

A mikrovaszkularizáltság prognosztikai jelentősége operált tüdőrák esetén

Szőke Tamás,¹ Klaus Kayser,² Jan-Dirk Baumhäkel,² Troján Imre,¹ Furák József,¹
Tiszlavicz László,³ Szluha Kornélia,⁴ Horváth Ákos⁴

¹Szegedi Tudományegyetem, Sebészeti Klinika, Szeged,

²Institute für Pathologie, Humboldt-Universität, Berlin,

³Szegedi Tudományegyetem, Patológiai Intézet, Szeged, ⁴Debreceni Egyetem, Sugárterápia Tanszék

Cél: A mikrovaszkularizáltság prognosztikai jelentőségének meghatározása operált tüdőtumoros esetekben. **Beteganyag és módszer:** 450, radikálisan operált tüdőtumoros beteg szövettani anyagából készített metszeteket VIII-as faktor-asszociált antigén elleni antitestekkel festettük. Számítógépes képezés során a vaszkularizáltság abszolút és relatív paramétereit, ill. szintaktikai struktúraanalízis segítségével az erek közelében elhelyezkedő tumorsejtek sűrűségét mértük. Az eredményeket összevetettük a TNM státussal, a szövettani típussal és a tumorvolumennel. **Eredmények:** A legtöbb paraméter fokozott vaszkularizációt jelzett a T2 és T4 stádiumokban, de csak a felületfrakció mutatott szignifikáns eltérést. A mikrovaszkularizáltság paraméterei nem különböztek statisztikailag lényegesen a különböző N-státusú esetek között, azonban a sejtsűrűség az érközeleli területeken fokozatosan emelkedett az előrehaladottabb formákban. A microcellularis carcinomás esetekben a vaszkularizáltság erősebb volt, mint a nem kissejtes tumoros esetekben, míg a sejtsűrűség alacsonyabb volt, a különbségek azonban statisztikailag nem bizonyultak szignifikánsnak. A vaszkularizáltság és a tumorok volumene között nem találtunk kapcsolatot. Az erektől számított 20 µm-es területen lévő tumorsejtek sűrűségének emelkedése szignifikánsan rosszabb túléléssel járt. Multivariancia-analízis során a 20 µm-en belül elhelyezkedő tumorsejtek sűrűsége a harmadik legerősebb prognosztikai faktornak bizonyult. **Következtetések:** Egyértelmű kapcsolat nem tudtunk kimutatni a vaszkularizáltság és a nyirokcsomó-metasztázisok megjelenése között. Az erek közelében elhelyezkedő tumorsejtek sűrűsége fontos prognosztikai faktor, mert az angiogenezis mellett a daganatsejtek migrációjának kvantitatív jellemzésére is alkalmas. *Magyar Onkológia 50:47–53, 2006*

Objective: The aim of our study was the determination of microvascularization and its prognostic significance in lung cancer patients. **Methods:** Histological sections were prepared from paraffin-embedded tissues removed from the peripheral part of the tumor of 450 radically operated non-small cell and small cell lung cancer patients. Immunohistochemical staining was performed with antibody against factor VIII-associated antigen. During computer imaging, the absolute and relative parameters of vascularization were determined, as was the density of tumor cells situated to the nearest neighboring vessels. The results were compared with TNM status, the cell type and survival. **Results:** T2 and T4 tumors demonstrated an enhanced vascularization, however, except for the surface fraction, statistically significant difference was not found. The microvascularization parameters did not differ significantly between tumors with different N status. In small cell lung cancer cases, the vascularization was stronger than in non-small cell lung cancer cases, while cell density was lower, however, these differences did not prove statistically significant. The survival rate decreased significantly with the increasing tumor cell density in the interval of 0-20 µm. **Conclusions:** A clear connection could not be demonstrated between vascularization and the appearance of lymph node metastases. The density of tumor cells measured in the direct vicinity of vessels proved an important prognostic factor. *Szőke T, Kayser K, Baumhäkel J-D, Troján I, Furák J, Tiszlavicz L, Szluha K, Horváth Á. Prognostic role of microvascularization in operated lung cancer. Hungarian Oncology 50:47–53, 2006*



Közlésre érkezett: 2005. május 27.
Elfogadva: 2006. február 2.

Levelezési cím: Dr. Szőke Tamás, Szegedi Tudományegyetem, Sebészeti Klinika,
6720 Szeged, Pécsi u. 4., Tel.: 62-545-844, Fax: 62-545-462, e-mail: szoketama@hotmail.com

A vizsgálatok a Verein zur Förderung des biologisch-technologischen Fortschritts in der Medizin e.V. alapítvány támogatásával történtek.

Bevezetés

A tüdőcarcinoma prognózisának meghatározását ma rutinszerűen a TNM rendszer alapján végezzük. Ugyanakkor még T1N0M0 stádium esetén is csak 70% körül van az 5 éves túlélés, tehát a radikális tumoreltávolítás után is minden harmadik betegnél kiújul a betegség (22). Számos olyan hisztopatológiai vagy molekuláris genetikai vizsgálat történt, amelynek célja a tumorterjedést befolyásoló tényezők vizsgálata, ezáltal a prognózis jobb meghatározása és új kezelési eljárások keresése (17).

A tumor növekedésének, terjedésének szempontjából igen fontos az új erek képződésének folyamata, az angiogenezis. A 2 mm-nél nagyobb tumorok növekedéséhez már szükség van új kapillárisokra, amelyeknek a szerkezete

eltér a normális erekétől: szabálytalanok, csavarodottak, simaizomelemeik hiányoznak, endothelbélésük és basalis membránjuk, amelyeket a tumorsejtek állandóan bontanak, elégtelen (3). Macchiarini és kollégái írták le először az angiogenezis prognosztikai hatását nem kisesejtes tüdőcarcinománál (16), és azóta több vizsgálat is megerősítette ezt (5, 10, 18, 20). Több tanulmányban igazolták az angiogenezis prognosztikai hatását különböző humán daganatoknál: emlő- (8, 30), prostata- (32), gyomor- (9, 28), vastagbél- (29), ovariumcarcinomák (7), és melanoma (26). Ugyanakkor nem minden esetben lehet összefüggést bizonyítani a tumor vaszkularizáltsága és a prognózis között (16).

