



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Multimodal image-guided interventions using oncological biomarkers

Stammes, M.A.

### Citation

Stammes, M. A. (2018, May 22). *Multimodal image-guided interventions using oncological biomarkers*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/62351>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/62351>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/62351> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Stammes, M.A.

**Title:** Multimodal image-guided interventions using oncological biomarkers

**Issue Date:** 2018-05-22

# **Appendices**

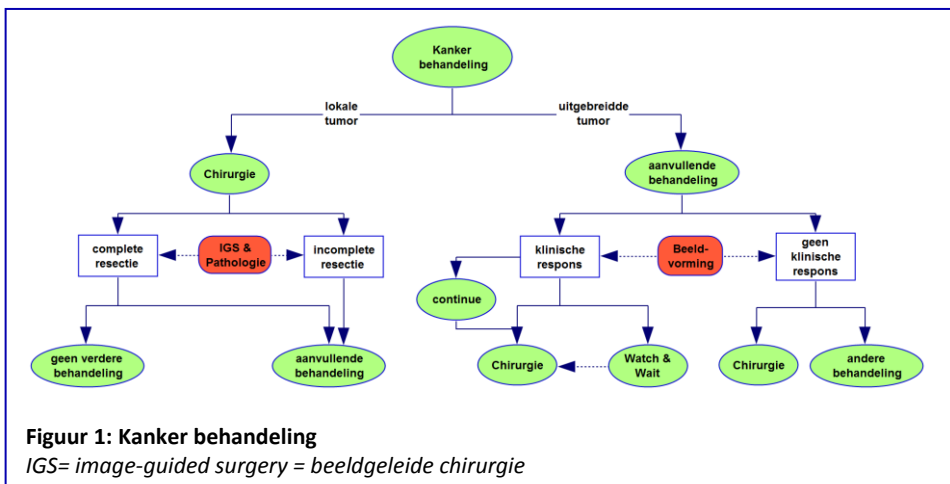
**Nederlandse Samenvatting  
List of Abbreviations  
Curriculum Vitae  
List of Publications & Conference Abstracts  
Dankwoord**

Marieke A. Stammes



## Nederlandse Samenvatting

Op dit moment is kanker één van de belangrijkste doodsoorzaken in de wereld met circa 14 miljoen nieuw gediagnosticeerde gevallen in 2012 en rond de 20 miljoen in 2025. Dit betekent dat het risico dat iemand kanker krijgt nu al op 18.5% ligt en alleen nog maar verder gaat stijgen. Het doel van het onderzoek uitgevoerd in dit proefschrift is dan ook om een bijdrage te leveren aan zowel de diagnostiek als behandeling van kankerpatiënten. De meest gebruikte behandelingen voor kanker zijn: chirurgie, systemische therapie of radiotherapie. Vaak zal er voor een combinatie van deze behandelingen worden gekozen en wanneer mogelijk maakt chirurgie daar deel van uit. Voor alle combinaties geldt dat het doel is om het kankergezwel in zijn geheel te verwijderen. Wanneer chirurgie in eerste instantie niet goed mogelijk is, dan is het soms mogelijk om eerst een andere behandeling te geven om de tumor te verkleinen. Indien dit succesvol blijkt, dan hoopt men in tweede instantie de tumor alsnog operatief te kunnen verwijderen (**Figuur 1**).



Tegenwoordig is één van de speerpunten in de behandeling van kankerpatiënten om deze meer patiënt- en doelgericht te maken. Op deze manier hopen we de nauwkeurigheid om kankercellen te vernietigen te verhogen en om daarnaast meer gezond weefsel te kunnen sparen. Er zijn meerdere manieren om dit aan te pakken en te verbeteren.

Dit proefschrift bestaat uit twee delen, in het eerste gedeelte wordt de mogelijke meerwaarde van beeldgeleide chirurgie besproken en bediscussieerd. Het onderzoek dat in dit gedeelte is uitgevoerd, toont aan dat beeldvorming van grote meerwaarde kan zijn tijdens de operatie. Het slagingspercentage hiervan is echter afhankelijk van de keuze van de beeldvormende modaliteit in combinatie met het target waartegen het contrastmiddel gericht is. In het tweede gedeelte van het proefschrift wordt een stof getest die necrose, onnatuurlijke celdood, aantoont. In dit gedeelte wordt succesvol aangetoond dat deze stof gebruikt zou kunnen worden als biomarker voor een vroege evaluatie van de behandelrespons tijdens een kankerbehandeling.

