

A rekombináns humán erythropoietin- α fokozza a humán laphámrák sugárérzékenységet preklinikai modellben

Lövey József¹, Kenessey István², Rásó Erzsébet², Dobos Judit^{2,4}, Vágó Ágnes³, Kásler Miklós¹, Futosi Krisztina², Döme Balázs⁴, Tímár József², Tóvári József^{2,5}

Országos Onkológiai Intézet, ¹Sugárterápiás, ²Tumor Progressziós Osztály, ³Központi Laboratórium,

⁴Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet,

⁵Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

Tumoros betegekben gyakran alakul ki anémia, amelyet különböző rekombináns erythropoietinek (rHuEPO-k) segítségével próbálnak korrigálni. A legújabb vizsgálatok azt mutatják, hogy az erythroid progenitor sejtek mellett a tumor- és endotheliális sejtek is expresszálnak erythropoietin-receptort (EPOR), ezáltal a rHuEPO hatással lehet ezen sejtek funkcióira is. Munkánkban a rHuEPO α -nak a sugárkezelés eredményességét befolyásoló hatásait vizsgáltuk EPOR+ humán laphámrák (A431) xenograft modellben. A tumort hordozó SCID egereket rHuEPO α -val kezeltük humán-ekvivalens dózisban (150 IU/kg, három alkalommal hetente) a tumor oltását követően. A xenograftokat a 14. napon besugaraztuk (5 Gy, amikor a tumor mérete elérte az 50-70 mm³-t), majd a 22. napon megmértük a kialakult daganatok tömegét. A kísérletek alatt figyelemmel kísértük a rHuEPO α általános hatásait, tekintettel a hemoglobinszintre, a tumor-asszociált erekre és a xenograftok HIF-1 α -expressziójára. A rHuEPO α -val és besugárzással kezelt A431 sejtek proliferációját, apoptózisát és kolóniaképző képességét *in vitro* módszerekkel is vizsgáltuk. *In vitro* a rHuEPO α -kezelés önmagában nem módosította az EPOR+ A431 sejtek proliferációját, viszont fokozta a sugárkezelés hatását az apoptózisra és a kolóniaképző képességre. *In vivo* a rHuEPO α -kezelés kompenzálta a tumor-indukált anémiát SCID egerekben és csökkentette a tumorális HIF-1 α -expressziót, viszont nem volt hatással a tumor növekedésére. Mindeközben, a rHuEPO α -kezelés szignifikánsan ($p < 0,05$) növelte a sugárterápia hatékonyságát *in vivo*, a tumorerek roncsolásának fokozása révén. Megállapíthatjuk, hogy a rHuEPO α -kezelés a daganat sugárterápiájának hatékonyságát nemcsak az általános hypoxia és a tumorális HIF-1 α -expresszió csökkentésével módosíthatja, hanem a tumorerek nagyobb mérvű roncsolódásán keresztül is. *Magyar Onkológia: 51:53–61, 2007*

According to recent data erythropoietin receptor (EPOR) is expressed not only by bone marrow erythroid progenitors but by endothelial- and cancer cells and it was suggested that erythropoietin (EPO) may affect their functions as well. We have analyzed the effects of recombinant human erythropoietin- α (rHuEPO α) on radiation sensitivity of EPOR+ human epidermoid carcinoma (A431) xenograft model. *In vivo* rHuEPO α treatment was started after tumor cell inoculation into SCID mice. 5 Gy irradiation was performed on day 14, the effect of which was measured on day 22. Hemoglobin level, tumor-associated microvessels and HIF-1 α expression of the xenograft were monitored during the experiment. rHuEPO α administration prevented the development of tumor-induced anemia of SCID mice and reduced the level of HIF-1 α expression of the xenograft tumor without affecting tumor growth. We have found that rHuEPO α treatment significantly increased the efficacy of antitumor effect of irradiation which was partly mediated by complex effects on tumor-associated microvessels. *In vitro* rHuEPO α did not affect proliferation of A431 cells but enhanced the antiproliferative and proapoptotic effects of irradiation. We concluded that rHuEPO α administration positively modulated the antitumoral effects of irradiation at least by two pathways, decreasing systemic hypoxia resulting in decreased tumoral HIF-1 α expression and enhancing direct effects on tumor-associated microvessels. Lövey J, Kenessey I, Rásó E, Dobos J, Vágó Á, Kásler M, Futosi K, Döme B, Tímár J, Tóvári J. Human recombinant erythropoietin- α increases the efficacy of irradiation in preclinical model. *Hungarian Oncology 51:53–61, 2007*

Közlésre érkezett: 2007. január 22.

Elfogadva: 2007. március 7.

Levelezési cím: Dr Tóvári József, Országos Onkológiai Intézet, 1122 Budapest, Ráth György u. 7-9. Telefon: 1-224-8600, Fax: 1-224-8620, e-mail: tozsi@oncol.hu

A kísérletek a következő pályázatok támogatási keretein belül folytak: Oktatási Minisztérium NKFP-1a-0024-05, valamint OTKA D048519 és F046508.

Bevezetés

Az anémia gyakran előforduló jelenség daganatos betegek esetében; csökkenti az életminőséget és a kezelés kedvezőtlen kimenetelét okozhatja (8, 13, 38). Számtalan különböző erythropoietikus hatóanyagot használnak a hemoglobinszint javítására (7, 35, 36), azonban ellentmondásos kísérleti és klinikai adatok állnak rendelkezésre a rekombináns humán erythropoietinek (rHuEPO-k) alkalmazásával kapcsolatban. Sugár- vagy sugár- és kemoterápiában részesülő különböző eredetű daganatos betegek rHuEPO-kezelése vegyes eredményeket adott a kezelés kimenetele szempontjából: az EPO anémiát korrigáló és életminőséget javító hatása nem kérdéses emlő-, fej-nyaki-, illetve méhnyakrákban szenvedő betegek esetében, azonban a teljes túlélés nem javult (14, 18, 39), bár a méhnyakrákra vonatkozó adatok újabb vizsgálatokat igényelnek (6). Ugyanakkor petefészek- és nyelőcsődaganatok rHuEPO-kezelésekor a teljes túlélésben javulás mutatkozott (26, 31). Az ellentmondásos eredményeknek köszönhetően a legújabb áttekintő munkák arra a következésre jutottak, hogy a rHuEPO-kezelés hatása a daganatos betegek túlélésére legalábbis bizonytalan.

Számos kísérleti és klinikai eredmény gyűlt össze a tumorsejtek EPO-receptor- (EPOR) expressziójáról (1, 3), és az ezzel együttjáró fokozott daganatsejt-proliferációról, tumornövekedésről (4, 45). Mindemellett jól ismert, hogy az anémia és különösen a tumorszövetek hypoxiája csökkenti a kemo- és sugárterápia hatékonyságát (42). Számos adat azt mutatja, hogy szoros összefüggés van a hemoglobinszint és a daganatkezelés hatékonysága között: magasabb hemoglobinszint a tumor jobb oxigenációjához vezet, mely nagyobb mennyiségű aktivált szabadgyök képződését eredményezi a besugárzás után (12, 29, 43). Néhány adat azonban arra utal, hogy a tumorsejtektől függetlenül, a tumoros erek sugárérzékenysége is lényeges eleme a sugárterápiának (24, 28). A besugárzás fokozza a hypoxia-indukálható faktor-1 α -t (HIF-1 α), mely a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF) és más angiogén faktorok overexpresszióját vonja maga után, ezáltal hozza létre az endotheliális sejtek fokozott sugárrezisztenciáját (11). Preklinikai vizsgálatokban VEGF-receptor-gátlószerek adása a sugárkezelés alatt fokozta a tumorkontrollt (46). Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a tumor érrendszere nemcsak a tumorszövet ellátásában kulcsfontosságú, hanem a sugárterápia eredményességét is befolyásolja.

