



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Risk factors of thrombosis in cancer : the role of microparticles
Tesselaar, M.E.T.

Citation

Tesselaar, M. E. T. (2008, March 6). *Risk factors of thrombosis in cancer : the role of microparticles*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12639>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/12639>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

10

Nederlandse
samenvatting

Jarenlang werd aangenomen dat Armand Trousseau de eerste was die het verband tussen veneuze trombose en kanker beschreef, recentelijk werd echter aangetoond dat dit al in 1823 door Bouillaud geschiedde. Trousseau beschreef dat trombose vaak voorkomt bij patiënten met gastro-intestinale tumoren. Pas een eeuw later verschenen de eerste grote cohort studies, die deze observatie ondersteunen. Bij patiënten met trombose wordt vaker de diagnose kanker gesteld, terwijl omgekeerd, patiënten met kanker vaker trombose zullen ontwikkelen dan patiënten die geen kanker hebben. Verder blijkt dat kankerpatiënten met trombose een slechtere prognose hebben, dan kankerpatiënten die geen trombose ontwikkelen. Dit alles wijst er op dat stolling (stolsels) de groei van tumorcellen kan bevorderen.

Bekende risicofactoren voor het ontwikkelen van trombose zijn ondermeer bedrust, operatie, de pil, zwangerschap, en de periode van het kraambed, langdurige vlieguren, en het hebben van aangeboren risico factoren zoals een mutatie in het factor V Leiden gen of een prothrombine 20210A genmutatie. Bij kankerpatiënten kunnen veranderingen van de bloedviscositeit door ontstekingsfactoren of hemodynamische veranderingen zoals stasis van bloed door tumorcompressie van buiten af op het bloedvat, een rol spelen. Verondersteld wordt dat ook verschillende andere mechanismen bij kankerpatiënten een rol kunnen spelen. Het betreft activatie van de stollingscascade wellicht geïnitieerd door de tumorcel zelf, specifieke effecten van bloedplaatjes, witte bloedcellen en/of endotheelcellen, en hoge concentraties van diverse cytokines (IL-1, TNF, VEGF). Het geheel kan resulteren in een toename van stollingsbevorderende eiwitten of afname van eiwitten die normaliter de afbraak van de trombus bewerkstelligen. Kankercellen zelf kunnen echter ook eiwitten produceren die rechtstreeks de stolling op gang kunnen brengen of bevorderen. Een goed voorbeeld hiervan is weefselfactor ("tissue factor"), de initiator van de stolling, of het zogeheten 'cancer procoagulant' eiwit.

De twee meest frequente oorzaken van het overlijden van kankerpatiënten zijn het hebben van metastasen en trombose. Het zou heel goed kunnen zijn, dat de verhoogde neiging tot stolling in het lichaam zelf een milieu vormt, waarin tumorcellen ook makkelijker kunnen uitzaaien in het lichaam (metastaseren). Weefselfactor en andere eiwitten zoals trombine zijn niet alleen betrokken bij de stollingscascade, maar lijken ook betrokken te zijn bij het metastaseringsproces van tumorcellen zelf. Anti-kanker therapie zoals cytostatica, hormonale therapieën, maar ook de nieuwere 'targeted drugs' kunnen de hemodynamische balans verder verstoren door veranderingen in de bloedvaten of directe beïnvloeding van de stollingscascade-eiwitten.

De incidentie van veneuze trombose in kankerpatiënten varieert in de literatuur en is in het bijzonder hoog bij patiënten met een pancreastumor (in de literatuur wordt een cumulatieve incidentie tot wel 57% gerapporteerd). Ook in patiënten met andere (adeno)carcinomen zoals tumoren uitgaande van de ovaria, long, prostaat en overige tractus digestivus tumoren, is de incidentie van kanker-gerelateerde trombose hoog. De gedachte is dat patiënten met een adenocarcinoom een hoger risico voor het ontwikkelen van trombose hebben dan patiënten met een andere histologische type tumor. Een directe vergelijking tussen de verschillende tumor typen is, met uitzondering van de studie van Blom et al, nooit eerder gemaakt.

Andere risicofactoren bij kankerpatiënten zijn het, bij deze groep patiënten vaker toegepaste gebruik van centraal-veneuze lijn, de vaak langdurige bedrust als gevolg van de slechte algemene conditie van de kankerpatiënt, en langere en intensievere operaties vergeleken met patiënten die geen kanker hebben.

