

Untersuchung des Expressionsprofils vaskulärer Funktionsproteine beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Alexander Kinnen

aus Leverkusen

2022

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Tobias Christian Hilbert
2. Gutachter: Prof. Dr. Sebastian Zimmer

Tag der Mündlichen Prüfung: 03.02.2022

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. Mark Coburn

Lara & Emil

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Deutsche Zusammenfassung	8
1.1 Einleitung	8
1.2 Material und Methoden	12
1.3 Ergebnisse	16
1.4 Diskussion	24
1.5 Zusammenfassung	27
1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	28
2. Veröffentlichung	35
Abstract	35
Introduction	35
Materials and Methods	36
Results	37
Discussion	37
Conclusions	41
References	41
3. Danksagung	43

Abkürzungsverzeichnis

AKT	Proteinkinase B
ANG	Angiopoietin
BRCA	Breast Cancer
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CT	Cycle Threshold
EK	Ethikkommission
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
E-selectin	Endothel-Selectin; CD62E
FFP	Fresh frozen plasma
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
GEKID	Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
HIF	Hypoxia-inducible factor
ICU	Intensive Care Unit
IL	Interleukin
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
MAP	Mean arterial pressure
MCP-1/CCL2	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MS	Microsoft
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NO	Nitric oxide
OC	Ovarian cancer
OP	Operation
PARP	Poly ADP ribose polymerase
PCR	Polymerase chain reaction
PDK	Periduralkatheter
PE	Streptavidin-Phycoerythrin
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PRBC	Transfusions of Packed Red Blood Cells

RT-PCR	Real-time Polymerase chain reaction
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonucleic acid
RQ	Relative quantification
sICAM-1	Soluble Intercellular Adhesion Molecule 1
sRAGE	Soluble Receptor for Advanced Glycation Endproducts
sTIE2	Soluble Tyrosine Kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains 2
sVCAM-1	Soluble Vascular Cell Adhesion Protein 1
TIE	Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
VE-Cadherin	Vascular endothelial cadherin; CDH5
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor Receptor
ZO-1	Zonula occludens-1

1. Deutsche Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit und deren Ergebnisse verstehen sich als zusammenfassender Überblick über die bereits publizierte Veröffentlichung, welche dieser Arbeit angehängt ist. Beide Arbeiten sind federführend von mir erstellt worden.

1.1 Einleitung

1.1.1 Das Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom stellt in den USA die häufigste Todesursache unter allen Tumorentitäten des weiblichen Reproduktionstraktes dar und belegt Rang fünf der krebisbedingten Todesfälle bei Frauen (American Cancer Society, 2021). Weltweit betrachtet beansprucht es mit einer Inzidenz von 313.959 im Jahr 2020 Rang 20 der Krebsneuerkrankungen und ist mit 207.252 Toten ursächlich für 2,1 % der auf Krebserkrankungen zurückzuführenden Todesfälle (Sung et al., 2021).

Infolge fehlender pathognomonischer Frühsymptome werden 75 % der Fälle erst in einem fortgeschrittenen Stadium klinisch manifest (Lasch, 2017) und äußern sich initial durch unspezifische gastrointestinale oder urologische Symptome, später durch B-Symptomatik und progredienten abdominellen Aszites (Kreienberg et al., 2009; Weber, 2017). Final sind bei Verdacht auf ein Ovarialkarzinom sowohl Diagnose als auch mögliche Therapieoptionen ausschließlich über eine operative Stadienbestimmung (engl. 'staging') mit histopathologischer Untersuchung des Tumorgewebes festzulegen und entsprechend der Klassifikation der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) einzuordnen (Lasch, 2017; Petru et al., 2019). Therapeutisch stellen die zytoreduktive Chirurgie und die adjuvante Chemotherapie das optimale Prozedere dar (Norell et al., 2020). Im Speziellen ist zwischen einer primären Tumormassenreduktion (engl. 'debulking') oder einer neoadjuvanten Chemotherapie, gefolgt von einem Intervalldebulking, zu unterscheiden (Norell et al., 2020). Bei einer nachgewiesenen BRCA (Breast Cancer)-1/2-Mutation eröffnet der Einsatz von PARP (Poly ADP ribose polymerase)-Inhibitoren nach Ansprechen auf eine platinhaltige Chemotherapie in der Erstlinien-Therapie einen effektiven Ansatz hinsichtlich einer

Risikoreduktion von Krankheitsprogress oder Tod (Moore et al., 2018). Des Weiteren kann auch die Applikation von Bevacizumab in fortgeschrittenen Stadien IIIB bis IV zu einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens führen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020).

Aufgrund der überwiegend spät gestellten Erstdiagnose sind die Überlebensaussichten stark reduziert, wobei das relative 5-Jahres-Überleben bei derzeit 43 % liegt (RKI und GEKID, 2019). Bei einer Früherkennung liegen die relativen Überlebensraten bei 89 % im Stadium I beziehungsweise bei 77 % im Stadium II (RKI und GEKID, 2019). Nicht zuletzt stellt das operative Debulking selbst aufgrund der hohen chirurgischen Invasivität und intraoperativer deutlicher Veränderungen der Hämodynamik einen risikoreichen Eingriff für die Patientinnen dar und ist eine Herausforderung für Operateur und Anästhesist gleichermaßen (Egger et al., 2020). Diese hämodynamischen Veränderungen fallen bei zytoreduktiven operativen Eingriffen bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom im Vergleich zu anderen Tumorentitäten besonders ausgeprägt aus.

1.1.2 Vaskuläre Veränderungen im Rahmen tumorbedingter Proliferation

Im Rahmen maligner Prozesse und Tumorwachstum verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenetisch wirkenden Faktoren in Richtung einer diffusen Vaskularisierung des Tumorgewebes (Folkman, 2008). Diese gliedert sich in eine avaskuläre und eine vaskuläre Phase, deren Übergang als „angiogenic switch“ bezeichnet wird (Folkman, 2008). Die avaskuläre Phase ist dominiert von diffus angeordneten neoplastischen Zellen, die als Kolonie im Ruhezustand („quiescent state“) via Diffusion versorgt werden, bevor der Tumor beginnt, infiltrierend zu wachsen (Ribatti und Vacca, 2008). Aufgrund der im Zuge der stetigen Proliferation sich vergrößernden interzellulären Diffusionsstrecken kommt es im Zentrum des Tumors vermehrt zu Zuständen chronischer Hypoxie (Ribatti und Vacca, 2008). Dies stellt für die Tumorzellen einen adäquaten Reiz zur Expression und Stabilisation von HIF (Hypoxia-inducible factor) dar. In der Folge wird der oben beschriebene Ruhezustand abgelöst durch einen aktivierten, pro-angiogenen Zustand, in welchem Gene des Angiopoietin (ANG)/TIE- und VEGF (Vascular endothelial growth factor)-Systems als zentrale Induktoren von Angiogenese, Invasion, Metabolismus und Proliferation agieren

(Bronsert und Werner, 2019; Charlesworth und Harris, 2008; Hashimoto und Shibasaki, 2015).

Dabei bedeutet Angiogenese das Aussprossen endothelialer Zellen aus bereits existierenden Blutgefäßen und basiert nicht wie die embryonale Vaskulogenese auf Stammzellen mesodermalen Ursprunges (Hämangioblasten) (Folkman et al., 1989). Auf diese Weise induzieren sich neoplastisches Wachstum und Tumorangiogenese fortlaufend selbst, wobei der neovaskuläre Gefäßplexus eine ausreichende Blutversorgung der Zellen im Umkreis von jeweils 100 bis 200 µm sicherstellt (Bronsert und Werner, 2019; Eichmann et al., 2008). Die neu aussprossenden Blutgefäße weisen ihrerseits jedoch eine gestörte Gefäßarchitektur auf (Eichmann et al., 2008).

Subzellulär bewirkt VEGF-A aufgrund der Interaktion mit VEGFR2 (Vascular endothelial growth factor Rezeptor) eine Destabilisierung der Adherens Junctions über eine Phosphorylierung von Serin- und Tyrosinresten an VE-Cadherin (Vascular endothelial cadherin) (Roux und Gavard, 2019). Gleichermaßen führt VEGF-A auf der Basis einer Src-vermittelten Phosphorylierung von Tyrosinresten an Occludin zu einer Destabilisierung der Tight Junctions und ihrer Zell-Zell-Adhäsion infolge einer gestörten Occludin/ZO-1- (Zonula occludens 1)-Interaktion (Roux und Gavard, 2019). Insgesamt bedingt so die in tumorösen Geweben vorherrschende kontinuierliche Freisetzung pro-angiogenetischer Faktoren wie VEGF-A eine Veränderung der vaskulären Zellarchitektur (Nagy et al., 2008). Die daraus resultierende Beeinträchtigung der endothelialen Schrankenfunktion verursacht eine chronische Hyperpermeabilität mit Auswirkungen auf sowohl Mikro- und Makrozirkulation (Nagy et al., 2008; Siddall et al., 2017) und bildet die Grundlage für Tumorwachstum und hämatogene Metastasierung aufgrund der Invasion tumoröser Zellen in das fragile Gefäßsystem (Eichmann et al., 2008; Liu und Cao, 2016). Neben VEGF ist das Bindungsverhältnis der kompetitiv antagonistisch agierenden Angiopoietine 1 und 2 an ihrem Rezeptor TIE2 maßgeblich für den vaskulären Wachstumsstatus und reguliert diesen zwischen Ruhe- oder Aktivierungszustand (Hilbert und Klaschik, 2015; Yuan et al., 2009). ANG-1 bindet an TIE2 und induziert dessen Aktivierung über eine kontinuierliche Phosphorylierung des Rezeptors, die über den Signalweg der PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) und AKT (Proteinkinase B) sowohl Zellüberleben als auch Antipermeabilität und anti-inflammatorische Wirkungen auf Endothelzellen vermittelt und somit den Ruhezustand

von Endothelzellen stabilisiert (Hilbert und Klaschik, 2015; Yuan et al., 2009). ANG-2 hingegen inhibiert die ANG-1-induzierte Phosphorylierung von TIE2 durch kompetitiven Antagonismus am Rezeptor und schwächt die Wirkung von ANG-1 in Form einer Verstärkung von Endothelzellmigration, Inflammation und Permeabilität ab (Hilbert et al., 2017; Yuan et al., 2009). Im Verlauf führt die im Rahmen der Hyperpermeabilität voranschreitende Extravasation wasserbindender Proteine wie Albumin zu einem Anstieg des interstitiellen Druckes, welcher zur Ausbildung eines peritumorösen Ödems beiträgt (Folkman, 2008; Jain et al., 2008). Die in großem Maße ausströmende proteinreiche Flüssigkeit manifestiert sich beim Ovarialkarzinom mit Peritonealkarzinose abdominell als Aszites. Die Menge an gebildetem Aszites ist signifikant mit einem kürzeren progressionsfreien und absoluten Überleben assoziiert (Ford et al., 2020; Szender et al., 2017).

1.1.3 Anästhesiologische Besonderheiten (im Rahmen zytoreduktiver abdomineller Eingriffe)

In malignen Geweben herrscht neben einer unregelmäßigen zellulären Proliferation also ebenso eine stark erhöhte vaskuläre Permeabilität vor, welche andererseits ebenfalls pathognomonisch für Inflammation (und Sepsis als Prototyp der systemischen Inflammation) ist. Auch dabei gelangt als Folge einer vaskulären Leckage proteinreiches Transsudat von intravasal in den interstitiellen Raum. Eine solche initial lokale sogenannte Hyperpermeabilität gipfelt aufgrund einer fehlregulierten, überschießenden Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren als Folge einer Infektion in eine generalisierte (systemische) vaskuläre Hyperpermeabilität mit hämodynamischer Instabilität, distributivem Schock und finalem Multiorganversagen (Bloos et al., 2008; Siddall et al., 2017; Standl et al., 2018). In den lokalen pathophysiologischen Prozessen ähneln sich Inflammation und Tumorprogression daher in bedeutender Weise (Aguilar-Cazares et al., 2019). In beiden Entitäten finden sich eindeutig veränderte Expressionsprofile angiogenetischer Gene, die einen entscheidenden Einfluss auf die endotheliale Architektur haben.

Interessanterweise stellt der primär durch eine VEGF-induzierte Hyperpermeabilität bedingte Aszites bei abdominellem Tumorwachstum (wie beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom) auch einen Risikofaktor für eine perioperative Verschlechterung der

Hämodynamik dar (Ford et al., 2020; Hunsicker et al., 2015). Dabei korreliert die Menge an Aszites mit der Häufigkeit intraoperativ auftretender hämodynamischer Komplikationen, wobei diese mit der Menge an Aszites zunehmen (Hunsicker et al., 2015). So zeigten sich bei einem präoperativen Aszitesvolumen >500 mL intraoperativ ein signifikant erhöhter Volumenbedarf sowie deutliche Verschlechterungen der systemischen Hämodynamik (Hunsicker et al., 2015).

Aus den dargestellten Zusammenhängen ergibt sich daher die Überlegung, dass es (analog zur systemischen Inflammation in der Sepsis) auch bei zwar lokalisierten, aber fortgeschrittenen Tumorerkrankungen wie dem Ovarialkarzinom mit Peritonealkarzinose zu einer generalisierten, systemischen Veränderung der Gefäßbiologie kommen kann. Dies könnte eine Erklärung für die ausgeprägten intraoperativen hämodynamischen Veränderungen im Rahmen von Debulking-Operationen bei Ovarialkarzinomen sein. Dies wurde bisher jedoch noch nicht systematisch untersucht.

1.1.4 Hintergründe und Fragestellung

Bisherige Erkenntnisse zu Einflüssen tumorinduzierter pro-angiogenetischer Faktoren auf die Gefäßarchitektur beschränkten sich auf die unmittelbar peritumorös gelegenen Gefäße und können einen intraoperativ gesteigerten Volumenverlust und konsekutiven -bedarf bei Operationen von Ovarialkarzinomen nicht hinreichend erklären. Ziel der vorliegenden Studie war es daher, einen möglichen Zusammenhang relevanter molekularer pro-angiogenetischer Faktoren mit der systemischen Gefäßmorphologie zu untersuchen und so die Hypothese zu prüfen, dass die Expressionsprofile vaskulärer und endothelialer Gene bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom im fortgeschrittenen Stadium nicht nur in intra- und peritumorösem Gewebe, sondern ebenso in peripher lokalisiertem, primär gesundem Gewebe verändert sind.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Studiendesign und Studienpopulation

In diese prospektive Beobachtungsstudie wurden im Zeitraum von April 2019 bis April 2020 insgesamt 32 Patientinnen eingeschlossen. Nach entsprechender Aufklärung und Einwilligung wurden einerseits Patientinnen mit einer geplanten Laparatomie aufgrund

eines fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms rekrutiert (Fallkohorte, genannt OC-Gruppe) und andererseits Patientinnen mit Indikation zur Laparotomie aufgrund einer benignen Indikation (Myomektomie, Hysterektomie) in die Kontrollgruppe aufgenommen.

