

Νεοαγγειογένεση και καρκίνος πνεύμονα

Γ. ΧΑΡΔΑΒΕΛΛΑ^{1,2}, Δ. ΣΤΕΦΑΝΟΥ³, Σ.Η. ΚΩΝΣΤΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ²

¹Κέντρο Αναπνευστικής Ανεπάρκειας, Γ.Ν.Ν.Θ.Α «Η Σωτηρία»

²Πνευμονολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

³Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Εισαγωγή

Η αγγειογένεση συνιστά ένα θεμελιώδες γεγονός στη διαδικασία ανάπτυξης όγκων και στη μεταστατική διασπορά και αποτελεί αντικείμενο ενδιαφέροντος διάφορων σύγχρονων μελετών.

Ο όρος αγγειογένεση («angiogenesis») αναφέρεται στο σχηματισμό νέων αγγείων, τα οποία εκφύονται από προϋπάρχοντα μικρά αγγεία, τόσο σε εμβρυϊκό ιστό, όσο και σε ιστό ενηλίκων και ωριμάζουν μέσω της αγγειογενούς αναδιαμόρφωσης¹.

Η κύρια ομάδα νοσημάτων στην οποία επικεντρώνεται η έρευνα για την αγγειογένεση είναι τα κακοήθη νεοπλασμάτα^{2,3,4}. Όγκοι με μέγεθος >2mm χρειάζονται τη δημιουργία νέων αγγείων για την περαιτέρω ανάπτυξή τους⁵. Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι η νεοπλασματική αγγειογένεση δεν αποτελεί προνόμιο των συμπαγών όγκων, όπως αρχικά πιστευόταν, καθώς έχει παρατηρηθεί και σε αιματολογικές κακοήθειες, όπως οι λευχαιμίες^{6,7} και το πολλαπλούν μυέλωμα^{8,9}.

Μηχανισμοί νεοαγγειογένεσης και ανάπτυξη όγκων

Η ιδέα της εξάρτησης των κακοηθών νεοπλασμάτων από το αγγειακό τους δίκτυο χρονολογείται από τις αρχές του περασμένου αιώνα^{4,10}.

Η στενή σχέση μεταξύ αγγειογένεσης και ανάπτυξης των όγκων οδήγησε στη διαμόρφωση της άποψης περί «αγγειογενούς μεταστροφής» («angiogenic switch»), η οποία αποτελεί ένα ουσιαστικό βήμα στην αρχική φάση ανάπτυξης του όγκου, όπου προκαλείται αγγειογένεση με σκοπό την εξάπλωσή του^{4,11}.

Πραγματικά, η αγγειογενής μεταστροφή σχετίζεται ξεκάθαρα με την ανάπτυξη του όγκου σε ποντίκια με πολυεπίπεδη καρκινογένεση¹².

Εύλογα γεννάται το ερώτημα πώς τα καρκινικά κύτταρα πυροδοτούν την αγγειογενή μεταστροφή.

Μελέτες που αφορούσαν σε γλοιοβλάστωμα ανθρώπων και σε γλοίωμα μυών έδειξαν ότι η υποξία αποτελεί αιτία έκφρασης του ρυθμιστή της αγγειογένεσης, ήτοι

του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF-Vascular Endothelial Growth Factor) (ομοδιμερής γλυκοπρωτεΐνη 45-kDa) και κατά συνέπεια της αγγειογένεσης, θεμελιώνοντας κατ' αυτό τον τρόπο το ακόλουθο, κοινώς πλέον αποδεκτό μοντέλο: ο υψηλός ρυθμός πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων προκαλεί τη δημιουργία υποξικών περιοχών εντός της καρκινικής μάζας και τα καρκινικά κύτταρα που βρίσκονται σε αυτές τις περιοχές «εξαναγκάζονται» να εκφράσουν τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα με την επακόλουθη ενεργοποίηση της νεοαγγειογένεσης^{13,14} (εικόνα 1).

Η αναγνώριση του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα 1 (HIF-1, hypoxia inducible factor) ως μεταγραφικού παράγοντα, υπεύθυνου για την ενεργοποίηση του VEGF σε καταστάσεις υποξίας, παρείχε περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με τους μηχανισμούς της νεοπλασματικής αγγειογένεσης^{15,16,17}.