Ondanks het feit dat veel kankerpatiënten (tot wel 80%) een abnormaal stollingsprofiel hebben (bijvoorbeeld verhoogde concentraties van stollingsfactoren als fibrinogeen, factoren V, VIII, IX en XI en trombocytose), ontwikkelen zij niet allemaal trombose en is het mechanisme verantwoordelijk voor kanker-gerelateerde trombose tot op heden nog steeds niet goed opgehelderd.

Micropartikels, kleine subcellulaire fragmenten, werden in 1967 door Wolf voor het eerst aangetoond, en destijds ook wel "platelet dust" genoemd. Inmiddels is bekend dat circulerende bloedcellen, maar ook endotheelcellen in staat zijn micropartikels te vormen door cel-activatie of cel-dood (apoptose). Deze micropartikels variëren in grootte van 100 tot 1000 nanometer en worden gekenmerkt door de aanwezigheid van dezelfde antigenen op hun oppervlak als de cel waar ze van afkomstig zijn (de moedercel). Heel lang is gedacht dat micropartikels slechts celdebris zijn en geen pathofysiologische betekenis hebben. Er komen echter steeds meer aanwijzingen dat dit niet het geval is.

Bij patiënten met een aangeboren bloedziekte, die gekenmerkt wordt door een gestoorde membraan-vesiculatie ('Scott syndroom'), wordt in het bloed een sterk verlaagd aantal micropartikels gevonden en juist deze patiënten presenteren zich met een verhoogde neiging tot bloeden. Daartegenover staan ziektebeelden die geassocieerd zijn met vaatwand beschadiging en verhoogde neiging tot stolling (hypercoagulabiliteit), waarbij de aantallen micropartikels duidelijk hoger zijn dan die van gezonde mensen.

Flowcytometrie is wereldwijd de meest gebruikte methode om micropartikels te karakteriseren. Micropartikels kunnen worden geïsoleerd uit plaatjes-vrij plasma voordat

ze worden geïncubeerd met specifieke antilichamen of Annexine-V (dat specifiek bindt aan negatief geladen fosfolipiden in aanwezigheid van calcium ionen), en waaraan een fluorochroom is bevestigd. Op deze manier kunnen antigenen, respectievelijk fosphatidylserines, die zich op het micropartikel oppervlak bevinden, gekwantificeerd worden met behulp van de flowcytometer. Het merendeel van de micropartikels bij zowel gezonde als zieke mensen, bindt Annexine-V en brengt CD61 of CD41 tot expressie en is dus afkomstig van bloedplaatjes. De door de verschillende auteurs gerapporteerde aantallen MP bij gezonde mensen lopen sterk uiteen. Deze grote verschillen lijken te worden verklaard door de verschillende technieken die de diverse laboratoria gebruiken voor de isolatie (wel of niet gesedimenteerd, centrifugatie snelheid), detectie en karakterisering van micropartikels (keuze en het gebruik van de verschillende cel-specifieke antilichamen). Helaas is er tot op heden nog geen richtlijn voor de beste techniek om aantallen MP betrouwbaar te meten. Door de verschillen in toegepaste methode is onderling vergelijken van de resultaten van verschillende laboratoria niet goed mogelijk. Soms leidt dit tot inconsistente of zelfs tegenstrijdige resultaten.

In 1999 toonden Giesen et al. aan dat *ex vivo* gevormde trombi niet alleen bloedplaatjes en fibrine, maar ook een aanzienlijke hoeveelheid weefselfactor bevatten. Door middel van elektronenmicroscopie met goudgelabeld anti-weefselfactor antilichaam konden zij grote clusters van weefselfactor antigeen-positieve membraan vesikels aantonen, die zich bevonden in de nabijheid van bloedplaatjes. Het bleef echter onduidelijk waar dit zogeheten “blood-born” weefsel factor vandaan kwam. De auteurs suggereerden destijds dat de weefselfactor wellicht afkomstig was van weefselfactor-positieve leukocyten of monocyten. Muller et al toonden door middel van elektronenmicroscopie aan dat weefselfactor antigeen aanwezig was in de alpha granula van bloedplaatjes, en dat - na stimulatie van bloedplaatjes - weefselfactor aanwezig was op het oppervlak van de plaatjes. Voorts onderzochten zij direct uit bloed geïsoleerde micropartikels en ook micropartikels afkomstig van bloedplaatjes, verkregen door middel van *in vitro* stimulatie. Zij toonden aan dat MP van bloedplaatjes functioneel inactief weefselfactor bevatten, maar na stimulering van de bloedplaatjes of bij toediening van MP, bleek dat de MP zelf weefselfactor-procoagulante activiteit bezaten. Zij suggereren dat dergelijke micropartikels afkomstig van gestimuleerde bloedplaatjes wellicht ook *in vivo* voorkomen en weefselfactor kunnen “vervoeren” naar verschillende delen van het lichaam, waardoor zij de stolling zowel lokaal als op afstand kunnen initiëren. Rauch et al toonden aan dat monocyttaire cellijnen die weefselfactor tot expressie brengen,