Jól ismert, hogy a rHuEPO hatással van az endotheliális sejtek proliferációjára, apoptózisára és migrációjára, valamint hogy a rHuEPO a VEGF-hez hasonló hatású angiogénikus faktor (2, 17, 33). Korábban kimutattuk, hogy a rHuEPO α adása preklinikai xenograft modellekben szignifikánsan növelte a tumor-asszociált endotheliális sejtek proliferációs indexét és a CD31-pozitív intratumorális erek méretét. A megnövekedett érfelszín emelte a tumorszövet perfúzióját, amely fokozta a kemoterápiás szerek daganatellenes ha-

tásait (41). Jelen vizsgálatunkban a rHuEPO α sugárkezelés eredményességét befolyásoló hatásait elemeztük *in vitro* és *in vivo* A431 humán laphámkarcinóma sejtvonalon és -xenografton.

Anyag és módszer

Sejtvonal

A431 humán laphámkarcinóma-sejteket 5% foetalis borjúsavót tartalmazó DMEM médiumban (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) tartottuk fenn 37°C-on 5% CO₂-tartalom mellett.

Tumorsejtek áramlási citometriája

A sejtekből egysejtszuspenziót készítettünk EDTA-val (Sigma), háromszor átmostuk szérumentes DMEM-mel, majd fixáltuk 20 percig metanollal. A fixálás után a sejteket blokkoltuk 3% BSA/PBS-sel (Sigma) 30 percig, aztán inkubáltuk anti-humán EPOR monoklonális antitesttel (1:20 PBS-ben, R&D Systems, Minneapolis, MN) vagy kontroll egér IgG2b antitesttel (Sigma). A kötődött elsődleges antitestet RPE-vel konjugált kecske anti-egér Ig-vel mutattuk ki (1:10 PBS-ben, DakoCytomation, Glostrup, Dánia). A jelölt sejtek fluoreszcenciáját CyFlow SLGreen áramlási citométerrel mértük (Partec, Münster, Németország) és a pozitív sejteket %-ban adtuk meg. Minden egyes kísérleti pontot három párhuzamosban teszteltük, és a kísérleteket legalább három alkalommal megismételtük.

In vitro proliferációs teszt

Kétezer A431 sejtet tettünk lyukanként 96 lyukú szövettenyésztő edénybe (Greiner, Frickenhausen, Németország) 5% szérumot tartalmazó médiumban, majd 24 órával később humán rekombináns erythropoietin- α -val (rHuEPO α , epoetinum alpha, Jannsen-Cilag, Shaffhausen, Svájc) kezeltük különböző koncentrációkban (0,1, 1, 10 IU/ml) 72 órán keresztül 200 μ l médiumban.

A sugárkezelés sejtproliferációra gyakorolt hatásának detektálásához a szövettenyésztő edényeket besugároztuk (1,85 Gy/perc, összességében 5 Gy) 200 kV, 15 mA erősségű terápiás röntgensugárzással (THX 250, Medisor, Budapest) 0,5 mm Cu filter használatával 6 párhuzamos lyukban. 48 órás inkubációt követően 20 μ l 5 mg/ml koncentrációjú metil-tiazol-tetrazólium-bromidot (MTT, Sigma) adtunk a sejtmédiumhoz 4 órára, 37°C-on, majd a médiumot eltávolítottuk és a tetrazólium-kristályokat 100 μ l DMSO-ban (Sigma) feloldottuk. Az abszorbanciát 570 nm-en ELISA Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA) segítségével mértük.

Kolóniaképző túlélési vizsgálat

A431 tumorsejteket (300-2000/lyuk, egyenként hozzávetőlegesen 100-200 túlélő kolóniát hoznak létre a sugárkezelést követően) 6 lyukú szövettenyésztő edényekbe (Greiner) juttattunk széru-

mot tartalmazó DMEM médiumban, és rHuEPO α különböző koncentrációival kezeltük (0,1, 1, 10 IU/ml). A sejteket 24 órával később besugaraztuk (5 Gy) a rHuEPO α -t tartalmazó médiumban, majd az edényeket 2 hétig 37°C-on inkubáltuk. A kolóniákat 6 párhuzamos lyukban metanollal fixáltuk, Giemsa-val (Chroma, Köngen, Németország) megfestettük, és sztereomikroszkóp (MSZ5600, A. Krüss Optronik GmbH, Hamburg, Németország) alatt megszámláltuk.

Az apoptotikus frakció detektálása

A rHuEPO-kezelt és besugarozott tumorsejteket 48 órás inkubáció után 0,02%-os EDTA segítségével felszedtük, PBS-sel átmostuk, majd 70%-os etanollal fixáltuk. A propidiumjodiddal és RNázal (Cystain PI Absolute T, Partec, Németország) végzett 2 órás inkubációs periódus után meghatároztuk a sejtekben a DNS mennyiségét áramlási citométerrel (CyFlow, Partec). Az apoptotikus sejtek arányát a szub-G1 frakció mutatta ki, melyet FlowMax szoftver segítségével elemeztünk.

A tumorxenograftok létrehozása

A xenograftokat egysejtszuspenziós oldatként 10^6 tumorsejt/0,1 ml szérumentes DMEM oldatban nőstény SCID egerek hátába történő szubkután oltással hoztuk létre. Minden állatkísérletet az Országos Onkológiai Intézet Állatgondozási és -Kezelési Bizottsága által jóváhagyott standardok és eljárások szerint végeztünk el.

Hemoglobinszint mérése SCID egerekben

Az egereket intraperitoneálisan Nembutal (Serva, Heidelberg, Németország) adásával elaltattuk, majd a szívből vért vettünk (a 8., 15., 18., 19. és 22. napon). A friss vért üvegcövekben tartottuk 3,8% nátrium-citrát oldatban (citrát:vér arány = 1:10 v/v). A mintákat 15 percig 4000 rpm-en centrifugáltuk, és a hemoglobinszintet SYSMEX SF 3000 hematológiai műszerrel határoztuk meg.

In vivo EPO-kezelés és a tumorok besugárzása

A tumort hordozó egereket rHuEPO α -val kezeltük humán-ekvivalens dózisban (150 IU/kg fiziológias sóoldatban, 0,1 ml végtérfigatban), heti 3 alkalommal intraperitoneálisan a tumoroltás utáni első naptól a sugárkezelés megkezdéséig (14. nap), amikor a tumor térfogata már elérte az 50-

70 mm³-t. Az állatokat altatás után rögzítettük, és a daganatot egy 1 cm²-es kör alakú terület középpontjába állítottuk. Egyszeri 5 Gy röntgensugárdózist alkalmaztunk lokálisan, egyenként létrehozott led árnyékolással, 200 kV, 15 mA-es terápiás röntgensugárforrás használata mellett (THX 250, Medicor, Budapest), 0,5 mm Cu filter alkalmazásával, 1,85 Gy/min dózisirátával. 8 napos inkubációt követően az állatokat Nembutallal túlaltattuk és az eltávolított tumorok súlyát lemértük.

