

SAMENVATTING

Glioblastoma (GB) zijn infiltratieve, heterogene hersentumoren, gekenmerkt door een hoge cellulariteit, structurele abnormaliteiten van de kern, microvasculaire proliferatie en centrale tumor necrose. GB patiënten hebben een overlevingskans van 5% over 5 jaar en een mediane overleving van slechts 6 – 12 maanden. Bij nieuw gediagnosticeerde GB wordt volgens het Stupp protocol gestreefd naar een volledige chirurgische resectie, gevolgd door radio- en chemotherapie. Ondanks de ontwikkeling van nieuwe therapieën zoals immunotherapie werd er nagenoeg geen progressie gezien de laatste tien jaar in de behandeling van deze tumoren.

Bij diagnose speelt beeldvorming een belangrijke rol bij de discriminatie tussen benigne laesies en hersentumoren. Computed tomography (CT) en magnetic resonance imaging (MRI) zijn de twee meest gebruikte beeldvormingsmodaliteiten om anatomische informatie te verschaffen. Een nadeel aan MR-beeldvorming is dat therapie gerelateerde alteraties zoals inflammatie en stralingsnecrose een aan tumor gelijkaardig beeld kunnen vertonen. Functionele informatie kan worden verkregen via positron emission tomography (PET), waarbij gebruik wordt gemaakt van radioactieve moleculen om specifieke metabolische en moleculaire processen in beeld te brengen.

Het gefluoreerde glucose analog, 2-[¹⁸F]Fluoro-2-deoxy-D-glucose ([¹⁸F]FDG), is het meest gebruikte radiofarmacon bij klinische PET beeldvorming in oncologie. Het verhoogd glucosemetabolisme van gezond hersenweefsel resulteert echter in een ongunstig tumor-hersencontrast en bijgevolg een onduidelijke aflijning van tumorweefsel. Radioactief gelabelde aminozuur tracers vertonen een gunstiger tumor-hersencontrast door een lagere opname in gezond hersenweefsel. Het opnamemechanisme van de meest gebruikte aminozuur tracer O-(2-[¹⁸F]Fluoroethyl)-L-tyrosine ([¹⁸F]FET) blijft echter onduidelijk waardoor aspecifieke opname in benigne weefsels wordt opgemerkt door reactieve astrocytose.

De L-type amino acid transporters (LAT) zijn een groep natrium onafhankelijke membraantransporters met vier isovormen: LAT1, LAT2, LAT3 en LAT4. Aangezien LAT1 tot overexpressie komt in verscheidene humane tumoren en er een correlatie is met maligne proliferatie van glioma, vertegenwoordigt LAT1 een veelbelovende target voor zowel beeldvorming als therapie.

In onderzoek worden diermodellen beschouwd als een belangrijke hoeksteen voorafgaand aan klinische experimenten. In neuro-oncologie kan niet-invasieve *in vivo* beeldvorming van tumoren waardevol zijn voor diagnostische en/of therapeutische doeleinden. Naast de ontwikkeling van

preklinische beeldvormingsmodaliteiten, heeft de ontwikkeling van small animal research platforms (SARRP) de deur geopend naar gepersonaliseerde geneeskunde in radiotherapie. In dit proefschrift zijn we geïnteresseerd in het concept van dose painting waarbij een niet-uniforme dosis wordt gegeven aan het GB op basis van de informatie verkregen door PET. Dose painting kan worden uitgevoerd aan de hand van twee verschillende technieken: dose painting by contours (DPBC) en dose painting by numbers (DPBN). Afhankelijk van de techniek die gebruikt wordt om dose painting uit te voeren, wordt een dosis gegeven aan een set van subvolumes (DPBC) of op voxelniveau (DPBN).

In overeenstemming met de titel van dit proefschrift, exploratie van diagnostische en therapeutische mogelijkheden van LAT1-specifieke PET beeldvorming in glioblastoma, wordt een driedelige doelstelling vooropgesteld in hoofdstuk 3. Ten eerste willen we de haalbaarheid evalueren van een GB proefdiermodel om PET gebaseerde dose painting toe te passen en de therapierespons op te volgen. Het tweede doel omvat de ontwikkeling van een ^{18}F gelabeld fenylalanine analoog voor PET beeldvorming dat een gunstigere affiniteit en specificiteit vertoont voor de LAT1 transporter dan [^{18}F]FET. Tot slot zijn we geïnteresseerd hoe de verbeterde *in vitro* kenmerken *in vivo* tot uiting komen.

Het eerste deel van dit proefschrift geeft de nodige achtergrondinformatie over GB en moleculaire beeldvorming. Hoofdstuk 1 geeft een algemene inleiding over GB, aminozuurtransporters, preklinische GB modellen en veelvuldig gebruikte moleculaire beeldvormingsmodaliteiten in de neuro-oncologie (CT, MRI, SPECT & PET). Hoofdstuk 2 behandelt de opbouw en productie van radiofarmaca. Hierbij wordt in de eerste plaats aandacht besteed aan ^{18}F radiochemie. Vervolgens wordt een overzicht gegeven van de SPECT en PET tracers gebruikt voor GB beeldvorming met een speciale focus op aminozuur radiofarmaca. Tenslotte worden in hoofdstuk 3 een aantal onderzoeksvragen gesteld die in de daaropvolgende experimentele hoofdstukken worden onderzocht.

