
NEDERLANDSE SAMENVATTING

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Tumoren (nieuwvormingen) ontstaan uit een lichaamscel als gevolg van een mutatie in het DNA van die cel, waardoor de celdeling ontremd raakt en een klompje cellen (tumor) kan ontstaan. Om van een kleine ("slapende of dormant") tumor uit te kunnen groeien tot klinisch relevante vormen van kanker is deze afhankelijk van de aanmaak van nieuwe bloedvaten. Dit proces heet angiogenese en bestaat uit deling, migratie en weefselinvasie van endotheelcellen. Algemeen wordt gedacht dat, wanneer angiogenese wordt verhinderd tumoren niet kunnen uitgroeien, zich niet uitzaaien en geen klinische problemen geven. Een belangrijke groeifactor voor de vorming van nieuwe bloedvaten is vascular endothelial growth factor (VEGF), een eiwit dat werkzaam is als groeifactor, geproduceerd kan worden door kankercellen en de endotheelcellen aanzet tot deling. Nadat het belang van angiogenese voor de tumorgroei was onderkend, zijn er klinische behandelingen gericht tegen angiogenese ontwikkeld. Hiertoe behoren onder andere het wegvangen van VEGF met een antilichaam (bevacizumab) en het blokkeren van de werking van VEGF receptoren met stoffen die aan deze receptoren kunnen binden, de zogenaamde tyrosine kinase remmers, zoals sunitinib en sorafenib die beide de tumorangiogenese en daarmee tumorgroei kunnen remmen. Deze therapie wordt daarom anti-angiogenese therapie genoemd.

Naarmate het aantal patiënten met kanker dat te maken krijgt met behandelingen waarvan een anti-angiogenese middel deel uitmaakt toeneemt, wordt het steeds belangrijker om in een zo vroeg mogelijk stadium de biologische effecten van de medicatie op het tumorendotheel te kunnen meten en om vast te kunnen stellen of er een relatie met het anti-tumoreffect is.

De tumorgroei-remmende effecten van angiogenese-remmers zijn in tegenstelling tot klassieke chemotherapie niet altijd dosisafhankelijk. "Hoe meer, hoe beter" geldt hierbij dus niet altijd. Daarom is een betrouwbare parameter die vroeg tijdens de behandeling voorspellend kan zijn voor de biologische activiteit en voor het anti-tumoreffect van de anti-angiogenese behandeling van essentieel belang.

Momenteel probeert men in klinische trials op verschillende manieren en met verschillende technieken parameters te testen die vroege effecten van angiogenese remmers op de tumorvasculatuur kunnen reflecteren. Deze parameters worden ook wel 'biomarkers' genoemd. Voorbeelden van niet-invasieve technieken die gebruikt worden voor het onderzoek naar biomarkers zijn bloeddorstroming, vaat- permeabiliteit en bloeddruk waarbij men gebruikt maakt van technieken zoals dynamische MRI, CT of PET-scanning. Naast deze in vivo technieken wordt er ook gekeken of er biomarkers in het bloed geschikt zijn voor het meten van de effectiviteit van angiogenese remmers. Deze laatste categorie biomarkers kan worden onderverdeeld in 1) metingen van plasma- of serumeiwit (zoals het target-eiwit VEGF of de oplosbare vorm van de VEGF receptoren,

sVEGFR1/ sVEGFR2), of 2) metingen van de aantallen en/of eigenschappen van circulerende endotheelcellen (CECs).

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift omvat een nader onderzoek naar CECs als biomarker bij patiënten behandeld met angiogenese remmers voor de voorspelling van respons en prognose.

