

Samenvatting

Dit proefschrift richt zich op de effecten van voedingsinterventies met lycopeen- en isoflavonensuppletie op het insuline-achtige groeifactor (IGF) systeem en beschrijft daarnaast moleculaire studies waarin de rol van het IGF-systeem bij het ontstaan van borst- en dikkedarmkanker wordt onderzocht. Het IGF-systeem is voornamelijk betrokken bij de regulatie van normale groei, en componenten van het IGF-systeem komen tot expressie in de meeste weefsels. De lever is echter de belangrijkste bron voor de twee liganden IGF-I en IGF-II in de bloedcirculatie. Ongeveer 90% van het IGF-I in de circulatie is gebonden aan het IGF bindingseiwit -3 (IGFBP-3) en een zuur-labele subunit. Dit complex is te groot om de bloedbaan te kunnen passeren, hetgeen resulteert in een toegenomen halfwaardetijd van IGF-I. Vrij IGF-I (<1%) en IGF-I gebonden aan IGFBP-1 en IGFBP-2 kan uit de bloedbaan getransporteerd worden naar specifieke weefsels. IGFBPs kunnen worden afgebroken door proteases, waardoor het vrijgekomen IGF-I kan reageren met de IGF-I receptor (IGF-IR). Binding van IGF-I of IGF-II aan de IGF-IR resulteert in fosforylatie van de receptor, activatie van downstream moleculen, en stimulatie van celgroei en remming van celdood.

Epidemiologische studies laten zien dat hoge concentraties circulerend IGF-I geassocieerd zijn met een verhoogd risico op kanker, met name het risico op premenopauzale borstkanker en dikkedarmkanker (**Hoofdstuk 1 en 2**). Hoge circulerende IGF-II concentraties zijn ook geassocieerd met een verhoogd risico op dikkedarmkanker. Kwalitatieve en semikwantitatieve studies hebben vaak een verhoogde expressie van de IGF-IR gevonden in borsttumorweefsels en in dikkedarmtumorweefsels. De resultaten van kwantitatieve studies zijn echter schaars en inconsistent. Circulerende concentraties van IGF-I worden bepaald door zowel genetische als voedings- en leefstijlfactoren. Studies in cellen en dieren en epidemiologische studies duiden erop dat de voedingsstoffen lycopeen en isoflavonen circulerende IGF-I concentraties mogelijk zouden kunnen verlagen en circulerende IGFBP-3 concentraties zouden kunnen verhogen. Lycopeen is een carotenoïde die voornamelijk voorkomt in tomaten en tomatenproducten. Isoflavonen lijken in structuur en functie op oestrogenen en komen met name voor in sojaproducten, maar kunnen ook verkregen worden uit rode klaver. De effecten van lycopeen en isoflavonen op het IGF-systeem in mensen kan het meest optimaal getest worden in interventiestudies gebruikmakend van voedingssupplementen.

Het belangrijkste doel van de studies beschreven in dit proefschrift was om de effecten te onderzoeken van suppletie met lycopeen en isoflavonen op circulerende concentraties van IGF-I en andere IGF-systeem componenten bij premenopauzale vrouwen met een verhoogd risico op borstkanker, en bij mannen en vrouwen met een verhoogd risico op dikkedarmkanker. Daarnaast hebben we onderzocht of er verschillen bestaan in expressieniveaus van IGF-systeem componenten tussen normaal borstweefsel en borsttumorweefsel en probeerden we opheldering te verkrijgen over de relatie tussen niveaus van IGF-systeem componenten in normaal dikkedarmweefsel en in bloed.