Παρά το γεγονός ότι η προκαλούμενη από την υποξία ενεργοποίηση του VEGF στα νεοπλασματικά κύτταρα έχει αποδειχτεί από διάφορες μελέτες^{15,18,19,20}, πιστεύεται ότι η υποξία ενεργοποιεί τη νεοπλασματική αγγειογένεση έμμεσα. Για παράδειγμα, τα μακροφάγα που αναπτύσσονται σε υποξικές συνθήκες απελευθερώνουν αυξητικούς παράγοντες πεπτιδίων, όπως τον παραγόμενο εξ αιμοπεταλίων αυξητικό παράγοντα PDGF (platelet derived growth factor) και τους ινοβλαστικούς αυξητικούς παράγοντες FGFs (fibroblast growth factors), οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν την ανάπτυξη ενδοθηλιακών κυττάρων²¹⁻²⁶. Επιπροσθέτως, ο VEGF παράγεται από νεοπλασματικά στρωματικά κύτταρα *in vivo*²⁷, υποδηλώνοντας τη συνεργασία μεταξύ στρωματικών και καρκινικών κυττάρων στην πρόκληση της νεοπλασματικής αγγειογένεσης.

Παρά το γεγονός ότι ο ρόλος του VEGF στην ανάπτυξη των όγκων έχει αποδειχτεί, υπάρχει ένας ικανός αριθμός αποδεικτικών στοιχείων που καταδεικνύει την εμπλοκή και άλλων αγγειογενετικών παραγόντων στη νεοπλασματική αγγειογένεση²⁸.

Μεταξύ αυτών οι FGF1 και FGF2 μελετήθηκαν εκτενώς. Είναι αξιοσημείωτο ότι παρά την έλλειψη ακολουθιών σημάτων για έκκριση, οι FGF1 και FGF2 αποβάλλονται ειδικά από τα καρκινικά κύτταρα, προφανώς μέσω μίας εναλλακτικής οδού αποβολής²⁹.

Επιπλέον, η αποβολή FGF1 και FGF2 φαίνεται να σχετίζεται με τη μεταστροφή στη νεοαγγειογένεση σε ποντίκια που έπασχαν από ινοσάρκωμα και καρκίνωμα β-κυττάρων αντίστοιχα, αυξάνοντας την πιθανότητα εμπλοκής των παραπάνω ουσιών στην έναρξη της νεοπλασματικής αγγειογένεσης^{30,31}.

Έχει αναφερθεί επανειλημμένως ότι η προκαλούμενη εξ ογκογονιδίων κυτταρική μεταμόρφωση συνοδεύεται από την αυξημένη έκφραση πεπτιδικών παραγόντων, οι οποίοι είναι σε θέση να προκαλέσουν αγγειογένεση³².

Παρόλα αυτά, οι μελέτες που αφορούν στη διερεύνηση του ρόλου που παίζουν τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια στην αγγειοποίηση νεοπλασμάτων αντιπροσωπεύουν ένα νέο τομέα στο φάσμα της αντικαρκινικής έρευνας.

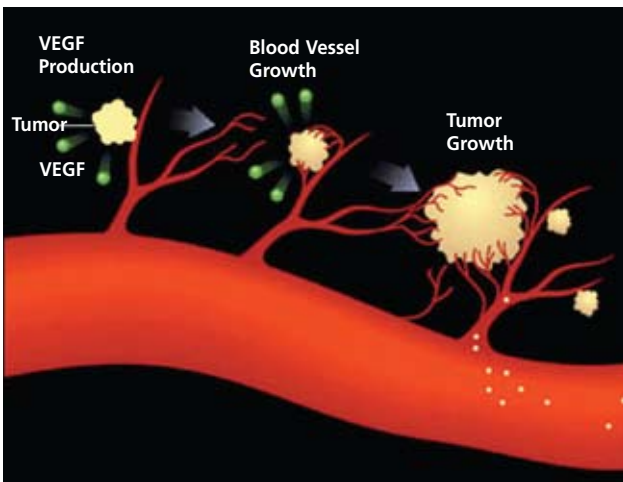
Η ενεργοποίηση ογκογονιδίων, όπως του *ras*, έχει συσχετιστεί με αυξημένη παραγωγή του VEGF, γεγονός που καταδεικνύει ότι μία από τις βασικές λειτουργίες των ογκογονιδίων είναι η συμβολή τους στη διαμόρφωση του αγγειογενετικού φαινοτύπου των κακοηθών νεοπλασμάτων^{17,32}. Για τον παραπάνω λόγο, η πρόκληση αγγειογένεσης λόγω αυξημένης παραγωγής VEGF αποτελεί απαραίτητη αλληλιά όχι επαρκή συνθήκη για την ενεργοποίηση των ογκογονιδίων *ras* και την κατ' επέκταση δημιουργία όγκων^{33,34}.