A tumorerek immuncitokémiás vizsgálata

A szubkután nőtt tumorokat összegyűjtöttük, formalinban fixáltuk és paraffinba ágyaztuk. Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz 5-7 μ m vastagú deparaffinált metszeteket használtunk. A metszeteket poliklonális nyúl anti-humán Factor VIII antitesttel (hígítás 1:20, Becton Dickinson Bioscience, San Jose, CA) inkubáltuk, amit biotinált anti-nyúl IgG és streptavidin-konjugált torma-peroxidáz (Vector Laboratories, Burlingame, CA) követett. Az ereket DAB kromogénnel tettük láthatóvá, a szövetszeleteket hematoxilinnel háttérfestettük. Metszetenként öt, egyenként 300x400 μ m méretű élő tumorterületet fényképeztünk le és elemeztünk mikroszkóp alatt. A Factor-VIII+ erek morfológiáját 5-5 tumor 5 különböző területén vizsgáltuk.

Az érfal pericitáit anti-simaizomaktin antitesttel (SMA, DakoCytomation) történő immunhisztokémiai jelöléssel, AEC kromogénnel azonosítottuk.

RNS-izolálás és reverz transzkripció

A fagyasztva homogenizált mintákból a gyártó (TRI ReagentTM, Sigma) által megadott protokoll szerint össz-RNS-t izoláltunk. A reverz transzkripciónál 2 μ g tisztított RNS-hez 1 μ l (10 mM) dNTP-mixet (Finnzyme, Espoo, Finnország), illetve 1 μ l random primer-oligo dT-keveréket (mindkettő végkoncentrációja 2,5 μ M) adtunk, és ezt az elegyet 10 percig 70°C-on inkubáltuk. Szobahőmérsékletre történt hűtés után a reakcióelegyhez mintánként 2 μ l 10x M-MLV reverz transzkriptáz puffert (Sigma), 1 μ l M-MLV reverz transzkriptázt (200 NE/ μ l, Sigma), 0,5 μ l RNáz-inhibitor (40 NE/ μ l, Promega) és 6,5 μ l DEPC-kezelt vizet adtunk. 37°C-on 50 percig történt a reverz transzkripció, majd az enzimet 85°C-on 10 percig inaktiváltuk. Az átírás megtörténtét (RT+ minták) és a DNS-szennyeződés kizárását (RT- minta) β -aktin primerekkel (1. táblázat) végzett PCR segítségével ellenőriztük. Negatív kontrollként DEPC-kezelt víz szolgált.

Primer jele (Génbank ID)		Szekvencia (5'-3') (lokalizáció)	Termék
β -aktin (gi:5016088)	sense	TCT GGC ACC ACA CCT TCT AC (327-347)	387 bp
	antisense	CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC (714-692)	
EPOR (gi: 4557561) HIF-1 α (gi:31077212)	sense	CATCAATGAAGTAGTGCTCCTAGAC (550-574)	131 bp
	antisense	CCT CGT AGC GGA TGT GAG AC (680-661)	
	sense	AACCTCTGGATGCTGGTGATT (496-516)	
	antisense	TGTTTCATAGTTCTTCCTCGGC (834-814)	339 bp

1. táblázat.
A PCR reakciókban
alkalmazott primerek

Az EPOR expressziójának igazolása PCR segítségével

A fenti átírásból származó cDNS 2 µl-éből kiindulva végeztük a PCR-t. A 25 µl végtérfigatú reakcióelegy az EPOR-specifikus primerek (1. táblázat; végkoncentráció: 1 µM) kívül 2,5 µl 1,5 mM Mg²⁺-koncentrációjú PCR-puffert (DyNazyme™, Finnzyme), 2 µl dNTP-mixet (2,5 mM, Finnzyme) és 0,4 µl DNS-polimerázt (2 NE/µl, DyNazyme™, Finnzyme) tartalmazott. A PCR-feltételek a következők voltak: 95°C-on 2 percig történő aktiválást követően 35 ciklus 94°C 1 perc, 55°C 1 perc, 72°C 2 perc, amit egy 72°C-on 10 percig tartó extenziós lépés követett. A PCR-terméket 2%-os agarózgélben választottuk szét, majd az eredményét etidium-bromiddal történt festést követően a Gel Doc 2000 (Bio-Rad) rendszer segítségével dokumentáltuk.

HIF-1α-expresszió relatív mennyiségének mérése valósidejű PCR segítségével

Az expresszált HIF-1α relatív mennyiségének meghatározását real-time PCR (MyiQ™ Single Color Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad iCycler) méréssel végeztük el. A 25 µl-es végtérfigatú reakcióelegy 12,5 µl 2x iQ SYBR® Green Supermix-et (Bio-Rad), 200 nM végkoncentrációban primereket (1. táblázat) és 11,5 µl hígított, a fenti átírásból származó cDNS-t tartalmazott. A PCR-feltételek a következők voltak: iTaq™ DNS-polimeráz aktiválását (3 perc, 95°C) követően 50 ciklus 95°C 30 mp, 55°C 30 mp, 72°C 1 perc lépésekkel. Pozitív kontrollként a hígítási sort is adó K562 humán leukémia sejtekből származó cDNS szolgált, míg a negatív kontroll itt is a minták hígítására használt víz volt. Minden mintán mind-

két PCR reakcióban (HIF-1α és β-aktin) 3-3 párhuzamos mérést végeztünk. A PCR-termékeket (autentikus termékméret alapján történő igazolásra) 2%-os agarózgélben megfuttattuk, majd etidium-bromiddal festettük. A felvétel rögzítését számítógéppel összekapcsolt Gel Doc 2000 (Bio-Rad) segítségével végeztük el.

A HIF-1α relatív kiindulási mennyiségét K562 sejtekből származó cDNS hígítási sorának (1x-625x) HIF-1α PCR reakciója alapján nyert görbe, illetve a saját β-aktin-expresszióra történt normalizálás alapján végeztük el (az utóbbi alapja ugyanazon K562 cDNS hígítási sor β-aktin PCR reakciója). A három párhuzamos mintán nyert mérési eredményt átlagoltuk. A minták HIF-1α-expressziójának egymáshoz viszonyított relatív arányát az eredménytáblázatban úgy számítottuk ki, hogy a legalacsonyabb expressziójú vonal mennyiségét vettük 1-nek, és a többi vonal normalizált kiindulási értékét ennek normalizált kiindulási mennyiségével osztottuk el.

A PCR-termékek szekvenciájának meghatározása

Valamennyi PCR-termék autentikus voltát szekvenálással igazoltuk. A PCR-termékeket az agaróz gélből High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim, Németország) segítségével nyertük vissza tiszta formában, majd a bázis-sorrendet ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) segítségével határoztuk meg.

Statistikai elemzés

Az *in vitro* kísérletekből és morfológikus vizsgálatokból származó adatok összehasonlítása Student's t-teszt, míg az *in vivo* adatok elemzése a Mann-Whitney U-teszt alkalmazásával történt. A 0,05-nél kisebb p értéket tekintettük szignifikánsnak. Minden statisztikai elemzéshez CSTAT statisztikai programot használtunk.

