

Molecular imaging of large arteries by ultrasound

Citation for published version (APA):

Kornmann, L. (2010). *Molecular imaging of large arteries by ultrasound: Potentials and pitfalls*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/2010

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

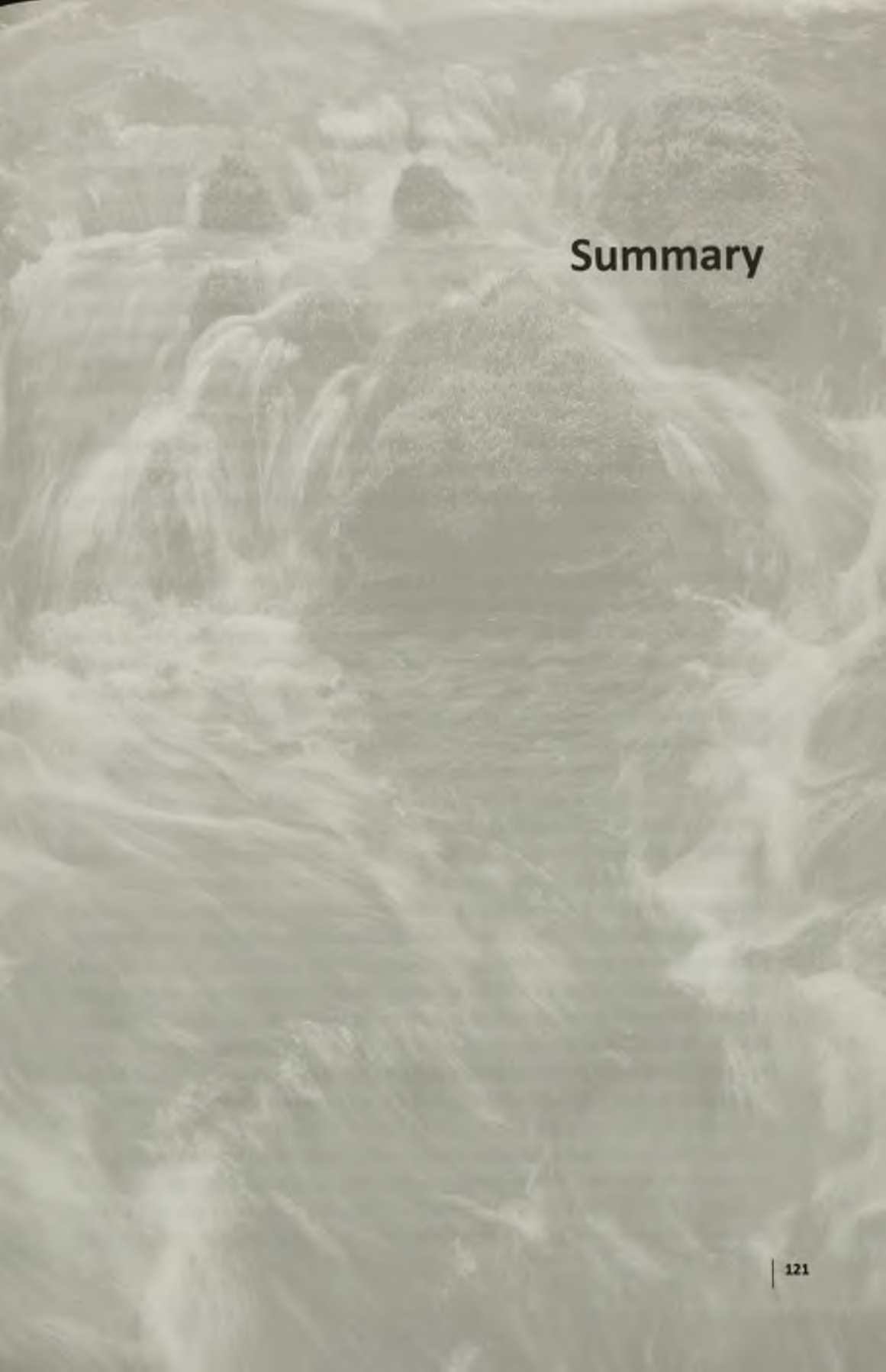
www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.



