

ANGIOGENES – MARKÖR FÖR METASTASER

För att en cancer skall kunna växa och sätta metastaser krävs att den förvärvar förmågan att nybilda blodkärl. Nybildningen av blodkärl – angiogenes – kan man kvantifiera genom att räkna blodkärl i primärtumören – angiogenesindex.

Flera studier under de senaste åren har visat att angiogenesindex är en stark prognostisk markör för metastaser och cancerorsakad död vid solida tumörer som bröstcancer, prostatacancer, ventrikelcancer, malignt melanom och icke-småcellig lungcancer.

I framtiden kan PAD vid solida maligna tumörer komma att utöver tumörtyp, differentieringsgrad, stadium och uttryck av eventuella biokemiska markörer ange ett angiogenesindex, vilka sammantagna ger kliniker en möjlighet att värdera tumörens aggressivitet.

Nybildning av blodkärl är ett urgammelt system som hållits likartat genom djurserien. En väl fungerande angiogenes möjliggör placentation, fosterutveckling, tillväxt och sårkläckning och är således en fördel i det naturliga urvalet [1].

Men detta adelsmärke kan också bli en akilleshäla: flera studier har visat att en cancer förmår att tillväxa och sätta

metastaser först när den förvärvar förmågan att nybilda blodkärl. Tidigare trodde man att tumörcellerna hade metabolt utbyte med värdorganets befintliga mikrocirkulation; nu har det i djurexperimentella modeller visats att alla blodkärl i tumörer är nybildade [2].

En cancer in situ kan så förbli i flera månader (hos människan i flera år) till dess att den förvärvar förmågan att stimulera omgivningen till nybildning av blodkärl [3]. Först då blir canceren en invasiv, exponentiellt tillväxande och metastaserande tumör.

Tumören stimulerar direkt och indirekt via värdens makrofager den friska omgivande vävnaden till att nybilda blodkärl. De nybildade kärlen växer in i tumören.

Detta innebär för det första att extracellulära matrix och basalmembran luckras upp för att ge plats åt kärlnopparna, medan tumörcellerna kan »invadera» den uppluckrade vävnaden åt andra hållet.

För det andra innebär det att tumörcellerna kan tillväxa i takt med att ytan av utbyteskärl ökas.

För det tredje innebär blodkärlsnybildningen att tumörcellerna, som i sitt in situ-stadium var avaskulära, kommer nära nybildade blodkärl med ett ofullständigt endotelcellager, och därmed kan migrera ut till värdens centrala cirkulation.

En bröstcancer med en volym på en kubikcentimeter släpper ut ca 2 miljoner tumörceller per dygn i den centrala cirkulationen [4]. Lyckligtvis är det ytterligt få av dessa som klarar av att etablera en metastas!

Sovande mikrometastaser

Alla tumörceller i en cancer är inte angiogena. De icke-angiogena tumörcellerna »åker snålskjuts» på de angiogena och tillväxer därmed också när nya blodkärl växer in i tumören. Detta innebär i sin tur att de tumörceller som kommer ut i cirkulationen är av två huvudtyper; angiogena och icke-angiogena. De angiogena cellerna kan bilda metastaser som tidigt blir påvisbara kliniskt, medan de icke-angiogena metastaserna förblir »sovande» [5] till dess att de förvärvar den angiogena fenotypen. Detta

resonemang kan således förklara förekomsten av sena tumörrecidiv.

Angiogenesindex

En konsekvens av denna nya syn på blodkärlsnybildningens roll för tumörtillväxt och metastasering är att ju mer malign tumör, desto större borde dess förmåga till nybildning av blodkärl vara.

Den första kliniska studien som visade ett sådant samband gällde malignt melanom [6]. Därefter kunde Weidner och medarbetare 1991 i en retrospektiv studie av 49 kvinnor med bröstcancer visa att antalet blodkärl per mikroskopiskt synfält var signifikant högre i gruppen med metastaser (30 patienter) än utan (19 patienter) [7].

I en välgjord, prospektiv bröstcancerstudie omfattande 254 konsekutiva patienter utan lymfkörtelmetastaser vid diagnos var angiogenesindex även den starkaste prediktorn för överlevnad [8]. I denna studie var angiogenesindex en starkare prognostisk markör än lymfkärtsinvasion, östrogen- och progesteronreceptorstatus samt uttrycket av p53 och c-erbB-2.

I skrivande stund finns ett 60-tal studier över relationen mellan angiogenesindex och metastasrisken publicerade för bröstcancer och andra former av solida tumörer, exempelvis prostatacancer [9], ventrikelcancer [10] och cervixcancer [11] samt en översikt [12]. De flesta studierna har visat att angiogenesindex är en stark oberoende prediktor för metastasrisken.