Ausschlusskriterien waren gruppenübergreifend die Unfähigkeit oder Weigerung, eine schriftliche Einverständniserklärung abzugeben, ein Alter der Patientin unter 18 Jahren sowie eine Schwangerschaft.

Alle mit dieser Studie verbundenen Handlungen wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki und nach der Genehmigung der Ethikkommission (EK) des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt. Die Genehmigung des Vorhabens durch die EK erfolgte am 12. März 2019 (Protokollnummer 360/16).

Vor Beginn der Narkoseeinleitung erhielten Patientinnen der OC-Gruppe einen thorakalen Periduralkatheter (PDK) zur postoperativen Analgesie sowie nach Narkoseeinleitung einen femoralarteriellen und einen zentralvenösen Katheter. Die Narkose wurde durch Sufentanil, Propofol und Rocuronium eingeleitet und nach der endotrachealen Intubation als balancierte Anästhesie mit Isofluran oder Sevofluran unter der kontinuierlichen Applikation von Remifentanil fortgeführt. Zusätzlich wurden eine Magensonde und ein transurethraler Blasenkatheter gelegt. Das intraoperative Volumenmanagement zur hämodynamischen Stabilisierung erfolgte unter der kontinuierlichen Blutdruckmessung mit kristalloiden und kolloidalen Infusionslösungen, um die Pulsdruckvariation (eng. Pulse Pressure Variation, PPV) unter 15 % zu halten. Lag der arterielle Mitteldruck (eng. Mean arterial pressure, MAP) trotz vorheriger Volumensubstitution unter 65 mmHg, so wurde Noradrenalin als Vasopressor appliziert. Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten wie auch gefrorene Frischplasmen (eng. Fresh Frozen Plasma, FFP) wurden bedarfsadaptiert entsprechend den aktuellen Transfusionsrichtlinien gegeben. Nach Abschluss der chirurgischen Maßnahmen erfolgten bei stabilem Zustand die Extubation sowie eine entsprechende Verlegung auf die Peripher- oder Intensivstation.

1.2.2 Messung zirkulierender Biomarker

10 mL Blut wurden präoperativ abgenommen, nach Koagulation zentrifugiert und das abgetrennte Serum bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ zur nachfolgenden Analyse gelagert. In den Serumproben wurde später die Konzentration von ANG-1, ANG-2 und VEGF mittels

ELISA gemäß den Herstellerangaben quantifiziert. Darüberhinaus wurde mittels Bead-basierter Luminex™ Multiplex-Arrays (RnD Systems, Minneapolis, MN, USA) nach Herstellerprotokoll die Konzentration der folgenden Proteine untersucht:

IL-8 (Interleukin 8), MCP-1/CCL2 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), sRAGE (Soluble Receptor for Advanced Glycation Endproducts), Resistin, ANG-2, sTIE2 (Soluble Tyrosine Kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains 2), Thrombomodulin, Syndecan-1, E-Selectin (Endothel-Selectin), sVCAM-1 (Soluble Vascular Cell Adhesion Protein) und sICAM-1 (Soluble Intercellular Adhesion Molecule).

Das im Detail in der Arbeit von Zhang et al. (2014) beschriebene Bead-basierte Prinzip sog. Multiplex-Arrays wie dem Luminex™-System ermöglicht es, mehrere Zielmoleküle (engl. 'targets') gleichzeitig in einer Serumprobe zu untersuchen (engl. 'Immunoassay'). Dabei entsprechen die mit Fluorophoren gefärbten superparamagnetischen Polystyrolkugeln (engl. 'beads') einem festgelegten Spektralbereich (bead region). Individuelle bead regions werden mit einem dem Analyt entsprechenden Antikörper beschichtet und binden während der Inkubation ihren spezifischen Biomarker aus der Serumprobe. Im Anschluss inkubieren die zuvor gewaschenen Proben erneut mit einer spezifischen Mischung aus biotinylierten Sekundärantikörpern und einem Streptavidin-Phycoerythrin (PE)-konjugat-Reporter. Mithilfe zweier im verwendeten Luminex™-Detektorgerät MAGPIX™ (Luminex Corp., Austin, TX, USA) enthaltenen Lasern wurden die analytspezifischen bead regions zuerst angeregt und anschließend die Größe des PE-abgeleiteten Signals detektiert. Dieses ist proportional zur Menge des gebundenen Analyten und gibt somit Aufschluss über dessen Quantität.

Alle Konzentrationen werden in pg/ml angegeben. Werte, die unterhalb der für den Assay individuellen Nachweisgrenze lagen, wurden auf null gesetzt. Alle Untersuchungen wurden in Duplikaten ausgeführt. Aus den Resultaten wurde der Mittelwert gebildet und für die nachfolgende weitere statistische Analyse verwendet. Alle perioperativ gewonnenen Blut- und Gewebeproben wurden durch für die Gruppenzugehörigkeit der Patientinnen und die sonstigen erhobenen Daten verblindetes Personal analysiert.

1.2.3 Gewinnung von Gewebeproben und Analyse der Genexpression

Bei allen Patientinnen wurde eine Medianlaparotomie durchgeführt. Dabei wurden bei den Patientinnen der Kontrollgruppe Gewebeproben aus dem Muskelgewebe der Bauchdecke (M. rectus abdominis) sowie Peritoneum entnommen. Patientinnen der Fallgruppe wurde zusätzlich tumorhaltiges Gewebe entnommen. Die gewonnenen Gewebeproben wurden unmittelbar nach der Entnahme temporär in flüssigem Stickstoff und zur finalen Aufbewahrung bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C tiefgefroren.

Zur Extraktion der RNA wurden die gefrorenen Proben in 4 M Guanidin-Thiocyanat (Roth, Karlsruhe, Germany) unter Verwendung eines Dispergierers (Polytron-Kinematica, Lucerne, Switzerland) homogenisiert. Die nach Abzentrifugation von Zellbestandteilen separierte RNA wurde mit TRIzol™-Lösung (Fisher Scientific, Schwerte, Germany) entsprechend der Herstellerangaben isoliert. Dabei denaturiert TRIzol™ entsprechend dem Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktionsverfahren Proteine einschließlich RNasen, die in Phenol gelöst sind. Die in Wasser gelösten Nukleinsäuren setzen sich in Gegenwart von Chloroform von den gelösten Proteinen ab und bilden zwei heterogene Phasen. Aus der oberen wässrigen Phase lassen sich die Nukleinsäuren durch Ausfällen mit 2-Propanol extrahieren. Das 2-Propanol wurde im Anschluss mit Ethanol ausgewaschen und das daraus entstehende Pellet luftgetrocknet, bevor es in RNase-freiem Wasser resuspendiert wurde. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde spektrophotometrisch quantifiziert (NanoDrop, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Nach Synthese der cDNA aus 2 µg RNA mittels des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) wurde die Expression der folgenden Gene mithilfe der quantitativen Real-Time-PCR (RT-PCR) mit Taqman™ Expression Assay und Taqman™ Gene Expression Master Mix auf einem ViiA7-Gerät (alles Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) bestimmt:

ANG-1, ANG-2, TIE2, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, eNOS (Endothelial Nitric Oxide Synthase), iNOS (Inducible Nitric Oxide Synthase), Occludin, Claudin 1, Claudin 5, VE-Cadherin.

Die Expression des jeweils untersuchten Zielgens wurde auf die Expression des Haushaltsgens 18S-ribosomale RNA (18s-rRNA) normalisiert (relative Quantifizierung

(RQ)) und wird als Vielfaches der Expression in der jeweiligen Kontrolle angegeben (sog. Delta-Delta CT-Methode) (s.a. Aerts et al., 2004).

1.2.4 Statistik

Die erhobenen Daten wurden in MS (Microsoft) Excel (Microsoft Corp., Redmond, CA, USA) übertragen und mithilfe der Software GraphPad PRISM 8 (La Jolla, CA, USA) statistisch analysiert und visualisiert.

Alle Daten werden als prozentuale Werte oder als Medianwerte zusammen mit dem 25. und 75. Perzentil dargestellt. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen Fall- und Kontrollgruppe wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Testes ermittelt. Dichotome Parameter wurden mittels des exakten Tests nach Fisher verglichen. Zusammenhänge zwischen den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse und klinischen Parametern wurden mit dem Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten bewertet. p-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Informationen zu Studienpopulation und Prozeduren

Von den insgesamt 32 in die Studie eingeschlossenen Patientinnen entfielen 22 auf die Fallkohorte (OC-Gruppe) und 10 Patientinnen auf die Kontrollkohorte. Lag das mediane Gesamtalter aller Patientinnen bei 59 (45–66) Jahren, so war es in der OC-Gruppe signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (63 (58–67) Jahren vs. 38 (33–51) Jahren ($p < 0.001$)). In Hinblick auf die prozeduralen Kennzahlen fiel die Fallkohorte durch eine signifikant längere Operations- sowie Narkosedauer auf (242 (130–354) Min. vs. 98 (87–136) Min. bzw. 370 (328–508) Min. vs. 171 (144–217) Min. (p jeweils $< 0,001$)). Ein Unterschied zeigte sich ebenso hinsichtlich des perioperativen Volumenbedarfs. Dabei erhielten die Patientinnen der OC-Gruppe (bezogen auf die Dauer der Operation) intraoperativ mehr Flüssigkeit als die der Kontrollgruppe (783 (539–893) mL/h vs. 491 (382–674) mL/h ($p = 0.01$)) bzw. 7.5 (6–11.25) Infusionen à 500 ml vs. 2.5 (2–4.25) Infusionen ($p < 0.001$)). Zudem mussten signifikant höhere Dosen des Vasopressors Noradrenalin zur Kreislaufstabilisierung verabreicht werden (0.06 (0.04–0.14) $\mu\text{g}/\text{kg}^*\text{min}$ vs. 0 (0–0) $\mu\text{g}/\text{kg}^*\text{min}$ ($p < 0.001$)). In Konsequenz wiesen die

Patientinnen der OC-Gruppe postoperativ eine erhöhte normalisierte Flüssigkeitsbilanz auf (644 (493–792) mL/h vs. 403 (335–619) mL/h ($p = 0,02$)). Im Anschluss an die Operation wurden in der OC-Gruppe signifikant mehr Patientinnen intensivmedizinisch betreut als in der Kontrollgruppe (9 (41 %) vs. 0 (0 %) ($p = 0,03$)). Wie **Tabelle 1** zu entnehmen ist, zeigten unter anderem Parameter wie die intraoperative Urinausscheidung oder der Blutverlust verbunden mit der Gabe von Blutersatzpräparaten keine signifikanten Unterschiede.

1.3.2 Zirkulierende Biomarker im Serum

Die Untersuchung zirkulierender Biomarker in den präoperativ gewonnenen Serumproben ließ einen signifikanten Anstieg der pro-inflammatorischen Marker IL-8 (5,88 (0–13,41) pg/mL vs. 0,42 (0–2,28) pg/mL ($p = 0,03$)) sowie MCP-1/CCL2 (171,7 (139,5–238,2) pg/mL vs. 123,2 (99,4–174,7) pg/mL ($p = 0,02$)) in der OC-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennen (**Tabelle 2**). Ein Anstieg findet sich gleichermaßen in der Serumaktivität der Adhäsionsmoleküle sVCAM-1 (CD 106) und sICAM-1 (CD 54) sowie bei Thrombomodulin, deren Konzentration in der OC-Gruppe ebenfalls erhöht ist ($p < 0,03$). VEGF und Biomarker der ANG/TIE-Achse waren in der Fallgruppe ebenso verstärkt nachweisbar, wenngleich jedoch in nicht signifikantem Maße.

1.3.3 Genexpressionsanalyse in Gewebebiopsien

Im direkten Vergleich der Genexpressionsmuster zwischen Peritoneum und Muskelgewebe in der Kontrollgruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Wie im Detail aus den **Tabellen 3 und 4** zu entnehmen ist, wies die Expression solcher Gene, welche im Zusammenhang mit einer vaskulären Leckage stehen, eine signifikante Veränderung in den Proben aus Karzinomgewebe auf, verglichen mit tumorfreiem Peritonealgewebe der Kontrollpatientinnen (**Tabelle 3**). Die statistisch signifikanten Veränderungen betrafen die ANG/TIE-Achse und das VEGF/VEGFR-System, jedoch nicht die NO-Synthasen oder Adhäsionsmoleküle. So waren sowohl ANG-1 als auch ANG-2 in tumorösem Gewebe in der Expression herunterreguliert im Vergleich zur Expression im Peritoneum der Kontrollgruppe (0,13

(0,04–0,46) vs. 0,99 (0,68–2,04) bzw. 0,28 (0,09–0,60) vs. 1,31 (0,42–2,07) ($p = 0,003$ und $p = 0,005$)). Dabei schien im Tumorgewebe das pathophysiologisch bedeutsame Verhältnis der beiden Angiopoietine 1 und 2 zugunsten von ANG-2 verschoben, dies war jedoch statistisch nicht signifikant.

Auch die Expression des korrespondierenden Angiopoietin-Rezeptors TIE2 war in der OC-Gruppe reduziert (0,13 (0,05–0,33) vs. 1,50 (0,55–2,11) ($p < 0,001$)). War die verminderte Expression von VEGF in der Fallgruppe nicht signifikant, so zeigten VEGFR1 und VEGFR2 ebenfalls eine signifikant herabregulierte Expression (0,20 (0,12–0,51) vs. 1,19 (0,50–2,30) und 0,12 (0,07–0,30) vs. 1,02 (0,68–1,51); ($p = 0,001$ und $p < 0,001$)) (**Tabelle 3**).

Im Vergleich der entsprechenden tumorfreien Peritoneumproben von Kontroll- und Fallgruppe war ANG-1 in seiner Expression signifikant bei OC- Patientinnen erniedrigt ($p = 0,008$). Daraus resultierend war das ANG-2/1-Verhältnis im Peritonealgewebe der OC-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe um mehr als das Doppelte erhöht (2,53 (1,32–4,13) vs. 1,03 (0,55–1,78) ($p = 0,03$)) (**Tabelle 3**).

Bei der Untersuchung der Genexpression in peripherem, also tumorfernem Muskelgewebe aus der Bauchdecke zeigten sich interessanterweise ebenfalls signifikante Gruppenunterschiede. Diese betrafen, wie in **Tabelle 4** dargestellt, ebenfalls die Gene der ANG/TIE-Achse. Unterschiede in den Expressionsprofilen der NO-Synthasen und Adhäsionsmoleküle waren dagegen lediglich in nicht signifikantem Maße zu verzeichnen. Die bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom verminderte Expression von ANG-1 und TIE2 ($p = 0,003$ und $p = 0,005$) zusammen mit dem in dieser Gruppe deutlich erhöhten ANG-2/1-Verhältnis (4,42 (3,24–12,3) vs. 0,99 (0,61–1,58) ($p < 0,001$)) deutet auf die Entwicklung eines permeabilitätsgesteigerten Genotyps hin. **Abbildung 1** gibt eine graphische Übersicht über die Expressionsprofile aller signifikant veränderten Gene in den drei untersuchten Gewebearten zwischen Fall- und Kontrollgruppe.