### ***Deel I: Beeldgeleide Chirurgie***

Voor de start van een behandeling van een kankerpatiënt, met een solide tumor, worden er verschillende vormen van beeldvorming gedaan om een goed overzicht te krijgen van de conditie van de patiënt en voor de stadiëring van de tumor. Tijdens een operatie is het beeld echter veranderd doordat de anatomie van alle weefsels gewijzigd is. Het vaststellen van de rand van de tumor kan dan dus niet meer op basis van de voorafgaande beeldvorming adequaat gedaan worden maar moet gedaan worden door visuele inspectie en palpatie door de chirurg. Complete verwijdering van een tumor wordt dan bepaald op basis van palpabel en visueel afwezig tumorweefsel. De bevestiging of dit juist was wordt bepaald door histologische inspectie van het uitgenomen weefsel door de patholoog, echter de resultaten hiervan zijn ongeveer een week na de operatie bekend met alle consequenties van dien. Het grote voordeel van beeld- of moleculair geleide chirurgie is dat, door de toevoeging van deze nieuwe techniek, de chirurg een directe terugkoppeling krijgt over het weefsel wat hij uitgenomen heeft door een verbetering van het zicht.

Over het algemeen kan ieder element in een tumor dat specifiek geactiveerd, tot expressie gebracht of overgereguleerd wordt, dienen als doelwit voor beeldgeleide chirurgie. Op dit moment zijn een groot aantal van dit soort 'elementen' of biomarkers voor optische beeldvorming in verschillende fases van onderzoek, waarbij veelbelovende resultaten worden verkregen. Deze studies tonen aan dat de standaard chirurgische procedure niet negatief wordt beïnvloed door het gebruik van optische beeldvorming en dat de tumor

zonder vertraging “live” in beeld kan worden gebracht. De twee grootste problemen die gezien worden is het hoge aantal vals-positieve bevindingen en daarmee de overbehandeling van patiënten en de minimale penetratie diepte van optische beeldvorming. Voor de ontwikkeling van nieuwe beeldgeleide technieken zijn doelgerichte contrast middelen noodzakelijk die een hoge weefsel specificiteit hebben met daarbij een hoge tumor-achtergrond ratio voor een meer specifieke en gedetailleerde visualisatie van de tumor (**hoofdstuk 3**). Daarnaast is het zinvol om op zoek te gaan naar alternatieve beeldvormende modaliteiten of combinaties hiervan (**hoofdstuk 2 & 4**)

In **Hoofdstuk 2** worden tien verschillende innovatieve en beschikbare beeldvormende modaliteiten, die tijdens de operatie gebruikt zouden kunnen worden, met elkaar vergeleken vanuit een klinisch oogpunt. De conclusie die in dit hoofdstuk getrokken wordt, is dat geen enkele beeldvormende modaliteit op zichzelf in staat is om al het noodzakelijke weer te geven. Het gebruik van multimodale beeldvorming is vereist om op die manier de voordelen te laten prevaleren boven de nadelen. De betrouwbaarheid en beeldkwaliteit van de meeste van deze modaliteiten kan verbeterd worden door het gebruik van doelgerichte contrastmiddelen. Hierbij lijken specifieke “doelen”, die ruimschoots aanwezig zijn op het celoppervlak van tumorcellen en afwezig zijn bij gezonde cellen, de beste en meest kansrijke kandidaten voor beeldgeleide chirurgie.

In **Hoofdstuk 3** worden twee biomarkers; EphA2 en EphB4 met elkaar vergeleken. Beide worden tot over-expressie gebracht bij de meerderheid van patiënten met een colorectale tumor. Om de verschillen in expressie tussen tumor en nabijgelegen gezond weefsel in beeld te brengen werd een scoringsdiagram ontwikkeld. Dit gaf in één oogopslag weer dat hoewel beide biomarkers tot over expressie werden gebracht, alleen EphB4 een duidelijk verschil toonde in vergelijking met gezond weefsel.

