988;114(4):415–9.
- Kuruppu D, Christophi C, O'Brien PE. Microvascular architecture of hepatic metastases in a mouse model. *HPB Surg*. 1997;10(3):149–57; (discussion 58).
- Dezso K, Bugyik E, Papp V, Laszlo V, Dome B, Tovari J, et al. Development of arterial blood supply in experimental liver metastases. *Am J Pathol*. 2009;175(2):835–43. doi:10.2353/ajpath.2009.090095.