Crossectionele studie

We hebben eerst onderzocht of de gebruikelijke voedingsinname van lycopene en tomaten, fyto-oestrogenen (waaronder isoflavonen) en de producten rijk aan deze stoffen, en de inname van de totale hoeveelheid energie, eiwit en alcohol geassocieerd was met plasmaniveaus van IGF-I en IGFBP-1, IGFBP-2 en IGFBP-3 (**Hoofdstuk 3**). Daartoe werd een crossectionele studie uitgevoerd bij 224 premenopauzale en 162 postmenopauzale gezonde Nederlandse vrouwen, 49 tot 69 jaar oud, die deelnamen aan de Prospect-EPIC studie in Nederland. De voedingsinname werd geschat met behulp van een voedselfrequentievragenlijst. In deze studie werden geen onafhankelijke associaties gevonden van voedingsfactoren met IGF-I of IGFBP-3 plasmaconcentraties. Van de voedingsmiddelen die lycopene en isoflavonen bevatten was alleen een verhoogde inname van sojaproducten geassocieerd met hogere IGFBP-2 plasmaconcentraties ($p = 0.04$). De gebruikelijke voedingsinname van lycopene en isoflavonen van deze studiepopulatie was laag (mediane inname respectievelijk 3 mg/dag en 0.15 mg/dag). Blijkbaar was deze lage inname niet geassocieerd met circulerende concentraties van IGF-I en IGFBP-1, IGFBP-2 en IGFBP-3.

Voedingsinterventiestudies

Om nauwkeurig te onderzoeken of een hogere inname van lycopene en isoflavonen bloedconcentraties van IGF-systeem componenten beïnvloedt, hebben we gerandomiseerde, placebo-gecontroleerde, dubbelblinde crossover studies uitgevoerd met een tomatenextract (30 mg/dag lycopene, capsules) en een rode klaver extract (84 mg/dag isoflavonen, tabletten). De totale duur van de studies was ongeveer 6 maanden, bestaande uit twee 2 maanden durende interventieperiodes die van elkaar gescheiden werden door een 2 maanden durende wash-out periode. De meeste mannen en vrouwen met een verhoogd risico op dikkedarmkanker ondergingen een dikkedarmonderzoek aan het einde van de eerste interventieperiode. De belangrijkste parameter was het relatieve crossover verschil in serumconcentraties van totaal IGF-I (d.w.z. de concentratie na interventie- minus concentratie na placebo-behandeling, uitgedrukt als een procentuele verandering ten opzichte van de concentratie na placebo-behandeling). Relatieve crossover verschillen in serumconcentraties van vrij IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2 en IGFBP-3 waren secundaire eindpunten.

Lycopene en IGF

In **Hoofdstuk 4** hebben we het effect van lycopene-suppletie onderzocht bij premenopauzale vrouwen met (1) een persoonlijke geschiedenis van borstkanker ($n = 24$), of (2) een familiegeschiedenis van borstkanker ($n = 36$), die hoogstens 50 jaar oud waren. In de twee studiepopulaties tezamen had lycopene-suppletie geen effect op serumniveaus van totaal IGF-I, noch op een van de andere IGF-systeem componenten. Tussen de twee studiepopulaties werden echter statistisch significante discordante resultaten gevonden (i.e., $p < 0.05$ voor totaal IGF-I, vrij IGF-I en IGFBP-3). Totaal IGF-I en IGFBP-3 waren

gestegen bij de overlevenden van borstkanker (gemiddelde relatieve verschil tussen serum totaal IGF-I concentraties na lycopeensuppletie en na placebo, 7.0%, 95% btbh-i -0.2% tot 14.3%; IGFBP-3, 3.3%, 95% btbh-i 0.7% tot 6.0%), en vrij IGF-I was afgenomen bij vrouwen met een familiegeschiedenis van borstkanker (-7.6%, 95% btbh-i -14.6% tot -0.6%). Er werden geen veranderingen gevonden in circulerende concentraties van IGFBP-1 en IGFBP-2. Deze resultaten suggereren dat lycoppeen alleen een IGF-I verlagend effect heeft bij gezonde vrouwen met een familiegeschiedenis van borstkanker en niet bij overlevenden van borstkanker. Dit kan verklaard worden door interferentie van de genetische achtergrond of ziektestatus met lycoppeen effecten op het IGF-systeem. Aangezien bekend is dat het IGF-systeem interactie aangaat met signaaltransductieroutes van geslachtshormoonsteroiden, zouden effecten van voedingsfactoren ook kunnen verschillen naar geslacht of menopauzale status. Deze resultaten kunnen echter ook een toevalsbevinding zijn.