Η ογκογονιδιακά εξαρτώμενη πρόκληση αγγειογένεσης δεν περιορίζεται στα ογκογονίδια *ras*. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ενεργοποίηση της αγγειογένεσης από την τυροσινική κινάση *src* κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης των γλοιοματών³⁵, ενώ πολλά άλλα κλασικά ογκογονίδια ενεργοποιούν την παραγωγή μορίων, τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν αγγειογένεση³⁶. Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι



ΠΙΝΑΚΑΣ 1. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΓΙΑ ΤΑ ΜΗ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΠΝΕΥΜΟΝΩΝ

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΟΥΣΙΑ	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	ΣΤΑΔΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
Bevacizumab	Anti-VEGF αντίσωμα	Σύνδεσμοι του VEGF	Φάση III
Sorafenib	TKI	Raf-1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR-h, Flt-3, c-Kit	Φάση III
Sunitinib	TKI	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, Flt-3, PDGFR-a, PDGFR-h, c-Kit	Φάση II
Vatalanib	TKI	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR-h, c-Kit, c-Fms	Φάση II
AMG 706	Αναστολέας πρωτεϊνικής κινάσης	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR, c-Kit, c-Ret	Φάση II
CP-547,632	TKI	VEGFR2	Φάση II
AZD2171	TKI	VEGFR2	Φάση II-III
AEE788	TKI	VEGFR1, VEGFR2, EGFR, HER2	Φάση III
ZD6474	TKI	VEGFR2, VEGFR3, EGFR	Φάση II



Εικόνα 1. Έκφραση του VEGF από τα καρκινικά κύτταρα συνεπάγεται την ενεργοποίηση της νεοαγγειογένεσης.

το ογκογονίδιο H-ras ελαττώνει τη δραστηριότητα των TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) μέσω μίας οδού μεταβίβασης σημάτων διαφορετικής από αυτή που προκαλεί αύξηση της παραγωγής του VEGF³⁷. Για τον παραπάνω λόγο, τα ογκογονίδια θα μπορούσαν να διαταράξουν την αγγειογενετική ισορροπία, όχι μόνο ενεργοποιώντας τους αγγειογενετικούς διεγέρτες, αλλά και αποδυναμώνοντας τους ενδογενείς αγγειογενετικούς αποκλειστές.

Δείκτες νεοαγγειογένεσης και καρκίνος πνεύμονα

Η συνειδητοποίηση της σημασίας της νεοπλασματικής αγγειογένεσης στην έκφρα-

ση της επιθετικής συμπεριφοράς των κακοήθων νεοπλασμάτων κατέστησε εμφανή την ανάγκη της ποσοτικής μέτρησής της³⁸. Η ανακάλυψη ειδικών αντισωμάτων κατά των ενδοθηλιακών κυττάρων ικανοποίησε την παραπάνω ανάγκη, καθώς η χρήση της ανοσοϊστοχημείας οδήγησε στη χρώση και ανάδειξη αγγείων σε ιστολογικές τομές νεοπλασμάτων.

Τα κύρια αντισώματα που χρησιμοποιούνται για την ανάδειξη των αγγείων με ανοσοϊστοχημική χρώση σε τομές παραφίνης είναι το CD31, το CD34 και το αντίσωμα κατά του von Willebrand Factor (vWF), η ευαισθησία και ειδικότητα των οποίων, όπως έχει διαπιστωθεί σήμερα, απέχει από

το τέλειο³⁹⁻⁴⁴. Οι προαναφερόμενοι δείκτες αντιδρούν με την ίδια ένταση τόσο με τα νεοπλασματικά νεοαγγεία, όσο και με τα φυσιολογικά που βρίσκονται στον υγρή ιστό που περιβάλλει το νεόπλασμα. Για τους παραπάνω λόγους έχει προταθεί η χρήση άλλων δεικτών ή η ταυτόχρονη χρήση ενός συμβατικού αντισώματος (κυρίως του CD34) με ένα δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού (όπως το ki-67), ώστε να αναδεικνύονται νεοαγγεία σε φάση πολλαπλασιασμού^{40,44,45}. Μη ενδοθηλιακοί δείκτες, όπως η α-ακτίνη, που στρέφονται κατά των περικυττάρων (τοιχωματικά κύτταρα αγγείων) χρησιμοποιούνται για την ανάδειξη αγγείων^{40,46}. Άλλοι δείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί, αν και όχι ευρέως, είναι το CD36, το TEC-11, το E9, το FB5, το BW200⁴⁰. Τα TEC-11, FB5 και E9 δεν μπορούν να εφαρμοστούν σε δείγματα μονιμοποιημένα σε παραφίνη, παρά μόνο σε τομές κρουστάτη.

