

Molekulare Magnetresonanz- bildgebung der Angiogenese mittels anti-VEGFR- Eisenoxidpartikel-Konjugaten

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität

zu Kiel

vorgelegt von

Jennifer Wolter

Kiel
2004

Referent: Prof. Dr. rer. nat. U. Seydel

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. U. Hansen

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Februar 2005

Zum Druck genehmigt: Kiel,

Der Dekan

Für Lars

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
1 Einleitung und Zielsetzung	1
1.1 Abstract	1
1.2 Einführung in das Thema	3
2 Angiogenese als Target für die molekulare MR-Bildgebung	7
2.1 Angiogenesefaktor VEGF	8
2.2 Aufnahmemechanismen der Zelle	11
3 Theorie der Magnetresonanz-Tomographie	13
3.1 Präzession von Kernspins im konstanten Magnetfeld	13
3.2 Besetzung der Energieniveaus	14
3.3 Bloch-Gleichungen	15
3.4 Relaxationsmechanismen	17
3.4.1 Spin-Gitter-Relaxation	17
3.4.2 Spin-Spin-Relaxation	18
3.5 Echos	20
3.5.1 Freier Induktionszerfall und Inversion Recovery	20
3.5.2 Spinecho	20
3.5.3 Gradientenecho	22
3.5.4 Echo-Planare-Bildgebung	23
3.6 MR-Kontrastmittel	23
3.6.1 Magnetismus	23
3.6.2 Relaxationseffekte	26
3.6.3 Theoretische Vorüberlegungen	30
3.6.4 Relaxationsvorgänge bei MR-Messungen	31
3.6.5 Superparamagnetische Eisenoxidpartikel als Kontrastmittel	32
4 Materialien und Methoden	35
4.1 Materialien	35
4.1.1 Verwendete Chemikalien und Antikörper	35
4.1.2 Verwendete Eisenoxidpartikel	38
4.2 Qualitative Referenzverfahren	39
4.2.1 Transmissions-Elektronen-Mikroskopie	39
4.2.2 Histologische Färbetechniken	40
4.2.3 Dot-Spot-Test zur Detektion von Antikörpern an Eisenoxidpartikeln	41
4.3 Quantitative Referenzverfahren	42
4.3.1 Totalreflexions-Röntgenfluoreszenz Analyse	42
4.3.2 Quantifizierung der Antikörper mittels ^{125}I -Markierung	47
4.3.3 Messung der Suszeptibilitäten mit einer Faraday-Magnetwaage	49
4.3.4 Photometrische Bestimmung des Eisengehaltes von Magnetpartikeln	51

4.4	Molekularbiologische Methoden	53
4.4.1	Zellkultur	53
4.4.2	Kopplung von Antikörpern an Eisenoxidpartikel	54
4.5	Probenpräparation	55
4.5.1	Eisenoxidpartikel in Puffer (MRT)	55
4.5.2	Eisenoxidpartikel internalisiert in Zellen (MRT)	55
4.5.3	Spezifische und unspezifische Aufnahme (TRFA)	56
4.5.4	Spezifische und unspezifische Aufnahme an HUVE-Zellen (MRT)	56
4.5.5	Eisenoxidpartikel intrazellulär und an die Zellmembran angelagert	56
4.5.6	Konjugat intrazellulär und an den Rezeptor gebunden	57
4.6	MRT-Messung	57
4.7	Analyse-Methoden	58
4.7.1	Statistische Auswertung	58
4.7.2	Detektion von Signalveränderungen im MRT	58
5	Ergebnisse	61
5.1	Zelluläre Aufnahme von Eisenoxidpartikeln	61
5.1.1	Aufbau der Eisenoxidpartikel	62
5.1.2	Unspezifische Eisenaufnahme in U118-Zellen	63
5.1.3	Spezifische Aufnahme	64
5.1.4	Nachweis der VEGF-Rezeptoren an HUVE-Zellen	68
5.1.5	Vergleichende Analyse der verschiedenen Partikel und Zellen	73
5.2	MR-Kontrastverhalten von extra- und intrazellulären Eisenoxidpartikeln	75
5.2.1	Magnetische Eigenschaften der Eisenoxidpartikel	75
5.2.2	Relaxationseigenschaften von Eisenoxidpartikeln in Puffer	77
5.2.3	Relaxationseigenschaften von Eisenoxidpartikeln in und an Zellen	84
5.2.4	Vergleich der Relaxationseigenschaften von Eisenoxidpartikeln in Zellen und Puffer	96
5.2.5	Sensitivitätsabschätzung für Zellmarkierung mittels Eisenoxidpartikel	99
5.2.6	Zusammenfassung	103
6	Diskussion	105
6.1	Charakterisierung der Partikel	105
6.1.1	Aufbau der Partikel	105
6.1.2	Magnetische Suszeptibilität der Partikel	106
6.2	Relaxationseigenschaften der Eisenoxidpartikel	107
6.2.1	Vergleich der Relaxationseigenschaften internalisiert in Zellen und suspendiert in Puffer mit der Theorie	107
6.2.2	Relaxationseigenschaften von Eisenoxidpartikel intrazellulär und angelagert an die Zellmembran	110
6.2.3	Eisenoxidpartikel für die molekulare MR-Bildgebung	111
6.3	Spezifische und unspezifische Aufnahme von Eisenoxidpartikel	112
6.3.1	Unspezifische Aufnahme	112
6.3.2	Spezifische Aufnahme über die VEGF-Rezeptoren	113
6.3.3	VEGF-Rezeptoren als Target für die molekulare MR-Bildgebung	115
6.4	Signalunterschiede im MRT	117
6.4.1	In vitro	117
6.4.2	In vivo	118

7 Zusammenfassung und Ausblick	121
Anhang	125
A. Relaxationsraten der Eisenoxidpartikel	125
B. Theoretische Berechnung der Relaxivitäten	128
Literaturverzeichnis	129
Danksagung	139

Abkürzungsverzeichnis

Biochemie

anti-VEGFR	Antikörper gegen den VEGFR
BrCN	Bromzyan
BSA	Kälberserumalbumin (<i>bovine serumalbumin</i>)
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat
FKS	fötales Kälberserum
flk-1	<i>fetal liver kinase 1</i> (VEGFR-1)
flt-1	<i>fms-like tyrosine kinase 1</i> (VEGFR-1)
HCL	Salzsäure
HEPES	h-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseraddish peroxidase</i>)
HUVEC	Endothelzellen aus der Nabelschnur (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>)
K_d	Dissoziationskonstante
KDR	VEGFR-2 (<i>kinase insert domain containing receptor</i> , Flk-1)
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
PBA	<i>protein blocking agent</i>
PBS	Phosphate gepufferte Lösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PVDF	Polyvinyl-difluorid
SMC	<i>smooth muscle cell</i>
TBST	<i>tris-buffered saline tween</i>
Tris	tris(hydroxymethyl)-aminoethan
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	VEGF-Rezeptor

Physik

\vec{m}	magnetisches Dipolmoment (klassisch)
$\vec{\mu}$	magnetisches Dipolmoment (quantenmechanisch)
\vec{L}	Drehimpuls

\vec{B}	äußeres Magnetfeld
ω_L	Larmorfrequenz $\omega_L = 2\pi \cdot f_L$
γ	gyromagnetisches Verhältnis
\hbar	Planck'sches Wirkungsquantum ($= 6,626/2\pi \cdot 10^{-34}$ Js)
$E_{\uparrow\downarrow}$	Energieniveau (Spin up/down)
ΔE	Energiedifferenz
$n_{\uparrow\downarrow}$	Besetzungszahl der Energieniveaus
k	Boltzmann-Konstante ($= 1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K)
T	absolute Temperatur
\vec{M}	Magnetisierung
$\vec{B}(t)$	zeitliches Magnetfeld
$\vec{B}_1(t)$	magnetisches Wechselfeld (HF-Puls)
α	Drehwinkel
\vec{H}	Magnetfeld
μ	relative Permeabilität
μ_0	Permeabilitätskonstante ($= 4\pi \cdot 10^{-7}$ [Vs/Am])
$\Delta\omega_r$	Frequenzverschiebung
β	Schwächungsterm
χ	magnetische Suszeptibilität
δ	Dispersiver Term
φ_c	kritischer Winkel
τ_{CP}	Echozeit ($= T_E / 2$)
τ_D	charakteristische Diffusionszeit
τ	<i>delay time</i>
τ_R	Relaxationszeit eines Festkörpersystems
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
AES	Auger-Elektronen-Spektroskopie
CA	<i>contrast agent</i>
CLIO	<i>cross linked iron oxide</i>
CNR	Kontrast-zu-Rausch Verhältnis (<i>contrast-to-noise ratio</i>)
CPM	<i>counts per minute</i>
D	Diffusionskonstante
EPI	<i>echo planar imaging</i>
FFE	<i>fast field echo</i>
FID	<i>free induction decay</i>
FLASH	<i>fast low angle shot</i>

FOV	<i>field of view</i>
GE	Gradientenecho
HF	Hochfrequenz
ICP-MS	<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
ICP-OES	<i>inductively coupled plasma optical emission spectroscopy</i>
IR	<i>inversion recovery</i>
IR-SE	<i>inversion recovery spinecho</i>
K_{eff}	Anisotropie-Konstante
MION	<i>monocrystal iron oxide nanoparticles</i>
MR	Magnetresonanz
MNR	<i>motional narrowing Regime</i>
MRI	<i>magnetic resonance imaging</i>
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
Multi-SE	Multi-Spinecho
n	Brechungsindex
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
R_1	longitudinale Relaxationsrate (= $1/T_1$)
r_1	longitudinale Relaxivität
R_2	transversale Relaxationsrate (= $1/T_2$)
r_2	transversale Relaxivität
R_2^*	effektive transversale Relaxationsrate (= $1/T_2^*$)
r_2^*	effektive transversale Relaxivität
RFA	Röntgenfluoreszenz-Analyse
ROI	<i>region of interest</i>
SDR	<i>static dephasing Regime</i>
SE	Spinecho
SI	Signalintensität
Si(Li)	Silizium-Lithium
SIMS	Sekundär-Ionen Massenspektroskopie
SPECT	<i>single photon emission computer tomography</i>
SPIO	<i>superparamagnetic iron oxide</i>
T_1	longitudinale Relaxationszeit (Spin-Gitter-Relaxation)
T_2	transversale Relaxationszeit (Spin-Spin-Relaxation)
T_2^*	Effektive transversale Relaxationszeit
T_2'	durch Magnetfeldinhomogenitäten bedingte transversale Relaxation
T_c	Curie-Temperatur
T_E	Echozeit
TEM	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie
T_R	Repetitionzeit

TRFA	Totalreflektions-Röntgenfluoreszenz-Analyse
USPIO	<i>ultrasmall superparamagnetic iron oxide</i>

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Abstract

Molecular Imaging is a growing research discipline aimed at developing and testing novel tools, reagents and methods to image specific molecular pathways *in vivo*, particular those that are key targets in disease processes. Molecular imaging by Magnetic Resonance Imaging (MRI) depends on the development of superparamagnetic particles targeting specific molecules or cell types. Angiogenesis, the formation of new blood vessels from existing ones, is an essential step in the development, growth and metastasis of many human tumors. Often, the angiogenesis factor VEGF (vascular endothelial growth factor) is produced by tumors, and its receptors are overexpressed on endothelial cells during tumor-induced angiogenesis. The aim of this work is the development and testing of an iron oxide-antiVEGF-receptor-antibody-conjugate for molecular imaging of angiogenic processes.

Four major questions were addressed in this work: (i) How does the different iron oxide particles influence the signal behaviour in the MRI depending on increasing iron concentration of the particles? (ii) How many particles are needed to achieve a significant signal difference? (iii) How many particles are specifically (receptor-mediated) and non-specifically internalised under different incubation parameters in cellular model systems? (iv) Is the difference of specific and non-specific uptake high enough to induce a significant signal change for MRI *in vitro* and *in vivo*?

To answer these questions, the structures of the different iron oxide particles were investigated by Transmission Electron Microscopy (TEM). Their magnetism was measured with a Faraday-Balance. Furthermore, the relaxation behaviour of the iron oxide particles was investigated with MRI internalised in cells and suspended in saline buffer.

With regard to the second question, an iron oxide-antiVEGF-receptor-antibody conjugate was developed. The specific (receptor-mediated) and unspecific uptake in dependence on the incubation concentration and -time was investigated in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and in the glioblastoma cell line U118. The iron uptake of the cells was quantified using Total-Reflection-X-ray-Fluorescence analysis (TXRF).

In this work it is shown that endothelial cells can be specifically labelled with a newly developed iron oxide-VEGF-receptor-antibody conjugate. MRI *in vitro* can distinguish specific from unspecific labelling. Estimations show that this is also possible *in vivo*.

Molekulare Bildgebung ist ein stark wachsendes Forschungsfeld der letzten Jahre. Das Ziel ist hier die Entwicklung und Erprobung von neuen Methoden, Reagenzien und Werkzeugen zur Visualisierung von spezifischen molekularen Vorgängen *in vivo*, speziell Schlüsselprozesse in Krankheitsverläufen. Das Prinzip der Molekularen Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (MRT) beruht auf der Markierung eines spezifischen zellulären Targets durch superparamagnetische Partikel. Angiogenese, die Ausbildung von neuen Blutgefäßen aus bereits existierenden, ist ein essentieller Schritt in der Entwicklung und im Wachstum von vielen Tumoren. Der Angiogenesefaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*) wird von vielen Tumoren exprimiert. Seine Rezeptoren werden während der Angiogenese an Endothelzellen überexprimiert. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung und Untersuchung eines Eisenoxidpartikel-Antikörper-Konjugates für die molekulare MR-Bildgebung von angiogenetischen Prozessen.

Die zentralen Fragestellungen dieser Arbeit sind: (i) Wie beeinflussen verschiedene Eisenoxidpartikel intra- und extrazellulär bei wachsender Konzentration das Signal in der MRT? (ii) Wieviele Eisenoxidpartikel sind nötig, um eine signifikante Signaländerung *in vitro* mittels MRT zu detektieren? (iii) Wieviele Eisenoxidpartikel werden bei unterschiedlichen Inkubationsparametern spezifisch und unspezifisch von den Endothelzellen und den Tumorzellen aufgenommen? (iv) Ist der Unterschied zwischen spezifischer und unspezifischer Markierung groß genug, um eine signifikante Signaländerung im MRT *in vitro* und *in vivo* hervorzurufen?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden die verschiedenen Eisenoxidpartikel hinsichtlich ihres Aufbaus mittels Transmissions-Elektronen-Mikroskopie und ihrer magnetischen Eigenschaften mit einer Faraday-Waage untersucht. Das Relaxationsverhalten der Partikel in den erwarteten Umgebungen, also internalisiert in Zellen bzw. suspendiert in Puffer, wurde mittels Magnetresonanztomographie quantifiziert. Darüber hinaus wurde ein Eisenoxidpartikel-antiVEGF-Rezeptor-Antikörper-Konjugat entwickelt. Die unspezifische Aufnahme der Eisenoxidpartikel sowie die Rezeptor-induzierte Aufnahme des Konjugates in Abhängigkeit der Inkubationszeit und -konzentration an Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC) sowie an der Glioblastoma-Zelllinie U118 wurden untersucht. Die Eisenaufnahme der Zellen wurde durch Totalreflektions-Röntgenfluoreszenz-Analyse (TRFA) quantifiziert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass HUVE-Zellen spezifisch mit einem neu entwickelten Eisenoxidpartikel-VEGF-Rezeptor-Antikörper-Konjugat markiert werden können. Mittels MRT können die spezifisch markierten von den unspezifisch markierten Zellen *in vitro* unterschieden werden. Abschätzungen zeigen, dass dieses ebenfalls *in vivo* möglich ist.

1.2 Einführung in das Thema

Eine große Herausforderung der Tumordiagnostik ist die Diagnose von Tumoren in ihrem Anfangsstadium, wenn sie also noch sehr klein sind. Allerdings können mit den gängigen klinischen Verfahren wie Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) und Röntgen Tumore erst ab einer bestimmten Größe und damit in einem fortgeschrittenen Stadium sichtbar und symptomatisch werden. Beispielsweise werden nur 40% der Pankreaskarzinome, die kleiner als 2 cm sind, im MRT erkannt (Pauls et al., 2003). Eine weitere diagnostische Herausforderung betrifft die Nachsorge von Patienten nach radikaler Operation: Im Bereich der Tumorresektion findet sich häufig Narbengewebe, das nicht immer eindeutig von vitalem Tumorgewebe zu unterscheiden ist, dies trifft auch für die Nachsorge nach Chemo- sowie Strahlentherapie zu. Die frühe Erkennung sowohl des Tumors selber als auch eines Rückfalles kann sich unter Umständen als sehr schwierig wenn nicht unmöglich erweisen. Als eine Lösung für diese Problematik bietet sich die molekulare Bildgebung an.

Die molekulare Bildgebung kann als *in vivo* Messung und Charakterisierung von biologischen Prozessen auf zellulärer und molekularer Ebene definiert werden (Alfke et al., 2000; Fleige et al., 2000; Alfke et al., 2001; Hogemann et al., 2001; Weissleder und Mahmood, 2001). Im Prinzip basiert die molekulare Bildgebung auf den gleichen grundlegenden molekularbiologischen Techniken, wie sie seit einem Jahrzehnt in der *in vitro* Diagnostik (z. B. Histologie) üblich sind. Rezeptoren und Liganden, welche mit einem gut darstellbaren Kontrastmittel gekoppelt sind, lagern sich spezifisch an den Tumor oder ein anderes Target an und können so für die Bildgebung genutzt werden. Voraussetzungen bei diesem Verfahren sind eine möglichst hohe spezifische Signaländerung am Target im Verhältnis zur unspezifischen Signaländerung des umliegenden Gewebes sowie eine möglichst einfache Zugänglichkeit des Kontrastmittels zum Target.

Als Target für die molekulare Bildgebung von Tumoren bietet sich die Tumorangiogenese an. Hierbei bildet der Tumor durch Ausschüttung von Wachstumsfaktoren neue Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen, um so seine Versorgung zu sichern und sein Wachstum zu ermöglichen (Augustin, 2003). Dieses Verhalten des Tumors beginnt bereits bei einer Größe von 1 mm³ (Bremer et al., 2001). Diese kleinen Tumore sind mit gängigen klinischen Verfahren noch nicht sichtbar. Als spezifisches zelluläres Target für die molekulare Bildgebung der Angiogenese können die Rezeptoren des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) genutzt werden. VEGF bezeichnet einen bei Angiogenese vorkommenden Wachstumsfaktor, welcher an Endothelzellen die Expression seiner Rezeptoren stark hoch reguliert. Da die Endothelzellen die Gefäßwände auskleiden, sind die VEGF-Rezeptoren für ein spezifisches Kontrastmittel über die Blutbahn leicht zugänglich. In den letzten Jahren sind überdies eine Fülle verschiedener anti-

angiogenetischer Therapieansätze entwickelt und in mehr als 25 klinischen Studien untersucht worden (Folkman, 1995; Bremer et al., 2001; Folkman et al., 2001; Folkman, 2002). Eine spezifische Bildgebung, welche Angiogenese visualisiert, wäre hierbei für die Therapiekontrolle gut einsetzbar.

