



Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomlarında Tümör Anjiogenezinin Prognostik Parametrelerle İlişkisi

The Relationship of Angiogenesis with Prognostic Factors in Non-small Cell Lung Cancers

Sevilay ÖZMEN, Cemal GÜNDOĞDU

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, ERZURUM

ÖZET

Amaç: Akciğer kanserleri her iki cinste ölüme yol açan kanserler içerisinde birinci sırada yer almasından dolayı en önemli sağlık sorunlarından birini oluşturmaktadır. Etiyolojisinde çevresel faktörler özellikle sigara içme önemli rol oynar. Son yıllarda ülkelerin yapmış olduğu karşı kampanyalar görülme sıklığı oranlarını aşağı çekmektedir. Buna rağmen akciğer kanserlerinde görülen bu yüksek ölüm hızı yeni prognostik belirteçlerin araştırılma gereksinimini artırmaktadır. Bu nedenle küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde anjiogenezde önemli rol oynayan COX-2, VEGF ve TGF β'nin bilinen prognostik faktörlerle ilişkisini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Olguları Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında 1995-2006 tarihleri arasında tanı almış 41 küçük hücreli dışı akciğer kanseri oluşturmaktadır. Klinikopatolojik veriler arşivden elde edildi. Ayrıca COX-2, VEGF ve TGF β immunreaktiviteyi stereolojik yöntemlerle belirlendi.

Bulgular: Olgular 30 rezeksiyon ve 11 biyopsi materyalinden oluşmaktadır. 39'u erkek 2'si kadın olup yaş ortalaması 57'dir. Histopatolojik tip olarak olgularımızın tamamı skuamöz hücreli karsinomlardan oluşmaktadır. COX-2 ve VEGF diferansiyasyon azalması ile paralel bir ilişki göstermektedir. TGF β immunreaktivitesi izlenmekle birlikte diferansiyasyon ile ilişki saptanmamıştır.

Sonuç: Önemli prognostik parametrelerden biri olan tümör diferansiyasyonu ile neoanjiogenezde rol oynayan COX-2 ve VEGF'ün pozitif korelasyonu olduğunu saptadık. TGF β ise tümör hücreleri immunreaktivite içermekle birlikte diferansiyasyonla ilişkisi saptanmadı. Tümör anjiogenezinin belirlenmesinin küçük hücreli dışı akciğer kanserleri için prognostik parametreler içerisinde yer alabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Sözcükler: Akciğer kanseri, Anjiogenez, COX-2, VEGF, TGF β

ABSTRACT

Aim: Lung cancer is one of the most important health problem being in the first line of cancer deaths in both sex. Enviromental factors, especially smoking, play an important role in etiology. In recent years, campaigns have reduced the incidence rates. However, high mortality rates in lung cancer necessiates investigation of new prognostic markers. Therefore, we aimed to investigate the relationship of COX-2, VEGF and TGF β with known prognostic factors, which play important role in angiogenesis in non-small cell lung cancer.

Materials and Methods: The cases constituted 41 non-small cell lung cancers diagnosed between 1995-2006 at Atatürk University Faculty of Medicine, Department of Pathology. Clinicopathologic data was obtained from the archival resords. In addition, COX-2, VEGF and TGF immunoreactivity were determined by stereological methods.

Results: Our cases consist of 30 resections and 11 biopsy materials from 40 male and one female patients with a mean age of 57. Our cases consist entirely of squamous cell carcinomas. COX-2 and VEGF showed a parallel relationship with decreased differentiation. TGF-β immunoreactivity was observed, but no correlation was found with differentiation.

Conclusion: Neo-angiogenesis markers COX-2 and VEGF Show a positive correlation with tumor differentiation. In contrast, TGF immunoreactivity is not correlated with differentiation. In conclusion, tumor angiogenesis may be an important prognostic parameter for non-small cell lung carcinomas.