In **Hoofdstuk 4** wordt de meerwaarde van multi-spectrale optoacoustische tomografie (MSOT) aangetoond. MSOT is vergelijkbaar aan optische fluorescente beeldvorming, alleen gebruikt MSOT licht als bron en geluid voor signaal detectie, waardoor de penetratie diepte groter is. Dit hoofdstuk toont de meerwaarde van 3D over 2D beeldvorming aan, onafhankelijk van de techniek die gebruikt wordt. Daarnaast wordt hard gemaakt dat een

combinatie van anatomische en functionele beeldvorming onontbeerlijk is voor het verkrijgen van een compleet overzicht van de tumor voor de operatie.

### ***Deel II: Beeldvorming van Necrose***

Celdood is een essentieel proces in het menselijke lichaam om in zijn geheel te kunnen overleven. Tumor celdood is meestal het effect van een kankerbehandeling en hoewel geïnduceerd van buiten het lichaam noodzakelijk om patiënten kanker te laten overleven. In dit gedeelte van het proefschrift doen we de aanname dat een verhoging van de hoeveelheid celdood in een tumor een teken is dat een patiënt reageert op de behandeling. Dit is een aanname, omdat het ook mogelijk is dat door de behandeling de biologische systemen rond een tumor geactiveerd worden en dat de tumor daardoor zelfs sneller gaat groeien. Ook dit proces zal celdood veroorzaken in de kern van de tumor, daar de bloedvaten niet zo snel mee kunnen groeien. Zowel respons op de behandeling als het sneller groeien van de tumor leidt tot celdood echter alleen een respons op de behandeling is een positief teken. De tweede aanname is dat necrose de belangrijkste vorm van celdood is, die plaatsvindt tijdens het behandelproces van kankerpatiënten. Deze aanname doen we omdat necrose geclassificeerd wordt als onnatuurlijk en veroorzaakt door directe onherstelbare schade aan de cel. Echter, volgens de internationale classificaties van celdood, zijn er 13 verschillende vormen van celdood te onderscheiden. Elke vorm heeft zijn eigen karakteristieken. Hoogstwaarschijnlijk vindt er dus een combinatie van verschillende vormen van celdood plaats na een behandeling.

In **Hoofdstuk 5** werd aangetoond dat de twee gecarboxyleerde cyanine kleurstoffen, HQ5 en IRDye800CW, een sterke aantrekkingskracht tot necrose hebben. Het exacte mechanisme waarmee ze binden op moleculair niveau is onduidelijk. We weten dat deze stoffen zich richten op cytoplasmatische eiwitten, die beschikbaar komen nadat de membraan integriteit verbroken is. Hiermee is de aanname uit bovenstaande alinea gerechtvaardigd, aangezien het eindpunt bij vele vormen van celdood het verlies van de membraan integriteit is.

Om deze stoffen in de toekomst klinisch bruikbaar te maken en om de hoeveelheid celdood te kunnen kwantificeren hebben we in **Hoofdstuk 6** één



van de leden van de HQ5 familie, HQ4, gekoppeld met een radioactief label. In dit hoofdstuk hebben we laten zien dat na deze koppeling er nog steeds binding aan necrose plaatsvindt en dat deze binding specifiek is. Hierdoor heeft HQ4 de potentie om gebruikt te gaan worden voor meerdere klinische toepassingen. Eén van de belangrijkste toepassingen is de evaluatie van behandelrespons. In **Hoofdstuk 6** laten we zien dat dit mogelijk is in met chemotherapie behandelde muizen, en in **Hoofdstuk 7**, door muizen te behandelen met radiotherapie.

Daarnaast testen we in **Hoofdstuk 7** ook een andere beeldvormende modaliteit, optoacoustische tomografie, voor de detectie van necrose met behulp van HQ4. In dit hoofdstuk is aangetoond dat HQ4 een multimodaal contrastmiddel is voor de beeldvorming van zowel oppervlakkig als dieper gelegen weefsels. De resultaten uit dit deel van het proefschrift laten zien dat contrastmiddelen gericht tegen necrose de potentie hebben om in de kliniek gebruikt te worden voor zowel diagnostische, prognostische als therapeutische doeleinden.