Η μικροαγγειακή πυκνότητα στα καρκινώματα των πνευμόνων

Η αγγειογένεση αξιολογείται έμμεσα σε κακοήθη νεοπλάσματα μέσω της μέτρησης μικροαγγείων και τον υπολογισμό της μικροαγγειακής πυκνότητας. Η σχέση της μικροαγγειακής πυκνότητας με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και την κλινική έκβαση ασθενών με καρκίνωμα πνεύμονα έχει εξεταστεί από πολύ μικρό αριθμό μελετών⁴⁷⁻⁶⁰, εκ των οποίων οι περισσότερες αναφέρονται σε μη μικροκυτταρικά καρκινώματα. Όσον αφορά στα μικροκυτταρικά καρκινώματα των πνευμόνων, οι βιβλιογραφικές αναφορές είναι ελάχιστες^{49,57,59,60} λόγω της μικρής συχνότητας του εν λόγω ιστολογικού τύπου, αλλά και των γενικότερων ιδιομορφιών του πνευμονικού ιστού. Ορισμένες από τις παραπάνω μελέτες έδειξαν ότι η αυξημένη μικροαγγειακή πυκνότητα σχετίστηκε με αυξημένη συχνότητα υποτροπών της νόσου και χειρότερη επιβίωση^{48,50,51,53,57,59}, ενώ άλλες δεν επιβεβαίωσαν τις παρατηρήσεις αυτές^{47,52,54-56,60}. Όλες οι προαναφερόμενες μελέτες εμφανίζουν τα προβλήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω, με αποτέλεσμα να κρίνεται επιτακτική η ανάγκη πραγματοποίησης επιπλέον μελετών οι οποίες θα λαμβάνουν υπόψη όχι μόνο τα μειονεκτήματα αλλά και το σχεδιασμό των προηγούμενων μελετών, ώστε να είναι δυνατή η αξιολόγησή τους ως ενιαίο σύνολο.

Αντιαγγειογενετικοί παράγοντες - Θεραπευτικές προοπτικές

Η κατανόηση του ουσιαστικού ρόλου

⇒ του VEGF στη νεοπλασματική αγγειογένεση οδήγησε στην παραγωγή φαρμάκων, με σκοπό την αναστολή της δράσης του και επομένως τη βελτίωση της επιβίωσης των καρκινοπαθών. Ο πιο εξελιγμένος κλινικά στοχευμένος αντιαγγειογενετικός παράγοντας είναι το bevacizumab (Avastin, Roche, Basel, Switzerland; Genentech, Inc., South San Francisco, CA)⁶¹, που αποτελεί ένα ανασυνδυασμένο μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του VEGF.

Προκλινικές μελέτες με το bevacizumab έδειξαν αναστολή της ανάπτυξης σε διάφορους όγκους, συμπεριλαμβανομένου του μη μικροκυτταρικού καρκινώματος πνεύμονα⁶². Το bevacizumab σε συνδυασμό με την 5-φθοροουρακίλη έχει πρόσφατα εγκριθεί στην Ευρώπη και τις Ηνωμένες Πολιτείες ως θεραπεία πρώτης γραμμής για μεταστατικά καρκινώματα παχέος εντέρου και στις Ηνωμένες Πολιτείες ως θεραπεία πρώτης γραμμής για εκτεταμένο μη πηλακώδες μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα. Ο πίνακας 1 αναφέρει τους αναστολείς της αγγειογένεσης για τα μη μικροκυτταρικά καρκινώματα πνευμόνων που βρίσκονται σε κλινική εξέλιξη.

Συμπεράσματα

Η αγγειογένεση αποτελεί μία δυναμική διαδικασία, η οποία κατέχει σημαντική θέση στην ανάπτυξη των καρκινωμάτων του πνεύμονα και ρυθμίζεται από πολυπλοκούς μηχανισμούς. Η αντιαγγειογενετική θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου έχει προταθεί ως πιθανώς αποτελεσματική, με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται προσπάθεια ανάπτυξης αντίστοιχων φαρμακευτικών σκευασμάτων, τα οποία σε συνδυασμό με συνθησιμένους κυτταροτοξικούς παράγοντες αναμένεται να επιφέρουν θεραπευτικά οφέλη στη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα.

