

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/21918> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Xie, Bangwen

**Title:** Optical imaging of cancer and cell death

**Issue Date:** 2013-10-08

## Samenvatting

Optische beeldverwerking is een gevoelige, snelle en relatief goedkope techniek toepasbaar in preklinisch *in vitro* en *in vivo* onderzoek. De ontwikkeling van injecteerbare nabij infrarode fluorescente (NIRF) probes heeft fluorescente beeldverwerking geschikt gemaakt om tumorgroei en metastasering in de tijd te volgen in proefdieren. Deze NIRF probes kunnen wellicht op den duur ook bij patiënten worden gebruikt.

In dit proefschrift wordt de toepasbaarheid van verschillende NIRF probes beschreven om tumorgroei en celdood te visualiseren. In **hoofdstuk 2** wordt een combinatie van enzym activeerbare en specifiekgerichte NIRF probes gebruikt om de tumorgroei te volgen in een 4T1-luc2 borstkankermodel in muizen. De correlatie tussen fluorescentie (FLI) en bioluminescentie (BLI) in dit model wordt beschreven. Verder laat dit hoofdstuk de mogelijkheden zien om simultaan meerdere tumoreigenschappen te visualiseren door gebruik te maken van een combinatie van NIRF probes met verschillende spectrale eigenschappen, die we van elkaar kunnen onderscheiden door spectrale analyse.

*In vitro* experimenten laten zien dat de 4T1-luc2 cellen in staat zijn de enzym activeerbare probes (ProSense680 en MMPSense680) te activeren en de specifiek gerichte probes (IRDye 800CW 2-DG en IRDye 800CW EGF) te binden. Na injectie van deze cellen in het borstweefsel van immuundeficiente muizen is tumorgroei met bioluminescentie te volgen. Als vervolgens de verschillende NIRF probes worden ingespoten zien we een sterke lineaire correlatie tussen BLI en FLI met een goede signaal-ruis verhouding. Immunohistochemie laat probe-specifieke expressiepatronen zien in de tumoren waaruit we kunnen afleiden dat het gebruik van deze probes in het proefdier een meer compleet beeld geeft van de verschillende tumoreigenschappen. Het simultaan kunnen visualiseren van verschillende tumoreigenschappen door gebruik te maken van een mix van verschillende NIRF probes in combinatie met spectrale analyse (unmixing) van de verschillende fluorescentie signalen zou wellicht toepasbaar kunnen worden in klinisch onderzoek, in het bijzonder bij beeldgeleide chirurgie.

Elke tumor heeft zijn eigen karakteristieke kenmerken van intracellulaire en oppervlakte eiwitten welke gebruikt kunnen worden ter identificatie van de tumor of bij het bepalen van de te volgen anti-kanker therapie. Verschillende probes en therapieën zijn dus nodig om de verschillende tumoren te identificeren dan wel te behandelen. Wat de verschillende vooral agressieve tumorsoorten meestal gemeen hebben is de vorming van een necrotische kern als gevolg van celdood door ischemie veroorzaakt door vaatlijden. Dit proces treedt op wanneer de snelheid van de tumorgroei groter is dan de vorming van nieuwe bloedvaten door angiogenese en is geassocieerd met slechte prognose. Celdood in necrotisch weefsel is dus een vrij universeel kenmerk van tumoren en kan

---

gebruikt worden om tumoren te lokaliseren of als doelwit voor behandeling.

In **hoofdstuk 3** en **4** worden experimenten beschreven met twee verschillende NIRF probes die specifiek zijn voor het aantonen van dode cellen. In een experimenteel proefdier model waarin traumatisch hersenletsel wordt veroorzaakt door een cryolesie worden in **hoofdstuk 3** de resultaten van de experimenten beschreven uitgevoerd met het synthetische zink(II)-dipicolylamine PSS-794 dat bindt aan fosphatidylserine dat tot expressie komt op de membranen van (vroeg en laat) apoptotische en necrotische cellen. In **hoofdstuk 4** worden de bevindingen beschreven uitgevoerd met het fluorescent gelabelde 4-(N-(S-glutathionylacetyl) amino) phenylarsonous acid (GSAO-AF750) dat aan het cytosolisch heat shock protein-90 (HSP-90) bindt afkomstig uit apoptotische en necrotische cellen wat samengaat met het lek raken van de plasmamembraan.