### **Toekomst Perspectief**

Kort samengevat laten de onderzoeken in dit proefschrift zien dat er meerdere veelbelovende technieken in ontwikkeling zijn, die mogelijk van meerwaarde kunnen zijn bij beeldgeleide chirurgie en behandel evaluatie van kankerpatiënten. Dit proefschrift toont ook aan dat het noodzakelijk is om modaliteiten te combineren, om de behandeling van kankerpatiënten verder te kunnen verbeteren. In dit proefschrift werd gekozen voor een combinatie van beeldvormende technieken en biomarkers. Een andere mogelijkheid is het combineren van diagnostiek en therapie, theranostiek. Theranostiek kan een combinatie zijn van diagnostiek gevolgd door therapie waarbij de diagnostiek gebruikt wordt om te onderzoeken of de therapie aan gaat slaan. Daarnaast kan theranostiek ook therapie gevolgd door diagnostiek zijn om vroege behandel respons vast te leggen. De laatste mogelijkheid is dat diagnostiek en therapie tegelijkertijd worden uitgevoerd. Het doel van theranostiek is dat er gepersonaliseerde behandelingen gegeven worden. De juiste behandeling wordt dan aan de juiste patiënt gegeven. Het maakt de patiëntenzorg efficiënter en tevens (kosten) effectiever. Doordat patiënten minder belast

worden met onnodige bijwerkingen, zorgt dit tevens voor een verbetering van de kwaliteit van leven.

Ik zou willen afsluiten met een citaat van de Chinese filosoof Lao Tzu; *“een reis van duizend kilometer begint met één enkele stap”*. In de context van mijn proefschrift heeft dit voor mij de volgende betekenis: om een hoge variëteit aan kankersoorten te verslaan is iedere stap voorwaarts er één. Met elke stap kunnen we het gedrag van kanker en het complete biologische proces erachter iets verder ontrafelen, met als doel kanker in de toekomst nog beter te kunnen behandelen. Ik hoop dat dit proefschrift bijgedragen heeft met een kleine stap voorwaarts in de juiste richting!

## List of Abbreviations

<b>%ID/g</b>	Percentage injected dose per gram
<b>%ID/w</b>	Percentage injected dose corrected for the weight
<b><sup>111</sup>In-Cl<sub>3</sub></b>	<sup>111</sup> indium-chloride
<b><sup>18</sup>F</b>	<sup>18</sup> fluor
<b>2DG</b>	2-Deoxyglucose
<b>800CW</b>	IRDye800CW
<b>AI</b>	Amphiphilicity index
<b>5-ALA</b>	5-aminolevulinic acid
<b>ATM</b>	Ataxia telangiectasia mutated
<b>ATP</b>	Adenosine triphosphate
<b>AVF</b>	Annexin V-FITC
<b>BED</b>	Biological effective dose
<b>BF</b>	Bright-field
<b>BLI</b>	Bioluminescent imaging
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin
<b>CA</b>	Contrast agent
<b>CBG99</b>	Green click beetle luciferase
<b>CBN</b>	Conjugated bond number
<b>CLI</b>	Cherenkov luminescence imaging
<b>cRGD</b>	c[RGDyK], cyclo (Arginine- Glycine – Aspartic acid-Tyrosine- Lysine)
<b>CT</b>	Computed tomography
<b>CTX</b>	Cyclophosphamide
<b>DAMP</b>	Damage-associated molecular pattern
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>DTPA</b>	Diethylene triamine pentaacetic acid
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>EphA2</b>	Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma receptor A2
<b>EphB4</b>	Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma receptor B4
<b>EPR</b>	Enhanced permeability and retention
<b>ERC</b>	European research council
<b>ETO</b>	Etoposide
<b>FACS</b>	Fluorescence-activated cell sorting
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FDG</b>	Fluorodeoxyglucose
<b>FFPE</b>	Formalin-fixed paraffin-embedded
<b>FGD</b>	Fluorescence-guided dissection
<b>FGS</b>	Fluorescence-guided surgery
<b>FITC</b>	Fluorescein isothiocyanate
<b>FLI</b>	Fluorescence imaging
<b>FOV</b>	Field of view
<b>FP7</b>	Seventh framework programme