weefselfactor kunnen overbrengen op geactiveerde bloedplaatjes via micropartikels, en het mogelijk maken de trombus vorming te initiëren.

De eerste artikelen over een mogelijke rol van micropartikels bij de ontwikkeling van trombose bij kankerpatiënten, dateren uit de tachtigerjaren van de vorige eeuw waarin Dvorak aantoonde dat micropartikels afkomstig van tumorcellijnen stollingsactiviteit bezitten. Het lukte hem niet een relatie aan te tonen tussen de pro-coagulante activiteit van de micropartikels enerzijds en het ontwikkelen van trombose anderzijds. Na een “windstilte” van enkele tientallen jaren verschijnen daarna de eerste artikelen over micropartikels in relatie tot kanker in het begin van de eenentwintigste eeuw. In 2004 toonden Yu et al weefselfactor activiteit aan in micropartikels afgesnoerd van twee tumorcellijnen. Daarna toonden wij aan dat er een sterke associatie is tussen micropartikels, trombose en kanker bij de mens. De toekomst zal moeten uitmaken in hoeverre micropartikels daadwerkelijk een belangrijke rol spelen bij het ontstaan van kanker-gerelateerde trombose.

Hoofdstuk 2. In dit hoofdstuk worden de resultaten getoond van een studie naar risicofactoren van centrale veneuze lijn trombose in kankerpatiënten, die chemotherapie krijgen toegediend via deze centraal veneuze lijn. In totaal zijn er 255 centraal veneuze lijnen ingebracht in 243 kankerpatiënten; 84 zogehete ‘arm-poorten’, ingebracht via een ader in de arm, en 171 zogehete ‘borst-poorten’, ingebracht via de vena jugularis of vena subclavia. Van de totale groep kregen 181 patiënten een vorm van antistolling, als profylaxe dan wel therapeutisch. Bij verdenking op een centraal veneuze lijn trombose, werd de trombose altijd bevestigd door middel van echografie of flebogram. Van de patiënten die geen antistolling gebruikten, ontwikkelden 28% respectievelijk 33% een arm-poort cq borst-poort centrale veneuze lijn trombose. Het gebruik van antistolling had geen invloed op het optreden van trombose bij patiënten met een arm-poort, maar was geassocieerd met een veel lagere incidentie van trombose bij de patiënten met een borst-poort (slechts 1% van deze patiënten ontwikkelde een trombose). Verder bleek er vaker trombose op te treden bij patiënten bij wie de borst-poort aan de linker zijde van het lichaam was ingebracht, en bij patiënten bij wie de tip van de katheter niet in het rechter atrium zat. Bij 101 patiënten werden bloedmonsters afgenomen voor de bepaling van factor V Leiden en prothrombine 20210A mutatie, de concentratie van fibrinogeen, de stollingsfactoren VIII, IX en XI en homocysteïne. Bij deze 101 patiënten bleek er geen relatie te zijn tussen het optreden van trombose en een genmutatie van factor V Leiden

of een prothrombin 20210A, verhoogde spiegels van de stollingsfactoren VIII, IX of XI. Wel was er een relatie tussen verhoogde spiegels homocysteïne en het optreden van centraal veneuze lijn trombose.

