

Eindverslag Stichting Prof. Michaël-van Vloten Fonds.

Onderzoeker: Daan Linders, arts-onderzoeker Heelkunde, LUMC

Onderzoekperiode: Jul-aug '24 (Massachusetts General Hospital en Harvard Medical School)

Onderzoeksproject: Testen van topicaal aan te brengen fluorescente stoffen voor tumorvisualisatie



1. Inleiding:

Dit onderzoeksproject had als doel de preklinische evaluatie van recent in het MGH ontwikkelde fluorescente stoffen, die tumor specifieke visualisatie mogelijk maken na topicale toediening. De fluorescente stoffen, die pas fluorescent worden in een zure omgeving (een universeel kenmerk van solide tumoren), hebben potentie om de effectiviteit van fluorescentie-geleide chirurgie te verbeteren. Dit vergroot de kans op volledige tumorresectie en kan de noodzaak voor aanvullende behandelingen, zoals re-operaties of chemotherapie, verminderen.

2. Voortgang en uitgevoerde werkzaamheden:

Na een succesvolle start van het project, waarbij de muismodellen met menselijke kankercellijnen (zoals borst-, ovarium- en darmkanker) al waren voorbereid, hebben we het onderzoek in vier hoofdfasen uitgevoerd:

Toediening en beeldvorming:

De fluorescente stoffen zijn topicaal aangebracht op zowel tumor- als omliggend gezond weefsel in muizen met verschillende typen tumoren. Met behulp van het FLARE-camera systeem konden we de fluorescente stoffen direct na toediening visualiseren. Tumoren werden binnen enkele minuten zichtbaar.

Weefselpenetratie en diffusieonderzoek:

Naast de visualisatie van tumoren hebben we uitgebreid onderzoek gedaan naar de diffusie van de fluorescente stoffen in gelmodellen en in kippenborst. Dit onderzoek was essentieel voor het bepalen van de effectiviteit van de stoffen bij de intra-operatieve beoordeling van resectiemarges. De stoffen drongen adequaat door, wat bevestigt dat ze ook geschikt kunnen zijn voor gebruik bij dieper gelegen tumoren.

Optimalisatie van toediening:

Tijdens de experimenten hebben we de incubatietijd en concentraties van de stoffen geoptimaliseerd voor een maximale fluorescentie en duidelijke afbakening van tumorweefsel. Deze verfijning is gebaseerd op de eerste observaties, waarbij verschillende concentraties en tijden werden getest om een optimaal fluorescentiesignaal te verkrijgen.

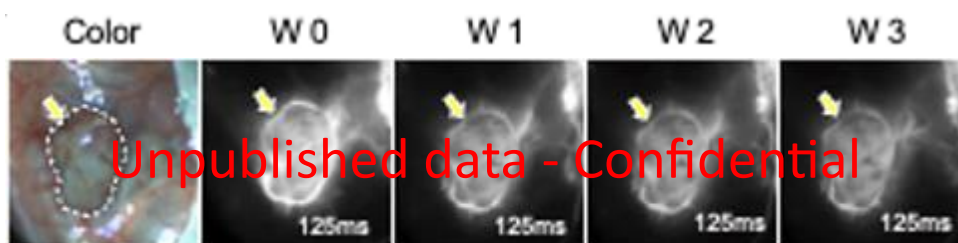
Experimenten op verschillende tumortypes:

Gedurende het project zijn de fluorescente stoffen succesvol getest op muismodellen met verschillende typen tumoren, waaronder borstkanker, eierstokkanker en darmkanker. De stoffen vertoonden bij al deze typen tumoren een sterke, specifieke activatie in het tumorweefsel.

3. Resultaten en bevindingen:

Tumor specifieke activatie:

De fluorescente stoffen toonden een duidelijke, tumor-specifieke activatie in de verschillende muismodellen. Gezond weefsel bleef grotendeels niet-fluorescent, wat bevestigt dat de stoffen effectief zijn in het markeren van tumorgrenzen tijdens chirurgie (**Figuur 1**).



Figuur 1: Fluorescent signaal in subcutane colon tumor (muis) na topicaal aanbrengen pH-activeerbare fluorescente stof. W = wasstap.