Eredmények

Az EPO-receptor expressziója A431 sejtekben

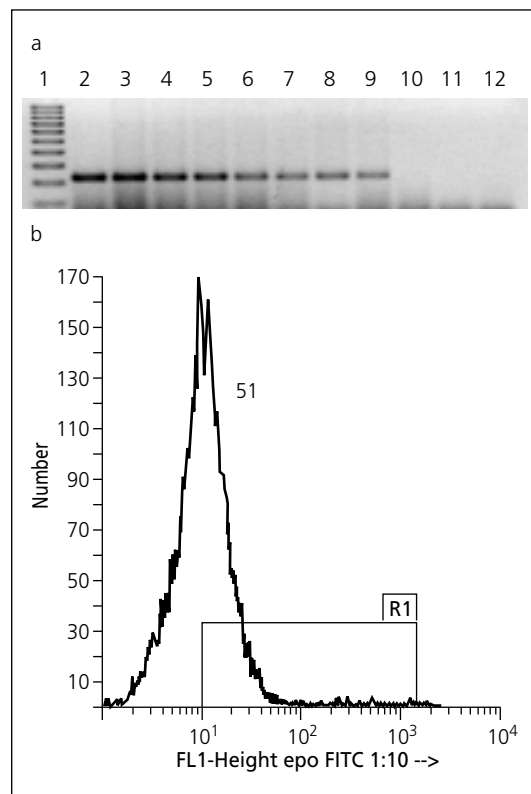
Az EPOR expresszióját mRNS szintjének meghatározásával mutattuk ki RT-PCR technika segítségével mind az *in vitro* növekvő humán A431 sejtekben, mind az *in vivo* xenograft tumorokban. Az EPOR-ra specifikus primerpár mind a sejtvonalban, mind a xenograft tumorban a várt 131 bp hosszúságú terméket adta (1a. ábra), ezzel szemben az egér szövetekben (izom, bőr) nem történt amplifikáció, jelezve a primerek humán-specifitását. Az immuncitokémiai vizsgálatok azt mutatták, hogy az A431 sejtek több mint 50%-a expresszálja az EPOR fehérjét (1b. ábra).

A rHuEPOα *in vitro* hatása a tumorsejtek proliferációjára és a sugárkezelés eredményességére

Bár az A431 sejtek kifejezték az EPOR-t, a rHuEPOα-val 0,1-10 IU/ml dózistartományban

1. ábra.
Az EPO-receptor expressziójának kimutatása mRNS- és fehérje-szinten.

(a) Az EPO-receptor (EPOR) detektálása RT-PCR segítségével. A humán-specifikus primerpár egy 131 bp nagyságú terméket amplifikált az A431 sejtekből (2-5) és a tumorxenograftokból (6-9) egyaránt. A primer specifitását mutatja, hogy sem egér izomból (10), sem egér bőrből (11) nem történt amplifikáció. Negatív kontroll: 12. (b) Az EPOR protein kimutatása áramlási citometriával; az eredményeket a pozitív sejtek százlékában fejeztük ki.



Napok a tumoroltás után	0	8	15	19	22
Hemoglobin (g/dl) Kontroll	11,6±1,1	11,6±0,7	11,4±0,4	11,4±1,2	11,3±0,2
A431		11,3±0,5	10,9±0,6	10,4±0,5	10,1±0,5
A431 + rHuEPO		12,3±0,9	13,0±0,5*	12,4±0,4*	12,5±0,5*

Átlag±SD (n=3), *p<0,05 a tumoros kontrollhoz viszonyítva

2. táblázat. A rHuEPO-kezelés hatása a hemoglobinszintre A431 tumorxenograftok növekedése során

72 órán keresztül végzett kezelés nem mutatott szignifikáns hatást a sejtproliferációra (az adatot nem mutatjuk). A tumorsejtek besugarazása 5 Gy-vel 25,32%-kal csökkentette az élő sejtek számát 48 óra alatt. A rHuEPO-kezelés (0,1-10 IU/ml) és a sugárkezelés (5 Gy) együttes alkalmazása további (<20%-nyi) proliferációgátlást eredményezett (2a. ábra).

A rHuEPO α hatása a tumorsejtek apoptózisára és kolóniaképző képességére *in vitro*

A rHuEPO α -kezelés önmagában nem befolyásolta az apoptózist (a kontroll mintákban $1,6 \pm 0,3\%$ volt az apoptotikus sejtek aránya, míg a rHuEPO-kezeltekben $1,5 \pm 0,4\%$), viszont szignifikánsan ($p < 0,01$) megnövelte az apoptotikus sejtfrakció mennyiségét a besugárzott tumorsejtekben. A sugárkezelés (5 Gy) önmagában ötszörös ($8,4 \pm 2,1\%$), míg a rHuEPO α -val (1 IU/ml, 48 óra) kombinálva közel 11-szeres ($16,4 \pm 2,3\%$) növekedést eredményezett az apoptotikus sejtek arányában.

Az A431 sejtek hosszú távú túlélésének tanulmányozása a kolóniaképzés vizsgálatával történt. Azt találtuk, hogy a rHuEPO α koncentrációfüggően (0,1-10 IU/ml koncentrációban) megnövelte a sugárkezelés hatását *in vitro* (2b. ábra). A sugárkezelés 60%-os csökkenést idézett elő a daganatsejtek klonogén túlélésében, melyet szignifikánsan tovább erősített (8%, 30%, ill. 49%) a rHuEPO-kezelés.

A rHuEPO α hatása a tumort hordozó SCID egerek hemoglobinszintjére

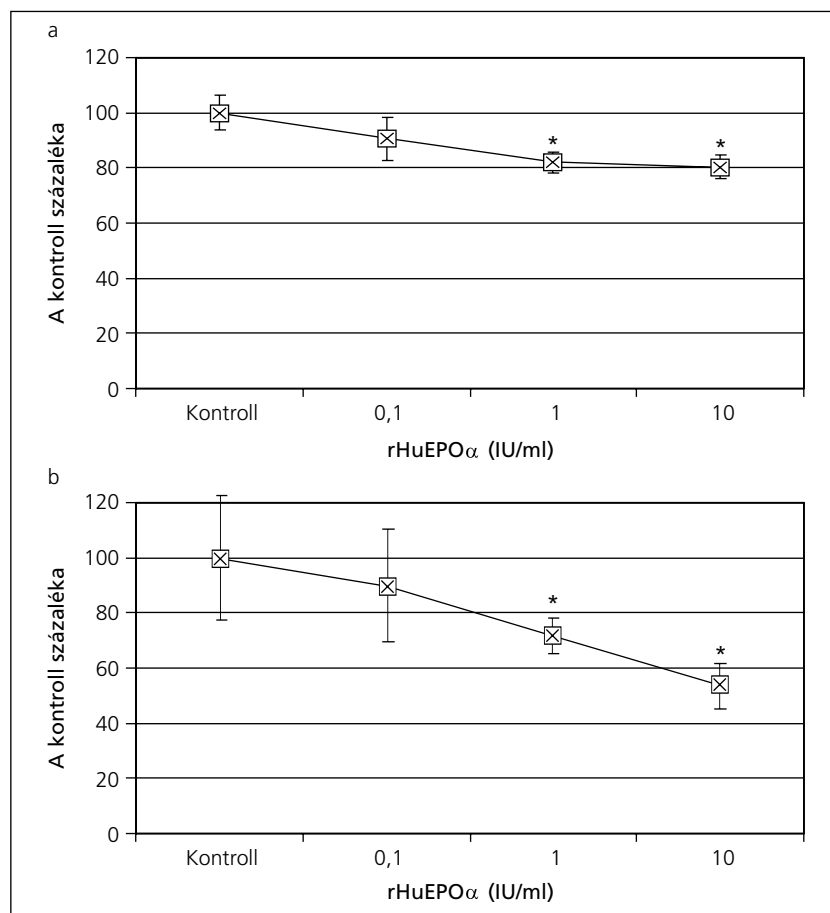
A növekvő A431 xenograft anémiát idézett elő (hemoglobinszint < 11 g/dl) a SCID egerekben a tumorsejtek szubkután történő beoltását követő 15. naptól (2. táblázat). Intraperitoneálisan rHuEPO-t adtunk az egereknek humán-ekvivalens dózisban (150 IU/kg, 3 alkalommal hetente), az első naptól a kísérlet végéig (22. nap), mely csökkentette a tumor-indukált anémiát (2. táblázat, $p < 0,05$).