Für die Bildgebung können verschiedenste Techniken angewandt werden. Die wichtigsten sind: Positronen-Emissions-Tomographie (PET), *single photon emission computer tomography* (SPECT), MRT, Lumineszenz und Fluoreszenz. Die MRT ist bezüglich der Detektion spezifischer Substrate weniger sensitiv als andere Verfahren und kann 10^{-4} – 10^{-6} molare Substrate detektieren. Mit der PET beispielsweise ist eine Detektion von 10^{-12} molaren Substraten möglich. Vorteilhaft ist allerdings die deutlich bessere räumliche Auflösung im MRT, die in der Schichtebene bereits bei klinisch eingesetzten Geräten im Bereich von μm (statt mm beim PET) liegt. Ein anderer Vorteil der MRT ist die gleichzeitige Beurteilung der anatomischen Struktur und somit die genaue räumliche Lokalisation des Tumors. Um die wesentlich bessere räumliche Auflösung der MRT und die Korrelation mit anatomischen Strukturen nutzen zu können, beschäftigen sich einige Arbeitsgruppen mit der Entwicklung von spezifischen MR-Kontrastmitteln. Diese Kontrastmittel werden eingesetzt, um die Expression von endothelzellenspezifischen Proteinen wie E-Selectin (Kang et al., 2002) oder anderen Tumormarkern wie die Transferinrezeptoren sichtbar zu machen (Hogemann-Savellano et al., 2003). Auch lassen sich verschiedenartige Zellen, die ein gemeinsames spezielles Merkmal aufweisen, selektiv darstellen. Beispielsweise können apoptotische Zellen anhand von an Eisenoxid gekoppeltem Synaptotagmin I (C_2 -Domäne) (Zhao et al., 2001) oder Annexin V (Schellenberger et al., 2002) von gesunden, nicht absterbenden Zellen mittels Magnetresonanztomographie (MRI) *in vitro* und *in vivo* (Tiermodell) differenziert werden.

Die Kontrastmittel benötigen die Eigenschaft bei sehr geringen Konzentrationen bereits eine große Kontraständerung an ihrem Zielort hervorzurufen. Dazu wurden bisher insbesondere Dextran-ummantelte Eisenoxidkristalle (MION, *monocrystalline iron oxide nanoparticles*; CLIO, *cross-linked iron oxide*) genutzt, aber auch Gadolinium basierte Kontrastmittel finden in der Molekularen MR-Bildgebung ihre Anwendung. Alle MR-Kontrastmittel, sowohl gadoliniumhaltige Verbindungen als auch Eisenoxid basierte, verkürzen gleichzeitig die longitudinale und die transversale Relaxationszeit der Wasserprotonen ihres umgebenden Gewebes, wobei Eisenoxide die transversale Relaxationszeit wesentlich stärker reduzieren als gadoliniumhaltige Substanzen. Es muss also eine wesentlich höhere Konzentration an gadoliniumhaltigem als an eisenhaltigem Kontrastmittel eingesetzt werden, um die gleiche Signalreduktion zu erhalten. Die theoretische Beschreibung der Relaxationsmechanismen der als MR-Kontrastmittel verwendeten Eisenoxid-Partikel werden seit über 15 Jahren untersucht (Gillis und Koenig, 1987; Josephson et al., 1988; Majumdar et al., 1988; Kennan et al., 1994;

Yablonskiy und Haacke, 1994; Bulte et al., 1999; Gillis et al., 1999; Brooks et al., 2001; Brooks, 2002; Gillis et al., 2002; Gossuin et al., 2002). Trotzdem geben sie weiterhin noch Rätsel auf. Physikalisch betrachtet, erfolgt die Dephasierung der Wasserprotonen und damit die Signalmindernug durch stochastisch fluktuierende Störfelder, die durch das Eisen hervorgerufen werden. Es existieren für einzelne Bereiche Lösungen, beispielsweise für Bereiche mit sehr schnellen (*motional narrowing regime*) und sehr langsamen Magnetfeldfluktuationen (*static dephasing regime*). Die für den jeweiligen Bereich geltenden Formeln sind aber nicht auf die anderen Bereiche übertragbar. In einem biologischen System ist der Übergang der verschiedenen Bereiche bei steigender Eisenkonzentration fließend, da die Relaxationseigenschaften von der Magnetisierung der Partikel, die sich durch Clusterbildung in Zellen verändern, der Diffusion der Wasserprotonen sowie der Größe der Eisenpartikel bzw. der Cluster abhängen. Dies macht einen Vergleich mit der Theorie schwierig.

Sehr kleine Eisenoxidpartikel (10–100 nm) bieten aus zwei Gründen gute Voraussetzungen für rezeptor- und antikörpervermittelte Kontrastierung bzw. Zellmarkierung. Zum einen können an das Hüllenmaterial Antigene oder Antikörper gebunden werden, wobei der Gesamtdurchmesser der Partikel klein genug bleibt, um von Zellen internalisiert zu werden. Zum anderen können die Partikel durch ihre hohen Relaxivitäten, welche auch von der Partikelgröße abhängen (Muller et al., 1991; Pouliquen et al., 1992; Chouly et al., 1996), noch in geringen Konzentrationen mit dem MRT nachgewiesen werden. Im Zellexperiment wurde gezeigt, dass mehr Eisen durch große Partikel aufgenommen werden kann, als durch kleine Partikel (Metz et al., 2004). Um eine für die intravenöse Injektion geeignete Präparation von eisenoxidhaltigen Kontrastmitteln zu erhalten, müssen die Partikel mit einer Umhüllung versehen werden, da Eisenoxid in größeren Konzentrationen toxisch wirken kann. In größeren Partikeln bilden Eisenoxidkristalle zusammen mit dem Hüllmaterial Konglomerate mit bis zu mehreren 100 nm Durchmesser (polykristalline Partikel). Bei sehr kleinen Partikeln <20 nm sind einzelne Kristalle separat mit dem Hüllmaterial beschichtet (monokristalline Partikel). Als Hüllmaterialien wurden bislang Polymere wie Dextran, Carboxydextran, Albumin, Stärke, Polyethylenglycol oder eine liposome Umhüllung verwendet (Taupitz et al., 2003). Vom Hüllmaterial und der Größe der Partikel hängt entscheidend die Aufnahme der Partikel in die Zelle ab (Pouliquen et al., 1992; Chouly et al., 1996; Roser et al., 1998; Billotey et al., 2003, Metz et al., 2004). Im Vergleich zum im Körper vorhandenen Eisen sind diagnostische Dosierungen von ca. 10–50 $\mu\text{mol Fe/kg}$ gering und entsprechen ca. 5–20 % der Gesamteisenmenge im Körper. Nach intravenöser Injektion werden die Partikel im Körper abgebaut (Weissleder et al., 1989).

Mit gadoliniumhaltigen Kontrastmitteln wird eine andere Strategie für die molekulare Bildgebung verfolgt, da die Gadolinium-Chelate sehr groß sind (>250 nm). Die Gruppe um Gregory Lanza und Samuel Wickline hat Gd-Perfluorcarbon-Nanopartikel entwickelt, welche

über eine Biotin-Avidin-Bindung leicht an Antikörper gebunden werden können. Die Antikörper sind jeweils spezifisch gegen verschiedene molekulare Epitope auf Zelloberflächen gerichtet, beispielsweise gegen den *smooth muscle cell* (SMC) Gewebe-Faktor, um Angiogenese bei früher Arteriosklerose zu detektieren (Morawski et al., 2004), das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (Anderson et al., 2000) oder gegen arteriosklerotischen Plaque (Flacke et al., 2001; Winter et al., 2003). Diese Konjugate werden also von der Zelle nicht internalisiert, sondern binden an der Zelloberfläche.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung und Untersuchung eines Eisenoxidpartikel-Anti-VEGFR-Konjugates für die molekulare MR-Bildgebung von angiogenetischen Prozessen. Die zentralen Fragestellungen sind dabei:

- (i) Wie beeinflussen verschiedene Eisenpartikel intra- und extrazellulär bei wachsender Konzentration das Signal?
- (ii) Wieviele Eisenpartikel sind nötig, um eine signifikante Signaländerung *in vitro* im MRT zu erzielen?
- (iii) Wieviele Eisenpartikel werden bei unterschiedlichen Inkubationsparameter spezifisch und unspezifisch von den Endothelzellen und den Tumorzellen aufgenommen?
- (iv) Ist der Unterschied zwischen spezifischer und unspezifischer Markierung groß genug, um eine signifikante Signaländerung im MRT *in vitro* und *in vivo* hervorzurufen?

Die Arbeit ist wie folgt strukturiert: Zunächst wird im Kapitel 2 in die Angiogenese und den Wachstumsfaktor VEGF eingeführt. Die Grundlagen der Magnetresonanz-Tomographie werden in Kapitel 3 erläutert. Abschnitt 3.6 befasst sich mit Magnetismus, der Relaxationstheorie und dem Aufbau von den verwendeten Eisenoxidpartikeln. In Kapitel 4 werden die verwendeten Materialien aufgelistet, die verschiedenen qualitativen und quantitativen Referenzverfahren erläutert sowie die Probenpräparation, die Herstellung des Eisenpartikel-Antikörper-Konjugates und die MRT-Messungen dargestellt. Die Ergebnisse der Untersuchungen der Relaxationseigenschaften verschiedener Eisenoxidpartikel intra- und extrazellulär, der spezifische und unspezifischen Aufnahme bei unterschiedlichen Inkubationsparametern sowie die Untersuchung des Kontrastverhaltens im MRT sind in Kapitel 5 zusammengefasst. In Kapitel 6 werden die Ergebnisse diskutiert und mit anderen Arbeiten auf dem Gebiet der molekularen Bildgebung verglichen.

2 Angiogenese als Target für die molekulare MR-Bildgebung

Zunächst wird in diesem Kapitel das Target für die molekulare MR-Bildgebung vorgestellt, die Angiogenese. Als Angiogenese bezeichnet man ganz allgemein den Vorgang, bei dem neue Blutgefäße aus bereits bestehenden hervorgehen. Die Bildung neuer Blutgefäße ist ein physiologischer Prozess in der Embryonalentwicklung und während des Wachstums. Die Angiogenese findet beim Erwachsenen jedoch nur selten in normalen, häufig aber während pathologischer Vorgänge statt. Ein Beispiel für eine notwendige Angiogenese bei Erwachsenen ist die Wundheilung, für eine de-regulierte Angiogenese, die rheumatoide Arthritis oder die Gefäßneubildungen in Tumoren (Carmeliet und Jain, 2000).

Das Wachstum von Tumorgewebe ist abhängig von einer ständigen Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen. Ab einem Durchmesser von ca. 1 mm^3 kann ein Tumor nicht mehr durch reine Diffusion versorgt werden, so dass seine weitere Entwicklung von einer vaskulären Versorgung abhängig wird. In einem Prozess, welcher als Neoangiogenese bezeichnet wird, sprießen neue Kapillaren in den Tumor ein. Ein Gefäßnetz zur Tumorversorgung bildet sich aus (Abbildung 1).

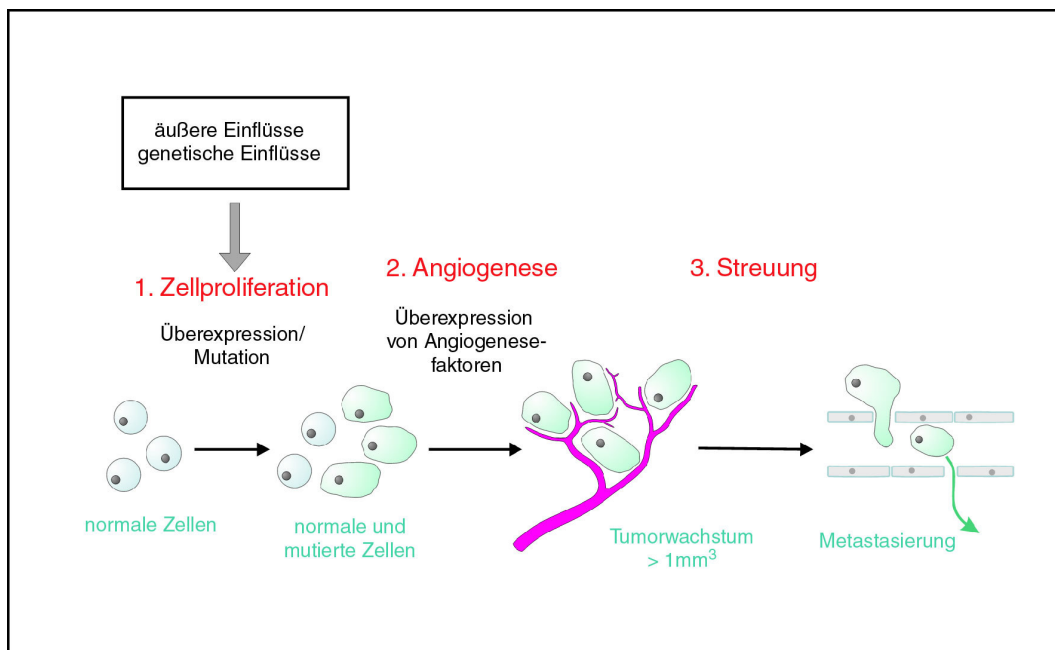


Abbildung 1: Durch verschiedenste Einflüsse fangen normale, gesunde Zellen an zu mutieren. Sie bilden zu ihrer Versorgung Gefäße aus (Angiogenese). Hierbei werden Angiogenesefaktoren wie beispielsweise das VEGF verstärkt ausgeschüttet. Dies wiederum regt das Tumorstadium an. Der letzte Schritt ist die Metastasierung des Tumors.

Bei diesem Vorgang spielen Angiogenesefaktoren eine entscheidende Rolle. Angiogenesefaktoren werden während der Embryonalentwicklung, von entzündlichem oder malignem Gewebe gebildet. Sie wirken auf Endothel- oder glatte Muskelzellen und steuern damit die Neubildung von Gefäßen. 1971 wurde der erste Angiogenesefaktor von Judah Folkman beschrieben (Folkman, 1971; Folkman et al., 1971). Folkman postulierte daraufhin, dass die Blockierung der Angiogenese eine mögliche Strategie darstellt, um Tumorwachstum zu unterbinden. Diese Möglichkeit verursachte eine rasante Entwicklung der Angiogeneseforschung. Mit der Zeit haben sich zwei Hauptbereiche in der Erforschung der Angiogenesefaktoren herauskristallisiert: Der erste Bereich umfasst die Untersuchung der Angiopoietin und ihrer Tie-Rezeptoren (Loughna und Sato, 2001; Thurston, 2003), der zweite Bereich den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und seine Rezeptoren (VEGFR-1 und 2).

2.1 Angiogenesefaktor VEGF

Bis heute wurden sechs unterschiedlich wirkende VEGF-Faktoren identifiziert: VEGF-A, -B, -C, -D, -E und PlGF (Ferrara und Davis-Smyth, 1997; Veikkola et al., 2000). Der wichtigste Faktor unter ihnen ist das VEGF-A, welches bei jeglicher Form der Angiogenese in verschiedenen Kombination mit anderen VEGF-Faktoren vorkommt. Bei der Herzentwicklung beispielsweise kommt das VEGF-B in Kombination mit VEGF-A vor, bei der Lymphgefäßbildung VEGF-C und VEGF-D (Ferrara und Davis-Smyth, 1997; Ferrara et al., 2003). VEGF-E dagegen ist viral und hat ein hohes angiogenetisches Potenzial. VEGF-A bildet mit PlGF (*placenta growth factor*) Heterodimere, welche geringere mitogene Eigenschaften als das VEGF Homodimer haben. Dies bedeutet, dass die biologischen Eigenschaften des VEGFs durch das PlGF negativ beeinflusst bzw. gehemmt werden (Robinson und Stringer, 2001).

VEGF-A ist ein dimeres Glycopeptid mit einer Länge von 45 kDa, dessen Monomere über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind (Abbildung 2). Für das humane VEGF-A existieren sechs verschiedene Formen, welche sich durch ihre Länge (121 bis 206 Aminosäuren) unterscheiden. Diese Splicevarianten haben unterschiedliche biologische Bedeutungen. So sind VEGF-A₁₂₁ und VEGF-A₁₆₅ weitgehend frei diffusibel und haben ein hohes angiogenetisches Potenzial. Die längeren Splicevarianten (z.B. VEGF-A₁₈₉) hingegen binden an so genannte Bindungsproteine (Heparansulfat und Proteoglycane). Sie sind somit weniger diffusibel und haben ein geringeres angiogenetisches Potenzial (Robinson und Stringer, 2001).

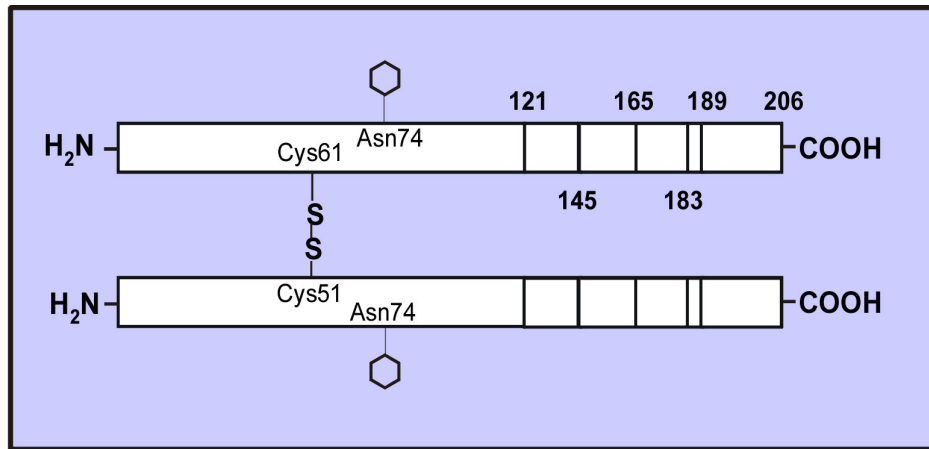


Abbildung 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Spliceformen des VEGF-A. Das VEGF-A besteht aus zwei über eine Disulfidbrücke verknüpften Polypeptidketten. Gezeigt sind die unterschiedlich langen Aminosäureketten der Splicevarianten und die Glykosylierungsstellen .

In den meisten gesunden Organsystemen spielt VEGF nur bei der Gefäßbildung und während der Embryonalentwicklung eine Rolle. Physiologisch tritt es im ausgewachsenen Organismus nur sehr selten in Erscheinung. Zu diesen seltenen Ausnahmen zählen die Prozesse der Wundheilung und regelmäßig wiederkehrende Gefäßbildungen im Rahmen des Menstruationszyklus (Ravindranath et al., 1992; Cullinan-Bove und Koos, 1993). Bei pathologischen Prozessen hingegen wird VEGF häufig wieder reexprimiert: Dies ist bei Entzündungsprozessen, wie z. B. der rheumatoiden Arthritis, der Arthrose (Koch et al., 1994) sowie unter Hypoxie (Isner und Losordo, 1999; Losordo et al., 1999) oder von bestimmten Tumoren der Fall. Insbesondere Glioblastome gehören zu den Tumoren, die permanent VEGF bilden, wobei die Expression durch Hypoxie oder durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren oder Cytokinen noch gesteigert wird. Gemessen an anderen Angiogenesefaktoren wirkt VEGF relativ spezifisch auf Endothelzellen (Ferrara und Davis-Smyth, 1997), indem es deren Proliferation anregt und die Permeabilität erhöht.

Für die Vermittlung der Effekte des VEGF sind im Wesentlichen zwei der insgesamt vier bekannten VEGF-Rezeptoren (VEGFR) verantwortlich: VEGFR-1 und VEGFR-2. Nur diese beiden Rezeptoren binden alle Splicevarianten des VEGF-A (siehe Abbildung 3). Der VEGFR-3 (synonym: flt-4) hingegen bindet ausschließlich die Isoformen VEGF-C und VEGF-D. Der Rezeptor Neuropilin-1 (NP-1) bindet VEGF-B, -E, PIGF und lediglich die VEGF-A-Splicevariante VEGF-A₁₆₅. Um das VEGF-A zu binden, stehen somit nur die VEGF-Rezeptoren 1 und 2 zur Verfügung. VEGFR-1 wird auch als flt-1 (*flt-like tyrosine kinase*) und VEGFR-2 als KDR (*kinase insert domain containing receptor*) bzw. flk-1 (*fetal liver kinase*) (de Vries et al., 1992; Terman et al., 1992) bezeichnet. VEGFR-1 und -2 gehören zu der Familie der Tyrosinkinaserzeptoren. Sie sind aus sieben immunoglobulinartigen extrazellulären Domänen,

einer Transmembranregion sowie einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne aufgebaut (Abbildung 3). Diese ist wiederum durch eine Kinase-Insert-Domänen unterbrochen. Der VEGFR-1 hat eine etwas höhere Affinität zum VEGF-A₁₆₅ ($K_d = 10\text{--}20\text{ pM}$) (de Vries et al., 1992) als der VEGFR-2 ($K_d = 75\text{--}125\text{ pM}$) (Terman et al., 1992).

