

**EVA LØBNER LUND**, läkare, Ph d, forskningsledare, Laboratoriet för experimentell onkologi, Institutet för molekylär patologi, Københavns universitet, Danmark  
**PAUL EG KRISTJANSEN**, läkare, Ph d, med dr, forskningsdirektör, Novo Nordisk A/s, Danmark, för närvarande tjänstledig från Københavns universitet, Danmark

## Den maligna fenotypen

⊙ I dag är de molekylära förlopp som ligger till grund för tumörprocesserna och utvecklingen av den maligna fenotypen i allmänhet väl kända. Cancer är inte längre en gåta även om det fortfarande är en ytterst komplicerad sjukdom.

Mitt i flödet av specifika, molekylära förändringar och förlopp som är kartlagda som enskilda beståndsdelar i utvecklingen av cancer tycks det finnas vissa allmänna tendenser.

I en översikt av Hanahan & Weinberg (2000) [1] identifierades sex grundläggande förändringar i cellvävnadens fysiologi som gemensamma kännetecken för den maligna fenotypen, även om de verkar genom olika mekanismer:

- 1) självförsörjning vid tillväxtsignalering,
- 2) okänslighet mot tillväxthämmande signaler,
- 3) förmåga att kunna undvika den programmerade celldöden, apoptos,
- 4) obegränsad replikationspotential,
- 5) utdragen angiogenes och vävnadsinvasion.

I en översikt av Vogelstein & Kinzler (2004) [2] identifierades åtta olika cellbiologiska signalvägar som de flesta, om inte alla, stegen i molekylär carcinogenes leder mot. Intressant nog är alla dessa signalvägar relaterade till eller känsliga för samspelet mellan cellen och mikromiljö.

Denna översikt belyser nya fakta om gemensamma kännetecken för den maligna fenotypen med särskild betoning på samspelet mellan cancerceller och deras omgivning.

**G**emensamma kännetecken för samtliga cancerformer är att de orsakas av mutationer. Det senaste årtiondet har hundratals olika genmutationer som är inblandade i utvecklingen av cancer identifierats. Vissa är odefinierade mutationer inom genen, andra är resultatet av omfattande kromosomlagringar. Vissa är ärvda gendefekter (som nästan helt utgörs av små avgränsade skador som endast påverkar enstaka baspar) ökar med största sannolikhet risken för cancerutveckling. Trots det är fullt utvecklad cancer alltid resultatet av en ackumulering av flera olika mutationer i en enda ursprungscell. Hos människan kan en enstaka gendefekt inte ensam omvandla en normal cell till en malign tumörcell, medan möss (som har en förväntad medellivslängd på 3 månader utanför den skyddande miljön i ett forskningslaboratorium) kan utveckla malignitet genom aktivering av endast 1–2 onkogener.

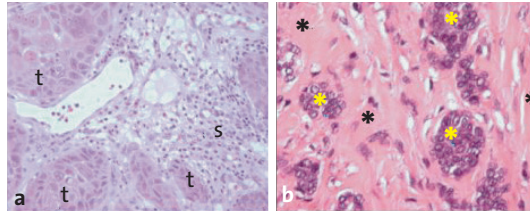
Många olika tumörframkallande mutationer påverkar samma centrala tillväxtreglerande signalvägar som på grund av de defekter som uppstår ökar cellens förmåga att uppnå autonom tillväxt. Det betyder att olika förändrade genotyper kan leda till samma slutresultat: allvarliga defekter i tillväxtkontrollen. Den maligna fenotypen kan med andra ord vara ett resultat av mutationer i olika gener. Tumören hos varje enskild patient är det sammanlagda resultatet av en unik kombination av genförändringar. Det faktum att 1) ingen enstaka genmutation kan driva fram en cancerutveckling hos människa och 2) varje tumör hos en patient har en unik genmutationsprofil utgör tillsammans de två största hindren för en cancerterapi som riktar sig mot sjukdomsorsaken.

Den tumörframkallande processen, carcinogensen, sker i flera steg och påverkas av tre typer av gener; onkogener, tumörsuppressorgener och stabiliserande gener.