Ugyancsak ellentmondó a tumor metasztatizálásának és az angiogenezisnek a kapcsolata: Slodkowska összefüggést talált a nyirokcsomó-metasztázisok megjelenése és a tüdőcarcinoma vaszkularizáltsága között (25), ugyanakkor más vizsgálat nem támasztotta alá ezt a megfigyelést (10, 15).

Korábbi vizsgálatainkban nem kisesejtes tüdőrákos esetekben nem tudtuk igazolni, hogy a mikrovaszkularizáció fokozódása rossz prognózisú lenne, viszont kimutattuk, hogy a mikroerek környezetében elhelyezkedő daganatsejtek sűrűsége korrelált a túléléssel (27). Jelen vizsgálataink célja az volt, hogy kvantitatív módon jellemezzük mind a nem kisesejtes, mind a kisesejtes tüdőtumorok vaszkularizáltságát, valamint összefüggést keressünk a radikálisan operált tüdőcarcinoma vaszkularizáltsága és a daganatok stádiuma, ill. a prognózis között.

Beteganyag és módszer

450 radikálisan operált tüdőrákos beteg szövettani anyagát dolgoztuk fel, akiknél 1990. január 1. és 1995. december 31. között történt műtét. 233 beteget a heidelbergi Thoraxklinik mellkassebészeti osztályán, 217 beteget pedig a Szegedi Tudományegyetem Sebészeti Klinikáján operáltak. A betegek statisztikai adatait (nem, szövettan, stádium) az 1. táblázat tartalmazza. A két központ beteganyagának paramétereit és a túlélés között nem találtunk szignifikáns különbséget, kivéve az életkort. Az utánkövetés átlagosan 48 hónap (2-122 hónap) volt.

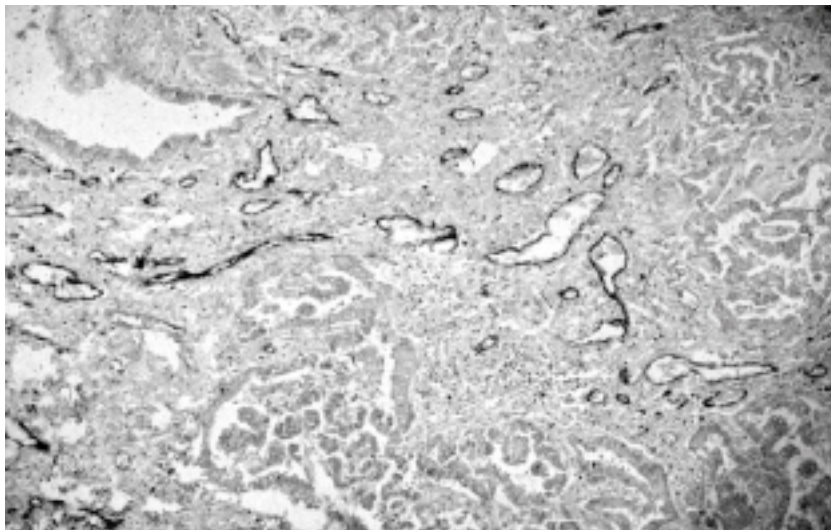
A tumor perifériás részéből vett és paraffinba ágyazott szövettani anyagból 4-5 µm vastag metszeteket készítettünk, és tripszines előemésztést követően kereskedelmi forgalomban kapható VIII-as faktor elleni ellenanyaggal (BioGenex, Burlingame, USA) immunhisztokémiai módszerrel megfestettük. Jelölőrendszerként alkalikus foszfatázzal konjugált streptavidint (BioGenex) használtunk. Ellenfestést végeztünk a tumorsejtek magjának megjelölésére. Pozitív és negatív kontrollmetszeteket használtunk.

A tumorereket mint a tumoros szövetben elhelyezkedő vérereket definiáltuk. Az elkészült metszeteket áttekintve 4 „normális” vasz-

1. táblázat.
A két klinika
beteganyagának
összehasonlítása

	Heidelberg	Szeged	Összes	p
Nem				
Férfi	190	176	366	0,866
Nő	43	41	84	
Átlagéletkor (év)	60,13±8,86	57±9,68	58,6±9,38	0,001
Szövettani típus				
Laphámcarcinoma	105	96	201	0,741
Adenocarcinoma	87	79	166	
Nagysejtes carcinoma	34	31	65	
Kissejtes carcinoma	7	11	18	
Stádium				
I/A	28	29	57	0,521
I/B	90	73	163	
II/A	4	2	6	
II/B	43	44	87	
III/A	66	63	129	
III/B	2	3	5	
IV	0	3	3	
Túlélés				
5 éves túlélés (%)	42,3	37,5		0,279
Medián túlélés (hónap)	45,9	40		

1. ábra. Tumorszövetben található mikroerek festése VIII-as faktor-asszociált antigén elleni antitesttel végzett immunhisztokémiai reakcióval (adenocarcinoma, eredeti nagyítás 224x)



kularizáltságú és 2 kifejezetten vaszkularizált területet („hotspot”) választottunk ki a morфомetriás mérések és szintaktikai struktúraanalízis számára (1. ábra).