Die Bindung eines VEGF-Dimers an einen Rezeptor führt zur Dimerisierung zweier Rezeptoren, die sich dabei an der intrazellulären Domäne gegenseitig an Tyrosinresten phosphorylieren. Dieser Vorgang wird auch Autophosphorylierung genannt. Die Phosphorylierungen dienen intrazellulären, SH2-Domänen-tragenden Signalproteinen als Bindungsstellen. Diese Signalproteine leiten die durch die Ligandenbindung induzierte Signalkaskade ein.

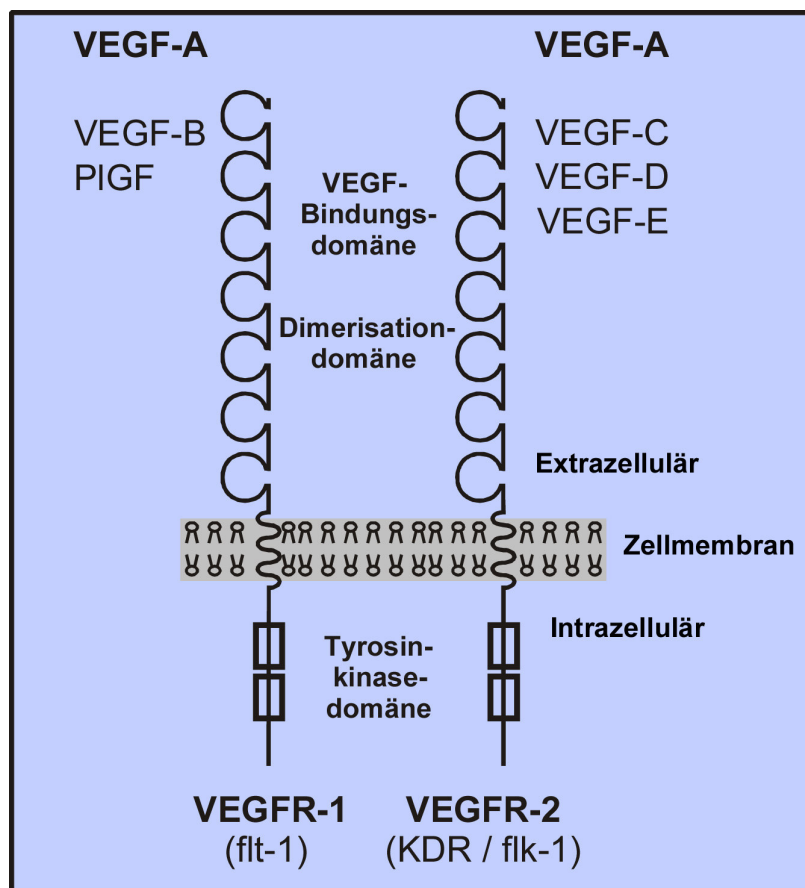


Abbildung 3: Schematische Darstellung der VEGF-Rezeptoren-1 und -2 mit ihren potenziellen Liganden. Beide Rezeptoren gehören zu der Familie der Tyrosinkinaserzeptoren. Sie sind aus sieben immunglobulinartigen extrazellulären Domänen, einer Transmembranregion und einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne aufgebaut. Diese wird durch eine Kinase-Insert-Domänen unterbrochen.

Es können Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die dann das Signal in eine Zellantwort umschreiben. Als Folge wird die Expression bestimmter Gene, die Proliferation der Zellen oder ihre Chemotaxis induziert. Der Ablauf einer solchen Signalkaskade ist dabei nicht einheitlich,

sondern variiert bei verschiedenen Zelltypen und ist meist weit verzweigt. Die Expression der VEGF-Rezeptoren wird durch VEGF, verschiedene andere Cytokine und Hypoxie unterschiedlich reguliert. VEGFR-1 und VEGFR-2 werden vorwiegend an Endothelzellen exprimiert. Sie kommen aber auch an einigen wenigen anderen Zellen vor. So wird von Monozyten bzw. Makrophagen VEGFR-1 (Barleon et al., 1996), von hämatopoietischen Zellen VEGFR-2 (Katoh et al., 1995) und von ein paar einzelnen Tumor-Zellen, wie z. B. Melanoma-Zellen oder Glioblastomazellen, VEGFR-1 oder -2 exprimiert (Gitay-Goren et al., 1993; Mentlein et al., 2004).

2.2 Aufnahmemechanismen der Zelle

Zellen nehmen Partikel und Moleküle durch Endozytose auf (Alberts et al., 1995; Mellman, 1996). Hierbei stülpen sich lokalisierte Abschnitte der Plasmamembran nach innen ein, schnüren sich ab und bilden endozytotische Vesikel (Abbildung 4). Die aufgenommenen Partikel und Moleküle gelangen letztlich in die Lysosomen, wo sie abgebaut werden. Endozytose kann entweder konstitutiv ablaufen oder aber als Reaktion auf extrazelluläre Signale. Je nach Größe der gebildeten endozytotischen Vesikel unterscheidet man zwei Haupttypen der Endozytose: die Pinozytose und die Phagozytose. Durch Pinozytose werden Flüssigkeiten und gelöste Substanzen in kleinen Vesikeln (Durchmesser ≤ 150 nm) aufgenommen. Durch Phagozytose gelangen größere Partikel, wie z.B. Mikroorganismen und Zelltrümmer, über große Vesikel (Phagosomen, Durchmesser > 250 nm) in die Zellen. Die meisten Zellen nehmen ständig Flüssigkeiten und gelöste Stoffe durch Pinozytose auf. Große Partikel dagegen werden hauptsächlich von spezialisierten, phagozytierenden Zellen, wie z.B. Makrophagen oder Leukozyten, aufgenommen.

In vielen Zellen ist die Endozytose so ausgedehnt, dass ständig ein großer Teil der Plasmamembran nach innen gelangt. Die Bestandteile der Plasmamembran (Proteine und Lipide) werden kontinuierlich in einem umfangreichen Endozytose-Exozytose-Zyklus an die Zelloberfläche zurückgebracht. Der endozytotische Zyklusteil beginnt mit dem Abschnüren von clathrinbedeckten Vesikeln. Viele Zelloberflächen-Rezeptoren, die bestimmte extrazelluläre Makromoleküle binden, sammeln sich in den mit Clathrin bedeckten Pits (Ausbuchtungen in der Zellmembran) und werden in so genannten *coated vesicles* in die Zelle befördert. Alternativ besteht eine spezifische Endozytose über Caveolae, kleine endozytotische Vesikel, welche durch das Protein Caveolin gekennzeichnet sind. Diese Vorgänge werden als Rezeptor-induzierte Endozytose bezeichnet.

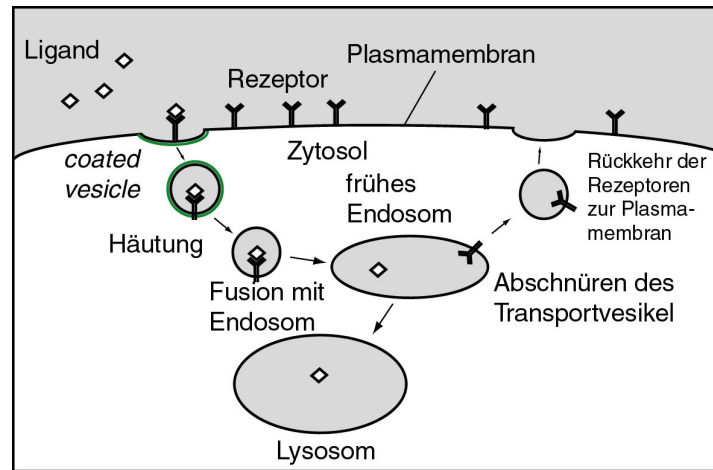


Abbildung 4.: Der Ligand bindet an einen Rezeptor und wird durch ein *coated vesicle* internalisiert. Im frühen Endosom werden Rezeptor und Ligand separiert. Der Rezeptor kehrt an die Zelloberfläche zurück und der Ligand wird im Lysosom abgebaut (nach Alberts et al., 1995).

Durch die Rezeptor-induzierte Endozytose werden bestimmte Makromoleküle selektiv angereichert. Der Wirkungsgrad, mit der einzelne Liganden aufgenommen werden, kann um das 1000fache gesteigert werden. Auf diese Weise können selbst schwach konzentrierte Bestandteile der extrazellulären Flüssigkeit spezifisch in großer Menge aufgenommen werden. Dies bedeutet, dass der Vorgang der Endozytose auch als unspezifische Aufnahme und die Rezeptor-induzierte Endozytose als spezifische Aufnahme bezeichnet werden kann.

Die endozytotischen *coated vesicles* verlieren schnell ihre Clathrinhülle und verschmelzen mit frühen Endosomen. Das frühe Endosomenkompartiment ist die wichtigste Sortierstelle auf dem Endozytose-Transportweg. Die meisten Liganden dissoziieren im sauren Milieu der Endosomen von ihren Rezeptoren und landen schließlich in den Lysosomen, während die Rezeptoren von Transportvesikeln teilweise wieder an die Zelloberfläche gebracht und dort erneut verwendet werden. Die Rezeptor-Liganden-Komplexe können vom Endosomen-Kompartiment aus auch anderen Wegen folgen. In manchen Fällen werden Rezeptor und Ligand in den Lysosomen abgebaut und reduzieren so die Rezeptorexpression an der Zelloberfläche. In anderen Fällen (z.B. bei *low density* Lipoproteinen, LDL) werden beide zu einer anderen Domäne in der Plasmamembran befördert. Der Ligand wird schließlich durch Exozytose an einer Stelle der Zelloberfläche freigelassen, die sich von seinem Ursprungsort unterscheidet.

3 Theorie der Magnetresonanz-Tomographie

Die Grundlagen der Magnetresonanzbildgebung wurden 1946 mit der Entdeckung der Kernresonanz durch Felix Bloch (Bloch et al., 1946) und Edward Purcell (Purcell et al., 1946) gelegt. Erst in den 70er Jahren fanden die ersten bildgebenden Experimente durch Paul Lauterbur (Lauterbur, 1973) und Peter Mansfield (Mansfield und Maudsley, 1976; Mansfield et al., 1978) statt, wofür sie im Jahre 2003 den Medizin-Nobelpreis erhielten (Ringertz et al., 2003). Heutzutage hat die Magnetresonanzbildgebung den Einzug in die klinische Routine vollzogen und ist aus dem klinischen Alltag nicht mehr weg zu denken. In diesem Abschnitt soll zunächst auf die Grundlagen der MR-Tomographie eingegangen werden, d.h. es werden die Blochgleichungen entwickelt sowie die Relaxationszeiten, das Spin- und das Gradientenecho eingeführt.

Das Grundlagenprinzip der Magnetresonanz-Tomographie (MRT) basiert auf dem Phänomen der Kernspinresonanz von Wasserstoffkernen in einem statischen äußeren Magnetfeld (Dössel, 2000; Vlaardingerbroek und den Boer, 2003). Die Wechselwirkung der Protonenspins mit einem magnetischen Wechselfeld erzeugt eine dynamische Änderung des Zustandes des Gesamtsystems, welches mit geeigneten Detektoren nachgewiesen werden kann und Rückschlüsse auf das signalerzeugende Objekt zulässt. Die MRT beruht auf der Detektion von magnetischen Resonanzsignalen der Wasserstoffkerne in einem äußeren Magnetfeld nach Einstrahlung eines Hochfrequenzpulses. Die Signalintensität und damit der Bildkontrast ist eine Funktion der Kernspindichte und der Relaxationszeiten.

3.1 Präzession von Kernspins im konstanten Magnetfeld

Ein Proton mit Spin $\frac{1}{2} \hbar$ (\hbar , Planck'sches Wirkungsquantum) besitzt ein magnetisches Dipolmoment \vec{m} und kann klassisch als magnetischer Kreisel betrachtet werden. Befindet sich das Proton nun in einem äußeren Magnetfeld $\vec{B}_0 = (0, 0, B_z)$, fängt es an, um die z-Achse des Feldes mit $\omega_L = \gamma \cdot B_z$ zu präzidieren. Hierbei wird mit $\gamma = \vec{m} / \vec{L}$ das gyromagnetische Verhältnis definiert, das sich aus dem Verhältnis des Dipolmomentes \vec{m} zum Drehimpuls \vec{L} ergibt. ω_L bezeichnet man auch als die Larmorfrequenz. Für Protonen ergibt sich $\gamma = 2\pi \cdot 42,577$ MHz/Tesla.

Aus der Definition des Drehimpulses $\vec{L} = I \cdot \vec{\omega}$, mit I dem Trägheitsmoment, und der allgemeinen Bewegungsgleichung rotierender Körper $\vec{T} = \frac{d\vec{L}}{dt}$, mit \vec{T} dem Drehmoment, kann folgende Bewegungsgleichung für den Kernspin im Magnetfeld abgeleitet werden:

$$\vec{m} \times \vec{B} = \frac{d\vec{L}}{dt} \quad (3.1)$$

3.2 Besetzung der Energieniveaus

Nach den Grundgesetzen der Quantenmechanik kann ein Spin-1/2-Teilchen in einem Magnetfeld $\vec{B}_0 = (0, 0, B_z)$ zwei unterschiedliche Energieniveaus annehmen:

$$E_{\downarrow} = \frac{\hbar\omega_L}{2} \quad \text{und} \quad E_{\uparrow} = -\frac{\hbar\omega_L}{2}$$

Die Energiedifferenz dieser beiden quantenmechanisch zulässigen Energieniveaus beträgt damit (Abbildung 5): $\Delta E = \hbar\omega_L$ (3.2)

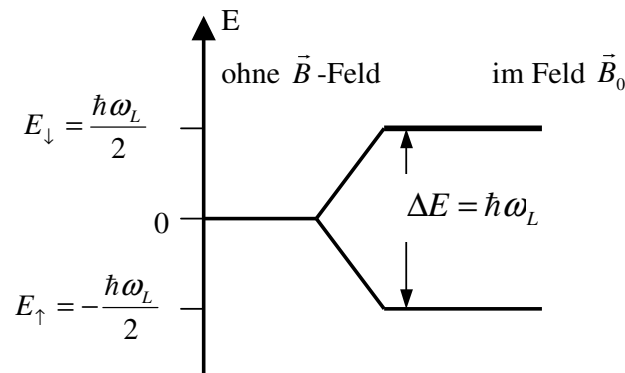


Abbildung 5: Energieniveaus eines Spin-1/2 Teilchens im äußeren homogenen Magnetfeld.

Betrachtet man nun die Besetzung der beiden Energieniveaus in einem Ensemble von n Protonenspins, so ergibt sich im thermischen Gleichgewicht das Verhältnis der Besetzungen der beiden Energieniveaus nach Boltzmann zu

$$\frac{n_{\uparrow}}{n_{\downarrow}} = e^{(\Delta E/kT)} \approx 1 + \frac{\Delta E}{kT}, \quad (3.3)$$

wobei n_{\downarrow} und n_{\uparrow} die Besetzungszahlen der beiden Zustände, k die Boltzmannkonstante und T die absolute Temperatur ist. Bei Zimmertemperatur ergibt sich bei einem MR-Tomographen mit 1 T Feldstärke für den relativen Besetzungsunterschied $n_{\uparrow}/n_{\downarrow}$ ein Wert in der Größenordnung von $1 + 6,6 \cdot 10^{-6}$. Es ist also lediglich ein kleiner Überschuss (6,6 ppm) Protonenspins ausgerichtet. Aus diesem kleinen Überschuss resultiert in einem makroskopischen Objekt eine messbare Magnetisierung, welche die Grundvoraussetzung für die MRT darstellt. Auch erklärt er die gegenüber anderen Methoden geringe Sensitivität der MRT.

3.3 Bloch-Gleichungen

Die Vektorsumme aller magnetischen Momente in einem Volumenelement v bezogen auf

dessen Größe heißt Magnetisierung \vec{M} :

$$\vec{M} = \frac{d\vec{m}}{dv} \quad (3.4)$$

Die zeitliche Entwicklung der Magnetisierung eines Spin-1/2-Systems in einem zeitlich variablen Magnetfeld $\vec{B}_0(t) = (0, 0, B_z(t))$ kann mit Hilfe von Gl. 3.1, 3.4 und $\gamma = \vec{m}/\vec{L}$ wie folgt beschrieben werden:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma \vec{M} \times \vec{B}_0(t) \quad (3.5)$$

Wird nun ein zum Hauptfeld $\vec{B}_0(t)$ senkrecht stehendes magnetisches Wechselfeld

$$\vec{B}_1(t) = B_1 \begin{pmatrix} \cos \omega t \\ -\sin \omega t \\ 0 \end{pmatrix} \quad (3.6)$$

eingestrahlt, so ergibt sich:

$$\begin{pmatrix} \frac{dM_x}{dt} \\ \frac{dM_y}{dt} \\ \frac{dM_z}{dt} \end{pmatrix} = \gamma \begin{pmatrix} 0 & B_0 & B_1 \sin \omega t \\ -B_0 & 0 & B_1 \cos \omega t \\ -B_1 \sin \omega t & -B_1 \cos \omega t & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} M_x \\ M_y \\ M_z \end{pmatrix} \quad (3.7)$$

Im Resonanzfall ($\omega = \omega_L$) ergeben sich mit den Anfangsbedingungen $\vec{M}(0) = (0, 0, M_0)$, d.h. das Spin-1/2-System hat entlang der z-Richtung des Hauptfeldes eine makroskopische Magnetisierung M_0 , folgende Lösungen:

$$\begin{pmatrix} M_x \\ M_y \\ M_z \end{pmatrix} = -\gamma M_0 \begin{pmatrix} \sin \alpha \sin \omega_L t \\ \sin \alpha \cos \omega_L t \\ \cos \alpha \end{pmatrix} \quad (3.8)$$

Dies entspricht einer Präzessionsbewegung des Magnetisierungsvektors \vec{M} um \vec{B}_0 mit $\omega_L = \gamma B_z$, überlagert von einer Bewegung zur x-y-Ebene hin. Die resultierende schraubenförmige Rotationsbewegung wird auch als „Umklappen“ von \vec{M} bezeichnet. Der Winkel α , um den die Magnetisierung aus der longitudinalen Position ausgelenkt wird, bezeichnet man als Drehwinkel ($\alpha = \gamma B_1 t$). Er hängt von Dauer und Stärke des magnetischen Wechselfeldes ab (Abbildung 6).

Durch eine Transformation des betrachteten Systems in ein mit ω rotierendes Bezugssystem können die Gl. 3.7 und 3.8 weiter vereinfacht werden (Abbildung 6). Dabei geht das zeitabhängige magnetische Wechselfeld $\vec{B}_1(t)$ in das zeitunabhängige Feld $\vec{B}'_1(t) = (B_1, 0, 0)$ über. Die Blochschen Gleichungen im rotierenden Bezugssystem ergeben sich dann zu:

$$\frac{d\vec{M}'}{dt} = \gamma \vec{M}' \times \vec{B}' \Leftrightarrow \begin{pmatrix} \frac{dM'_x}{dt} \\ \frac{dM'_y}{dt} \\ \frac{dM'_z}{dt} \end{pmatrix} = \gamma \begin{pmatrix} 0 & B_0 & 0 \\ -B_0 & 0 & B_1 \\ 0 & -B_1 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} M'_x \\ M'_y \\ M'_z \end{pmatrix} \quad (3.9)$$

Unter Resonanzbedingungen ($\omega = \omega_L$) erhält man für freie Protonen mit der Anfangsbedingung $\vec{M}'(0) = \vec{M}(0) = (0, 0, M_0)$ für die Magnetisierung

$$\begin{pmatrix} M'_x \\ M'_y \\ M'_z \end{pmatrix} = -\gamma M_0 \begin{pmatrix} 0 \\ \sin \alpha \\ \cos \alpha \end{pmatrix}. \quad (3.10)$$

Damit entsteht der transversale Anteil der Magnetisierung durch einfache Rotation von \vec{M}' um die Richtung des magnetischen Wechselfeldes $\vec{B}'_1(t)$. Der Drehwinkel $\alpha = \gamma B_1 t$ bestimmt je nach Einstrahldauer t und Amplitude B_1 des magnetischen Wechselfeldes den Anteil von transversaler (M_x, M_y) und longitudinaler Magnetisierung (M_z). Im MR-Experiment wird dies durch einen kurzen Hochfrequenz-Puls (HF-Puls) mit geeignetem Anregungsspektrum realisiert. Im Allgemeinen hängt die Orientierung der Ebene, in der die Magnetisierung rotiert

wird, von der Phase des magnetischen Wechselfeldes ab, so dass \vec{M}' um beliebige Achsen teilweise oder vollständig in die transversale Ebene rotiert werden kann.