A rHuEPO α hatása a HIF-1 α mRNS-szintjére

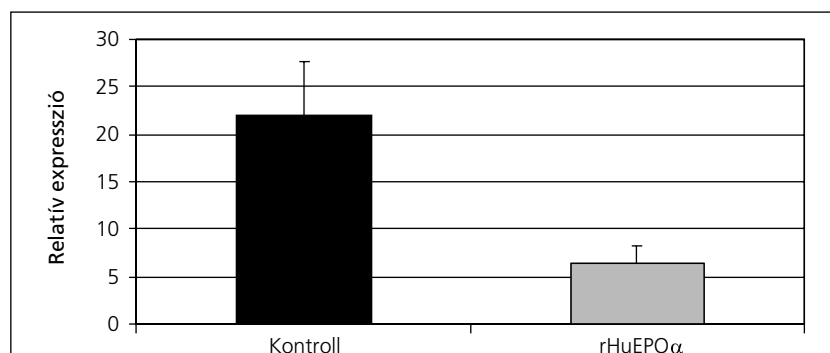
A tumorális (humán daganatsejtek és a tumorstroma) HIF-1 α expresszióját mRNS-szintjének (339 bp hosszúságú termék) mérésével határoztuk meg a tumorxenograftokban az oltást követő 22. napon real-time PCR-rel. Az adatok azt mutatják, hogy a kontroll tumorokban a HIF-1 α mRNS-expressziója szignifikánsan magasabb volt (3,5-szörös), mint az rHuEPO α -kezeltekben (3. ábra).

2. ábra. rHuEPO α -kezelés hatása besugárzott tumorsejtek proliferációjára és kolóniaképző képességére *in vitro*

(a) rHuEPO α -val kezelt A431 sejtek proliferációja egyszeri 5 Gy dózisú besugarozás után. * $p < 0,05$ az egyedüli besugarozáshoz viszonyítva. (b) Besugárzott A431 sejtek hosszú távú (14 nap) kolóniaképző képességének vizsgálata rHuEPO α -kezelés után. Átlag $\pm$ SD, $n = 6$; * $p < 0,01$ az egyedüli besugarozáshoz viszonyítva



3. ábra. Humán HIF-1 α gén expressziója A431 tumorxenograftokban. A HIF-1 α gén expresszióját real-time PCR-rel detektáltuk. A rHuEPO α -kezelés szignifikánsan csökkentette a HIF-1 α -produkciót. Átlag $\pm$ SD, $n = 5$; * $p < 0,05$ a kontrollhoz viszonyítva



A rHuEPO α hatása a sugárkezelés antitumorális aktivitására *in vivo*

A rHuEPO α adása *in vivo* humán-ekvivalens dózisban nem volt szignifikáns hatással az A431 tumorxenograftok növekedésére (kontroll tumor-tömeg: $59,2 \pm 8,1$ mg, rHuEPO α -kezelt: $59,0 \pm 8,0$ mg). A tumorok az oltást követő 14. napon 5 Gy-es egyszeri besugárzást kaptak, mikor átlagos méretük elérte az 50-70 mm³-t. Míg a sugárkezelés önmagában is szignifikáns gátlást eredményezett a tumor növekedésében ($35,4 \pm 4,6$ mg, $p < 0,01$), addig a rHuEPO-kezelés ezt a hatást szignifikánsan fokozta ($24,2 \pm 5,3$ mg, $p < 0,05$).

A rHuEPO-kezelés és a sugárkezelés hatása a tumorok vérereire

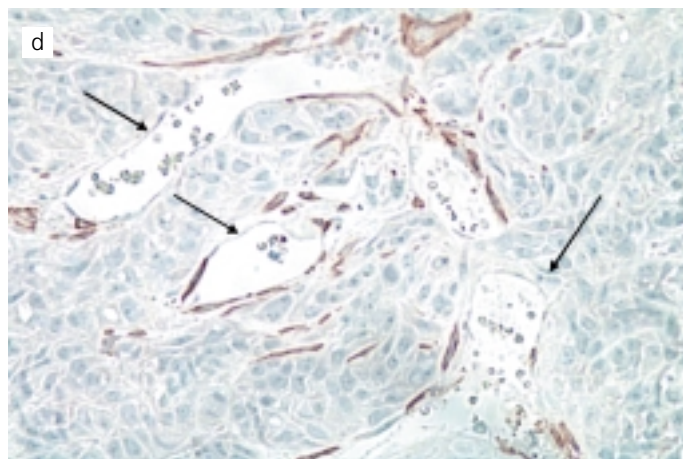
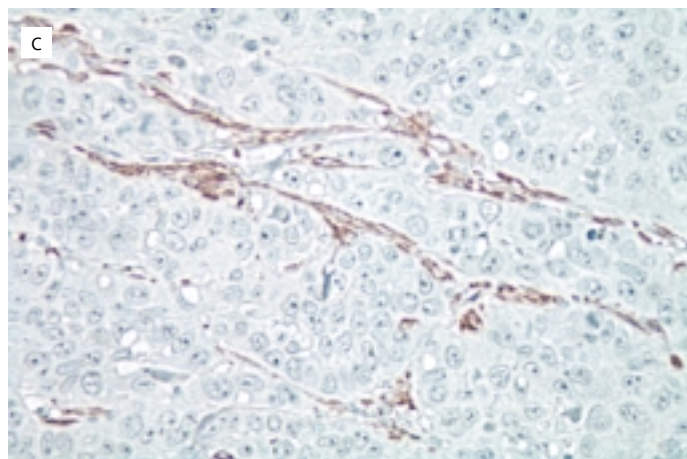
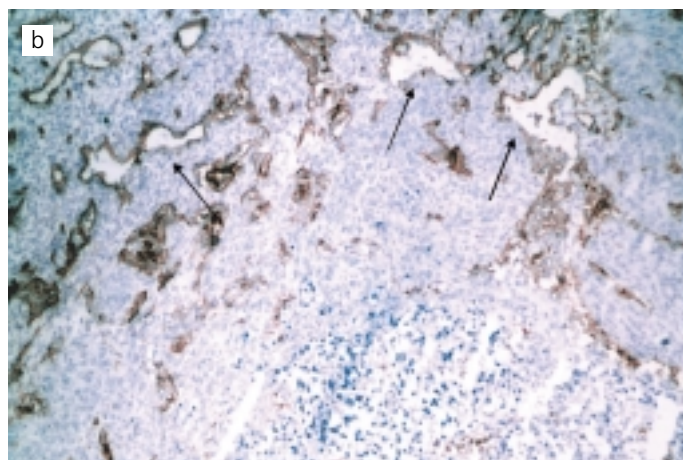
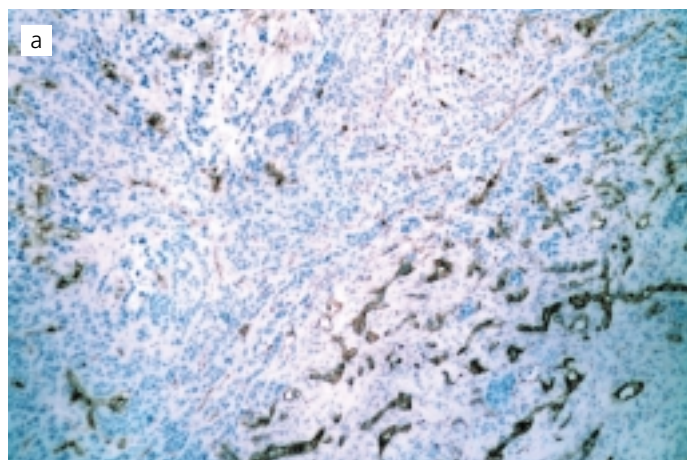
Az A431 tumorxenograftokban lévő mikropapillárisokat humán poliklonális anti-von Willebrand faktor antitesttel jelöltük paraffinba ágyazott metszeteken morfometriai vizsgálatok céljából. Korábbi eredményeink szerint (41) a rHuEPO α -kezelt A431 xenograftokban az intratumorális mikropapillárisok megnagyobbodtak, és az erek szabálytalan formát öltöttek (4a,b. ábra). A perici-

