

Door: Michel Hu ^{1,2}, Kim Rijkers ^{3,4}, Jim Dings ^{3,4}, Olaf Schijns ^{3,4}, Arn van den Maagdenberg ^{1,2}, Regina Luttge⁵, Govert Hoogland (g.hoogland@maastrichtuniversity.nl) ^{3,4}, Jean-Philippe Frimat (j.p.m.s.frimat@lumc.nl) ^{1,2,3,5}
¹Humane Genetica en ²Neurologie, Leids Universitair Medisch Centrum; ³Neurochirurgie, School for Mental Health and Neuroscience en ⁴Academisch Centrum voor Epileptologie, MUMC+; ⁵Neuro-Nanoscale Engineering, Mechanical Engineering/Microsystems, Institute for Complex Molecular systems, Technische Universiteit Eindhoven

Netwerkactiviteit in een gekweekt hersenbiopt: Hoe analyseer je dat?

Analyse van grote hoeveelheden data om daarmee verbanden te kunnen leggen, bijvoorbeeld verbanden binnen een netwerk van neuronen, is door recente technische ontwikkelingen (snellere computers, ontwikkeling van algoritmen, etc.) toegankelijker geworden voor onderzoekers. Onderstaande beschrijft een systeem voor de acquisitie en analyse van netwerkactiviteit in een gekweekt hersenbiopt.

Big data

Het verzamelen van steeds grotere hoeveelheden digitale data neemt snel toe, bijvoorbeeld omdat de opslag van gegevens de afgelopen jaren steeds goedkoper is geworden. Neurofysiologische signaalmetingen aan mensen, dieren en *in vitro* hersenplakjes resulteren door de hoge spatiële en temporele resolutie –afhankelijk van de duur van de signalen– al snel in vele gigabytes aan data.

Hierdoor is er in toenemende mate behoefte aan snelle en efficiënte verwerking van zulke data (Amado et al., 2018). Voor preklinisch onderzoek bestaan echter nauwelijks protocollen om grote hoeveelheden elektrofysiologische data op een systematische wijze te analyseren op netwerkverbanden. Voor een deel komt dit doordat de methoden in wetenschappelijke publicaties onvolledig of niet duidelijk zijn gepubliceerd. De ontwikkeling van een gebruiksvriendelijk systeem waarmee op een gestandaardiseerde wijze grote hoeveelheden elektrofysiologische data kunnen worden verwerkt is van belang voor preklinisch epilepsieonderzoek.

Alternatief voor dierexperimenteel onderzoek

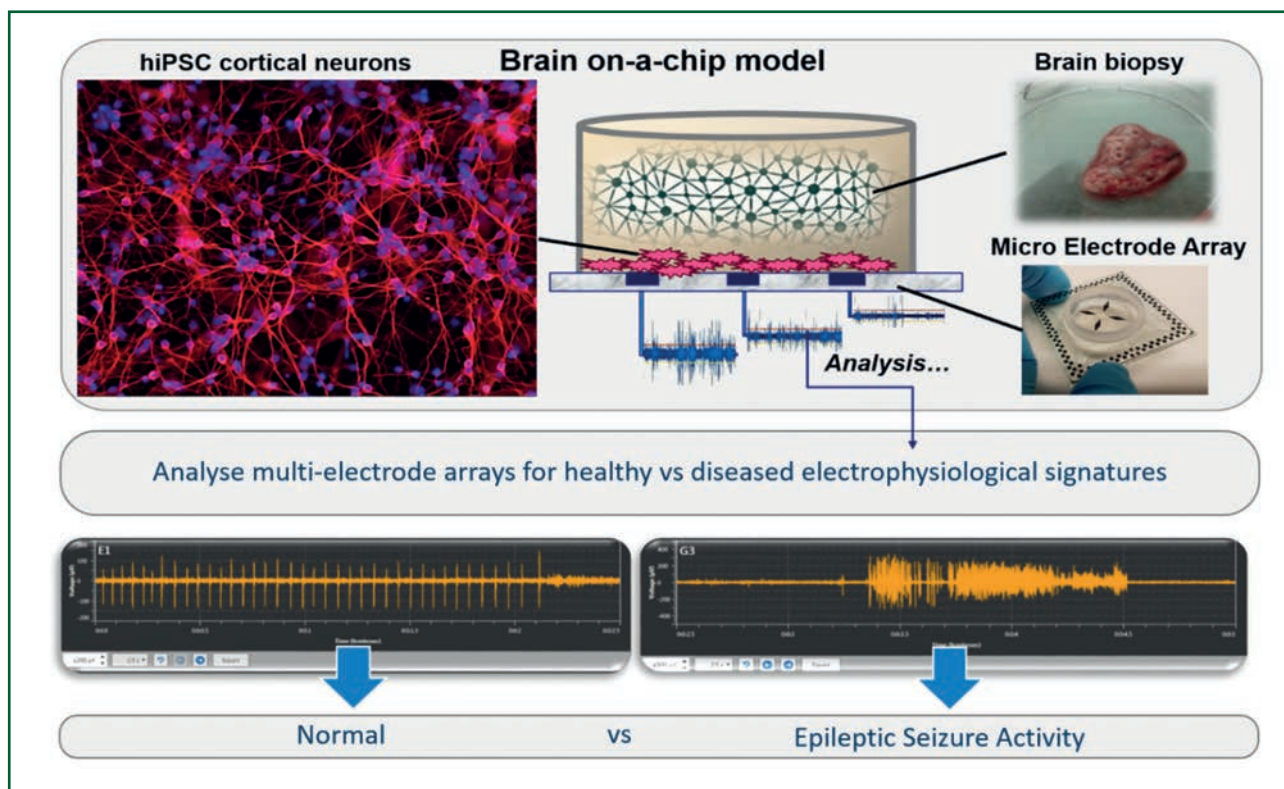
Preklinisch epilepsieonderzoek maakt traditioneel gebruik van proefdiermodellen. Echter, door een toenemend maatschappelijk debat over de noodzaak van het gebruik van proefdieren voor medisch onderzoek is er steeds meer belangstelling voor de ontwikkeling van alternatieve modellen. Voorbeelden daarvan zijn het gebruik van stamcellen van mensen (met name *human induced pluripotent stem cells*; hiPSC) en het kweken van organen (Takahashi & Yamanaka, 2006; Hubrecht & Carter, 2019). Een tweede reden om niet-dierlijke modellen te ontwikkelen is dat ongeveer