In hoofdstuk 4 wordt een orthotopisch allograft F98 GB ratmodel beschreven dat gebruikt wordt in een dose painting experiment. De hypothese was dat PET gebaseerde bestraling gericht op de meest metabolisch actieve (met [^{18}F]FET) of radiotherapie resistente/hypoxische (met [^{18}F]Fluoroazomycine arabinoside ([^{18}F]FAZA)), tumorregio zou kunnen leiden tot een betere lokale tumorcontrole en overleving. Hiervoor werden vier verschillende behandelingsgroepen gedefinieerd op basis van verschillende bestraling doelvolumes ([^{18}F]FET, [^{18}F]FAZA, MRI en een controle groep). Uiteindelijk konden we PET-gebaseerde radiotherapie uitvoeren met het F98 GB ratmodel. Bij het vergelijken van de dosisvolume-histogrammen werd enkel een significant verschil gevonden tussen de D2-waarden. Er konden overigens geen significante verschillen gevonden worden in tumorgroei tussen de verschillende therapiegroepen. Daarentegen kon tussen de actieve therapie en de controlegroep wel

een significant verschil worden gevonden in tumorgroei. In dit hoofdstuk hebben we de haalbaarheid van PET begeleide subvolume boosting van F98 glioblastoma bij ratten aangetoond. Met betrekking tot de tumor respons kon echter geen gunstig effect aangetoond worden. Er zijn bijgevolg verbeteringen nodig zoals de ontwikkeling van hogere resolutie PET systemen en betere radiotracers, om meer dosisgericht de radiotherapie te kunnen uitvoeren bij kleine proefdieren.

In hoofdstuk 5 wordt de synthese en karakterisatie van zes verschillende *ortho*-, *meta*-, *para*-fluoroethyl gesubstitueerde fenylalaninederivaten besproken. Aangezien er tegenstrijdige resultaten zijn verschenen omtrent de preferentiële stereochemie voor binding aan de LAT1 transporter, werden zowel de R als S enantiomeren gesynthetiseerd. Om de stereospecificiteit en de invloed van de aromatische ringmodificatie in te schatten werd de affiniteit (K_i) voor de LAT1 expresserende F98 cellijn bepaald door middel van competitieve *in vitro* assays. Bij beoordeling van de K_i waarden van de L-enantiomeren werd duidelijk dat de positie van het 2-fluoroethyl substituent op de aromatische ring van fenylalanine volgende voorkeur had voor de LAT1 transporter: *ortho* > *meta* > *para*. Met andere woorden, 2FELP bleek de meest gunstige affiniteit te bezitten voor de LAT1 transporter in de F98 GB cellijn. Daarom werd er geopteerd om deze molecule verder te ontwikkelen en te evalueren in de volgende hoofdstukken.

Hoofdstuk 6 behandelt de radiosynthese van 2- ^{18}F FELP die een S_N2 nucleofiele substitutie met ^{18}F fluoride omvatte op een getosyleerde beschermde precursor, gevolgd door een zure deprotectiestap en opzuivering door middel van high performance liquid chromatography (HPLC). Bovendien werd deze radiosynthese succesvol geïmplementeerd op een Synthra RN plus module zodat productie van grotere hoeveelheden mogelijk werd om eventueel later te kunnen overgaan tot klinische producties. Stabiliteitsstudies onthulden geen radioactieve metabolieten binnen 360 min na het beëindigen van de radiosynthese waardoor 2- ^{18}F FELP geschikt is voor *in vitro* en *in vivo* experimenten. Door middel van opname-experimenten met verschillende blokkers kon geconcludeerd worden dat de LAT1 transporter meer betrokken is bij de opname van 2- ^{18}F FELP dan bij de ^{18}F FET-opname. Een eerste *in vivo* experiment in een orthotopisch F98 GB ratmodel kon aantonen dat 2- ^{18}F FELP niet inferieur is aan ^{18}F FET.

In hoofdstuk 7 werden twee verschillende diermodellen gebruikt. Als eerste werd een stralingsnecrose/GB ratmodel ontwikkeld om het vermogen van 2- ^{18}F FELP te evalueren om deze twee letsels te onderscheiden in vergelijking met ^{18}F FET en ^{18}F FDG. Met behulp van een muis inflammatie model werd nagegaan of 2- ^{18}F FELP aanleiding zou geven tot een vals positief PET signaal. Semi-kwantitatieve analyse van beide experimenten toonde aan dat 2- ^{18}F FELP superieur was aan

[¹⁸F]FET in discriminatie GB van RN en niet werd opgenomen in de inflammatielaesie. Uit deze experimenten kunnen we besluiten dat voor differentiële diagnose tussen tumorherval en RN 2-[¹⁸F]FELP PET het meest aangewezen is.

In hoofdstuk 8 wordt een antwoord gegeven op de verschillende onderzoeksvragen vooropgesteld in hoofdstuk 3. De internationale context, relevantie en toekomstperspectieven worden behandeld in hoofdstuk 9.