

# Hoofdstuk 9

## Samenvatting en Conclusies



## SAMENVATTING EN CONCLUSIES

Om een hematogene metastase te vormen moeten circulerende tumorcellen vele afweermechanismen overwinnen alvorens ze kunnen aanhechten aan het endotheel van een orgaan. Vervolgens migreren de tumorcellen door deze laag, waarna aanhechting aan en invasie door de extracellulaire matrix plaats vindt zodat de tumorcellen binnendringen in het orgaan en kunnen uitgroeien om een metastase te vormen. Inplanting van circulerende tumorcellen blijkt erg inefficiënt te zijn en de meeste tumorcellen worden snel vernietigd. Niettemin blijven recidieven naar organen op afstand na een in opzet curatieve operatie een groot probleem voor de meeste gastro-intestinale tumoren. De manipulatie van de primaire tumor tijdens de resectie verhoogt het aantal circulerende tumorcellen, maar dit verklaart het hoge recidiefpercentage niet voldoende. Uit voorgaande *in vivo* en *in vitro* studies bleek dat het chirurgisch trauma zelf het ontstaan van locoregionale recidieven bevordert via de ontstekingsreactie die het opwekt. De doelstelling van dit proefschrift is de invloed van het chirurgisch trauma op het ontstaan van tumorrecidief op afstand te onderzoeken.

### Chirurgisch trauma en tumorrecidief op afstand: *in vivo*

Hoewel chirurgische resectie de meest effectieve therapie voor naar de lever gemetastaseerde colorectale tumoren blijft, is het recidiefpercentage hoog. Algemeen wordt gedacht dat tumorgroei- bevorderende factoren die vrijkomen tijdens leverregeneratie verantwoordelijk zijn voor dit hoge recidiefpercentage. Deze hypothese werd geevalueerd in **hoofdstuk 2**. Een *in vivo* rattenmodel werd ontwikkeld waarin het effect van leverresectie op tumorrecidief in de longen werd onderzocht. Een gedeeltelijke leverresectie gevolgd door het perifeer inspuiten van CC531 rattencoloncarcinoma cellen resulteerde in een significant verhoogd aantal tumornoduli in de longen vergeleken met een 'sham' operatie. Echter, de toevoeging van serum, verkregen van ratten die een partiele leverresectie ondergingen, aan *in vitro* culturen van CC531 cellen verhoogde niet de groei van deze cellen. Verder werd alleen maar een verhoging in het aantal tumornoduli waargenomen wanneer de resectie werd uitgevoerd kort voor het inspuiten van de tumorcellen, maar niet wanneer de resectie een dag voor of een dag na het inspuiten werd verricht. Het tumorbevorderende effect van een partiele leverresectie is dus slechts aanwezig gedurende een korte tijdsperiode peri-operatief. Daarnaast geeft partiele ileumresectie ook een verhoging van het aantal tumornoduli wat indiceert dat het chirurgisch trauma in het algemeen en niet alleen een partiele leverresectie leidt tot een verhoogd tumorrecidief. Deze resultaten sluiten een rol voor tumorgroei-bevorderende factoren geproduceerd door de regenererende lever uit in het verhoogd tumorrecidief na een partiele leverresectie. Een effect van het chirurgisch trauma

op bindingsinteracties tussen circulerende tumorcellen en het endotheel van de long lijkt het verantwoordelijke mechanisme.

### Chirurgisch trauma en tumorrecidief op afstand: *in vitro*

De voorgaande experimenten uitgevoerd in een diersmodel demonstreerden een relatie tussen het chirurgisch trauma en tumorrecidief op afstand. Het chirurgisch trauma veroorzaakt zowel lokaal als systemisch een ontstekingsreactie waarin leukocyten worden geactiveerd en zodoende ontstekingsmediatoren uitscheiden zoals de pro-inflammatoire cytokinen en zuurstofradicalen. Onze hypothese is dat deze factoren de bindingsinteracties tussen tumorcellen en het microvasculair endotheel moduleren.

Om de overstap te maken van een diersmodel naar een humaan model werden humane *in vitro* modellen ontwikkeld. In deze modellen kunnen de bindingsinteracties tussen tumorcellen en microvasculaire endotheelcellen, welke een zeer belangrijke stap vormen in metastasering, worden onderzocht zonder interferentie van onbekende *in vivo* factoren. Op deze manier kan een beter inzicht in de rol van specifieke onderdelen van de ontstekingsreactie veroorzaakt door het chirurgisch trauma in deze bindingsinteracties worden verkregen.