90% van het onderzoek naar nieuwe geneesmiddelen in de klinische trial fase faalt, terwijl resultaten uit voorafgaand dierexperimenteel onderzoek juist de aanleiding waren voor een trial (Akhtar, 2015). Een voorwaarde voor de nieuwe modellen is daarom dat ze een betere externe validiteit hebben dan de bestaande modellen.

De hiPSC cellen kunnen op verschillende manieren worden verkregen. Cellen van een patiënt, bijvoorbeeld uit een huidbiopt, kunnen in het lab worden omgezet naar hiPSCs, die daarna in vrijwel elk weefselspecifiek celtype kunnen worden gedifferentieerd, gekweekt en bestudeerd. Bij een eventuele genetische oorzaak van een aandoening kan dan worden onderzocht wat het effect van de genmutatie is op het functioneren van weefselspecifieke cellen. Door gedifferentieerde weefselspecifieke cellen onder speciale kweekomstandigheden in een externe 3D-structuur te kweken, kan zelfs een orgaan worden nagebootst. Hoewel veel van deze modellen zich nog in de ontwikkel-/validatie fase bevinden, kunnen ze op langetermijn mogelijk bijdragen aan het efficiënt *ex vivo* testen van een patiëntspecifieke behandeling. In Nederland bestaan verschillende consortia, zoals het *human organ and disease model technologies* (hDMT; <https://www.hdmt.technology>) en het *Netherlands organ-on-a-chip initiative* (NOCI; <https://noci-organ-on-chip.nl/>), waarin wetenschappers van verschillende disciplines met elkaar samenwerken om de *in vitro* ontwikkeling van verschillende organen mogelijk te maken.

Brain-on-a-chip

In een samenwerking tussen de Technische Universiteit Eindhoven en het Maastricht en Leids Universitair



Figuur 1 Meetsysteem (*brain-on-a-chip*) voor de acquisitie van elektrofyysiologische activiteit uit een gekweekt hersenbiopt. Het systeem is opgebouwd uit:

1. Een chip, een dun schijfje waarop 120 elektroden zijn aangebracht (*micro/multi-electrode array, MEA*).
2. Een laag humane neuronen, gekweekt op de chip (*hiPSC cortical neurons*).
3. Een humaan hersenbiopt van ongeveer 0,15 mm³.

