

Chapter 10

*Samenvatting, conclusies en
toekomstperspectieven*

Samenvatting, conclusies en toekomstperspectieven.

Dikkedarmkanker of colorectaal carcinoom (CRC) is de tweede meest voorkomende oorzaak van sterfte aan kanker in de westerse wereld. Hoewel de afgelopen jaren vooruitgang is geboekt met betrekking tot chirurgische technieken en de ontwikkeling van nieuwe chemotherapeutische behandelingen is de 5-jaars overleving nog steeds rond de 60%¹. Alvorens de studies die in het kader van dit proefschrift zijn verricht samen te vatten zullen enkele nieuwe ontwikkelingen binnen het onderzoek naar oorzaken, diagnostiek en behandeling van CRC worden besproken.

Veel onderzoek houdt zich bezig met het verbeteren van vroege opsporing van CRC of het voorstadium ervan, de adenomateuze poliep, bijvoorbeeld door screening van de bevolking en door periodiek endoscopisch onderzoek van mensen met een verhoogd risico op de ontwikkeling van CRC. Hiertoe behoren personen met een bepaalde genetische predispositie zoals familiale adenomateuze polyposis (FAP) en hereditair non-polyposis colorectaal carcinoom (HNPCC), personen met een belaste familieanamnese voor CRC, patiënten met eerdere adenomen of CRC of patiënten met langer bestaand inflammatoir darmlijden. De laatste tijd is veel onderzoek gedaan ter verbetering van het identificeren van personen die behoren tot HNPCC families aangezien periodieke endoscopische controles bij deze populatie de overlevingscijfers blijken te verbeteren.

Op dit moment zijn verschillende screeningstechnieken beschikbaar, te weten het testen van feces op occult bloed, sigmoïdoscopie en colonoscopie, waarbij elk onderzoek zijn voor- en nadelen kent. Screeningstechnieken zullen mogelijk in de nabije toekomst worden uitgebreid met methoden als CT- of MR-colografie (zogenaamde virtuele colonoscopie), detectie van eiwitten in serum ('proteomics') en de opsporing van moleculair genetische afwijkingen in ontlasting van patiënten met CRC¹. Daarnaast is men bezig om endoscopische technieken te verbeteren, met name om maligne of premaligne weefsel beter te herkennen, zoals door het gebruik van bepaalde kleurstoffen of endoscopen met de mogelijkheid om beelden sterk te vergroten.

Daarnaast wordt het potentieel belang van chemopreventieve maatregelen toenemend erkend, met name voor populaties met een hoog risico op CRC. Chemopreventie is het gebruik van geneesmiddelen of natuurlijk voorkomende stoffen die de ontwikkeling van CRC of adenomateuze poliepen remmen. Hoewel van een aantal middelen een beschermend effect is aangetoond, zoals bepaalde non-steroidale anti-inflammatoire drugs (NSAIDs), calcium en ursodeoxycholzuur, is het effect niet compleet en is er behoefte aan meer effectieve middelen. Een veelbelovende aanpak bestaat uit het combineren van verschillende chemopreventieve middelen. Een dergelijke strategie in het diermodel voor FAP, waarbij de combinatie van een NSAID met een remmer van het zogenaamde epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase werd gegeven, leverde veelbelovende resultaten op². De werkzaamheid van dergelijke combinaties verdient zeker verder onderzocht te worden.

Een andere gebied van ontwikkeling betreft het verbeteren van de effectiviteit van

chemotherapie. Chemotherapie bij CRC wordt gebruikt in de adjuvante setting bij patiënten met stadium III colontumoren en zijn onderwerp van studie bij stadium II/III rectumtumoren. In de palliatieve setting wordt chemotherapie gegeven bij patiënten met stadium IV CRC. Of adjuvante chemotherapie ook van waarde is bij patiënten met stadium II colonkanker is controversieel, maar er lijkt een zekere subpopulatie te bestaan die er voordeel van kan hebben. Pogingen worden ondernomen om genetische of eiwitmarkers te identificeren in patiënten met stadium II colonkanker die terugkeer van de ziekte voorspellen³ en in patiënten met stadium II/III CRC om de gevoeligheid voor chemotherapie te voorspellen⁴. De toegenomen kennis van de moleculaire biologie van CRC heeft ook geleid tot het herkennen van moleculaire aangrijpingspunten in tumoren van CRC patiënten, die specifiek geattaqueerd kunnen worden. De verwachting is dat een dergelijke aanpak resulteert in een directe verstoring van het groeiproces van kankercellen, waarbij gezonde cellen relatief ongemoeid worden gelaten, in tegenstelling tot de situatie bij de huidige cytostatica. Kortgeleden zijn de eerste van dergelijke middelen geïntroduceerd in de klinische praktijk. Het betrof in dit geval antilichamen gericht tegen EGFR en VEGF (vascular endothelial growth factor)^{5,6}. Over het algemeen geldt dat een toenemend kennisniveau van de moleculaire achtergrond van CRC nieuwe aangrijpingspunten zal opleveren voor de behandeling ervan.