We onderzochten het effect van lycopeensuppletie eveneens in een vergelijkbare studie bij 40 mannen (40 tot 75 jaar oud) en 31 postmenopauzale vrouwen (50 tot 75 jaar oud) met een familiegeschiedenis van dikkedarmkanker en/of een persoonlijke geschiedenis van adenomateuze poliepen in de dikke darm (**Hoofdstuk 5**). Bij zowel mannen als vrouwen had lycopeensuppletie geen significante invloed op serum totaal IGF-I concentraties. Lycopeensuppletie verhoogde echter serum IGFBP-1 concentraties bij vrouwen (mediane relatieve verschil 21.7%, $p = 0.01$). Serum IGFBP-2 concentraties na lycopeensuppletie waren toegenomen bij zowel mannen als vrouwen, maar in mindere mate dan de IGFBP-1 concentraties (gemiddelde relatieve verschil respectievelijk 8.2%, 95% btbh-i 0.7% tot 15.6% en 7.8%, 95% btbh-i -5.0% tot 20.6%). IGF-II en IGFBP-3 concentraties waren niet noemenswaardig veranderd en de vrije IGF-I concentraties waren niet bepaald. Ondanks het feit dat lycopeensuppletie de serum totaal IGF-I concentraties bij mannen en vrouwen met een verhoogd risico op dikkedarmkanker niet beïnvloedde, duiden onze resultaten erop dat het de IGF-I biobeschikbaarheid zou kunnen verlagen door het verhogen van IGFBP-1 en IGFBP-2 concentraties. We waren echter de eerste die de effecten van lycoppeen op circulerende concentraties van IGFBP-1 en IGFBP-2 hebben onderzocht en de resultaten moeten bevestigd worden in grotere gerandomiseerde interventiestudies.

Isoflavonen en IGF

Het effect van isoflavonensuppletie op circulerende concentraties van IGF-systeem componenten werd onderzocht bij 37 mannen (40 tot 75 jaar oud) en 34 postmenopauzale vrouwen (50 tot 75 jaar) met een familiegeschiedenis van dikkedarmkanker en/of een persoonlijke geschiedenis van adenomateuze poliepen in de dikke darm. Bij mannen had isoflavonensuppletie geen effect op serumconcentraties van totaal IGF-I (gemiddelde relatieve verschil -1.3%, 95% btbh-i -8.6% tot 6.0%), noch op een van de andere IGF-systeem componenten (**Hoofdstuk 6**). Eerdere studies hebben laten zien dat ongeveer 30-50% van de mensen in staat is om daidzeïne, een van de belangrijkste

isoflavonenmetabolieten, om te zetten in de meer potente oestrogene metaboliet equol. Interessant is dat in onze studie hogere serumconcentraties van equol geassocieerd waren met verlagingen in serum IGF-I concentraties na isoflavonensuppletie ($r = -0.49$, $p = 0.002$). Onze conclusie was dat isoflavonensuppletie de circulerende IGF-I concentraties niet beïnvloedde bij mannen met een verhoogd risico op dikkedarmkanker. Voor zover ons bekend is dit echter de eerste studie die suggereert dat isoflavonen alleen een IGF-I verlagend effect zouden kunnen hebben bij mannen die equol kunnen vormen. Dit onderschrijft het belang om rekening te houden met de equol status in toekomstige interventiestudies met isoflavonen.

Isoflavonensuppletie had eveneens geen significant effect op serumconcentraties van totaal IGF-I bij postmenopauzale vrouwen (gemiddelde relatieve verschil -2.0% , 95% btbh-i -8.0% tot 3.9%) (Hoofdstuk 7). IGF-II noch IGFBPs waren significant veranderd na isoflavonensuppletie. Bovendien vonden we geen verschillen in mRNA expressieniveaus van IGF-systeem componenten in biopten van normaal dikkedarmweefsel tussen vrouwen op isoflavonen en vrouwen op placebo. Deze resultaten suggereren dat de verhoogde serum IGF-I concentraties die gevonden zijn in eerdere studies naar soja- of soja-eiwitsuppletie meest waarschijnlijk veroorzaakt worden door het soja-eiwit zelf, en niet door de isoflavonen.