*Onkogener* är pådrivande gener. Mutationen i onkogener driver på genproduktens aktivitet och ger cellen en selektiv tillväxtfördel. Normalt överför tyrosinkinas-receptorer på cellmembranet bindningen av en tillväxtfaktor på ytan till en tillväxtsignal inne i cellen. Vid vissa cancerformer muteras tillväxtfaktor-receptorn så att cellens signalsystem blir oberoende av bindning till tillväxtfaktorer. Cellen får ta emot en konstant tillväxtsignal, oberoende av mängden tillväxtfaktor i omgivningen.

*Tumörsuppressorgener* muteras så att deras genprodukters aktivitet reduceras.

Tillsammans driver tumörsuppressorgener och onkogener fram tumörprocessen genom stimulering av celltillväxt och hämning av celledöd och cellcykelstopp. Mutationen i den tredje celltypen, *stabilitetsgenerna*, har en helt annan fysiologisk effekt. Deras genprodukter deltar i reparationen av slumpvisa gendefekter som sker under DNA-replikation, mitos eller om cellen utsätts för mutagener, det vill säga



**Figur 1 a–b.** a) Väl differentierat skivepitelcellcarcinom från munhålan. Morfologin hos tumörceller (t) är heterogen. I bindvävsstromat (s) som omger de små öarna med tumörceller ses infiltrering med inflammationsceller. b) Adenocarcinom i bröst. Öar med tumörceller (gula asterisker) är inkapslade i en kollagenrik stroma (svarta asterisker).

faktorer som kan framkalla en mutation. När reparationsgenerna hämmas ökar mutationshastigheten hos alla gener på grund av att defekterna inte längre kan repareras ordentligt. Den genetiska instabiliteten och den ökade mottagligheten för mutationer i tumörcellen leder till en kontinuerlig utveckling av nya mutationer. Resultatet blir att det utvecklas kloner av tumörceller med olika genprofil och fenotyp. När en tumör vuxit till och blivit så stor att den kan upptäckas är heterogenitet en primär egenskap (Figur 1 a). Varje enskild cancercell innehåller mutationer i multipla gener, stora kromosomavvikelser och omfattande förändringar i genuttrycksprofilen.

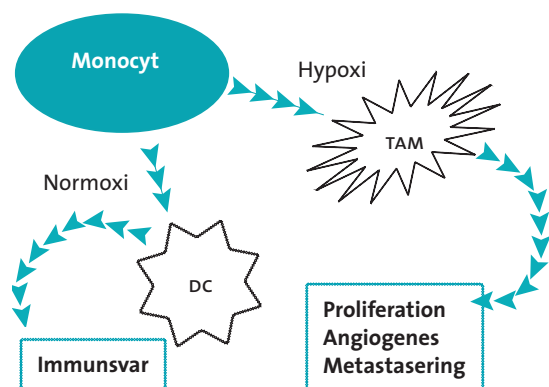
#### Tumörens mikromiljö

Bortsett från tumörcellerna består de flesta solida tumörer också av olika icke-maligna stromaceller. Dessa celler deltar i bildningen av en unik mikromiljö och påverkar tumörens sjukliga beteende. Ett viktigt exempel är endotelcellerna i tumörens blodkärl. Fibroblaster (och det kollagenrika extracellulära cellmatrix de producerar) är ofta en mycket viktig del hos tumörer. Ett exempel är bröstcancer, där tumörceller ofta är inkapslade som små öar av celler i en rikligt förekommande kollagenrik stroma (Figur 1 b). Aktiverade tumörfibroblaster är inte bara passiva åskådare till den tumörframkallande processen. De kan även delta aktivt genom ett samspel med tumörcellerna [3, 4].

En annan viktig beståndsdel i mikromiljön är inflammationscellerna. Många cancerformer uppstår ur infektionshärdar, vid kronisk irritation och vid inflammation [5]. Graden av kronisk infiltrering av inflammationsceller i tumörvävnaden varierar både mellan olika tumörtyper och från patient till patient. Ofta ses dock en mycket framträdande infiltrering av T-lymfocyter och makrofager (Figur 1 a). Inflammationscellerna och deras kemokiner och cytokiner reglerar tillväxten, migreringen och differentieringen hos alla celltyper i tumörens mikromiljö inklusi-

#### \*Fenotyp

Organismens märkbara egenskaper som uppkommit genom en samverkan mellan arvsanlag och miljö, det vill säga den sammanlagda effekten av de ärftliga och de förvärvade egenskaperna.



