

Die Bedeutung von Kavitationsblasen für transiente Membranpermeabilisierung und Zellschädigung

Bernhard Wolfrum, Claus-Dieter Ohl*, Robert Mettin, Thomas Kurz und Werner Lauterborn

Drittes Physikalisches Institut, Bürgerstr. 42-44, Universität Göttingen, D-37073 Göttingen, Germany.

*Department of Applied Physics, Physics of Fluids, TU Twente, Postbus 217, 7500 AE Enschede, The Netherlands.

Email: wolfrum@physik3.gwdg.de

Einleitung

Seit Erfindung der extrakorporalen Lithotripsie finden Stoßwellen vielfältige Anwendung in der Medizin¹. In der Praxis treten bei diesem Verfahren der Steinertrümmerung Gewebeschädigungen als Nebeneffekt auf. Es wurde gezeigt, dass Stoßwellen auch die Aufnahme von extrazellulären Molekülen erleichtern können. Das Einschleusen von normalerweise nicht membranpermeablen Molekülen in Zellen (drug delivery) ist eine wesentliche Voraussetzung für andere medizinische Anwendungen wie z.B. die Gentherapie. Wir zeigen hier, dass Zellpermeabilisierung und die Aufnahme von FITC-Dextran nach Stoßwellenapplikation *in vitro* durch Kavitationsblasen verursacht wird. Die Kavitationsblasen entstehen in der nach dem Stoß auftretenden Unterdruckphase² und kollabieren weniger als 200 μ s später. Dabei wird ein starkes Strömungsfeld erzeugt, welches zur Ablösung der Zellen vom Substrat, zur transienten Permeabilisierung der Membranen und zur Zerstörung der Zellen führen kann. Befinden sich Kavitationskeime in der umgebenden Flüssigkeit, so wird die Ausbildung von Kavitationsblasen erleichtert. Hochgeschwindigkeitsaufnahmen zeigen, dass bereits geringe Unterdruckamplituden von weniger als 2 MPa ausreichen, um Levovist Kontrastmittelblasen (Schering AG) auf mehr als das 30-fache ihres ursprünglichen Radius aufzuziehen und Zellen im darauf folgenden Kollaps der Blasen sichtbar zu schädigen.

Material & Methoden

Die Anregung und Erzeugung der Kavitationsblasen wird auf zwei verschiedene Weisen realisiert: Im ersten Versuchsteil, dargestellt in Abbildung 1, verwenden wir Levovist Kontrastmittel als Keim für Kavitationsblasen in einer Zellkultur von Rattenfibroblasten.

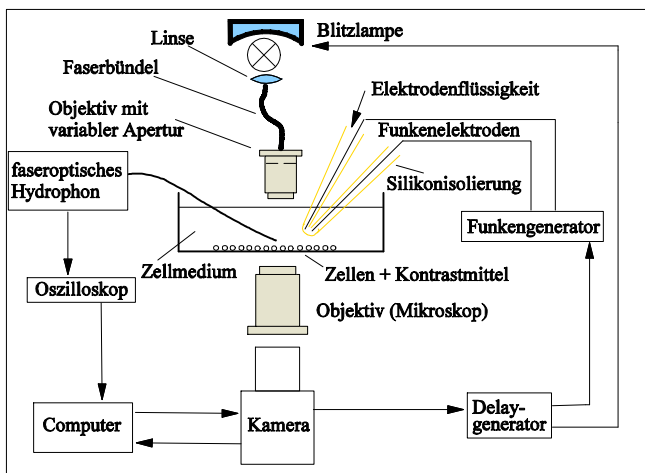


Abbildung 1: Aufbau zur Beobachtung von druckangeregten Kontrastmittelblasen in der Nähe von Zellen.

Eine Druckwelle wird durch elektrischen Funkenüberschlag erzeugt und regt die Kontrastmittelbläschen zu Schwingungen an. Die Blasendynamik und deren Auswirkungen auf die Zellen werden mit einer Hochgeschwindigkeitskamera durch ein Mikroskop beobachtet.

Im zweiten Versuchsteil wird die Wirkung von Lithotripterstoßwellen auf adhärente Gebärmutterhals-Tumorzellen (HeLa) bezüglich des Ablöseverhaltens der Zellen, sowie der Membranpermeabilisierung und Zellschädigung untersucht. Zu diesem Zweck werden die Zellen mit Stoßwellen eines kommerziellen Lithotripters beschossen und gleichzeitig durch ein Fernmikroskop beobachtet. Transiente Membranpermeabilisierung wird anschließend durch die Überprüfung der Aufnahme von extrazellulären Molekülen (FITC-Dextran, Calcein) festgestellt. Die Zellschädigung wird mit Viabilitätstests (Acridine Orange/Ethidium Bromid) ebenfalls nach der Stoßwellenapplikation im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Beobachtung der Interaktionen zwischen druckangeregten Kontrastmittelblasen und Zellen