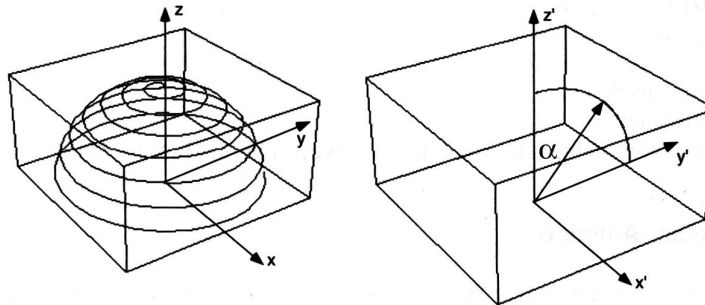


Abbildung 6: Herausdrehen des magnetischen Dipols im stehenden und im rotierenden Koordinatensystem (nach Dössel, 2000).

3.4 Relaxationsmechanismen

Wird das magnetische Wechselfeld abgeschaltet, kehrt die zuvor in die Ebene rotierte Magnetisierung mit unterschiedlicher transversaler und longitudinaler Zeitkonstante in ihre Ausgangslage zurück. Dies bedeutet, dass die longitudinale Magnetisierung sich ihrem Ausgangswert wieder annähert. Dagegen wird die transversale Magnetisierung zerstört. Diese Zeitkonstanten variieren für unterschiedliche Gewebetypen und sind von entscheidender Bedeutung für die verschiedenen Kontraste in der MRT.

3.4.1 Spin-Gitter-Relaxation

Durch einen HF-Puls werden die Spin-Ensembles angeregt und gehen in einen höheren Energiezustand über (Stark und Bradley, 1988). Sie können nur dann in ihren Grundzustand zurückkehren, wenn sie ihre überschüssige Energie an ihre Umgebung (Atomgitter) abgeben, in der sie eingebettet sind. Dieser Prozess, die Spin-Gitter-Relaxation, beschreibt die Rückkehr der longitudinalen Magnetisierung M_z in ihr thermisches Gleichgewicht. Die Zeit mit der dies geschieht nennt man T_1 -Zeit. Relaxationsphänomene passieren nicht spontan, sie müssen induziert werden. Der Übergang wird stimuliert von einem sich ändernden magnetischen Feld, das mit der Larmorfrequenz fluktuiert. Durch die Larmorfrequenz wird genau die Energiedifferenz impliziert, die für den Übergang benötigt wird. Die Fluktuationen im magnetischen Feld werden durch Rotation und Translation der umgebenden Moleküle ausgelöst, bedingt durch die Brownsche Molekularbewegung. Die mittlere Frequenz der Brownschen Molekularbewegung hängt von der Größe der Moleküle im Gitter ab. Kleine

Moleküle reorientieren sich wesentlich schneller als große. Die Frequenz der Rotation von schneller relaxierenden Molekülen, wie beispielsweise Lipiden, entspricht der Larmorfrequenz am ehesten. Deshalb ist die Relaxationszeit von Protonen in Lipiden höher als die von Protonen in purem Wasser oder wesentlich größeren Molekülen, wie Proteinen. Die T_1 -Relaxationszeiten liegen für Flüssigkeiten bei Feldstärken von 1–2 T unter Normalbedingungen in der Größenordnung von Sekunden und für biologisches Gewebe im Bereich von Zehntelsekunden.

Die T_1 Relaxationszeit hängt ebenfalls von der Magnetfeldstärke (Beeinflussung der Larmorfrequenz) und der Temperatur (Beeinflussung der Brownschen Molekularbewegung) ab. Der Relaxationseffekt wird beschrieben durch die phänomenologische Differentialgleichung

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{1}{T_1}(M_0 - M_z), \quad (3.11)$$

wobei mit M_0 die Gleichgewichtsmagnetisierung bezeichnet wird. Die Relaxation resultiert in einer exponentiellen Rückkehr der z -Komponente der Magnetisierung in ihre Ausgangslage.

3.4.2 Spin-Spin-Relaxation

Bei der transversalen Relaxation wird ein reversibler und ein irreversibler Anteil unterschieden. Die Zeitkonstante der gesamten transversalen Relaxation wird mit T_2^* , die des irreversiblen Anteils mit T_2 bezeichnet (Stark und Bradley, 1988; Gillis et al., 2002).

Unmittelbar nach einer HF-Anregung präzedieren die Spins zunächst synchron und bilden eine Quermagnetisierung M_{xy} , die detektiert werden kann. Lokale Magnetfeldinhomogenitäten dephasieren die synchron präzidierenden Spins. Hieraus resultiert, dass M_{xy} verschwindet. Durch die Feldinhomogenitäten differieren die Larmorfrequenzen der Spins geringfügig, so dass die Magnetisierungskomponenten auseinander driften bzw. dephasieren. Diesen Relaxationsvorgang nennt man T_2 -Zerfall, transversale Relaxation oder Spin-Spin-Relaxation. Die Zeitkonstante T_2 , welche von Gewebe zu Gewebe unterschiedlich ist, gibt die Zeit an, die M_{xy} benötigt, um in seine Ausgangslage zurückzukehren. Anders als bei der T_1 -Relaxation wird hier keine Energie von den Spins auf die Umgebung transferiert. In biologischem Gewebe kommt die Hauptbeeinflussung der T_2 -Relaxation durch die statischen Felder der benachbarten Protonen. Große Moleküle, die sich langsamer reorientieren als kleine, haben ein kurzes T_2 . Wasser beispielsweise hat ein langes T_2 . Die Magnetfeldstärke beeinflusst unter normalen MRI Bedingungen (1–2 T) T_2 wesentlich weniger als T_1 . Die gemessenen Relaxationszeiten setzen sich immer aus Kompartiments von Protonen in unterschiedlichen Umgebungen zusammen. Durch Diffusion der Wasserprotonen zwischen den Kompartimenten werden die T_2 -Zeiten in diesen beeinflusst. Die T_2 -Zeit von Wasser bei 21 °C und 1,5 T beträgt 2 s. Typische T_2 -Werte in Gewebe liegen in der Größenordnung von 50 bis 100 ms. Dies liegt unter anderem daran, dass

die Diffusionszeit von Wasserprotonen in Gewebe nur halb so hoch ist wie in freiem Wasser, d.h. dass hier auch die Korrelationszeiten höher sind.

Die tatsächlich beobachtete Relaxationszeit für den Zerfall ist oft deutlich kürzer, als durch die Spin-Spin-Wechselwirkung erklärbar. Die Unvollkommenheit des Hauptfeldes B_0 sowie Feldinhomogenitäten können zu noch schneller ablaufenden Dephasierungseffekten führen. Die Feldinhomogenitäten können durch unterschiedliche magnetische Eigenschaften der Umgebung und durch Suszeptibilitätsänderung hervorgerufen werden. Dieser Relaxationsprozess wird durch die T_2' -Zerfallszeit charakterisiert. Der im Experiment beobachtete Zerfall der transversalen Magnetisierung kann somit als Summe dieser beiden Effekte verstanden werden. Mit Hilfe der effektiven Relaxationszeit T_2^* lässt sich der exponentielle Zerfall wie folgt beschreiben:

$$\frac{d\vec{M}_{xy}}{dt} = -\frac{1}{T_2^*} \vec{M}_{xy}, \text{ mit } \frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_2'} \quad (3.12)$$

Die Magnetfeldinhomogenitäten sind im Gegensatz zu den T_2 -Relaxation auslösenden Feldinhomogenitäten zeitlich konstant. Der hierdurch verursachte Dephasierungseffekt ist durch geeignete Anwendung eines zweiten HF-Pulses zeitlich umkehrbar und stellt die Grundlage des Spinechos dar. T_2 ist somit im Gegensatz zu T_2^* ein irreversibler Prozess.

Nach Störung des thermodynamischen Gleichgewichts finden die Relaxationsprozesse gleichzeitig und unabhängig voneinander statt, wobei bei gleichem Objekt die Zerfallskonstanten unterschiedlich lang sind. Im Allgemeinen gilt $T_2^* < T_2 < T_1$.

Zur vollständigen semiklassischen Beschreibung der Kernspinresonanz müssen die Relaxationsterme den Blochschen Gleichungen hinzugefügt werden. Damit ergibt sich nach Gl. 3.9:

$$\begin{pmatrix} \frac{dM'_x}{dt} \\ \frac{dM'_y}{dt} \\ \frac{dM'_z}{dt} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1/T_2 & \gamma B_0 & 0 \\ -\gamma B_0 & 1/T_2 & \gamma B_1 \\ 0 & -\gamma B_1 & -1/T_1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} M'_x \\ M'_y \\ M'_z \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ M_0/T_1 \end{pmatrix} \quad (3.13)$$

3.5 Echos

3.5.1 Freier Induktionszerfall und Inversion Recovery

Jeder durch einen HF-Puls hervorgerufenen Drehwinkel der Spins α zwischen 0° und 180° führt zu einem elektrischen Signal in einer Spule (Dössel, 2000). Dieses Signal direkt nach einem HF-Puls nennt man freier Induktionszerfall (*free induction decay*, FID). Es klingt für $T_2^* \ll T_1$ mit T_2^* ab. Für T_1 und T_2 nach einem $\alpha = 90^\circ$ Puls mit den Anfangsbedingungen $M_z(0) = 0$ und $|\vec{M}_{xy}(0)| = M_0$ ergeben sich folgende Lösungen der Gl. 3.11 und 3.12

$$M_z(t) = M_0 \left(1 - e^{-t/T_1}\right) \quad \text{und} \quad (3.14)$$

$$|\vec{M}_{xy}(t)| = M_0 e^{-t/T_2} \quad (3.15)$$

Eine andere Methode T_1 zu messen ist, nach einem 180° -Puls (Inversionspuls) zu einem Zeitpunkt τ (*delay time*), an dem die Längsmagnetisierung jedoch noch nicht das thermische Gleichgewicht erreicht, einen 90° -Puls einzustrahlen. So wird die zu diesem Zeitpunkt vorhandene Längsmagnetisierung in die xy -Ebene geklappt. Dies führt unmittelbar zu einem FID-Signal, dessen Signalintensität ein Maß für die noch vorhandene Längsmagnetisierung ist (*inversion recovery*, IR):

$$M_z(t) = M_0 \left(1 - 2e^{-t/T_1}\right). \quad (3.16)$$

3.5.2 Spinecho

Die Spinecho-Sequenz ist ein häufig verwendetes Verfahren zur Bildgebung (Dössel, 2000). Es ist nahezu unempfindlich gegenüber Feldinhomogenitäten und Suszeptibilitätseffekten. Das Grundprinzip beruht auf der Erzeugung eines Hahnschen Spinechos durch Refokussierung des durch statische Feldinhomogenitäten induzierten T_2' -Signalzerfalls. Dafür wird nach der HF-Anregung mit einem Flipwinkel α_1 nach einer Zeit $T_E/2$ (Echozeit T_E) ein zweiter Refokussierungspuls α_2 geschaltet, so dass ein Teil der zuvor auseinander rotierenden transversalen Magnetisierungskomponenten wieder zusammenlaufen und zum Zeitpunkt T_E ein Echosignal beobachtet werden kann (Abbildung 7).

Zur Erzeugung eines Spinechos können beliebige HF-Pulspaare (α_1, α_2) verwendet werden, wobei die Signalintensität zum Zeitpunkt T_E entscheidend von der Wahl dieser Drehwinkel abhängt. In Idealfall wird für $\alpha_1 = 90^\circ$ und $\alpha_2 = 180^\circ$ die dephasierte transversale Magnetisierung vollständig rephasiert, was zu einer maximalen Signalintensität führt (Abbildung 8). Mit

dieser Methode können also durch Feldinhomogenitäten und Suszeptibilitätseffekte induzierte Dephasierungen der Spins rückgängig gemacht werden.

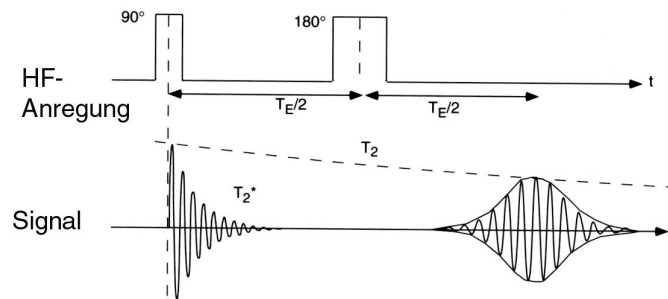


Abbildung 7: Spinecho Sequenz: Ein Echosignal kann nach einem Zeitpunkt T_E beobachtet werden, nachdem die Spins vorher durch eine HF-Anregung mit einem Flipwinkel von $\alpha_1 = 90^\circ$ ausgelenkt und nach einer Zeit $T_E/2$ (Echozeit T_E) durch einen zweiten Puls mit $\alpha_2 = 180^\circ$ wieder refokussiert wurden. Ein Teil der zuvor nach dem 90° -Puls auseinander rotierenden transversalen Magnetisierungskomponenten wird durch den 180° -Puls wieder zusammengeführt, so dass ein Echosignal beobachtet wird (nach Dössel, 2000).

Die Dephasierung der quantenmechanischen Spins innerhalb eines Spin-Ensembles, die zur Relaxationszeit T_2 führt, kann durch nichts rückgängig gemacht werden. Dies bedeutet, dass die Signalintensität des Spinechos mit e^{-T_E/T_2} abklingt und T_2 messbar wird.

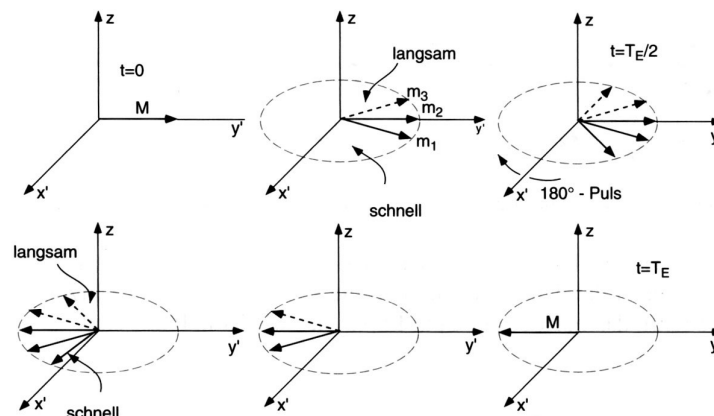


Abbildung 8: Verhalten der Spins bei einem Spinecho. Zum Zeitpunkt $t = 0$ wird die Magnetisierung \vec{M} durch einen 90° Puls ausgelenkt. Die Spins (m_1 , m_2 , etc.) fangen an zu präzidieren. Dabei dephasieren die Spins, d.h. einige Spins laufen langsamer, andere wiederum schneller. Durch einen 180° Puls um die y' -Achse laufen die Spins wieder zusammen. Nach einer Zeit $t = T_E$ treffen sich die Spins und bilden ein Echo (nach Dössel, 2000).

Wird nun vor der Erzeugung eines Spinechos ein Inversionspuls (180° -Puls) angewendet, kann durch Variation der Wartezeit τ (delay time) zum nächsten Puls ein unterschiedlicher T_1 -Kontrast erzielt werden. Diese Sequenz wird IR-SE (inversion recovery spin echo) genannt. Durch eine Aneinanderreihung von Spinechos mit unterschiedlichen T_E -Zeiten, können Bilder mit unterschiedlicher T_2 -Gewichtung erzielt werden. Diese Sequenz wird Multi-SE (Multispinecho) genannt.

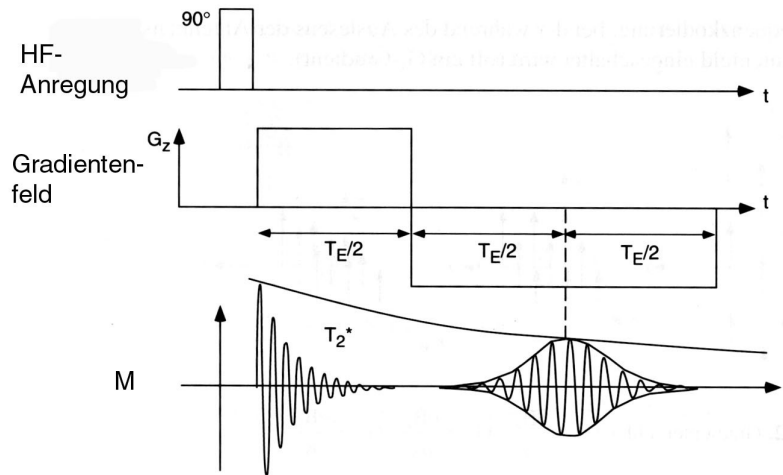


Abbildung 9: Gradientenecho Sequenz: Durch geeignetes, zeitlich versetztes Schalten eines invertierten Gradienten G_z wird das Echosignal erreicht. Der Abfall des Signals erfolgt T_2^* gewichtet (nach Dössel, 2000).

3.5.3 Gradientenecho

Das Gradientenecho bildet die Grundlage vieler bildgebender Verfahren zur schnellen Datenaufnahme (Dössel, 2000). Im Gegensatz zum Spinecho-Verfahren wird hier das Echosignal nicht durch einen Refokussierungspuls α_1 , sondern durch geeignetes, zeitlich versetztes Schalten eines invertierten Gradienten G_z erreicht (Abbildung 9). Im Vergleich zur Spinecho-Sequenz sind hier deutlich kürzere Echozeiten realisierbar. Allerdings wird die durch statische Feldinhomogenitäten ausgelöste Dephasierung der transversalen Magnetisierungskomponenten nicht refokussiert, so dass die Signalintensität neben T_1 nicht von T_2 , sondern von T_2^* abhängt. Da im Vergleich zur Spinecho-Sequenz lange Echozeiten ($T_E \gg T_2^*$) aufgrund des schnellen Signalzerfalls nicht möglich sind, wird der Bildkontrast durch eine Mischgewichtung aus T_1 und T_2^* bestimmt. Bei kurzen Wiederholzeiten ($T_R \leq T_2^*$) ist die transversale Magnetisierung noch nicht vollständig zerfallen, so dass in diesem Fall die Phasenkodiergradienten nach Auslesen des MR-Signals rephasiert werden, um bei der nächsten Anregung kohärente Überlagerungen durch Magnetisierungsanteile der vorigen Anregungen zu erhalten. Bei Anwendung von kleinen Drehwinkeln zur HF-Anregung wird das Gradientenecho-Verfahren auch als FLASH-Technik (*fast low angle shot*) oder FFE-Technik (*fast field echo*) bezeichnet (Vlaardingerbroek und den Boer, 2003). Auch hier lässt sich das Magnetisierungsverhalten nach den Bloch-Gleichungen beschreiben:

$$|\vec{M}_{xy}| = M_0 \frac{1 - e^{-T_R/T_1}}{1 - \cos \alpha \cdot e^{-T_R/T_1}} \sin(\alpha) \cdot e^{-T_E/T_2^*} \quad (3.17)$$

Für ein gegebenes T_R kann der Flipwinkel α so optimiert werden, dass die zur Signalerzeugung zur Verfügung stehende transversale Magnetisierung maximiert wird. Der Drehwinkel, bei dem die transversale Magnetisierung bei gegebenem T_R und T_1 ein Maximum

aufweist, wird auch als Ernst-Winkel $\cos \alpha = e^{-T_R/T_1}$ bezeichnet (Vlaardingerbroek und den Boer, 2003). Für ein kurzes T_R von einigen Millisekunden ergeben sich bei den T_1 -Zeiten des Körpergewebes kleine Ernst-Winkel in der Größenordnung von 15–30°.