Moleculaire studies

Borstcarcinogenese

De eiwit- en mRNA expressie van IGF-systeem componenten in humaan borstweefsel zijn voornamelijk onderzocht met gebruikmaking van kwalitatieve of semikwantitatieve technieken. De resultaten met betrekking tot mRNA expressie in normaal borst- en borsttumorweefsel zijn inconsistent en inconclusief, en kwantitatieve gegevens over mRNA expressie in verschillende types humaan borstweefsel ontbreken. Voor het onderzoeken van de aannemelijk oorzakelijke relatie tussen susceptibiliteit (d.w.z. hoge serumniveaus van IGF-I en susceptibiliteit voor kanker) en tumorinductie en -promotie (d.w.z. weefselexpressie en opeenvolgend risico op kanker) zijn kwantitatieve gegevens over mRNA expressie van IGF-systeem componenten in borstweefsel essentieel. In Hoofdstuk 8 hebben we de mRNA expressie van IGF-I, IGF-II en hun receptoren (IGF-IR en IGF-IIR) kwantitatief bepaald in borstweefsel samples ($n = 83$) van 72 vrouwen met behulp van real-time RT-PCR. We onderzochten of mRNA expressieniveaus verschillen in zowel normaal borstweefsel als borsttumorweefsel van vrouwen met en zonder een familiegeschiedenis van borstkanker. We vonden een grote variatie in mRNA niveaus. De expressie van elk gen was significant hoger in normaal weefsel dan in tumorweefsel (mediaan voor normaal en tumorweefsel, respectievelijk (arbitraire eenheden); IGF-I: 25.2 en 1.4; IGF-II: 5.9 en 0.6; IGF-IR: 0.18 en 0.07; IGF-IIR: 1.8 en 0.9; $p < 0.0001$). Het was interessant dat in tumorweefsel van patiënten met een sterke familiegeschiedenis van borstkanker de expressie van beide receptoren hoger was dan in tumorweefsel van sporadische patiënten (IGF-IR: 0.13 en 0.05, $p = 0.04$; IGF-IIR: 1.1 en 0.8, $p = 0.04$). Voor

controles zonder kanker was de expressie van IGF-II en de IGF-IIR in normaal borstweefsel ook hoger bij vrouwen met een familiegeschiedenis van borstkanker dan bij vrouwen zonder een dergelijke familiegeschiedenis (IGF-II: 7.2 en 1.5, $p = 0.02$; IGF-IIR: 2.6 en 1.5, $p = 0.09$). Onze studie laat op kwantitatieve wijze zien dat mRNA expressieniveaus van IGF-systeem componenten in de borst over het algemeen hoger zijn in normaal weefsel in vergelijking met tumorweefsel, en hoger in weefsel van vrouwen met een familiegeschiedenis van borstkanker dan in weefsel van vrouwen zonder een dergelijke familiegeschiedenis. Hiermee is een basis gelegd voor studies die als doel hebben om kennis te verkrijgen over IGF als een risicofactor voor borstkanker, over de relatie tussen het IGF-systeem in serum en weefsels, en de effecten van leefstijlfactoren op het IGF-systeem.