Summary

Atherosclerosis, an inflammatory disease of large and middle-sized arteries, is the primary cause of events like stroke or acute myocardial infarction. Molecular imaging of the molecular and cellular processes involved in atherosclerosis utilizes targeted contrast agents in combination with specific imaging modalities, such as ultrasound. Targeting of the atherosclerotic wall of large arteries under physiological circumstances imposes specific requirements on ultrasound contrast agents. They should be able to attach, roll and finally firmly adhere to the wall during oscillating shear stress to achieve sufficient accumulation and ultrasound imaging enhancement. The physiologically high shear forces acting on contrast agents, limiting eventual attachment, remain one of the major obstacles for clinical application. Notably, the adherence requirements for ultrasound contrast agents in small rodents are even more severe since wall shear stress is substantially higher in small animals than in humans. The objective of this thesis was to develop a method for molecular imaging by means of ultrasound contrast agents targeted to endothelial markers in large arteries.

In **Chapter 2** the basic principles of ultrasound, contrast imaging, hemodynamics, and particle adhesion are discussed. It is established that high ultrasound echogenicity requires a high density of particles with a large size and a high acoustic impedance mismatch with the surrounding medium, i.e., the blood pool and endothelium. Interrogation of superficially located atherosclerotic regions is advantageous because it allows the use of a high ultrasound frequency, favoring the ratio of particle diameter and wavelength. On the other hand a large particle size is more susceptible to the hemodynamic forces exerted on the particle, i.e., shear stress.

The results obtained in the past with the current ultrasound contrast agents are thoroughly reviewed in **Chapter 3**. This chapter provides an overview of the commonly used ultrasound contrast agents, such as microbubbles, liposomes and emulsions with a size in the range of 0.1 to 6 μm . Most detachment studies with contrast agents were performed after static incubation, and those studying attachment of contrast agents were performed under low shear stress conditions. In animal models, contrast agents showed a short circulation time, because they were large, stiff and did not contain suitable shell membrane components. *In vitro*, stiff-shelled agents exhibited low capture and weak firm adhesion efficiency at low shear stresses. Changing to deformable agents, to multiple contrast agent surface ligands or to pulsatile flow improved adhesion, but the improvements were still limited.

Current ultrasound contrast agents exhibit a wide size distribution, prohibiting conversion from observed echogenicity enhancement to the number and density of particles involved, and, hence, to the density of binding sites as an indication of the stage of the atherosclerotic process rather than a yes/no decision. **Chapter 4** de-

scribes a study in which a membrane emulsification technique is used to create strictly monodisperse perfluorohexane emulsions with a preset size. The ability to produce well defined emulsions of different sizes will make it possible to explore the optimal emulsion droplet size for quantitative imaging in relation to shear stress and echogenicity. In this study monodisperse perfluorohexane emulsions with pre-selected sizes of 4 μm and 12 μm were produced. Ultrasound experiments demonstrated that the newly developed perfluorohexane emulsions exhibited the anticipated echogenic behavior. Further investigations are required to get more insight into the relationship between echogenicity and the local concentration and size of adhered ultrasound contrast agents *in vivo*.

Because of the low adhesion success rate of current standard ultrasound contrast agents the use of monocytes as a vehicle for ultrasound contrast agents was explored in **Chapter 5**. Isolated murine bone marrow cells were cultured into macrophages, which were allowed to take up contrast material (perfluorohexane). The uptake was easily controlled by the concentration of the contrast agents and duration of exposure. The uptake of contrast material increased echogenicity dose-dependently by more than 10 dB (4% v/v). The uptake process did not modify the expression of adhesion molecules (VLA-4, PSGL-1 and LFA-1), indicating that it does not affect binding potential. Moreover, under no shear stress conditions the loaded macrophages were able to adhere to stimulated endothelium.

The *in vivo* applicability of loaded macrophages as described in chapter 5 was studied in **Chapter 6**. Ultrasound examination showed that after intravenous injection perfluorohexane loaded bone marrow macrophages enhanced the echo level of arterial blood in mice. Moreover, injection via the tail vein of 2.5×10^6 2% v/v loaded bone marrow macrophages was well tolerated by the animals. Intravital microscopy showed that injected bone marrow macrophages exhibited rolling and adhesion behavior at the TNF- α stimulated carotid artery endothelium, similar to native blood leukocytes. Furthermore, rolling behavior was not different between perfluorohexane loaded and unloaded bone marrow macrophages. Similarly, there was no difference in the number of adhering loaded and unloaded bone marrow macrophages. Future experiments are required to get more insight into the relationship between local expression of molecular markers on endothelial surfaces and the local concentration and diameter of adhered cell-based ultrasound contrast agents.