Key Words: Lung cancer, Angiogenesis, COX-2, VEGF, TGF β

GİRİŞ

Dünyada, akciğer kanserleri her iki cinste de kansere bağlı ölümlerde ilk sırayı almaktadır. Akciğer kanserleri 1930 yılına kadar ender görülen kanser türü iken bu yıllardan sonra erkeklerde kansere bağlı ölümlerin en önemli nedenini oluşturmuştur. Kadınlarda ise 1960 yıllarında başlayan artış günümüzde de devam etmektedir (1, 2). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre tüm dünyada kanserler içerisinde görülme sıklığı açısından %13 oranı ile birinci sırada yer almaktadır (3). Türkiye Halk Sağlığı Kurumunun yayınlamış olduğu 2014 yılı kanser istatistiklerine göre %30 oranı ile akciğer kanserleri ilk sırada yer almaktadır. Aynı raporda akciğer kanserlerinin 2007 yılından sonra görülme sıklığında azalma başladığı saptanmıştır (4). Akciğer kanserlerinin görülme sıklığı yaşla birlikte artmaktadır. Erkeklerde 80, kadınlarda 70 yaşından sonra sıklık azalmaktadır. Tanı konulan olguların %5-10'u 50 yaşın altındadır (1).

Akciğer kanserlerinin oluşumunda sigara önemli bir risk faktördür. DSÖ'nün 2014 kanser raporuna göre akciğer kanseri; erkeklerde kanserden ölümlerde %23,6 oranı ile birinci sırada, kadınlarda ise meme kanserlerinden sonra %13,8 oranı ile ikinci sırada yer almaktadır (3). Kadınlarda son yıllarda görülme sıklığındaki artış sigara kullanım oranlarındaki artma ile ilişkilendirilmektedir (5).

Akciğer kanserleri kaynaklandığı hücrenin özelliğine bağlı olarak çeşitli yönde diferansiyasyon olabileceği gösterir. Temelde embriyolojik kök, prognoz ve tedavi protokolü göz önüne alındığında küçük hücreli ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri olarak iki gruba ayrılır. Bütün akciğer kanserlerinin %75-85'ini küçük hücreli dışı akciğer kanseri oluşturmaktadır (6). Akciğer kanserlerinde ilk sınıflama 1967 tarihinde yapılmış olup 2004 yılında moleküler belirteçler ön plana çıkarılarak kapsamlı bir sınıflama yapılmıştır. DSÖ'nün 2015 yılı sınıflamasında immunohistokimyasal değerlendirme temel alınmış olup adenokarsinomlarda farklı bir yaklaşım meydana gelmiştir. Büyük hücreli karsinomlar ve skuamöz hücreli karsinomlar yeniden sınıflandırılmıştır (7).

Genel olarak akciğer kanserlerinde 5 yıllık sağ kalım oranı %20'nin altındadır (8). Hastanın tedavisinin planlamasında ve seyrinin belirlenmesinde pek çok prognostik faktör üzerine çalışmalar yapılmıştır. Tanı alan olgularda prognozun belirlenmesinde histolojik tip ve evre çok önemli faktörlerdir (8, 9). Son yıllarda hedefe yönelik tedavilerin gelişmesi ile tedavi protokolünün belirlenmesinde rol oynayacak prediktif faktörlerin belirlenmesi gittikçe daha fazla önem kazanmıştır (10, 11). Bu belirteçlerden birisi de tümör anjiogenezidir (12).

Tümör anjiogenezis karsinogenezis progresyonunda önemli bir basamaktır. Kanserlin invazyon ve metastazında rol oynayan kompleks bir olaydır. Akciğer kanserlerinde anjiogenik aktivite gösteren çeşitli mediatörler ve büyüme faktörleri tanımlanmıştır (13). Bu faktörler içerisinde tümör hücreleri

tarafından salınan ve endotelial hücrelere spesifik mutajen olan VEGF, solid tümör büyümesinde damarlanmayı destekleyen COX2 ve anjiogenez uyarıcı TGF- β son yıllarda dikkati çekmektedir.