Tijdens een ontsteking, zoals veroorzaakt door een chirurgisch trauma, worden leukocyten geactiveerd die pro-inflammatoire cytokinen produceren. In **hoofdstuk 3** werd de invloed van de belangrijkste pro-inflammatoire cytokinen IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  en IL-6 op de aanhechting van de humane HT29 coloncarcinomacellijn aan het endotheel onderzocht. Een onderscheid werd gemaakt tussen aanhechting aan humane macrovasculaire endotheelcellen afkomstig van navelstrengvenen, welke het meest worden gebruikt voor *in vitro* modellen omdat ze makkelijk verkrijgbaar zijn, en aanhechting aan humane microvasculaire endotheelcellen van de long. Deze laatste cellen zorgen voor een realistischer model, aangezien de aanhechting plaats vindt in de microcirculatie.

Pre-incubatie van de microvasculaire endotheelcellen met IL-1 $\beta$  of TNF- $\alpha$ , maar niet met IL-6, resulteerde in een concentratie- en tijdsafhankelijke toename in tumorceladhesie met tenminste 150% (t.o.v. de controle). Vergelijkbare resultaten werden gevonden voor de aanhechting aan macrovasculair endotheel. Pre-incubatie van de tumorcellen moduleerde niet de adhesieve interacties. Blootstelling van de endotheelcellen aan IL-1 $\beta$  of TNF- $\alpha$  veroorzaakte een tijdsafhankelijke opregulatie van de adhesiemoleculen E-Selectine, ICAM-1 en VCAM-1 overeenkomend met de tumorceladhesie. De bijpassende receptoren sialyl Lewis<sup>a</sup> en <sup>x</sup>, LFA-1 en VLA-4 komen tot expressie op HT29. Hoewel de binding aan geactiveerd macrovasculair endotheel E-Selectine afhankelijk is, is de binding aan geactiveerd microvasculair endotheel niet afhankelijk van E-Selectine en wordt waarschijnlijk gevormd door een complex van adhesiemoleculen.

De rol van deze pro-inflammatoire cytokine in de aanhechting van pancreascarcinomacellen aan microvasculair endotheel werd bestudeerd in **hoofdstuk 4**. Wederom leidde pre-incubatie van het endotheel met IL-1 $\beta$  of TNF- $\alpha$ , maar niet met IL-6, tot een significante toegenomen aanhechting van de drie pancreascarcinomacellijnen PanC1, BxPC3 en MiaPaCa. Blootstelling van de pancreascarcinomacellen aan deze cytokinen beïnvloedde de aanhechting niet, zoals dat ook werd waargenomen voor de coloncarcinomacellen. In tegenstelling tot de aanhechting van pancreascarcinomacellen aan macrovasculair endotheel, welke volgens de literatuur E-Selectine afhankelijk is, is de aanhechting aan microvasculair endotheel noch E-Selectine noch ICAM-1 afhankelijk.

Tijdens het chirurgisch trauma worden polymorfonucleaire leukocyten (PMN) geactiveerd wat leidt tot de productie van zuurstofradicalen. Voorgaande diermodellen bewezen dat deze zuurstofradicalen een belangrijke rol speelden in het verhoogde lokale tumorrecidief na chirurgisch trauma. In **hoofdstuk 5** vonden we dat blootstelling van het endotheel aan geactiveerde PMN de aanhechting van zowel colon- als pancreascarcinomacellen aan dit endotheel doet toenemen. De zuurstofradicalen superoxide anion, de belangrijkste zuurstofradicaal geproduceerd door PMN, en waterstofperoxide zijn voor het grootste deel verantwoordelijk voor deze toename, aangezien toevoeging van de anti-oxidantenzymen superoxide dismutase en/of catalase een aanzienlijke reductie geeft in deze toename.

Om de invloed van zuurstofradicalen op tumorcel-endotheelcellinteracties in meer detail te bestuderen, werd het superoxide anionproducerende complex xanthine/xanthine-oxidase gebruikt (**Hoofdstuk 6**). Dit complex beïnvloedde de tumorceladhesie vergelijkbaar overeenkomstig als de PMN dat deden. Wederom konden de interacties gereduceerd worden door toevoeging van de anti-oxidantenzymen superoxide dismutase en/of catalase. Blootstelling van het endotheel aan zuurstofradicalen bracht de cellen in apoptose met begeleidende verhoging in expressie van de celadhesiemoleculen E-Selectine, ICAM-1 en VCAM-1. De verhoogde expressie van deze adhesiemoleculen zou het mechanisme van de geobserveerde toename in adhesie kunnen verklaren.