Die durchgeführte Spearman-Rangkorrelationsanalyse zeigte eine signifikante Assoziation der Genexpressionsmuster von ANG-1, dem ANG-2/1-Verhältnis sowie VE-Cadherin im Tumorgewebe der OC-Patientinnen mit der postoperativen Flüssigkeitsbilanz ($r = 0,53$ ($p = 0,03$), $r = 0,53$ ($p = 0,03$) und $r = 0,55$ ($p = 0,02$)).

Tab. 1: Darstellung der Patienten- und Verfahrensdetails

Darstellung als Prozentwerte oder als Median mit 25. und 75. Perzentil. Für kontinuierliche Werte wurde der Mann-Whitney-U-Test und für dichotome Parameter der exakte Test nach Fisher verwendet. ICU = Intensive Care Unit, PRBC = Packed red blood cells (Tabelle adaptiert aus Kinnen et al., 2021)

Parameter	Kontrollgruppe	Fallgruppe	p-Wert
Patientendetails:			
n	10	22	
Alter (Jahre)	38 (33–51)	63 (58–67)	<0,001
Größe (cm)	168 (164–172)	165 (159–169)	0,17
Gewicht (kg)	71 (64–78)	68 (53–84)	0,44
Body mass index (kg/m ²)	24 (22,7–28,4)	24,3 (18,9–29,7)	0,61
Diagnose:			
Uterusmyom (n [%])	8 (80)	–	
Ovarialzyste (n [%])	1 (10)	–	
Ovarialfibrom (n [%])	1 (10)	–	
Verfahrensdetails:			
Operationsdauer (min)	98 (87–136)	242 (130–354)	<0,001
Anästhesiedauer (min)	171 (144–217)	370 (328–508)	<0,001
Postoperative ICU-Therapie (n [%])	0 (0)	9 (41)	0,03
Intraoperative Volumengabe (mL/h)	491 (382–674)	783 (539–893)	0,01
Postoperative Flüssigkeitsbilanz (mL/h)	403 (335–619)	644 (493–792)	0,02
Intraoperative Urinausfuhr (mL/h)	58 (11–65)	72 (26–127)	>0,99
Nummer kristalloider Infusionslösungen á 500 mL	2,5 (2–4,25)	7,5 (6–11,25)	<0,001
Nummer kolloidaler Infusionslösungen á 500 mL	0 (0–0)	0 (0–0,25)	0,17
Geschätzter intraoperativer Blutverlust (mL/h)	127 (44–182)	81 (55–109)	0,37
Patienten mit PRBC Transfusion (n [%])	0 (0)	5 (23)	0,16
Von denen: Anzahl der transfundierten PRBC-Konzentrate	–	2 (1–2,5)	
Anzahl der transfundierten FFP-Konzentrate	0 (0–0)	0 (0–2)	0,14
Anzahl der transfundierten Thrombozytenkonzentrate	0 (0–0)	0 (0–0)	>0,99
Maximale Noradrenalinosis (µg/kg*min)	0 (0–0)	0,06 (0,04–0,14)	<0,001
Maximale Dobutamindosis (µg/kg*min)	0 (0–0)	0 (0–0)	0,53

Tab. 2: Darstellung der zirkulierenden Biomarker in Serumproben (präoperativ)
Darstellung als Medianwerte mit 25. und 75. Perzentil. Mann-Whitney-U-Test. MCP-1/CCL2 = Monocyte Chemoattractant Protein-1, sRAGE = soluble Receptor for Advanced Glycation Endproducts, ANG-1 =Angiopoietin-1, ANG-2 =Angiopoietin-2, sTIE2 = soluble Tyrosine Kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains 2, VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor, sVCAM-1 = soluble Vascular Cell Adhesion Protein 1, sICAM-1 = soluble Intercellular Adhesion Molecule 1 (Tabelle adaptiert aus Kinnen et al., 2021)

	Kontrollgruppe (pg/mL)	Fallgruppe (pg/mL)	p-Wert
Pro-inflammatorische			
Marker			
IL-8	0,42 (0–2,28)	5,88 (0–13,41)	0,03
MCP-1/CCL2	123,2 (99,4–174,7)	171,7 (139,5–238,2)	0,02
sRAGE	340,9 (151,2–634,5)	516,3 (328,4–758,5)	0,25
Resistin	6119 (3172–9559)	6512 (4326–10.038)	0,59
Marker vaskulärer Leckage			
ANG-2	721,4 (396,0–1034)	985,9 (656,9–1360)	0,29
sTIE2	4.432 (3.068–5.338)	6.438 (3.740–8.042)	0,09
VEGF	163,3 (0–410,9)	499,6 (62,73–821,6)	0,07
Adhäsionsmoleküle			
E-selectin	6.662 (4.513–11.540)	9630 (6739–11.684)	0,15
sVCAM-1	275.924 (238.808–332.216)	395.023 (289.266–554.476)	0,01
sICAM-1	119,735 (76.702–141.354)	153.568 (128.516–216.570)	0,02
Andere			
Syndecan-1	170,4 (0–413)	362,4 (0–916,4)	0,27
Thrombomodulin	1.445 (1.383–1.745)	2.041 (1.472–2.576)	0,03

Tab. 3: Analyse der Genexpression in peritonealen und tumorösen Geweben
Angabe in RQ (Zielgen / 18S-RNA) als Medianwerte mit 25. und 75. Perzentil. Vergleich mit der Expression der jeweiligen Gene in der Kontrollgruppe mittels Mann-Whitney-U-Test. eNOS = Endothelial Nitric Oxide Synthase, iNOS = Inducible Nitric Oxide Synthase, ANG-1 und -2 = Angiopoietin-1 und -2, TIE2 = Tyrosine Kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains 2, VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor, VEGFR1 und 2 = VEGF receptor 1 und 2, ANG-2/1 = Verhältnis zwischen ANG-2 und -1 Expression, VE-Cadherin = Vascular Endothelial Cadherin (Tabelle adaptiert aus Kinnen et al., 2021)

	Kontrollgruppe	Fallgruppe	p-Wert	Tumorgewebe	p-Wert
	Peritoneum	Peritoneum			
NO-Synthasen					
eNOS	0,94 (0,31–2,57)	1,78 (0,93–2,50)	0,40	0,28 (0,18–1,23)	0,14
iNOS	0,75 (0,48–2,63)	1,00 (0,65–2,20)	0,61	0,34 (0,20–0,95)	0,053
Gene assoziiert mit Gefäßleckagen					
ANG-1	0,99 (0,68–2,04)	0,19 (0,11–0,64)	0,008	0,13 (0,04–0,46)	0,003
ANG-2	1,31 (0,42–2,07)	0,55 (0,24–1,94)	0,34	0,28 (0,09–0,60)	0,005
TIE2	1,50 (0,55–2,11)	0,66 (0,37–1,29)	0,13	0,13 (0,05–0,33)	<0,001
VEGF	1,16 (0,44–1,64)	0,72 (0,55–1,20)	0,71	0,92 (0,50–2,76)	0,93
VEGFR1	1,19 (0,50–2,30)	1,08 (0,69–1,35)	0,68	0,20 (0,12–0,51)	0,001
VEGFR2	1,02 (0,68–1,51)	0,82 (0,45–1,97)	0,64	0,12 (0,07–0,30)	<0,001
ANG-2/1	1,03 (0,55–1,78)	2,53 (1,32–4,13)	0,03	2,36 (0,86–3,33)	0,06
Adhäsionsmoleküle					
Occludin	0,77 (0,28–6,62)	6,29 (0,10–21,8)	0,46	0,19 (0,08–12,07)	0,44
Claudin 1	1,18 (0,30–3,88)	0,71 (0,16–1,98)	0,43	0,90 (0,08–3,26)	0,63
Claudin 5	0,65 (0,25–5,93)	1,42 (0,59–5,69)	0,40	0,31 (0,03–6,37)	0,29
VE-Cadherin	2,01 (0,32–5,39)	1,16 (0,32–2,80)	0,50	0,64 (0,21–4,83)	0,58

Tab. 4: Analyse der Genexpression in Muskelgewebe der Bauchwand

Angabe in RQ (Zielgen / 18S-RNA) als Medianwerte mit 25. und 75. Perzentil. Vergleich mit der Expression der jeweiligen Gene in der Kontrollgruppe mittels Mann-Whitney-U-Test. eNOS = Endothelial Nitric Oxide Synthase, iNOS = Inducible Nitric Oxide Synthase, ANG-1 = Angiopoietin-1, ANG-2 = Angiopoietin-2, TIE2 = Tyrosine Kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains 2, VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor, VEGFR1 = VEGF receptor 1, VEGFR2 = VEGF receptor 2, ANG-2/1 = Verhältnis zwischen ANG-2 und -1 Expression, VE-Cadherin = Vascular Endothelial Cadherin (Tabelle adaptiert aus Kinnen et al., 2021)

	Kontrollgruppe	Fallgruppe	p-Wert
	Peripherer Muskel	Peripherer Muskel	
NO-Synthasen			
eNOS	0,84 (0,67–1,58)	0,94 (0,64–1,78)	0,65
iNOS	1,13 (0,74–1,38)	0,58 (0,36–1,38)	0,13
Gene assoziiert mit Gefäßleckagen			
ANG-1	1,38 (0,47–2,21)	0,17 (0,09–0,45)	0,003
ANG-2	1,11 (0,66–2,02)	1,06 (0,40–3,52)	0,76
TIE2	0,97 (0,77–1,47)	0,56 (0,37–0,71)	0,005
VEGF	1,55 (0,44–2,18)	0,57 (0,37–1,16)	0,1
VEGFR1	1,79 (0,27–2,12)	0,42 (0,25–1,08)	0,1
VEGFR2	1,17 (0,82–1,37)	0,53 (0,30–1,68)	0,31
ANG-2/1	0,99 (0,61–1,58)	4,42 (3,24–12,3)	<0,001
Adhäsionsmoleküle			
Occludin	0,87 (0,52–6,71)	1,10 (0,36–14,2)	0,7
Claudin 1	0,99 (0,62–1,90)	1,13 (0,47–2,46)	0,86
Claudin 5	0,62 (0,56–2,49)	1,29 (0,40–12,7)	0,53
VE-Cadherin	0,96 (0,79–1,16)	0,74 (0,41–1,00)	0,09

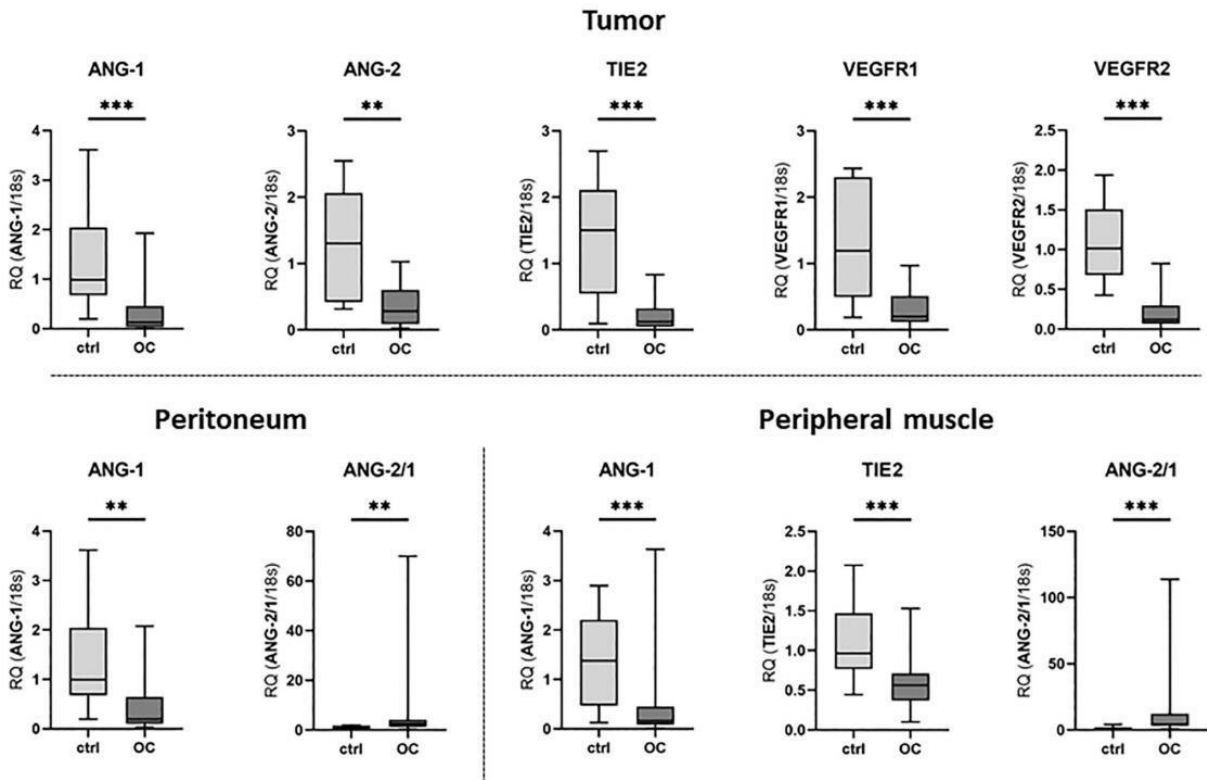


Abb. 1: Signifikant veränderte Genexpression bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom
 Die Abbildung ist aus der Originalpublikation Kinnen et al. (2021) übernommen. Gezeigt sind die in ihrer Expression signifikant veränderten Gene in Tumorgewebe, tumorfreiem Peritoneum und peripherem Bauchwandmuskel von Patientinnen mit Ovarialkarzinom (ovarian cancer, OC), verglichen mit einem gesunden Kontrollkollektiv (control, ctrl). Die Expression des jeweiligen Zielgens wird als Vielfaches der jeweiligen Kontrolle (Peritoneum oder peripherer Muskel) angegeben. Die Daten sind als Medianwerte mit dem 25. und 75. Perzentil und Bereich gezeigt und wurden mittels Mann-Whitney-U-Tests verglichen. n = 10 für die Kontrollgruppe, n = 22 für OC-Gruppe. ANG-1 = Angiopoietin-1, ANG-2 = Angiopoietin-2, TIE2 = Tyrosine Kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains 2, VEGFR1 = Vascular Endothelial Growth Factor receptor 1, VEGFR2 = Vascular Endothelial Growth Factor receptor 2, ANG-2/1 = Verhältnis zwischen ANG-2 und -1 Expression. (Abbildung adaptiert aus Kinnen et al., 2021)

1.4 Diskussion

Debulking-Operationen bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom stellen aufgrund des perioperativ oftmals stark gesteigerten Volumenbedarfs und damit einhergehenden kritischen hämodynamischen Instabilitäten stets Hochrisikoeingriffe dar. Vorausgegangene Studien lassen einen Einfluss der malignen Grunderkrankung auf die systemische Gefäßbiologie vermuten, was einen Erklärungsansatz für die beobachteten perioperativen Flüssigkeitsverschiebungen darstellen kann. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen dies, indem sie eine signifikante Verschiebung der Expression vaskulärer und endothelialer Funktionsgene zugunsten eines hyperpermeablen und pro-angiogenetischen Genotyps bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom im Vergleich zu tumorfreien Kontrollpatientinnen aufzeigen. Relevante Veränderungen der ANG/TIE-Achse sowie des VEGF-Systems beschränkten sich dabei nicht nur auf tumoröses Gewebe und tumorassoziiertes Peritoneum, sondern imponierten ebenso signifikant in peripheren Gewebeproben ohne direkten oder metastatisch bedingten Tumorbezug. Gleichermaßen zeigten Patientinnen mit Ovarialkarzinom bei prolongierten Operationszeiten einen intra- und postoperativ erhöhten Flüssigkeitsbedarf sowie vermehrte Kreislaufinstabilitäten und postoperative intensivstationäre Behandlungen.