3.5.4 Echo-Planare-Bildgebung

Eine signifikante Beschleunigung der Messzeit (50–120 ms je MR-Bild) kann mit Hilfe der Echo-Planaren-Bildgebung (*echo planar imaging*, EPI) erreicht werden (Dössel, 2000). Die Grundidee besteht darin, nach einer einzigen HF-Anregung eine Serie von Gradienten- oder Spinechos (Echozug) entlang eines Lesegradienten zu erzeugen. Da der Echozug innerhalb eines Zeitfensters ausgelesen werden muss, dessen Dauer die Größenordnung von T_2^* nicht überschreiten sollte, werden beim Einsatz dieser Verfahren hohe Anforderungen an die Hardware bezüglich minimaler Schaltzeiten und maximaler Amplitude der Gradienten gestellt. Es stellt auch eine Methode dar, um Kontraste basierend auf Spinecho und Gradientenecho zu beschleunigen.

3.6 MR-Kontrastmittel

Für den *in vivo* erzielbaren Kontrast der Eisenoxidpartikel spielt ihr magnetisches Verhalten (d.h. ihre Suszeptibilität) unter Beeinflussung durch die Zellumgebung eine große Rolle. In diesem Kapitel erfolgt zunächst eine Einführung in die Theorie des Magnetismus, danach werden die verschiedenen Relaxationseffekte der Wasserprotonen im MRT beschrieben und Theorien vorgestellt, die das Relaxationsverhalten der Eisenoxidpartikel im MRT erklären.

3.6.1 Magnetismus

3.6.1.1 Magnetische Suszeptibilität

Die Magnetisierung \vec{M} , die durch atomare Kreisströme in den Atomen eines magnetischen Materials erzeugt wird, ist definiert als (Raith, 1999)

$$\vec{M} = \chi \cdot \vec{H}. \quad (3.18)$$

Hierbei ist \vec{H} die magnetische Erregung, die proportional zum B -Feld ist:

$$\vec{H} = \frac{1}{\mu\mu_0} \vec{B}, \quad (3.19)$$

mit μ_0 der Permeabilitätskonstanten und μ der relativen Permeabilität. Der Proportionalitätsfaktor χ heißt magnetische Suszeptibilität. Nach dem Wert und dem Vorzeichen der magnetischen Suszeptibilität χ sind die verschiedenen Stoffe hinsichtlich ihres magnetischen Verhaltens in verschiedene Klassen eingeteilt:

Diamagnetische Stoffe:	$\chi < 0$	und	$ \chi \ll 1$	
Paramagnetische Stoffe:	$\chi > 0$	und	$ \chi \ll 1$	
Ferromagnetische Stoffe:	$\chi > 0$	und	$ \chi \gg 1$	
Superparamagnetische Stoffe:	$\chi > 0$	und	$ \chi \ll 1$	außerhalb eines B -Feldes
			$ \chi \gg 1$	innerhalb eines B -Feldes

3.6.1.2 Diamagnetismus

Diamagnetische Stoffe bestehen aus Atomen oder Molekülen, die kein permanentes magnetisches Dipolmoment besitzen (Raith, 1999). Bringt man solche Stoffe in ein Magnetfeld, so entstehen induzierte Dipole, die so gerichtet sind, dass ihr Magnetfeld dem induzierten äußeren Feld entgegengerichtet ist. Das Feld im Inneren der Probe wird kleiner als das äußere Feld. Die Gesamtmagnetisierung \vec{M} ist daher ebenfalls dem äußeren Feld entgegengesetzt, d.h. die Suszeptibilität ist negativ.

3.6.1.3 Paramagnetismus

Paramagnetismus entsteht durch nicht-kompensierte Bahn- und Spinmomente, die beide mit Drehimpulsen gekoppelt sind (Raith, 1999). Die Magnetisierung steigt mit dem äußeren Feld und sinkt mit zunehmender Temperatur. Bei sehr kleinen Temperaturen und sehr großen Feldstärken wird eine Sättigung erreicht. Die magnetischen Momente können sich beim Paramagnetismus nicht einfach parallel zum äußeren Feld ausrichten, weil damit Drehimpulse verbunden sind, für die nach der Quantenmechanik nur diskrete Zustände bzw. Orientierungen zum Feld erlaubt sind. Die Energieabstände wachsen mit dem Magnetfeld \vec{B} an. Erst das thermische Gleichgewicht gibt eine ungleiche Besetzung der magnetischen Zustände: Die Zustände geringerer Energien (magnetisches Moment parallel zum Feld) werden stärker besetzt als die Zustände höherer Energien. Hieraus resultiert die paramagnetische Magnetisierung. Mit zunehmender Temperatur werden die Besetzungsunterschiede kleiner. Bei Raumtemperatur und einem Feld von 1 T (weitab der Sättigung) liefert die Theorie eine paramagnetische Suszeptibilität von

$$\chi_{para} = \frac{n\mu_0\mu_{eff}^2}{3kT}, \quad (3.20)$$

wobei n die Atomdichte und μ_{eff} das effektive magnetische Moment ist. μ_{eff} ergibt sich aus der Kopplung der Bahn- und Spinnmomente der beteiligten Atomelektronen. Die Atome der Lanthanoiden („Seltene Erden“), zu denen auch Gadolinium gehört, zeigen einen ausgeprägten Paramagnetismus.

3.6.1.4 Ferromagnetismus

Ferromagnetische Festkörper bestehen aus mikroskopischen Bereichen (Domänen bzw. Weißschen Bezirken), in denen jeweils alle atomaren Momente durch starke Wechselwirkungen zwischen den atomaren Momenten parallel ausgerichtet sind (spontane Magnetisierung, Raith, 1999). In einem sich ändernden Magnetfeld kann die Magnetisierung durch eine Hysteresekurve beschrieben werden. Die ferromagnetischen Eigenschaften gehen bei Überschreitung der so genannten Curie-Temperatur T_c verloren. Das Material wird paramagnetisch und die magnetische Suszeptibilität wird um Größenordnungen kleiner. Für Eisen beträgt sie $T_c = 744 \text{ °C}$.

Bei einigen Materialien sind die Nachbarspins antiparallel ausgerichtet, aber verschieden groß und kompensieren sich nur zu einem gewissen Bruchteil. Solche Ferrimagnetika wie Magnetit (Fe_2O_3) verhalten sich ähnlich wie Ferromagnetika, ihre Sättigungsmagnetisierung ist jedoch viel kleiner.

3.6.1.5 Superparamagnetismus

Superparamagnetische Materialien besitzen Eigenschaften, die sowohl charakteristisch für ferromagnetische als auch für paramagnetische Substanzen sind (Raith, 1999). Erst in einem angelegten magnetischen Feld zeigen superparamagnetische Materialien eine hohe Suszeptibilität (ferromagnetisches Verhalten). Ohne magnetisches Feld ist keine geordnete Ausrichtung der elementaren magnetischen Dipole zu beobachten (paramagnetisch). Superparamagnetismus entsteht, wenn die Größe einzelner Partikel (bestehend aus ferromagnetischen Materialien) der einzelner Domänen entspricht (Cornell und Schwertmann, 2003).

Superparamagnetisches Verhalten wird nur beobachtet, wenn die magnetischen Domänen physikalisch separiert sind und nicht miteinander wechselwirken können. Die magnetische Anisotropie beschreibt den Einfluss der Messrichtung auf die gemessene Magnetisierung. Ein anisotropes Partikel besitzt so genannte leichte Achsen. Um die Magnetisierung aus einer leichten Achse herauszudrehen, muss Arbeit geleistet werden. Die magnetische Anisotropie setzt sich aus Oberflächen-, Austausch- und magnetokristalliner Anisotropie zusammen. Sie ist ein Maß für die Arbeit, die beim Ummagnetisieren von magnetischen Systemen geleistet werden muss. Demzufolge nimmt die Anisotropie auch Einfluss auf die Relaxationszeit τ_R ,

welche die Zeit angibt, die ein Partikelsystem benötigt, um während einer Messung die Magnetisierung entsprechend eines äußeren Feldes einzustellen. Dieser Prozess ist temperaturabhängig. Für die Relaxationszeit gilt

$$\tau_R \propto \exp\left[\frac{K_{eff} \cdot V}{k_B T}\right], \quad (3.21)$$

mit K_{eff} der Anisotropie-Konstanten und V dem Partikelvolumen.

Superparamagnetische und ferromagnetische Partikel sind also am besten als Kontrastmittel für die MR-Bildgebung geeignet. Bedingt durch die hohe Magnetisierung dieser Partikel werden die Spins stark dephasiert. Sie beeinflussen folglich T_2 und T_2^* . Aber auch paramagnetische Partikel, die die T_1 -Relaxation beeinflussen, wie beispielsweise gadoliniumhaltige Präparate, werden als Kontrastmittel verwendet.

3.6.2 Relaxationseffekte

Superparamagnetische Partikel besitzen in Gegenwart eines magnetischen Feldes starke magnetische Momente. Diese beeinflussen die Relaxationsprozesse der Protonen im umgebenden Medium. Es existiert keine einheitliche Theorie, die alle Relaxationsphänomene der superparamagnetische Partikel beschreiben kann. Jedoch gibt es für bestimmte Bedingungen Lösungen (Gillis und Koenig, 1987; Kennan et al., 1994; Koenig und Kellar, 1995; Brooks et al., 2001; Brooks, 2002; Gillis et al., 2002; Gossuin et al., 2002).

Durch unterschiedliche Pulssequenzen können die Kontraste im MR-Bild stark variiert werden. Kontrastmittel (*contrast agents*, CA) bieten darüber hinaus weitere Möglichkeiten, die Bilder in Hinblick auf eine spezifische diagnostische Fragestellung zu verbessern (Stark und Bradley, 1988). Da die Protonendichte im Gewebe nur schwer veränderbar ist, setzen alle Kontrastmittel bei einer Modifikation von T_1 und/oder T_2 bzw. T_2^* an. Um T_1 zu verändern, muss das Kontrastmittel ein Magnetfeld erzeugen, das ungefähr mit der Larmorfrequenz fluktuiert. T_2 und T_2^* werden durch Magnetfeldinhomogenitäten verkürzt, welche von der magnetischen Suszeptibilität des Kontrastmittels hervorgerufen werden. Wie stark ein Kontrastmittel die Relaxationszeiten reduziert, wird durch die Relaxivität r_1 bzw. r_2 des Kontrastmittels angegeben. Die Einheit der Relaxivität ist $[1/(\text{mM}\cdot\text{s})]$ Es gilt:

$$\frac{1}{T_{1,CA}} = \frac{1}{T_1} + [C_{CA}] \cdot r_1, \quad \text{bzw.} \quad \frac{1}{T_{2,CA}} = \frac{1}{T_2} + [C_{CA}] \cdot r_2 \quad (3.22 \text{ a,b})$$

Hierbei ist $T_{1,CA}$ bzw. $T_{2,CA}$ die jeweilige Relaxationszeit nach der Kontrastmittelgabe, T_1 bzw. T_2 die Relaxationszeit des gewählten Mediums ohne Kontrastmittel und $[C_{CA}]$ ist die

eingesetzte Konzentration des Kontrastmittels in mM. $1/T_1$ bzw. $1/T_2$ wird auch die Relaxationsrate genannt und mit R_1 bzw. R_2 abgekürzt. Die Relaxivität ist also ein Maß für die Steigung der Relaxationsrate in Abhängigkeit von der Kontrastmittelkonzentration. Das Inverse der effektiven transversalen Relaxationszeit $1/T_2^*$ wird als effektive transversale Relaxationsrate bezeichnet und mit R_2^* abgekürzt.

Für den *in vivo* erzielbaren Kontrast der Eisenoxidpartikel spielt ihr magnetisches Verhalten (d.h. ihre Suszeptibilität) unter Beeinflussung durch die Zellumgebung eine große Rolle. Die Relaxationsrate kann beim Vergleich von extrazellulären Eisenoxidpartikeln mit internalisierten ansteigen oder auch abfallen, wobei letzteres die Eignung als Marker limitiert. Die Ursache liegt an der Umgebung der Partikel und der damit verbundenen unterschiedlichen Diffusionen der Wasserprotonen. Eine Theorie, die die Beeinflussung der Eisenoxidpartikel auf das Signalverhalten und damit die Relaxationszeiten (T_1 , T_2 und T_2^*) behandelt, wurde von Pierre Gillis und Seymour Koenig sowie Dmitriy Yablonskiy und Mark Haacke entwickelt (Gillis und Koenig, 1987; Yablonskiy und Haacke, 1994; Gillis et al., 2002). Chris Bowen (Bowen et al., 2002) hat diese Theorie auf superparamagnetische Eisenoxidpartikel internalisiert in Zellen angewandt.

3.6.2.1 Outer-Sphere Theorie und Motional Narrowing Regime

Die quantenmechanische *outer-sphere* Theorie (Gillis und Koenig, 1987) gilt für die durch schwach magnetische Partikel induzierte Relaxation der Wasserprotonen bei hohen Feldern (>1 T). Sie ist weiterhin für stark magnetische Partikel gültig, wenn sie klein genug sind, so dass

$$\Delta\omega_r \cdot \tau_D \ll 1 \quad (3.23)$$

gilt. Dies ist die Voraussetzung für das so genannte *motional narrowing* Regime (MNR). In diesem System ist die charakteristische Diffusionszeit

$$\tau_D = \frac{r^2}{D}, \quad (3.24)$$

die Zeit, die ein Wassermolekül benötigt, um eine Strecke $\sqrt{2} r$, wobei r den Radius des Partikels angibt, in jede beliebige Richtung zu diffundieren. $\Delta\omega_r$ beschreibt die Frequenzverschiebung an der Partikeloberfläche bedingt durch das induzierte magnetischen Feld (Gillis und Koenig, 1987; Gillis et al., 2002). D ist der Diffusionskoeffizient der Wasserprotonen. Unter diesen Voraussetzungen gilt für die transversale Relaxationsrate

$$R_2 = \frac{4}{9} \nu \cdot \tau_D (\Delta\omega_r)^2, \quad (3.25)$$

$$\text{mit } \Delta\omega_r = \frac{8\pi}{3\sqrt{5}} \gamma \cdot M . \quad (3.26)$$

ν gibt das Volumenverhältnis wieder, das von den magnetischen Partikel im Verhältnis zum Umgebungsvolumen eingenommen wird, M ist die Magnetisierung und γ das gyromagnetische Verhältnis. Die Diffusionszeit ist also im Verhältnis zur Verteilung der lokalen durch die Frequenzverschiebung $\Delta\omega_r$ bedingten Feldstörungen sehr kurz, so dass die Relaxationsraten von τ_D und der Magnetisierung der Partikel dominiert werden.

Durch die schnelle Diffusion der Wasserprotonen werden die kleinen, durch $\Delta\omega_r$ bedingten, Magnetfeldinhomogenitäten ausgemittelt, so dass effektiv auf die Wasserprotonen keine Magnetfeldinhomogenitäten wirken, d.h. es existiert kein Anteil der transversalen Relaxation, der refokussierbar wäre. Es gilt folglich im *motional narrowing* Regime, dass $R_2 = R_2^*$, wenn R_2^* als der Anteil der Relaxation bezeichnet wird, der in einem Spinecho-Experiment durch einen 180°-Puls refokussierbar ist. Aus Gl. 3.25 geht ebenfalls hervor, dass im *motional narrowing* Regime die transversale Relaxationsrate quadratisch von der Magnetisierung der Partikel abhängt.

Die Relaxationsrate in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration (Relaxivität, r_2) kann nach Gl. 3.25 wie folgt berechnet werden:

$$r_2 = \frac{4}{9} \cdot \alpha \cdot \tau_D (\Delta\omega_r)^2 \quad (3.27)$$

Hierbei ist α der Proportionalitätsfaktor zwischen Volumenverhältnis ν und Eisenkonzentration. Er kann berechnet werden als

$$\alpha = \frac{m_{mol,Fe}}{m_{Fe,Partikel}} \cdot V_{Partikel} , \quad (3.28)$$

mit $m_{mol, Fe}$ der Molmasse von Eisen, $m_{Fe, Partikel}$ der Eisenmenge pro Partikel und $V_{Partikel}$ dem Volumen des Partikels.

3.6.2.2 Static dephasing Regime

Wenn superparamagnetische Partikel jedoch in Zellen kompartmentalisiert werden, dann sind die Voraussetzungen des MNR nicht mehr erfüllt. Hier dominieren die lokalen Feldstörungen. *In vivo*- und *in vitro*-Studien haben gezeigt, dass das Verhältnis von R_2^* zu R_2 von Partikeln internalisiert in Zellen verglichen mit der gleichen Eisenkonzentration homogen suspendiert in Gel stark ansteigt (Weissleder et al., 1997; Bowen et al., 2002).

Wenn Eisenoxidpartikel kompartimentalisiert werden, wie beispielsweise in Zellen, entsteht durch die Clusterung der Partikel eine makroskopische Addition der magnetischen Suszeptibilitäten auf zellulärer Ebene. Diese dipolaren Feldinhomogenitäten sind groß genug, so dass Gl. 3.23 nicht mehr gilt und das System sich nicht mehr im MNR befindet. Das Signal fällt dann aufgrund der Dephasierung der magnetischen Momente, bedingt durch die lokalen Unterschiede in den Protonenfrequenzen, schneller ab, als die Diffusion dieses Phänomen ausgleichen kann. Dies bedeutet, dass die Diffusion in diesem Regime nur einen minimalen Einfluss besitzt. Unter diesen Bedingungen gilt

$$\Delta\omega_r \cdot \tau_D \gg 1. \quad (3.29)$$

Das Signal fällt im *static dephasing* Regime (SDR) mit der effektiven transversalen Relaxationsrate R_2^* ab. Zusätzlich ist der Signalabfall unbeeinflusst vom Aussehen und von der Größe des magnetischen Störgegenstandes. Ein magnetisches Feld, das durch einen Partikel induziert wurde, ist nur in der Nähe des Partikels von dessen Form abhängig, folglich nur, wenn der Abstand vergleichbar mit der Länge der größten Dimension des Partikels ist (Yablonskiy und Haacke, 1994). Außerhalb dieser Region kann das durch das Partikel entstandene Feld nicht mehr von einem Feld unterschieden werden, das durch ein kugelförmiges Partikel mit dem gleichen magnetischen Moment entstanden ist. Da die Konzentration eines Kontrastmittels meist sehr klein ist, werden die meisten Moleküle, welche zum MR-Signal beitragen, von diesem magnetischen Feld beeinflusst. Die Diffusionszeit im SDR ist im Verhältnis zum Einflussbereich der Partikel bzw. der Partikelkompartimente sehr lang. Damit können innerhalb von kurzen Echozeiten ($\tau_{cp} = T_E/2$, $\tau_{cp} < \tau_D$) die dephasierten Spins wieder rephasiert werden. Es existiert also ein rephasierbarer Anteil R_2' , somit ist $R_2^* \neq R_2$. Befinden sich Protonen in unmittelbarer Nähe des Partikels, werden sie durch die dort herrschenden starken lokalen Magnetfeldgradienten dephasiert. Der Einfluss der geringen Diffusion in diesem Regime reicht aus, damit auch bei kurzen T_E -Zeiten die Protonen durch einen 180° -Puls nicht mehr rephasiert werden können. Damit reduziert sich R_2' um diesen Anteil, und R_2 wird größer (Brooks et al., 2001; Brooks, 2002; Gillis et al., 2002).