Hoofdstuk 3. Dit overzichtartikel beschrijft de problemen rondom centraal veneuze lijn trombose in de algemene praktijk. Central veneuze lijnen worden frequent gebruikt door nefrologen in het kader van hemodialyse, hemato-oncologen voor een continue toegang tot de bloedbaan voor het geven van diverse bloedproducten, cytostatica en parenterale voeding, maar ook door cardiologen voor pacemakers bij ritme stoornissen. De oorzaak van centraal veneuze lijn trombose is multicausaal waarbij erfelijke factoren zoals factor V Leiden mutatie een rol spelen. Ook kankerpatiënten die chemotherapie krijgen toegediend blijken een grotere kans te hebben op het ontwikkelen van symptomatische trombose. De belangrijkste complicaties van centraal veneuze lijn trombose zijn longembolie en het ontwikkelen van een post-trombotisch syndroom. Het is onduidelijk of profylactische antistollingsbehandeling het optreden van veneuze lijn trombose doet verminderen, maar ook de behandeling van een lijn trombose zelf is controversieel. Zo zijn er geen gerandomiseerde studies waarin wordt onderzocht wat de beste behandeling is van een centraal veneuze lijn trombose. In de meeste cohort studies wordt er enige vorm van antistolling gegeven. Het gebruik van stolsels oplossende agentia (thrombolytica) wordt in de meeste studies ontraden gezien de hoge complicaties die daar bij optreden en wordt gereserveerd voor levensbedreigende situaties. Het is niet goed uitgezocht of het beter is de centraal veneuze lijn indien er sprake is van trombose, verwijderd dient te worden. Er is dan ook behoefte aan een studie waarin de optimale behandeling van een centraal veneuze lijn trombose wordt onderzocht.

Hoofdstuk 4. Longkanker is een van de meest voorkomende tumoren in de Westerse wereld, met de hoogste mortaliteit bij zowel mannen als vrouwen. In dit hoofdstuk worden de risicofactoren van veneuze trombose beschreven bij patiënten met longkanker. Risico factoren op het ontwikkelen van trombose bij longkanker patiënten zijn: het stadium van de ziekte (patiënten met vergevorderd stadium van hun ziekte hebben vaker trombose), uitgebreide longchirurgie zoals pneumectomie (chirurgische verwijdering van een long), antikanker therapie zoals chemotherapie, of de nieuwere “targeted drugs”, en het hebben van een adenocarcinoom. Ook het aantal trombocyten voor start van de antikanker behandeling en de aanwezigheid van MP die weefselfactor tot expressie brengen in de bloedcirculatie lijken geassocieerd met een hogere kans op trombose.

Hoofdstuk 5. De hypothese dat patiënten met een adenocarcinoom vaker trombose ontwikkelen dan patiënten met een ander histologisch type kanker, wordt ondersteund door bevindingen van grote studies, waaronder de Leidse MEGA studie, waaruit blijkt dat trombose het vaakst optreedt bij patiënten met een tumor uitgaande van de ovaria, long, prostaat en tractus digestivus, tumoren meestal van het type adenocarcinoom. Hoofdstuk 5 bekijkt het risico op het ontwikkelen van trombose bij 1000 patiënten met een tumor in het bovenste deel van de tractus digestivus. Het betreft 535 patiënten met slokdarmkanker, waarvan 216 (40%) patiënten een adenocarcinoom hebben en 319 (60%) een plaveiselcel carcinoom, en 465 patiënten met een adenocarcinoom uitgaande van de maag. Het risico op trombose in patiënten met slokdarm of maagkanker was 10 respectievelijk 15 keer hoger dan je zou verwachten in de Nederlandse populatie. Het risico op veneuze trombose bij patiënten met een adenocarcinoom (59/681) was 2.6-voudig verhoogd (HR 2.63, 95% CI: 1.38-5.00) vergeleken met het risico bij patiënten met een plaveiselcel carcinoom (11/319). De overleving van patiënten die trombose ontwikkelden was veel slechter dan van de patiënten die geen trombose kregen. Dit verschil bleek onafhankelijk van waar de tumor zich bevond, maag dan wel slokdarm.