A kiválasztott területeket 10x-es nagyítás mellett színes CCD kamerával (JVC TK1070) 512x512 pixeles felbontással digitalizáltuk. Saját készítésű képanalizáló szoftvert használtunk, amelynek alapja kereskedelmi forgalomban kapható Digital Image Analysing System (DIAS, University Jena). A kiválasztott erek morфомetriai vizsgálata alapján meghatároztuk a volumenfrakciót (erek kalkulált térfogata/tumorszövet kalkulált térfogata, Vv), amely az adott szövet érsűrűségét jellemzi, és a felületfrakciót (erek kalkulált felszíne/tumorszövet kalkulált térfogata, Sv), amely a szöveti oxigénellátás intenzitására utal. Az abszolút értékek közül a legkisebb érátmérőt, az átlagos érkerületet és az érfelületet mértük. Szintaktikai struktúraanalízissel – amelynek elméleti háttérét és kivitelezését korábban már ismertettük – meghatároztuk a tumorsejtek eloszlását a hozzájuk legközelebb eső szomszédos ér környezetében (5). Az adatok statisztikai feldolgozását chi-négyzet-próbával, ANOVA-val, Kendall-féle korrelációs számítással végeztük. Túlélésszámításhoz a Kaplan-Meier-módszert és Cox regressziós analízist használtuk, az előbbi metodikánál a szignifikanciát log-rank módszerrel állapítottuk meg. Statisztikai feldolgozáshoz az SPSS 11.0 (SPSS Corp., Chicago, USA) programot használtuk.

Eredmények

Morfometriai eredmények (2. táblázat)

N-STÁTUS ALAPJÁN

A vaszkularizációs paraméterek nem mutattak egyértelmű összefüggést a különböző szintű nyirokcsomóáttétek jelenlétével. Az N0 daganatoknál az abszolút jellemzők (legkisebb érátmérő, az átlagos érkerület és érterület) vala-

mivel nagyobbak voltak, mint a hilusi vagy mediasztinális nyirokcsomó-metasztázisok esetén, míg a relatív adatok (volumenfrakció, felületfrakció) az N2 metasztázisok esetén voltak a legnagyobbak. Statisztikailag azonban az N0, N1 és N2 esetek nem mutattak szignifikáns eltérést egymástól. Az N3 esetek adatait a kis elemszám miatt a szignifikanciaszámítás során nem vettük figyelembe.

T-STÁTUS ALAPJÁN

A látóterenkénti érszám kivételével minden vizsgált adat a T2 tumoroknál nagyobb volt, mint a T1-es daganatoknál, de meghaladták a T3-as tumoroknál mért értékeket is. A felületfrakciónál jelentősebb eltérés mutatkozott a csoportok között ($p=0,022$).

A legerősebb vaszkularizációt a T4-es tumoroknál észleltük, de a többi csoporthoz viszonyított kis esetszám miatt ez inkább csak tájékoztató jellegű, és a szignifikanciaszámításnál – hasonlóan az N3-as esetekhez – ezt a csoportot kihagytuk.

SZÖVETTANI TÍPUS ALAPJÁN

A nem kissejtes carcinomákon belül érmorfológiai paramétereket tekintve nem találtunk lényeges különbséget a különböző szövettani típusok között. A kissejtes carcinomás eseteknél a legtöbb paraméter (felület- és volumenfrakció, az átlagos érkerület és érfelület) nagyobb volt, mint a nem kissejtes esetekben, de nem különbözött szignifikánsan az NSCLC esetektől.

Szintaktikai struktúraanalízis eredményei (3. táblázat)

N-STÁTUS ALAPJÁN

Az előrehaladottabb N stádiumokban a sejtsűrűség fokozatosan emelkedett minden egyes távolságtartományban. A morфомetriai adatokhoz hasonlóan a kis elemszám miatt itt sem vettük figyelembe az N3, ill. a következő pontban a T4 eseteket.

2. táblázat.

Összefüggés a pT, pN klasszifikáció, valamint a szövettani típus és a mikovaszkularizáltság kvantitatív morfológiai jellemzői között tüdőrákban (átlag $\pm$ SD)