Bereits Studien von Hata et al. (2004) und Zhang et al. (2003) zeigten den Zusammenhang zwischen Überexpression von VEGF und einem verschobenen ANG-2/1-Verhältnis und einem daraus resultierenden instabilen Gefäß-Phänotyp im Rahmen eines pro-angiogenetischen Tumormilieus. Dies konnten wir an unseren Ergebnissen nachvollziehen, denn die Expression von ANG-1, -2 und TIE2 war in der Fallgruppe im Karzinomgewebe signifikant verändert. Zudem zeigten die Expressionsprofile von VEGFR-1 und -2 statistisch signifikante Veränderungen, welche bereits Sopo et al. (2019) nachweisen konnten und gleichzeitig eine Assoziation mit einem verschlechterten prognostischen Behandlungsergebnis aufzeigten. Das eigentlich überraschende Resultat unserer Untersuchungen ist die veränderte Expression von für die Tumor-Angiogenese relevanten Genen wie ANG-1 und TIE2 sowie das daraus resultierende verschobene Verhältnis von stabilisierendem ANG-1 und destabilisierendem ANG-2 auch in tumorfernem, peripherem Muskelgewebe. Dies

unterstreicht, dass ein fortgeschrittenes Tumorleiden eine Systemerkrankung ist. Zwar berichteten Cedervall et al. bereits 2015 über stenosierte Blutgefäße bei Brustkrebspatientinnen aufgrund tumorinduzierter Neutrophil Extracellular Traps (NETs) mit einer nachfolgenden kardialen und renalen Dysfunktion. Dies stellt jedoch im Gegensatz zu den von uns aufgezeigten systemischen Veränderungen des vaskulären Genexpressionsprofils eher eine physikalisch, weil thromboembolisch verursachte Komplikation dar und nicht einen Einfluss auf die Gefäßbiologie an sich.

Wie lässt sich die von uns gefundene Veränderung peripherer Expressionsprofile bei Ovarialkarzinompatientinnen erklären? Ein möglicher Ansatz kann ein humoral vermittelter Einfluss durch pro-inflammatorische Mediatoren wie IL-6 und MCP-1/CCL2 darstellen (Klaschik et al., 2019). Sowohl IL-6 als auch MCP-1/CCL2 regulieren ANG-1 herunter und verschieben das ANG-2/1-Verhältnis in Richtung eines pro-angiogenetischen Phänotypes (Kayakabe et al., 2012; Klaschik et al., 2019; Stamatovic et al., 2006). Nach Hefler et al. (1999) und Furukawa et al. (2013) ist die Blutserumkonzentration von MCP-1/CCL2 bei Ovarialkarzinompatientinnen gegenüber nicht-tumortragenden Kontrollpatientinnen stark erhöht. Analog dazu sind in unserer Untersuchung die Konzentrationen von MCP-1/CCL2 signifikant in den Serumproben der Fallgruppe erhöht. Eine Beeinflussung der Expression von ANG-1 und TIE2 in Form humoraler Mediatoren wäre demnach denkbar. Darüber hinaus könnte ein signifikant erhöhter IL-8-Serumgehalt entsprechend der von Conroy et al. (2018) beschriebenen Induktion eines pro-angiogenetischen Phänotypes ein weiterer in Frage kommender Kandidat sein.

Der Befund von in den Seren der Karzinompatientinnen signifikant erhöhten löslichen Adhäsionsmoleküle sVCAM-1 und sICAM-1 unterstützt die These einer systemischen endothelialen Aktivierung bei fortgeschrittenem Tumorleiden. Derart veränderte Serumkonzentration können nachgewiesenermaßen mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und reduzierter Prognose assoziiert sein (Tas et al., 2014). Dies kann ebenfalls durch tumorinduzierte pro-inflammatorische humorale Mediatoren wie TNF- α getriggert werden (Banks et al., 1993). Abschließend deuten die in den Serumproben der Fallgruppe gemessenen signifikant erhöhten Konzentrationen von Thrombomodulin und (tendenziell) Syndecan-1 analog ihres von Guo et al., (2015) und Whalen et al.,

(2000) beschriebenen Vorkommens in fortgeschrittenen Stadien des Ovarialkarzinoms ebenso auf eine relevante Alteration der Gefäßmorphologie hin.

Das sich in tumorösem und peritonealem Gewebe darstellende genetische Expressionsprofil einer reduzierten ANG-1- und TIE2-Expression steht aufgrund eines leakagefördernden Phänotypes nicht nur im Zusammenhang mit der Entstehung von Aszites, sondern ebenso mit systemisch auftretenden inflammatorischen Prozessen. So demonstrierten Mofarrahi et al. bereits 2008 eine endotoxin-vermittelte Inhibition von ANG-1 sowie TIE2 mit gleichzeitiger Induktion von ANG-2 als Ursache einer hyperpermeablen Gefäßwand bei Sepsis. Ein derart veränderter Genotyp als Induktor einer vaskulären Leckage und Inflammation konnte bereits wiederholt demonstriert werden und wird als Basis einer generalisierten vaskulären Hyperpermeabilität angenommen (Parikh, 2019). Auch die in unseren Untersuchungen gezeigte tendenziell reduzierte Expression von Adhäsionsmolekülen wie VE-Cadherin, Occludin, Claudin 1 und 5 könnte durch eine gesteigerte Permeabilität die Bildung von Aszites und den Austritt intravasalen Volumens im perioperativen Kontext zusätzlich erklären (Bekes et al., 2016; Hu et al., 2006).

Ein auch durch unsere Daten objektivierbares anspruchsvolles perioperatives Kreislauf- und Volumenmanagement in Verbindung mit extensiven Flüssigkeitsverschiebungen erinnert nicht nur an das Bild eines septischen Geschehens, sondern deckt sich ebenso mit den Erkenntnissen aus Vorstudien von Egger et al., (2020), Gehlen et al. (2020) und Klaschik et al. (2019) hinsichtlich eines Einflusses veränderter vaskulärer und endothelialer Signalkaskaden auf die perioperative Hämodynamik. Wir beobachteten einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen veränderter Genexpression im Tumorgewebe und perioperativ erhobenen hämodynamischen Parametern wie der Flüssigkeitsbilanz. Zwar zeigten unsere Untersuchungen keine direkte Korrelation zwischen der erfolgten Volumengabe und veränderten Genexpressionsmustern auch in tumorfreiem peritonealen oder peripheren Gewebe, dennoch scheint es denkbar, dass auch diese aufgrund ihrer im Zusammenhang mit einer Sepsis beschriebenen Effekte zur Destabilisierung der intraoperativen Hämodynamik beitragen.

1.5 Zusammenfassung

Ausgedehnte zytoreduktive Operationen im Rahmen eines fortgeschrittenen Ovarialkarzinom-Leidens gehen nicht nur mit chirurgischen Risiken einher, sondern sind aufgrund von unter Umständen großen perioperativen Flüssigkeitsverschiebungen auch mit relevanten hämodynamischen Instabilität assoziiert. Wir konnten in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Änderung der Expression von Genen der ANG/TIE-Achse sowie der VEGF-Familie bei Ovarialkarzinompatientinnen nicht nur in tumorösem, sondern ebenso auch in peripherem Gewebe ohne direkten bzw. metastasenbedingten Tumorbezug feststellen. Ebenso konnten wir eine signifikante Erhöhung sowohl des intra- als auch des postoperativen Volumenbedarfes im Vergleich zu malignomfreien Kontrollpatientinnen nachweisen.

In präoperativ gewonnenen Serumproben der OC-Patientinnen waren die zirkulierenden Biomarker IL-8, MCP-1/CCL2, sVCAM-1, sICAM-1 und Thrombomodulin signifikant erhöht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Expression von ANG-1, ANG-2, TIE-2, VEGFR1 und VEGFR2 in Tumorgewebe signifikant herabreguliert. Tumorfrem Peritonealproben der Fallgruppe wiesen verglichen mit Kontroll-Peritoneum eine signifikant erniedrigte Expression von ANG-1 sowie ein daraus resultierendes um mehr als das Doppelte erhöhte ANG-2/1-Verhältnis auf. Bei der Untersuchung der Genexpression in tumorfernem Muskelgewebe der Bauchdecke entsprach die verminderte Expression von ANG-1 und TIE2 zusammen mit dem erhöhten ANG-2/1-Verhältnis in der OC-Gruppe dem Expressionsprofil eines leakagefördernden Genotyps. Darüberhinaus zeigte sich eine signifikante Assoziation der veränderten Genexpressionsmuster mit der postoperativen Flüssigkeitsbilanz bei Ovarialkarzinom-Patientinnen. Die Tatsache, dass eine Veränderung des Expressionsprofils von Genen, die mit Barrieredysfunktion und Angiogenese assoziiert sind, nicht nur in Tumorgewebe selbst, sondern ebenso in peripherem Muskelgewebe von Karzinompatientinnen nachweisbar ist, unterstreicht den Charakter eines fortgeschrittenen Tumorleidens als Systemerkrankung.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Aerts JL, Gonzales MI, Topalian SL. Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using real-time RT-PCR. *Biotechniques* 2004; 36: 84-86, 88, 90-91

Aguilar-Cazares D, Chavez-Dominguez R, Carlos-Reyes A, Lopez-Camarillo C, Hernandez de la Cruz ON, Lopez-Gonzalez JS. Contribution of angiogenesis to inflammation and cancer. *Front Oncol* 2019; 9: 1399

American Cancer Society, 2021: Estimated deaths, 2021. <http://cancerstatisticscenter.cancer.org/> (Zugriffsdatum: 10.04.2021)

Banks RE, Gearing AJ, Hemingway IK, Norfolk DR, Perren TJ, Selby PJ. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. *Br J Cancer* 1993; 68: 122-124

Bekes I, Friedl TWP, Köhler T, Möbus M, Janni W, Wöckel A, Wulff C. Does VEGF facilitate local tumor growth and spread into the abdominal cavity by suppressing endothelial cell adhesion, thus increasing vascular peritoneal permeability followed by ascites production in ovarian cancer?. *Mol Cancer* 2016; 15: 1-13

Bloos F, Kortgen A, Meier-Hellmann A, Reinhart K. Sepsis. In: Burchardi H, Larsen R, Kuhlen R, Jauch KW, Schölmerich J, Hrsg. *Die Intensivmedizin*. Heidelberg: Springer, 2008: 791-809

Bronsert P, Werner M. Pathology of Tumor Angiogenesis. In: Marmé D, Hrsg. *Tumor Angiogenesis*. Cham (CH): Springer Nature Switzerland, 2019: 253-274

Cedervall J, Zhang Y, Huang H, Zhang L, Femel J, Dimberg A, Olsson AK. Neutrophil Extracellular Traps Accumulate in Peripheral Blood Vessels and Compromise Organ Function in Tumor-Bearing Animals. *Cancer Res* 2015; 75: 2653-2662

Charlesworth PJS, Harris AL. Hypoxic Regulation of Angiogenesis by HIF-1. In: Figg WD und Folkman J, Hrsg. *Angiogenesis*. New York: Springer, 2008: 169-179

Conroy S, Kruyt FAE, Wagemakers M, Bhat KPL, den Dunnen WFA. IL-8 associates with a pro-angiogenic and mesenchymal subtype in glioblastoma. *Oncotarget* 2018; 9: 15721-15731

Egger EK, Kohls N, Stope MB, Condic M, Keyver-Paik MD, Könsgen D, Hilbert T, Klaschik S, Exner D, Vilz T, Mustea A. Risk Factors for Severe Complications in Ovarian Cancer Surgery. *In Vivo* 2020; 34: 3361-3365

Eichmann A, Bouvrée K, Pardanaud L. Vasculogenesis and Angiogenesis in Development. In: Marmé D und Fusenig N, Hrsg. *Tumor Angiogenesis: Basic Mechanisms and Cancer Therapy*. Berlin – Heidelberg: Springer, 2008: 31-45

Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989; 339: 58–61

Folkman J. History of Angiogenesis. In: Figg WD und Folkman J, Hrsg. *Angiogenesis*. New York: Springer, 2008: 1-14

Ford CE, Werner B, Hacker NF, Warton K. The untapped potential of ascites in ovarian cancer research and treatment. *Br J Cancer* 2020; 123: 9-16

Furukawa S, Soeda S, Kiko Y, Suzuki O, Hashimoto Y, Watanabe T, Nishiyama H, Tasaki K, Hojo H, Abe M, Fujimori K. MCP-1 promotes invasion and adhesion of human ovarian cancer cells. *Anticancer Res* 2013; 33: 4785-4790

Gehlen J, Klaschik S, Neumann C, Keyver-Paik MD, Mustea A, Soehle M, Frede S, Velten M, Hoeft A, Hilbert T. Dynamic changes of angiopoietins and endothelial nitric oxide supply during fluid resuscitation for major gyn-oncological surgery: a prospective observation. *J Transl Med* 2020; 18: 48-58

Guo Q, Yang X, Ma Y, Ma L. Syndecan-1 serves as a marker for the progression of epithelial ovarian carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 2015; 36: 506-513

Hashimoto T, Shibasaki F. Hypoxia-inducible factor as an angiogenic master switch. *Front Pediatr* 2015; 3: 33

Hata K, Nakayama K, Fujiwaki R, Katabuchi H, Okamura H, Miyazaki K. Expression of the angopietin-1, angopietin-2, Tie2, and vascular endothelial growth factor gene in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004; 93: 215-222

Hefler L, Tempfer C, Heinze G, Mayerhofer K, Breitenecker G, Leodolter S, Reinthaller A, Kainz C. Monocyte chemoattractant protein-1 serum levels in ovarian cancer patients. *Br J Cancer* 1999; 81: 855-859

Hilbert T, Dornbusch K, Baumgarten G, Hoeft A, Frede S, Klaschik S. Pulmonary vascular inflammation: effect of TLR signalling on angiopoietin/TIE regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2017; 44: 123-131

Hilbert T, Klaschik S. The angiopoietin/TIE receptor system: focusing its role for ischemia-reperfusion injury. *Cytokine Growth Factor Rev* 2015; 26: 281-291

Hu L, Ferrara N, Jaffe RB. Paracrine VEGF/VE-cadherin action on ovarian cancer permeability. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; 231: 1646-1652

