

Nederlandse samenvatting

Er bestaan grote onderlinge verschillen tussen patiënten met darmkanker, oftewel colorectale carcinomen zowel op het niveau van de patient als op het niveau van tumorbiologie. Ondanks dit inzicht is de chirurgische en (neo-) adjuvante behandeling als mede de overleving van patiënten met een colorectale tumor de laatste jaren nagenoeg hetzelfde gebleven. De behandeling en klinische uitkomsten zijn nog steeds voornamelijk gebaseerd op de stadiering van de primaire tumor en de leeftijd van de patiënt.

Classificatie van colorectale carcinomen op basis van de huidige staging systemen en histopathologische kenmerken lijkt onvoldoende nauwkeurig. Inmiddels is aangetoond dat tumoren binnen hetzelfde TNM stadium een grote mate van variatie kunnen vertonen op moleculair niveau wat zich kan uiten in verschillend biologisch gedrag en klinische uitkomst. Specifieke profielen van chromosomale veranderingen, gen mutaties, microsatelliet instabiliteit, CpG promotor hypermethylering, micro RNA's en gen expressie blijken te zijn geassocieerd met prognose en respons op therapie. Tumor profiling, dat wil zeggen een indeling van tumoren gebaseerd op zulke genetische en epigenetische kenmerken, zou waarschijnlijk een nauwkeurigere tumor classificatie kunnen bieden en daarmee een meer individueel aangepaste therapie voor patiënten met een colorectaal carcinoom mogelijk maken.

Naast de heterogeniteit van de tumor zelf, bestaat er uiteraard een grote diversiteit tussen patiënten met colorectale tumoren, wat vanzelfsprekend de chirurgische uitkomsten, therapie keuze en oncologische resultaten beïnvloedt. Patiënten met verschillende eigenschappen vereisen een andere aanpak en behandel methode, zowel qua chirurgische interventie als qua pre- en postoperatieve behandeling. Het moge duidelijk zijn dat een ander aanpak nodig is voor jonge, gezonde, slanke patiënten, dan voor oudere, acuut opgenomen patiënten.

In dit proefschrift zijn diverse aspecten van tumor en patiënt profiling ter voorspelling van de klinische uitkomsten bij patiënten met een colorectaal carcinoom bestudeerd.

Deel I van het proefschrift richt zich voornamelijk op profiling van Stadium II colon carcinomen. Ongeveer de helft van alle colon carcinomen wordt postoperatief gestadiëerd als een stadium II colon carcinoom (T3-4N0M0, TNM classificatie, UICC) en dus voornamelijk uitsluitend behandeld met een chirurgische resectie van de tumor zonder adjuvante therapie. Ongeveer 20-30% van deze patiënten krijgt toch te maken met een recidief van de tumor, waaraan een groot deel van de patiënten komt te overlijden. Behalve enkele bekende hoog risico factoren zoals T4 tumoren, tumor perforatie of slecht gedifferentieerde tumoren, voorspelt de histopathologie van de tumor onvoldoende de recidief kans. Colon carcinomen worden gekenmerkt door chromosomale veranderingen, welke zijn geassocieerd met de biologische diversiteit op DNA niveau. Specifieke chromosomale patronen van adenomen, colon carcinomen in een vroeg stadium en gemetastaseerde carcinomen zijn gekoppeld aan specifieke klinische uitkomsten.

