

Het hoornvlies, het transparante "venster" aan de voorzijde van het oog, moet perfect transparant blijven om licht te focussen en scherp zicht te garanderen. De helderheid van het hoornvlies kan echter verloren gaan door verschillende problemen, wat leidt tot verminderd zicht of blindheid. Een van deze problemen hangt samen met de binnenste laag van het hoornvlies, namelijk het hoornvliesendotheel. Deze cellen functioneren als een continue pomp die voortdurend overtollig vocht verwijdt dat het hoornvlies van nature absorbeert (als een spons). De opstapeling van vocht in het hoornvlies wordt voorkomen door de pompfunctie van het hoornvliesendotheel. Als te veel van deze pompcellen afsterven (door erfelijke aandoeningen of als complicatie van een oogoperatie), zijn de overgebleven cellen niet langer in staat om zwelling te voorkomen, met als gevolg dat het hoornvlies troebel wordt en uiteindelijk blindheid ontstaat. Deze cellen kunnen bij mensen niet op natuurlijke wijze regenereren, waardoor een hoornvliestransplantatie momenteel de enige behandeling is. Er is echter een wereldwijd tekort aan donorhoornvliezen. Dit heeft onderzoekers gestimuleerd om alternatieve strategieën te vinden die minder afhankelijk zijn van donormateriaal. Een van deze strategieën omvat de aflevering van nucleïnezuren aan deze hoornvliesendotheelcellen, wat tijdelijk celdeling zou kunnen induceren. Als deze cellen tijdelijk kunnen groeien, zou het totale aantal pompen op het endotheel toenemen, waardoor vochttopstapeling in het hoornvlies wordt voorkomen. Bovendien zouden nucleïnezuren ook kunnen worden ingezet om te voorkomen dat deze cellen afsterven onder specifieke omstandigheden, of om genetische mutaties te behandelen in geval van erfelijke aandoeningen. Deze nucleïnezuren zijn echter aanzienlijk groter dan standaard moleculen van standaard geneesmiddelen. Daarom zijn gespecialiseerde technieken vereist om deze nucleïnezuren in de cellen af te leveren. Dit proefschrift focust op de ontwikkeling en bespreking van verschillende van deze technieken voor het hoornvliesendotheel.

Hoofdstuk 1 vat alle aflevertechnieken samen die zijn onderzocht voor de aflevering van nucleïnezuren aan het hoornvliesendotheel. Hier worden de technieken verdeeld in fysieke technieken, die een tijdelijk gat in het celmembraan creëren waardoor de nucleïnezuren de cel kunnen binnendringen, of biochemische technieken, die 'pakketjes' vormen met de nucleïnezuren om de cellulaire opname te vergemakkelijken. Elk van deze technieken heeft verschillende voor- en nadelen die worden besproken, samen met hun potentieel voor toekomstige toepassingen.

Hoofdstuk 2 onderzoekt de prestaties van DOTAP:DOPE-lipoplexten, een biochemische techniek. Deze worden vergeleken met commercieel verkrijgbare lipide-gebaseerde transfectiekits voor de aflevering van nucleïnezuren aan hoornvliesendotheelcellen in celcultuur. Bovendien werden ze ook getest op endotheelcellen aanwezig op een runderhoornvlies, wat dient als een complexer model. Hoewel deze commercieel verkrijgbare lipide-gebaseerde transfectiekits vaak efficiënt zijn, zijn ze niet geschikt voor toepassingen in een klinische setting. Daarom worden DOTAP:DOPE-lipoplexten onderzocht als een alternatief met klinisch potentieel.

Hoofdstuk 3 onderzoekt een nieuwe fysieke techniek genaamd fotoporatie. Hier worden tijdelijke gaten in het celmembraan gemaakt door zeer korte (enkele miljardsten van een seconde) laserpulsen toe te passen op gouden nanodeeltjes die zich in de onmiddellijke nabijheid van het celmembraan bevinden. De efficiëntie en veiligheid van deze techniek zullen worden geëvalueerd op hoornvliesendotheelcellen gekweekt in een schaalte, maar ook op hoornvliesendotheelcellen aanwezig op runder- en zelfs menselijke hoornvliezen. Tot slot zullen we de prestaties ook onderzoeken in levende konijnen. Om dit te doen, hebben we deze gouden nanodeeltjes, samen met de nucleïnezuren, ingebed in een hyaluronzuur gel. Deze gel kan vervolgens eenvoudig in de voorste oogkamer worden geïnjecteerd om het hoornvliesendotheel te coaten. Na laserbestraling kan deze gel worden verwijderd. Dit is sterk vergelijkbaar met een procedure die wordt gebruikt tijdens cataractoperaties om het hoornvliesendotheel tegen mogelijke schade te beschermen.

Hoofdstuk 4 richt zich op een andere oorzaak van hoornvliesblindheid, namelijk microbiologische infecties van het hoornvlies. Meer specifiek richt het zich op een bijzonder ernstige infectie veroorzaakt door de *Acanthamoeba*-parasiet. Tijdens de infectiefase zijn deze *Acanthamoeba* aanwezig in hun actieve levensvorm, waarbij ze zich een weg 'eten' door het hoornvlies. Echter, wanneer ze worden geconfronteerd met medicatie of een ongunstige omgeving, transformeren ze in een slapende levensvorm met een beschermende dubbele wand. Deze levensvorm is extreem resistent tegen medicijnen en moeilijk uit te roeien, wat vaak resulteert in intensieve en lange behandelingen. In dit hoofdstuk zullen we een nieuw fysiek mechanisme onderzoeken om deze dubbelwandige slapende toestand specifiek te vernietigen. Meer specifiek creëren we een krachtige mechanische kracht die de wand verbrijzelt, waardoor de parasiet wordt gedood.

Ten slotte plaatst **Hoofdstuk 5** de bevindingen beschreven in dit proefschrift in de bredere internationale context. Het bespreekt ook hoe technieken voor de aflevering van nucleïnezuren voor het hoornvliesendotheel in de toekomst kunnen helpen bij de behandeling van hoornvliesblindheid. Daarnaast moeten nog verschillende uitdagingen worden aangepakt voordat deze strategieën kunnen worden geïmplementeerd in de klinische praktijk, waaronder regelgevende en economische uitdagingen.