Finally, **Chapter 7** integrates the results of the studies presented in this thesis and discusses the remaining challenges towards ultrasound molecular imaging in large arteries under (patho)physiological flow conditions.



Samenvatting

Atherosclerose ("aderverkalking") is een ontstekingsziekte van de wand van de grote slagaders. Het is de voornaamste oorzaak van een beroerte of een hartinfarct. Atherosclerose is een langzaam en geleidelijk voortschrijdend proces waarbij de ontsteking leidt tot de ontwikkeling van een atherosclerotische plaque. Als gevolg daarvan produceert de binnenlaag van het vat (het endotheel) specifieke moleculen. Moleculaire beeldvorming ("molecular imaging") is gebaseerd op het zichtbaar maken van de moleculaire en cellulaire processen betrokken bij weefselveranderingen. Daartoe wordt gebruik gemaakt van contrastmiddelen die met een gegeven beeldvormende techniek, zoals ultrageluid (echografie), goed kunnen worden waargenomen. Selectieve hechting wordt bereikt door de contrastmiddelen te voorzien van moleculen die een binding aangaan met de moleculen die als gevolg van het atherosclerotische proces gevormd worden. De hechting moet zo stevig zijn dat ze vast blijven zitten ondanks de wrijvingskrachten die het stromend bloed erop uitoefent. De wrijvingskracht per eenheid van oppervlakte wordt de afschuifspanning of "shear stress" genoemd. Naarmate zich meer contrastmiddelen lokaal ophopen zullen ze steeds beter zichtbaar worden op het ultrasonore echobeeld.

De afschuifspanning aan de wand, uitgeoefend op het contrastmiddel, belemmert de hechting. Dit is één van de grootste obstakels bij de toepassing van contrastmiddelen voor ultrageluid in slagaders bij de mens. Bovendien is het uittesten van moleculaire beeldvorming met behulp van ultrageluid bij kleine knaagdieren moeilijk. Juist in kleine dieren blijkt de shear stress aanzienlijk hoger zijn dan bij de mens. Het doel van dit proefschrift is een methode te ontwikkelen voor moleculaire beeldvorming met behulp van ultrageluid contrastmiddelen, die hechten aan specifieke moleculen in de arteriewand onder (patho)fysiologische stromingscondities.

In **hoofdstuk 2** worden de basisprincipes van ultrageluid, contrast afbeelding, hemodynamica en hechting van contrastmiddelen in detail besproken. Daarin wordt onder andere vastgesteld dat een hoge reflectiviteit van het ultrageluidsignaal een hoge dichtheid vereist van contrastmiddelen met een grote diameter en een akoestische impedantie die sterk afwijkt van die van de omgeving, dat wil zeggen, het bloed en het endotheel. Bovendien is de reflectiviteit van een klein deeltje in belangrijke mate afhankelijk van de verhouding tussen zijn diameter en de golflengte van het gebruikte ultrageluid. Het heeft daarom zin om in de ontwikkelingsfase te kiezen voor een oppervlakkig gelegen slagader die gevoelig is voor atherosclerotische processen, zoals de halsslagader. Vanwege de geringe indringdiepte van ultrageluid (30 mm) heeft men minder last van verzwakking van het geluid en kan dus een hogere frequentie (7-10 MHz) met een kortere golflengte gebruikt worden. Een complicerende factor is echter dat een contrastdeeltje met een grotere diameter gevoeliger is voor afschuifspanningen waardoor hechting aan de wand bemoeilijkt wordt.

De ervaringen die eerder zijn opgedaan met de hedendaagse ultrageluid contrastmiddelen passeren in **hoofdstuk 3** de revue. Dit hoofdstuk geeft een overzicht van de gebruikelijke ultrageluid contrastmiddelen, zoals microbubbels, liposomen en emulsies met een deeltjesformaat van 0,1 tot 6 μm . De meeste hechtingsstudies waren gericht op het los laten van de contrastmiddelen nadat ze eerst, zonder stroming, mochten hechten aan het doelgebied. Andere hechtingsstudies bestudeerden de hechting van contrastmiddelen bij aanzienlijk lagere afschuifspanningen dan die bij de mens in slagaders optreden. In diermodellen lieten de contrastmiddelen een korte circulatietijd zien, omdat ze te groot en te stijf waren en niet de geschikte membraan componenten bevatten. De contrastmiddelen met een stijve membraan hadden bij een lage afschuifspanning ook een lage hechtingsefficiëntie, terwijl de hechting weer gemakkelijk verbroken werd. Het gebruik van vervormbare contrastmiddelen, of contrastmiddelen met meerdere bindingsmoleculen op het membraan, of hechting van contrastmiddelen onder pulsatieve stromingscondities resulteerden in een matige verbetering.