Deze chromosomale veranderingen kunnen worden gemeten op genoom wijde schaal met behulp van Comparative Genomic Hybridization (CGH). CGH met een hoge resolutie, gebruik makend van oligonucleotide probes, kan zeer kleine focale DNA veranderingen detecteren, die slechts een paar genen bevatten. Hoewel het identificeren van kandidaat kanker genen in deze kleine focale veranderingen overzichtelijker is dan in grote chromosomale veranderingen, blijft het nog steeds een grote uitdaging om precies aan te wijzen welke genen de drijvende kracht zijn achter het carcinogenetische proces. Zelfs wanneer het definitieve bewijs van het oorzakelijke verband nog niet geleverd is, kunnen deze DNA veranderingen desondanks al dienen als nieuwe markers voor prognose of als aangrijpingspunt voor therapie. Integratie van gen mutaties of gen expressie profielen met analyses van chromosomale veranderingen, kan helpen om het aantal potentiële kanker genen te verkleinen. In **hoofdstuk 2** zijn focale chromosomale veranderingen (<3 MB) bij patiënten met een stadium II colon carcinomen bestudeerd. Tumor weefsel van 38 patiënten met een stadium II colon carcinomen werd geanalyseerd met een hoge resolutie oligonucleotide array CGH platform. Eerst werd aangetoond dat kleine focale chromosomale veranderingen zelfs konden worden gedetecteerd met array CGH analyse in DNA dat uit paraffine gefixeerd tumor weefsel geïsoleerd was. Inderdaad werden identieke array CGH resultaten behaald met DNA geïsoleerd uit vers tumor weefsel en uit paraffine gefixeerd tumor weefsel van eenzelfde patiënt. Eveneens werden dezelfde resultaten behaald wanneer DNA uit paraffine gefixeerd weefsel van dezelfde patiënt werd gehybridiseerd op twee verschillende platformen, namelijk een Agilent 44K en een 135K Nimblegen array CGH platform. In totaal werden 81 focale chromosomale veranderingen (deleties en amplificaties) verspreid over het hele genoom gevonden. Deze focale chromosomale veranderingen konden worden gevalideerd met publiek beschikbare data van chromosomale veranderingen gevonden in colorectale, borst, pancreas carcinomen en glioblastomen. Opvallend was dat amplificaties meer colon specifiek leken, aangezien die minder overlap vertoonden met amplificaties in andere tumoren.

Voor 177 kandidaat kanker genen gevonden in de 81 focale veranderingen werd een correlatie tussen mRNA expressie en DNA kopie status gevonden wat verder de relevantie van deze focale veranderingen ondersteunt. Focale deletie van 5q34 en amplificatie van 13q22.1 waren onafhankelijke voorspellers voor de overleving van patiënten met een Stadium II colon carcinoom. Vele bekende en nieuwe kandidaat kanker genen werden in deze focale chromosomale veranderingen geïdentificeerd, waarvan een aantal nadere analyse motiveren.

Naast focale chromosomale veranderingen, komen grote chromosomale veranderingen zeer frequent voor in colorectale carcinomen. De prognostische waarde van deze grote chromosomale veranderingen is eerder bestudeerd, maar niet met een hoge resolutie array CGH analyse in een homogene groep van stadium II colon carcinoom patiënten, zoals in **hoofdstuk 3**. In deze studie werden deleties van chromosoom 4, 5, 15q, 17q en 18q meer gezien in tumoren van patiënten die recidief ziekte hadden vergeleken met patiënten die ziekte vrij bleven. Wanneer we alleen naar de microsatelliet stabiele tumoren keken was verlies van chromosoom 4q22.1-4q35.2 voorspellend voor een slechte prognose. Verlies van chromosoom 4 werd niet gezien in microsatelliet instabiele tumoren. Deze studie bevestigt dat MSI tumoren ook chromosomale veranderingen ten toon spreiden,

echter in een veel lagere frequentie en vooral bestaande uit DNA amplificaties. Verdere validatie van de prognostische waarde van 4q deletie in een onafhankelijke serie van patiënten met een colon carcinoom is nodig om de potentieel klinische waarde van de bevindingen te bevestigen.

Array CGH analyse van tumor weefsels gaat gepaard met technische uitdagingen. Golf artefacten in array CGH profielen verstoren de analyses van breekpunten en biologische informatie kan hierdoor verloren gaan. In **hoofdstuk 4** is een algoritme beschreven dat ontworpen is om golf artefacten in CGH profielen te verwijderen. Het script en instructies zijn beschikbaar op de website <http://www.few.vu.nl/~mavdwiel/nowaves>.