Biz, çalışmamızda küçük hücreli dışı akciğer kanseri tanısı almış olgularda anjiogenik aktivite gösteren COX-2, VEGF, TGF- β protein ekspresyonunu diğer prognostik parametreler ile karşılaştırarak tümör anjiogenezinin prognoz üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 1995-2006 yılları arasında küçük hücreli dışı akciğer karsinomu tanısı almış 41 olgu çalışmaya dahil edildi. Bu olguların 30'u rezeksiyon 11'i biyopsi materyallerinden oluşmaktaydı.

Olguların yaş, cinsiyet, rezeksiyon yapılmış olanlarda makroskopik tümöral çap, cerrahi sınır, lenf nodu durumu gibi klinikopatolojik veriler patoloji arşiv raporlarından elde edildi. Parafin bloklar ve lamalar arşivden alındı. Histopatolojik tanı birbirinden bağımsız iki patolog tarafından tekrar yorumlandı.

Parafin bloklardan immunohistokimyasal çalışma yapmak üzere yeniden 3'er kesit alındı ve TGF- β (Novacastra), COX-2 (Novacastra) ve VEGF (Zymed) immunohistokimyasal boyaları Dako Cytomation Autostainer Plus ile Strepto Avidin Biotin Complex (ABC) metodu kullanılarak otomatik olarak uygulandı.

Boyanmanın yoğunluğu hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olmak üzere üçe ayrıldı. Boyanma yaygınlığı ise, Leica DA 4000B stereolojik ışık mikroskobu aracılığı ile Micro Bright Field (MBF) programı ile yapıldı. Stereolojik metodlardan fiziksel parçalama metodu kullanıldı ve boyanan hücrelerin yoğunluğu yukarıda belirtilen program eşliğinde belirlendi.

Elde edilen veriler Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testleri kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi.

BULGULAR

Çalışmaya toplam 41 küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) tanılı olgu dahil edildi. Bunların 30'u rezeksiyon 11'i biyopsi materyali idi. Olguların 2'si kadın, 39'u erkek idi. Olgularımız 40-74 yaşlarında olup ortalama yaş 57 olarak tespit edildi.

Olguların tümü skuamöz hücreli karsinomlardan oluşmakta idi. Olguların diferansiyasyon, lenfovasküler invazyon, rezeksiyon uygulananlarda tümöral çap, metastaz içeren lenf nodu sayıları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Olgulara immunohistokimyasal olarak COX-2 (Şekil 1), VEGF (Şekil 2) ve TGF- β (Şekil 3) uygulandıktan sonra boyanma yoğunluğu ve yaygınlığı belirlendi. TGF- β pozitif olgularda boyama yaygınlığı MBF programı ile bilgisayar ortamında

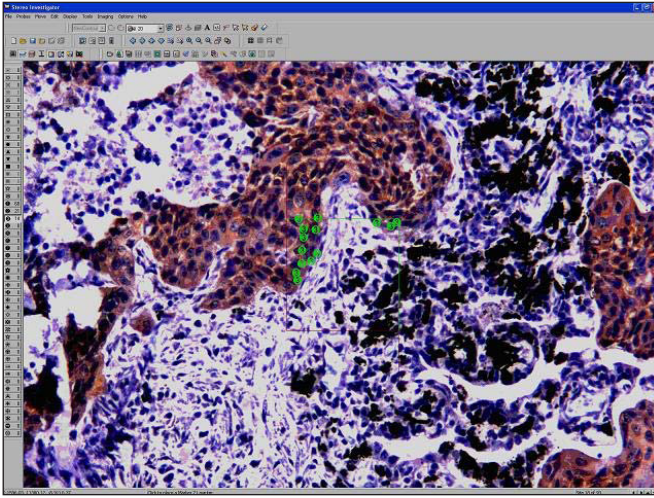
değerlendirildi, olgular sadece +1 olarak boyandı. Olguların diferansiyasyon ve immunoreaktivitelerine göre dağılımları grafiklerde gösterildi (Şekil 4-6).