<b>FWHM</b>	Full width half maximum
<b>GA</b>	Gambogic acid
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein
<b>GLUT</b>	Glucose receptor-1
<b>GMP</b>	Good manufacturing practices
<b>HIPEC</b>	Hyperthermic intra-peritoneal chemotherapy
<b>H&amp;E</b>	Hematoxylin and Eosin
<b>H&amp;N</b>	Head and neck
<b>H2020</b>	Horizon 2020, funding programme
<b>ICD</b>	Immunogenic cell death
<b>ICG</b>	Indocyanine green
<b>iCT</b>	Intraoperative computed tomography
<b>IGS</b>	Image-guided surgery
<b>IGOS</b>	Image-guided oncologic surgery
<b>IHC</b>	immunohistochemistry
<b>iMRI</b>	Intraoperative magnetic resonance imaging
<b>ioUS</b>	Intraoperative ultrasound
<b>logP</b>	Log octanol-water partition coefficient, Lipophilicity
<b>MALDI</b>	Matrix assisted laser desorption/ionisation
<b>MIP</b>	Maximum intensity projection
<b>MR</b>	Magnetic resonance
<b>MRI</b>	Magnetic resonance imaging
<b>mRNA</b>	Messenger Ribonucleic Acid
<b>MSCA</b>	Marie Skłodowska-Curie actions
<b>MSOT</b>	Multispectral optoacoustic tomography
<b>MTS</b>	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)
<b>Mw</b>	Molecular weight
<b>N/T</b>	Normal to tumor
<b>NACA</b>	Necrosis avid contrast agent
<b>NCI</b>	National Cancer Institute
<b>NHS</b>	N-Hydroxysuccinimide
<b>NIH</b>	National Institutes of Health
<b>NIR (F)</b>	Near- infrared fluorescence
<b>NL</b>	Not labeled
<b>OA</b>	Optoacoustic imaging
<b>OCT (1)</b>	Optical coherence tomography
<b>OCT (2)</b>	Optimum cutting temperature
<b>OR</b>	Operating room
<b>OSEM</b>	Ordered subset expectation maximization
<b>PA</b>	Photoacoustic
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered saline
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction

<b>PDAC</b>	Pancreatic ductal adenocarcinoma
<b>PDT (1)</b>	Photodynamic therapy
<b>PDT (2)</b>	Population doubling time
<b>PEG</b>	Polyethylene glycol
<b>PET</b>	Positron emission tomography
<b>PI</b>	Propidium iodide
<b>POSEM</b>	Pixel-based ordered subset expectation maximization
<b>PS</b>	Phosphatidylserine
<b>qPCR</b>	Realtime PCR
<b>QSAR</b>	Quantitative Structure Activity Relations
<b>R0 resection</b>	Radical resection
<b>R1 resection</b>	Irradical resection
<b>RA</b>	Radioactivity
<b>RECIST</b>	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
<b>REIMS</b>	Rapid evaporative ionization mass spectrometry
<b>REMARK</b>	REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies
<b>RIP-1</b>	Receptor-Interacting Protein 1
<b>ROI</b>	Region of interest
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>RS</b>	Raman spectroscopy
<b>RT</b>	Room temperature
<b>RT</b>	Radiation therapy
<b>S/B</b>	Signal-to-background
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<b>SEM</b>	Standard error of the mean
<b>SGC</b>	Small gamma camera
<b>SLN</b>	Sentinel lymph node
<b>SNR</b>	Signal to noise ratio
<b>SOP</b>	Standard operating protocol
<b>SPECT</b>	Single-photon emission computed tomography
<b>Sta</b>	Staurosporine
<b>SUV</b>	Standard uptake value
<b>TBR</b>	Tumor to background ratio
<b>TCO</b>	Trans-Cyclooctene
<b>TMA</b>	Tissue microarray
<b>TNM</b>	Tumor node metastasis classification of malignant tumors
<b>TNT</b>	Tumor necrosis targeting
<b>TOF</b>	Time of flight
<b>TUNEL</b>	TdT-mediated dUTP Nick-end labelling
<b>US</b>	Ultrasound
<b>Z</b>	Electric charge
<b><math>\lambda_{abs}</math></b>	Absorbance wavelength
<b><math>\lambda_{em}</math></b>	Emission wavelength