WN-03 What's new in imaging technology: from genomics to robot

08:45-09:15 201

Chairperson(s): Kwon-Ha Yoon *Wonkwang University College of Medicine, Korea*
Kyoung Ho Lee *Seoul National University Bundang Hospital, Korea*

Sonoporation: preclinical application

Jae Young Lee
Seoul National University College of Medicine, Korea. leejy4u@snu.ac.kr

I. Sonoporation

Sonoporation은 초음파에 의해 세포막의 투과성이 증가되는 현상을 말하며, 세포 내로 거대분자를 비침습적으로 이송할 수 있는 기술로 각광을 받고 있다 (1). Sonoporation은 세포 주위에 기포가 존재할때 급격하게 증가하는데 이는 pulsating bubble과 세포 사이의 fluid dynamic interaction 때문이며, 기포로 부터 분출되는 shock waves or acoustic transients, extensional flow, shearing flow, 기포가 비대칭적으로 터질 때 방출되는 micro-jetting flow 등이 관여하는 것으로 알려져 있다 (2). Jet flow는 기포가 팽창 후 압축될 때 발생하며 속도는 5m/s에서 80m/s에 이른다. Single shot ultrasound pulse에 의해서도 주위 약 1/4의 세포가 이jet flow에 의해 손상을 입는다 (3). 세포가 기포 최대반지름의 0.75배 안에 있을 때 75% 이상의 확률로 poration이 일어난다 (4). 그러나 어느 정도 bubble과 떨어져 있을 때는 jet flow의 직접 타격보다는 jet flow나 oscillation bubble에 의한 streaming 및 shear force가 더 sonoporation에 큰 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (5, 6).

이런 sonomechanical effect에 의한 sonoporation외에 sonochemical effect의 존재를 주장하는 그룹도 있다. Inertial cavitation은 microsecond와 nanometer scale상에서 매우 격렬한 반응이며 이는 bubble 속 water vapor의 열분해를 일으켜 매우 높은 반응성을 보이는 OH radical과 H atom를 생성하고 이 radical들은 주위 분자와 반응하여 새로운 free radical들을 생성하거나 DNA의 염기서열에 영향을 준다. 이 과정에서 좀 더 오래 지속되는 화학물질이 생성될 수 있고 이들은 초음파에 직접 노출되지 않은 세포에도 바이오효과를 나타낼 수 있다는 것이 sonochemical effect 주장의 근간을 이룬다.

Sonoporation에 영향을 끼치는 인자들은 acoustic pressure, pulse frequency, pulse repetition frequency, pulse duration, insonation time 등이며 pulse frequency를 제외한 나머지 모든 인자들은 크기가 클수록 cell permeability가 증가하고 viability가 감소한다 (7). 유입되는 입자의 size는 delivery에 큰 영향을 주지 않으며 2 MDa까지 유입이 가능하다.

II. Preclinical application

1. Drug delivery (chemotherapeutic agents)

초음파와 microbubble(MB)의 병합은 항암제의 세포 내 이송을 증가시켜 항암제의 효과를 증진시킨다. 그 효과는 초음파 조사 후 60분 이상 지속된다 (8). Squamous carcinoma cell에 bleomycin을 주입 후 MB를 이용한 sonoporation을 4주 시행하였을 때 종양이 거의 소실되었고 조직학적으로 apoptosis가 주였다 (9). 이때 사용한 sonication의 조건은 1 MHz, 2.0 W/cm^2, duty cycle 50%, 1분(x2) 이었다. Retinoblastoma, primary cutaneous melanoma, lympohoma, prostate cancer, oral cancer, pancreas cancer 등에서 병합효과가 실험적으로 증명이 되고 있다 (8, 10).

Drug 외에도 Protein, synthetic oligonucleotides, small compound 등의 influx를 증가시킬 수 있다. 초음파에 의한 transmembrane delivery는 endocytosis가 관계하지 않고 알려진 대로 pore에 의한 직접적인 유입으로 보인다는 주장이 많으나 (11), gene transfection을 증가시키기 위해 polyethylenimine (PEI)를 이용한 연구에서 초음파조사 후 대부분의 uptake가 3시간 안에 일어나 endocytosis가 관여할 가능성을 제시하였다 (12). 이에 대해서는 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각이 된다 (8). MB의 shell의 성분에 의해서도 transfection의 efficiency가 영향을 받는 데 lipid bubble이 albumin shell이나 liposome보다 낫다는 보고가 있다 (13). Doxorubicin-containing liposome-containing MB을 이용한 sonication 실험에서 Dox-liposome보다 Dox-loaded MB에서 2배 이상 melanoma 세포가 사멸되었다 (14).