Metodologiska synpunkter – hur? vad? och var?

Det finns även studier där man ej kunnat finna ett samband mellan angiogenesindex och prognos [13-15]. Dessa motstridiga resultat kan förmodligen förklaras av användandet av olika endotelcellsmarkörer, förstöringsgrad vid räknandet samt räknasätt [8, 16]. Beräkning av angiogenesindex är nämligen betydligt mer komplicerat än det vid första anblicken kan verka.

För det första – hur skall blodkärlen märkas? Idag används huvudsakligen fyra olika endotelcellsmarkörer vilka kan påvisas immunhistokemiskt på för-

Författare

ERIK SKÖLDENBERG
AT-läkare, doktorand

ROLF CHRISTOFFERSON
med dr, avdelningsläkare; barnkirurgiska sektionen, Akademiska barnsjukhuset, kirurgiska institutionen och anatomiska institutionen, Uppsala universitet.

malinfixerad, paraffinbäddad vävnad: faktor VIII-relaterat antigen (FVIII-*rag*), Ulex Europaeus Agglutinin-1 (UEA-1), CD31/PECAM och CD34 (Figur 1). Nybildade blodkärl uppvisar en heterogen antigenitet [17], och idag finns ingen morfologisk eller biokemisk markör som är patognomon för nybildade blodkärl.

Två möjliga kandidater är under utvärdering [17, 18]. Försök har gjorts att bestämma sensitivitet och specificitet för endotelcellsmarkörer i tumörblodkärl vid bröstcancer [19, 20]. Dock kan en annan tumörtyp uttrycka andra epitoper på sina endotelceller. Här finns således en uppenbar risk för såväl falskt positiva som falskt negativa kärl, vilket påverkar angiogenesindex. Sannolikt måste en optimal endotelcellsmarkör bestämmas för varje tumörtyp.

Vi har utvecklat en metod där vi seriesnittar tumören, färgar in med endotelcellsmarkörer och jämför med referenssnitt (Figur 2). Våra preliminära data för barnnjurcancer Wilms' tumör visar att faktor VIII-relaterat antigen har en sensitivitet på 68 procent, Ulex Europaeus Agglutinin-1 64 procent, CD31/PECAM 97 procent och CD34 98 procent.

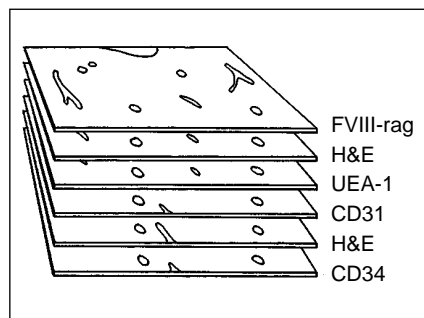
För det andra – vad skall räknas? I de flesta studierna anges att man räknat »mikrokärl» utan att definiera dessa. Det går ej att ange en maximal lumendiameter på kärl som skall räknas, då kärnen kollaberar vid immersionsfixering. Syftet med angiogenes är att öka ytan för metabol utbyte. Det borde innebära att endast kapillärer och postkapillära venoler (utbyteskärl) skall räknas, dvs kärl vars vägg endast består av en endotelcell och ett basalmembran. Även här finns således en risk att man räknar för många eller för få kärl.

För det tredje – var skall kärl räknas? De flesta studierna angivna ovan räknar antalet mikrokärl i det subjektivt kärltätaste området i tumören. Sannolikt är

Figur 1. Nybildade blodkärl i barnnjurcancer Wilms' tumör. Kärnlens endotelceller är inmärkt immunhistokemiskt med antikroppar mot ytantigenet CD34. Motfärgning med hematoxylin.

detta område karakteristiskt för tumören och speglar dess angiogena potential [2]. Det återstår dock att visa att det inte finns andra sätt att räkna som ger mindre spridning.

Är ett genomsnittligt värde ett bättre mått på tumörens angiogenes [21]? Nybildade blodkärl kommer ju från den juxtatumoral vävnaden – är kanske omgivande vävnads subjektivt trätätaste område ett känsligare mått på tumörens angiogenes? Eller den omgivande vävnadens genomsnittliga utbyteskärlstäthet? Det borde vara den till tumören omedelbart gränsande vävnaden som tvingas att svara på tumörens angiogena signaler. Sannolikt finns här ytterligare en orsak till att antalet kärl över- eller underskattas.