Endotheelcellen vormen een laag cellen (het endotheel) aan de lumenale zijde (binnenkant) van elk bloedvat. In de normale rustende fysiologische toestand is er een balans tussen stimulerende en remmende factoren voor het vernieuwen van het endotheel voor de aanmaak van nieuwe bloedvaten. Bij endotheelschade, bijvoorbeeld bij verwondingen, wordt de endotheellaag hersteld door een tijdelijke stimulering van de endotheelceldeling. Een van de belangrijkste factoren die nieuwe bloedvatvorming bevorderen/ induceren, is een te lage hoeveelheid zuurstof, die in weefsels en cellen optreedt als gevolg van beschadigde (wond) of te grote afstand (tumoren) van bloedvaten. De toestand van te weinig zuurstof, hypoxia (Nederlands woord is "hypoxie") geheten, zorgt voor de aanmaak van een hele scala aan eiwitten, zoals VEGF, maar ook erythropoietine (EPO), die het zuurstof transport naar de cellen bevorderen. In tumoren is de vorming van nieuwe (micro)vaatjes en de turnover van endotheelcellen verstoord en ligt vele malen hoger dan in rustend weefsel.

Endotheelcellen in circulatie, CECs, zijn endotheelcellen die door schade of 'ouderdom' hun adhesie aan de basaalmembraan verliezen en daardoor in de circulatie komen. Theoretisch gezien verwacht men dat het aantal CECs bij patiënten met kanker hoger is dan bij gezonde personen, door het verstoorde vasculaire netwerk in tumoren. Binnenin een tumor is er een constante reconstructie van het vasculaire netwerk om aan de behoefte van de groeiende tumor te kunnen voldoen.

Er zijn tenminste 2 typen CECs in het perifere bloed te onderscheiden: rijpe, waarschijnlijk afstervende endotheelcellen, die losgelaten hebben van de vaatwand (rijpe of mature CECs) en onrijpe voorlopercellen, mogelijk afkomstig uit het beenmerg (circulerende progenitor cellen; CEPs). Beide typen cellen zouden in theorie geschikt kunnen zijn om effecten van angiogenese remmers te meten.

In **hoofdstuk 1** wordt een algemene inleiding gegeven over angiogenese, tumor angiogenese en de rol van circulerende cellen daarin. Tevens wordt hypoxie als belangrijkste stimulus voor de vorming van nieuwe bloedvaten in tumoren besproken, gevolgd door een overzicht van de mogelijke anti-angiogene, anti-kankertherapieën. Verschillende mogelijkheden van biomarker onderzoek worden weergegeven en tot slot wordt de doelstelling en inhoud van dit proefschrift geschetst.

Voor het monitoren van de effecten van anti-angiogene therapie op het aantal of de eigenschappen van CECs en voorlopercellen bij kanker patiënten is het van belang dat er

een eenvoudig toepasbare en betrouwbare methodiek beschikbaar komt. De twee belangrijkste limiterende aspecten voor het meten van CECs als biomarker zijn het extreem lage aantal van deze cellen in bloed (0-100 mL) aanwezig en het ontbreken van unieke markers op de CEC celpopulatie(s) die een ondubbelzinnige identificatie mogelijk zouden maken. Dit betekent dat er een hoge gevoeligheid en betrouwbaarheid van de analytische technieken vereist is en dat er combinaties van markers gebruikt moeten worden voor het zo goed mogelijk identificeren van de CECs. In **hoofdstuk 2** beschrijven wij vier celpopulaties welke positief zijn voor de receptor van het target-eiwit VEGFR2, de betrouwbaarheid en methodiek van het meten van deze populaties en de aantallen van deze cellen in gezonde personen en in een groep patiënten met kanker. CECs worden gezien als potentiële biomarkers die informatie kunnen verschaffen over de vasculaire staat in de tumor van patiënten met kanker die behandeld worden met angiogenese remmers. Op deze manier kan wellicht meer inzicht komen in (vroeg) effecten van anti-angiogene anti-kankertherapie of het selecteren van die patiënten die baat kunnen hebben bij deze manier van therapie. In **hoofdstuk 3** wordt een klinische studie beschreven waarbij het middel sunitinib (een VEGFR remmer) wordt gegeven aan nierkanker patiënten. Deze studie laat zien dat de CECs in tegenstelling tot de hematopoietische stamcellen (HPCs) stijgen tijdens de behandeling met sunitinib en bij het stoppen van de behandeling weer dalen naar vergelijkbare aantallen als voor de start van de therapie. Van deze patiënten is ook het VEGF en erythropoetine (EPO) –eiwit in het plasma bepaald. Zowel VEGF als EPO levels waren verhoogd gedurende de behandeling in parallel met de stijgende CEC aantallen. We zagen significante veranderingen van CECs en HPCs tijdens de behandeling met sunitinib en de stijgende CECs waren geassocieerd met progressie-vrije overleving. Er werd geen relatie gevonden tussen de veranderingen in CECs of HPCs tijdens de behandeling en de tumor respons op basis van RECIST.