Βιβλιογραφία

1. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386:671-674.
2. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25:581-611.
3. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18:4-25.
4. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:795-803.
5. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer* 1990; 82:4-6.
6. Rajkumar SV, Mesa RA, Tefferi A. A review of angiogenesis and anti-angiogenic therapy in hematologic malignancies. *J Hematother Stem Cell Res* 2002; 11:33-47.
7. Moehler TM, Neben K, Ho AD, et al. Angiogenesis in hematologic malignancies. *Ann Hematol* 2001; 80:695-705.
8. Munshi NC, Wilson C. Increased bone marrow microvessel density in newly diagnosed multiple myeloma carries a poor prognosis. *Semin Oncol* 2001; 28:560-564.
9. Rajkumar SV, Kyle RA. Angiogenesis in multiple myeloma. *Semin Oncol* 2001; 28:560-564.
10. Ide AG, Baker NH, Warren SL, et al. Vascularization of the Brown Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am J Roentgenol* 1939; 42:891-899.
11. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9:653-666.
12. Bergers G, Hanahan D, Coussens LM. Angiogenesis and apoptosis are cellular parameters of neoplastic progression in transgenic mouse models of tumorigenesis. *Int J Dev Biol* 1998; 42: 995-1002.
13. Ellis LM, Liu W, Ahmad SA, et al. Overview of angiogenesis: Biologic implications for antiangiogenic therapy. *Semin Oncol* 2001; 28:94-104.
14. Fidler IJ. Angiogenesis and cancer metastasis. *Cancer J* 2000; 6 Suppl 2:S134-141.
15. Maxwell PH, Dachs GU, Gleadow JM, et al. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8104-9.
16. Levy AP, Levy NS, Wegner S, et al. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* 1995; 270:13333-13340.
17. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 2003; 9:677-684.
18. Grunstein J, Roberts WG, Mathieu-Costello O, et al. Tumor-derived expression of vascular endothelial growth factor is a critical factor in tumor expansion and vascular function. *Cancer Res* 1999; 59:1592-8.
19. Ellis LM, Staley CA, Liu W, et al. Down-regulation of vascular endothelial growth factor in a human colon carcinoma cell line transfected with an antisense expression vector specific for c-src. *J Biol Chem* 1998; 273: 1052-7.
20. Rofstad EK, Danielsen T. Hypoxia-induced angiogenesis and vascular endothelial growth factor secretion in human melanoma. *Br J Cancer* 1998; 77:897-902.
21. Monestiroli S, Mancuso P, Burlini A, et al. Kinetics and viability of circulating endothelial cells as surrogate angiogenesis marker in an animal model of human lymphoma. *Cancer Res* 2001; 61:4341-4344.
22. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275:964-967.
23. Kuwabara K, Ogawa S, Matsumoto M, et al. Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:4606-4610.
24. Frank S, Hubner G, Breier G, et al. Regulation of VEGF expression in cultured keratinocytes. Implication for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 1995; 270:12607-12613.
25. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, et al. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor- β in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 1994; 269:6271-6274.
26. Cohen T, Nahari T, Cerem LW, et al. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996; 271:736-741.
27. Fukumura D, Xavier R, Sugjura T, et al. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 1998; 94:715-725.
28. Christofori G. The implication of angiogenesis on tumor invasiveness. *Angiogenesis* 1998; 2:21-23.
29. Christofori G, Luef S. Novel forms of acidic fibroblast growth factor-1 are constitutively exported by tumor cell lines independent from conventional secretion and apoptosis. *Angiogenesis* 1997; 1:55-70.
30. Kandel J, Bossy-Wetzel E, Radvanyi F, et al. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell* 1991; 66:1095-104.
31. Kerbel RS, Vitoria-Petit A, Okada F, et al. Establishing a link between oncogenes and tumor angiogenesis. *Mol Med* 1998; 4:286-95.
32. Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, et al. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1995; 55:4575-80.
33. Shi YP, Ferrara N. Oncogenic ras fails to restore an in vivo tumorigenic phenotype in embryonic stem cells lacking vascular endothelial growth factor (VEGF). *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254:480-3.
34. Okada F, Rak JW, Croix BS, et al. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras upregulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:3609-14.