	N	Kötőszövet térfogata (%)	Felület- frakció (%)	Volumen- frakció (%)	Legkisebb érátmérő (μ m)	Átlagos érkerület (μ m)	Átlagos érfelület (μ m ²)	Érszám
pN0	247	31,680 $\pm$ 42,4	6,81 $\pm$ 5,06	5,14 $\pm$ 2,05	19,44 $\pm$ 8,43	113,57 $\pm$ 44,32	1915,5 $\pm$ 2518,38	52,75 $\pm$ 21,63
pN1	113	36,83 $\pm$ 51,68	6,31 $\pm$ 3,76	5,03 $\pm$ 1,63	17,87 $\pm$ 6,19	105,38 $\pm$ 32,66	1629,58 $\pm$ 1315,5	55,46 $\pm$ 23,29
pN2	88	27,5 $\pm$ 29,35	7,11 $\pm$ 4,85	5,25 $\pm$ 1,85	18,22 $\pm$ 7,03	111,47 $\pm$ 41,74	1863,59 $\pm$ 2142,21	56,64 $\pm$ 25,44
pN3	2	19 $\pm$ 1,41	9,75 $\pm$ 5,58	7,5 $\pm$ 0,7	19 $\pm$ 16,97	107,5 $\pm$ 82,73	1825,5 $\pm$ 1918,38	101 $\pm$ 69,29
		p=0,3	p=0,465	p=0,731	p=0,143	p=0,224	p=0,497	p=0,311
pT1	70	28,57 $\pm$ 35,81	5,82 $\pm$ 3,45	5,14 $\pm$ 2,25	18,3 $\pm$ 5,36	104,75 $\pm$ 28,61	1457,98 $\pm$ 931,26	55,65 $\pm$ 25,99
pT2	276	33,41 $\pm$ 45,25	7,22 $\pm$ 5,24	5,25 $\pm$ 1,92	19,3 $\pm$ 8,46	114,69 $\pm$ 45,8	2003,74 $\pm$ 2528,37	54,32 $\pm$ 22,99
pT3	100	31,63 $\pm$ 41,09	6,06 $\pm$ 3,83	4,79 $\pm$ 1,58	17,67 $\pm$ 6,7	105,62 $\pm$ 37,36	1637,19 $\pm$ 1468,76	52,71 $\pm$ 20,28
pT4	4	15,25 $\pm$ 2,99	8,35 $\pm$ 2,72	7 $\pm$ 1,63	20 $\pm$ 9,02	108,75 $\pm$ 40,24	1531 $\pm$ 710,75	81,75 $\pm$ 46,94
		p=0,693	p=0,022	p=0,116	p=0,149	p=0,069	p=0,095	p=0,700
Laphámcc.	201	32,96 $\pm$ 42,81	6,76 $\pm$ 4,35	5,2 $\pm$ 1,68	18,91 $\pm$ 7,8	110,01 $\pm$ 38,87	1765,61 $\pm$ 1611,36	55,47 $\pm$ 22,8
Adenocc.	166	32,63 $\pm$ 45,65	6,62 $\pm$ 5,05	5,07 $\pm$ 1,99	18,59 $\pm$ 7,78	110,33 $\pm$ 45,12	1873,31 $\pm$ 2799,48	53,81 $\pm$ 23,46
Nagysejtes cc.	65	28,78 $\pm$ 39,77	6,85 $\pm$ 4,97	5,12 $\pm$ 2,34	19,04 $\pm$ 7,79	113,93 $\pm$ 40,87	1869,06 $\pm$ 1568,79	53,15 $\pm$ 24,88
Kissejtes cc.	18	29,56 $\pm$ 22,58	7,62 $\pm$ 5,11	5,33 $\pm$ 2,22	18,83 $\pm$ 5,77	119,5 $\pm$ 48,11	2088,22 $\pm$ 2204,63	52,72 $\pm$ 21,49
		p=0,906	p=0,856	p=0,895	p=0,973	p=0,751	p=0,912	p=0,847

	N	Sejtsűrűség < 20 μm	Sejtsűrűség 20-40 μm	Sejtsűrűség 40-60 μm	Sejtsűrűség 60-80 μm	Sejtsűrűség > 80 μm
pN0	247	14,94 $\pm$ 18,36	17,66 $\pm$ 32,93	18,81 $\pm$ 48,14	14,87 $\pm$ 44,77	45,76 $\pm$ 12,79
pN1	113	16,04 $\pm$ 25,25	18,45 $\pm$ 32,07	19,02 $\pm$ 37,81	15,58 $\pm$ 40,26	46,03 $\pm$ 12,03
pN2	88	17,79 $\pm$ 30,14	21,4 $\pm$ 40,28	21,66 $\pm$ 42,35	15,78 $\pm$ 29,35	44,15 $\pm$ 12,77
pN3	2	17,5 $\pm$ 2,12	22,5 $\pm$ 2,12	27 $\pm$ 4,24	22,5 $\pm$ 6,36	29,5 $\pm$ 6,36
		p=0,599	p=0,680	p=0,871	p=0,979	p=0,516
pT1	70	13,3 $\pm$ 6,75	14,97 $\pm$ 8,44	15,11 $\pm$ 10,22	11,48 $\pm$ 9,55	47,37 $\pm$ 13,78
pT2	276	17,52 $\pm$ 28,74	21,15 $\pm$ 43,18	22,54 $\pm$ 56,2	18,02 $\pm$ 51,7	44,44 $\pm$ 12,63
pT3	100	12,7 $\pm$ 3,6	14,09 $\pm$ 4,96	13,9 $\pm$ 6,04	10,16 $\pm$ 4,96	47,18 $\pm$ 11,43
pT4	4	16,5 $\pm$ 7,32	19,75 $\pm$ 10,4	21,25 $\pm$ 12,63	18 $\pm$ 12,02	37 $\pm$ 11,34
		p=0,120	p=0,132	p=0,171	p=0,184	p=0,073
Laphámcc.	201	15,40 $\pm$ 21,15	17,58 $\pm$ 25,81	17,98 $\pm$ 29,91	14,16 $\pm$ 31,3	44,93 $\pm$ 12,01
Adenocc.	166	17,04 $\pm$ 28,97	21,06 $\pm$ 47,99	22,71 $\pm$ 64,8	17,82 $\pm$ 57,48	45,72 $\pm$ 13,31
Nagysejtes cc.	65	14,52 $\pm$ 9,12	16,67 $\pm$ 11,87	17,09 $\pm$ 13,72	13,26 $\pm$ 12,43	46,57 $\pm$ 13,12
Kissejtes cc.	18	13,05 $\pm$ 2,88	14,55 $\pm$ 3,71	14,38 $\pm$ 4,46	11,05 $\pm$ 4,88	44,61 $\pm$ 11,37
		p=0,599	p=0,680	p=0,870	p=0,979	p=0,516

3. táblázat.

A mikroerek környezetében mért tumorsejtsűrűség (tumorsejt/ μm^2) összefüggése a pT, pN klasszifikációval és a szövettani típussal tüdőrákban

T-STÁTUS ALAPJÁN

A tumorsejtek sűrűsége az érközei területeken a T2 és T4 tumoroknál nagyobb volt, mint a T1 és T3 tumoroknál. Ezek az eredmények hasonló tendenciát mutattak, mint a morfológiai paraméterek.

SZÖVETTANI TÍPUS ALAPJÁN

A különböző szövettani típusok közül az adenocarcinomáknál mértük a legnagyobb sejtsűrűséget. A laphámcarcinomák és a nagysejtes carcinomák esetén a sejtsűrűség hasonló volt. A

kissejtes tüdőrákoknál a sejtsűrűség minden távolságtartományon belül kisebb volt, mint a többi szövettani típusnál, a különbségek azonban statisztikailag nem bizonyultak szignifikánsnak.