2. Gene delivery

초음파를 매개로 한 gene transfer는 viral gene transfer의 가능한 대안으로 적극적으로 모색되고 있고 많은 전임상 연

구들이 이를 지지해 주고 있다 (15). Bacteria 내에 mutant를 만들기 위해 gene transfection을 시키는 데 있어 sonoporation은 매우 유용하며 한 연구에 의하면 electoporation보다 2배 정도 효과적이었고 electroporation과 달리 bacteriocidal하지 않았다. Delivery efficiency는 acoustic pressure amplitude, duty cycle, 그리고 MB의 양에 달려 있으며 PRF와는 큰 영향을 받지 않았다 (16). Reporter DNA plasmid를 rat eye의 ciliary muscle에 trasnfection하는 데 US + MB가 MB only나 US only, 또는 plasmid only에 비해 통계적으로 유의하게 높은 transfection을 보였고 lens나 ciliary muscle의 손상이 없었다 (17). US-mediated antiangiogenic gene therapy를 항암치료나 면역치료와 결합하여 치료하였을 때 더 높은 효과를 얻을 수 있었다 (18). Electroporation과 sonoporation을 같이 이용한 경우 electroporation만 이용했을 때 보다 6배 이상 transfection efficiency가 증가했다 (19). Neuronal cell에도 약 20% transfection efficiency를 보일 정도로 gene transfection이 증가시킨다 (20). MicroRNA transfection도 sonoporation을 이용해 증강시킬 수 있다 (21). BBB를 통과해서 drug 및 gene을 이송할 수 있다 (22).

III. Future challenges

임상으로 가기 위해서는 더 많은 실험 data와 함께 임상적으로 좀 더 정확하게 deep seated tumor를 treat하고 targeting 할 수 있는 more sophisticated US generating device가 필요하다. 또한 실제 종양이 가지고 있는 특성에 따른 치료효과의 차이를 극복하기 위한 연구가 필요한데 종양의 heterogeneity에 따른 위치별 sonoporation의 차이를 어떻게 극복할 것인가가 관건이다. 종양내 혈관이 많은 곳에는 MB이 vascular permeability를 증가시켜 유출을 증가시키지만, 혈관이 적거나 괴사된 부분에서는 유출이 제한된다. 이런 제한점은 nano-sized bubble이나 microbubble을 만들어내는 nanoemulsion 또는 nanoparticle로 극복할 수 있을 것이다 (23-25).