Dikkedarmcarcinogenese

Studies in humane dikkedarmtumoren hebben, gebruikmakend van kwalitatieve of semikwantitatieve technieken, laten zien dat de IGF-IR en met name IGF-II vaak verhoogd tot expressie komen in vergelijking met normaal dikkedarmweefsel. Momenteel zijn geen kwantitatieve gegevens beschikbaar met betrekking tot mRNA expressieniveaus van IGF-systeem componenten in verschillende locaties van de dikke darm. Bovendien is het onbekend of circulerende IGF-I en IGF-II eiwitten rechtstreeks de groei van humane dikkedarmtumoren beïnvloeden door binding en activering van de IGF-IR, of ze van invloed zijn op de lokale weefselexpressie van IGF-systeem componenten (bv. opregulatie van IGF-I, IGF-II, of IGF-IR), of dat ze een weerspiegeling zijn van de weefselexpressie van IGF-systeem componenten en daarmee een biomarker zijn van de bioactiviteit van IGF-systeem componenten in weefsel. Om dit meer diepgaand te onderzoeken werden bipten van macroscopisch normaal mucosaal weefsel verkregen op vier locaties in de dikke darm (colon ascendens, colon transversum, sigmoïd, en rectum) van 48 asymptomatische patiënten met een verhoogd risico op dikkedarmkanker (**Hoofdstuk 9**). We hebben op kwantitatieve wijze de mRNA expressieniveaus van IGF-I, IGF-II, IGF-IR, IGF-IIR en IGFBP-3 onderzocht met behulp van real-time RT-PCR. De eiwitexpressie van de IGF-IR in de colon ascendens en het rectum werd semikwantitatief beoordeeld met behulp van immunohistochemie. In aanvulling daarop bestudeerden we de relatie van weefsel mRNA en eiwitexpressie met serum IGF-I en IGF-II concentraties. Met uitzondering van de IGF-IIR waren de mRNA niveaus van alle onderzochte IGF-systeem componenten, evenals de eiwitexpressie van de IGF-IR, significant hoger in het rectum in vergelijking met het colon ascendens ($p \leq 0.001$). Circulerende IGF-I en IGF-II concentraties correleerden met geen enkele van de bestudeerde parameters in dikkedarmweefsel. Onze resultaten wijzen op differentiële expressie van IGF-systeem componenten in de humane dikke darm. Bovendien suggereren onze uitkomsten dat lokale en circulerende componenten van het IGF-I systeem differentieel gereguleerd zijn. Onze bevindingen onderschrijven het belang om rekening te houden met de locatie in de dikke darm wanneer voedingseffecten of farmacologische effecten worden onderzocht op mRNA expressie van IGF-systeem

componenten in dikkedarmweefsel.

Conclusies

In **Hoofdstuk 10** worden de uitkomsten van onze studies samengevat, bediscussieerd en geïntegreerd. In onze gerandomiseerde, gecontroleerde crossover studies werd geen verlagend effect gevonden van lycopene op de circulerende IGF-I concentraties bij vrouwen met een verhoogd risico op premenopauzale borskanker of bij mannen en vrouwen met een verhoogd risico op dikkedarmkanker. Isoflavonen verlaagden evenmin de circulerende IGF-I concentraties bij mannen en vrouwen met een verhoogd risico op dikkedarmkanker. Deze resultaten zijn in lijn met resultaten van eerdere studies. Interessant is dat lycopene de IGFBP-1 concentraties bij vrouwen en de IGFBP-2 concentraties bij mannen en bij vrouwen met een verhoogd risico op dikkedarmkanker deed toenemen en daarmee mogelijk de hoeveelheid biobeschikbaar IGF-I verlaagt. Bovendien suggereren onze resultaten dat isoflavonen mogelijk alleen de circulerende IGF-I concentraties zouden kunnen verlagen bij mannen die equol kunnen vormen, die ongeveer 30-50% van de Westerse bevolking uitmaken. Beide bevindingen moeten nader onderzocht worden in toekomstige gerandomiseerde, gecontroleerde studies. De resultaten van onze studies en ander bewijs dat tot nu toe is gepubliceerd ondersteunen geen gezondheidsclaims voor lycopene en isoflavonen in het verlagen van circulerende IGF-I concentraties bij vrouwen met een verhoogd risico op premenopauzale borstkanker noch bij mannen en vrouwen met een verhoogd risico op dikkedarmkanker. Hoewel zowel circulerende en lokale IGF-systeem componenten zijn gerelateerd aan het ontstaan van borstkanker en dikkedarmkanker hebben wij geen associatie gevonden tussen dikkedarmweefsel- en circulerende niveaus van deze componenten. Of IGF-I in de bloedcirculatie oorzakelijk gerelateerd is met het risico op kanker in de mens moet nader onderzocht worden.