35. Theurillat JP, Hainfellner J, Maddalena A, et al. Early induction of angiogenic signals in gliomas of GFAP-v-src transgenic mice. *Am J Pathol* 1999; 154:581-90.
36. Bouck N, Stellmach V, Hsu SC. How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res* 1996; 69: 135-74.
37. Arbiser JL, Moses MA, Fernandez CA, et al. Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:861-6.
38. Brem S, Cotran R, Folkman J. Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading. *J Natl Cancer Inst* 1972; 48:347-356.
39. Vermeulen PB, Fox SB, Dirix LY, et al. Heterogeneity of vascularisation in invasive breast carcinoma. *Eur J Cancer* 2002; 38:1951-1952.
40. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumors. *Eur J Cancer* 2002; 38:1564-1579.
41. Ahlgren J, Risberg B, Villman K, et al. Angiogenesis in invasive breast carcinoma- a prospective study of tumor heterogeneity. *Eur J Cancer* 2002; 38:64-69.
42. Saad RS, Liu YL, Nathan G, et al. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic makers in colorectal cancer. *Mod Pathol* 2004; 17:197-203.
43. Wang JM, Kumar S, Pye D, et al. Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86:386-388.
44. Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, et al. Evaluation of angiogenesis in non small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin Cancer Res* 2001; 7:3410-3415.
45. Fonsatti E, Maio M. Highlights on Endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J Transl Med* 2004; 2:18.
46. Eberhart S, Kahlert S, Goede V, et al. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res* 2000; 60:1388-1393. Erratum in *Cancer Res* 2000; 60:3668.
47. Offersen BV, Pfeiffer P, Hamilton-Dutoit S, et al. Patterns of Angiogenesis in Non Small-Cell Lung Carcinoma. *Cancer* 2001; 91:1500-9.
48. Stefanou D, Goussia AC, Arkoumani E, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and the adhesion molecule E-cadherin in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2003; 23(6C):4715-20.
49. Stefanou D, Batistatou A, Arkoumani E, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and association with microvessel density in small-cell and non-small-cell lung carcinomas. *Histol Histopathol* 2004; 19(1):37-42.
50. Seto T, Higashiyama M, Hiroko F, et al. Prognostic value of expression of vascular endothelial growth factor and its flt-1 and KDR receptors in stage I non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006; 53:91-96.
51. Volm M, Kooma R, Mattern J. Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in squamous cell lung cancer. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1997; 74:64-68.
52. Decaussin M, Sartelet H, Robert C, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non small cell lung carcinomas (NSCLCs). Correlation with angiogenesis and survival. *J Pathol* 1999; 188:369-377.
53. Giatromanolaki A, Koukourakis M, O'Byrne K, et al. Prognostic value of angiogenesis in operable non small cell lung cancer. *J Pathol* 1996; 179:80-88.
54. Baillie R, Carlisle J, Pendleton N, et al. Prognostic value of vascularity and vascular endothelial growth factor expression in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2001; 54:116-120.
55. Yoo J, Jung JH, Lee MA, Seo KJ, et al. Immunohistochemical Analysis of Non-Small Cell Lung Cancer: Correlation with Clinical Parameters and Prognosis. *J Korean Med Sci* 2007; 22:318-25.
56. Trivella M, Pezzella F, Pastorino U, et al. Microvessel density as a prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2007; 8:488-99.
57. Lucchia M, Mussia A, Fontanini G, et al. Small cell lung carcinoma (SCLC): the angiogenic phenomenon. *Eur J Cardio Thorac* 2002; 21:1105-1110.
58. Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, et al. Expression of endothelin-1 is related to poor prognosis in non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cancer* 2005; 41:2828-2835.
59. Fontanini G, Faviana P, Lucchi M, et al. A high vascular count and overexpression of vascular endothelial growth factor are associated with unfavourable prognosis in operated small cell lung carcinoma. *Br J Cancer* 2002; 86(4):558-63.
60. Yamashita J, Ogawa M, Abe M, et al. Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor/Thymidine Phosphorylase Concentrations Differ in Small Cell and Non-small Cell Lung Cancer. *Chest* 1999; 116:206-211.
61. Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, et al. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22:2184-2191.
62. Herbst RS, Sandler AB. Non-small cell lung cancer and anti-angiogenic therapy: what can be expected of bevacizumab? *Oncologist* 2004; 9:19-26.