Een interessante vraag is waarom CECs, de cellen met endotheliale kenmerken, stijgen tijdens een behandeling met een angiogenese-remmer. Dit terwijl een angiogenese-remmer juist als doel heeft deling van endotheelcellen te hinderen. Hierbij zijn verschillende interpretaties mogelijk; 1) de toename van de CECs tijdens sunitinib behandeling zou te wijten kunnen zijn aan het los laten van (beschadigde) endotheelcellen en zo de sunitinib anti-vasculaire effecten kunnen weerspiegelen, 2) of de CEC populatie zou (deels) de voorlopercel-achtige EPCs/ECFCs kunnen bevatten welke als reactie op sunitinib geïnduceerde (tumor) hypoxie een verhoging in het bloed van de patiënt veroorzaken. De mogelijke verklaringen hiervoor zijn in detail besproken in hoofdstuk 3 en 6.

In aanvulling op hoofdstuk 3 hebben we in **hoofdstuk 4** de hemoglobine concentraties in het bloed bestudeerd in dezelfde groep patiënten die werden behandeld met sunitinib.

Deze concentraties bleken net als de CECs en VEGF ook het cyclische patroon van het doseringsschema (4 weken medicijn, 2 weken zonder) te volgen. In deze 'letter to the editor' wordt als een mogelijke verklaring voor de hemoglobine stijging onder invloed van sunitinib gegeven: namelijk een tijdelijk verlies van intravasculaire vloeistof veroorzaakt door remming van VEGFR2 en de daaropvolgende reductie van stikstofoxide. Dit in tegenstelling tot een eerder gepubliceerde studie die een verhoging van de erythropoëse als mogelijke oorzaak hiervan gaf.

In **hoofdstuk 5** hebben we onderzocht of de toename in CECs en afname van HPCs specifiek was voor angiogenese-remmers. We hadden de mogelijkheid om dit te testen in een groep niet-kleincellige longkanker patiënten die behandeld werden met drie verschillende behandelingsschema's allen in combinatie met de EGFR remmer erlotinib (ER). Een groep werd behandeld met de tyrosine kinase (TK)-remmer sorafenib (SO/ER), de andere groep werd behandeld met anti-VEGF antilichaam bevacizumab (BV/ER), en een laatste (kleine) groep patiënten werd behandeld met monotherapie ER welke in deze studie als controle-groep fungeerde. In deze studie werd bevestigd dat de toename van CECs (anti-VEGF) angiogenese-remmer specifiek was. In zowel de SO/ER als de BV/ER behandelde patiënten werd er een vergelijkbare toename in CECs gedetecteerd, die niet gezien werd bij patiënten behandeld met monotherapie ER. In deze studie gaven de CECs geen voorspellende waarde voor de response op de behandeling met SO/ER of BV/ER. Wat betreft de HPC populatie werd er alleen een daling gevonden bij de patiëntengroep behandeld met SO/ER. Dit lijkt consistent met de eerdere groep sunitinib behandelde patiënten. Beide stoffen hebben een vergelijkbaar spectrum van receptoren waarop ze werkzaam zijn, waartoe voor beide de receptor TKs, Flt3 en c-Kit behoren. Naast de totale HPC populatie werd in deze studie ook de subpopulatie CD133-positieve HPCs gevolgd omdat CD133 een primitievere subpopulatie cellen markeert en aangezien het consistent gerapporteerd werd dat deze cellen pro-angiogene eigenschappen bezitten. Het basisniveau van de CD133+/ HPCs was significant hoger in de patiënten die niet reageerden op SO/ER behandeling, en de groep patiënten met CD133+/HPCs aantallen hoger dan de mediaan van deze groep patiënten hadden een kortere tijd tot progressie. Wellicht draagt de daling van de CD133+/HPCs (veroorzaakt door een suppressie van het beenmerg) bij aan het anti-tumor effect van sorafenib doordat minder van deze pro-angiogene progenitor cellen door de groeiende tumor kunnen worden aangetrokken.