ta-borítás, melyet simaizomaktin-immunhisztokémiával mutattunk ki, diszkontinuussá vált a tumorasszociált erek körül (4c,d. ábra). Az átlagos pericita-borítás morfometriai analízise több mint 30%-os csökkenést ($p < 0,05$) jelzett. Összehasonlítva a kontroll tumorokkal, a sugárkezelés nagyobb érroncsolást végzett az élő tumorterületen belül a rHuEPO α -val kezelt állatokban (5a, b. ábra). Az abnormalis alakú, széttroncsolt tumorasszociált erek aránya több mint 50%-os volt a rHuEPO-kezelt és besugározott xenograftokban, szemben a kizárólag sugárkezelést kapott csoporttal, ahol ez 30%-nak adódott (5. ábra táblázata).

Diszkusszió

A hypoxia a szolid tumorok jellemzője, és független prognosztikus faktorként szerepel a kedvezőtlen sugárkezelés kimenetelében és a túlélésben (13). Daganatos betegek esetében gyakran alkalmaznak különböző rHuEPO-kat a csökkent hemoglobinszint javítására. Az anémia hagyományos tüneteinek és ennek következtében az életminőségnek a javítása mellett (22) egy újabb észszerű oka van a rHuEPO-k használatának: erősítik a sugár- és/vagy kemoterápia hatékonyságát

4. ábra. rHuEPO α -kezelés hatása a tumoros erekre A431 humán tumor xenograftban. Az ereket von Willebrand faktor elleni antitesttel jelöltük besugárzás előtt a kezeletlen (a) és az rHuEPO α -kezelt állatokban (b). Nyilak: nagyobb átmérőjű erek a rHuEPO α -kezelt tumorokban; 200x nagyítás. c, d. Immunofluoreszcens jelölés az erek pericita-borításának kimutatására (simaizomaktin, piros) a kezeletlen (c) és az rHuEPO α -kezelt állatokban (d) 22 napos xenograftokban (400x nagyítás). A folyamatos pericita-borítás megszakadt (nyilak) az rHuEPO α -kezelt A431 tumorokban.



(23). Sajnálatos módon azonban az rHuEPO-kezelések hatásairól szóló klinikai adatok ellentmondásosak. Számos pozitív eredmény (17, 37, 40) mellett az adatok egy jelentős része azt jelzi, hogy a kezelés kimenetelére a rHuEPO-knak kedvezőtlen hatása van (14, 21). Az ellentmondásosság egyik fő oka a tumorsejtek EPO-receptor-expressziója lehet. Egyes tumortípusok feltehetően EPO-t, valamint EPO-receptort is expresszálhatnak (1, 3), ezért ez a citokin-szignálrendszer esetleg felelőssé tehető a daganat növekedéséért (4, 45). Más vizsgálatok szerint a rHuEPO-kezelés nincs hatással a tumorsejtek proliferációjára vagy *in vivo* növekedésére még az EPOR-t expresszáló tumorsejtek esetében sem (19, 25).

In vitro és *in vivo* kísérleteinkben humán lapámrák-sejtvonal- (A431) és xenograft modellt használtunk. Ezek a daganatsejtek mRNS- és protein szinten is kifejezik az EPOR-t. Humán-ekvivalens dózisban (1 IU/ml, vagy 150 IU/kg intraperitoneálisan 3 alkalommal hetente) adva a rHuEPO α nem volt hatással a sejtproliferációra *in vitro* vagy a tumornövekedésre *in vivo*. A korábbiakban használt HT25 humán vastagbél-karcinóma sejtvonallal azonos eredményre jutottunk (41), alátámasztva mások adatait, miszerint nincs direkt összefüggés a tumorsejtekben meg lévő EPOR és a rHuEPO α adásánál néhány esetben tapasztalt fokozott proliferáció között (1, 4).

A klinikai és preklinikai adatok arra engednek következtetni, hogy az EPO-k pozitív hatással vannak valamennyi tumorsejt típus esetén a sugárkezelés hatékonyságára, mely a tumor fokozott oxigenizációjára vezethető vissza. Számos korábbi eredmény szerint a hemoglobinszintnek kulcsszerepe van a sikeres sugárterápiában (20, 32).

SCID egerekben az A431 tumorxenograftok növekedése során a hemoglobinszint csökkent a tumorhordozó állatokban, hasonlóan a humán

körülményekhez, a rHuEPO α adása humán-ekvivalens dózisban azonban megátolta ezt a csökkenést. A rHuEPO α -kezelés az A431 xenograftok felerősödött sugárérzékenységehez vezetett, és a csupán besugárzást kapott egerekhez képest szignifikánsan kisebb tumorméretet eredményezett. A rHuEPO α -kezelés jótékony hatása a sugárkezelésre *in vitro* is kimutatható volt. Az A431 sejtek *in vitro* rHuEPO α -kezelése befolyással volt a besugárzás hatására, amely független volt az oxigenizációtól. A rHuEPO α adása (1 IU/ml) kissé növelte a sugárkezelés (5 Gy) proliferációgátló hatását, szignifikánsan emelte az apoptotikus frakció mennyiségét és csökkentette az A431 sejtek kolóniaképző kapacitását a besugárzást követően. Ezeket a hatásokat *in vitro* kísérletekből ismertük meg, és részben magyarázhatják a rHuEPO és a sugárterápia additív hatását *in vivo*, amikor a csupán besugárzottakhoz képest kisebb tumorokat észleltünk.