Figur 2. För kvantifiering av sensitivitet och specificitet hos fyra olika endotelcellsmarkörer vid Wilms' tumör har vi utvecklat en »sandwich» av 2 µm seriesnitt som märkts in enligt figuren. Varje markörsnitt ligger intill ett referenssnitt (H&E, hematoxylin och eosin) som tjänar som »facit». Endast tvärsnittade utbyteskärl som kan återfinnas i samtliga snitt används. Övriga förkortningar är: FVIII-*rag* = faktor VIII-relaterat antigen, UEA-1 = Ulex Europaeus Agglutinin-1, CD31, dvs platelet-endothelial cell adhesion molecule, CD34, dvs myeloid progenitor cell antigen.

Våra egna preliminära data för Wilms' tumör visar att för alla fyra olika räknemetoder är tätheten av utbyteskärl högst i gruppen som avlidit av sin tumör, men att det bara är tumörens subjektivt trätätaste område som ger signifikanta skillnader mellan grupperna överlevande och döda.

För det fjärde – hur skall kärl räknas? I de flesta studier räknas antalet inmärkt strukturer per synfält vid en viss förstoring. Det har föreslagits att automatiserad bildanalys [22] eller användande av okulär med räknepunkter [23] kan användas för att effektivisera och standardisera räknandet. Inom morfologin finns en hel vetenskap, stereologin, som har utarbetat en serie algoritmer för hur strukturer skall mätas på ett enkelt, effektivt och av observatören oberoende sätt [24]. Det är väl känt inom stereologin att räknandet av strukturer per synfält är tidskrävande, ineffektivt och observatörsberoende. Således finns även här en uppenbar risk att över- eller underskatta antalet kärl.

Vi utvecklar i samarbete med danska stereologer ett system för kvantifiering av angiogenesindex avsett att vara så enkelt att det kan användas av den kliniske patologen utan dyrbar utrustning.

Angiogenesindex behövs

Klinikerns bedömning av patientens tumörsjukdom baseras idag på ett antal väldokumenterade prognostiska faktorer som allmäntillstånd, ålder, kön, tumörtyp, differentieringsgrad, stadium samt uttryck eller bortfall av biokemiska och genetiska markörer. Till denna lista kan angiogenesindex komma att läggas, eftersom flera studier har visat att angiogenesindex ger prognostisk information om olika tumörers benägenhet att sätta metastaser. Ytterligare forskning krävs dock för att avgöra angiogenesindex kliniska betydelse.

För att patologen »på fältet» skall kunna ange ett angiogenesindex i sitt utlåtande, krävs att en metodik utarbetas med en sensitiv och specifik, kommersiellt tillgänglig endotelcellsmarkör och med ett enkelt, effektivt och observatörsberoende räknesätt.

Litteratur

1. Folkman J. Tumor angiogenesis. In: Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA, eds. The molecular basis of cancer. Philadelphia: WB Saunders Co, 1995: 206-32.
2. Folkman J, Hanahan D. Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. Princess Takamatsu Symp 1991; 22: 339-47.
3. Liotta LA, Saidel MG, Kleinerman J. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. Cancer Res 1976; 36: 889-94.
4. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: Balanced



- proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Medicine* 1995; 1: 149-53.
6. Srivastava A, Laidler P, Davies RP, Horgan K, Hughes LE. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study. *Am J Pathol* 1988; 133: 419-23.
 7. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8.
 8. Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, Maluta S, Dalla Palma P, Caffo O et al. Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1994; 12: 454-66.
 9. Wakui S, Furusato M, Itoh T, Sasaki H, Akiyama A, Kinoshita I et al. Tumour angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study. *J Pathol* 1992; 168: 257-62.
 10. Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Ogawa Y, Sawada T, Yamashita Y et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 1995; 13: 477-81.
 11. Wiggins DL, Granai CO, Steinhoff MM, Calabresi P. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1995; 56: 353-6.
 12. Gasparini G, Harris AL. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol* 1995; 13: 765-82.
 13. Busam KJ, Berwick M, Blessing K, Fandrey K, Kang S, Karaoli T et al. Tumor vascularity is not a prognostic factor for malignant melanoma of the skin. *Am J Pathol* 1995; 147: 1049-56.
 14. Kainz C, Speiser P, Wanner C, Obermair A, Tempfer C, Sliutz G et al. Prognostic value of tumour microvessel density in cancer of the uterine cervix stage IB to IIB. *Anticancer Res* 1995; 15: 1549-51.
 15. Dray TG, Hardin NJ, Sofferan RA. Angiogenesis as a prognostic marker in early head and neck cancer. *Ann Oto Rhinol Laryng* 1995; 104: 724-9.
 16. Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36: 169-80.
 17. Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N et al. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340: 1120-4.
 18. Barbareschi M, Gasparini G, Morelli L, Forti S, Dallapalma P. Novel methods for the determination of the angiogenic activity of human tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36: 181-92.
 19. Fox SB, Leek RD, Smith K, Hollyer J, Greenall M, Harris AL. Tumor angiogenesis in node-negative breast carcinomas: relationship with epidermal growth factor receptor, estrogen receptor, and survival. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 29: 109-16.
 20. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96: 379-94.