**Figur 2.** Monocyter som rekryterats från tumörmiljön kan antingen utvecklas till antigen-presenterande, dendritiska celler som deltar i immunsvaret mot tumörceller eller differentiera till tumörframkallande makrofager som producerar olika tillväxtfaktorer, cytokiner och proteaser som stimulerar och stödjer tumörtillväxt och tumörutveckling. Denna typ av makrofager ansamlas ofta i tumörens syrefattiga, hypoxiska, områden.

ve tumörceller, fibroblaster och endotelceller samt iscensätter även förändringar i det extracellulära matrixet.

#### Tumörrelaterade makrofager (TAM)

Makrofager frisätts från benmärgen i form av omogna monocyter och cirkulerar i blodet innan de läcker in i vävnader där de utvecklas till makrofager. Beroende på den lokala mikromiljön utvecklar makrofagerna specifika fenotyper. Makrofager har en mängd funktioner som är nödvändiga för vävnadsombildning, inflammation och immunsvär. Tumörrelaterade makrofager (TAM) är intressanta både på grund av sin tumörframkallande verkan (Figur 2) och sin roll som antigenpresenterande celler vid det cytotoxiska immunsvaret mot tumörceller. I de flesta studier relateras ett stort antal TAM i patienters tumörbiopsier till en dålig prognos [6, 7]. Det tyder på att den tumörframkallande funktionen hos makrofager dominerar över deras roll som immunstimulerande celler i många cancerformer.

Ett stöd för teorin har nyligen visats: om rekryteringen av makrofager till tumörer hämmas kan det i sin tur hämma tillväxten hos brösttumörer [8]. Studien visade även att samspelet mellan tumörceller och makrofager underlättar migreringen och spridningen hos tumörceller [7, 9].

Makrofager ansamlas i syrefattiga områden hos solida tumörer [10] på samma sätt som vid andra sjukdomar som exempelvis aterosklerotiska plack eller artritiska leder. I syrefattiga områden står TAM för ett antal näringsfunktioner som ökar tumörutveckling, spridning och metastasering. Tillväxtfaktorer och ke-

mokiner från TAM skickar tillväxt- och överlevnadsstimulerande signaler till tumörceller. Proteaser som utsöndras från TAM främjar tumörinvasionen genom att bryta ner basalmembran och ombilda stromamatrixet. Nedbrytningen och ombildningen av extracellulära matrixbeståndsdelar är avgörande för tumörcellernas migrering till den omgivande miljön.

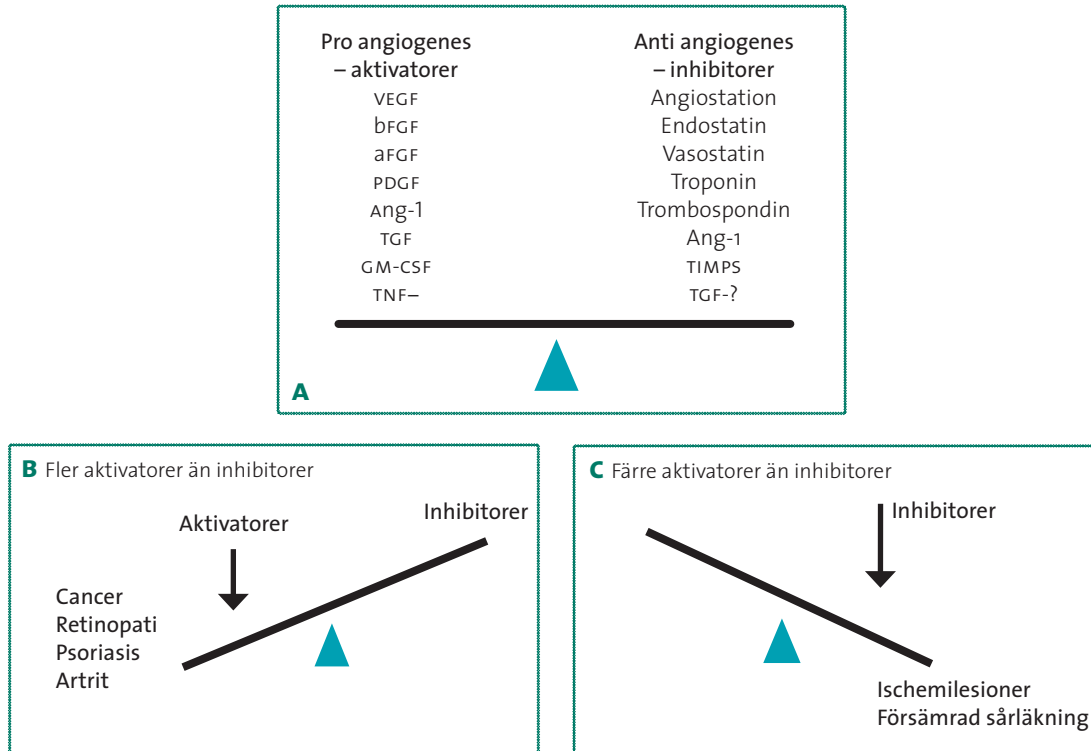
TAM stimulerar angiogenes på tre sätt: 1) de utsöndrar viktiga angiogena faktorer som VEGF (vascular endothelial growth factor) och angiopoetiner, 2) de proteaser som produceras är inte bara nödvändiga för tumörcellernas migrering utan även för förflyttningen av endotelceller in i tumörvävnad, samt 3) TAM rekryterar även andra hematopoetiska celler, till exempel mastceller och neutrofiler, genom sin produktion av cytokiner. Makrofager kan även främja tumöruppkomst och tumörutveckling genom att de kan generera mutagener, biprodukter från sin produktion av reaktiva syre- och kväveradikaler.