Túlélési eredmények

Multivariancia-analízis során a TNM stádium, a tumorvolumen, a morfológiai paraméterek és a szintaktikai struktúraanalízis eredményeinek összefüggését vizsgáltuk a túléléssel. A nyirokcsomó-metasztázisok megjelenése rontotta legjobban a prognózist ($p < 0,001$). A túlélést erősen befolyásolta a szövettani típus is ($p = 0,002$). Az értől 20 μm -en belüli sejtek sűrűségének növekedése szignifikánsan csökkentette a túlélést ($p = 0,02$). Ezzel szemben a 20 és 40 μm -en belül elhelyezkedő sejtek sűrűségének növekedése jobb prognózissal járt ($p = 0,046$). A morfológiai paraméterek nem befolyásolták szignifikánsan a túlélést és nem találtunk kapcsolatot a tumor térfogata és a túlélés között sem (4. táblázat).

Összefüggés a 20 μm -en belüli és 20-40 μm közötti tumorsejtsűrűség között

Az összes beteg adatait figyelembe véve, a 20 μm -en belüli és 20-40 μm közötti tumorsejtsűrűség igen erős pozitív korrelációt mutatott, tehát a 20 μm -en belüli sejtsűrűség emelkedése együtt járt a következő terület sejtsűrűségének növekedésével ($r = 0,963$, $p < 0,001$). Hasonlóan szoros kapcsolat mutatható ki a nem kissejtes csoporton belül ($r = 0,962$, $p < 0,001$).

A mikrovaskularizációs paraméterek felhasználása a tüdőrák prognózisának meghatározásában

Azokban az esetekben, ahol a tumorsejtek sűrűsége nem haladta meg a 8 sejt/ μm^2 értéket az értől mért 0-20 μm területen belül, a túlélés szignifikánsan jobbnak bizonyult, mint az

4. táblázat. Radikálisan operált tüdőtumoros betegek többváltozós túlélésvizsgálata mikrovaskularizációs jellemzők bevonásával

	Halál relatív kockázata	p	95%-os konfidencia-intervallum
Szövettan		0,002	
Laphámcc. vs. adenocc.	1,43	0,008	1,10-1,88
Laphámcc. vs. nagysejtes cc.	1,48	0,028	1,04-2,07
Laphámcc. vs. kissejtes cc.	2,51	0,001	1,45-4,34
pT		0,47	
T1 vs. T2	1,38	0,088	0,95-1,99
T1 vs. T3	1,75	0,014	1,12-2,72
pN		<0,001	
N0 vs. N1	1,43	0,015	1,07-1,93
N0 vs. N2	2,36	<0,001	1,74-3,20
Kötőszövet térfogata	1,00	0,642	0,99-1,00
Felületfrakció	1,00	0,956	0,99-1,00
Volumenfrakció	1,06	0,587	0,85-1,32
Legkisebb érátérő	0,99	0,560	0,95-1,02
Átlagos érkerület	0,97	0,484	0,98-1,00
Átlagos érterület	1,00	0,305	1,00-1,00
Sejtsűrűség < 20 μm	1,05	0,020	1,01-1,09
Sejtsűrűség 20-40 μm	0,93	0,046	0,86-0,99
Sejtsűrűség 40-60 μm	1,05	0,108	0,99-1,10
Sejtsűrűség 60-80 μm	0,99	0,353	0,96-1,01
Sejtsűrűség > 80 μm	0,99	0,777	0,98-1,01
Érszám	0,99	0,308	0,97-1,00
Tumor térfogata	1,00	0,104	1,00-1,00

ennél nagyobb sejtsűrűség esetén ($p=0,048$) (2. ábra). A 20 és 40 μm közötti területen mért sejtdenzitás esetén hasonló „cut-off” pont meghatározása sikertelen volt.

Megbeszélés

A tumorok növekedéséhez megfelelő tápanyag- és oxigénellátásra van szükség. Az ehhez szükséges erek lehetnek a gazdaszervezet saját erei és lehetnek a tumorsejtek által termelt angiogenetikus faktorok hatására képződött új erek, amelyek a kapillárisok és a venulák endothelsejtjeinek növekedéséből keletkeznek (23). Az endothelsejtoszlopok egymással kapcsolatba lépve hurkokat formálnak, amelyekben lumen képződik, lehetővé téve a véráramlást. A tumorsejtek hatására a proliferáló kapillárisok bazális membránja sérül, fragmentálódik, és így lehetővé válik, hogy a migráló tumorsejtek a legkisebb ellenállás irányába vándorolva bejussanak a vérkeringésbe (6).

Vizsgálatainkban a morфомetriai mérések és szintaktikai struktúraanalízis eredményeit hasonlítottuk össze a klasszikus prognosztikai faktorok (pT, pN, szövettan) egyes csoportjai között, valamint összefüggést kerestünk a vaszkularizációt jellemző értékek és a túlélés között. Célunk az volt, hogy olyan paramétereket találjunk, amelyek a hagyományos prognosztikai tényezők mellett a betegség kimenetelének pontosabb meghatározásában, ezáltal a multimodális kezelés tervezésében segítenek. Ezek a jellemzők más paraméterekkel kombinálva részei lehetnek egy molekuláris substaging rendszernek (5).