Im so genannten SDR gelten folgende Gleichungen:

$$R_2^* = \frac{\sqrt{15}}{9} \pi \cdot v \cdot \Delta\omega_r \quad \text{und} \quad (3.30)$$

$$R_2 = 2,25 \cdot v \frac{(\Delta\omega_r \cdot \tau_{CP})^2}{\tau_D} \cdot \left(\frac{r}{r'}\right)^5, \quad (3.31)$$

mit r dem Partikel- bzw. dem Kompartimentradius und r' dem Radius des Bereiches um das Partikel, in dem ein 180° Puls die Dephasierung nicht mehr rephasieren kann. v gibt das Volumen wieder, das von den magnetischen Kompartiments im Verhältnis zum Volumen der Umgebung eingenommen wird. Aus Gl. 3.30 geht hervor, dass im SDR die effektive transversale Relaxationsrate linear von der Magnetisierung der Partikel abhängt. Das Verhältnis r/r' ist für jedes Eisenoxidpartikel unterschiedlich, denn es hängt von dem magnetischen Feld ab, welches von den einzelnen Partikel bzw. Konglomeraten induziert wird. Je stärker dieses induzierte Feld ist, desto größer ist der Radius r' des Bereiches um das Partikel, in dem ein 180° Puls die Dephasierung nicht mehr rephasieren kann.

Zwischen dem MNR und dem SDR existiert noch ein Übergangsbereich, in dem gilt (Gillis et al., 2002):

$$\Delta\omega_r \cdot \tau_D \approx 1 \quad (3.32)$$

In diesem Bereich gilt schon die Formel für das SDR (Gl. 3.30), allerdings ist hier der Anteil der Spins, der refokussiert werden kann, noch sehr klein, so dass immer noch $R_2^* \approx R_2$ gilt.

3.6.3 Theoretische Vorüberlegungen

Für superparamagnetische Eisenoxidpartikel suspendiert in Wasser oder Gel kann für die Betrachtung der Relaxation der Wasserprotonen die Diffusionskonstante von reinem Wasser angenommen werden: $D = 2,5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$. Der Radius der Partikel wird mit $3,5 \cdot 10^{-8} \text{ m}$, der Volumenanteil $v = 5 \cdot 10^{-6}$ und die Magnetisierung mit $0,1 \text{ kG}$ angenommen. Damit folgt für $\Delta\omega_r = 2,36 \cdot 10^6 \text{ rad/s}$ (mit $\gamma = 2,68 \cdot 10^4 \text{ rad/(s}\cdot\text{G)}$) und $\tau_D = 4,9 \cdot 10^{-7} \text{ s}$, dass $\Delta\omega_r \cdot \tau_D \ll 1$. Es gilt also das *motional narrowing* Regime. Falls die Eisenoxidpartikel jedoch clustern, d.h. der Radius der resultierenden Partikel wird größer und die Magnetisierung nimmt zu, erfolgt der Übergang in das SDR. Gillis et al. (Gillis et al., 2002) haben für stark magnetisierte Partikel in diesem Parameterbereich Monte-Carlo-Simulationen durchgeführt. Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse dieser Simulation. Die effektive transversale Relaxationsrate der Partikel wurde in Abhängigkeit von der Diffusionszeit untersucht. Für $\tau_D < 10^{-4} \text{ ms}$ gilt das MNR (Gl. 3.25) für $\tau_D > 10^{-4}$ das SDR (Gl. 3.30 und 3.31). Für höhere τ_D wird auch der Anteil der refokussierbarer Protonen immer höher, so dass die Differenz zwischen R_2 und R_2^* immer größer wird.

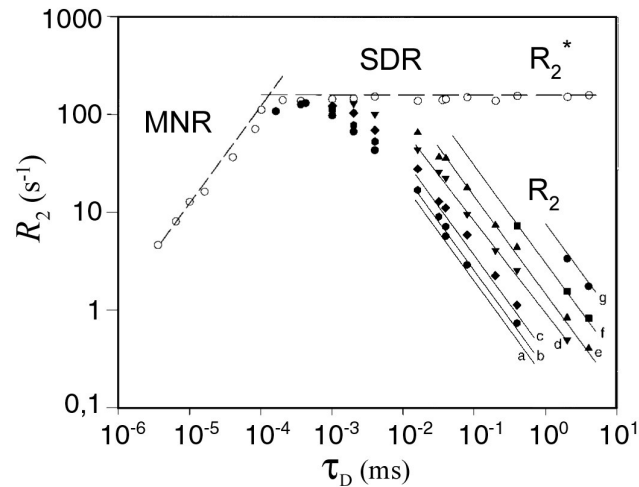


Abbildung 10: Monte-Carlo-Simulation von Gillis et al. (2002). Dargestellt ist die effektive transversale Relaxationsrate in Abhängigkeit von der Diffusionszeit. Die offenen Kreise repräsentieren R_2^* -Werte, die geschlossenen R_2 -Werte mit $\tau_{CP} = 0,1$ ms (Kreis, Linie a), $\tau_{CP} = 0,2$ ms (Fünfeck, Linie b), $\tau_{CP} = 0,5$ ms (Viereck, Linie c), $\tau_{CP} = 2$ ms (Dreieck, Linie d), $\tau_{CP} = 5$ ms (Dreieck, Linie e), $\tau_{CP} = 10$ ms (Quadrat, Linie f), $\tau_{CP} = 20$ ms (Kreis, Linie g).

In Zellen ist die Diffusion des intrazellulären Wassers längst nicht mehr so hoch. Die Diffusionskonstante des intrazellulären Wassers beträgt $D = 0,14 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ (Thelwall et al., 2002). Wenn nun Partikel in Zellen kompartimentalisiert sind, wird durch die Clusterung in den Kompartimenten der Zelle die Magnetisierung ansteigen, so dass die Theorie des *static dephasing* Regimes gilt.

Dies bedeutet also, dass für Partikel an der Zellmembran das MNR gilt und für steigende Eisenkonzentrationen auch R_2 ansteigt. Wird dieselbe Eisenmenge internalisiert, ändern sich die Diffusion der Wasserprotonen und der Radius der geclusterten Partikel. τ_D wird größer, und es gilt das SDR. Aus Abbildung 10 geht hervor, dass im SDR die R_2 -Rate mit wachsendem τ_D abnimmt. Somit kann die R_2 -Rate bei gleicher Eisenkonzentration in der Zelle geringer sein als an der Zellmembran. Dies hängt aber von den Clustereigenschaften des jeweiligen Partikel ab.

3.6.4 Relaxationsvorgänge bei MR-Messungen

Die in Abschnitt 3.6.2 beschriebenen transversalen Relaxationsphänomene der Eisenoxidpartikel können mittels MRT gemessen werden. Hierzu werden die in Abschnitten 3.5.2 und 3.5.3 beschriebenen SE- und GE-Sequenzen verwendet. Mit der SE-Sequenz kann die transversale Relaxationszeit T_2 und mit der GE-Sequenz die effektive transversale Relaxationszeit T_2^* (s. Abschnitt 3.4.2) gemessen werden. Die Inversen dieser Relaxationszeiten werden als transversale Relaxationsrate R_2 und effektive transversale Relaxationsrate R_2^* bezeichnet. Die gemessenen Relaxationsraten setzen sich also nach Gl. 3.12 aus einem durch die Eisenoxidpartikel bestimmten Anteil und einem Gerätespezifischen Anteil zusammen

(Yablonskiy und Haacke, 1994). Für die mit der GE-Sequenz gemessene effektive Relaxationsrate $R_{2,GE}^*$ gilt somit:

$$R_{2,GE}^* = \underbrace{R_{2,Partikel} + R'_{2,Partikel}}_{R_{2,Partikel}^*} + R'_{2,InhB-Feld}, \quad (3.33)$$

mit der durch die Eisenoxidpartikel induzierten transversalen Relaxationsrate $R_{2,Partikel}$, der durch die Partikelsuszeptibilität bedingten Relaxationsrate $R'_{2,Partikel}$ und einem Anteil $R'_{2,InhB-Feld}$, welcher durch Magnetfeldinhomogenitäten des Hauptfeldes B_0 sowie durch Übergangsinhomogenitäten hervorgerufen wird. Der Anteil $R'_{2,InhB-Feld}$ ergibt einen konstanten Offset, da die Inhomogenitäten des Hauptfeldes zeitlich konstant das zu messende Objekt beeinflussen. Dieser Offset ist unterschiedlich für Gewebe bzw. Zellen und Wasser, da die gleiche Feldinhomogenität die Spins der Wasserprotonen, welche in Gewebe und Wasser unterschiedlich stark gebunden sind, unterschiedlich dephasiert. Zu diesem Anteil tragen ebenfalls Phasenübergänge, wie beispielsweise zwischen einem Plastikgefäß, dem Inhalt und der Luft bei.

Die mit der SE-Sequenz gemessene effektive Relaxationsrate $R_{2,SE}^*$ setzt sich aus folgenden Anteilen zusammen:

$$R_{2,SE}^* = \underbrace{R_{2,Partikel} + R'_{2,Partikel}}_{R_{2,Partikel}^*} + \underbrace{R'_{2,InhB-Feld}}_{= 0, \text{ da dieser Anteil durch den } 180^\circ\text{-Puls wieder refokussiert wird}} \quad (3.34)$$

Durch den 180° -Puls in der SE-Sequenz kann der Anteil $R'_{2,InhB-Feld}$ sowohl im MNR als auch im SDR wieder refokussiert werden. Im MNR ist nun allerdings der Fall gegeben, dass durch die schnelle Diffusion der Wasserprotonen die Einflüsse der Magnetfeldinhomogenitäten der Eisenoxidpartikel ausgemittelt werden, d.h. es existiert kein Effekt mehr, der refokussierbar wäre. Im SDR hingegen wird der Anteil der von den Partikeln induzierten Relaxationsrate, welcher durch den 180° -Puls refokussiert werden kann, mit steigendem τ_D größer, so dass $R_{2,Partikel}^*$ kleiner wird und sich im Grenzfall $R_{2,Partikel}$ annähert.

3.6.5 Superparamagnetische Eisenoxidpartikel als Kontrastmittel

Die in der MRT als Kontrastmittel experimentell und klinisch eingesetzten superparamagnetischen Eisenoxidpartikel können in zwei Gruppen unterteilt werden (Taupitz et al., 2003): Die erste Gruppe hat einen größeren Partikeldurchmesser (> 50 nm) und wird als SPIO (*superparamagnetic iron oxide*) bezeichnet. Die zweite Gruppe hat einen vergleichsweise kleinen Partikeldurchmesser (< 20 nm) und wird als USPIO (*ultrasmall superparamagnetic iron oxide*) bezeichnet. Weitere Bezeichnungen berücksichtigen den Partikelbau, wie z.B. monokristalline Eisenoxidpartikel (*monocrystal iron oxide nanoparticles*, MION) oder eine Modifizierung des Hüllenmaterials (*cross linked iron oxide*, CLIO).

3.6.5.1 Eisenoxid

Maghemit und Magnetit sind zwei unterschiedliche Oxidationsstufen des Eisens, die sich in ihrem Aufbau und ihren Eigenschaften sehr ähneln (Cornell und Schwertmann, 2003). Magnetit unterscheidet sich vom Maghemit lediglich durch die unterschiedlichen Valenzen der Eisenionen. Diese beiden Oxidmodifikationen werden als inverse Spinelle bezeichnet. Spinelle besitzen die Formel $X^{2+}(X^{3+})_2(O^{2-})_4$, wobei X ein Metallion der angegebenen Wertigkeit darstellt. Die Spinellstruktur besteht aus einem kubisch dichtest gepackten Sauerstoffionengitter mit Tetraeder- und Oktaederlücken. Insgesamt besitzt das Sauerstoffgitter 64 Tetraederlücken und 32 Oktaederlücken pro Einheitszelle. Die Lücken werden jedoch in dieser Struktur nicht vollständig besetzt. In der Spinellstruktur sind lediglich acht der 64 Tetraederlücken und 16 der 32 Oktaederlücken besetzt. Die inverse Spinellstruktur unterscheidet sich von der Spinellstruktur durch die unterschiedliche Besetzung der Lückenplätze. Durch die Besetzung der Gitterlücken kommt es zur Ausbildung von Untergittern. Die Eisenionen auf den Oktaeder- und Tetraederplätzen bilden jeweils ein Untergitter. Im Magnetit kommen, entsprechend der inversen Spinellstruktur, zwei- und dreiwertige Eisenionen vor. Die Tetraederlücken werden von dreiwertigen Eisenionen besetzt, wohingegen die Oktaederlücken sowohl von zwei- als auch von dreiwertigen Eisenionen besetzt sind. Die kubische Struktur besitzt eine Gitterkonstante von $a = 0,893$ nm. Maghemit besitzt eine ähnliche Struktur. Jedoch besetzen lediglich dreiwertige Ionen die Gitterlücken. Auf Grund der geringeren Anzahl an Eisenionen sind noch weniger Lückenplätze als beim Magnetit besetzt. In der Struktur des Maghemit sind wiederum acht der 64 Tetraederlücken besetzt, aber nur 13 (statt 16) der 32 Oktaederplätze. Die Gitterkonstante a des Maghemit beträgt 0,834 nm.

Magnetit als auch Maghemit sind auf Grund ihrer Untergitterstrukturen so genannte Ferrimagnete. Ursache des Ferrimagnetismus sind die entgegengesetzt ausgerichteten Spinmomente der Eisenionen in den beiden Untergittern. Die Sauerstoffatome besitzen keine ungepaarten Elektronen und liefern demnach keinen Beitrag zum magnetischen Moment. Die Sättigungsmagnetisierung von Magnetit ist mit $92\text{--}100 \text{ Am}^2\text{kg}^{-1}$ bei 300 K höher als die von Maghemit ($60\text{--}80 \text{ Am}^2\text{kg}^{-1}$). (Anmerkung: $\text{Am}^2\text{kg}^{-1}$ (SI-System) = emu/g (CGS-System))

3.6.5.2 Partikel Aufbau

Um eine für den Organismus verträgliche Präparation zu erhalten, müssen die Eisenoxidkristalle mit Hüllmaterial versehen werden. In größeren Partikeln bilden zahlreiche Eisenoxidkristalle zusammen mit dem Hüllmaterial Konglomerate mit bis zu mehreren 100nm Durchmessern so genannte polykristalline Partikel (Saini et al., 1987). Bei kleineren Partikeln sind einzelne Kristalle separat mit Hüllmaterial beschichtet (monokristalline Partikel). Die Eisenoxidkristalle können auch in einer Dextranmatrix eingebettet sein. Als Hüllmaterial werden bislang Polymere wie Dextran (z.B. AMI 25, AMI 227), Carboxydextran (SHU 555A

[Resovist], SHU 555C), Albumin, Stärke, Polyethylenglycol oder eine liposome Umhüllung verwendet (Taupitz et al., 2003). Das Hüllmaterial spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufnahme der Eisenoxidpartikel in die Zelle. Werden die Hüllen beispielsweise mit Antikörpern versehen, kann eine spezifische Aufnahme ermöglicht werden (Kang et al., 2002). Eine andere Methode ist die Verstärkung der unspezifischen Aufnahme durch beispielsweise HIV-tat Peptide (Josephson et al., 1999). Im Vergleich zum Eisen im Körper sind diagnostische Dosierungen von ca. 10–50 $\mu\text{mol Fe/kg}$ gering und entsprechen ca. 5-20% der Gesamteisenmenge. Nach intravenöser Injektion werden die Partikel abgebaut, das Eisen wird im Körper eingelagert (Weissleder et al., 1989).

3.6.5.3 Verwendung

Die momentan klinisch zugelassenen eisenoxidbasierten Kontrastmittel dienen traditionell zur Leberdiagnostik. Dabei werden die Eisenoxidpartikel von Makrophagen der Leber unspezifisch aufgenommen und begünstigen so die Tumordiagnostik (Saini et al., 1987). Andere Anwendungsgebiete sind die MR-Angiographie, die Lymphknoten und die Milz. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die in der Forschung, derzeit in der klinischen Entwicklung und bereits zugelassenen eisenoxidbasierten Kontrastmittel.

Tabelle 1: Übersicht über die in der Forschung, derzeit in der klinischen Entwicklung und bereits zugelassenen Eisenoxid-basierten Kontrastmittel (nach Taupitz et al., 2003).

Substanz	Indikation	Handelsname	Hersteller	Status
AMI-25	Leber/Milz	Endorem (EU) Feridex (USA)	Guerbet Berlex	zugelassen
SHU 555A	Leber/Milz	Resovist	Schering	zugelassen
AMI-227	Leber/Lymphknoten MR-Angiographie	Sinerem (EU) Combidex (USA)	Guerbet Adv. Magnetix	Phase III
NC 100150	MR-Angiographie Perfusion	Clariscan	Amersham	Phase III
SHU 555C	MR-Angiographie	Supravist	Schering	Phase II
OMP	Orale Kontrastierung	Abdoscan	Ferropharm	zugelassen
AMI-121	Orale Kontrastierung	Lumirem Gastromark	Guerbet Adv. Magnetix	zugelassen
MION	Molekulare Bildgebung			Forschung
CLIO	Molekulare Bildgebung			Forschung

4 Materialien und Methoden

In diesem Kapitel werden die verwendeten qualitativen und quantitativen Referenzverfahren erklärt sowie die verwendeten Materialien aufgelistet.

4.1 Materialien

4.1.1 Verwendete Chemikalien und Antikörper

Antikörper und Peptide

anti-VEGFR-1	Human, Maus monoclonal, R & D Systems, MAB321
anti-VEGFR-2	Ratte-Human, Ziege polyklonal, R & D Systems, AF357,
VEGF, human rekombinant	Pepto Tech Inc. (TEBU)

Chemikalien

Aceton	Merck
Acetonitril	Merck
Agarose	Roth
Araldit M	Fluka
B102	N. Buske, Berlin
BrCN	Merck
Chloramin T	Merck
Citronensäure	Roth
Collagenase H (20% in PBS)	Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Fluka
EDTA	Merck
Eisen-Test-Kit (Fe-AN), Spectroquant,	Merck, Best.-Nr. 14761
Ethanol	Roth
FKS	PAA Laboratories
Glukose	Merck
Glutaraldehyd	Merck
Glycin	Roth
H ₂ O ₂	Roth

HCl	Roth
HCl rauchend (37%)	Merck
Hepes	Biomol GmbH
Kaliumhexacyanoferrat (II)	Merck
KCl	Merck
Kernechtrubin	Chroma-Gesellschaft, Schmid & Co.
KH ₂ PO ₄	Merck
L-Glutamin	Roth
Mayer`s Hämalaun	Merck
Methanol	Roth
N ₂ O	micromod Partikeltechnologie GmbH
N ₅₀	micromod Partikeltechnologie GmbH
N ₇₀	micromod Partikeltechnologie GmbH
Na ¹²⁵ I	Amersham
Na ₂ HPO ₄	Merck
Na ₂ HPO ₄ - 2H ₂ O	Roth
NaCl	Roth
NaHCO ₃	Sigma
Osmiumtetroxid (OsO ₄)	Planu
PDL (Poly-D-Lysin)	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Resovist	Schering
Sephacryl S-300	Amersham Biosciences
Sephadex G-25	Amersham Biosciences
Thermo Shandon	Immu-Mount
Titrisol, Eisenstandard	Merck
Tris	Sigma 7-9 [®] , Sigma-Aldrich
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Tween 20	Fluka
Uranylacetat	Serva
Y-Standard	Merck

Medien

U118 Medium: (Standard-Medium)

Dulbeccos Modified Eagle`s Medium (DMEM)

10% FCS

Gibco

1% Penicillin/Streptomycin

3% L-Glutamin

HUVEC Medium:

Endothelial Cell Growth Medium MV

PromoCell GmbH

DMSO-Medium:

50 ml Standard-Medium

5 ml (10%) DMSO

500 µl (1%) Penicillin/Streptomycin

250 µl (0,5%) Glukoselösung (50%)

Verbrauchsmaterialien

PVDF-Membran

Amersham Pharmacia

Kupfergitter

VECO

Hyperfilm ECL

Amersham Pharmacia

96er Mikrotiterplatten

Costar 3590 96-well Platten

Zellkultur-Flaschen (75 cm²)

Sarstedt

Deckgläschen(25 cm²)

Nunc

10 ml Röhrchen

Sarstedt

Geräte

Gammazähler

Wallac

UV/VIS Zweistrahl Spektrometer U-2000

Hitachi

TECAN-Microplate-Reader

SLT Labinstruments

TEM EM 902

Zeiss

Zentrifuge

Eppendorf

TXRF 3080C

Atomica

MRT, 1,5 T Intera

Philips Medical Systems

Faraday-Magnetwaage

Bruker

Puffer**Hepes Puffer pH 7,5:**

10 mM Hepes

0,14 M NaCl

Bicarbonat Puffer pH 8,3:0,1 M NaHCO₃**PBS (3l) pH 7,4:**

24 g NaCl

0,69 g KCl

4,32 g Na₂HPO₄

0,72 g KH₂PO₄

Citronensäure-Phosphat-Puffer:

1 M Citronensäure

1 M Na₂HPO₄ - 2H₂O

Tris-buffer pH 8,5:

0,2 M Tris

Kaliumphosphat Puffer pH 7,2:

1 M Kaliumphosphat

Chloramin T (1 mg/ml in Kaliumphosphat pH 7,2)

TBST pH 7,5:

20 mM Tris

140 mM NaCl

1 mM EDTA

0,1% Tween

Trypsin-Lösung:

10 ml PBS

1 mg Trypsin

14,8 mg EDTA

4.1.2 Verwendete Eisenoxidpartikel

In Tabelle 2 sind die verwendeten Eisenoxidpartikel aufgelistet. Es wurden drei verschiedene Eisenoxidpartikel der Firma Micromod Partikeltechnologie, Rostock verwendet: Nanomag-D 70 nm (N70) und 50 nm (N50) und Nanomag 20 nm (N20). Laut Hersteller bestehen die N70 Partikel aus 5–15 nm großen Maghemitkristallen (γ -Fe₂O₃), die in eine Dextranmatrix eingebettet sind und damit einen resultierenden Partikeldurchmesser von ca. 70 nm besitzen. N50 Partikel bestehen aus 5–15 nm großen Magnetitkristallen (Fe₃O₄), ebenfalls in eine Dextranmatrix eingebettet, mit einem resultierenden Partikeldurchmesser von ca. 50 nm. N20 Partikel sind die für die N70 Partikel verwendeten Eisenoxidkristalle (γ -Fe₂O₃) ohne jegliche Hülle.