In het experimenteel cryolesie model wordt een metalen cilinder, dat gekoeld is door vloeibaar stikstof, kortstondig tegen de schedel van een muis gehouden. Dit veroorzaakt lokaal celdood in de hersenen. De NIRF probes PSS-794 en GSAO-AF750 blijken selectief te accumuleren in de cryolesie in de hersenen. Celdood en specifieke accumulatie van de probe in necrotisch weefsel werd bevestigd met histologie. Voor deze studies hebben we een nieuwe assay ontwikkeld waarin we celdood initiëren in de kweekplaat. Bioluminescente 4T1-luc2 cellen worden gekweekt in de kweekplaat waarna er aan de onderkant van de plaat een pellet droogijs tegenaan wordt gehouden. Dit veroorzaakt lokaal celdood met als gevolg lokale inactivatie van het luciferase enzyme waardoor er geen bioluminescentie signaal optreedt op de behandelde plek. Na toevoeging van de fluorescente NIRF probes zien we specifiek fluorescentie op de plek waar celdood is. Deze snelle en robuuste is dus uitermate geschikt om nieuwe probes te screenen op hun potentie om dode cellen aan te tonen. De verkregen data suggereren dat beide probes in staat zijn specifieke celdood aan te tonen.

In **hoofdstuk 5** laten we zien dat GSAO-AF750 te gebruiken is om de effectiviteit van chemotherapie aan te tonen door zijn capaciteit om celdood te detecteren. De expressie van HSP-90 wordt verhoogd als gevolg van de chemotherapie. Biodistributie studies tonen aan dat de fluorescent gelabelde probe snel wordt geklaard via de nieren en niet accumuleert in gezond weefsel. Flowcytometrie laat specifieke binding van de probe zien aan dode Jurkat T cellen die behandeld zijn met staurosporine. In muizen met een tumor die behandeld worden met cyclophosphamide, bindt de probe aan necrotische en apoptotische tumorcellen. Optische beeldverwerking met behulp van specifieke fluorescente celdood-probes maakt het mogelijk de effectiviteit van tumor therapie in tijd te vervolgen. Mogelijkerwijs is deze strategie in de toekomst ook bij patiënten met kanker toe te passen.

In **hoofdstuk 6** worden mogelijke toekomstperspectieven van optische beeldverwerking zowel op microscopisch als macroscopisch niveau

bediscussieerd. In dit hoofdstuk wordt ook de mogelijkheid besproken hoe nieuwe optische of multi-modale beeldverwerkings technieken toegepast zouden kunnen worden in de kliniek. Wat betreft de beeldverwerking van kanker en celdood worden de huidige uitdagingen en nieuwe strategieën besproken. Tevens wordt er aandacht besteed aan de voor- en nadelen van de vele verschillende celdood probes.

Al met al benadrukken de in dit proefschrift beschreven preklinische studies het belang van non-invasieve optische beeldverwerking van tumorgroei en celdood. Deze techniek is zeer waardevol en biedt complementaire informatie naast de gebruikelijke diagnostiek verkregen met behulp van MRI, SPECT/PET en CT. Een ander bijkomend voordeel van deze snelle diagnostische methode zijn de lage kosten in vergelijking met de andere modaliteiten. Echter, voordat optische beeldverwerking zich een vaste plaats kan verwerven in de diagnostiek naast de bestaande technieken zal er nog het nodige gedaan moeten worden aan de verdere optimalisatie van deze techniek.