Az ereket olyan struktúráként definiáltuk, amelyek pozitívan festődtek a VIII-as faktor elleni antitestekkel. Nem vizsgáltuk, hogy a tumoros területen található érstruktúrák az angiogenezis során képződött új erek vagy a normális tüdőszövetben már korábban is meglévő, de a daganat által körbevett erek. A mikrovaszkularizáltság vizsgálata során szükségünk van kvantitatív jellemzőkre, amelyek a vaszkularizáltság fokról tájékoztatnak. A leggyakrabban használt adat a látóterenkénti mikroérszám. Több közleményben a mikroérszám növekedése negatív prognosztikai faktornak bizonyult tüdőrákban (15, 20). Ugyanakkor Mattern és mtsai azt tapasztalták 87 lapáthamarcinomás eset feldolgozása során, hogy a túlélés és a mikroerek száma között nincs kapcsolat (19). A többváltozós elemzés során mi sem tudtuk bizonyítani a túlélés és a mikroerek számának kapcsolatát.

Vizsgálataink során ezért az érszám mellett több morфомetriai paramétert mértünk: az abszolút vaszkuláris jellemzők közül a legkisebb érátmérőt, átlagos érkerületet, átlagos érfelületet, a sztereológiai adatok közül pedig a mikroerek felületének, ill. térfogatának a tumor nagyságához való arányát (Sv és Vv).

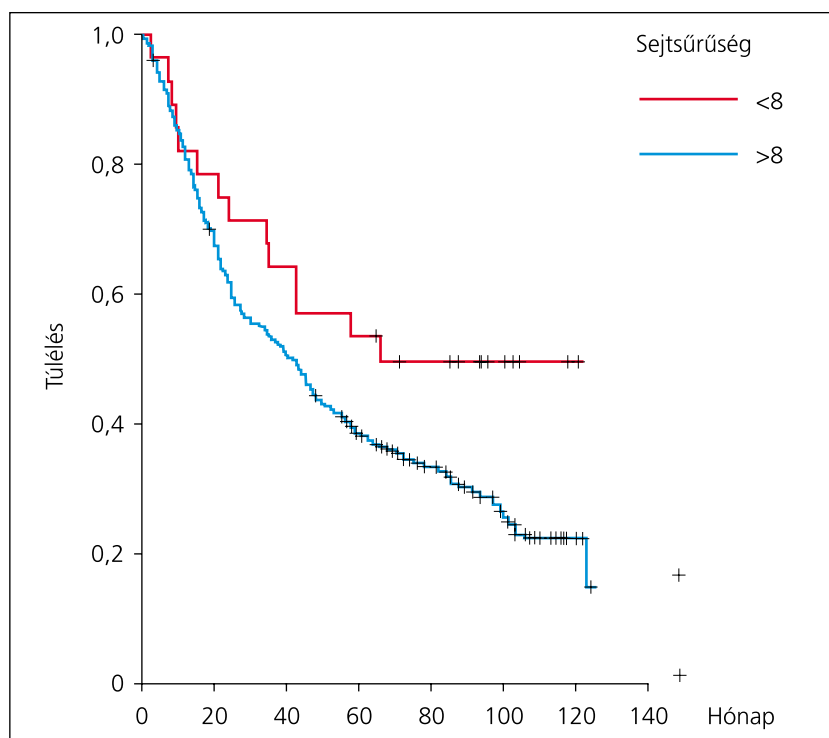
A tumorok progressziójában és metasztatizálásában az angiogenezis csak az egyik tényező. Bizonyos enzimek (kollagenáz, mátrix-metalloproteinázok) fokozott termelésének hatására a

tumorsejteket körülvevő stroma dezintegrálódik és a daganatsejtek inváziója lehetségessé válik. Az angiogenezis során képződött venulák, valamint a nyirokerek vékony falának kicsi az ellenállóképessége, ezért a daganatsejtek könnyen bekerülhetnek az ér lumenébe és ezáltal a szisztémás keringésbe (4, 6).

A fentiekből az is következik, hogy nemcsak a mikroerek száma befolyásolhatja a tumorok terjedését, hanem az intercelluláris kapcsolatok dezorganizációja és a tumorsejtek migrációja is. Ennek a folyamatnak a jellemzésére használjuk a mikroerek közelében elhelyezkedő tumorsejtek sűrűségének meghatározását. Kayser és mtsai több közleményben foglalkoztak azzal a kérdéssel, hogy a tumorsejtek térbeli elhelyezkedése és más sejtekhez ill. szöveti struktúrákhoz való távolsága hogyan változik a különböző szövettani típusú tüdődaganatokban és milyen összefüggést mutat a túléléssel (6, 12, 13). Szintaktikai struktúraanalízis során kimutatták, hogy az S-fázisban lévő tumorsejtek aránya fokozatosan emelkedik a legközelebbi szomszédos értől mért távolság csökkenésével (11). CD34 elleni antitesttel végzett festés után a legközelebbi értől mért 20 μm -es távolságon belül elhelyezkedő tumorsejtek sűrűségét meghatározva azt tapasztaltuk, hogy a sejtsűrűség emelkedése szignifikánsan csökkenti a túlélést (11).

A T státusnál azt tapasztaltuk, hogy a T2 tumorok némileg vaszkularizáltabbak, mint a T1-es daganatok, és a T4-es tumorok érellátása is jobban fejlett a T3-as tumorokénál. Érdekes, hogy a T2-es tumorok vaszkularizáltsága nagyobb, mint a T3-asoké. Nem szabad azonban figyelmen kívül hagyni, hogy főleg a T3 esetén a besorolás alapvetően nem a tumor méretétől, hanem a tumor elhelyezkedésétől függ. További vizsgálatot igényelne annak el-

2. ábra.
Radikálisan operált tüdődaganatos betegek túlélése a mikroerek 20 μm -en belüli környezetének tumorsejtsűrűsége alapján ($p=0,048$)



döntése, hogy az „invazív” T3 formák (mellkasfal, pericardium, rekeszinfiltráció) vaszkularizáltsága jobb-e, mint a lokalizáció alapján (bifurcatiót 2 cm-nél jobban megközelítő) T3-nak minősülő eseteké.