Korábban eredményeink azt mutatták, hogy a rHuEPO α adásával preklinikai modellekben szignifikánsan nőtt a tumorasszociált erek proliferációs indexe, mely nagyobb intratumorális erekhez vezetett. A megnövekedett érfelszín javulást eredményezett a kemoterápiás szerek tumorsejtekhez történő szállításában és fokozta azok anti-tumorális hatásait (41). Korábbi tanulmányok azt sugallják, hogy a rHuEPO α adása javítja az oxigenizációt az élő tumortömegben, függetlenül a hemoglobinszinttől (5), így a tumor oxigenizáltsága növekedik a fokozott tumorperfúzióval.

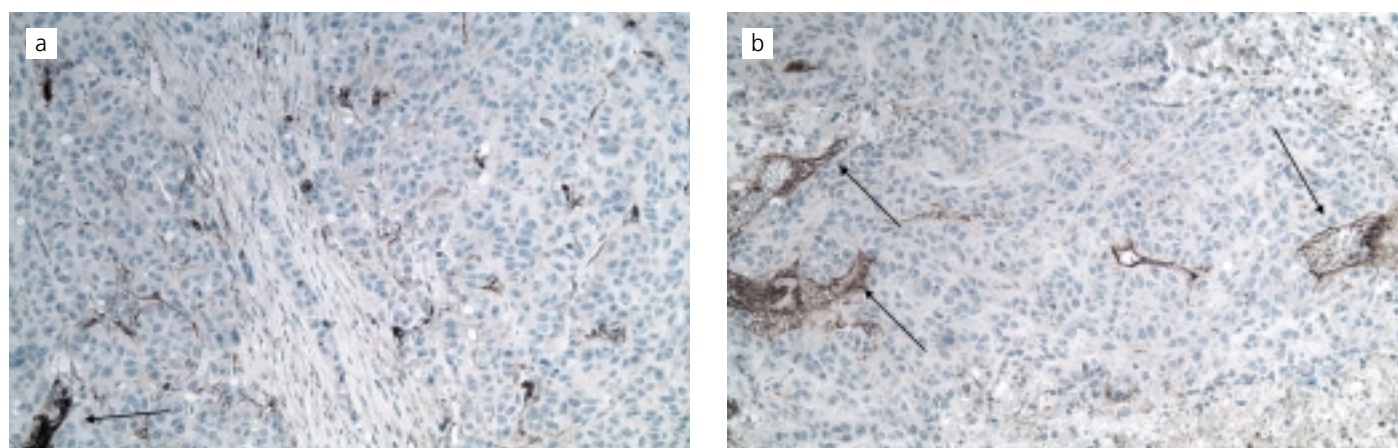
Jól ismert, hogy az endotheliális sejtek EPOR-t expresszálhatnak, és a rHuEPO befolyásolja a proliferációjukat, apoptózisukat és migrációjukat (2, 33). Sőt, a VEGF-hez hasonlóan a rHuEPO α is egy angiogenikus faktor (17). Ahogy azt korábban már leírták, a sugárkezelés tumorelles mechanizmusában kulcsfaktor az anti-angiogenikus ha-

5. ábra. rHuEPO α -kezelés és a besugárzás hatása a tumoros erekre A431 tumorxenograftban.

Az ereket von Willebrand faktor elleni antitesttel jelöltük besugárzás után a kezeltlen (a) és a rHuEPO α -kezelt állatokban (b).

Nyílak: roncsolt erek a besugárzás után (200x nagyítás). Táblázat: a roncsolt erek mennyiségi kiértékelésének eredménye;

* $p < 0,05$ a kontrollhoz, ** $p < 0,05$ az egyedüli besugárzáshoz viszonyítva



	Kontroll	rHuEPO α	Sugárkezelés	Sugárkezelés + rHuEPO α
A roncsolt erek százaléka	4,3 $\pm$ 0,3	6,6 $\pm$ 0,4	30,0 $\pm$ 8,7*	52,4 $\pm$ 8,8**

tás (24, 28). Jelen vizsgálatunkban bemutattuk, hogy a sugárkezelés nagy hatással van a tumorerekre. A rHuEPO α -kezelt állatokban az élő tumormasszában az erek kitágulnak, a kontrollhoz képest az átlagos érátmérő szignifikánsan megnő. Ezek az EPO-aktivált erek abnormális alakot vesznek föl, az endotheliális sejtek több rétegben helyezkednek el, míg a pericita-borítás diszkontinuussá válik. Kimutattuk, hogy a rHuEPO α -módosított erek nagyobb hatásfokkal roncsolódtak a besugárzás révén. Ez az eredmény alátámasztja mások munkáját, miszerint az exogén rHuEPO-k fokozzák az endotheliális sejtek sugárérzékenységét, növelve apoptózisukat (10, 30). Mások kimutatták, hogy a VEGF-receptor tirozinkináz-aktivitásának gátlása fokozza a besugarazott erek érzékenységét, mikor az erek perfúziója és a tumor oxigenizáltsága megnövekedik (15, 44, 46). Másrészt, jól ismert, hogy a VEGF-expresszió a HIF szabályozása alatt áll (6).

Korábban bemutattuk, hogy mind a gazdaszerkezet, mind a tumor VEGF-expressziója szignifikánsan csökkent a rHuEPO α -kezelt xenograftokban a kontrollhoz képest (41). Jelenlegi eredményeink azt jelzik, hogy a HIF-1 α felelős lehet a csökkent VEGF-expresszióért, miután a HIF-1 α génexpressziója szintén csökkent sugárterápia előtt a rHuEPO-kezelt állatokban. Néhány adat arra utal, hogy szoros korreláció van a HIF-1 α -expresszió és a tumorprogresszió között (16), és a HIF-1-regulált citokinek fokozzák az endothelsejtek sugárrezisztenciáját is (28). A besugarazást követő HIF-1-aktiváció gátlásával továbbá szignifikánsan nőtt a tumorok sugárérzékenysége az érpusztulás révén (28).

Korábbi, illetve jelen munkánkban bemutattuk, hogy a rHuEPO α , mint erős angiogenikus faktor, szignifikánsan távolabb ereket eredményezett az élő tumortömegben belül az endothelsejtek proliferációjának növelésével. Ugyanakkor a HIF-1 α expressziója csökkent, amely csökkent VEGF-expressziót okozott, és ez az endothelsejtek fokozott sugárérzékenységét eredményezte. Ezek a besugárzás előtti változások a tumor regressziójához vezettek a sugárkezeléssel kombinált terápiában.

Az eredmények arra utalnak, hogy a rHuEPO α -kezelés legalább kétféle hatással van a tumorokra: az egyik, hogy képes csökkenteni a hypoxiát, amely önmagában is kedvezőtlen jele a prognózisnak; a másik, hogy növeli az endotheliális sejtek proliferációját, ezzel javítja az erek sugárérzékenységét és a tumorszövet oxigénnel, illetve kemoterápiás szerekkel történő perfúzióját.

Preklinikai adataink megerősítik korábbi eredményeinket, miszerint a rHuEPO α hatása a tumorstromára módosítja a daganatok terápiás érzékenységét. A rHuEPO α -kezelés egyéb kiegészítő eljárásokkal (anti-angiogenezis, hypoxia-indukált génterápia (34), anti-HIF-1 α) kiegészítve hasznos lehet a hagyományos kemo- és/vagy sugárterápia hatékonyságának fokozására. Természetesen e kérdések megválaszolásához további preklinikai és klinikai vizsgálatok szükségesek.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondunk Parragné Derecskei Katalinnak és Sinka Andrásnének a kísérletek kivitelezésében nyújtott technikai segítségükért, valamint Dr. Ladányi Andreának a kézirat kritikus átanulmányozásáért.

