

## Lab-on-a-Chip voor kankeronderzoek

F. WOLBERS<sup>1</sup>, H.R. FRANKE<sup>2</sup>, A. van den BERG<sup>1</sup> en I. VERMES<sup>1,3</sup>

### Inleiding

Hoewel de overlevingskansen van kanker de afgelopen jaren meer dan verdubbeld zijn, is kanker voor het eerst in Nederland doodsoorzaak nummer 1, daarmee hart- en vaatziekten achter zich latend. Dit komt doordat de sterftcijfers voor kanker veel langzamer dalen dan die voor hart- en vaatziekten. Het verbeteren van het huidige kankertherapie regime kan een belangrijke rol spelen in het verlagen van deze sterftcijfers. Tegenwoordig worden kankerpatiënten behandeld op basis van tumorkarakteristieken (locatie, grootte en histologie) evenals bijvoorbeeld de leeftijd van de patiënt. Deze behandelingsprotocollen zijn vastgesteld in grote gerandomiseerde trials. Echter, het is bekend dat vanwege genetische variatie iedere patiënt specifiek reageert op een bepaald medicijn, waardoor dit 'one-size-fits-all'-principe niet toereikend is. Het kan dus zijn dat de arts een medicijn voorschrijft, waarvan na enkele weken blijkt dat dit niet het gewenste effect heeft gehad. Voor de patiënt is er dan kostbare tijd verloren gegaan, en in het ergste geval kan zelfs het ziektebeeld verslechterd zijn. Idealiter zou de arts gebruik willen maken van een simpele predictieve test waarmee van te voren kan worden vastgesteld of een bepaald medicijn bij deze patiënt zal aanslaan of niet. Met andere woorden: zorg op maat ('het juiste medicijn in de juiste concentratie voor de juiste patiënt'). De BIOS groep ontwikkelt zo'n simpele test, in de vorm van een microfluidische Lab-on-a-Chip (1, 2). Dit systeem kan in detail het effect van verschillende medicijnen analyseren, gebruikmakend van maar een kleine hoeveelheid tumorcellen (3). Onze focus ligt op borstkanker (4). Voor zorg op maat moet gebruik gemaakt worden van tumorweefsel uit de patiënt, echter in deze eerste experimenten, om de werking van de chip te analyseren, is de oestrogenreceptorpositieve invasieve lobulaire adenocarcinoomcellijn MCF-7 gebruikt. Hoewel resultaten uit in-vitro-experimenten niet direct en uniform vertaald kunnen worden naar de in-vivosituatie, heeft de in-vitroaanpak voor het bepalen van de sensitiviteit en resistentie van medicijnen op tumorcellen grote potentie om zo patiënten ineffektieve behandelingen te besparen. De voordelen van deze chip boven de bestaande technieken zijn veelzijdig. Vooral de fluidica zorgt voor een continue toevoer van medicijn naar de cellen en vergemakkelijkt 'high-throughput' dosis-responsanalyse, waarvoor maar een beperkte hoeveelheid cellen nodig is. De chip gebruikt

in deze experimenten bestaat nog uit 1 kweekkamer en 1 toevoerkanaal voor het analyseren van één medicijn in één concentratie, maar door het aantal kweekkamers en toevoerkanaalen te vergroten kan 'high-throughput' analyse bewerkstelligd worden. Verder evenaren de microfluidische dimensies de grootte van cellen, wat gedetailleerde celanalyse mogelijk maakt en aantoonde of een medicijn specifiek gericht is tegen z'n target, de tumorcellen. Dit zal de ontwikkeling van medicijnen, en dus de kankerdiagnostiek bevorderen. Uiteindelijk is ons doel een Lab-on-a-Chip te ontwikkelen dat in de kliniek kan worden ingezet om zo kankerpatiënten beter te behandelen en hiermee de kwaliteit van leven sterk te verbeteren en sterftcijfers te verlagen.