Hoofdstuk 6. In dit hoofdstuk wordt de rol die micropartikels (MP) spelen bij de ontwikkeling van kanker-gerelateerde trombose onderzocht. Bloed van gezonde vrijwilligers ($n = 37$), patiënten met trombose maar zonder kanker ($n=7$) en patiënten met kanker ($n = 80$) is geanalyseerd met behulp flowcytometrie op aantallen MP en de expressie van bepaalde eiwitten (antigenen) op de MP. Met een functionele essay is onderzocht of de uit bloed geïsoleerde MP, weefsel factor (TF) activiteit (MP-TF activiteit) bezitten. De kankerpatiënten zijn in 4 groepen verdeeld, groep 1+2 betreft patiënten met een vroeg stadium mammacarcinoom bij wie voorafgaande aan en na de operatieve verwijdering van hun tumor, bloed werd afgenomen. Groep 3, patiënten met een vergevorderd stadium mammacarcinoom en groep 4, patiënten met een vergevorderd stadium pancreas carcinoom. Van deze laatste 2 groepen presenteerden 2 respectievelijk 5 patiënten zich met een veneuze trombose.

Patiënten met een vergevorderd stadium kanker hebben een verhoogd aantal MP in hun circulatie en een deel van de MP brengt het epitheliale antigen MUC1 tot expressie. Verder bleken zij een hogere MP-TF activiteit te bezitten in vergelijking met gezonde vrijwilligers, patiënten met trombose maar zonder kanker en kankerpatiënten in een vroeg stadium van hun ziekte. Kankerpatiënten met trombose hadden een sterk verhoogde

MP-TF activiteit. Patiënten met zowel MUC1 antigeen-positieve MP als een verhoogde MP-TF activiteit hadden een slechte overleving in vergelijking tot de andere individuen.

Hoofdstuk 7. Naar aanleiding van de bevindingen in hoofdstuk 6, wordt in dit hoofdstuk verder gekeken naar de MP- TF activiteit bij verschillende type kankerpatiënten met en zonder trombose. Hiertoe zijn MP uit bloed van 51 kankerpatiënten met een trombose vergeleken met dat van controle kankerpatiënten, zonder trombose. De controle patiënten waren geselecteerd op leeftijd, geslacht, type tumor, stadium van de ziekte en therapie. Voor 2 patiënten met veneuze trombose kon geen geschikte controle patiënt worden gevonden. Naast het hebben van kanker, identificeerden wij risicofactoren voor het krijgen van trombose ('trombose risico factor'), zoals compressie van het bloedvat door de tumor en het ondergaan van een behandeling met chemotherapie.

Van de 51 kankerpatiënten met trombose hadden 24 patiënten geen 'trombose risico factor', terwijl 27 patiënten dit wel hadden. Kankerpatiënten (n=27) met 'trombose risico factoren' en de 49 controle kankerpatiënten zonder trombose hadden een normale of minimaal verhoogde MP-TF activiteit. De 24 kankerpatiënten met trombose, maar zonder 'trombose risico factor', hadden allen een verhoogd tot sterk verhoogde MP-TF activiteit. Opvallend was dat de meeste patiënten met trombose een adenocarcinoom hadden. De overleving van de kankerpatiënten met trombose en zonder 'trombose risico factor' was veel korter (2 maanden) dan die van de kankerpatiënten met trombose maar met een 'trombose risico factor' (13 maanden) en die van de controlegroep (12 maanden). Er is dus een duidelijke relatie tussen de MP-TF activiteit en overleving.

Hoofdstuk 8. Vooral patiënten met een pancreascarcinoom staan bekend om hun hoge incidentie van veneuze trombose. Histologisch onderzoek van pancreascarcinomen heeft aangetoond dat slecht gedifferentieerde tumoren vaker TF tot expressie brengen, wat suggereert dat TF betrokken is bij stolling, angiogenese en het biologische gedrag van de tumor. In dit hoofdstuk kijken we naar MP-TF activiteit, het voorkomen van veneuze trombose en de expressie van TF in de tumor. Twaalf van de 62 patiënten met een ductaal adenocarcinoom uitgaande van de pancreas ontwikkelden trombose. Immunohistologisch onderzoek kon bij 27 patiënten worden verricht. Er bleek geen verschil te zijn tussen de patiënten met en zonder trombose voor wat betreft de aantallen MP, de hoeveelheid MP afkomstig van bloedplaatjes en de totale concentratie bloedplaatjes in de circulatie. Alle 12 patiënten met trombose hadden een verhoogde MP-TF activiteit. Er was geen associatie

tussen TF expressie van de tumor zelf en het optreden van trombose. De mediane overleving van de patiënten was 4 maanden en de overleving was niet geassocieerd met leeftijd of geslacht, maar wel sterk geassocieerd met de MP-TF activiteit en het optreden van veneuze trombose.