De ontwikkeling van CRC wordt gekenmerkt door een aantal opeenvolgende gebeurtenissen waarbij normaal colonepitheel geleidelijk verandert naar kanker, in de meeste gevallen via het tussenstadium van een adenomateuze poliep. Dit wordt de zogenaamde adenoom-carcinoom sequentie genoemd. Deze sequentie wordt gedreven door een opeenstapeling van moleculaire veranderingen met als gevolg progressieve verstoringen in normale celgroei, celdifferentiatie en apoptose. Apoptose, ook wel bekend als geprogrammeerde celdood, speelt een belangrijke rol in de ontwikkeling van weefsels en in het onderhouden van een zeker evenwicht in die weefsels. Apoptose is ook een mechanisme om potentieel bedreigende cellen op te ruimen, bijvoorbeeld cellen die genetische schade hebben opgelopen, zoals tumorcellen. Verstoringen in de normale functie van apoptotische mechanismen zijn een bijdragende factor in de ontwikkeling van CRC. Daarnaast is het zo dat resistentie tegen apoptose nogal eens de effectiviteit van chemotherapie of radiotherapie belemmert.

Tijdens apoptose wordt een complex programma geïnitieerd dat uiteindelijk leidt tot de dood van de cel. Dit programma kan grofweg op twee verschillende manieren worden aangeschakeld namelijk via de 'extrinsieke' route en de 'intrinsieke' route. De extrinsieke route wordt geactiveerd door het aanzetten van zogenaamde death receptoren op het celoppervlak, leidend tot activatie van de intracellulaire apoptotische machinerie. De intrinsieke route wordt geactiveerd via mitochondrieën door cellulaire stress, bijvoorbeeld na DNA schade veroorzaakt door chemotherapie of radiotherapie. De intrinsieke route wordt onder andere gereguleerd door eiwitten van de Bcl-2 familie en eiwitten genaamd inhibitors of apoptosis (IAPs). De verdere ontrafeling van de moleculaire mechanismen die een rol spelen bij de regulatie van deze processen is van belang omdat kennis hierover ongetwijfeld aangrijpingspunten zal bieden voor gerichte therapieën.

Tumour necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is een eiwit dat behoort tot de TNF superfamilie. TRAIL initieert de extrinsieke apoptotische route na binding aan de membraangebonden receptoren DR4 en DR5. TRAIL kan ook binden aan de zogenaamde decoy receptoren DcR1 en DcR2 die geen apoptotisch signaal doorgeven. De fysiologische betekenis van TRAIL is nog niet goed bekend. Er zijn gegevens die een rol in immuunmodulatie suggereren. In vitro induceert TRAIL apoptose in kankercellijnen van diverse origine maar niet in normale cellen. Dierexperimenteel onderzoek in muizen en apen gaf aan dat recombinant TRAIL sterke tumorreducerende eigenschappen heeft en niet gepaard gaat met veel systemische toxiciteit. Om deze redenen wordt TRAIL beschouwd als een veelbelovend nieuw middel in de strijd tegen kanker.

Het doel van dit proefschrift was om meer duidelijkheid te verkrijgen omtrent de veranderingen die optreden met betrekking tot apoptose in de loop van de adenoom-carcinoom sequentie. Daarnaast werd de potentiële toepassing van TRAIL onderzocht bij colorectale adenomen en carcinomen. Hiervoor werden colorectale tumoren onderzocht van patiënten met een sporadische (niet erfelijke) ziekteachtergrond en van FAP en HNPCC patiënten. Tenslotte werden mechanismen achter de chemopreventieve werking van het NSAID sulindac op colorectale epitheliale cellen bestudeerd, aangezien recente gegevens hierbij een rol voor TRAIL gemedieerde apoptose suggereren.