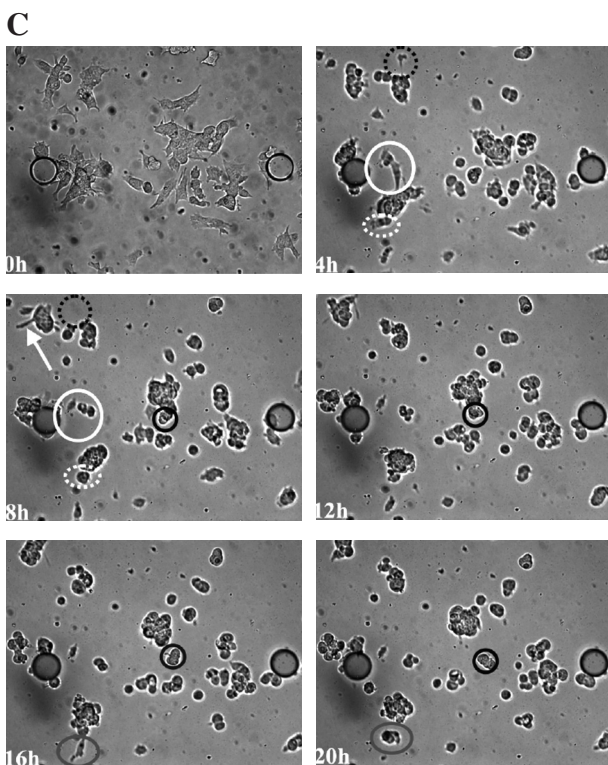
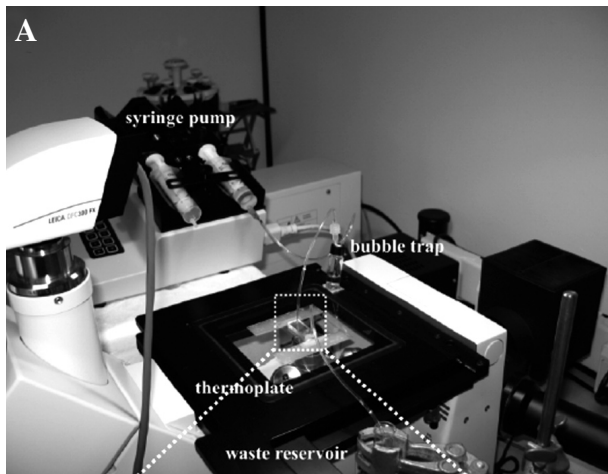
### Methoden

De Lab-on-a-Chip bestaat uit een hoofdkanaal dat uitmond in een kleine kweekkamer (0,5 cm<sup>2</sup>; figuur 1A/B) (5). Vanwege het kleine oppervlak zijn er per analyse maar weinig cellen nodig. De diepte van 44 µm maakt gedetailleerde celanalyse mogelijk. De chip is gemaakt van PDMS (polydimethylsiloxaan). PDMS is biocompatibel en gasdoorlatend, waardoor PDMS uitermate geschikt is voor celanalyses. De PDMS-chip wordt afgedicht met een microscoopglasje. MCF-7-cellen werden 24 h voordat het betreffende medicijn werd toegediend, in de chip gebracht, voor een goede celadhesie aan het glas. De volgende medicijnen zijn getest: tumornecrosisfactor(TNF)-α in combinatie met de eiwitsyntheseremmer cycloheximide (CHX), de kinaseremmer staurosporine (SSP) en het chemotherapeutikum doxorubicine (DOX). Via real-time optische analyse werd bepaald of het toegediende medicijn in staat is apoptose te initiëren (6, 7). De resultaten werden gekwantificeerd door de veranderingen in celmorfologie en cellulaire oppervlaktebezetting te meten. Hiervoor werd er gefocused op een bepaald gebied in de kweekkamer (zichtveld microscoop) en in de tijd bepaald welk percentage deel van het zichtveld in beslag werd genomen door MCF-7-cellen.

**Resultaten.** MCF-7-cellen vertonen in afwezigheid van een medicijn een aggregaatachtige morfologie, die kenmerkend is voor tumoren (figuur 1C, t=0h). Als respons op TNF-α/CHX veranderde deze karakteristieke morfologie. MCF-7-cellen krompen en rondde zich, wat aangeeft dat de apoptotische cascade geactiveerd was (figuur 1C). Aankleuring met de fluorescente dyes Annexine V en propidiumiodide aan het eind van de incubatieperiode bevestigde deze aanname. Verder bewogen MCF-7-cellen actief over het oppervlak ('filopodia') (figuur 1C, pijl) en werden er cellen en celfragmenten (apoptotische lichaampjes) afgesnoerd (figuur 1C, cirkels). Het chemotherapeutikum DOX (1 µM) liet vergelijkbare morfologische veranderingen zien. Hiermee

BIOS, Lab-on-a-Chip Groep, MESA<sup>+</sup> Instituut voor Nanotechnologie, Universiteit Twente, Enschede<sup>1</sup>, Afdeling Gynaecologie en Afdeling Klinische Chemie<sup>2</sup>, Medisch Spectrum Twente, Enschede<sup>3</sup>