## Tumorcelinteracties met de extracellulaire matrix (ECM)

Na de aanhechting aan het microvasculair endotheel is de volgende stap in succesvolle metastasering de invasie door deze laag en vervolgens aanhechting aan de onderliggende ECM. Daarom is in **hoofdstuk 7** een reproduceerbaar humaan in vitro model ontwikkeld om de aanhechting van 2 coloncarcinomacellijnen, HT29 en Caco2, aan de belangrijkste componenten van de ECM te bestuderen. Deze belangrijke componenten bestaan uit collageen type I en IV, fibronectine en laminine. Beide coloncarcinomacellijnen vertonen een sterke aanhechting aan de ECM, hoewel het adhesiepatroon aan de verscheidene componenten verschilde tussen de 2 cellijnen. Voor HT29, de hoogste aanhechting werd

bereikt aan collageen type I (60.9%) en de laagste aan fibronectine (20.6%), terwijl voor Caco2 de hoogste adhesie werd gezien aan collageen type IV (51.4%) en de laagste aan laminine (21.9%). Om te bestuderen hoe de binding tussen deze tumorcellen en de componenten van de ECM tot stand is gekomen, werden inhibitiestudies uitgevoerd met gebruik van functionele blokkerende antilichamen. Het effect van de antilichamen tegen ICAM-1, VCAM-1 en de VLA-integrinen werd bestudeerd. Deze studies toonden duidelijk dat de  $\alpha$ 2- en  $\alpha$ 6-unit een belangrijke rol spelen in de binding tussen de tumorcellen en componenten van de ECM, hoewel beide tumorcellijnen een verschillend adhesiepatroon aan de matrixcomponenten vertoonden. Toch blijft de exacte identiteit van adhesiemoleculen in deze aanhechting onduidelijk vanwege de complexiteit waaruit de matrix bestaat en de heterogeniteit tussen de tumorcellijnen.

## CONCLUSIES

- De toegenomen metastasering na partiële leverresectie lijkt niet te worden veroorzaakt door stimulatie van tumorgroei, maar door toename van adhesieve interacties tussen tumorcellen en het microvasculaire endotheel. (Hoofdstuk 2)
- Niet alleen partiële leverresectie, maar chirurgie in het algemeen stimuleert de ontwikkeling van tumorrecidief op afstand. (Hoofdstuk 2)
- Blootstelling van microvasculair endotheel aan de pro-inflammatoire cytokinen IL-1 $\beta$  of TNF- $\alpha$ , maar niet IL-6, resulteert in een significante toename van de aanhechting van zowel colon- als pancreascarcinomacellen aan dit endotheel. (Hoofdstuk 3 en 4)
- De tumorceladhesie aan microvasculair endotheel is niet afhankelijk van E-Selectine, terwijl de adhesie aan macrovasculair endotheel wel E-Selectine afhankelijk is. (Hoofdstuk 3 en 4)
- Geactiveerde PMN verhogen de aanhechting van colon- en pancreascarcinomacellen aan het microvasculair endotheel. (Hoofdstuk 5)
- De zuurstofradicalen zijn de belangrijkste daders in de toegenomen tumorceladhesie veroorzaakt door geactiveerde PMN. (Hoofdstuk 5)
- Blootstelling van het microvasculair endotheel aan superoxide anionen verhogen tumorcel-endotheelcelinteracties. (Hoofdstuk 6)
- Superoxide anionen veroorzaken apoptose van de endotheelcellen wat leidt tot een verhoogde expressie van adhesiemoleculen. (Hoofdstuk 6)

- Adhesieve interacties tussen tumorcellen en het microvasculair endotheel worden niet gemoduleerd door blootstelling van de tumorcellen aan pro-inflammatoire cytokinen of zuurstofradicalen. (Hoofdstuk 3, 4 en 6)
- Colonicarcinomacellijnen vertonen een sterke aanhechting aan de ECM, hoewel het adhesiepatroon aan de verscheidene componenten verschilt tussen de tumorcellijnen.
- **De ontstekingsreactie welke ontstaat door chirurgisch trauma verhoogt de ontwikkeling van metastasen op afstand, waarschijnlijk doordat de binding van circulerende tumorcellen aan het microvasculair endotheel wordt bevorderd.**