Hunsicker O, Fotopoulou C, Pietzner K, Koch M, Krannich A, Sehouli J, Spies C, Feldheiser A. Hemodynamic Consequences of Malignant Ascites in Epithelial Ovarian Cancer Surgery: A Prospective Substudy of a Randomized Controlled Trial. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94: 2108

Jain RK, Duda DG, Batchelor TT, Sorensen AG, Willett CG. Normalization of Tumor Vasculature and Microenvironment. In: Figg WD und Folkman J, Hrsg. *Angiogenesis*. New York: Springer, 2008: 273-281

Kayakabe K, Kuroiwa T, Sakurai N, Ikeuchi H, Kadiombo AT, Sakairi T, Matsumoto T, Maeshima A, Hiromura K, Nojima Y. Interleukin-6 promotes destabilized angiogenesis by modulating angiopoietin expression in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2012; 51: 1571-1579

Kinnen A, Klaschik S, Neumann C, Egger EK, Mustea A, Soehle M, Frede S, Velten M, Coburn M, Hilbert T. Gene expression in the Angiopoietin/TIE axis is altered in

peripheral tissue of ovarian cancer patients: A prospective observational study. *Life Sci* 2021; 274: 119345

Klaschik S, Gehlen J, Neumann C, Keyver-Paik MD, Soehle M, Frede S, Velten M, Hoeft A, Hilbert T . Network of mediators for vascular inflammation and leakage is dysbalanced during cytoreductive surgery for late- stage ovarian cancer. *Mediat Inflamm* 2019; 2019: 1-9

Kreienberg R, Prömpeler HJ, Rieber-Brambs A, Baumann KH, Wagner U, Lück HJ, Meier W, Gropp M. Diagnostik. In: Kreienberg R, du Bois A, Pfisterer J, Schindelmann S, Schmalfeldt B, Hrsg. *Management des Ovarialkarzinoms*. Heidelberg: Springer, 2009: 71-115

Lasch L. Tuben und Ovarien. In: Lasch L, Fillenberg S, Hrsg. *Basiswissen Gynäkologie und Geburtshilfe*. Berlin: Springer, 2017: 105 – 109

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2020: S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzi-nom/> (Zugriffsdatum: 06.04.2021)

Liu Y und Cao X. Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer Cell* 2016; 30: 668-681

Mofarrahi M, Nouh T, Qureshi S, Guillot L, Mayaki D, Hussain SN. Regulation of angiopoietin expression by bacterial lipopolysaccharide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008; 294: 955-963

Moore K, Colombo N, Scambia G, Kim BG, Oaknin A, Friedlander M, Lisianskaya A, Floquet A, Leary A, Sonke GS, Gourley C, Banerjee S, Oza A, González-Martín A, Aghajanian C, Bradley W, Mathews C, Liu J, Lowe ES, Bloomfield R, DiSilvestro P. Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2018; 379 : 2495-2505

Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis* 2008; 11: 109-119

Norell CH, Butler J, Farrell R, Altman A, Bentley J, Cabasag CJ, Cohen PA, Fegan S, Fung-Kee-Fung M, Gourley C, Hacker NF, Hanna L, Høgdall CK, Kristensen G, Kwon J, McNally O, Nelson G, Nordin A, O'Donnell D, Schnack T, Sykes PH, Zotow E, Harrison S. Exploring international differences in ovarian cancer treatment: a comparison of clinical practice guidelines and patterns of care. *Int J Gynecol Cancer* 2020; 30: 1748-1756

Parikh SM. Dysregulation of the angiotensin-Tie-2 axis in sepsis and ARDS. *Virulence* 2013; 4: 517-524

Petru E, Moinfar F, Winter R, Tamussino K, Sehouli J. Maligne epitheliale Tumoren des Ovars. In: Petru E, Fink D, Köchli OR, Loibl S, Hrsg. *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie*. Berlin: Springer, 2019: 103-126

Ribatti D, Vacca A. Overview of Angiogenesis During Tumor Growth. In: Figg WD und Folkman J, Hrsg. *Angiogenesis*. New York: Springer, 2008: 161-168

Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2019: Krebs in Deutschland für 2015/2016. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf?__blob=publicationFile (Zugriffsdatum: 22.04.2021)

Roux Q und Gavard J. Endothelial Cell-Cell Junctions in Tumor Angiogenesis. In: Marmé D, Hrsg. *Tumor Angiogenesis*. Cham (CH): Springer Nature Switzerland, 2019: 91-119

Siddall E, Khatri M, Radhakrishnan J. Capillary leak syndrome: etiologies, pathophysiology, and management. *Kidney Int* 2017; 92: 37-46

Sopo M, Anttila M, Hämäläinen K, Kivelä A, Ylä-Herttua S, Kosma VM, Keski-Nisula L, Sallinen H. Expression profiles of VEGF-A, VEGF-D and VEGFR1 are higher in distant

metastases than in matched primary high grade epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2019; 19: 584

Stamatovic SM, Keep RF, Mostarica-Stojkovic M, Andjelkovic AV. CCL2 regulates angiogenesis via activation of Ets-1 transcription factor. *J Immunol* 2006; 177: 2651-2661

Standl T, Annecke T, Cascorbi I, Heller AR, Sabashnikov A, Teske W. The nomenclature, definition and distinction of types of shock. *Dtsch Arztebl Int* 2018; 115: 757–768

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA CANCER J CLIN* 2021; 0: 1-41

Szender JB, Emmons T, Belliotti S, Dickson D, Khan A, Morrell K, Khan N, Singel KL, Mayor PC, Moysich KB, Odunsi K, Segal BH, Eng KH. Impact of ascites volume on clinical outcomes in ovarian cancer: A cohort study. *Gynecologic Oncology* 2017; 146: 491-497

Tas F, Karabulut S, Serilmez M, Ciftci R, Duranyildiz D. Clinical significance of serum epithelial cell adhesion molecule (EPCAM) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) levels in patients with epithelial ovarian cancer. *Tumour Biol* 2014 ; 35: 3095-3102

Weber S. *BASICS Gynäkologie und Geburtshilfe*. München: Elsevier 2017: 58 – 61

Whalen MJ, Doughty LA, Carlos TM, Wisniewski SR, Kochanek PM, Carcillo JA. Intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 are increased in the plasma of children with sepsis-induced multiple organ failure. *Crit Care Med* 2000; 28: 2600-2607

Yuan HT, Khankin EV, Karumanchi SA, Parikh SM. Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 2011-2022

Zhang L, Yang N, Park JW, Katsaros D, Fracchioli S, Cao G, O'Brien-Jenkins A, Randall TC, Rubin SC, Coukos G. Tumor-derived vascular endothelial growth factor up-regulates angiopoietin-2 in host endothelium and destabilizes host vasculature, supporting angiogenesis in ovarian cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 3403-3412

Zhang Y, Birru R, Di YP. Analysis of clinical and biological samples using microsphere-based multiplexing Luminex system. *Methods Mol Biol* 2014; 1105: 43-57

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifescie

Gene expression in the Angiopoietin/TIE axis is altered in peripheral tissue of ovarian cancer patients: A prospective observational study

Alexander Kinnen^a, Sven Klaschik^a, Claudia Neumann^a, Eva-Katharina Egger^b, Alexander Mustea^b, Martin Soehle^a, Stilla Frede^a, Markus Velten^a, Mark Coburn^a, Tobias Hilbert^{a,*}

^a Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, University Hospital Bonn, Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn, Germany

^b Department of Gynecology and Obstetrics, University Hospital Bonn, Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Ovarian cancer
Angiopoietins
Vascular leakage
Angiogenesis
Carcinogenesis

ABSTRACT

Aims: Clinical studies suggest altered systemic vascular biology in cancer patients. We assessed expression patterns of endothelial activation- and vascular leakage-related genes in tumor as well as in tumor-free peripheral tissues from patients with and without ovarian cancer (OC).

Main methods: Patients being scheduled for laparotomy for either gynecologic benign diagnosis ($n = 10$) or for advanced-stage OC ($n = 22$) were prospectively recruited to this observational study. Serum samples were taken preoperatively, and tissue samples were taken from peripheral abdominal wall musculature, tumor-free peritoneum and the tumor itself.

Key findings: Patients in OC group received significantly more fluid per time intraoperatively ($p = 0.01$). IL-8 and MCP-1/CCL2, VCAM-1 (CD 106) and ICAM-1 (CD 54) as well as Thrombomodulin were significantly increased in cancer patients' serum at baseline ($p = 0.03$). Expression of distinct vascular leakage-related genes (Angiopoietin-1 (ANG-1), ANG-2, TIE2, VEGFR1, VEGFR2) was significantly altered in tumor tissue of OC patients ($p = 0.003$), while in tumor-free peritoneal tissue, ANG-2/1 expression ratio was more than doubled in OC group ($p = 0.03$). In peripheral musculature, particularly genes from the ANG/TIE axis were significantly changed in OC patients ($p = 0.005$), suggesting a distinct vascular leakage-related genotype. Gene expression changes in OC patients were significantly associated with the postoperative fluid balance ($p = 0.03$).

Significance: Altered expression of barrier dysfunction- and angiogenesis-associated genes from the ANG/TIE axis was detected not only in tumor but also in peripheral tissues of cancer patients. This may contribute to a systemic vascular leakage-related genotype.

1. Introduction

Ovarian cancer (OC) ranks fifth in cancer deaths among women and therefore accounts for most deaths among all cancer entities of the female reproductive system [1]. Despite curative therapeutic options become limited with progressive disease, standard treatment includes upfront cytoreduction (debulking surgery) followed by adjuvant chemotherapy and, dependent on stage and mutational status, followed by Bevacizumab and PARP (poly ADP ribose polymerase) inhibitors [2]. Due to marked invasiveness and hemodynamic alterations, debulking surgery is a high-risk procedure and challenging for surgeons and anesthesiologists as well [3].

Increasing size of the tumor requires local alterations in vascular

biology. This process, also referred to as 'angiogenic switch', is a hallmark of persistent tumor growth and is initiated by progressive hypoxia in its central region. Changes in the expression patterns of HIF (hypoxia-inducible factor)-related genes such as Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) or those from the Angiopoietin/TIE axis induce sprouting of blood vessels newly formed from endothelial cells of preexisting vessels inside the neoplastic tissue (angiogenesis), thereby providing supply for further growth, tumor maintenance, and metastasis [4–9]. Blood vessels formed this way are characterized by distinct leakiness, which contributes to the intrusion of tumor cells into the systemic vasculature and to perilesional edemas [10]. In advanced-stage OC with peritoneal carcinomatosis, abnormally increased permeability of tumor blood vessels results in leakage of large amounts of protein-rich fluid

* Corresponding author.

E-mail address: thilbert@uni-bonn.de (T. Hilbert).

into the abdominal cavity. Increased ascites volume has been shown to correlate with overall tumor extent, thereby being indicative of worsened clinical outcomes in terms of progression-free and overall survival [11].

Apart from tumor growth, increased systemic vascular leakage is pathognomonic for inflammation and is supposed to contribute to hemodynamic destabilization in septic shock [12]. This illustrates similarities between carcinogenesis and inflammation in general, as both highly involve distinct changes in the expression patterns of angiogenesis-related genes [13]. Interestingly, besides its impact on long-term outcome, volume of ascites in advanced-stage OC also directly correlates with the extent of hemodynamic deterioration during debulking surgery for cytoreduction [14]. A systemic change in vascular biology also in peripheral tissues (in addition to the local tumor microenvironment) therefore stands to reason. However, this has not been investigated so far.

We hypothesized that expression patterns of vascular and endothelium-related genes are altered in advanced-stage OC patients not only in the tumor itself or in tumor-associated tissues but also in healthy tissues of peripheral localization. To test this, gene expression was investigated in samples from advanced-stage OC patients as well as from a healthy control cohort.

2. Materials and methods

2.1. Study design and patient information

This observational study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and after approval by the institutional review board (IRB) of the University of Bonn (protocol number 360/16, date of approval March 12, 2019). Patients who were scheduled for laparotomy either because of a benign gynecologic diagnosis (myomectomy, hysterectomy; referred to as the control group) or because of advanced-stage ovarian cancer (OC group) were prospectively screened to participate in the study. Exclusion criteria were as follows: inability or refusal to provide written informed consent, patient age <18 years, and pregnancy. Prior to anesthesia induction, in OC patients, a thoracic epidural catheter was usually placed for postoperative analgesia. All patients received anesthesia induction according to standard procedures including endotracheal intubation. A femoral arterial and central venous catheterization was performed in OC patients. Anesthesia was induced with sufentanil, propofol, and rocuronium and was maintained with either isoflurane or sevoflurane and by continuous infusion of remifentanyl. A urinary catheter was placed as well as a feeding tube. For intraoperative hemodynamic stabilization, crystalloid and colloid fluids were administered to keep discontinuously assessed pulse pressure variation below 15%. Norepinephrine was administered in case of a mean arterial pressure (MAP) still below 65 mmHg despite prior fluid optimization. Red blood cell and platelet concentrates and Fresh Frozen Plasma were substituted according to recent transfusion guidelines. After completion of surgical procedures, anesthesia was terminated and patients were extubated if a stable respiratory situation was present. Patients were then transferred to the peripheral ward or intensive care unit for further postoperative care.

2.2. Assessment of soluble circulating biomarkers

Ten mL of blood was drawn before the beginning of surgery. Coagulated samples were centrifuged (3.000 rpm, 4 °C, 10 min), and serum aliquots were stored at -80 °C for subsequent analysis. In serum samples, the following proteins were assessed using custom-made Luminex™ multiplex arrays (RnD Systems, Minneapolis, MN, USA):

IL-8, Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1/CCL2), soluble Receptor for Advanced Glycation Endproducts (sRAGE), Resistin, Angiopoietin-2 (ANG-2), soluble Tyrosine Kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains 2 (STIE2), Thrombomodulin, Syndecan-1, E-

Selectin, soluble Vascular Cell Adhesion Protein 1 (sVCAM-1), soluble Intercellular Adhesion Molecule 1 (sICAM-1).

VEGF was measured using commercially available ELISA kits (RnD Systems). All analyses were performed according to the manufacturer's protocol.

Bead-based multiplex arrays such as the Luminex™ system are described in detail in the work from Zhang et al. (2014) [15]. In brief, these are immunoassays allowing to measure multiple analytes in one serum sample. Color-coded superparamagnetic microspheres (beads) are dyed with red and infrared fluorophores that correspond to a distinct spectral signature (or bead region). Unique bead regions are coated with custom-made mixtures of analyte-specific antibodies and bind biomarkers from the serum sample upon incubation. After washing, samples are subsequently incubated with a specific mixture of biotinylated detection antibodies and a streptavidin-phycoerythrin (PE) conjugate reporter. With the Luminex™ reader, beads are excited by one laser determining the bead region and the corresponding assigned analyte. Another laser then assesses the magnitude of the PE-derived signal, which is proportional to the amount of analyte bound. For this study, arrays were analyzed using a MAGPIX™ reader (Luminex Corp., Austin, TX, USA). Results are given in pg/mL serum. Values below the assay's detection limit were set to zero. All experimental tests were performed in duplicates. The mean value was calculated from these results and used for further statistical analysis. All personnel performing the serum analyses were blinded for intra- and postoperative patient data.