İyi diferansiye olgularda COX-2 immunoreaktivitesine göre dağılımlarında tümörlü dokularda belirgin artma olup istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar ($p<0,05$) tespit edildi. Orta ve az diferansiye olgularda ise bu dağılımın daha anlamlı olduğu ($p<0,01$) belirlendi.

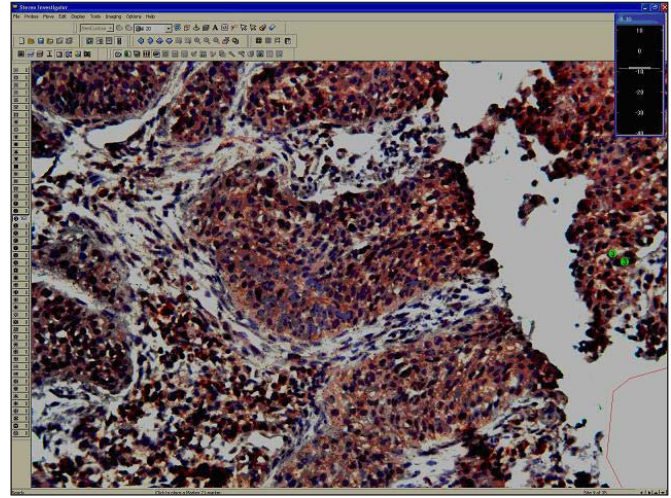
VEGF'de tümörlü dokularda belirgin artma olup iyi ve orta derece diferansiye tümörlerde bu artış anlamlı, az diferansiye tümörlerde anlamsız olduğu; TGF- β 'da ise tümörlü dokularda belirgin artma olup bu artış iyi diferansiye tümörlerde anlamsız, orta derece diferansiye tümörlerde çok anlamlı, az diferansiye tümörlerde ise anlamlı bir dağılım belirlendi.

Tablo I: Olguların klinikopatolojik özelliklere göre dağılımı

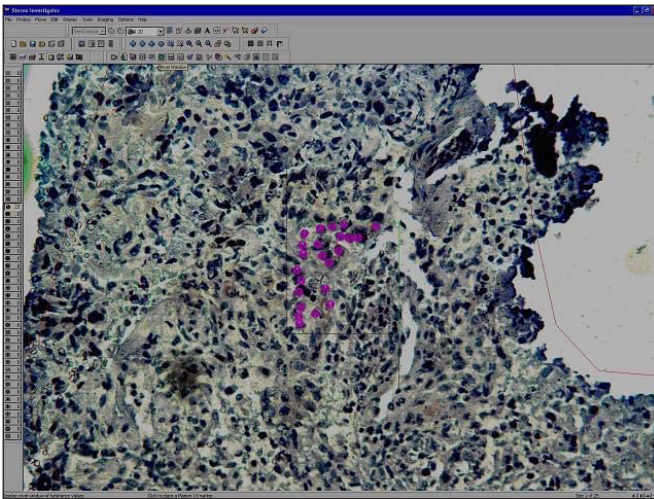
		Olgu sayısı	%
Diferansiyasyon	İyi	5	14,6
	Orta	25	58,5
	Az	11	26,8
Lenfovasküler invazyon		3	7,3
Tümöral çap (Rezeksiyonlarda)	0,1-2 cm	4	13,3
	2,1-4 cm	8	26,7
	4,1-6 cm	10	33,3
Tespit edilemeyen	6 cm üstü	5	16,7
	Tespit edilemeyen	3	10,0
Metastatik Lenf Nodu Sayısı		10	33,3



