

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/19979> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Buckle, Tessa

Title: Interventional molecular imaging, a hybrid approach

Date: 2012-10-17

**Interventional
molecular imaging,
a hybrid approach**

**Dutch summary
Nederlandse samenvatting**

Chapter 16

In dit proefschrift is het gebruik van (hybride) contrastmiddelen voor gecombineerde pre- en intra-operatieve detectie van de schildwachtklier (sentinel lymph node; SLN), en voor evaluatie van het expressie niveau van de chemokine receptor 4 (CXCR4) in tumor weefsel besproken. Een samenvatting vindt u hieronder.

Deel I: Hybride geleiding van de SLN biopsie

Een biopsie van de SLN maakt vroege detectie van gemetastaseerde ziekte in het lymfesysteem mogelijk. Radioactief gelabelde nanodeeltjes, zoals technetium gelabelde albumine aggregaten (^{99m}Tc -nanocolloïd), worden momenteel gebruikt voor het preoperatief identificeren van de SLN. Tijdens de interventie kan dit radioactieve signaal gebruikt worden voor akoestische geleiding met behulp van een gamma stralen detector. Voor optische chirurgische geleiding worden veelal extra kleurstoffen geïnjecteerd tijdens de ingreep. Gebruik van deze kleurstoffen resulteert echter veelal niet tot verbeterde detectie van de SLN. Nieuwe chirurgische geleidingsmethoden die preoperatieve identificatie van de SLN integreren met intra-operatieve optische detectie zijn besproken in **Hoofdstuk 2 t/m 7**.

Hoofdstuk 2

Ontwikkeling van niet biomarker gerichte hybride nanodeeltjes vormt een relatief nieuwe tak van onderzoek binnen de chemie/nanotechnologie. Binnen dit onderzoeksveld vormt de SLN biopsie een aantrekkelijke toepassing, aangezien er tijdens de diagnostiek van de SLN een duidelijke voorkeur is voor deeltjes met het formaat van 10-100 nm. Dit formaat zorgt voor voldoende retentie in de SLN, waardoor de (fluorescente) kleurstoffen en radiolabels die gekoppeld zijn aan dit deeltje ook in de lymfeklier kunnen worden gedetecteerd. Een goed voorbeeld hiervan is het hybride ICG- ^{99m}Tc -nanocolloïd, dat bestaat uit een complex van het reeds klinisch toegepaste radioactief gelabelde humaan serum albumine complex nanocolloïd en de fluorescente kleurstof Indocyanine groen (ICG).

Hoofdstuk 3

De dynamiek van ^{99m}Tc -nanocolloïd, ICG, en ICG- ^{99m}Tc -nanocolloïd is bestudeerd in een orthotoop muismodel voor metastaserende borstkanker. Deze studie toont aan dat de drainage en het retentie patroon van beide radiocolloïden in muizen vergelijkbaar zijn, terwijl vrij ICG snel geklaard wordt.

Hoofdstuk 4

De potentie van gecombineerde pre- en intra-operatieve beeldvorming met behulp van het hybride ICG-^{99m}Tc-nanocolloïd is verder geëvalueerd in een spontaan muis model voor prostaatkanker. Gebruik van een mengsel van de fluorescente kleurstof en het radiocolloïd zorgde voor een meer translationele formulering van het contrastmiddel. De stabiliteit van het hybride radiocolloïd bleek groter te zijn dan de stabiliteit van een niet-colloïdaal ICG-^{99m}Tc-humaan serum albumine complex. In dit hoofdstuk werden bovendien de eerste (ex vivo) resultaten in patiënten gepresenteerd.

De resultaten van de twee preklinische studies (**Hoofdstuk 3 en 4**) laten zien dat de hybride aanpak bijdraagt aan de verbetering van de op fluorescentie gebaseerde intra-operatieve geleiding. Tevens kon gecombineerde chirurgische planning en intra-operatieve detectie bewerkstelligd worden op basis van een enkele injectie met ICG-^{99m}Tc-nanocolloïd.

Hoofdstuk 5

In een reproduceerbaarheidsstudie waarin 25 patiënten met een melanoom in het hoofd-halsgebied, de romp, of met peniscarcinoom zijn geïnccludeerd, werd een klinische vergelijking gemaakt tussen de lymfatische drainage patronen van de Europese gouden standaard ^{99m}Tc-nanocolloïd en ICG-^{99m}Tc-nanocolloïd. Vergelijkbaar met de resultaten van de preklinische situatie, werden identieke drainage patronen gevonden voor beide contrastmiddelen.