Na een korte inleiding in **Hoofdstuk 1** wordt in **Hoofdstuk 2** een overzicht gegeven van de huidige kennis van de mechanismen van apoptose en veranderingen die optreden in de ontwikkeling van colorectaal carcinoom. Hoewel er tientallen onderzoeken beschikbaar zijn waarin apoptose in colonslijmvlies wordt bestudeerd in verschillende stadia van de ontwikkeling van CRC zijn de resultaten hiervan tegenstrijdig. Zo bestaat er een aanzienlijke controverse over de vraag of de mate van apoptose toe- of afneemt in de loop van de adenoom-carcinoom sequentie. Dit was reden om een systematisch onderzoek te doen van de beschikbare studies. Hierbij werden alle onderzoeken die veranderingen in de mate en distributie van apoptose in normaal of neoplastisch colonslijmvlies hadden bestudeerd onder de loop genomen. Een zoekactie met behulp van PUBMED leverde 53 relevante artikelen op.

Bij nauwkeurige beschouwing van deze 53 studies viel allereerst een grote variatie op in de technieken die gebruikt waren om apoptotische cellen aan te tonen. In de meeste studies was de TUNEL (terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated nick end labelling) techniek gebruikt (n = 29). Andere gebruikte technieken waren ISEL (in situ end labelling, n = 7), morfologische analyse met lichtmicroscopie (n = 7), TUNEL of ISEL samen met lichtmicroscopische morfologie (n = 9), ISEL samen met morfologie vastgesteld met electronenmicroscopie (n = 1), morfologie vastgesteld met licht microscopie samen met electronenmicroscopie (n = 2) en de recent ontwikkelde techniek van het aantonen van gekleefd cytokeratine 18 met behulp van immuunhistochemie (n = 2). Door caspase gekleefd cytokeratine 18 is een vroeg kenmerk van apoptose dat aangetoond kan worden in epitheliale cellen met gebruik van een antilichaam (M30). Zoals verwacht mag worden met al deze verschillende technieken was er een grote variatie in het gerapporteerde percentage

apoptotische cellen (apoptotische indices). Deze variatie is waarschijnlijk grotendeels terug te voeren op de voornaamste beperking van de TUNEL en ISEL techniek: het foutpositief aanmerken van necrotische cellen naast apoptotische cellen. Anderen hebben reeds hun vraagtekens gezet bij de toepasbaarheid van TUNEL in het aantonen van apoptotische cellen in de tractus digestivus. Hoewel de laatste tijd nieuwe technieken zijn ontwikkeld met een hogere specificiteit dan TUNEL voor apoptotische cellen, zoals de methode van M30 immunoreactiviteit, hebben nog weinig studies van deze technieken gebruik gemaakt.

Met betrekking tot de mate van apoptose in normaal colonslijmvlies varieerden gerapporteerde apoptotische indices tussen 0,11 en 11 %. Daarnaast viel op dat in de meeste studies het bestudeerde normale colonslijmvlies in feite was verkregen van macroscopisch normaal ogend slijmvlies in resectievlakken van tumoren waarbij men zich kan afvragen in hoeverre dit daadwerkelijk als normaal colonslijmvlies kan worden beschouwd. In een studie bleek dat de mate van apoptose inderdaad verschillend was in normale mucosa van sneevlakken ten opzichte van echte normale mucosa. Dit dient men zich te realiseren bij de interpretatie van studies waarin apoptose in normaal colon is bestudeerd. De overgang van normaal colonepitheel naar het adenoomstadium gaat in de meeste studies gepaard met een toename in mate van apoptose. Over wat er gebeurt bij de overgang van adenoom naar carcinoom bestaat veel discussie. De meeste onderzoeken geven aan dat de mate van apoptose in carcinomen hoger is dan in adenomen. Er zijn echter ook studies waarin er geen verschil was, of zelfs tegenovergestelde resultaten werden gezien. Als het gaat om de distributie van apoptotische cellen in de loop van de adenoom-carcinoom sequentie komt uit vrijwel alle studies naar voren dat in adenomen de meeste apoptose gezien wordt aan de basis van crypten, met de meeste prolifererende cellen aan de luminale zijde van crypte. Dit patroon is volstrekt tegenovergesteld aan dat wat gezien wordt in normaal epitheel. Wanneer de correlatie werd bekeken tussen de mate van apoptose en de mate van proliferatie in adenomen en carcinomen werden opnieuw tegenstrijdige resultaten verkregen. Waar sommige studies een correlatie tussen beide vonden, wordt dit in andere bestreden. Met betrekking tot de prognostische waarde van apoptotische indices werd in de meeste studies gevonden dat colorectale tumoren met een hoge mate van apoptose geassocieerd waren met een betere prognose.