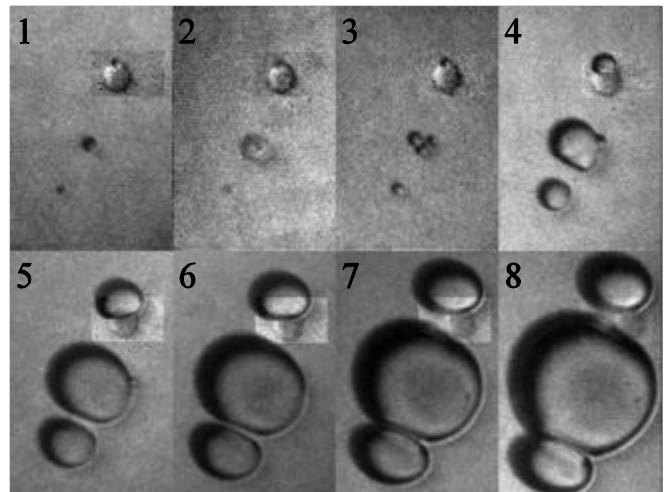


Abbildung 2: Aufschwingende Kontrastmittelbläschen an einzelner Zelle. Einzelbildbreite: 71 μ m, Belichtungszeit: 200 ns, Zwischenbildzeit: 1 μ s.

Die Dynamik von drei Kontrastmittelblasen nach elektrischem Funkenüberschlag ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Blasen kollabieren zunächst aufgrund einer ersten positiven Druckwelle. Anschließend werden sie durch einen geringen Unterdruckpuls (< 2 MPa) aufgezogen und erreichen ein Vielfaches (teilweise 30x) ihres ursprünglichen Durchmessers. Während der Aufschwingphase der Blasen wird eine in der Nähe liegende Zelle geringfügig verschoben und zusammengedrückt. Dieses Verhalten wurde in vielen

Durchführungen des Experiments beobachtet. Es ist jedoch anzunehmen, dass die geringe Verformung (abgeschätzte Membrandehnung $< 2\%$) in der Regel keine signifikante Schädigung der Zelle verursachen wird. Beim Kollaps der Blasen hingegen konnte eine sehr viel stärkere Deformierung und teilweise sogar Zerstörung der Zellen beobachtet werden³. Die Blasendynamik wurde dabei im Wesentlichen durch die Grenzfläche des Substrats, die Richtung der Druckwelle und die Nachbarschaft zu anderen Blasen beeinflusst. Abbildung 3 zeigt den Kollaps einer aufgeschwungenen Kontrastmittelblase am Substrat.

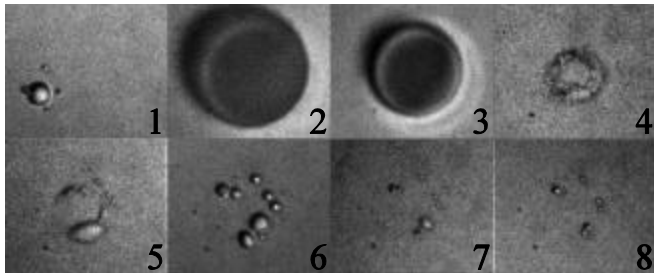


Abbildung 3: Torusförmiger Kollaps einer druckangeregten Kontrastmittelblase. Einzelbildbreite: 57 μm , Belichtungszeit: 200 ns, Zwischenbildzeit: Bild 1-2: 15.5 μs , Bild 2-8: 400 ns.

Aufgrund der Grenzfläche kollabiert die Kontrastmittelblase asphärisch. Es bildet sich ein Jet, der durch die Blase auf die Grenzfläche trifft und nach dem Kollaps eine torusförmige Struktur hinterlässt^{4,5}. Die restlichen Blasenfragmente nehmen durch die hohe Oberflächenspannung schnell wieder sphärische Form an und lösen sich anschließend auf.

Kavitationsinduzierte Zellablösung

Beschallt man adhärenente Zellen mit fokussierten Stoßwellen eines Lithotripters, so kommt es zur Ablösung der Zellen vom Substrat. In unseren Experimenten konnten wir nur an den Stellen Zellablösung beobachten, wo auch Kavitationsblasen in der Nähe erzeugt wurden (Abbildung 4).

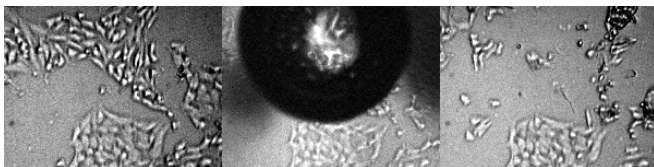


Abbildung 4: Ablösung von Zellen durch eine lithotripterinduzierte Kavitationsblase. Bildbreite: 670 μm , Bild 1: vor Stoßwelle; Bild 2: $\sim 100 \mu\text{s}$, Bild 3: $\sim 0.5 \text{ s}$ nach Stoßwelle.