Hoofdstuk 6

De toegevoegde waarde van ICG-^{99m}Tc-nanocolloïd tijdens laparoscopische procedures werd aangetoond in elf patiënten waarbij een robot geassisteerde laparoscopische prostatectomie werd uitgevoerd, in combinatie met een lymfeklier dissectie. Pre-operatief kon de SLN worden geïdentificeerd aan de hand van de verkregen lymfoscintigrammen en de SPECT/CT beelden, terwijl het hybride karakter van het contrastmiddel intra-operatieve optische identificatie van de SLN mogelijk maakte door middel van fluorescentie beeldvorming. Tijdens de ingreep bleken detectie van het radioactieve en fluorescentie signaal complementair; Fluorescentie verbeterde de chirurgische geleiding in gebieden met een hoog radioactief achtergrond signaal, zoals rond de plaats van injectie. Radiogeleiding werd gebruikt als aanvulling op de beperkte weefselpenetratie van het fluorescentie signaal.

Hoofdstuk 7

Een additionele eigenschap van ICG-^{99m}Tc-nanocolloïd is dat de optische component gebruikt kan worden voor de ex vivo evaluatie van de locatie van het ICG-^{99m}Tc-nanocolloïd injectie depot. Door met fluorescentie beeldvorming de locatie van de injectie deposito's in ingebedde prostaat monsters te bepalen, en deze direct te linken aan het lymfedrainage patroon zoals preoperatief gezien op lymfoscintigrafie, kon een correlatie tussen beiden worden aangetoond. Uit de resultaten van deze studie kon worden geconcludeerd dat de plaatsing van de injectie in de prostaat het lymfedrainage patroon beïnvloedt, en als zodanig van invloed is op de SLN biopsie procedure als geheel.

Deel II: Chemokine recetor 4 (CXCR4) gerichte toepassingen

Voor de visualisatie van tumorcellen moet men gebruik maken van beeldvormende technieken die een specifieke biomarker op een tumorcel zichtbaar maakt. CXCR4 is een biomarker die tot over-expressie wordt gebracht in verschillende soorten kanker en is een opkomend target binnen de moleculaire beeldvorming een target voor therapie. De pre-klinische evaluatie van verschillend gelabelde contrastmiddelen gericht tegen CXCR4, gebaseerd op het aan CXCR4 bindende peptide Ac-TZ14011, zijn besproken in **hoofdstuk 8 t/m 13**.

Hoofdstuk 8

Bij de beoordeling van een (hybride) biomarker specifiek contrastmiddel zijn zowel de pre-klinische set-up als de affiniteit van de probe voor de receptor van invloed op de verkregen resultaten. Getransfecteerde cellijnen met zeer hoge CXCR4 expressie niveaus kunnen gebruikt worden voor de initiële evaluatie van een contrastmiddel. Tumor modellen met een over-expressie niveau dat beter vergelijkbaar is met de viervoudige over-expressie die gevonden is in de klinische situatie, kunnen het beste gebruikt worden om de klinische relevantie van contrastmiddelen voor CXCR4 te bestuderen.

De affiniteit van Ac-TZ14011 peptide derivaten voor CXCR4 kan worden beïnvloed door de toevoeging van een fluorescent label of een radio label. Toevoeging van een label veroorzaakt een afname in affiniteit voor de receptor. De affiniteit blijft echter in alle gevallen voldoende voor gebruik in vivo.

Hoofdstuk 9

Door functionalisatie van Ac-TZ14011 met de fluorescente kleurstof FITC konden in vitro, in borstkanker cellen, CXCR4 receptor expressie niveaus en de lokalisatie van de receptor geëvalueerd worden. CXCR4 bleek voornamelijk aanwezig te zijn op het celmembraan en/of in endosomen/lysosomen in het cytoplasma na het optreden van endocytose. Met Ac-TZ14011-FITC konden cellen met slechts een viervoudige overexpressie van CXCR4 worden onderscheiden van normale tumorcellen. Bovendien bleek de aankleuring na incubatie met Ac-TZ14011-FITC vergelijkbaar met de aankleuring die verkregen wordt na incubatie met commercieel verkrijgbare anti-CXCR4-antilichamen.

Hoofdstuk 10

Een indium gelabelde variant van het Ac-TZ14011 peptide (¹¹¹In-DTPA-Ac-TZ14011) maakte evaluatie van CXCR4 expressie niveaus mogelijk in het MIN-O muis tumor model dat vergelijking vertoont met humaan ductaal carcinoom in situ. Op basis van de CXCR4 expressie kon onderscheid worden gemaakt tussen een (pre-invasief) vroeg, overgangs- en een (invasief) laat stadium in de progressie van MIN-O tumorlaesies. De membraneuze CXCR4 expressie bleek heterogeen verdeeld over de tumor en de receptor expressie nam toe gedurende de progressie van de MIN-O laesies.