#### Angiogenes

För att solida tumörer ska kunna växa behöver de ha tillgång till blodkärl för att få en tillräcklig syre- och näringsförsörjning och kunna forsla bort avfallsprodukter. För de flesta tumörer är tillgången till blodkärl beroende av att de kan bilda ett tumörkärlsystem genom angiogenes, det vill säga att de kan bilda nya kärl genom förgrening från det befintliga kärlsystemet [11, 12]. Det finns dock några viktiga undantag från den regeln; astrocytom, hjärntumörer med låg malignitet, kan växa genom att ta över det befintliga kärlsystemet och infiltrera hjärnan längs kärlen [13]. En mindre fraktion av småcelliga lungcancer visar upp ett tydligt alveolärt, vaskulärt mönster utan några tecken på angiogenes som med största sannolikhet betyder att tumören tagit över det befintliga kärlsystemet [14]. Både vid hjärntumör och icke småcellig lungcancer kan prognosen för patienter med icke-angiogena tumörer tänkas vara bättre än prognosen för patienter som har angiogena tumörer.

I normalvävnad är balansen hårfin mellan faktorer som framkallar eller motverkar angiogenes (Figur 3). Vid en viss punkt i tumörutvecklingen sker en växling mot en övervikt av angiogenesframkallande faktorer. Det leder till uppkomsten av nya kärl ur redan existerande. I många tumörer är detta en tidig händelse. (Angiogenes observeras till och med i det förinvasiva stadiet, *carcinom in situ* [15].) Angiogena stimulatorer produceras av både tumörceller och stromaceller. Den mest potenta gruppen är VEGF-gruppen som är betydelsefull för både fysiologisk och patologisk angiogenes [16, 17]. VEGF regleras ofta upp vid cancer. Uppregleringen kan ske som en följd av onkogen signalering, via ett syrebristframkallat uttryck och även via en ansamling av VEGF-producerande inflammationsceller i tumören.

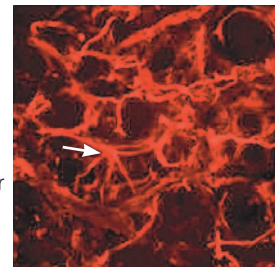
Tumörangiogenes skiljer sig signifikant från nor-



**Figur 3 a-c.** a) Angiogenes regleras av många olika aktivatorer eller inhibitorer. I allmänhet bestämmer balansen mellan nivån för aktivatorer och inhibitorer om kärlendotelet kommer att befinna sig i ett angiogent tillstånd eller slumrande. b) Vid ett antal andra sjukdomar, förutom cancer, spelar överdriven angiogenes en påtaglig roll för den patologiska processen. c) Otillräcklig angiogenes kan vara en försvårande faktor vid sårhäkning och ischemiesioner.