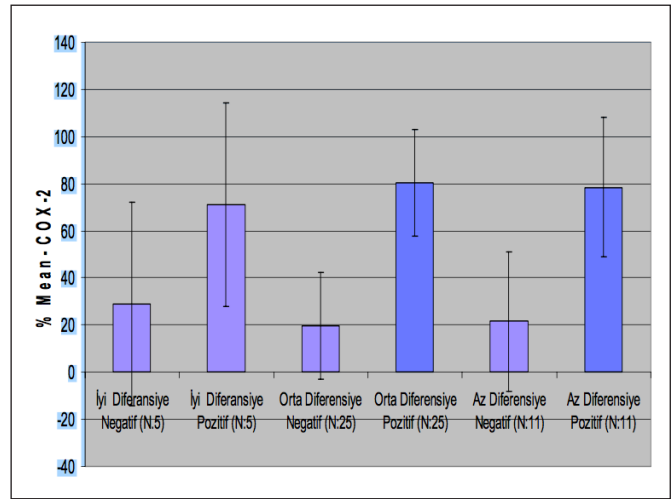
Şekil 1: Skuamöz hücreli karsinom tanılı bir olguda 3+ COX-2 immunoreaktivitesi.



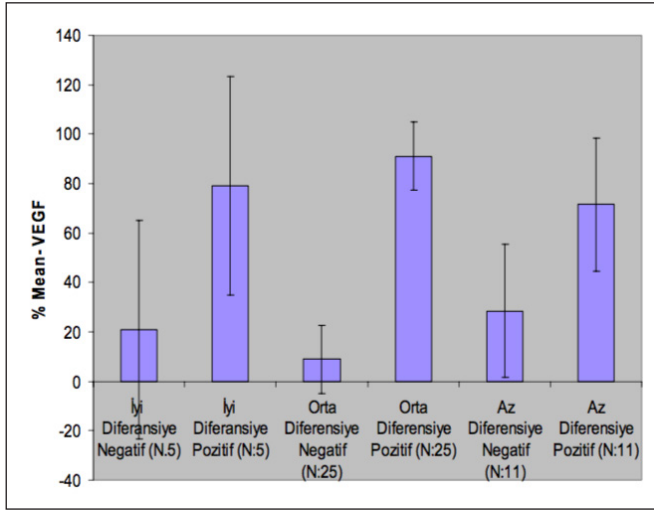
Şekil 2: Skuamöz hücreli karsinom tanılı bir olguda 3+ VEGF immunoreaktivitesi.



Şekil 3: Skuamöz hücreli karsinom tanılı bir olguda 1+ TGF- β immunoreaktivitesi.



Şekil 4: Tümör diferansiyasyonuna göre COX-2 immunoreaktivitesinin dağılımı.



Şekil 5: Tümör diferansiyasyonuna göre VEGF immunoreaktivitesinin dağılımı.

TARTIŞMA

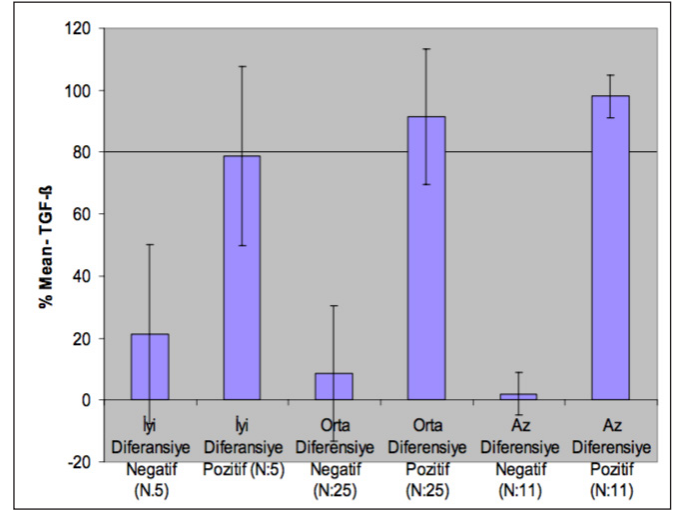
Akciğer kanserleri 20. yüzyılın başlarına kadar nadir görülen bir hastalık iken çevresel faktörlerin etkisi ile sıklığı artmıştır. Günümüzde ölüme yol açan kanserler içinde birinci sırada olması nedeniyle en önemli sağlık sorunlarından biri olmuştur (14). Olgularımız rastgele seçilmemiş olup Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 1995-2006 yılları arasında KHDAK tanısı almış 41 olgu ile kesitsel bir çalışma özelliğindedir.