SH U 555A (Resovist, Schering AG, Berlin) besteht aus einem 4,6 nm großen Maghemit-/Magnetit-Kern, wobei der Maghemitanteil überwiegt (Lawaczeck et al., 1997; Bowen et al., 2002). Das Hüllenmaterial besteht aus Carboxydextran (MW 1800Da). Der resultierende Partikeldurchmesser ergibt sich somit zu 57–59 nm. Die magnetische Suszeptibilität wurde bei 0,45 T und Raumtemperatur mit 107 emu/g Fe bestimmt (Lawaczeck et al., 1997). Die Relaxivität in Wasser bei 0,47 T und 40 °C beträgt $r_1 = 25$ l/(mmol·s) und $r_2 = 164$ l/(mmol·s) (Lawaczeck et al., 1997).

Der Partikeltyp B102 wurde von Dr. N. Buske, Berlin zur Verfügung gestellt. B102 besteht aus ca. 5–10 nm großen Maghemit/Magnetit-Kristallen beschichtet mit Carboxymethyldextran. Der genaue Partikelbau ist unbekannt, soll aber dem von Resovist sehr ähnlich sein. Der Durchmesser beträgt ca. 60 nm (Aussage N. Buske).

Tabelle 2: Auflistung des Aufbaus der verwendeten Eisenoxidpartikel.

Partikel	Partikelgröße	Hülle	Eisenoxidart	Struktur	Kristallgröße
N20 ¹	20 nm	keine	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Kristalle	5–15nm
N50 ¹	50 nm	Dextran	Fe_3O_4	Kristalle eingebettet in eine Dextranmatrix	5–15nm
N70 ¹	70 nm	Dextran	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Kristalle eingebettet in eine Dextranmatrix	5–15nm
B102 ²	ca. 60 nm	Carboxymethyl-Dextran	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3 / \text{Fe}_3\text{O}_4$	Kristalle eingebettet in eine Dextranmatrix	5–10nm
Resovist ³	60 nm	Carboxydextran	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (Fe_3O_4)	Kristalle eingebettet in eine Dextranmatrix	4,6nm

¹Angaben micromod Partikeltechnologie, GmbH

²Angaben N.Buske

³(Lawaczek et al., 1997; Bowen et al., 2002)

4.2 Qualitative Referenzverfahren

4.2.1 Transmissions-Elektronen-Mikroskopie

Das Transmissions-Elektronen-Mikroskop (TEM) dient zum einen der Darstellung des Aufbaus der Partikel, da dieser für die theoretische Betrachtungsweise der Relaxationsraten benötigt wird. Zum anderen soll mit dem TEM untersucht werden, ob Partikel von den HUVE-Zellen internalisiert werden.

4.2.1.1 Untersuchung des Aufbaus der Eisenoxidpartikel

Die Eisenoxidpartikelsuspensionen werden 1:100 verdünnt. Von dieser Verdünnung werden 2 μl auf ein Kupfergitter getropft und eingetrocknet. Die Probengitter mit den eingetrockneten

Eisenoxidpartikeln können nun mit einem Zeiss 902 Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM, Carl Zeiss) untersucht werden. Für fotografische Aufnahmen ist das TEM mit einer Planfilmkamera ausgestattet.

4.2.1.2 Zellpräparation für die Elektronenmikroskopie

Die HUVE-Zellen werden auf mit PDL (Poly-D-Lysin) beschichteten Deckgläschen ausgesät. Das Medium wird abgezogen und die Deckgläschen werden mit warmen PBS gespült. Die Zellen werden mit N70+anti-VEGFR-1-Konjugat in einer Konzentration von 20 µg Fe/ml 45 min bei 37 °C inkubiert. Danach werden die Zellen mit 3,5%iger Glutaraldehyd-Lösung 30 min fixiert, mit PBS gewaschen und mit 2%iger Osmiumtetroxid-Lösung (OsO₄) behandelt. Osmiumtetroxid (OsO₄) greift an Doppelbindungen an und verbindet so z.B. Phospholipide in Membranen. Über eine Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 85%, 96% und 2 x 100% Alkohol jeweils 5 min) werden die Proben entwässert, in Araldit eingebettet und als 0,1 µm dicke Schnitte auf Kupfernetze aufgebracht. Die Netze werden mit einer 70%igen Uranylacetat-Methanol-Lösung kontrastiert, in einer Methanolreihe (70%, 50%, 30%, dest. Wasser) gewaschen und getrocknet. Die Proben werden nun mit einem Zeiss 902 Transmissions-Elektronenmikroskop untersucht.

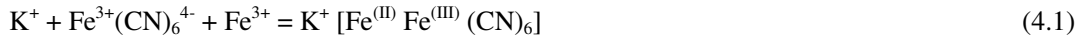
4.2.2 Histologische Färbetechniken

Die Histologie untersucht Gewebeschnitte und Zellen mittels besonderer Färbetechniken. An Hand dieser Färbungen lassen sich oft sehr genaue Diagnosen stellen. Eine dieser Färbetechniken ist die so genannte Berlinerblaufärbung, die ein histochemischer Nachweis für dreiwertiges Eisen ist, dessen Vorkommen durch hellblaue Körnchen unter dem Mikroskop zu sehen ist. Die altbewährten chemischen Färbemethoden sind heute durch immunologische Methoden ergänzt worden. Mit Hilfe der Immunhistochemie lassen sich spezifische Antigene, wie z. B. Proteine, in Zellen nachweisen. Die Herstellung des für den immunhistochemischen Nachweis benötigten Antikörpers erfolgt, indem man ein gereinigtes Protein in eine andere Spezies injiziert und anschließend die gegen das Protein gebildeten Antikörper aus dessen Blut gewinnt. Diese werden mit den zu untersuchenden Zellen inkubiert. Die Antigen-Antikörper-Komplexe werden gewöhnlich durch einen Sekundärantikörper (gerichtet gegen den Fc-Teil der Immunglobuline des Spendertieres) sichtbar gemacht. Dies geschieht meistens durch Kopplung von fluoreszierenden Stoffen oder Enzymen an den Sekundärantikörper. Durch eine Folgereaktion bildet sich dann ein farbiges Produkt (Boenisch, 2003).

4.2.2.1 Berlinerblaufärbung von Eisen in Zellen

Um dreiwertiges Eisen in Zellen nachweisen zu können, bedient man sich der so genannten Berlinerblau-Reaktion. Die Zellen werden auf Deckgläschen ausgesät und zwei Tage

angezogen. Sie werden danach mit Aceton fixiert. Die Zellen werden dann in einer 2%igen Kaliumhexacyanoferrat(II)-Lösung, welche 1:1 mit 1 N Salzsäure gemischt wird, 10 min bei 37 °C inkubiert. Dreiwertiges Eisen bildet mit Kaliumhexacyanoferrat(II) einen blauen Niederschlag (Berliner Blau) nach folgender Reaktionsgleichung:



Für eine Gegenfärbung der Kerne werden die Zellen 3 min mit Kernechtrubin inkubiert. Zwischen den Schritten werden die Zellen jedesmal mit PBS gespült.

4.2.2.2 Immunhistochemische Färbung von VEGFR-1 und 2 an HUVEC

Zum Nachweis der VEGF-Rezeptorproteine werden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und zwei Tage angezogen. Sie werden dann mit PBS gespült, für 10 min mit Aceton fixiert, mit PBS gewaschen und mit *protein blocking agent* (PBA) geblockt. Die Zellen werden dann wieder mit PBS gewaschen und anschließend 1 h bei 37 °C mit den Primärantikörper anti-VEGFR-1 und KDR in der Verdünnung 1:6 inkubiert. Die Antikörper sind beide gegen die extrazellulären Epitope der Rezeptoren gerichtet, so dass ein Aufschließen der Zellmembran nicht nötig ist. Die Zellen werden nach nochmaligem Spülen mit PBS mit dem „Universal Immunostaining Kit Streptavidin-Peroxidase“ (Immunotech, Marseille, Frankreich) nach Angaben des Herstellers gefärbt. Als Sekundärantikörper dient der in dem Kit enthaltene biotinylierte polyvalente Sekundärantikörper, der sowohl Kaninchen- als auch Mauseantikörper erkennt. Nach Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun werden die Deckgläschen mit Hilfe von „Thermo Shandon“ (Immu-Mount, Pittsburgh, PA, USA) auf Objektträgern fixiert und lichtmikroskopisch begutachtet. Die Rezeptoren sind nunmehr rot markiert, die Gegenfärbung der Zellkerne ist blau.

4.2.3 Dot-Spot-Test zur Detektion von Antikörpern an Eisenoxidpartikeln

Der so genannte Dot-Spot-Test dient dazu, die Bindung der Antikörper an die Eisenoxidpartikel auf einem Nitrozellulosestreifen zu kontrollieren. Eine Quantifizierung ist dabei nicht möglich. Zunächst werden auf einem Membranstreifen (Amersham Biosciences, Hybond-PVDF (Polyvinylidene-difluorid)) mit einem Kugelschreiber kleine Markierungen angebracht (Spots), um die später aufgetragenen Substanzen lokalisieren zu können. Da der Membranstreifen hydrophob ist, wird der Streifen in Methanol angefeuchtet, um ihn hydrophil zu machen. Anschließend wird er zunächst in Puffer und dann zum Antrocknen auf Wachspapier gelegt. Ist der Streifen fast trocken, wird auf die Spots ca. 1–3 µl des zuvor hergestellten Konjugates gegeben. Das Konjugat wird eingetrocknet und dann wieder mit Methanol angefeuchtet. Nun wird der Streifen dreimal 15 min mit TBST gewaschen, um ihn für die nächsten Reaktionen umzupuffern. Danach wird er in eine Verdünnung des Sekundär-

antikörpers mit TBST gelegt und ca. 1 h inkubiert. Das Tween im TBST (Beschreibung s. Abschnitt 4.1.1) dient dazu den Antikörper in Lösung zu halten. Der Sekundärantikörper besteht aus einem Antikörper gegen den Primärantikörper (hier: anti-Maus gegen anti-VEGFR-1 und anti-Ziege gegen anti-VEGFR-2) gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase. Danach wird der Streifen wieder dreimal 15 min mit TBST gewaschen. Die Detektion erfolgt mit einem Zwei-Komponenten-Chemilumineszenz-Verstärkersystem (ECL, *enhanced chemiluminescence*, Amersham Pharmacia). Die am Sekundärantikörper haftende Meerrettich-Peroxidase oxidiert unter alkalischen Bedingungen in Gegenwart von Wasserstoffperoxid das cyclische Diacylhydrazid Lumino und regt es dadurch an. Beim Zurückfallen auf das ursprüngliche Energieniveau emittiert das oxidierte cyclische Diacylhydrazid Lumino Licht. Phenole verstärken diese Reaktion um das 1000fache und verlängern sie auch. Die beiden Komponenten des ECL-Kits wurden gemäß Angabe des Herstellers angesetzt und auf die Streifen gegeben. Nach angegebener Inkubationszeit wurde die Flüssigkeit mit Hilfe von Fließpapier entfernt und die Streifen in Frischhaltefolie eingeschlagen. Dies geschieht zum einen, um ein Austrocknen zu verhindern, und zum anderen, um den aufzulegenden Film vor Feuchtigkeit zu schützen. Durch Auflegen eines speziellen hochempfindlichen Filmes (Hyperfilm ECL, Amersham) für die Dauer von 10 min und anschließendem Entwickeln (5 min), Fixieren (5 min) und Wässern (30 min) kann die Chemilumineszenz detektiert werden.

4.3 Quantitative Referenzverfahren

4.3.1 Totalreflexions-Röntgenfluoreszenz Analyse

Die Totalreflexions-Röntgenfluoreszenz Analyse (TRFA) ist eine Technik zur Oberflächen- und Micro- bzw. Spurenanalyse der Elemente. Sie unterscheidet sich in vielen Eigenschaften von der klassischen Röntgenfluoreszenzanalyse (RFA) und ist eher mit anderen spektroskopischen Methoden zur Spurenelementanalyse, wie der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) und *inductively-coupled-plasma* Techniken (ICP-OES, ICP-MS), oder Oberflächenanalyse, wie der Auger-Elektronen Spektroskopie (AES) und der Sekundär-Ionen Massenspektroskopie (SIMS), zu vergleichen. Die TRFA basiert auf der Entstehung von stehenden Röntgenwellen über der Oberfläche eines Probenträgers bzw. in oberflächennahen Schichten bei kleinem Einfallswinkel der Anregungsstrahlung. Je nach Anwendung werden Nachweisgrenzen bis 1 pg bzw. 10^{10} Atome/cm² erreicht (Klockenkämper, 1997).

4.3.1.1 Grundlagen der TRFA

Im Gegensatz zur RFA, die mit Einfallswinkeln von etwa 45° arbeitet, wird bei der TRFA mit einem Winkel von < 0,1° angeregt (Klockenkämper et al., 1992).

Anregung

Die einfallende Röntgenstrahlung wird an der Übergangsgrenze von einem optisch dichteren Medium (Luft) zu einem optisch dünneren Medium (Vakuum) gebrochen. Reflexion und Refraktion werden durch den komplexen Brechungsindex n bestimmt:

$$n = 1 - \delta - i\beta, \quad (4.2)$$

wobei δ der dispersive Term und β der Schwächungsterm ist. δ ist im Wesentlichen von der Dichte des reflektierenden Mediums abhängig, β hingegen von dem Massenabsorptionskoeffizienten. Beide Terme werden von der Wellenlänge bzw. der Energie der anregenden Röntgenstrahlung beeinflusst. Für Röntgenstrahlen sind δ und β sehr klein, δ liegt in der Größenordnung von 10^{-6} , β sogar noch darunter, so dass der Brechungsindex n nur geringfügig kleiner als eins ist. Röntgenstrahlen, die aus Vakuum oder Luft in Materie eindringen, werden zur Grenzfläche hin gebrochen. δ bestimmt den kritischen Winkel, unterhalb dem Totalreflexion stattfindet. Der kritische Winkel φ_c lässt sich aus dem Snelliusschen Gesetz herleiten zu:

$$\varphi_c = (2\delta)^{1/2} \quad (4.3)$$

φ_c wächst mit der Wellenlänge der anregenden Röntgenstrahlung. So ist z.B. φ_c bei Mo- K_α -Anregung an einer Siliziumoberfläche mit $\varphi_c = 1,75$ mrad kleiner als für Cu- K_α -Anregung mit $\varphi_c = 3,86$ mrad. φ_c ist ebenfalls von den Materialkonstanten des jeweiligen reflektierenden Medium abhängig.

Mit Hilfe der Fresnelschen Gleichungen, dem komplexen Brechungsindex und dem kritischen Winkel können zwei für die TRFA wichtige Größen bestimmt werden: die Reflektivität und die Eindringtiefe. Beide Größen sind abhängig vom Einfallswinkel φ . Während die Reflektivität zumindest für weniger absorptive Materialien unterhalb des kritischen Winkels φ_c nahe eins ist und abfällt, sobald φ_c überschritten wird, beträgt die Eindringtiefe unterhalb des kritischen Winkels φ_c nur wenige Nanometer und steigt bis in den μm -Bereich an, sobald φ_c überschritten wird. Die hohe Reflektivität eines optisch polierten Trägermaterials führt unter Totalreflektionsbedingungen zu einer drastischen Reduktion des spektralen Untergrundes und bildet daher die Basis für die Mikro- und Spurenanalyse mit Hilfe der TRFA. Die geringe Eindringtiefe unterhalb des kritischen Winkels macht die TRFA zu einer inhärent oberflächensensitiven Technik.

Stehende Wellen

Die Totalreflektion von Röntgenstrahlen wird charakterisiert durch die Bildung von stehenden Röntgenwellen über Grenzflächen und innerhalb oberflächennaher Schichten. Die zum Teil recht komplexen Überlagerungserscheinungen der Primärstrahlung können mit Hilfe von Modellrechnungen unter Einsatz des Fresnelschen Formalismus für die Ausbreitung von elektromagnetischen Wellen in Schichtsystemen verstanden und exakt beschrieben werden (Klockenkämper, 1997). Für den einfachsten Fall einer flachen und scharf definierten Grenzfläche zwischen Vakuum und eines unendlich dicken Mediums kann die Formation von stehenden Wellen ohne die Verwendung von mathematischen Methoden illustriert werden. Abbildung 11 zeigt die auftreffende zusammen mit der reflektierten Welle und den resultierenden Interferenzen, die unabhängig von der Zeit sind. Für kleine streifend einfallende Winkel ist das erste Minimum nahe der Grenzfläche. Weitere Maxima und Minima folgen periodisch in Abständen $d = (\lambda/2) / \sin\varphi$. Hierbei ist λ die Wellenlänge und φ der Einfallswinkel. Das Feld der stehenden Wellen in der Nähe einer totalreflektierenden Oberfläche ist in Abbildung 12 für zwei extrem unterschiedliche Einfallswinkel dargestellt. Das Quadrat der Wellenamplitude, die Primärintensität, ist abgebildet als eine Funktion des Abstandes von der Grenzfläche z , wobei jeder Punkt des Wellenfeldes durch zylindrische Koordinaten dargestellt ist.

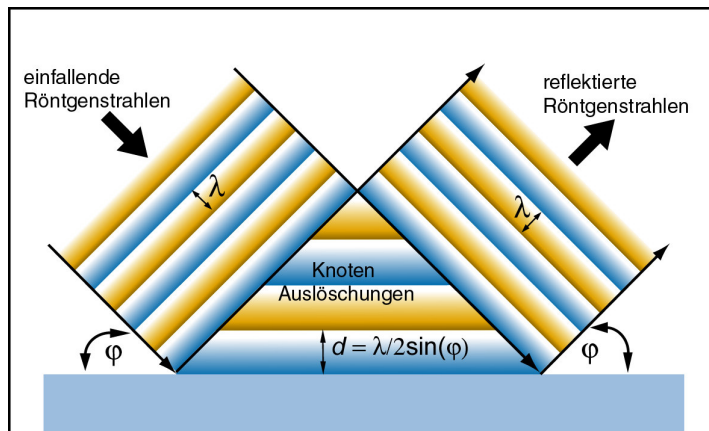


Abbildung 11: Schematische Darstellung von stehenden Wellen über einer Oberfläche. Die stehenden Wellen bilden sich durch die Interferenz von einfallenden und total reflektierten Röntgenstrahlen (nach Klockenkämper et al., 1992).