E-mail: F.Wolbers@ewi.utwente.nl



**Figuur 1.** A. Experimentele set-up. B. Focus op Lab-on-a-Chip-systeem. Het totale volume van de chip is 4,4µl. C. Lichtmicroscopie in de tijd van MCF-7-cellen geïncubeerd met 3 nM TNF- $\alpha$ /50 µM CHX (continue flow van 1 µl/min). Gedurende de optische analyse is de focus op een klein gedeelte van de kweekkamer (zichtveld microscoop). De verschillende cirkels laten het afsnoeren van cellen en celfragmenten zien, de pijl verwijst naar het lokaal stretchen van MCF-7-cellen ('filopodia'), waardoor de kolonie over het celoppervlak kan migreren. Vergroting is 20x.

gepaard veroorzaakten TNF- $\alpha$ /CHX en DOX in de tijd een verlaging in de oppervlaktebeziging met een factor 2 ten opzichte van onbehandelde cellen (i.e., MCF-7 krompen en lieten los van het oppervlak (anoikis)) en een stijging in het aantal ronde cellen (factor 4-6 t.o.v. onbehandeld). Echter SSP in de gebruikte concentratie van 5 µM liet een andere vorm van celdood zien, namelijk necrose, waardoor de celinhoud zich over het chipoppervlak verspreidde. SSP demonstreerde daarom ook geen duidelijke veranderingen in oppervlaktebeziging en aantal ronde cellen. Deze resultaten laten zien dat in deze chip medicijnspecifieke responses in real time op individueel celniveau kunnen worden aangetoond. Bovendien, wat kenmerkend is voor Lab-on-a-Chip, zijn er meerdere technieken geïntegreerd in één systeem, in ons geval celkweek, drugscreening en apoptosedetectie en -analyse. Verder tonen deze resultaten aan dat apoptose op een heterogene manier in een populatie cellen ontstaat, wat pleit voor gedetailleerde analyse op individueel celniveau.

### Conclusie

De hier gepresenteerde resultaten laten de potentie zien van dit Lab-on-a-Chip-systeem voor kankeronderzoek. De chip in de huidige vorm is in staat het effect van verschillende medicijnen in real time op individueel celniveau te bepalen. Echter, gebruik in de kliniek vereist aanpassingen. Door de insertie van elektrodes, zal optische analyse plaats maken voor elektrische (impedantie)metingen. Naast dat elektrische metingen beter kwantificeerbaar zijn, wordt high-throughputanalyse (meerdere kweekkamers en toevoerkanalen) mogelijk. Daarnaast zal de overstap naar humaan borsttumorsewefsel een betere vertaalslag naar de in-vivosituatie geven en een goede stap richting zorg op maat zijn. Dit tumorweefsel, verkregen via biopsie, zal off-chip worden bewerkt tot individuele cellen en op chip gekweekt en gekarakteriseerd (tumor- vs. gezonde cel) worden. Uiteindelijk is ons doel dat deze chip de arts een extra mogelijkheid biedt, naast de bestaande technieken, om op een snelle en simpele manier een keuze te maken welke therapie het beste past bij de betreffende patiënt. Dit zal het huidige kankertherapieregime sterk verbeteren en daarmee voor de patiënt de kwaliteit van leven.

### Referenties

1. Andersson H, van den Berg A. Microfluidic devices for cellomics: a review. *Sensors Actuators B* 2003; 92: 315-325.
2. Andersson H, van den Berg A. Microtechnologies and nanotechnologies for single-cell analysis. *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15: 44-49.
3. Wolbers F. Thesis 2007; ISBN: 987-90-365-2499-5.
4. Jansen GH, Franke HR, Wolbers F, Brinkhuis M, Vermes I. Effects of fulvestrant alone or combined with different steroids in human breast cancer cells in vitro. *Climacteric* 2008; 11: 315-321.
5. Komen J, Wolbers F, Franke HR, Andersson H, Vermes I, van den Berg A. Viability analysis and apoptosis induction of breast cancer cells in a microfluidic device: effect of cytostatic drugs. *Biomed Microdev* 2008; 10: 727-737.
6. Vermes I, Haanen C. Apoptosis and programmed cell death in health and disease. *Adv Clin Chem* 1994; 31:177-246.
7. Wolbers F, Haanen C, Andersson H, van den Berg A, Vermes I. "Lab-On-Chips for Cellomics: Micro and Nanotechnologies for Life Science", ed. H. Andersson and A. van den Berg, Kluwer Academic Publishers 2004.