Gegeven de beperkingen van de juist beschreven technieken TUNEL and ISEL om apoptotische cellen aan te tonen werd in **Hoofdstuk 3** de recent ontwikkelde techniek van M30 immunoreactiviteit (zie eerder) nader bestudeerd. De techniek werd gevalideerd tegen de methode die over het algemeen als de gouden standaard wordt beschouwd: de identificatie van apoptotische cellen door herkennen van bepaalde morfologische criteria. Naar aanleiding van de observatie in **Hoofdstuk 2** dat de meeste studies over apoptose in normaal colorectaal epitheel in feite waren uitgevoerd in macroscopisch normaal ogend weefsel in sneevlakken werd onderzocht of de mate van apoptose verschillend was tussen normale mucosa van sneevlakken en werkelijk normale mucosa. Paraffine materiaal van normale colonmucosa (n = 30), normale mucosa van sneevlakken (n = 30), colorectale adenomen (n = 84) en carcinomen (n = 40) werd bestudeerd. Apoptotische cellen werden aangetoond met behulp van M30 immunoreactiviteit en door het gebruik van morfologische

criteria en de mate van apoptose werd uitgedrukt als percentage van het totaal aantal getelde cellen (apoptotische index).

De gemiddelde apoptotische indices bepaald volgens de M30 methode waren $0,18 \pm 0,04$ % in normale mucosa, $0,42 \pm 0,04$ % in adenomen en $1,97 \pm 0,24$ % in carcinomen. Apoptotische indices vastgesteld met morfologische criteria waren respectievelijk $0,23 \pm 0,03$ %, $0,62 \pm 0,06$ % en $1,78 \pm 0,19$ %. De mate van apoptose was hoger in normale mucosa afkomstig van sneevlakken vergeleken met werkelijk normale mucosa ($p < 0,0001$). Er was een goede correlatie tussen apoptotische indices verkregen met de M30 techniek en met morfologische criteria ($r = 0,71$, $p < 0,01$). Deze bevindingen ondersteunen het gebruik van de techniek van M30 immunoreactiviteit bij het bestuderen van apoptose in colorectaal epitheel.

Om de potentiële toepassing van TRAIL of TRAIL receptor agonistische stoffen als therapeutische middelen bij colorectale tumoren te bestuderen werd de expressie van de vier membraangebonden TRAIL receptoren DR4, DR5, DcR1 en DcR2 in de darm onderzocht. De expressie en lokalisatie van TRAIL en TRAIL receptoren werd geanalyseerd met behulp van immunohistochemie in normale mucosa ($n = 10$), adenomen ($n = 19$) en carcinomen ($n = 21$). Het materiaal was afkomstig van patiënten met een sporadische achtergrond van hun aandoening. Daarnaast werden mogelijke correlaties bekeken tussen expressie van TRAIL en zijn receptoren en de mate van apoptose (bepaald met M30 immunoreactiviteit) en histopathologische kenmerken. De resultaten zijn beschreven in **Hoofdstuk 4**.

Zowel in normale mucosa als in adenomen en carcinomen werd expressie van TRAIL en TRAIL receptoren gezien. Het viel op dat TRAIL expressie verloren was gegaan in een aantal colorectale tumoren in vergelijking met aangrenzend normaal epitheel. Dit was vaker het geval in carcinomen dan in adenomen ($p < 0,05$). De intensiteit van DR4 en DR5 aankleuring was sterker in neoplastische cellen dan in aangrenzende normale epitheliale cellen, en ging samen met een hogere mate van apoptose. Er werden geen verschillen gevonden tussen normale cellen en neoplastische cellen met betrekking tot DcR1 en DcR2 expressie. Er waren geen correlaties tussen TRAIL of TRAIL receptor expressie en histopathologische kenmerken. De sterkere expressie van DR4 en DR5 in neoplastische cellen in vergelijking met normale cellen suggereert dat neoplastische cellen gevoeliger zijn voor TRAIL en TRAIL receptor agonistische stoffen dan normale cellen, hetgeen een bemoedigende bevinding is in het licht van een toekomstige klinische toepassing.

Naar aanleiding van de resultaten in patiënten met een sporadische achtergrond van hun colorectale tumor werd het onderzoek uitgebreid met materiaal van patiënten met FAP en HNPCC en dit is beschreven in **Hoofdstuk 5**. De expressie van DR4 en DR5 werd bestudeerd met behulp van immunohistochemie in colorectale adenomen en carcinomen van patiënten met een sporadische achtergrond ($n = 74$ respectievelijk 56), FAP ($n = 41$ en 4) en HNPCC ($n = 50$ en 21). Verder werden sporadische tumoren met zogenaamde microsatelliet instabiliteit (MSI) bestudeerd om de rol van mutaties in het BAX gen te onderzoeken. Er zijn aanwijzingen dat BAX een rol speelt bij de gevoeligheid voor TRAIL-

gemedieerde apoptose in vitro. Colorectale tumoren met MSI zijn kwetsbaar voor mutaties in het BAX gen. De aanwezigheid van BAX mutaties in MSI positieve tumoren zou derhalve de potentiële toepassing van TRAIL of TRAIL receptor agonisten kunnen beperken. Carcinomen (n = 42, waarvan 27 sporadische en 15 HNPCC-geassocieerd) met een hoge mate van MSI (MSI-H) werden geanalyseerd op de aanwezigheid van BAX mutaties en de mate van apoptose.