De biologie van tumoren kan uitgelezen worden op DNA, RNA en eiwit niveau. In **hoofdstuk 5** werd de prognostische waarde van de eiwit expressie van p21, p27, p53, EGFR, Her2/NeuKi-67, Cycline D1, TS, β -catenin en AURKA bestudeerd in een tissue micro experiment met immunohistochemie. Tumor weefsel van 386 stadium II and III colon carcinoom patiënten werd bestudeerd. De resultaten werden eveneens apart geanalyseerd voor MSI en MSS tumoren. Lage p21, hoge p53, lage cycline D1 en hoge AURKA eiwit expressie waren geassocieerd was met recidief ziekte in patiënten met stadium II en III colon carcinomen.

In deel II van dit proefschrift werden kenmerken van patiënten met colorectaal carcinoom in relatie tot klinische uitkomsten bestudeerd. Patiënt kenmerken, zoals co-morbiditeit en de algehele fysieke conditie ten tijde van de operatie zijn van cruciaal belang voor korte en lange termijn uitkomsten. Objectieve en reproduceerbare classificatie en definitie van de fysieke gesteldheid van een patiënt blijft complex. De Charlson co-morbiditeit index, de ASA classificatie en laboratorium waarden voorzien ten dele in objectieve informatie over de gezondheid van een patiënt. Scorings systemen, die patiënt factoren incalculeren zouden kunnen helpen om een reëel risico op postoperatieve mortaliteit en morbiditeit bij colorectale chirurgie in te schatten. Vele chirurgische risico modellen zijn gericht op de algemeen chirurgische praktijk, maar er zijn ook modellen specifiek ontwikkeld voor colorectale chirurgie. In **hoofdstuk 6** werd een overzicht gegeven van de nu beschikbare scorings systemen voor de algemeen en de colorectale chirurgische praktijk. De postoperatieve mortaliteit is nog steeds de belangrijkste gemeten uitkomst gemeten. Echter wanneer goede evaluatie van chirurgische zorg wordt verricht, zouden ook andere uitkomsten mee genomen moeten worden, zoals morbiditeit, lange termijn resultaten, en kwaliteit van leven. Externe validatie van veel scorings systemen is vaak nog niet uitgevoerd, wat nodig is voordat deze modellen betrouwbaar gebruikt kunnen worden om uitkomsten van zorg te vergelijken.

In **hoofdstuk 7** is de conditie van de patiënt met een colorectaal carcinoom op moment van operatie gedefinieerd met behulp van de fysiologische waarden van de POSSUM score, welke cardiovasculaire en respiratoire symptomen, systolische bloed druk, hartfrequentie, EMV score, ureum, kalium, hemoglobine, witte bloed cellen en ECG afwijkingen omvat. De fysiologische score was een

onafhankelijke voor speller voor de lange termijn overleving in stadium I, II en III colorectale carcinomen.

Toekomst perspectieven

De laatste jaren is het inzicht in de biologie van colorectale carcinomen en andere humane tumoren buitengewoon toegenomen, mede door het completeren van de volledige sequentie van het menselijke genoom in de "Human Genome Project" en de toegenomen ontwikkeling en beschikbaarheid van hoog resolutie technologische analyse methoden. Hiermee is een basis verleend voor potentieel klinische toepassingen van deze bevindingen. Recente belangrijke studies van sequentie analyses van alle coderende exonen in borst, colorectale, pancreas and hersenen tumoren hebben belangrijke nieuwe informatie in deze context verschaft. Deze studies laten zien dat het genomische landschap van vele carcinomen bestaat uit een aantal bergen (genen die gemuteerd zijn met een hoge frequentie) en vele kleine heuvels (genen die gemuteerd zijn met een lage frequentie). Veel genen die gemuteerd zijn met een hoge frequentie komen voor bij verschillende tumor typen, zoals PTEN en TP53. Aan de andere kant komen tumor specifieke genen zoals het APC gen in colorectale carcinomen ook voor. De technologische ontwikkelingen hebben het ook mogelijk gemaakt om somatische chromosomale veranderingen genoom wijd met een hoge resolutie te analyseren. Een van de grootste momenteel beschikbare analyse van 3131 hoog resolutie CGH profielen van 24 verschillende tumor typen geeft een stevig en veelomvattend inzicht het landschap van somatische chromosomale veranderingen in tumoren. Deze studie toont aan dat de meest voorkomende DNA kopie veranderingen of de grootte hebben van focale chromosomale veranderingen of van een heel chromosoom arm. Verdere studies, die de DNA kopie status en sequentie veranderingen integreren hebben veel nieuwe genen ontdekt die nog niet eerder in relatie tot tumorgenese waren geïmpliceerd. Deze analyses benadrukken het feit dat eerder veranderingen in bepaalde biologische processen dan individuele genen op zich de sleutel vormen voor het ontraffelen van tumor biologie en aanknopingspunten kunnen zijn voor therapie .