Akciğer kanserlerinin oluşumunda çevresel faktörlerin rolü büyüktür. Bu faktörler içerisinde sigara içme ön plana çıkmakta, bu durum erkeklerde daha sık görülmesini de açıklamaktadır. Bizim olgularımızda da erkeklerde belirgin bir üstünlük bulunmaktadır. 1980 yılından itibaren kadınların sigara içme alışkanlığında artış ve sigara karşıtı kampanyalar erkek/kadın sıklık oranında azalmaya ve son bahsedilen çalışma ile de genel görülme sıklığında azalmaya yol açmıştır (15).

Genel literatür bilgilerine bakılınca akciğer kanserleri yaşla birlikte artış göstermekte ve 6-7. dekadlarda pik yapmaktadır. Çalışmamıza dahil olan olgularda yaş aralığı 40-70, ortalama yaş 57 olup mevcut literatür bilgileri ile uyumluluk göstermektedir (16).

Küçük hücreli olmayan primer akciğer kanserleri histopatolojik tipleri coğrafik farklılıklar içermektedir. ABD ve Japonya'da en sık görülen histopatolojik tip adenokarsinom iken ülkemizde ve Asya ülkelerinde skuamöz hücreli karsinomlar ilk sırayı almaktadır. Olgularımızın tamamı skuamöz hücreli karsinomlardan oluşmakta idi. Diğer histopatolojik tipler olmadığından literatür karşılaştırması yapılamadı (2).

Akciğer kanserleri dünyada kanserden ölümlerde birinci sırada yer almasıyla araştırmacıların üzerinde çalışmalarını



Şekil 6: Tümör diferansiyasyonuna göre TGF B immunoreaktivitesinin dağılımı.

yoğunlaştığı sorunlardan biri olmuştur. Çevresel faktörlerin önemli rol oynamasından dolayı azaltılabilir bir hastalık grubunu oluşturmaktadır (17-19).

Histopatolojik prognostik parametreler, tedavi metodunun belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Birçok çalışmada KHDAK'li hastalarda prognostik faktörler içerisinde evre ilk sırada yer almaktadır (20). Bununla birlikte eş evreli hastaların yaşam süreleri arasında önemli farklılıklar olduğu da bilinmektedir. Bu durum prognostik başka parametrelere gereksinim olduğunu göstermektedir. Son yıllarda tümör anjiogenezi ve bunun belirleyicileri olan COX-2, VEGF ve TGF-β ön plana çıkmaktadır (21-23).

Olgularımızda COX-2 immunreaktivitesinin orta ve az diferansiyasyon tümörlerinde iyi diferansiyasyon tümörlere göre daha yüksek yüzde içerdiğini saptadık. Hida ve ark.nın yapmış olduğu çalışmada Akciğer tümörlerinde COX-2 ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. Ancak artmış COX-2 ekspresyonu ile yaş, hastalık evresi, yıllık sigara tüketimi arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (24). Bazı çalışmalarda ise COX-2 ekspresyonunun özellikle adenokarsinomlarda %70 arttığı belirlenmiş, adenokarsinom prekürsör lezyonlarında ve küçük hücreli karsinomlarda ihmal edilebilecek seviyede düşük olduğu saptanmıştır (25-27). Berbander ve ark.nın 89 KHDAK olgusunda yapmış oldukları araştırmalarında yüksek COX-2 ekspresyonunun düşük sağ kalımla doğru orantılı olduğu bir korelasyon saptanmıştır (28). Marrogi ve ark.nın yapmış olduğu çalışmada COX-2 ekspresyonunun tümör hücreleri tarafından üretilen VEGF ile anjiogenezis üzerine etki ettiği ileri sürülmüştür (29).