De meeste adenomen van alle drie patiëntengroepen toonden DR4 en DR5 expressie. De meeste carcinomen hadden DR4 expressie, met uitzondering van zes tumoren, alle met histologisch een mucineus karakter. Alle carcinomen, inclusief die met mucineuze histologie, toonden DR5 expressie. BAX mutaties werden gevonden in 6 van de 42 MSI-H tumoren, waarbij de apoptotische indices en expressie van DR4, DR5 en TRAIL vergelijkbaar waren in tumoren met en zonder BAX mutaties. Deze gegevens suggereren niet direct dat BAX inactivatie in tumoren met MSI in vivo een belangrijk mechanisme is om apoptose te omzeilen. Al met al geven de resultaten aan dat het selectief aangrijpen van TRAIL receptoren DR4 en DR5 in sporadische en erfelijke colorectale tumoren in potentie mogelijk is en verder uitgezocht dient te worden.

De identificatie van prognostische factoren voor patiënten met colorectaal carcinoom stelt ons wellicht in staat behandelingen hierop af te stemmen. Resistentie van tumorcellen tegen apoptose inductie is een beperkende factor in de effectiviteit van chemotherapie van coloncarcinoom. In vitro studies hebben laten zien dat chemotherapie en recombinant humaan (rh)TRAIL synergistisch apoptose induceren in colonkankercellen. De prognostische waarde van de expressie van TRAIL, DR4 en DR5 op overleving, ziekte-vrije overleving en tijd-tot-recidief werden bestudeerd in **Hoofdstuk 6**. Van tumoren van een cohort van 376 patiënten met stadium III colon carcinoom, die in het verleden aan een twee-armige studie met adjuvante chemotherapie hadden deelgenomen, werden zogenaamde weefsel microarrays geconstrueerd ⁷. Deze arrays werden geanalyseerd met behulp van immunohistochemie op TRAIL, DR4 en DR5 expressie. De mediane follow-up van het cohort was 43 maanden. Kaplan-Meier analyses en Cox proportional hazard analyses werden verricht waarbij werd gecorrigeerd voor behandelarm, leeftijd en geslacht.

De meeste carcinomen toonden sterke expressie van TRAIL (82,8 %), DR4 (91,7 %) en DR5 (87,1 %). Sterke DR4 expressie was geassocieerd met een slechtere overleving {odds ratio (OR; 95% CI) = 2,22 (1,03-4,81); p = 0,04} en een slechtere ziekte-vrije overleving {OR = 2,19 (1,06-4,53); p = 0,03}, vergeleken met zwakke DR4 expressie. Er was een trend dat sterke DR5 expressie geassocieerd was met een betere overleving {OR = 0,65 (0,41-1,03); p = 0,07}. Binnen de patiëntengroep met een recidief was het zo dat de tijd tot vaststelling van het recidief langer was voor diegenen met sterke DR5 expressie (p = 0,03) of sterke TRAIL expressie (p = 0,007) vergeleken met hen met een zwakke DR5 of TRAIL expressie. De bevinding dat de meeste tumoren sterke DR4 en DR5 expressie tonen geeft aan dat rhTRAIL in potentie gebruikt kan worden in de adjuvante behandeling van patiënten met een stadium III coloncarcinoom.

Recent werden twee gerandomiseerde placebo-gecontroleerde onderzoeken gepubliceerd waarin een chemopreventief effect van aspirine werd aangetoond in patiënten met eerder een colorectaal adenoom of carcinoom ^{8,9}. Deze studies worden besproken in **Hoofdstuk 7**, waarbij een kort overzicht wordt gegeven van de mechanismen achter de chemopreventieve werking van NSAIDs. Beide studies tonen een bescheiden beschermend effect van aspirine in de genoemde patiëntenpopulaties op de ontwikkeling van adenomen. De anti-neoplasmatische eigenschappen van NSAIDs zijn zowel in vitro bewezen als in vivo (dierexperimenteel onderzoek, epidemiologische studies en interventiestudies). Verschillende mechanismen achter de beschermende invloed van NSAIDs op de colorectale carcinogenese zijn in de afgelopen jaren beschreven. Centraal hierbij lijkt inductie van apoptose in neoplastische cellen, via cyclo-oxygenase- afhankelijke en onafhankelijke mechanismen. De precieze mechanismen van apoptose inductie zijn onbekend, maar er zijn aanwijzingen dat dit bij het NSAID sulindac via DR5 wordt gemedieerd.