A tumorsejtek sűrűsége a legközelebbi szomszédos erek környezetében hasonló tendenciát mutatott, mint a morfológiai paraméterek. Minden távolságtartományban a T2 és T4 tumoroknál volt legmagasabb a sejtsűrűség. Az angiogenetikus folyamat során a meglévő erek bazális membránját a tumorsejtekből felszabaduló proteolitikus enzimek (mátrix-metalloproteináz (2), plazminogénaktivátorok (24)) bontják le. A proteolízis során az extracelluláris mátrixból angiogenetikus faktorok szabadulnak fel (31), ill. bizonyos angiogenetikus anyagok aktiválják az urokináz típusú plazminogénaktivátort (21). Feltehetőleg a nagyobb sejtsűrűség miatt az angiogenetikus és proteolitikus anyagok nagyobb koncentrációban szabadulnak fel és ez vezethet fokozott vaszkularizációhoz.

A nagyobb tumoroknál a vaszkularizáltság nem egyenletes a tumoron belül, ezért egy-egy rész vizsgálata egy nagyobb tumoron belül nem ad mindig megfelelő képet a tumor tényleges vérrellátásáról. Harpole vizsgálatai szerint a tumor periferiás (ép tüdőhöz közeli) területein az érsűrűség szoros összefüggést mutatott a legvaszkularizáltabb területek érsűrűségével, míg a centrális területeken a gyakori nekrozisok miatt indifferens eredményeket kaptak (5).

A nyirokcsomó-metasztázisok kialakulásában nem tudtuk bizonyítani a fokozott mikrovaskularizáció szerepét. Az erősebb mikrovaskularizáltság és a nyirokcsomó-metasztázisok közötti összefüggést elsősorban emlőcarcinománál írták le (1, 8), más tumoroknál (többek között tüdőtumornál is) a mikroérszám és a limfogén metasztázisok közötti kapcsolatot a legtöbb szerző nem tudta kimutatni (18, 28, 29), bár Slodkowska vizsgálataiban szoros összefüggést mutatott ki a nyirokcsomó-státus és a vaszkularizáltság között adenocarcinomáknál (25).

A legközelebbi szomszédos értől számított 20 μm -en belül elhelyezkedő tumorsejtek sűrűsége fokozatos emelkedést mutatott a nyirokcsomó-metasztázisoknak megfelelően, de ez a különbség minden távolságtartományban minimális volt. Eredményeink alapján úgy véljük, hogy a tüdőtumorumok mikrovaskularizációjának növekedése nem befolyásolja a daganat limfogén metasztatizáló képességét.

A kissejtes tüdőcarcinomás esetek a többi szövettani típushoz viszonyítva a morfológiai paraméterek alapján némileg fokozott vaszkularizáltságot mutattak. A kissejtes carcinoma biológiai viselkedését figyelembe véve – gyors hematogén metasztatizálás – ez az eredmény nem meglepő. Elsősorban a felületfrakció átlagos értéke haladta meg több mint 10%-kal a többi szövettani csoport hasonló eredményét. Magasabb volt a Vv, valamint az érkerület és érterület átlagos értéke is. Mivel a látóterenkénti érszám kisebb volt, mint a nem kissejtes esetekben, a na-

gyobb Sv és Vv érték egyértelműen a nagyobb méretű ereknek köszönhető. Az átlagos sejtsűrűség az érközelebi területen kisebb volt, mint a nem kissejtes carcinomáknál. Ezek a különbségek a kissejtes és nem kissejtes csoport között azonban nem bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak. Ez is magyarázhatja, hogy ezekben a kissejtes esetekben a tumor korai stádiumú, operábilis folyamat volt, ahol az 5 éves túlélés meghaladta a 20%-ot. A NSCLC csoporton belül nem találtunk különbséget, és ez az eredményünk megegyezik több szerző megfigyelésével (6, 18).

A vaszkularizációs paraméterek közül a legközelebbi szomszédos értől 20 μm -en belül elhelyezkedő tumorsejtek sűrűségének emelkedése rosszabb túléléssel járt. Ezek az eredmények megegyeznek a CD34 elleni antitesttel történő festéssel kapott adatainkkal (10). Mint korábban már említettük, Kayser és mtsai azt tapasztalták, hogy a tumorközelebi erektől mért 20 μm -es területen belül a proliferáló sejtek aránya nagyobb, mint az értől távolabbi területen. Kírkali vese-carcinománál bizonyította a kapcsolatot az angiogenezis és a proliferációs ráta között (15). Ezek az eredmények alátámasztják azt az elképzelésünket, hogy az angiogenezis, a tumorsejtek migrációja és proliferációja együtt befolyásolják a daganatok terjedését és ezáltal a prognózist. Ez magyarázhatja azt is, hogy az önmagában csak a mikrovaskularizációt jellemző morfológiai paraméterek közül egyik sem mutatott szignifikáns kapcsolatot a túléléssel. A 20 és 40 μm között elhelyezkedő sejtek sűrűsége viszont kedvező irányban befolyásolta a túlélést. Ezt a tényt nem lehet azzal megmagyarázni, hogy a kedvezőbb prognózis esetén a daganatsejtek távolabb vannak az erektől. A két paraméter között szignifikáns pozitív korrelációt mutattunk ki, tehát minél nagyobb a sejtsűrűség 20 μm -en belül, annál nagyobb a 20 és 40 μm közötti területen is.

Eredményeink alapján a vaszkularizáció mértéke gyenge kapcsolatot mutatott a különböző tumorstádiumokkal. A betegek túlélését leg erősebben a nyirokcsomó-metasztázisok megjelenése befolyásolta, a vaszkuláris paraméterek közül az érhez közeli tumorsejtek sűrűsége kedvezőtlenül befolyásolta a betegek sorsát. Ha a daganatsejtek sűrűsége nem haladta meg a 8 sejt/ μm^2 -t, a túlélés szignifikánsan magasabb volt, és ez felhasználható a közvetlen prognózis meghatározásában.