Deze recente studies laten echter slechts een glimp zien van de biologische complexiteit van humane tumoren. Voortgaande initiatieven om systematisch het kanker genoom te analyseren zal vele nieuwe prognostische, predictieve en therapeutisch targets opleveren. Uiteindelijk zal dit leiden tot een moleculair gebaseerde taxonomie ipv een histopathologische classificatie van tumoren .

De aankomende uitdaging is om deze ontdekkingen te vertalen in betekenisvolle nuttige klinische toepassingen, zowel voor de diagnostiek als therapie, en dit alles in een kosten effectieve manier. Om dit te bereiken, zal gemeenschappelijke inspanning van alle (bio-) medische disciplines nodig zijn, evenals een efficiënte infrastructuur met goede klinische trial organisatie, biobanken, nauwkeurige en complete data verzameling, analyse en opslag. Alleen wanneer aan al deze voorwaarden is voldaan, zal de biomedische wetenschap optimaal kunnen bijdragen aan het vernieuwen en verbeteren van de behandeling van patiënten met kanker.

Tegelijkertijd zijn de medisch technisch ontwikkelingen spectaculair verbeterd in de laatste decennia. Gespecialiseerde intensive care afdelingen, fast-track benadering van postoperatieve patiënten, beeld geleide radiotherapie, laparoscopische, robot en microscopische chirurgie hebben de mogelijkheden om patiënten met een colorectaal carcinoom te genezen met minder morbiditeit en mortaliteit uitgebreid. Technische vernieuwingen in de behandelingen van colorectale patiënten zullen zich verder ontwikkelen, echter het optimaliseren van patiënt gerelateerd factoren op moment van operatie is ook nodig om klinische uitkomsten te verbeteren. Preoperatieve optimalisatie en betere postoperatieve monitoring kunnen mogelijk de klinische uitkomst, vooral bij hoog risico patiënten, verbeteren.

Echter verwachtingen van patiënten wat betreft de medische mogelijkheden en de oncologische uitkomsten nemen toe. Binnen een aantal jaar zullen mortaliteit en morbiditeit cijfers per ziekenhuis en chirurg beschikbaar komen voor het grote publiek. Het is daarom van cruciaal belang dat er objectieve indicators van de uitkomst van zorg komen, en dat goede evaluatie van deze uitkomsten geschied. Factoren zoals de gezondheid van de patiënt, wijze van ziekte presentatie en uitgebreidheid van ziekte moeten eveneens meegenomen worden. Wanneer patiënt gerelateerde variabelen routinematig geïncorporeerd worden in bestaande kanker registratie systemen, zal kwaliteit van oncologische chirurgische zorg accurate geëvalueerd en vergeleken kunnen worden

Volledige integratie van tumor en patiënt profielen zal het mogelijk maken om een nauwkeurigere voorspelling te doen van een individuele prognose, een op maat gemaakte therapie in te stellen en klinische uitkomsten te verbeteren voor elke patiënt met een colorectaal carcinoom.