Daarnaast zijn er aanwijzingen dat NSAIDs de Wnt route moduleren. De vorming van adenomen wordt over het algemeen toegeschreven aan mutaties in hetzij het APC gen of het gen coderend voor β -catenine. In normale cellen is β -catenine gebonden aan het celmembraan, waarbij cytoplasmatisch β -catenine wordt afgebroken door het zogenaamde APC/axine/GSK3 β -complex. Verlies van functioneel APC of bepaalde mutaties in het β -catenine gen leiden tot stapeling van β -catenine in de celkern, wat leidt tot activatie van de transcriptie factor T-cell factor 4 (TCF4). Als gevolg hiervan activeert TCF4 een genetisch programma dat verantwoordelijk wordt gehouden voor de vorming van adenomen. De Wnt-route, waarbij β -catenine/TCF4 activiteit fungeert als een schakel tussen proliferatie en differentiatie in het darmepitheel speelt waarschijnlijk een kritieke rol in de vroege ontwikkeling van colorectale tumoren. Anderen hebben aangetoond dat geactiveerde Wnt-signalering de concentratie vermindert van het eiwit p21, een eiwit dat de celcyclus beïnvloedt. Via dit mechanisme kunnen cellen ongeremd prolifereren. Recent zijn er aanwijzingen gekomen dat het chemopreventieve effect van het NSAID sulindac deels gemedieerd wordt door p21. Daarnaast is aangetoond dat het remmend effect van sulindac op de ontwikkeling van darmtumoren teniet werd gedaan door homozygote inactivatie van p21 in APC^{min} muizen, het muizenmodel van FAP. p21 is mogelijk de link tussen de Wnt route en het chemopreventieve effect van sulindac op de ontwikkeling van adenomen.

Deze informatie vormde de achtergrond voor een studie waarin de effecten van sulindac werden bestudeerd op de mate van apoptose en de expressie van DR4, DR5, β -catenine en p21 in normaal ogend slijmvlies. De resultaten zijn beschreven in **Hoofdstuk 8**. Biopten voor en na behandeling met sulindac, afgenomen in het kader van twee chemopreventie studies ^{10,11}, werden verzameld. Het betrof patiënten met HNPCC (n = 18) die 2 dd 150 mg sulindac gedurende 4 weken hadden gekregen in een placebo-gecontroleerd cross-over design ¹⁰. Uit een andere studie kwam materiaal van patiënten met FAP (n = 6) die behandeld waren met 2 dd 150 mg sulindac gedurende 6 maanden ¹¹. Met behulp van immunohistochemie werd de mate van apoptose vastgesteld (M30 immunoreactiviteit) en expressiepatronen van DR4, DR5, β -catenine en p21.

In HNPCC patiënten waren de apoptotische indices na sulindac en placebo vergelijkbaar. Ook in FAP patiënten was er geen verschil in mate van apoptose na sulindac vergeleken met de waarden vooraf. Expressie van DR4 en DR5 werd gezien in alle onderzochte coupes waarbij geen consistente veranderingen werden gezien na sulindac in vergelijking met placebo. De intensiteit van membraneuze β -catenine aankleuring was lager in HNPCC materiaal na sulindac dan na placebo ($p < 0,001$). Vergelijkbare resultaten werden verkregen in het FAP materiaal ($p < 0,01$). p21 expressie voor en na sulindac was vergelijkbaar in beide patiëntengroepen. Samengevat had sulindac een remmend effect op β -catenine expressie in normaal colorectaal epitheel van HNPCC en FAP patiënten zonder zichtbare veranderingen in mate van apoptose en DR4, DR5 en p21 expressie. Een remmend effect van sulindac op β -catenine expressie is ook geobserveerd in APC^{Min} muizen en in adenomen. Of dit fenomeen van belang is in het chemopreventieve effect van sulindac kan met de huidige gegevens vooralsnog niet worden beantwoord.