Weefselpenetratie en diffusie:

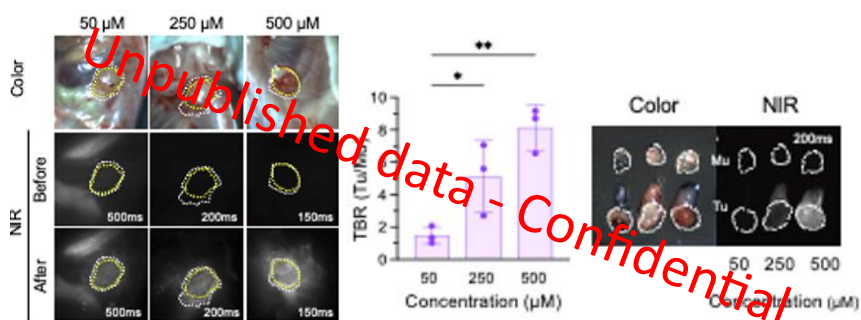
Het onderzoek naar de weefselpenetratie liet zien dat de fluorescente stoffen tot een aantal millimeters penetreren, wat cruciaal is voor het bepalen van resectiemarges tijdens een operatie. De diffusie van de stoffen was adequaat in zowel het gelmodel als het kippenborst model, met name in zure toestand (**Figuur 2**), wat aangeeft dat de stoffen in klinische situaties effectief kunnen zijn bij het opsporen van tumorresidu na resectie. Wel is het belangrijk dat de penetratiediepte ook in humaan weefsel bepaald wordt.



Figuur 2: Penetratie van pH-activeerbare fluorescente stof in gel (boven) en in kippenborst (onder).

Optimalisatie van toediening:

We hebben de juiste balans gevonden tussen incubatietijd en concentratie van de fluorescente stoffen, wat resulteerde in een optimale fluorescentie van tumoren 2 minuten na toediening en 3 wasstappen met PBS, met een concentratie van 500 μM (**Figuur 3**). Dit maakt de stoffen praktisch toepasbaar in een chirurgische setting.



Figuur 3: Verschillende concentraties van de fluorescente stof.

4. Uitdagingen en oplossingen:

Vals-positief signaal:

Tijdens enkele experimenten zagen we lichte fluorescentie in gezond weefsel (vals-positief signaal). Dit werd grotendeels opgelost door na toediening van de stoffen te spoelen met zoutoplossing, waardoor de niet-geactiveerde stoffen werden verwijderd en enkel de geactiveerde, in de tumor opgenomen stoffen zichtbaar bleven.

Beperkte klinische translatie in muismodellen:

Hoewel de muismodellen een belangrijke stap zijn in de preklinische evaluatie, blijft de vertaling naar menselijke tumoren essentieel. Muismodellen kunnen verschillen in tumoreigenschappen en biologie ten opzichte van menselijke tumoren. Daarom zullen verdere experimenten op menselijk tumorweefsel nodig zijn om de klinische relevantie volledig te beoordelen.

5. Conclusie:

Het project heeft veelbelovende resultaten opgeleverd. De fluorescente stoffen lieten een sterke tumor specifieke activatie zien, met een goede weefselpenetratie en minimalisering van vals-positieve signalen. De stoffen zijn succesvol getest op verschillende typen tumoren en hebben hun potentieel bewezen voor gebruik bij fluorescentie-geleide chirurgie. De optimalisatie van de applicatieparameters biedt een solide basis voor verdere klinische toepassingen.

6. Vervolgstappen:

Het vervolg van het onderzoek zal zich richten op het *ex vivo* testen van de fluorescente stoffen op menselijk tumorweefsel in Nederland. Dit zal de volgende cruciale stap zijn in de klinische translatie van deze technologie. Daarnaast zal er verder worden gewerkt aan het minimaliseren van eventuele vals-positieve signalen.

Met de opgedane kennis en ervaring tijdens dit werkbezoek, zijn we goed voorbereid om deze technologie verder te ontwikkelen richting klinische trials. Het is onze hoop dat deze innovatieve fluorescente stoffen in de toekomst een belangrijke bijdrage kunnen leveren aan het verbeteren van de uitkomsten voor patiënten die een chirurgische resectie van een tumor ondergaan.