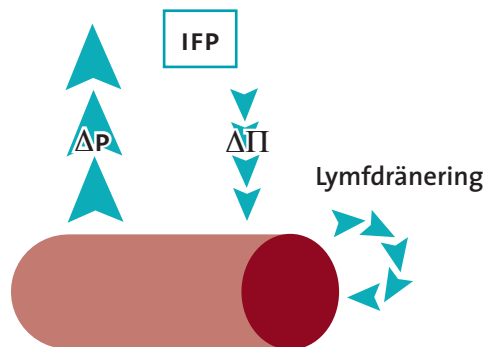
mal angiogenes. Normal fysiologisk angiogenes är en strikt reglerad process som innehåller ett komplicerat samspel mellan olika angiogena faktorer, proteaser et cetera med samverkande effekt från vissa kombinationer av angiogena faktorer och med antagonistiska effekter från andra kombinationer [18]. I tumörer störs angiogenesen av olika faktorer som framkallar eller motverkar angiogenes och de tumörkärl som bildas blir strukturellt och funktionellt avvikande. Strukturen hos artärlior, kapillärer och venoler är karakteristisk och blodkärlen blir slingrande, utvidgade eller till och med labyrintartade och får knoppar med slutna ändrar. Avvikande förgreningsmönster ses också (Figur 4). VEGF är även en faktor som styr genomträngligheten i endotelceller och tumörkärl är ofta mycket otäta. Vid angiogenes i normal vävnad mognar de nybildade kärlen snabbt och blir stabila. I tumörer är stora delar av de nybildade kärlen omogna och saknar det normala yttre höljet av celler, pericythöljet. De omogna kärlen är beroende av kontinuerlig stimulering med tillväxtfaktor för att inte tillbakabildas vilket kan förklara varför angiogenmotverkande terapi inte enbart leder till minskad angiogenes utan ibland även till vaskular tillbakabildning i tumörer [19].

**Figur 4.** Blodkärl i ett försöksglioblastom. Kärlen är avvikande med en kraftig variation i diametern. De är slingrande och har onormala förgreningsmönster (pil) samt knoppar med slutna ändrar. (Lektinfärgning genom vänligt tillmötesgående från dr Jørgen Rygaard.)



#### Två viktiga epigenetiska egenskaper hos olika cancerformer

På grund av den oregelbundna konturen i tumörernas kärlsystem dominerar områden med relativt låg eller obefintlig genomblödning i solida tumörer. Särskilt i stora skrymmande tumörer är central vävnadsdöd vanligt förekommande. Det anses i allmänhet bero på brist på koordinering mellan vaskulär och neoplastisk celltillväxt. Denna brist leder till kronisk syrebrist och slutlig svält hos otillräckligt blodkärlsförsedda centrala delar av den växande tumören. På ett liknande sätt är, på mikroskopisk nivå, små nekroshårdar vanligen utspridda kring cancervävnader. Detta är, enligt



$\Delta P$ : Hydrostatiskt tryck (cardiac output, gravity)  
 $\Delta \Pi$ : Osmotiskt tryck (oncotic)

**Figur 5.** Starlings filtreringslag: Den positiva netto-skillnaden mellan extravasation genom hydrostatiska krafter och intravasation genom osmotiska krafter balanseras av lymfdräneringen. Onormalt högt interstitiellt vätsketryck (IFP) kan vara ett resultat av förändringar hos alla tre parametrarna.

en nu klassisk teori om förstadiet till angiogenes [20], ett resultat av att avståndet mellan kapillärerna är över två gånger så stort som diffusionsavståndet för molekylärt syre. Nya rön som länkar ihop molekylära och fysiologiska processer vid syrebrist i tumörer har gjort att denna egenskap bedöms vara en viktig regulator för den maligna fenotypen.

#### Interstitiellt vätsketryck (IFP)

Ännu en egendomlig effekt av den vaskulära omfördelningen i solida tumörer är ett ökat tryck i den så kallade interstitialvätskan, IFP (den del av kroppens vätska som finns mellan cellerna). Det hydrostatiska trycket i det interstitiella rummet kallas IFP. I normala vävnader ligger trycket vanligen mellan -1 och 2 mmHg. I tumörer registreras genomgående värden på omkring 20 mmHg (ibland upp till 40–60 mmHg) både hos patienter och i försöksdjurmodeller [21–23]. Avvikelser i tryckbalansen mellan hydrostatiska och onkotiska tryckgradienter och lymfdränering (Figur 5) bidrar till en ökning av IFP i hela tumören [24].