Conclusies en toekomstperspectieven

Meerdere genen die betrokken zijn bij de regulatie van apoptose komen abnormaal tot expressie of zijn gemuteerd bij CRC. Hoewel het idee van geleidelijk verminderde apoptose in de ontwikkeling van CRC conceptueel aantrekkelijk is, duidt het beschikbare bewijs uit in vivo materiaal er op dat het percentage apoptotische cellen in de loop van de adenoom-carcinoomsequentie juist geleidelijk toeneemt. In vitro is tumor progressie vaak geassocieerd met resistentie tegen apoptose inductie. Hoewel deze gegevens elkaar op het eerste gezicht lijken tegen te spreken, doen ze dat in feite niet. De schijnbare tegenstrijdigheid vervalt wanneer in aanmerking wordt genomen dat bij in vivo studies spontane apoptose wordt bestudeerd terwijl in vitro studies gaan over geïnduceerde apoptose. Gegeven de beperkingen van de methoden van apoptose detectie, die in de meeste studies zijn gebruikt, zijn betere testen gewenst en waarschijnlijk in de nabije toekomst beschikbaar. De resultaten in dit proefschrift waarbij in een aantal studies de methode van M30 immunoreactiviteit is gebruikt ondersteunen het nut van deze techniek bij het bestuderen van apoptose in colorectaal epitheel.

Succesvolle, niet-chirurgische, eliminatie van kankercellen wordt uiteindelijk bepaald door inductie van apoptose. Vrijwel alle bekende cytostatica werken door inductie van apoptose, vaak niet alleen van kwaadaardige cellen maar ook van normale cellen, zich uitend in toxiciteit. De laatste jaren is de kennis over de mediators van apoptose in coloncellen enorm toegenomen. Voorbeelden van mediators, waarvan bekend is dat deze verstoord zijn in tumorcellen, zijn Bcl-2 familieleden en IAPs¹². Deze onderdrukkers van apoptose zijn aangrijpingspunten geworden voor de ontwikkeling van medicamenten die erop gericht zijn om de gevoeligheid van tumorcellen voor apoptose te herstellen. Een alternatieve benadering wordt gevormd door strategieën gericht op directe activering van agonisten van apoptose via de extrinsieke route. TRAIL is, in tegenstelling tot familieleden TNF- α en FasL, niet geassocieerd met het sepsis syndroom respectievelijk levertoxiciteit. Afgaande op de effectiviteits- en toxiciteitsgegevens uit preklinisch onderzoek en de informatie in dit proefschrift over de uitgebreide expressie van de pro-apoptotische TRAIL receptoren

in colorectale tumoren, kan rhTRAIL in deze setting als veelbelovend worden beschouwd. Agonistische TRAIL receptor antilichamen, gericht tegen DR4 en DR5, blijken dezelfde effecten als rhTRAIL te hebben^{13,14}. De eerste fase-I studies met rhTRAIL en agonistische TRAIL receptor antilichamen zijn onderweg en de resultaten van deze studies zullen waarschijnlijk een indicatie geven van de waarde van deze middelen in de behandeling van CRC.

Daarnaast dient de waarde van combinatie regimes, waarbij rhTRAIL gecombineerd wordt met een andere stof, verder te worden uitgezocht. Meerdere onderzoeken hebben aangetoond dat door rhTRAIL te combineren met bepaalde chemotherapeutische middelen, NSAIDs, proteosoomremmers of interferon- γ een additief of synergistisch apoptotisch effect kan worden verkregen¹⁵. Een andere veelbelovende strategie vormt de ontwikkeling van zogenaamde bi-specifieke antilichamen. Deze antilichamen combineren herkenning van de tumorcel met activering van het immuunsysteem, met als gevolg dat bepaalde effectorcellen tumorcellen opruimen. Er zijn inmiddels fusie eiwitten geconstrueerd waarbij TRAIL gecombineerd wordt met het aangrijpen van de EGFR-receptor en het met carcinomen geassocieerd antigeen EGP2, met veelbelovende resultaten *in vitro*^{16,17}. Dergelijke combinatiestrategieën verminderen waarschijnlijk de dosis TRAIL die nodig is voor een bepaald anti-tumor effect, en daarmee de kans op toxiciteit.

Afgezien van een toekomstige toepassing van TRAIL in de behandeling van CRC, is er mogelijk ook een rol voor TRAIL weggelegd in de therapie of preventie van colorectale adenomen. Hoewel adenomen over het algemeen verwijderd worden bij endoscopisch onderzoek zijn er situaties waarin dit niet mogelijk is, bijvoorbeeld in het geval van vlakke sessiele adenomen. Ook komt het voor dat het aantal aanwezige adenomen te groot is om verwijderd te kunnen worden, zoals bij FAP patiënten. Recente gegevens laten zien dat TRAIL ook apoptose induceert in colonadenoomcellen¹⁸. Deze waarneming werd bevestigd in een studie waarbij adenoomcellijnen en *ex vivo* kweken van humane adenomen werden onderzocht¹⁹. De bevindingen uit hoofdstukken 4 en 5 van dit proefschrift over de aanwezige expressie van TRAIL receptoren DR4 en DR5 in colorectale adenomen ondersteunen het verder exploreren van rhTRAIL of andere TRAIL receptor agonistische middelen voor de behandeling van colorectale adenomen.