Hoofdstuk 11

Toevoeging van een groep die zowel het chelaat DTPA als een fluorescerende kleurstof bevat (multifunctional single attachment point reagent; MSAP) leidde tot de vorming van een hybride versie van Ac-TZ14011 (Ac-TZ14011-MSAP). Deze functionalisatie resulteerde in een lagere affiniteit voor de CXCR4 receptor in vergelijking met het niet-gelabelde Ac-TZ14011 peptide. De affiniteit van het hybride contrastmiddel was echter vergelijkbaar met de affiniteit die verkregen was na toevoeging van zowel het FITC- of het DTPA-label aan Ac-TZ14011. Met het MSAP-label was het mogelijk om CXCR4 positieve tumoren te visualiseren in zowel de pre- als intra-operatieve setting.

Hoofdstuk 12

Multimerisatie kan worden gebruikt om de negatieve invloed van het MSAP-label op de bindingsaffiniteit van Ac-TZ14011 te minimaliseren. Terwijl de affiniteit voor CXCR4 van een ongelabelde dimeer en tetrameer iets lager was dan de affiniteit van de ongelabelde

monomeer, werd een vermindering van de specifieke binding gezien voor de MSAP gelabelde dimeer en tetrameer in vergelijking met de MSAP-gelabelde monomeer. De dimeer bleek minder invloed op de levensvatbaarheid van de cellen te hebben en zorgde voor een hogere ratio tussen opname in tumor- en spierweefsel.

Hoofdstuk 13

Het concept van hybride beeldvorming kon verder worden uitgebreid door het fluorescente label van MSAP-Ac-TZ14011 te gebruiken voor het bestuderen van de aanwezigheid van CXCR4 receptoren in vers MIN-O biopsie weefsel. Met behulp van flow cytometrische analyse konden verschillende CXCR4 positieve celpopulaties worden aangetoond, wat een nauwkeurige stadiëring van de laesies mogelijk maakte. Deze bevindingen werden gebruikt om nauwkeurig te voorspellen of in vivo visualisatie van tumor weefsel met behulp van beeldvormende technieken zoals SPECT/CT en fluorescentie detectie haalbaar was. Bovendien kon het fluorescente label ook ex vivo worden gebruikt om de CXCR4 gerelateerde aankleuring in tumormonsters bevestigen. Als zodanig bleek het hybride karakter van MSAP-Ac-TZ14011 geschikt voor integratie van biomarker screening, in vivo beeldvorming en ex vivo validatie van tumor weefsel met behulp van een enkel contrastmiddel.

Hoofdstuk 14 (toekomst visie)

Verdere ontwikkeling van fluorescentie camera's en ontwikkeling en klinische implementatie van nieuwe contrastmiddelen zullen essentieel zijn voor de verdere verbetering van de accuraatheid van een chirurgische ingreep. Momenteel wordt er op verschillende manieren geprobeerd om het in dit proefschrift beschreven hybride concept verder te optimaliseren en/of uit te breiden.

De biomarker specifieke hybride imaging aanpak kan ook worden toegepast voor andere biomarkers, bijvoorbeeld $\alpha_v\beta_3$ integrine. Via deze benadering kunnen met ^{111}In -MSAP-RGD, welke gericht is tegen $\alpha_v\beta_3$ integrine, zowel tumor marges als metastasen zichtbaar gemaakt worden.

(Borst) tumoren kunnen worden gemerkt met bv. markeringszaadjes om chirurgische lokalisatie te vergemakkelijken. Hybride markeringszaadjes kunnen worden gebruikt voor het uitbreiden van de huidige markeringsmethodes en de fluorescentie eigenschappen kunnen worden gebruikt voor het inschatten van de chirurgische veiligheidsmarges.

Zelfs wanneer fluorescentie gecombineerd wordt met pre-operatieve beeldvorming en intra-operatieve detectie van gamma stralen, kan de chirurgische identificatie van bijvoorbeeld diepliggende SLNs nog steeds moeilijk zijn. Pilot experimenten hebben laten zien dat, op 3D SPECT/CT gebaseerde, navigatie van een fluorescentie laparoscopie haalbaar is en mogelijk de chirurgische geleiding verder kan optimaliseren.

Conclusie

De resultaten beschreven in dit proefschrift laten het potentieel zien van hybride contrastmiddelen in de translatie van preoperative bevindingen naar de operatiekamer. Het hybride concept bleek van aanvullende waarde tijdens klinische SLN-biopsie procedures. Hiernaast is dit hybride concept preklinisch ook al succesvol toegepast voor de specifieke visualisatie van tumor cellen.