Den utåtriktade hydrostatiska tryckgradienten är känslig för förändringar i perfusionstrycket och ökar proportionerligt mot det ökade, geometriska flödesmotståndet i solida tumörer. Otäta blodkärl gör att makromolekyler lättare kan tränga in i det interstitiella rummet hos solida tumörer vilket leder till en minskning av den onkotiska gradienten. En icke-fungerande, lymfatisk funktion i tumören lyckas inte utjämna nettoöverskottet av vätsketransporten mellan kärlen vilket bevarar en hög tryckjämvikt. Slutligen kan interstitiell fibros och onormal sammandragning hos det interstitiella matrixet genom aktiverade, stro-

mala myofibroblaster aktivt höja det onormalt höga IFP [25, 26]. Förhöjt IFP hos solida tumörer är relaterat till väsentliga minskningar av upptaget av makromolekylära medel [27] och i viss grad också lågmolekylära föreningar som paclitaxel och 5-fluoracil [23]. Det senare är något paradoxalt eftersom IFP huvudsakligen påverkar den konvektiva transporten, transporten längs en tryckgradient. Denna form av transport utgör huvudmekanismen för överföring av makromolekyler och stora partiklar, medan små molekyler distribueras genom diffusion och därmed är relativt oberoende av IFP. Förhöjt IFP utgör därmed en huvudbeståndsdel i den fysiologiska försvarsmekanismen mot tumörer, det vill säga det uppstår en effektivitetsbrist på grund av ett selektivt minskat upptag av annars effektiva terapeutiska medel. Detta är en viktig försvarsmekanism som skiljer sig påtagligt från de cellulära mekanismerna vid läkemedelsresistens som är relaterad till klonalt selektionstryck, igångsättning av specifika membranpumpar eller anpassad målmodellering.

#### Syrebrist – hypoxi i tumörer

Det finns två typer av syrebrist, hypoxi, i tumörer: akut, perfusionsbegränsningshypoxi och kronisk diffusionsbegränsningshypoxi. Akut hypoxi är ett resultat av dålig blodgenomströmning som beror på stopp i blodflödet på grund av mikrobloodproppar eller opåkallade sammandragningar. Kronisk hypoxi är allmänt utbredd på gränsen mellan normalt syresatta vävnader och vävnadsdöd; det vill säga när tillförseln av syre och näringsämnen är precis tillräcklig för att hålla cellen vid liv men inte för att tillåta tillväxt och andra komplicerade processer. Kroniskt syrefattiga celler är ett terapeutiskt problem. De är relativt resistenta mot strålbehandling och har lägre känslighet för medel som är riktade mot tillväxtceller. Syrefattiga regioner är en tillflyktsort för klonogena celler. Dessa celler rekryteras dit sedan mindre syrefattiga tumörceller slagits ut. Den skadliga mikromiljön hos solida tumörer lockar fram mer robusta, cellulära fenotyper som har ett lägre näringsbehov och mindre sårbarhet på grund av förändringar i deras extracellulära pH och pO<sub>2</sub>.

Betydelsefulla upptäckter under det senaste decenniet har lärt oss hur syrebrist i tumörer kan spela en aktiv roll vid modulering av den maligna fenotypen genom att styra hypoxiinduktionsfaktor 1 HIF1, en huvudregulator för de flesta gener som är inblandade i utbredning och bevarande av maligniteten [2, 28].

HIF1 är en transkriptionsfaktor i däggdjursceller. Dess huvudsakliga funktion är att hjälpa cellerna att överleva vid minskade koncentrationer av syre och i en viss grad även glukos. HIF1 består av två underenheter, en  $\alpha$ -enhet och en  $\beta$ -enhet. HIF1- $\alpha$  produceras kontinuerligt och bryts omedelbart ner i cytoplasman så länge det har tillgång till syre och VHL (Von Hippel Lindau-protein – en klassisk tumorsupp-