Irodalom

1. Bosari S, Lee AKC, DeLellis RA et al. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 23:755-761, 1992
2. Fischer C, Gilbertson BS, Powers EA et al. Interstitial collagenase is required for angiogenesis in vitro. *Dev Biol* 162:499-510, 1994
3. Folkmann J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82:4-6, 1990
4. Fox SB, Gatter KC, Harris AL. Tumour angiogenesis. *J Pathol* 179:232-237, 1996
5. Harpole DHJ, Richards WG, Herndon JE et al. Angiogenesis and molecular biologic subtyping in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 61:1470-1476, 1996

6. Herbst RS, Hidalgo M, Pierson AS et al. Angiogenesis inhibitors in clinical development for lung cancer. *Semin Oncol* 29(Suppl 4):66-77, 2002
7. Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM et al. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 147:33-41, 1995
8. Horak ER, Leek R, Klenk N et al. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 340:1120-1124, 1992
9. Isozaki H, Fujii K, Nomura E et al. Prognostic value of tumor cell proliferation and intratumor microvessel density in advanced gastric cancer treated with curative surgery. *Int J Oncol* 13:255-259, 1998
10. Kayser G, Baumhäkel J-D, Szöke T et al. Vascular diffusion density and survival of patients with primary lung carcinomas. *Virchows Arch* 442:462-467, 2003
11. Kayser K, Richter B, Stryciak R et al. Parameters derived from integrated nuclear fluorescence, syntactic structure analysis, and vascularization in human lung carcinomas. *Anal Cell Pathol* 15:73-83, 1997
12. Kayser K, Berthold S, Eichhorn S et al. Application of attributed graphs in diagnostic pathology. *Anal Quant Cytol Histol* 18:286-292, 1997
13. Kayser K, Gabius HJ. The application of thermodynamic principles to histochemical and morphometric tissue research: principles and practical outline with focus on the glycosciences. *Cell Tissue Res* 296:443-455, 1999
14. Kirkali Z, Yorukoglu K, Ozkara E et al. Proliferative activity, angiogenesis and nuclear morphometry in renal carcinoma. *Int J Urol* 8:697-703, 2001
15. Lucchi M, Mussi A, Fontanini G et al. Small cell lung carcinoma (SCLC): the angiogenic phenomenon. *Biotech Histochem* 77:1081-1087, 2002
16. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ et al. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-lung cancer. *Lancet* 340:145-146, 1992
17. Marme D. Tumorangiogenese: Molekulare Fakten und therapeutische Möglichkeiten. *Chirurg* 70:31-35, 1999
18. Matsuyama K, Chiba Y, Sasaki M et al. Tumor angiogenesis as a prognostic marker in operable non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 65:1405-1409, 1998
19. Mattern J, Koomägi R, Volm M. Biological characterization of subgroups of squamous cell lung carcinomas. *Clin Cancer Res* 5:1459-1463, 1999
20. Meert A, Paesmans M, Martin B et al. The role of microvessel density on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 87:694-701, 2002
21. Montessano R, Pepper MS, Orci L. Paracrine induction of angiogenesis in vitro by Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Sci* 106:1013-1024, 1993
22. Mountain CF. Revision in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 111:1710-1717, 1997
23. Passalidou E, Trivella M, Singh N et al. Vascular phenotype in angiogenic and non-angiogenic lung non-small cell carcinomas. *Br J Cancer* 86:244-249, 2002
24. Pepper M, Montessano R. Proteolytic balance and capillary morphogenesis. *Cell Diff Dev* 32:19-28, 1990
25. Slodkowska J, Sikora J, Kobos J et al. The clinicopathological assessment of proliferation, metastatic potential and angiogenesis of lung adenocarcinomas. *Elect J Pathol Histol* 2.2:962-973, 1996
26. Sristava A, Laidler P, Davies RP et al. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma: a quantitative histological study. *Am J Pathol* 113:419-423, 1998
27. Szöke T, Kayser K, Baumhäkel JD et al. Prognostic significance of microvascularisation in cases of operated lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 27:1106-1111, 2005
28. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M et al. Extent of tumor vascularization correlates with prognosis and hematogenous metastasis in gastric carcinoma. *Cancer Res* 56:2671-2676, 1996
29. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M et al. Tumor angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 57:1043-1046, 1997
30. Toi M, Kashitani J, Tominaga T. Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. *Int J Cancer* 55:371-374, 1993
31. Vlodavsky I, Korner G, Ishai MR et al. Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: possible involvement in tumour metastasis and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 9:203-226, 1990
32. Weidner N, Carrol PR, Flax J et al. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate cancer. *Am J Pathol* 143:401-409, 1993

HIRDETMÉNY

A MAGYAR PATHOLOGUSOK TÁRSASÁGA ÉS

A MAGYAR ONKOLÓGUSOK TÁRSASÁGA

által 2005-ös évre

„Össejtek szerepe az onkológiában”

címmel meghirdetett

KROMPECHER ÖDÖN

pályázat nyertesei:

I. helyezett: „REW215” jeligével

Molnár Viktor SE ÁOK VI. évf. hallgató

II. helyezett: „Nagy utazó” jeligével

Vida Gábor Kálmán DE OEC ÁOK VI. évf. hallgató

III. helyezett: „LeZa” jeligével

Legeza Balázs és Zakariás Dávid SE ÁOK IV. évf. hallgatók (együtt adták be)

Pénzjutalomban részesült „Bonz Mester” jeligével

Kovács Sándor SE FOK I/4.

Budapest, 2006. március

MAGYAR PATHOLOGUSOK TÁRSASÁGA és
MAGYAR ONKOLÓGUSOK TÁRSASÁGA VEZETŐSÉGE