2.3. Collection of tissue samples and assessment of gene expression

Surgery was performed as median laparotomy. Tissue samples were collected from two (control group) or three (OC group) different localizations in every patient. Collection sites in OC patients were the abdominal wall muscle (*M. rectus abdominis*), tumor-free peritoneum and the tumor itself. Collection sites in the control group were identical except no tumor tissue was collected. Immediately after tissues have been collected, samples were placed into a cryo-tube and were snap-frozen in liquid nitrogen. Subsequently, samples were stored at -80 °C until further processing.

Frozen tissue samples were homogenized in 4 M guanidine thiocyanate (Roth, Karlsruhe, Germany) using a stand dispersion unit (Polytron-Kinematica, Lucerne, Switzerland). Tissue debris was removed by centrifugation, and total RNA was isolated with TRIzol™ reagent (Fisher Scientific, Schwerte, Germany) according to the manufacturer's instructions. TRIzol™ uses the guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method. In brief, guanidinium thiocyanate denatures proteins including RNases, which are dissolved in phenol, while nucleic acids are dissolved in water. In the presence of chloroform, these solvents separate into two phases: an upper aqueous phase containing the nucleic acids and a lower phase containing the proteins dissolved in phenol. Subsequently, the nucleic acids are recovered from the aqueous phase by precipitation with 2-propanol. The latter was washed away with ethanol, and the resulting pellet was air-dried and resuspended in RNase-free water. RNA concentration was determined spectrophotometrically (NanoDrop, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). 2 µg of total RNA were reverse transcribed into cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany). Following synthesis, cDNA was diluted in RNase-free water (1:5) and stored at +4 °C for no longer than 1–2 days until further use to avoid repeated freeze-thaw cycles. Gene expression analysis of the following genes was performed by quantitative RT-PCR with Taqman™ Expression Assays and Taqman™ Gene Expression Master Mix on a ViiA7 device (all Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany):

ANG-1, ANG-2, TIE2, VEGF, VEGF Receptor 1 (VEGFR1), VEGFR2, Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS), Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS), Occludin, Claudin 1, Claudin 5, Vascular Endothelial Cadherin (VE-Cadherin).

Expression of the respective gene of interest was normalized to the house-keeping gene 18S ribosomal RNA (relative quantification (RQ)); for the use of 18 s rRNA as house-keeping gene, please refer to the work from Aerts et al. [16]) and calculated as fold change expression of the respective control (delta-delta CT method). All these processes were performed by personnel blinded for intra- and postoperative patient data.

2.4. Statistical and bioinformatical analysis

Data were transferred into MS Excel (Microsoft Corp., Redmond, CA, USA). Statistical analysis and visualization were performed using GraphPad PRISM 8 (La Jolla, CA, USA). All data are presented as percentage values or as median values with 25th and 75th percentile, respectively. Significance of differences between samples from control and from OC group was tested using the Mann-Whitney *U* test. Dichotomous parameters were compared using Fisher's exact test. Associations between results from gene expression analysis and clinical parameters were assessed using the Spearman rank correlation coefficient. *P* values <0.05 were considered statistically significant.

The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

3. Results

Thirty-two consecutive patients were prospectively recruited to participate in the study. Ten otherwise healthy patients scheduled for surgery for benign gynecologic disease were recruited to the control cohort. Twenty-two patients scheduled for cytoreductive surgery for advanced-stage OC were recruited to the respective case cohort. Overall median patient age was 59 years (45–66), while patients in the OC group were significantly older than those in the control group (63 (58–67) vs. 38 years (33–51) ($p < 0.001$)). Duration of anesthesia as well as of surgery was significantly increased in OC group (370 (328–508) vs. 171 min (144–217) and 242 (130–354) vs. 98 min (87–136), respectively ($p < 0.001$)), and in that group, there were significantly more patients transferred to the ICU following surgery than in control patients ($p = 0.03$). Normalized to duration of procedure, patients in OC group received significantly more fluid intraoperatively (783 (539–893) vs. 491 mL/h (382–674) ($p = 0.01$)), resulting in a significantly increased normalized postoperative fluid balance (644 (493–792) vs. 403 mL/h (335–619) ($p = 0.02$)). Moreover, dosage of norepinephrine administered for hemodynamic stabilization was significantly increased in OC patients ($p < 0.001$). Table 1 gives an overview of the basic patients' characteristics and the procedural details.

Circulating biomarkers for vascular and endothelial activation were assessed in preoperative serum samples from both groups. As shown in Table 2, pro-inflammatory mediators IL-8 and MCP-1/CCL2, the soluble forms of the endothelial surface adhesion molecules VCAM-1 (CD 106) and ICAM-1 (CD 54) as well as Thrombomodulin were significantly increased in cancer patients at baseline compared to control patients ($p < 0.03$).

In control patients, tissue samples were collected from peritoneum as well as from the peripheral muscle of the abdominal wall (*M. rectus abdominis*). The results of the gene expression analysis are shown in Tables 3 and 4. There were no significant differences in gene expression patterns between peritoneum and peripheral muscle in control patients ($p > 0.05$). As shown in Table 3, expression of distinct vascular leakage-related genes was significantly altered in tumor tissue samples from OC patients, compared to peritoneum samples from the control group. These involved genes from both the ANG/TIE axis as well as from the VEGF/VEGFR system. In tumor tissue, the ANG-2/1 ratio tended to be increased, but this was not statistically significant. When gene expression patterns in tumor-free peritoneal tissue were compared between the two cohorts, only expression of ANG-1 was significantly decreased in OC group, while other genes were not significantly affected (Table 3). This

Table 1
Patient and procedural details.

Parameter	Control	Ovarian cancer	p value
Patient details:			
n	10	22	
Age (years)	38 (33–51)	63 (58–67)	<0.001
Height (cm)	168 (164–172)	165 (159–169)	0.17
Weight (kg)	71 (64–78)	68 (53–84)	0.44
Body mass index (kg/m ²)	24 (22.7–28.4)	24.3 (18.9–29.7)	0.61
Diagnosed with:			
Uterine myoma (n [%])	8 (80)	–	
Ovarian cysts (n [%])	1 (10)	–	
Ovarian fibroma (n [%])	1 (10)	–	
Procedural details:			
Duration of surgery (min)	98 (87–136)	242 (130–354)	<0.001
Duration of anesthesia (min)	171 (144–217)	370 (328–508)	<0.001
Postoperative ICU therapy (n [%])	0 (0)	9 (41)	0.03
Intraop. fluid intake (mL/h)	491 (382–674)	783 (539–893)	0.01
Postop. fluid balance (mL/h)	403 (335–619)	644 (493–792)	0.02
Intraop. urine output (mL/h)	58 (11–65)	72 (26–127)	>0.99
Numbers of crystalloid infusion solution à 500 mL	2.5 (2–4.25)	7.5 (6–11.25)	<0.001
Numbers of colloid infusion solution à 500 mL	0 (0–0)	0 (0–0.25)	0.17
Estimated intraop. blood loss (mL/h)	127 (44–182)	81 (55–109)	0.37
Patients with PRBC transfusion (n [%])	0 (0)	5 (23)	0.16
Of those: numbers of PRBC units transfused	–	2 (1–2.5)	
Numbers of Fresh Frozen Plasma units transfused	0 (0–0)	0 (0–2)	0.14
Numbers of platelet concentrate units transfused	0 (0–0)	0 (0–0)	>0.99
Max. norepinephrine dosage (µg/kg*min)	0 (0–0)	0.06 (0.04–0.14)	<0.001
Max. dobutamine dosage (µg/kg*min)	0 (0–0)	0 (0–0)	0.53

Data are given as percentage values or as median values with 25th and 75th percentile, respectively. Mann-Whitney *U* test for continuous data or Fisher's exact test for dichotomous parameters were used. ICU = Intensive Care Unit, PRBS = Packed red blood cells.

resulted in an ANG-2/1 expression ratio being more than doubled in OC group compared to the controls ($p = 0.03$).

The analysis of the expression patterns from samples from the peripheral muscle revealed that particularly genes from the ANG/TIE axis were significantly altered in OC patients (Table 4). This seemed to induce a distinct vascular leakage-related genotype, since TIE2 expression was reduced while the ANG-2/1 ratio was significantly increased compared to the control cohort. Fig. 1 shows all genes whose expression was significantly altered in OC patients compared to controls from all three tissue sampling sites.

According to Spearman correlation analysis, gene expression for ANG-1, ANG-2/1 ratio as well as for VE-Cadherin in tumor tissue from OC patients was significantly associated with the postoperative fluid balance in this cohort ($r = -0.53$ ($p = 0.03$), $r = 0.53$ ($p = 0.03$), $r = -0.55$ ($p = 0.02$), respectively; Table S1).

4. Discussion

Results from clinical studies suggest an impact of advanced-stage cancer disease on systemic vascular biology. Our herein presented analyses reveal that the expression of genes from the ANG/TIE axis in OC patients differs significantly from that in healthy non-cancer controls.

Table 2
Circulating biomarkers in serum samples (preoperative).

	Control (pg/mL)	Ovarian cancer (pg/mL)	p value
Pro-inflammatory markers:			
IL-8	0.42 (0–2.28)	5.88 (0–13.41)	0.03
MCP-1/CCL2	123.2 (99.4–174.7)	171.7 (139.5–238.2)	0.02
sRAGE	340.9 (151.2–634.5)	516.3 (328.4–758.5)	0.25
Resistin	6119 (3172–9559)	6512 (4326–10,038)	0.59
Vascular leakage-related markers:			
ANG-2	721.4 (396.0–1034)	985.9 (656.9–1360)	0.29
sTIE2	4432 (3068–5338)	6438 (3740–8042)	0.09
VEGF	163.3 (0–410.9)	499.6 (62.73–821.6)	0.07
Adhesion molecules:			
E-selectin	6662 (4513–11,540)	9630 (6739–11,684)	0.15
sVCAM-1	275,924 (238808–332,216)	395,023 (289266–554,476)	0.01
sICAM-1	119,735 (76702–141,354)	153,568 (128516–216,570)	0.02
Others:			
Syndecan-1	170.4 (0–413)	362.4 (0–916.4)	0.27
Thrombomodulin	1445 (1383–1745)	2041 (1472–2576)	0.03

Data are given as median values with 25th and 75th percentile and were compared using Mann-Whitney *U* test. MCP-1/CCL2 = Monocyte Chemoattractant Protein-1, sRAGE = soluble Receptor for Advanced Glycation End-products, ANG-1 = Angiopoietin-1, ANG-2 = Angiopoietin-2, sTIE2 = soluble Tyrosine Kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains 2, VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor, sVCAM-1 = soluble Vascular Cell Adhesion Protein 1, sICAM-1 = soluble Intercellular Adhesion Molecule 1.

These changes in expression patterns serve to induce a pro-angiogenic and vascular leakage-related genotype. They could be detected not only in the tumor itself and in tumor-associated peritoneal tissues, but also in samples from peripheral tissue not directly affected by tumor growth and not representing potential sites for metastasis. Compared to control patients, intraoperative hemodynamic deterioration was more pronounced in OC patients, and amounts of administered crystalloid infusion solution was related to the extent of altered gene expression. As far as we know, these relationships have not been described so far. Our results provide further insights into changes arising during the progression of advanced-stage cancer disease and into the pathogenesis of complications associated with the surgical management.

In the advent of a growing tumor, its cells are initially provided with oxygen only via diffusion from the existing vasculature. Due to its uncontrolled growth, however, it rapidly achieves dimensions that demand establishing a newly formed blood vessel architecture to allow for further expansion. Since spontaneously arising tumor cells are usually not angiogenic at first, this requires a fundamental change in the biology of the tumor microenvironment [5]. Progressive hypoxia in the center of the tumor leads to massive induction of genes under the control of HIF, thereby switching from a resting (or *quiescent*) state to an angiogenic phenotype [17]. In contrast to embryogenic vasculogenesis, which is the growth of blood vessels from mesodermal-derived stem cells (hemangioblasts), angiogenesis refers to the process of endothelial sprouting based on migration, proliferation, and tube formation of cells of pre-existing blood vessels [5]. The resulting vascular plexus ensures that, also in extensive tumor growth, all cells are located within a distance of 100 to 200 μ m from blood supply. Those vessels are considered immature, as they lack the organization and hierarchy of normal (or mature) vascular structures. Due to impaired intercellular contacts and defective basement membranes, they are furthermore highly leaky [18]. Vessel instability and increased permeability facilitate invasive cancer growth and intrusion of tumor cells into the systemic vasculature, thereby allowing for blood-borne metastasis.

A number of genes, most of which are HIF targets, are involved in the progression of a pro-angiogenic phenotype. Besides VEGF, which first has been described by the pioneer of the idea of the angiogenic switch,

Table 3
Gene expression analysis in peritoneum and tumor tissue.

	Control	Ovarian cancer		Tumor tissue	p value
	Peritoneum	Peritoneum	p value		
Nitric oxide synthases:					
eNOS	0.94 (0.31–2.57)	1.78 (0.93–2.50)	0.40	0.28 (0.18–1.23)	0.14
iNOS	0.75 (0.48–2.63)	1.00 (0.65–2.20)	0.61	0.34 (0.20–0.95)	0.053
Vascular leakage-related genes:					
ANG-1	0.99 (0.68–2.04)	0.19 (0.11–0.64)	0.008	0.13 (0.04–0.46)	0.003
ANG-2	1.31 (0.42–2.07)	0.55 (0.24–1.94)	0.34	0.28 (0.09–0.60)	0.005
TIE2	1.50 (0.55–2.11)	0.66 (0.37–1.29)	0.13	0.13 (0.05–0.33)	<0.001
VEGF	1.16 (0.44–1.64)	0.72 (0.55–1.20)	0.71	0.12 (0.50–2.76)	0.93
VEGFR1	1.19 (0.50–2.30)	1.08 (0.69–1.35)	0.68	0.20 (0.12–0.51)	0.001
VEGFR2	1.02 (0.68–1.51)	0.82 (0.45–1.97)	0.64	0.12 (0.07–0.30)	<0.001
ANG-2/1	1.03 (0.55–1.78)	2.53 (1.32–4.13)	0.03	2.36 (0.86–3.33)	0.06
Adhesion molecules:					
Occludin	0.77 (0.28–6.62)	6.29 (0.10–21.8)	0.46	0.19 (0.08–12.07)	0.44
Claudin 1	1.18 (0.30–3.88)	0.71 (0.16–1.98)	0.43	0.90 (0.08–3.26)	0.63
Claudin 5	0.65 (0.25–5.93)	1.42 (0.59–5.69)	0.40	0.31 (0.03–6.37)	0.29
VE-Cadherin	2.01 (0.32–5.39)	1.16 (0.32–2.80)	0.50	0.64 (0.21–4.83)	0.58

Data are given in RQ (Gene of Interest/18S-RNA) as median values with 25th and 75th percentile and were compared to expression of respective genes in control group using Mann-Whitney *U* test. eNOS = Endothelial Nitric Oxide Synthase, iNOS = Inducible Nitric Oxide Synthase, ANG-1 = Angiopoietin-1, ANG-2 = Angiopoietin-2, TIE2 = Tyrosine Kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains 2, VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor, VEGFR1 = VEGF receptor 1, VEGFR2 = VEGF receptor 2, ANG-2/1 = ratio between ANG-2 and -1 expression, VE-Cadherin = Vascular Endothelial Cadherin.