Fullständig referenslista kan erhållas från AT-läkare Erik Sköldenberg, Barnkirurgiska kliniken, Akademiska sjukhuset, 751 85 Uppsala.

»Källa till ungdom» inget för rutinbruk

Binjurebarkshormonet DHEA (dehydroepiandrosteron) har kommit i ro-pet i USA som en »källa till ungdom», men det finns inte underlag för att rekommendera DHEA som substitutionsbehandling för medelålders och äldre. Det vetenskapliga underlaget är alltför begränsat.

Epidemiologiska studier tyder på att låga serumhalter av DHEA har samband med ökad risk för hjärt-kärlsjukdom hos män och för bröstcancer hos kvinnor före menopaus.

Tre små dubbelblindstudier, där substansen testats mot placebo, antyder att DHEA kan öka bl a välbefinnandet, insulinkänsligheten och de naturliga dödscellernas aktivitet. Vid höga doser (100 mg) ökade emellertid halten av androgener i serum hos kvinnor i en av studierna så mycket att det fick oönska effekter.

Eftersom DHEA anses vara prekursor till både testosteron och östradiol kan ämnet påskynda utvecklingen av hormonberoende tumörer som bröstcancer och prostatacancer.

BMJ 1996; 312: 859-60.

Ibland osynlig inflammation vid »nödig» appendektomi

Åtskilliga operationer på grund av misstänkt blindtarmsinflammation betraktas i efterhand som onödiga därför att den histologiska undersökningen inte avslöjar några tecken på abnormiteter. En nyligen publicerad irländsk studie kanske kan vara till tröst för kirurger som är frustrerade av alla »nödiga» ingrepp.

Tre forskare undersökte blindtarmar som opererats bort på grund av misstanke om inflammation respektive av andra orsaker, i samband med elektiv buk-kirurgi. De fann att uttrycket av cytokinerna tumörnekrosfaktor alfa och interleukin-2, som tyder på inflammation, var kraftigt förhöjt inte endast i de preparat som histologen klassade som inflammierade utan också i 7 av 31 fall med histologiskt sett normala fynd.

Lancet 1996; 347: 1076-9.

Konkurrerande risker vid behandling av äldre

Eftersom äldre patienter ofta är utsatta för många konkurrerande risker, dvs flera sjukdomar som kan bli dödsorsaken, är den absoluta effekten av en

ny diagnos ofta ganska liten om man ser till förväntad livslängd. Den potentiella vinsten av en ny terapi är därför också ofta blygsam, medan riskerna ökar med åldern.

Även om läkare intuitivt gör sådana avvägningar kan det vara svårt att kvantifiera effekten av en behandling för ytterligare en diagnos, påpekar en kvintett amerikaner, vilka därför konstruerat en analysmodell som stöd för beslut. Med formler och kurvor visar de hur tungt olika effekter av behandling väger vid olika åldrar, hälsotillstånd och förväntad livslängd.

Deras slutsats av analysen är att de äldre bör be om endast de mest effektiva behandlingarna och vara villiga att riskera färre komplikationer av terapin än yngre patienter.

Ann Intern Med 1996; 124: 577-84.

Påverkas äldres hjärna av antihypertensiv terapi?

Många läkare är försiktiga med att behandla måttligt förhöjt blodtryck hos äldre av oro för att försämra deras hjärnfunktion, trots att studier tyder på att antihypertensiv terapi kan minska både sjuklighet och dödlighet.

Varken diuretika eller betablockerare tycks emellertid påverka den kognitiva förmågan måttligt med bl a inlärningstest efter 54 månaders behandling. Blodtrycksmedlen jämfördes med placebo i en brittisk multicenterstudie av mer än 2 500 patienter som var 65-74 år och som vid starten hade ett systoliskt tryck på 160-209 mm Hg och diastoliskt under 115 mm Hg.

BMJ 1996; 312: 793-4, 801-4.

Demens ger lågt blodtryck - eller är det tvärtom?

En studie inom Kungsholmenprojektet i Stockholm av 1 642 individer mellan 75 och 101 år visar att de ca 34 procent som hade relativt lågt blodtryck (under 140 mm Hg i systoliskt tryck och under 75 i diastoliskt) led av demens oftare än de som hade högre tryck. Sambandet gällde måttlig och svår demens, och det var starkast för dem som haft sjukdomen länge.

Forskarna tror att lågt blodtryck är en komplikation till demensprocessen, särskilt vid Alzheimers sjukdom. De anser det emellertid möjligt att lågt blodtryck kan predisponera en undergrupp för demensutveckling.

BMJ 1996; 312: 805-8.