Concluderend kan gezegd worden dat de laatste jaren nieuwe behandelingsmogelijkheden zijn ontwikkeld voor CRC, gebaseerd op toenemende kennis over de mechanismen die betrokken zijn bij de regulatie van apoptose. De potentiële klinische toepassing van rhTRAIL of andere TRAIL receptor agonistische middelen bij de behandeling van colorectale adenomen en carcinomen verdient nader onderzocht te worden. De resultaten van de eerste fase-I studies met rhTRAIL en TRAIL receptor agonistische antilichamen zullen toekomstige behandelingschema's moeten leiden. De sleutel voor verdere verbetering van preventie en behandeling van colorectale tumoren ligt waarschijnlijk niet in het zoeken naar de Heilige Graal: het ene ideale middel tegen kanker. Meer waarschijnlijk zal daadwerkelijke vooruitgang voortkomen uit het speuren naar een optimale combinatie van middelen die, door op verschillende essentiële routes in de cel aan te grijpen, resulteert in de onvoorwaardelijke dood van de kanker cel.

Referenties

1. Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW. Colorectal cancer. *Lancet* 2005;365:153-165.
2. Torrance CJ, Jackson PE, Montgomery E, et al. Combinatorial chemoprevention of intestinal neoplasia. *Nat Med* 2000;6:1024-1028.
3. Wang Y, Jatko T, Zhang Y, et al. Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B colon cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:1564-1571.
4. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003;349:247-257.
5. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351:337-345.
6. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335-2342.
7. Bleeker WA, Mulder NH, Hermans J, Otter R, Plukker JT. The addition of low-dose leucovorin to the combination of 5-fluorouracil-levamisole does not improve survival in the adjuvant treatment of Dukes' C colon cancer. IKN Colon Trial Group. *Ann Oncol* 2000;11: 547-552.
8. Sandler RS, Halabi S, Baron JA, et al. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003;348: 883-890.
9. Baron JA, Cole BF, Sandler RS, et al. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med* 2003; 348: 891-899.
10. Rijcken FE, Hollema H, van der Sluis T, Boersma-van Ek W, Kleibeuker JH. Sulindac increases epithelial cell proliferative activity in the proximal colon of HNPCC patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17: A56-57.
11. Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ et al. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993;328:1313-1316.
12. Reed JC. Apoptosis-targeted therapies of cancer. *Cancer Cell* 2003;3:17-22
13. Pukac L, Kanakaraj, Humphreys R, et al. HGS-ETR1, a fully human TRAIL-receptor 1 monoclonal antibody, induces cell death in multiple tumour types in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 2005;92:1430-1441.
14. Motoki K, Mori E, Matsumoto A, et al. Enhanced apoptosis and tumor regression induced by a direct agonist antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2. *Clin Cancer Res* 2005;11:3126-3135.
15. Van Geelen CM, de Vries EG, de Jong S. Lessons from TRAIL-resistance mechanisms in colorectal cancer cells: paving the road to patient-tailored therapy. *Drug Resist Updat* 2004;7:345-358.
16. Bremer E, Samplonius DF, van Genne L, et al. Simultaneous inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling and enhanced activation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor-mediated apoptosis induction by an scFv:sTRAIL fusion protein with specificity for human EGFR. *J Biol Chem* 2005;280:10025-10033.
17. Bremer E, Kuijlen J, Samplonius D, Walczak H, de Leij L, Helfrich W. Target cell-restricted and enhanced apoptosis induction by a scFv:sTRAIL fusion protein with specificity for the pancarcinoma-associated antigen EGP2. *Int J Cancer* 2004;109:281-290.
18. Hague A, Hicks DJ, Hasan F, Smartt H, Cohen GM, Paraskeva C, MacFarlane M. Increased sensitivity to TRAIL-induced apoptosis occurs during the adenoma to carcinoma transition of colorectal carcinogenesis. *Br J Cancer* 2005;92:736-742.
19. Jalving M, Koornstra JJ, de Jong S, et al. TRAIL induces apoptosis in colorectal adenoma cell lines and ex vivo adenoma cultures. *Gastroenterology* 2005;128(Suppl2):A437.