Judah Folkman, the angiopoietins together with their specific TIE receptors form the second most significant vascular-specific tyrosine kinase (TK) signaling system. ANG-1 and -2 are vascular growth factors with particular importance for the balance between endothelial quiescence and activation. They both are competitive (ant)agonists at the same endothelial TK receptor, TIE2. In a physiological state, continuously secreted ANG-1 mediates vascular quiescence and stabilization through permanent TIE2 phosphorylation and subsequent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein kinase B (AKT) pathway [19]. In contrast, ANG-2, which is released upon specific trigger signals, blocks ANG-1 binding to TIE2, thereby inhibiting AKT signaling. The results are endothelial migration, inflammation, and permeability, all of which are strong attributes of a pro-angiogenic phenotype [20,21]. Hence, this phenotype is characterized by a reversal of the physiological balance between ANG-1 and -2 towards the latter one (Fig. 2) [6]. Expression of ANG-1 was greatly reduced in tumor tissues in our study, being indicative of a distinct pro-angiogenic cancer microenvironment. Such expression pattern has been previously described in ovarian cancer and is associated with increased tumor vascularization and reduced prognosis [7–9]. This also applies to downregulation of the quiescence-mediating specific angiopoietin receptor TIE2, which was likewise evident for tumor tissue samples in our study. Furthermore, gene expression of VEGFR1 and -2 was

Table 4
Gene expression analysis in abdominal wall muscle tissue.

	Control	Ovarian cancer	p value
	Peripheral muscle	Peripheral muscle	
Nitric oxide synthases:			
eNOS	0.84 (0.67–1.58)	0.94 (0.64–1.78)	0.65
iNOS	1.13 (0.74–1.38)	0.58 (0.36–1.38)	0.13
Vascular leakage-related genes:			
ANG-1	1.38 (0.47–2.21)	0.17 (0.09–0.45)	0.003
ANG-2	1.11 (0.66–2.02)	1.06 (0.40–3.52)	0.76
TIE2	0.97 (0.77–1.47)	0.56 (0.37–0.71)	0.005
VEGF	1.55 (0.44–2.18)	0.57 (0.37–1.16)	0.1
VEGFR1	1.79 (0.27–2.12)	0.42 (0.25–1.08)	0.1
VEGFR2	1.17 (0.82–1.37)	0.53 (0.30–1.68)	0.31
ANG-2/1	0.99 (0.61–1.58)	4.42 (3.24–12.3)	<0.001
Adhesion molecules:			
Occludin	0.87 (0.52–6.71)	1.10 (0.36–14.2)	0.7
Claudin 1	0.99 (0.62–1.90)	1.13 (0.47–2.46)	0.86
Claudin 5	0.62 (0.56–2.49)	1.29 (0.40–12.7)	0.53
VE-Cadherin	0.96 (0.79–1.16)	0.74 (0.41–1.00)	0.09

Data are given in RQ (Gene of Interest/18S-RNA) as median values with 25th and 75th percentile and were compared to expression of respective genes in control group using Mann-Whitney U test. eNOS = Endothelial Nitric Oxide Synthase, iNOS = Inducible Nitric Oxide Synthase, ANG-1 = Angiotensin-1, ANG-2 = Angiotensin-2, TIE2 = Tyrosine Kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains 2, VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor, VEGFR1 = VEGF receptor 1, VEGFR2 = VEGF receptor 2, ANG-2/1 = ratio between ANG-2 and -1 expression, VE-Cadherin = Vascular Endothelial Cadherin.

significantly altered in tumor tissues in our study, which has likewise been demonstrated for primary OC and has been shown to be associated with a reduced prognosis [22]. Expression of nitric oxide synthases and of intercellular adhesion molecules tended to be decreased in tissue samples from OC patients in our study, but this was not statistically significant. We previously demonstrated altered nitric oxide bioavailability in OC patients, but this rather seems to depend on the functional NOS phosphorylation status than on changes in its expression pattern [23].

When we analyzed ANG-1 and TIE2 expression in tumor-free peritoneal tissue or in samples from a more peripheral localization such as the abdominal wall musculature, this likewise revealed an expression pattern altered in a similar way, with a significant increase in ANG-2/1 ratio and a downregulation of TIE2 in OC patients compared to healthy controls. Remote effects on peripheral vasculature and organs in individuals with cancer have already been described. For example, a recently published work demonstrated distant blood vessel occlusion by cancer-induced Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and subsequent remote heart and kidney dysfunction in breast cancer [24]. However, in contrast to this rather physical vascular complication (thrombosis), to our knowledge, a generally altered gene expression with distinct significance for vascular integrity in peripheral tissues not associated with metastasis has not been described before.

It is not clear what mediates the observed changes in ANG-1 and TIE2 expression in peripheral tissue of OC patients. However, pro-inflammatory signaling that modulates expression of angiogenesis-related genes in various cell types may be one possible explanation [25]. IL-6 downregulates ANG-1 expression while upregulating that of

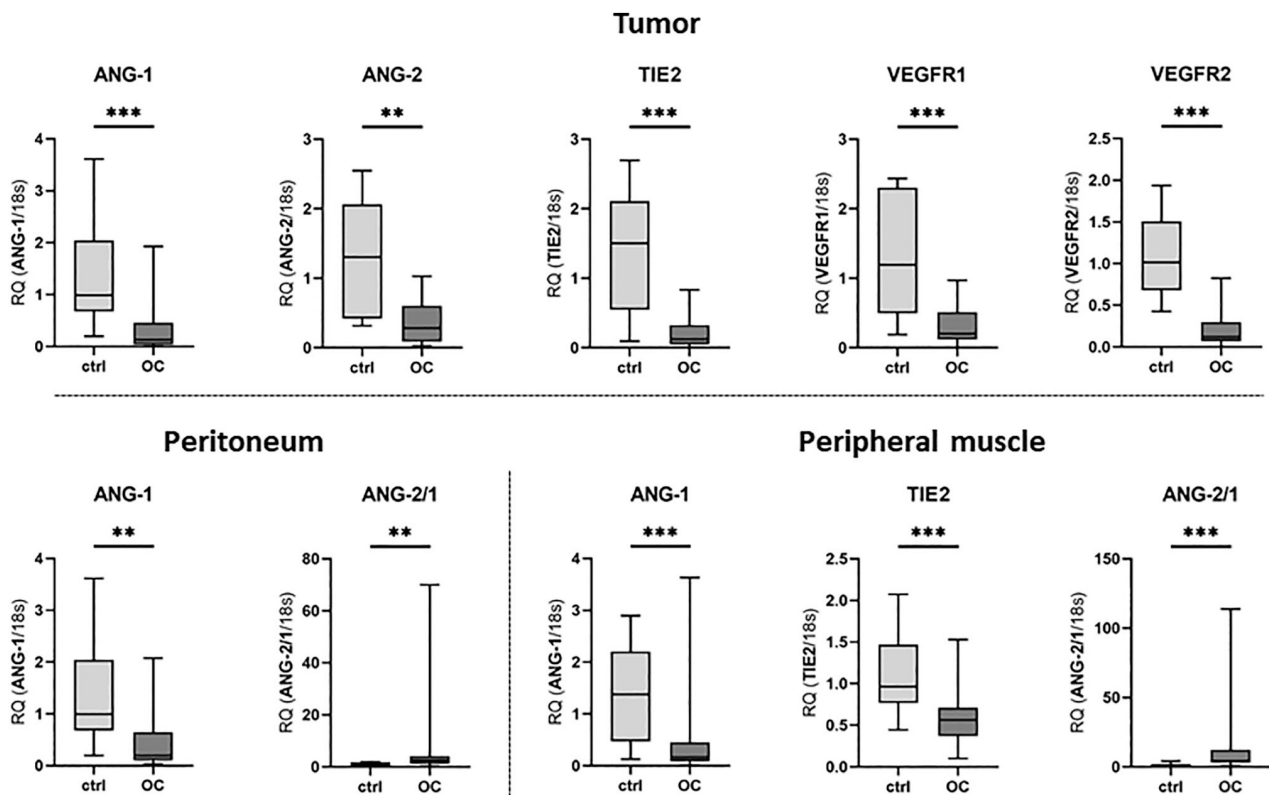


Fig. 1. Significantly altered gene expression in ovarian cancer patients.

Figure shows gene expression in tumor tissue, tumor-free peritoneum, and peripheral abdominal wall muscle of ovarian cancer (OC) patients compared to healthy control patients. Expression of the respective gene of interest is calculated as fold change expression of the respective control (peritoneum or peripheral muscle). Data are given as median values with 25th and 75th percentile and range and were compared using Mann-Whitney U test. $n = 10$ for control group, $n = 22$ for OC group. ANG-1 = Angiotensin-1, ANG-2 = Angiotensin-2, TIE2 = Tyrosine Kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains 2, VEGFR1 = Vascular Endothelial Growth Factor receptor 1, VEGFR2 = Vascular Endothelial Growth Factor receptor 2, ANG-2/1 = ratio between ANG-2 and -1 expression.

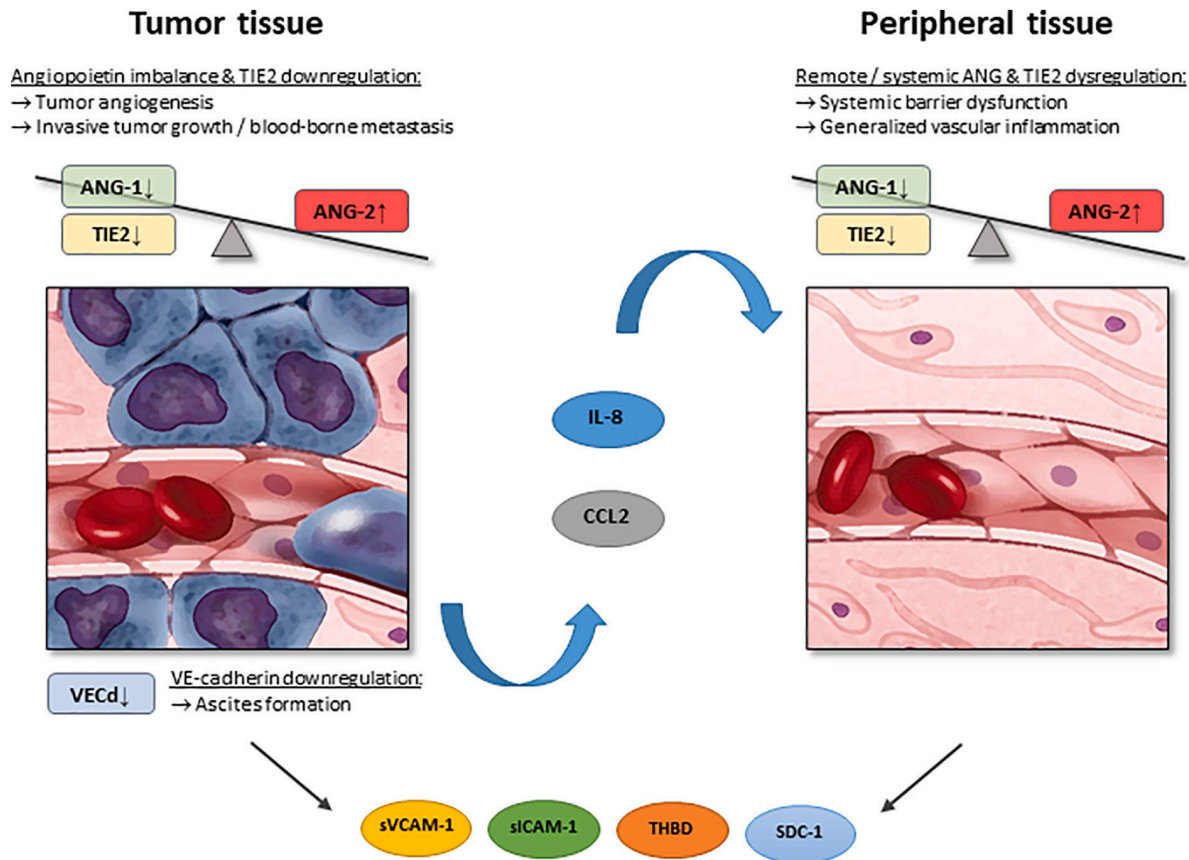


Fig. 2. Localized and generalized changes in gene expression patterns in advanced-stage OC.

Progressive tumor growth and hypoxia induce localized changes in expression patterns of angiogenesis-related genes, thereby inducing cancer angiogenesis and facilitating invasive tumor growth and blood-borne metastasis (left panel). Impaired expression of VE-cadherin (VECd) contributes to ascites formation. Circulating mediators CCL2 and IL-8 may induce systemic changes in gene expression patterns in remote and peripheral tissues, contributing to a phenotype of generalized vascular activation and inflammation (right panel). Biomarkers (sVCAM-1, sICAM-1, Thrombomodulin (THBD), and Syndecan-1 (SDC-1)) are indicative of that state of vascular dysfunction.

ANG-2, thereby shifting the ANG-2/1 ratio towards an activated phenotype [26]. Similarly, Stamatovic et al. demonstrated that pro-inflammatory MCP-1/CCL2 downregulates ANG-1 expression in endothelial cells [27]. MCP-1/CCL2 serum levels have been shown to be greatly increased in OC patients compared to benign cysts and healthy controls and to promote invasion and adhesion of ovarian cancer cells [28,29]. In line with that, in our cohort, circulating MCP-1/CCL2 was significantly increased in serum of OC patients compared to control serum, which may contribute to altered expression of the ANG/TIE axis in peripheral vascular beds in form of a humoral mediator. The same applies to circulating IL-8, likewise significantly increased in serum samples from OC patients in our study. As demonstrated by Conroy et al., IL-8 secreted by mesenchymal stem cells contributes to the induction of a pro-angiogenic phenotype in cancer patients and is associated with a poor overall survival, underlining the significance of our results [30].

The increase of circulating soluble endothelial adhesion molecules (sVCAM-1, sICAM-1) in our OC cohort compared to the controls provides another strong evidence for systemic vascular activation in tumor patients. This is in line with results from others, and the use of circulating endothelial adhesion molecules as diagnostic biomarkers for ovarian cancer has been proposed [31]. Similar to the observed changes in gene expression patterns in tissues from the abdominal wall musculature in our patients, upregulation and shedding of adhesion molecules in peripheral vascular beds may likewise be triggered by tumor-derived

pro-inflammatory humoral mediators [32]. Syndecan-1 has been shown to be associated with the progression of OC [33]. In serum samples from cancer patients in our study, Syndecan-1 tended to be increased compared to controls. Last, the detection of a significantly increased serum activity of Thrombomodulin in OC patients in our study is another strong indicator of altered vascular function and has also been demonstrated previously by other authors, together with an association to the clinical stage of cancer [34].