References

1. Deng CX, Sieling F, Pan H, Cui J. Ultrasound-induced cell membrane porosity. Ultrasound Med Biol. 2004;30(4):519-26
2. Ohl CD, Arora M, Ikink R, et al. Sonoporation from jetting cavitation bubbles. Biophys J. 2006;91(11):4285-95
3. Kudo N, Okada K, Yamamoto K. Sonoporation by single-shot pulsed ultrasound with microbubbles adjacent to cells. Biophys J. 2009;96(12):4866-76
4. Gac SL, Zwaan E, van den Berg A, Ohl CD. Sonoporation of suspension cells with a single cavitation bubble in a microfluidic confinement. Lab Chip. 2007;7(12):1666-72
5. Forbes MM, Steinberg RL, O'Brien WD, Jr. Examination of inertial cavitation of Optison in producing sonoporation of chinese hamster ovary cells. Ultrasound Med Biol. 2008;34(12):2009-18
6. Forbes MM, Steinberg RL, O'Brien WD, Jr. Frequency-dependent evaluation of the role of definity in producing sonoporation of Chinese hamster ovary cells. J Ultrasound Med. 2011;30(1):61-9
7. Karshafian R, Bevan PD, Williams R, Samac S, Burns PN. Sonoporation by ultrasound-activated microbubble contrast agents: effect of acoustic exposure parameters on cell membrane permeability and cell viability. Ultrasound Med Biol. 2009;35(5):847-60
8. Lee NG, Berry JL, Lee TC, et al. Sonoporation enhances chemotherapeutic efficacy in retinoblastoma cells in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011;52(6):3868-73
9. Iwanaga K, Tominaga K, Yamamoto K, et al. Local delivery system of cytotoxic agents to tumors by focused sonoporation. Cancer Gene Ther. 2007;14(4):354-63
10. Lee JY, Choi BI, Ryu JK, et al. Concurrent chemotherapy and pulsed high-intensity focused ultrasound therapy for the treatment of unresectable pancreatic cancer: initial experiences. Korean J Radiol. 2011;12(2):176-86
11. Geers B, Lentacker I, Alonso A, et al. Elucidating the mechanisms behind sonoporation with adeno-associated virus-loaded microbubbles. Mol Pharm. 2011;8(6):2244-51
12. Lee JL, Lo CW, Ka SM, Chen A, Chen WS. Prolonging the expression duration of ultrasound-mediated gene transfection using PEI nanoparticles. J Control Release. 2012;160(1):64-71
13. Kodama T, Aoi A, Watanabe Y, et al. Evaluation of transfection efficiency in skeletal muscle using nano/microbubbles and ultrasound. Ultrasound Med Biol. 2010;36(7):1196-205
14. Lentacker I, Geers B, Demeester J, De Smedt SC, Sanders NN. Design and evaluation of doxorubicin-containing microbubbles for ultrasound-triggered doxorubicin delivery: cytotoxicity and mechanisms involved. Mol Ther. 2010;18(1):101-8
15. Nomikou N, McHale AP. Microbubble-enhanced ultrasound-mediated gene transfer--towards the development of targeted gene therapy for cancer. Int J Hyperthermia. 2012;28(4):300-10
16. Han YW, Ikegami A, Chung P, Zhang L, Deng CX. Sonoporation is an efficient tool for intracellular fluorescent dextran delivery and one-step double-crossover mutant construction in Fusobacterium nucleatum. Appl Environ Microbiol. 2007;73(11):3677-83
17. Kowalczuk L, Boudinet M, El Sanharawi M, et al. In vivo gene transfer into the ocular ciliary muscle mediated by ultrasound and microbubbles. Ultrasound Med Biol. 2011;37(11):1814-27
18. Liao ZK, Tsai KC, Wang HT, et al. Sonoporation-mediated anti-angiogenic gene transfer into muscle effectively regresses distant orthotopic tumors. Cancer Gene Ther. 2012;19(3):171-80
19. Escoffre JM, Kaddur K, Rols MP, Bouakaz A. In vitro gene transfer by electrosonoporation. Ultrasound Med Biol. 2010;36(10):1746-55
20. Fischer AJ, Stanke JJ, Omar G, Askwith CC, Burry RW. Ultrasound-mediated gene transfer into neuronal cells. J Biotechnol. 2006;122(4):393-411
21. Chen ZY, Liang K, Qiu RX, Luo LP. Enhancing microRNA transfection to inhibit survivin gene expression and induce

WN (201), Oct 19, Fri

apoptosis: could it be mediated by a novel combination of sonoporation and polyethylenimine? Chin Med J (Engl). 2011;124(21):3592-4

22. Sheikov N, McDannold N, Vykhodtseva N, Jolesz F, Hynynen K. Cellular mechanisms of the blood-brain barrier opening induced by ultrasound in presence of microbubbles. Ultrasound Med Biol. 2004;30(7):979-89
23. Horie S, Watanabe Y, Ono M, Mori S, Kodama T. Evaluation of antitumor effects following tumor necrosis factor-alpha gene delivery using nanobubbles and ultrasound. Cancer Sci. 2011;102(11):2082-9
24. Rapoport NY, Kennedy AM, Shea JE, Scaife CL, Nam KH. Controlled and targeted tumor chemotherapy by ultrasound-activated nanoemulsions/microbubbles. J Control Release. 2009;138(3):268-76
25. Kang E, Min HS, Lee J, et al. Nanobubbles from gas-generating polymeric nanoparticles: ultrasound imaging of living subjects. Angew Chem Int Ed Engl. 2010;49(3):524-8