

Nederlandse samenvatting

Microbellen zijn hele kleine gasbelletjes (~2.5 μm) ingekapseld door een schilletje dat kan bestaan uit fosfolipiden (waar ook een celmembraan uit bestaat), eiwitten of polymeren. Ze worden gestabiliseerd doordat er binnenin een zwaar gas zit dat moeilijk door het schilletje kan diffunderen, in tegenstelling tot lucht. Microbellen zijn in eerste instantie ontwikkeld als contrast middel voor de echocardiografie. Doordat microbellen het ultrageluid zeer goed weerkaatsen, kan er een contrastrijker beeld gemaakt worden tijdens het echoën van het hart, en kan het stellen van een diagnose worden verbeterd. Wanneer microbellen zich in een ultrageluid veld bevinden, gaan ze oscilleren. Ze zetten uit en krimpen in onder invloed van de negatieve en positieve drukverschillen van de geluidsgolf. Als de intensiteit van het geluid wordt opgevoerd, worden de oscillaties van de bellen non-lineair en kunnen de bellen uiteindelijk barsten. Het zijn deze akoestische eigenschappen die hebben geleid tot de ontwikkeling van microbellen als een therapeutische modaliteit. Het blijkt namelijk dat cellen in de buurt van oscillerende of uit (in) elkaar klappende bellen een verhoogde opname van medicijnen of genetisch materiaal vertonen. Dit creëert de mogelijkheid om een zeer gerichte, lokale therapie te ontwikkelen met behulp van ultrageluid en microbellen, wat de specificiteit en effectiviteit van huidige medicatie kan verhogen.

Hoewel het nu bekend is dat ultrageluid en microbellen voor een verhoogde opname van therapeutica kunnen zorgen, is het nog niet duidelijk via welke route(s) cellen deze moleculen internaliseren. Verder is ook niet goed bekend welke effecten ultrageluid en microbellen induceren op het niveau van individuele cellen. Het onderzoek in dit proefschrift beschrijft de biologische effecten van ultrageluid en microbellen op cellulair niveau, als mede de mechanismen achter de verhoogde opname van moleculen.

In detail: in **hoofdstuk 2** wordt een overzicht gegeven vanaf de ontdekking van de eerste microbellen tot de verschillende toepassingen ervan: van diagnostiek tot therapie. In hoofdstuk 3 en 4 is gekeken naar de effecten van ultrageluid en microbellen in cellen die model staan voor hartspiercellen. In **hoofdstuk 3** is gevonden dat ultrageluid en microbellen zorgen voor een toename van waterstofperoxide (H_2O_2) in de cel. Als we een stofje toevoegen (catalase) dat buiten de cel blijft en H_2O_2 kan wegvangen, vinden we dat H_2O_2 buiten de cel wordt gevormd. Verder wordt in dit hoofdstuk aangetoond ultrageluid en microbellen tijdelijke kleine gaatjes in de celmembraan veroorzaken. Dit is aangetoond door de instroom van calcium ionen. Wanneer we verschillende blokkers van calcium kanalen toevoegen, blijft de door ultrageluid en microbellen geïnduceerde instroom van calcium ionen nog steeds aanwezig. Echter, wanneer we catalase toevoegen, vinden we een sterke reductie van de calcium instroom. Dit duidt op een rol voor H_2O_2 in de vorming van de tijdelijke gaatjes in de celmembraan.

Deze instroom van calcium ionen zorgt voor een lokale toename van het spanningsverschil over de celmembraan; de membraan wordt negatiever (hyperpolarisatie). Dit is beschreven in **hoofdstuk 4**. We hebben gevonden dat daar waar een ultrageluid-geactiveerde microbel de celmembraan raakt, het instromende calcium de calcium-afhankelijke kalium kanalen activeert. De cel overcompenseert voor de overmaat aan positief geladen calcium ionen door de uitstroom van positief geladen kalium ionen, waardoor er een tijdelijke en lokale hyperpolarisatie van de celmembraan optreedt. Ten slotte, zoals catalase in hoofdstuk 3 de H_2O_2 wegvangt en zorgt voor minder instroom van calcium ionen, zorgt catalase er ook voor dat de celmembraan minder hyperpolariseert.

In **hoofdstuk 5** worden de biologische effecten in endotheelcellen gemeten. Endotheelcellen bekleden de binnenkant van alle bloedvaten. Microbellen komen dus veel met endotheelcellen in contact. Ook wanneer er medicijnen of DNA naar de hartspiercellen gebracht moeten worden, zal eerst de endotheel-barrière gepasseerd moeten worden. Het is daarom van belang om de interacties tussen ultrageluid, microbellen en endotheelcellen te bestuderen. Daarbij hebben we gekeken naar effecten op de permeabiliteit van een endotheelcel zelf, als mede naar veranderingen in een dichte endotheelcel monolaag. Ook in de endotheelcellen vinden we de instroom van calcium ionen en een toename van H_2O_2 . Hier tonen we niet alleen aan dat H_2O_2 in de cel meetbaar is, we vinden ook dat het een effect heeft op de cel zijn eigen scavenger van H_2O_2 , evenals een soort 'voetafdruk' van de reactie van zuurstofradicalen met eiwitten in de cel, namelijk de aanwezigheid van bepaalde groepen (ONOO⁻) op eiwitten. Verder hebben we gevonden dat er gaten tussen de endotheelcellen in de monolaag veroorzaakt kunnen worden door ultrageluid en microbellen. Hierdoor zouden therapeutica voorbij de endotheel-barrière gebracht kunnen worden. De endotheelcellen worden niet zwaar beschadigd: ze zijn nog prima in staat om binnen 30 minuten het gat weer actief te dichtten.

Ten slotte, in **hoofdstuk 6** is er in detail gekeken naar de mechanismen achter verhoogde opname van moleculen. Het algemeen geaccepteerde idee was dat moleculen door tijdelijke kleine gaatjes in membraan naar binnen gaan. Dit klopt ook voor kleinere moleculen, maar de grotere moleculen – zoals DNA – kunnen niet door deze kleine gaatjes. Het blijkt dat naast het ontstaan van gaatjes, actieve internalisatie processen (endocytose) gestimuleerd worden door ultrasound en microbellen. Hierdoor kunnen ook de grotere moleculen worden opgenomen. Maar bijvoorbeeld DNA dat door endocytose wordt opgenomen, komt in afgesnoerde membraan blaasjes (endosomen) terecht. Wanneer er geen actief 'ontsnappings mechanisme' is, komen deze deze blaasjes met het DNA automatisch in de afbraak route van de cel terecht, en komt het stukje DNA niet tot expressie en heeft de gentherapie geen effect. Bij het bedenken van nieuwe therapieën die gebruik zullen maken van ultrageluid en microbellen is het dus van groot belang om rekening te houden met de grootte van het medicijn of stukje DNA. De grootte van het molecuul bepaald waar in de cel het terecht komt, en dus of het werkzaam zal zijn of niet.

In conclusie, de resultaten van dit onderzoek geven meer inzicht in de interacties tussen ultrageluid, microbellen en cellen, en onthullen de mechanismen achter ultrageluid en microbellen gestimuleerde opname van moleculen. Dit zal bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe effectieve therapieën.