Serimizde VEGF'nin orta derecede diferansiyasyon tümörlerinde az ya da iyi diferansiyasyon tümörlere göre daha yüksek immunoreaktivite gösterdiği belirlendi. O'Bryne ve ark.nın 223 opere KHDAK'li hastada yaptıkları immunohistokimyasal

araştırmada VEGF'nin anjiogeneziste rol oynadığı, mikrodamar yoğunluğu ile ilişkili olduğu ve sonuç olarak KHDAK'de prognostik öneme sahip olduğu belirtilmiştir (30). Aikawa ve ark. 112 KHDAK'lı hastayı içeren çalışmalarında erken evre hastalara göre ileri evre hastalarda VEGF ekspresyonunun yüksek olduğunu belirtmişlerdir (31). Fontanini ve ark.nın yapmış olduğu çalışmada ise VEGF ekspresyonu ile kötü prognoz arasında yakın bir ilişki gözlemlenmiştir (32).

Olgularımızda TGF- β immunoreaktivitesinin orta ve az diferansiye tümörlerde iyi diferansiye tümörlere göre daha yüksek yüzde içerdiğini saptadık. Pardelli ve ark.ı yapmış oldukları çalışmada TGF- β 'nin tümör anjiogenezisinde rol oynadığını göstermiştir (33). Jeon ve ark.nın yapmış olduğu çalışmada ise TGF β 'nin neoanjiogenezisi invaziv ve metastatik tümörlerde indüklediği gösterilmiştir (34).

Sonuç olarak tümör anjiogenezinin tümör progresyonunda önemli bir faktör olduğu gerçeğinden hareketle, anjiogenezin belirlenmesinde COX-2 ve VEGF'nin TGF β 'ya göre daha etkili faktörler olduğunu, tümör diferansiyasyonu azaldıkça bu faktörlerin ekspresyonlarında artış olduğunu öngörmekteyiz. Ancak çalışmanın, bu faktörlerle hastaların yaşam süreleri arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest Journal*. 2003;123(1_suppl):21S-49S.
2. Goksel T, Akkoclu A, Turkish Thoracic Society, Lung and Pleural Malignancies Study Group. Pattern of lung cancer in Turkey, 1994–1998. *Respiration*. 2002;69:207-10.
3. Stewart BW, Kleihues P. World cancer report/edited by Bernard W. Stewart and Paul Kleihues. World cancer report/edited by Bernard W Stewart and Paul Kleihues 2003.
4. Gültekin M, Boztaş G. Türkiye kanser istatistikleri. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. 2014;43.
5. Demirci E, Daloglu F, Gundogdu C, Calik M, Sipal S, Akgun M. Incidence and clinicopathologic features of primary lung cancer: a North-Eastern Anatolia region study in Turkey (2006-2012). *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;14:1989-93.
6. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008;58:71-96.
7. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JH, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB, Geisinger K, Hirsch FR, Ishikawa Y, Kerr KM, Noguchi M, Pelosi G, Powell CA, Tsao MS, Wistuba I; WHO Panel. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *J Thorac Oncol*. 2015;10:1243-60.
8. Hsieh C-P, Hsieh M-J, Wu C-F, Fu J-Y, Liu Y-H, Wu Y-C, Yang CT, Wu CY. Prognostic factors in non-small cell lung cancer patients who received neoadjuvant therapy and curative resection. *J Thorac Dis*. 2016;8:1477.
9. Berghmans T, Paesmans M, Sculier J-P. Prognostic factors in stage III non-small cell lung cancer: a review of conventional, metabolic and new biological variables. *Ther Adv Med Oncol*. 2011;1758834011401951.
10. Paesmans M. Prognostic and predictive factors for lung cancer. *Breathe*. 2012;9:112-21.
11. Gazdar AF, Schiller JH. Predictive and prognostic factors for non-small cell lung cancer--potholes in the road to the promised land. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(24):1810-1.
12. Grippi M E, Elisa JA, Fishman JA, Kotloff RM, Pack AI, Senior RM, Siegel MD (Eds). *Fishman's Textbook of Pulmonary Disease and Disorders*, 5th ed, USA: McGraw Hill Education; 2015.
13. Aikawa H, Takahashi H, Fujimura S, Sato M, Endo C, Sakurada A, Kondo T, Tanita T, Matsumura Y, Ono S, Saito Y, Sagawa M. Immunohistochemical study on tumor angiogenic factors in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*. 1998;19:4305-9.
14. Spiro SG, Porter JC. Lung cancer—where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:1166-96.
15. Çelik I, Engin K, Özyardımcı N. Akciğer kanserinde epidemiyoloji. Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar. Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd Şti Yayınları, İstanbul. 2001:50-6.
16. Radzikowska E, Roszkowski K, Gaz P. Lung cancer in patients under 50 years old. *Lung cancer*. 2001;33:203-11.
17. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest*. 2003;123:21S-49S.
18. Schottenfeld D. Etiology and epidemiology of lung cancer. *Lung cancer: principles and practice*. 2000.
19. Mulshine JL. Reducing lung cancer risk: early detection. *Chest*. 1999;116:493S-6S.
20. Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol*. 1969;26:235-302.
21. Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *New Eng J Med*. 1971;285:1182-6.
22. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science*. 1987;235:442-7.
23. Cheng T, Cao W, Wen R, Steinberg RH, LaVail MM. Prostaglandin E2 induces vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor mRNA expression in cultured rat Müller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:581-91.
24. Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, Muramatsu H, Kozaki K, Nakamura S, Ogawa M, Mitsudomi T, Sugiura T, Takahashi T. Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res*. 1998;58:3761-4.
25. Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, Ristimäki A. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res*. 1998;58:4997-5001.
26. Hastürk S, Kemp B, Kalapurakal SK, Kurie JM, Hong WK, Lee JS. Expression of cyclooxygenase1 and cyclooxygenase2 in bronchial epithelium and nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 2002;94:1023-31.