Medisch Centrum wordt een *in vitro* epilepsiemodel ontwikkeld¹, het zogenaamde *brain-on-a-chip* (figuur 1). Hierbij wordt een menselijk neocortex biopt (verkregen tijdens de chirurgische behandeling van epilepsie) geplaatst op een laagje gekweekte neuronen (verkregen door hiPSCs zo te differentiëren dat zij neuronen vormen), die gekweekt zijn op een plaatje met elektroden (*multi-electrode array of MEA*). Een MEA is een veelgebruikte chip waarmee met een hoge spatiële resolutie elektrofyysiologische activiteit in een *in vitro* opstelling kan worden gemeten (Bradley et al., 2018). Door de hoge spatiële resolutie in combinatie met een hoge *sampling* frequentie en de duur van de opname wordt in korte tijd veel data verzameld (ongeveer één GB per minuut). Om deze grote hoeveelheid data snel en gestandaardiseerd te verwerken, werd een softwareprogramma ontwikkeld (MEAtoolbox, <https://github.com/mhyhu/Toolbox>). Hiermee kan via een semi-geautomatiseerd proces de elektrofyysiologische activiteit in tijd en plaats worden geanalyseerd.

Elektrofyysiologische activiteit kan middels een MEA interface worden opgenomen met een *sampling* frequentie van 20 Hz. Tussen de metingen wordt de *brain-on-a-chip*

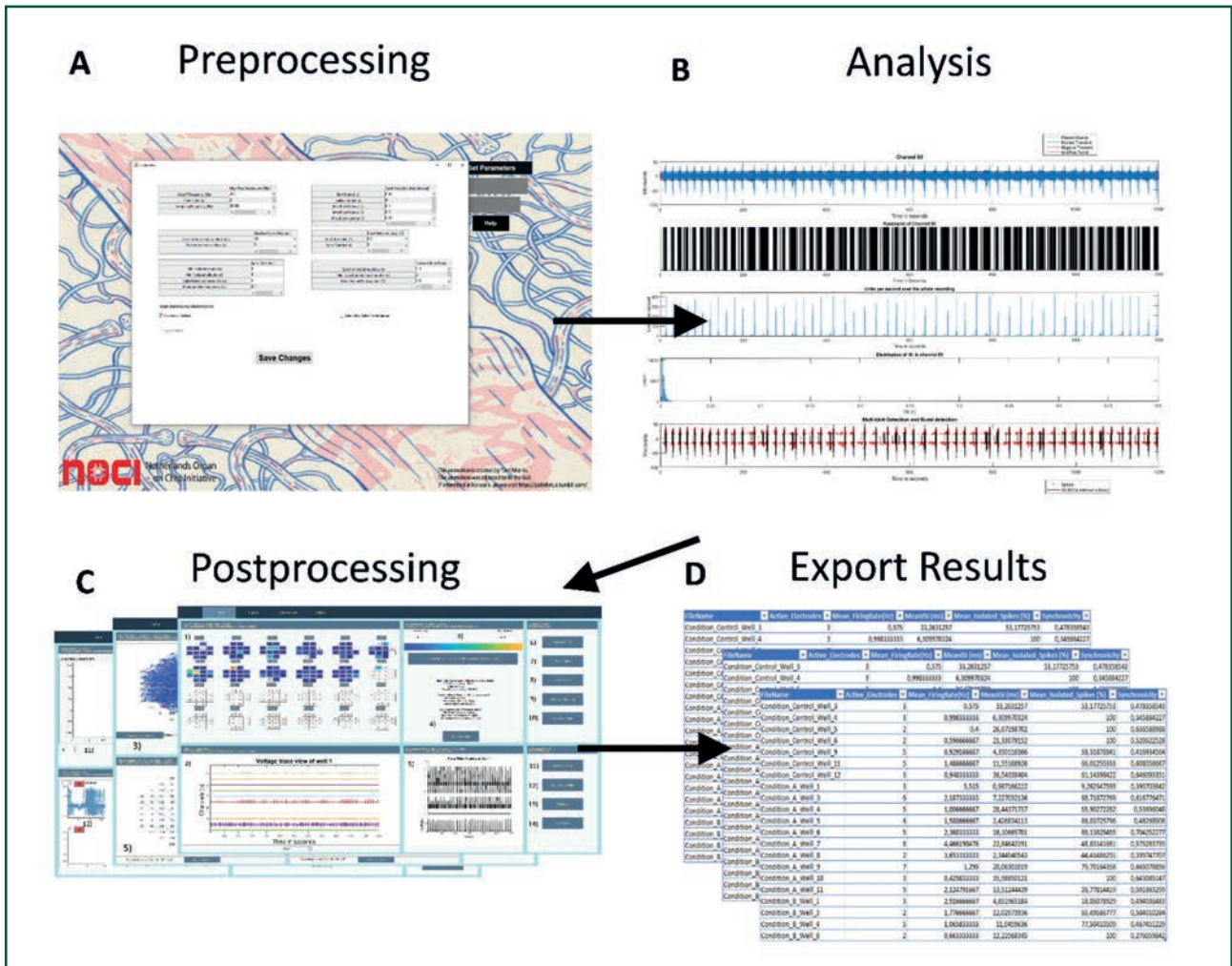
bewaard in een kweekmedium en in een incubator op 37°C gehouden.