In de voorgaande hoofdstukken is aandacht besteed aan de potentiële biomarkers 'circulerende endotheel cellen' en 'endotheliale voorloper cellen' en de mogelijke rol van deze cel populaties bij de voorspelling van respons op behandeling met angiogenese-remmers bij kanker patiënten. Naast het klinische translationele onderzoek hebben wij

ook onderzoek verricht naar de functionele eigenschappen van deze verschillende cellen. We hebben bestudeerd hoe zij zich gedragen onder lage zuurstof spanning (hypoxie), een conditie die de micro-omgeving van tumorcellen of in hypoxische (ischemische) weefsels bij hart –en vaatziekten nabootst. Het onderzoek dat wordt beschreven in **hoofdstuk 6** van dit proefschrift draagt hieraan bij. Op dit moment zijn er zijn twee typen 'endotheliale voorloper cellen', die van elkaar onderscheiden kunnen worden op basis van het type en de duur van in vitro kolonie vorming, namelijk vroege –en late uitgroeiende kolonies. De vroege 'endotheliale voorloper cellen' hebben een HPC, myeloïde/ monocytair karakter met pro-angiogene eigenschappen maar hebben geen vermogen om te differentiëren naar endotheelcellen. De zogenaamde laat uitgroeiende 'endotheliale voorloper cellen', zijn aanwezig in hele lage aantallen en zijn endotheliaal van aard, en worden aangeduid als 'endotheelkolonie vormende cellen' (endothelial colony forming cells; ECFCs). Mogelijk zijn de ECFCs functioneel en structureel betrokken bij het herstel van de endotheellaag bij vasculaire schade, bij het stimuleren van de tumor (her)groei in de hypoxische tumor gebieden en potentieel toepasbaar in weefselregeneratie. Omdat hypoxie hierbij een grote rol speelt hebben we de kolonievormende capaciteit van de primaire circulerende ECFCs uit navelstrengbloed onder 1% zuurstof vergeleken met de veel gebruikte in vitro kweekomstandigheden van 21% zuurstof. Hoofdstuk 6 laat zien dat primaire circulerende ECFCs niet in staat waren endotheliale kolonies te vormen wanneer ze in eerste instantie waren blootgesteld aan een lage zuurstof spanning (1% O₂). De gepresenteerde data in dit hoofdstuk zijn ten gunste van een vermeende differentiatie stop, maar totdat het mogelijk is deze cellen te zuiveren van het navelstrengbloed om deze bijvoorbeeld te kloneren voor verder onderzoek is het moeilijk een definitieve oorzaak te vinden voor de resultaten gevonden in dit onderzoek.

In dit proefschrift is de waarde van CECs als biomarker voor het selecteren en monitoren van patiënten die baat zullen hebben van angiogenese-remmende medicatie onderzocht. Tevens zijn de CECs blootgesteld aan lage zuurstof spanning (hypoxia) als een modelsysteem voor een tumor micro-omgeving en in situaties van lage zuurstof in weefsel zoals bij hart –en vaatziekten (wondgenezig).

De resultaten beschreven in dit proefschrift dragen vooral bij aan een betere identificatietechniek van circulerende endotheelcellen in het perifere bloed en het gebruik van deze cellen als biomarker bij kanker patiënten behandeld met angiogenese remmers. Uiteindelijk zullen grote en gerandomiseerde klinische studies moeten uitwijzen of CECs daadwerkelijk geschikt zijn als biomarker bij patiënten die worden behandeld met anti-angiogenese medicatie.