27. Hosomi Y, Yokose T, Hirose Y, Nakajima R, Nagai K, Nishiwaki Y, Ochiai A. Increased cyclooxygenase 2 (COX-2) expression occurs frequently in precursor lesions of human adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer*. 2000;30:73-81.
28. Brabender J, Park J, Metzger R, Schneider PM, Lord RV, Hölscher AH, Danenberg KD, Danenberg PV. Prognostic significance of cyclooxygenase 2 mRNA expression in non-small cell lung cancer. *Annals Surg*. 2002;235:440.
29. Marrogi AJ, Travis WD, Welsh JA, Khan MA, Rahim H, Tazelaar H, Pairolero P, Trastek V, Jett J, Caporaso NE, Liotta LA, Harris CC. Nitric oxide synthase, cyclooxygenase 2, and vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2000;6:4739-44.
30. O'byrne K, Koukourakis M, Giatromanolaki A, Cox G, Turley H, Steward W, Gatter K, Harris AL. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2000;82:1427.
31. Aikawa H, Takahashi H, Fujimura S, Sato M, Endo C, Sakurada A, Kondo T, Tanita T, Matsumura Y, Ono S, Saito Y, Sagawa M. Immunohistochemical study on tumor angiogenic factors in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*. 1999;19:4305-9.
32. Fontanini G, Vignati S, Boldrini L, Chine S, Silvestri V, Lucchi M, Mussi A, Angeletti CA, Bevilacqua G. Vascular endothelial growth factor is associated with neovascularization and influences progression of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1997;3:861-5.
33. Pardali E, ten Dijke P. Transforming growth factor-beta signaling and tumor angiogenesis. *Front Biosci*. 2009;14:4848-61.
34. Jeon H-S, Jen J. TGF- Signaling and the Role of Inhibitory Smads in Non-small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2010;5:417-9.