MEAtoolbox

De MEAtoolbox (figuur 2A) is ontworpen om in de elektrofyysiologische activiteit *spikes*, *bursts* en *network bursts* te detecteren. Daarnaast is het mogelijk hiermee een analyse van functionele connectiviteit en *spike sorting* uit te voeren. Alle analysemogelijkheden zijn via een *graphical user interface (GUI)* overzichtelijk en intuïtief te gebruiken (figuur 2B), waardoor MEA-data vrijwel direct kunnen worden geanalyseerd. Nadat de signalen zijn geanalyseerd, opent een GUI waarin de gebruiker een controle en eventueel correcties kan uitvoeren (figuur 2C). Ten slotte kunnen de resultaten naar een Excel-bestand worden geëxporteerd (figuur 2D). In deze file worden twintig karakteristieken, waaronder *firing rate*, *burst number and duration*, *inter-spike intervals*, *inter-burst intervals*, *network activity*, opgeslagen.

De eerste experimenten waarin de MEAtoolbox is gebruikt voor de analyse van een *brain-on-a-chip* zoals hierboven beschreven, laten zien dat het hersenbiopt tot zes dagen na het begin van de meting epileptiforme activiteit vertoonde.

¹ Dit werk is financieel mede mogelijk gemaakt door NOCI (NWO subsidie 024.003.001) en ZonMW OffRoad (subsidie 40-08125-98-160).



Figuur 2 Verwerking van elektrofyysiologische activiteit afkomstig van het **brain-on-a-chip** systeem. De **sampling** frequentie van 20 Hz en 120 elektroden leidt tot acquisitie van data van ongeveer één GB per min. De MEAtoolbox is een vrij verkrijgbaar programma (<https://github.com/mhyhu/Toolbox>), waarbij de gebruiker de mogelijkheid heeft de elektrofyysiologische activiteit verkregen met de MEA deels geautomatiseerd te verwerken. Hierbij wordt de data achtereenvolgens voorbereid (A), geautomatiseerd geanalyseerd (B), visueel gecontroleerd en eventueel handmatig gecorrigeerd (C) en tenslotte geëxporteerd naar een Excel-bestand (D).

Zo werd een toename in *fire rate*, *burst rate*, *burst duration*, *coefficient of variation of inter-spike interval* en *network burst durations rate* en een afname van *isolated spikes* en *inter-spike intervals* gemeten, vergelijkbaar met observaties uit een eerdere studie (Bradley et al., 2018). Als controle diende een chip met daarop de neuronale cellaag zonder het hersenbiopt. Het testen van een gezond hersenbiopt bleek niet haalbaar.

Conclusie

De ontwikkelde MEAtoolbox is vrij verkrijgbaar, eenvoudig in gebruik en in staat epileptiforme eigenschappen in een humaan hersenbiopt te detecteren. Daarmee draagt het bij aan standaardisering en een efficiënte verwerking van de grote hoeveelheid data die via een MEA wordt verzameld. Toekomstig onderzoek zal moeten uitwijzen of de algoritmen ook epileptiforme activiteit bij herhaling in dit en in andere modellen kunnen detecteren. Mogelijk is verdere verfijning van de algoritmen nodig om de specificiteit en

sensitiviteit van detectie van epileptiforme activiteit te verbeteren.

Referenties

Akhtar A. (2015) The flaws and human harms of animal experimentation. *Camb Q Health Ethics* 24(4):407–419.
 Amado A, Cortez P, Rita P, Moro S. et al. (2018) Research trends on big data in marketing: A text mining and topic modeling based literature analysis. *Eur Res Manag Bus Econ* 24:1–7.
 Bradley JA, Luithardt HH, Metea MR, Strock CJ et al. (2018) In vitro screening for seizure liability using microelectrode array technology. *Toxicol Sci* 163:240–253.
 Hubrecht RC, Carter E. (2019) The 3Rs and humane experimental technique: Implementing change. *Animals (Basel)* 2019;9(10):754.
 Takahashi K, Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 26:663–676.