ressorgenprodukt). I frånvaro av syre eller när VHL är inaktiverad, till exempel på grund av en mutation, tränger HIF1- $\alpha$  in i kärnan och förenas med HIF1- $\beta$ , ett konstitutivt uttryckt kärnprotein. Den förenade HIF1 gör att den mängd olika gener uttrycks som alla är till nytta för cellens överlevnad under perioder med allvarliga påfrestningar på mikromiljön (Figur 7). Angiogenes, glykolys och vasodilatation samt många andra processer och faktorer som erythropoetin och olika cytokiner regleras samtliga upp genom HIF1. Helt nyligen har man visat att HIF1 är central för alla kända signalvägar vid malignitet, inklusive reglering av apoptos och "genomskyddargenen" p53. Många nya terapeutiska medel under utveckling har haft HIF1 och andra hypoxiberoende transkriptionsfaktorer som molekylära mål. Även vissa etablerade läkemedel mot cancer inverkar direkt på HIF1-signalvägen. Ett exempel är topotekan, vars antitumöreffekt förhöjs genom övergående hypoxi, mest sannolikt via en hämmande effekt på HIF1 [29, 30].

Andra övertygande bevis för hypoxins betydelse som huvudregulator för fenotypisk malignitet har tagits fram i försök som visat en ökad metastasförmåga hos tumörer som utsattes för akuta hypoxiska betingelser innan de injicerades i gnagare [31].

### English summary

#### The malignant phenotype

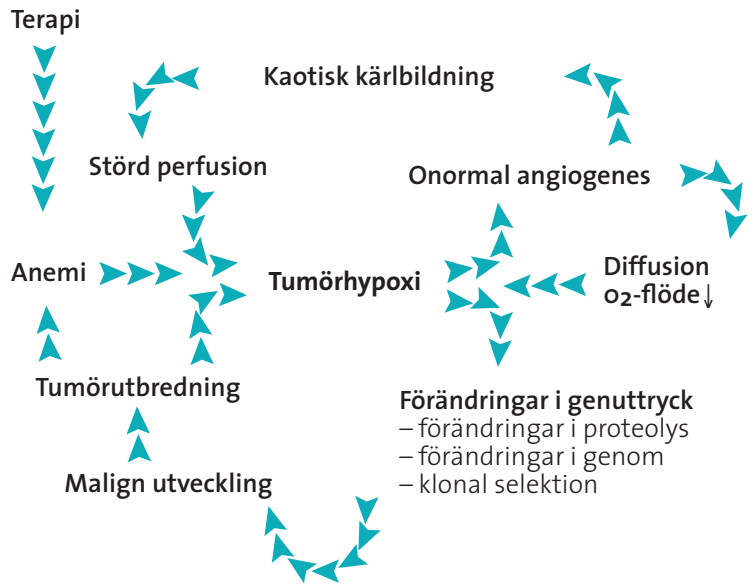
Eva Løbner Lund & Paul EG Kristjansen  
*Tandläkartidningen 2006; 98 (1): 64–70*

Much has happened in the field of cancer research and treatment over the last decades, and the knowledge of cancer biology has increased tremendously. Today it is fair to say that cancer is no longer enigmatic, but it is still incredibly complicated.

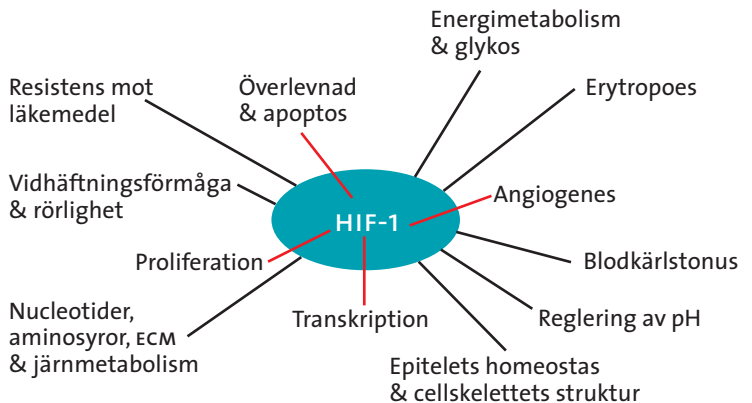
This review by Lund and Kristjansen presents an update on the current knowledge of the molecular background of cancer and highlights new information about common characteristics of the malignant phenotype. The local tumour microenvironment including blood vessels plays an active role in the development and progression of cancer, by recently discovered mechanisms involving inflammatory cells as well as hypoxia and the interstitial fluid pressure.