Decreased expression of ANG-1 and TIE2 in intraabdominal tumor and peritoneal tissue with subsequent leakage for fluids and proteins may contribute to the development of malignant ascites to a great extent [14]. In addition to cancer angiogenesis, a disturbed ANG/TIE axis was demonstrated to also be significant for other pathologies, particularly those related to local or systemic inflammation and increased endothelial permeability. In endotoxic shock, ANG-1 as well as TIE2 expression both have been shown to be greatly reduced [35]. The same applies to other leakage-associated infections, including anthrax, influenza, or malaria [36]. Meanwhile, a wide range of studies have provided evidence for a suppression of ANG-1 and TIE2 together with ANG-2 overexpression in human sepsis, the prototype of systemic vascular leakage-associated infections [37]. In contrast, overexpression of ANG-1 may potentially protect the vasculature against induced hyperpermeability by maintaining the endothelial integrity through stabilization of the intercellular adhesion molecule VE-cadherin [20,38]. Apart from septic diseases, impaired ANG/TIE2 signaling is also

involved in perioperative vascular barrier dysfunction in surgery patients [25,39].

Compared to surgery for benign disease or even other abdominal tumor entities such as gastric or colorectal cancer, interventions for cytoreduction in OC are often associated with extensive volume shifts. Loss of intravascular fluids to the extravascular space may require aggressive fluid resuscitation and vasopressor use, not unlike in septic shock [3,23]. This also corresponds to our own clinical impression, and based on our previous works, endothelial and vascular signaling altered during surgery seems to significantly contribute to perioperative hemodynamic deterioration [23,25]. However, preoperative extent of malignant ascites correlates with severity of intraoperative destabilization, suggesting a crucial role of cancer-related vascular dysfunction already present prior to surgery [14]. Therefore, we performed our analyses in order to test the hypothesis that expression patterns of vascular and endothelium-related genes are altered in advanced-stage OC patients per se, emphasizing the systemic nature of an advanced solid tumor disease. Our results support this hypothesis, since postoperative fluid balance in OC patients was significantly associated with the extent of gene expression changes of angiopoietins as well as downregulation of VE-cadherin in tumor tissue, suggesting, on one hand, a link between imbalanced angiopoietin signaling and vascular permeability. On the other hand, VE-cadherin has been shown to be quantitatively associated with increased endothelial permeability in experimental OC models, which may explain ascites formation as well as increased fluid extravasation during surgery for tumor debulking [40,41]. Gene expression of other intercellular adhesion molecules such as Occludin and Claudin 1 and 5 tended to be decreased in tumor tissue samples in our study, which has likewise been demonstrated by others, resulting in increased vascular permeability [41]. Overall, time-related intraoperative fluid intake as well as postoperative fluid balance were significantly increased in cancer patients compared to controls. Although we were not able to demonstrate a specific association of fluid administration with altered gene expression patterns also in tumor-free peritoneal or peripheral vasculature, it does not seem unlikely that these also contribute to intraoperative hemodynamic deterioration, given their effects described in sepsis and other vascular leakage-related systemic pathologies.

Our results are, at first, intended to reveal systemic changes arising during the progress of an advanced tumor disease and to provide an explanation for complications associated with its surgical therapy. However, to give a thought-provoking impulse, they may also emphasize the importance of genome-based risk stratification in cancer, an approach of which the clinical implementation is increasingly discussed at present [42]. This may help improving management and outcomes of OC patients in the future.

5. Conclusions

Altered expression of barrier dysfunction- and angiogenesis-associated genes from the ANG/TIE axis could be detected not only in tumor but also in peripheral tissues of OC patients that do not represent potential sites for metastasis. This may contribute to a systemic vascular leakage-related genotype not unlike sepsis and to hemodynamic deterioration during tumor debulking surgery. Further research is needed to understand the impact of cancer on systemic vasculature and its clinical implications.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119345>.

Funding

The authors declare that they received no funding from any external organization for the submitted work.

CRedit authorship contribution statement

Alexander Kinnen: Data curation, Investigation, Writing – original draft. **Sven Klaschik:** Investigation, Methodology, Writing – review & editing. **Claudia Neumann:** Data curation, Writing – review & editing. **Eva-Katharina Egger:** Data curation, Writing – review & editing. **Alexander Mustea:** Resources, Writing – review & editing. **Martin Soehle:** Conceptualization, Methodology, Validation. **Stilla Frede:** Formal analysis, Investigation, Methodology, Supervision. **Markus Velten:** Data curation, Investigation, Methodology, Writing – review & editing. **Mark Coburn:** Project administration, Resources, Validation, Writing – review & editing. **Tobias Hilbert:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Project administration, Software, Supervision, Validation, Visualization, Writing – original draft.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

The authors wish to thank Frank Splettsjoesser for providing technical support.

References

- [1] American Cancer Society, Cancer facts & statistics, American Cancer Society| Cancer Facts & Statistics. <http://cancerstatisticscenter.cancer.org/>. (Accessed 19 December 2020).
- [2] C.H. Norell, J. Butler, R. Farrell, et al., Exploring international differences in ovarian cancer treatment: a comparison of clinical practice guidelines and patterns of care, *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.* 30 (2020) 1748–1756.
- [3] E.K. Egger, N. Kohls, M.B. Stope, et al., Risk factors for severe complications in ovarian cancer surgery, *Vivo Athens Greece* 34 (2020) 3361–3365.
- [4] C. Gómez-Raposo, M. Mendiola, J. Barriuso, et al., Angiogenesis and ovarian cancer, *Clin. Transl. Oncol. Off. Publ. Fed. Span. Oncol. Soc. Natl. Cancer Inst. Mex.* 11 (2009) 564–571.
- [5] J. Folkman, K. Watson, D. Ingber, et al., Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia, *Nature* 339 (1989) 58–61.
- [6] C.R. Tait, P.F. Jones, Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch, *J. Pathol.* 204 (2004) 1–10.
- [7] K. Hata, K. Nakayama, R. Fujiwaki, et al., Expression of the angiopoietin-1, angiopoietin-2, Tie2, and vascular endothelial growth factor gene in epithelial ovarian cancer, *Gynecol. Oncol.* 93 (2004) 215–222.
- [8] K. Hata, J. Udagawa, R. Fujiwaki, et al., Expression of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and Tie2 genes in normal ovary with corpus luteum and in ovarian cancer, *Oncology* 62 (2002) 340–348.
- [9] L. Zhang, N. Yang, J.-W. Park, et al., Tumor-derived vascular endothelial growth factor up-regulates angiopoietin-2 in host endothelium and destabilizes host vasculature, supporting angiogenesis in ovarian cancer, *Cancer Res.* 63 (2003) 3403–3412.
- [10] Y. Liu, X. Cao, Characteristics and significance of the pre-metastatic niche, *Cancer Cell* 30 (2016) 668–681.
- [11] J.B. Szender, T. Emmons, S. Belliotti, et al., Impact of ascites volume on clinical outcomes in ovarian cancer: a cohort study, *Gynecol. Oncol.* 146 (2017) 491–497.
- [12] E. Siddall, M. Khatri, J. Radhakrishnan, Capillary leak syndrome: etiologies, pathophysiology, and management, *Kidney Int.* 92 (2017) 37–46.
- [13] D. Aguilar-Cazares, R. Chavez-Dominguez, A. Carlos-Reyes, et al., Contribution of angiogenesis to inflammation and cancer, *Front. Oncol.* 9 (2019), 1399.
- [14] O. Hunsicker, C. Fotopoulou, K. Pietzner, et al., Hemodynamic consequences of malignant ascites in epithelial ovarian cancer surgery*: a prospective substudy of a randomized controlled trial, *Medicine (Baltimore)* 94 (2015), e2108.
- [15] Y. Zhang, R. Birru, Y.P. Di, Analysis of clinical and biological samples using microsphere-based multiplexing Luminex system, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1105 (2014) 43–57.
- [16] J.L. Aerts, M.I. Gonzales, S.L. Topalian, Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using real-time RT-PCR, *BioTechniques* 36 (2004) 84–86, 88, 90–91.
- [17] T. Hashimoto, F. Shibasaki, Hypoxia-inducible factor as an angiogenic master switch, *Front. Pediatr.* 3 (2015) 33.
- [18] D. Marmé, N. Fusenig (Eds.), *Tumor Angiogenesis: Basic Mechanisms and Cancer Therapy*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2008, <https://doi.org/10.1007/978-3-540-33177-3>. Epub ahead of print.
- [19] T. Hilbert, S. Klaschik, The angiopoietin/TIE receptor system: focusing its role for ischemia-reperfusion injury, *Cytokine Growth Factor Rev.* 26 (2015) 281–291.

- [20] H.G. Augustin, G.Y. Koh, G. Thurston, et al., Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (2009) 165–177.
- [21] T. Hilbert, K. Dornbusch, G. Baumgarten, et al., Pulmonary vascular inflammation: effect of TLR signalling on angiopoietin/TIE regulation, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 44 (2017) 123–131.
- [22] M. Sopo, M. Anttila, K. Hämäläinen, et al., Expression profiles of VEGF-A, VEGF-D and VEGFR1 are higher in distant metastases than in matched primary high grade epithelial ovarian cancer, *BMC Cancer* 19 (2019) 584.
- [23] J. Gehlen, S. Klaschik, C. Neumann, et al., Dynamic changes of angiopoietins and endothelial nitric oxide supply during fluid resuscitation for major gyn-oncological surgery: a prospective observation, *J. Transl. Med.* 18 (2020), 48.
- [24] J. Cedervall, Y. Zhang, H. Huang, et al., Neutrophil extracellular traps accumulate in peripheral blood vessels and compromise organ function in tumor-bearing animals, *Cancer Res.* 75 (2015) 2653–2662.
- [25] S. Klaschik, J. Gehlen, C. Neumann, et al., Network of mediators for vascular inflammation and leakage is dysbalanced during cytoreductive surgery for late-stage ovarian cancer, *Mediat. Inflamm.* 2019 (2019), 5263717.
- [26] K. Kayakabe, T. Kuroiwa, N. Sakurai, et al., Interleukin-6 promotes destabilized angiogenesis by modulating angiopoietin expression in rheumatoid arthritis, *Rheumatol Oxf. Engl.* 51 (2012) 1571–1579.
- [27] S.M. Stamatovic, R.F. Keep, M. Mostarica-Stojkovic, et al., CCL2 regulates angiogenesis via activation of Ets-1 transcription factor, *J. Immunol.* 177 (2006) 2651–2661.
- [28] L. Hefler, C. Tempfer, G. Heinze, et al., Monocyte chemoattractant protein-1 serum levels in ovarian cancer patients, *Br. J. Cancer* 81 (1999) 855–859.
- [29] S. Furukawa, S. Soeda, Y. Kiko, et al., MCP-1 promotes invasion and adhesion of human ovarian cancer cells, *Anticancer Res.* 33 (2013) 4785–4790.
- [30] S. Conroy, F.A.E. Kruij, M. Wagemakers, et al., IL-8 associates with a pro-angiogenic and mesenchymal subtype in glioblastoma, *Oncotarget* 9 (2018) 15721–15731.
- [31] F. Tas, S. Karabulut, M. Serilmez, et al., Clinical significance of serum epithelial cell adhesion molecule (EPCAM) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) levels in patients with epithelial ovarian cancer, *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental. Biol. Med.* 35 (2014) 3095–3102.
- [32] R.E. Banks, A.J. Gearing, I.K. Hemingway, et al., Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies, *Br. J. Cancer* 68 (1993) 122–124.
- [33] Q. Guo, X. Yang, Y. Ma, et al., Syndecan-1 serves as a marker for the progression of epithelial ovarian carcinoma, *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 36 (2015) 506–513.
- [34] A. Salmaggi, M. Eoli, S. Frigerio, et al., Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and plasma thrombomodulin levels in glioblastoma patients, *Cancer Lett.* 146 (1999) 169–172.
- [35] M. Mofarrah, T. Nouh, S. Qureshi, et al., Regulation of angiopoietin expression by bacterial lipopolysaccharide, *Am. J. Phys. Lung Cell. Mol. Phys.* 294 (2008) L955–L963.
- [36] C.C. Ghosh, S. David, R. Zhang, et al., Gene control of tyrosine kinase TIE2 and vascular manifestations of infections, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) 2472–2477.
- [37] S.M. Parikh, Dysregulation of the angiopoietin-Tie-2 axis in sepsis and ARDS, *Virulence* 4 (2013) 517–524.
- [38] G. Thurston, J.S. Rudge, E. Ioffe, et al., Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage, *Nat. Med.* 6 (2000) 460–463.
- [39] T. Hilbert, G.D. Duerr, M. Hamiko, et al., Endothelial permeability following coronary artery bypass grafting: an observational study on the possible role of angiopoietin imbalance, *Crit. Care Lond. Engl.* 20 (2016) 51.
- [40] L. Hu, N. Ferrara, R.B. Jaffe, Paracrine VEGF/VE-cadherin action on ovarian cancer permeability, *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 231 (2006) 1646–1652.
- [41] I. Bekes, T.W.P. Friedl, T. Köhler, et al., Does VEGF facilitate local tumor growth and spread into the abdominal cavity by suppressing endothelial cell adhesion, thus increasing vascular peritoneal permeability followed by ascites production in ovarian cancer? *Mol. Cancer* 15 (2016) 13.
- [42] S.M. Rowley, L. Mascarenhas, L. Devereux, et al., Population-based genetic testing of asymptomatic women for breast and ovarian cancer susceptibility, *Genet. Med.* 21 (2019) 913–922.

3. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Tobias Hilbert bedanken, der mir nicht nur dieses überaus spannende Thema überlassen hat, sondern mit seinem hohen Engagement als Doktorvater maßgeblich zur Publikation und dem Gelingen meiner Dissertation beigetragen hat.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Stilla Frede. Sie hatte für Anliegen jeglicher Art immer ein offenes Ohr und hat mit ihren Ratschlägen und ihrer unermüdlichen Unterstützung vieles Unmögliche möglich gemacht.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich zudem beim gesamten Labor-Team bedanken. Dabei vor allen Dingen bei Frau Dr. med. vet. Katrin Stein, Frau Susanne Schulz und Herrn Frank Splettstoesser für die Hilfe bei allen labortechnischen Angelegenheiten.

Vielen Dank nicht nur an Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Alexander Mustea, Frau Priv.-Doz. Dr. med. Mignon-Denise Keyver-Paik und Frau Dr. med. Eva Egger, sondern ebenso an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter aus der Anästhesie und Frauenheilkunde im OP der Universitätsfrauenklinik Bonn. Dank ihnen konnte ich die notwendigen Serum- und Gewebeproben reibungslos akquirieren und viele lehrreiche Erfahrungen im OP sammeln.

Der größte Dank gilt meinen Eltern und meiner Frau, die immer an mich glauben und auf meinem gesamten Weg kompromisslos hinter mir stehen.