Die Blasen entstehen dabei in der Unterdruckphase der Lithotripter-Stoßwelle. Das im vorigen Abschnitt beschriebene Kollapsverhalten von druckangeregten Kontrastmittelblasen in der Nähe von Grenzflächen kann in ähnlicher Form für die größeren lithotripterinduzierten Blasen verwendet werden. Durch den Jet wird an der Grenzfläche eine Scherströmung erzeugt, welche vermutlich für die Zellablösung verantwortlich ist. Auf einem dicht bewachsenen Substrat entstehen deswegen nach dem Kollaps der Kavitationsblasen kreisförmige zellfreie Regionen (Abbildung 5).

Membranpermeabilisierung und Aufnahme extrazellulärer Moleküle

Die Scherströmung kann neben Zellablösung vom Substrat und evtl. permanenter Zellschädigung auch eine transiente Permeabilisierung der Zellmembranen verursachen. Die Poren, die dabei in

der Zellmembran entstehen, sind für Beobachtungen im Lichtmikroskop zu klein. Allerdings können während der Öffnungsdauer extrazelluläre Moleküle in die Zellen hindiffundieren und so die permeabilisierten Zellen sichtbar machen. In unseren Experimenten wurden die Fluoreszenzfarbstoffe FITC-Dextran oder Calcein vor Stoßwellenapplikation ins Zellmedium gegeben. Nach Stoßwellenapplikation waren von den abgelösten Zellen 12% permanent beschädigt. Dabei zeigten 11% (50%) der überlebenden Zellen eine Aufnahme von FITC-Dextran (Calcein).

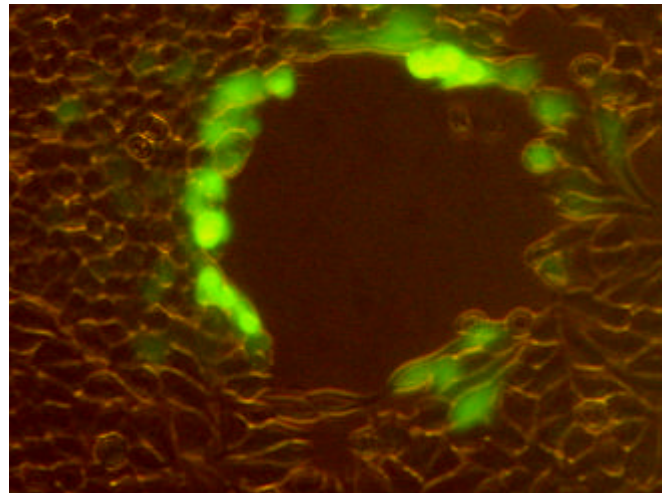


Abbildung 5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HeLa Zellen nach dem Kollaps einer Kavitationsblase. Grüne Zellen zeigen Aufnahme von FITC-Dextran, Bildbreite: 464 μm .

Bei adhärenente Zellen wurde vornehmlich eine Aufnahme von Molekülen um die Bereiche kavitationsinduzierter Ablösung festgestellt. Es ist daher anzunehmen, dass Zellpermeabilisierung ebenso wie Zellablösung durch Kavitationsblasen verursacht wird.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von druckangeregten Kontrastmittelblasen auf Zellen mit Hochgeschwindigkeitsaufnahmen untersucht. Geringe Unterdruckamplituden von weniger als 2 MPa reichen aus, um eine starke Expansion der Blasen zu hervorzurufen. Der anschließende Kollaps kann dabei zur Schädigung der umgebenden Zellen führen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass transiente Permeabilisierung von adhärenente HeLa-Zellen sowie deren Ablösung vom Substrat nach Stoßwellenapplikation durch Kavitationsblasen verursacht wird. Die Kavitationsblasen entstehen in der Unterdruckphase des Lithotripterpulses und bilden beim Kollaps aufgrund ihrer Nähe zum Substrat einen gegen die Grenzfläche gerichteten Jet aus. Der Jet erzeugt eine starke Scherströmung am Substrat, welche vermutlich für die Ablösung der Zellen und die transiente Membranpermeabilisierung mit nachfolgender Aufnahme extrazellulärer Moleküle verantwortlich ist.

¹ M. Delius, Lithotripsy, *Ultrasound in Med. & Biol.* **26**, 55-58 (2000).

² C. D. Ohl, Cavitation inception following shock wave passage, *Phys. Fluids* **14**, 3512-3521 (2002).

³ B. Wolfrum, R. Mettin, T. Kurz, W. Lauterborn, Observations of pressure-wave-excited contrast agent bubbles in the vicinity of cells, *Appl. Phys. Lett.* **81**, 5060-5062 (2002).

⁴ A. Vogel, W. Lauterborn, R. Timm, Optical and acoustic investigations of the dynamics of laser-produced bubbles near a solid boundary, *J. Fluid Mech.* **261**, 299-338 (1998).

⁵ J. R. Blake, D. C. Gibson, Cavitation bubbles near boundaries, *Ann. Rev. Fluid Mech.* **19**, 99-123 (1987).