De hedendaagse ultrageluid contrastmiddelen hebben eenbrede grootteverdeling waardoor het onmogelijk wordt om het waargenomen echosignaal te converteren naar het aantal en de dichtheid van de betrokken contrastmiddelen. Het is dan ook niet mogelijk om een indicatie te geven van het stadium waar het atherosclerotische proces in verkeert; men moet volstaan met een ja/nee beoordeling. **Hoofdstuk 4** beschrijft een methode om met een membraan emulsificatie techniek perfluorhexaan emulsies te maken met een nauwe grootteverdeling en een vooraf gekozen diameter, bijvoorbeeld 4 en 12 μm . Het wordt daardoor mogelijk om de meest optimale emulsie druppelgrootte te kiezen voor kwantitatieve beeldvorming in relatie tot de karakteristieken van de afschuifspanning en het echosignaal. Ultrageluid experimenten bevestigden dat deze perfluorhexaan emulsies zichtbaar zijn met behulp van ultrageluid. Extra onderzoek is nodig om meer inzicht te krijgen in de relatie tussen het echosignaal en de lokale concentratie en het formaat van de ultrageluid contrastmiddelen zoals die zich ophopen op een atherosclerotische plaque in de halsslagader.

Vanwege de slechte hechtingseigenschappen van de huidige ultrageluid contrastmiddelen hebben wij in **hoofdstuk 5** onderzocht of monocyt (witte bloedcellen; voorlopers van macrofagen) als voertuig voor ultrageluid contrastmiddelen kunnen worden gebruikt. Daartoe werden uit geïsoleerde beenmergcellen van muizen macrofagen gekweekt die contrastmiddelen opnemen. De opname kon gemakkelijk gecontroleerd worden door de concentratie van de contrastmiddelen (bijv. perfluorhexaan) in relatie tot de duur van de blootstelling. De opname van het contrastmiddel door de macrofaag liet een dosis-afhankelijke verhoging van het echosignaal zien van minstens een factor 3 (bij een dosis van 4% v/v). De opname van perfluor-

hexaan had geen invloed op de expressie van de bindingsmoleculen die normaal aanwezig zijn op het membraan van de macrofaag, zoals VLA-4, PSGL-1 en LFA-1. De opname van het contrastmiddel had geen invloed op de hechtingseigenschappen van de macrofagen.

In **hoofdstuk 6** worden experimenten gepresenteerd waarin de toepasbaarheid van de in hoofdstuk 5 beschreven macrofagen in muizen onderzocht werd. Intraveneuze injectie van perfluorhexaan geladen beenmergmicrofagen resulteerde direct na injectie in een geringe maar duidelijk waarneembare toename van het ultrageluids-niveau van het bloed in de longslagader en vervolgens in de halslagader. Verder bleek dat de geleidelijke injectie van 2.5 miljoen 2% v/v geladen beenmergmicrofagen via de staartvene door de muizen goed verdragen werd. Het atherosclerotisch proces werd gesimuleerd door de halslagader te stimuleren met TNF- α . We hebben vervolgens met behulp van een intravitaal microscoop vastgesteld dat de geïnjecteerde beenmergmicrofagen een rollend en hechtend gedrag vertoonden overeenkomstig met dat van de eigen witte bloedcellen van het dier. Bovendien hebben wij geen verschil in het rolgedrag en de hechting van de met perfluorhexaan geladen en de ongeladen beenmergmicrofagen vast kunnen stellen. Aanvullende experimenten zijn echter nodig, ondermeer om de relatie tussen de lokale expressie van moleculaire markers op het endotheel en de lokale concentratie en diameter van gehechte geladen monocytten vast te stellen, ten einde een definitieve conclusie te kunnen trekken over de bruikbaarheid van deze methode,

Tenslotte worden in **hoofdstuk 7** alle resultaten geïntegreerd en besproken. Daarbij wordt tevens aandacht besteed aan de resterende uitdagingen met betrekking tot moleculaire beeldvorming van atherosclerotische plaques met behulp van ultrageluid.