### Referenser

- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57–70.
- Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004; 10: 789–99.
- Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation* 2002; 70: 473–85.
- Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes – bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 839–49.



Figur 6. Tumörhypoxi driver fram många aspekter av den maligna fenotypen.



Figur 7. Cellulära funktioner eller klasser av funktionella gener som regleras av HIF1. (Bearbetad från Semenza [27].)

- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860–7.
- Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 2002; 196: 254–65.
- Chen JJ, Lin YC, Yao PL, Yuan A, Chen HY, Shun CT, et al. Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression. *J Clin Oncol* 2005; 23: 953–64.
- Aharinejad S, Paulus P, Sioud M, Hofmann M, Zins K, Schafer R, et al. Colony-stimulating factor-1 blockade

- by antisense oligonucleotides and small interfering RNAs suppresses growth of human mammary tumor xenografts in mice. *Cancer Res* 2004; 64: 5378–84.
9. Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER, et al. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res* 2004; 64: 7022–9.
  10. Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* 2004; 104: 2224–34.
  11. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182–6.
  12. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 401–10.
  13. Holash J, Maisonpierre P C, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999; 284: 1994–8.
  14. Offerens BV, Pfeiffer P, Hamilton-Dutoit S, Overgaard J. Patterns of angiogenesis in nonsmall-cell lung carcinoma. *Cancer* 2001; 91: 1500–9.
  15. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. [Review]. *Cell* 1996; 86: 353–64.
  16. Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 488–94.
  17. Lund EL, Thorsen C, Pedersen MW, Junker N, Kristjansen PE. Relationship between vessel density and expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in small cell lung cancer in vivo and in vitro. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4287–91.
  18. Ley C, Olsen MB, Lund EL, Kristjansen PE. Angiogenic synergy of bFGF and VEGF is antagonized by angiopoietin-2 in a modified in vivo matrigel assay. *Microvasc Res* 2004; 68: 161–8.
  19. Wille CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, et al. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasculature effects in human rectal cancer. *Nature Med* 2004; 10: 145–7.
  20. Thomlinson RH, Gray LH. The historical structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 1955; 9: 539–49.
  21. Young JS, Lumsden CE, Stalker AL. The significance of the tissue pressure of normal testicular and of neoplastic (Brown-Pearce Carcinoma) tissue in the rabbit. *J Pathol Bacteriol* 1950; 62: 313–33.
  22. Jain RK. The next frontier of molecular medicine: Delivery of therapeutics. *Nature Med* 1988; 4: 655–7.
  23. Heldin CH, Rubin K, Pietras K, Ostman A. High interstitial fluid pressure – an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 806–13.
  24. Boucher Y, Baxter LT, Jain RK. Interstitial pressure-gradients in tissue-isolated and subcutaneous tumors – Implications for therapy. *Cancer Res* 1990; 50: 4478–84.
  25. Kristjansen PE. Pathophysiology of human tumor xenografts. Aspects of metabolism, physiology, and pharmacokinetics in heterotransplanted human lung and colon tumors. *Dan Med Bull* 1997; 44: 380–95.
  26. Aukland K, Reed RK. Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume. *Physiol Rev* 1993; 73: 1–78.
  27. Jain RK. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 46: 149–68.
  28. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721–32.
  29. Lund EL, Hansen LT, Kristjansen PEG. Augmenting tumor sensitivity to topotecan by transient hypoxia. *Cancer Chemotherapy Pharmacol* 2005.
  30. Rapisarda A, Uranchimeg B, Sordet O, Pommier Y, Shoemaker RH, Melillo G. Topoisomerase I-mediated inhibition of hypoxia-inducible factor 1: mechanism and therapeutic implications. *Cancer Res* 2004; 64: 1475–82.
  31. Cairns RA, Hill RP. Acute hypoxia enhances spontaneous lymph node metastasis in an orthotopic murine model of human cervical carcinoma. *Cancer Res* 2004; 64: 2054–61.

**Address:**

Eva Løbner Lund,  
Laboratoriet för  
experimentel Onkologi  
Frederik V's Vej 22,  
DK-2100 København Ø,  
Danmark  
E-post: eva@pai.ku.d