Irodalom

1. Acs G, Acs P, Beckwith SM, et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer Res* 61:3561-3565, 2001
2. Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N, et al. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5978-5982, 1990
3. Arcasoy MO, Jiang X, Haroon ZA. Expression of erythropoietin receptor splice variants in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 307:999-1007, 2003
4. Batra S, Perelman N, Luck LR, et al. Pediatric tumor cells express erythropoietin and a functional erythropoietin receptor that promotes angiogenesis and tumor cell survival. *Lab Invest* 83:1477-1487, 2003
5. Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Snyder SA, et al. Human recombinant erythropoietin significantly improves tumor oxygenation independent of its effects on hemoglobin. *Cancer Res* 63:6162-6165, 2003
6. Blohmer JU, Wurschmidt U, Petry G. 6th interim analysis of a prospective, randomized, open and controlled AGO- and NOGGO-intergroup study: Sequential adjuvant chemo-radiotherapy with vs. without epoetin alfa for patients with high risk cervical cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 22:447, 2003
7. Bohlius J, Wilson J, Seidenfeld J, et al. Recombinant human erythropoietins and cancer patients: updated meta-analysis of 57 studies including 9353 patients. *J Natl Cancer Inst* 98: 708-714, 2006
8. Caro JJ, Salas M, Ward A, Goss G. Anemia as an independent prognostic factor for survival in patients with cancer. *Cancer* 91:2214-2221, 2001
9. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 23:4604-4613, 1996
10. Garcia-Baross M, Paris F, Cordon-Cardo C, et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* 300:1155-1159, 2003
11. Gorski DH, Beckett MA, Jaskowiak NT, et al. Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res* 59:3374-3378, 1999
12. Hall EH. Ed. *Radiobiology for the Radiologist*, 4th ed. Philadelphia, PA, Lippincott, 1994
13. Harris AL. Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2:38-47, 2002
14. Henke M, Laszing R, Rube C, et al. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 36:1255-1260, 2003
15. Huber PE, Bischof M, Jenne J, et al. Trimodal cancer treatment: beneficial effects of combined antiangiogenesis, radiation and chemotherapy. *Cancer Res* 65:3643-3655, 2005
16. Ishikawa H, Sakurai H, Hasegawa M, et al. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α predicts metastasis-free survival after radiation therapy alone in stage IIIB cervical squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 60:513-521, 2004
17. Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, et al. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res* 64:326-333, 2002
18. Kirkpatrick JP, Hardee ME, Snyder SA, et al. The effect of darbepoetin alfa on growth, oxygenation and radioresponsiveness of a breast adenocarcinoma. *Radiat Res* 165:192-201, 2006
19. LaMontagne KR, Butler J, Marshall DJ, et al. Recombinant epoetins do not stimulate tumor growth in erythro-

- poietin receptor-positive breast carcinoma models. *Mol Cancer Ther* 5:347-355, 2006
20. Laveys RS. Clinical trial experience using erythropoietin during radiation therapy. *Strahlenther Onkol* 174(Suppl 4):24-30, 1998
 21. Leyland-Jones B. Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly. *Lancet Oncol* 4:459-460, 2003
 22. Littlewood TJ, Nortier J, Rapoport B, et al. Epoetin alfa corrects anemia and improves quality of life in patients with hematologic malignancies receiving non-platinum chemotherapy. *Hematol Oncol* 21:169-180, 2003
 23. Littlewood TJ. The impact of hemoglobin levels on treatment outcomes in patients with cancer. *Semin Oncol* 28:49-53, 2001
 24. Lövey J, Lukits J, Remenár E, et al. Antiangiogenic effects of radiotherapy but not initial microvessel density predict survival in inoperable oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Strahlenther Onkol* 182:149-156, 2006
 25. Ludwig H. rHuEPO and treatment outcomes: the preclinical experience. *Oncologist* 9:48-54, 2004
 26. Marinaccio M, Mele E, Giotta F. Pretreatment normalization of mild anemia with epoetin alfa: impact on the outcome in epithelial ovarian cancer patients. *Proc Am Soc Clin Oncol* 22:486, 2003
 27. Mittelman M, Neumann D, Peled A, et al. Erythropoietin induces tumor regression and antitumor immune responses in murine myeloma models. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5181-5186, 2001
 28. Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell* 5:429-441, 2004
 29. Molls M, Stadler P, Becker A, et al. Relevance of oxygen in radiation oncology. Mechanism of action, correlation to low hemoglobin levels. *Strahlenther Onkol* 74(Suppl 4):13-16, 1998
 30. Paris F, Fuks Z, Kang A, et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 293:293-297, 2001
 31. Rades D, Tribius S, Yekebas EF, et al. Epoetin alfa improves survival after chemoradiation for stage III esophageal cancer: final results of a prospective observational study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 65:549-465, 2006
 32. Reichel O, Panzer M, Wimmer Ch, et al. Prognostic implications of hemoglobin levels before and after surgery as well as before and after radiotherapy for head and neck tumors. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 260:248-253, 2003
 33. Ribatti D, Marzullo A, Nico B, et al. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood* 93:2627-2636, 1999
 34. Scott SD, Greco O. Radiation and hypoxia inducible gene therapy system. *Cancer Metastasis Rev* 23:269-276, 2004
 35. Spivak JL. Recombinant human erythropoietin and the anemia of cancer. *Blood* 84:997-1004, 1994
 36. Stasi R, Amadori S, Littlewood TJ, et al. Management of cancer-related anemia with erythropoietic agents: doubts, certainties, and concerns. *Oncologist* 10:539-554, 2005
 37. Stüben G, Pöttgen C, Knuhmann K, et al. Erythropoietin restores the anaemia-induced reduction in radiosensitivity of experimental human tumors in nude mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 55:1358-1362, 2003
 38. Tchekmedyian NS. Anaemia in cancer patients: significance, epidemiology, and current therapy. *Oncology* 1:17-24, 2002
 39. Temkin SM, Hellmann M, Serur E, et al. Erythropoietin administration during primary treatment for locally advanced cervical carcinoma is associated with poor response to radiation. *Int J Gynecol Cancer* 16:1855-1861, 2006
 40. Thews O, Kelleher DK, Vaupel P. Erythropoietin restores the anemia-induced reduction in cyclophosphamide cytotoxicity in rat tumors. *Cancer Res* 61:1358-1361, 2001
 41. Tóvári J, Gilly R, Rásó E, et al. Recombinant human erythropoietin alpha targets intratumoral blood vessels improving chemotherapy in human xenograft models. *Cancer Res* 65:7186-7193, 2005
 42. Vaupel P, Kelleher DK, Höckel M. Oxygenation status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin Oncol* 28:29-35, 2001
 43. Vaupel P, Thews O, Höckel M. Treatment resistance of solid tumors. *Med Oncol* 18:243-259, 2001
 44. Winkler F, Kozin SV, Tong RT, et al. Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell* 6:553-563, 2004
 45. Yasuda Y, Musha T, Tanaka H, et al. Inhibition of erythropoietin signaling destroys xenografts of ovarian and uterine cancers in nude mice. *Br J Cancer* 84:836-843, 2001
 46. Zips D, Eichler W, Geyer P, et al. Enhanced susceptibility of irradiated tumor vessels to vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibition. *Cancer Res* 65:5374-5379, 2005