Abbildung 12a beschreibt die Situation für einen Anregungswinkel weit unterhalb des kritischen Winkels für Totalreflexion ($\varphi \ll \varphi_c$). Dieses Feld ist durch stark ausgeprägte Amplituden und Knotenebenen charakterisiert. Die Amplitudenebenen zeigen eine vielfache Intensität. Die Knotenebenen sind dabei nahezu intensitätsfrei. Die Eindringtiefe ist in diesem Fall sehr niedrig. Abbildung 12b) beschreibt die Situation für einen Anregungswinkel weit

oberhalb des kritischen Winkels für Totalreflexion ($\varphi \gg \varphi_c$). Mit zunehmendem Winkel φ ändern sich Phase und Periode der Wellen und die Intensität geht gegen eins. Unterhalb der Grenzfläche fällt die Intensität mit zunehmendem Abstand von der Grenzfläche exponentiell ab. Im Fall der Totalreflexion beträgt die Eindringtiefe nur wenige nm, nimmt jedoch mit zunehmendem Anregungswinkel bis in den μm -Bereich zu.

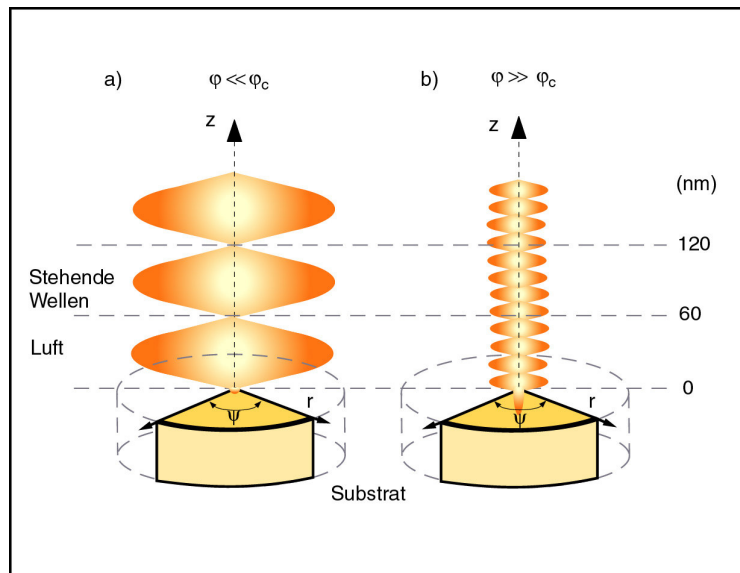


Abbildung 12: Intensitätsverteilung in einem Anregungsfeld stehender Röntgenwellen nach Reflexion der Primärstrahlung an einem totalreflektierenden Substrat. Jeder Punkt im Feld kann durch Zylinderkoordinaten beschrieben werden: Abstand r , Polarwinkel ψ und Höhe z . Die Intensität, welche unabhängig von r ist, kann durch eine Funktion aus ψ und z beschrieben werden. **a)** zeigt die Situation für den Fall der Totalreflexion ($\varphi \ll \varphi_c$), **b)** beschreibt die Situation für große Einfallswinkel ($\varphi \gg \varphi_c$) (nach Klockenkämper, 1997).

4.3.1.2 Aufbau eines TRFA-Spektrometers

In Abbildung 13 sind die wichtigsten Komponenten eines TRFA-Spektrometers dargestellt. Die polychromatische Strahlung der Röntgenröhre wird zur Anregung über einen Spiegel und über einen Monochromator gelenkt. Der Spiegel, meist aus Quarzglas, dient lediglich als Tiefpassfilter, indem er nur Anregungsstrahlung unterhalb des kritischen Winkels für Totalreflexion auf den Probenträger lenkt und die höher energetische Bremsstrahlung durch Streuung und Absorption vernichtet. Ein Metalfilter hinter dem Röntgenfenster dient zur Vorfilterung und verbessert somit die Verhältnisse weiter. Bereits geringe Änderungen des Einfallswinkels und der Anregungsenergie bewirken deutliche Änderungen des Signals. Eine Monochromatisierung der Anregungsstrahlung ist daher unbedingte Voraussetzung. Multilayer-Monochromatoren, die durch eine alternierende Folge dünner Schichten in Nanometerstärke mit hoher und niedriger Dichte charakterisiert sind, erlauben die Wahl eines definierten schmalen Energiebandes durch die Einstellung des Winkels ψ . Die Fluoreszenzstrahlung wird mit einem Si(Li)-Halbleiterdetektor nachgewiesen und mit einem Vielkanalanalysator registriert. Der Detektor ist

senkrecht über dem Probenträger in einem Abstand von wenigen mm über der Probe montiert (Abbildung 13).

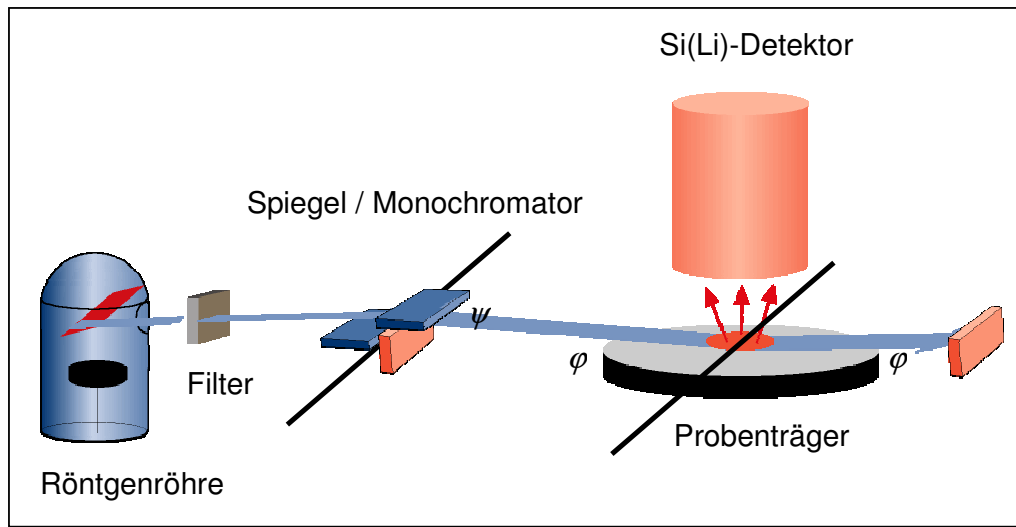


Abbildung 13: Aufbau eines TRFA-Spektrometers: Die polychromatische Strahlung der Röntgenröhre wird über einen Monochromator gelenkt. Die monochromatische Strahlung trifft nun mit dem Winkel φ auf die Probe und wird totalreflektiert. Die Fluoreszenzstrahlung wird mit einem Si(Li)-Detektor nachgewiesen.

4.3.1.3 Kalibrierung und interne Ein-Element-Standardisierung

Für die Mikroanalyse durch die TRFA werden Proben von wenigen Mikroliter bzw. wenigen Nanogramm benötigt. Aufgrund dieser geringen Probenmengen werden Absorptions- und Verstärkungseffekte vermieden, so dass für die Kalibrierung eine konstante Beziehung zwischen der Fluoreszenzintensität und der Ordnungszahl erhalten bleibt. Die Eichkurve ist daher unabhängig von der Probenmatrix. Der Verlauf der Kurve wird lediglich durch die Empfindlichkeit für die einzelnen Elemente bestimmt. Eine einmalige Kalibrierung während der Installation des Spektrometers behält ihre Gültigkeit, solange keine wesentlichen Komponenten, wie z.B. der Detektor, ausgetauscht werden müssen. Zur Quantifizierung einer Elementanalyse wird ein Einzelelementstandard, wie beispielsweise Yttrium, als interner Standard hinzugefügt. Die unbekannt Konzentrationen jedes anderen Elements können somit nach

$$C_E = C_S \cdot \frac{cps_E}{cps_S} \cdot \frac{\varepsilon_S}{\varepsilon_E} \quad (4.4)$$

berechnet werden, wobei C die Konzentration, cps die Impulse pro Sekunde, S und E die Abkürzungen für Standard und Element und ε die relative Empfindlichkeit des Instrumentes bezeichnen. Die absolute Empfindlichkeit des Instrumentes wird jedes Mal vor einer Messserie mit einer polierten Nickelplatte ermittelt.

Die instrumentellen Nachweisgrenzen variieren entsprechend der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Elemente. Für Metalle liegt sie im Bereich von einigen Pikogramm bis hinunter in den Subpikogramm-Bereich.

4.3.1.4 Messung der Eisenaufnahme der Zellen

Die Zellen werden gemäß den Versuchsvorschriften mit dem Konjugat oder den ungekoppelten Eisenoxidpartikel inkubiert. Danach werden sie mit warmen PBS zweimal gründlich gewaschen und in 10 ml PBS abgekratzt. Die Zellen werden dann nach der Trypanblau-Methode (4.4.1.1) gezählt. Ein Teil der Zellen (500.000–2 Mio) wird für die Eisenquantifizierung abgenommen und in einem Röhrchen (1,5 ml, Eppendorf) bei 1000 g und 5 min zentrifugiert. Der Überstand des resultierenden Zellpellets wird bis auf ca. 20 µl abgezogen. Nun wird für die TRFA Messung 20 ng Yttrium als interner Standard hinzugefügt. Das Zellpellet wird mit der Pipette homogenisiert und auf einen trockenen, sauberen Probenträger der TRFA gegeben. Das aufgetropfte Volumen wird dann eingetrocknet.

Die TRFA Messungen wird an einem TXRF 8030C Spektrometer von ATOMIKA Instruments (Oberschleißheim) bei einem Einfallswinkel von 1 mrad und einer Messzeit von 300 s durchgeführt. Das Spektrometer besitzt eine 3-kW-Röntgenröhre mit einer Mo-W-Anode und einem drehbaren Multilayer-Monochromator.

Die Messwerte der Zellen werden bei der Auswertung um das im PBS enthaltene Eisen korrigiert. Hierzu wird das Eisen in drei Proben 20µl PBS quantifiziert. Dies ergibt ein Eisengehalt von $2,46 \pm 0,48$ ng Fe / 20 µl PBS. Der mittlere Eisengehalt von drei Proben $5 \cdot 10^5$ HUVE-Zellen in PBS beträgt: $2,47 \pm 0,48$ ng Fe pro $5 \cdot 10^5$ Zellen. Somit existiert in den Zellen keine nennenswerte Eisenmenge, welche die Messungen verfälschen kann.

4.3.2 Quantifizierung der Antikörper mittels ^{125}I -Markierung

Um die Antikörper, welche an die Eisenoxidpartikel (Nanomag-D spio 70 nm) gekoppelt sind quantifizieren zu können, wird ein Teil der Antikörper vorher mit ^{125}I gelabelt. Diese können dann mit einem Gammazähler quantifiziert werden. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte dieses Verfahrens beschrieben:

1 µl anti-VEGFR-1 wird mit 4 µl Na^{125}I und 10 µl 1 M Kaliumphosphat pH 7,2 gemischt. Dann wird die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Chloramin T aktiviert. Nach ca. 30–40 s wird die Reaktion durch Zugabe von 10 µl 1 M Natriumthiosulfat gestoppt. Das überschüssige ^{125}I wird nun mit einer Sephadex G-25 Chromatographiesäule (15 x 0,5 cm) und 20 mM Hepes, 0,14 M NaCl-Puffer, pH 7,4 entfernt. 1 µl ^{125}I -anti-VEGFR-1 werden zu 40 µg anti-VEGFR-1 gegeben. Danach wird die Gammastrahlung des Gemisches mit einem Gammazähler (Wallac)

gemessen. Die Antikörperkonzentration kann durch die mit dem Gammazähler ermittelte Gammastrahlung der Probe CPM_{Probe} bestimmt werden. Die Gammastrahlung eines definierten Aliquots des radioaktiv markierten Antikörpers wird hierfür zuvor gemessen, um hieraus die Gammastrahlung CPM_{AK} pro Menge Antikörper V_{AK} zu bestimmen. Als nächstes werden die Antikörper, wie in Abschnitt 4.4.2 beschrieben, an die Eisenoxidpartikel gekoppelt. Für die Optimierung der Kopplung werden nun verschiedene BrCN-Volumina für die Koppelung verwendet, um zu ermitteln, wie viel BrCN für die maximale Anzahl von Antikörpern an den Eisenoxidpartikeln nötig ist. Nach der Konjugation der N70-Partikel mit den Antikörpern wird in einem letzten Gelchromatographieschritt das entstandene Konjugat von den überschüssigen radioaktiv markierten Antikörpern gereinigt. Hierbei werden sechs bis neun Fraktionen à 1 ml verschiedener Eisenoxidpartikelkonzentrationen gesammelt. In diesem Trennschritt gelangen zuerst die überschüssigen Antikörper durch die Gelchromatographiesäule und dann erst das Konjugat. Denn die Gelchromatographiesäule separiert die Substanzen nach ihrer Größe. Die Proben werden mit einem Gammazähler zur Antikörperquantifizierung und einem Photometer zur Eisenoxidpartikel-Quantifizierung vermessen. Die beste Kopplung existiert in der Fraktion, in der sowohl eine maximale Eisen- als auch eine maximale Antikörperkonzentration gemessen wird. Für diese Probe wird nun das Verhältnis von Antikörper zu Eisenoxidpartikel berechnet. Von den Eisenoxidpartikeln wird ein Absorptionsspektrum (240–720 nm) mit einem Photometer (Hitachi U-2000 Spectrometer) aufgenommen und eine charakteristische Absorptionswellenlänge von 527 nm ermittelt. Bei dieser Wellenlänge wird die Absorption bei sechs unterschiedlichen Eisenoxidpartikelkonzentrationen gemessen. Trägt man nun die gemessenen Absorptionen in Abhängigkeit von der Eisenoxidpartikelkonzentration auf, so erhält man durch eine lineare Regression für die Anzahl der Partikel $N_{N70} = 1,43 \cdot 10^{11} \cdot Abs$, wobei Abs die gemessene Absorption ist. Die Anzahl der Partikel N pro ml wird durch den Hersteller angegeben (N70: $3,5 \cdot 10^{13}$ Partikel/ml). Mit der gemessenen Absorption und der ermittelten Geradengleichung können nun die Eisenoxidpartikelkonzentration der Proben bestimmt werden. Die Konzentration des gekoppelten Antikörpers in der zu messenden Fraktion C_{AK} kann mit $C_{AK} = V_{AK}/CPM_{AK} \cdot CPM_{Probe}$ ermittelt werden. Für Antikörper gilt allgemein, dass 1 M Antikörper 180.000 g/l entspricht (Alberts et al., 1995), folglich entspricht eine Masse von 180.000 g Antikörpern einer Anzahl von $6,023 \cdot 10^{23}$ Antikörpern. Hieraus kann die Anzahl der Antikörper pro ml mit $N_{AK} = 3,34 \cdot 10^{12} \cdot C_{AK}$ berechnet werden. Die Anzahl der Antikörper pro Eisenoxidpartikel in einer Fraktion ergibt sich somit zu:

$$\frac{N_{AK}}{N_{N70}} = 23,4 \cdot \frac{V_{AK} \cdot CPM_{Probe}}{CPM_{AK} \cdot Abs} \quad (4.5)$$

N_{AK} ist hierbei die Anzahl der Antikörper, V_{AK} ist das zu Anfang eingesetzte Volumen des Antikörpers, CPM_{AK} sind die Counts pro Minute des V_{AK} und CPM_{Probe} gibt die bei der Probe gemessenen Counts an.

4.3.3 Messung der Suszeptibilitäten mit einer Faraday-Magnetwaage

Um die Messungen der Relaxationszeiten mit den theoretischen Berechnungen vergleichen zu können, wird die Magnetisierung der Eisenoxidpartikel benötigt. Diese kann leicht aus der mit einer Faraday-Magnetwaage ermittelten Suszeptibilität berechnet werden.

4.3.3.1 Prinzip der Magnetwaage

Eine Methode zur quantitativen Messung der magnetischen Suszeptibilität χ ist die Faraday Magnetwaage (Abbildung 14). Hierbei wird mit einer Waage die Kraft gemessen, mit der die zu untersuchende Probe in ein inhomogenes Magnetfeld hineingezogen oder herausgedrückt wird (Demtröder, 1995). Die Probe befindet sich in einem zylindrischen Glasrohr, das über einen Faden mit einer empfindlichen Waage verbunden ist. Gemessen wird die durch das Einschalten des Elektromagneten hervorgerufene Gewichtsveränderung. Bei einer Feldstärke \vec{B} wird die Kraft \vec{F} auf eine Probe mit dem Volumen V bei einer Magnetisierung \vec{M} wie folgt beschrieben:

$$\vec{F} = \vec{M} \cdot V \cdot \text{grad } \vec{B} \quad \text{mit} \quad \vec{M} = \chi \vec{H} = \left(\frac{\chi}{\mu_0} \right) \cdot \vec{B} \quad \text{ergibt:} \quad (4.6a, b)$$

$$\vec{F} = \left(\frac{\chi}{\mu_0} \right) \cdot \vec{B} \cdot V \cdot \text{grad } \vec{B} \quad (4.7)$$

Diamagnetische Körper ($\chi < 0$) erfahren eine radial nach außen gerichtete Kraft, wo das Feld schwächer ist, während paramagnetische Körper ($\chi > 0$) und besonders Ferromagnete und Superparamagnete ins Feld hineingezogen werden (s. Abschnitt 3.6.1). Oft wird das inhomogene Magnetfeld durch eine konische Form der Polschuhe eines Elektromagneten erzeugt. Hiermit wird versucht, einen möglichst konstanten Feldgradienten am Ort der Probe zu erreichen.

Die Suszeptibilität einer Masse m (Grammsuszeptibilität χ_g) erhält man aus Gl. 4.7:

$$\chi_g = \frac{\vec{F}_{res}}{m_0 \vec{H} \cdot \text{grad } \vec{H}} \quad (4.8)$$

mit $\vec{H} = \frac{\vec{B}}{\mu_0}$. m_0 bezeichnet hierbei die eingewogene Masse und \vec{F}_{res} die resultierende Kraft, welche sich aus der effektiv gemessenen Masse, korrigiert um den diamagnetischen Anteil der Probe und des Röhrchens sowie der Erdanziehungskraft $\vec{F} = m \cdot \vec{g}$ zusammensetzt. Bei den Berechnungen ist die Molmasse m_{Mol} der Probe zu berücksichtigen. Die Grammsuszeptibilität χ_g wird in der cgs-Einheit [$10^6 \cdot \text{cm}^3/\text{g}$] angegeben. Für die spezifische Magnetisierung der Probe gilt:

$$\vec{M}_g = \chi_g \cdot \vec{H} \quad (4.9)$$

Die Suszeptibilitäten und Magnetisierungen werden berechnet mit: (Fe, $m_{mol} = 55,85 \text{ g/l}$). Die Magnetisierung pro Volumen erhält man nach

$$\vec{M} = \chi_g \cdot \vec{H} \cdot \rho, \quad (4.10)$$

wobei ρ die Dichte des Stoffes angibt.



Abbildung 14: Verwendete Faraday-Magnetwaage (Bruker, Karlsruhe, <http://www.uni-kiel.de/anorg/bensch/bensch.htm>).

4.3.3.2 Probenpräparation und Messung

Für die Messung der magnetischen Suszeptibilität der verschiedenen Nanopartikel werden Aliquots gefriergetrocknet. Zuvor muss die Eisenkonzentration der verschiedenen Partikel-flüssigkeiten bestimmt werden (Abschnitt 4.3.4). Danach wird die Trockenmasse bestimmt. So

kann berechnet werden, wie viel Eisen sich in der Probe befindet (Tabelle 3). Für die Messung mit der Faraday-Magnetwaage (Bruker, Karlsruhe) wird nun eine kleine Probe in einem Glasröhrchen, die so genannte Einwaage m_{Probe} , abgewogen. Bei einer konstanten Temperatur von 298 K wird nun das Magnetfeld von 4–15 Gauss in 0,5 Gauss-Schritten verändert und das Gewicht der Probe m_g im Magnetfeld gemessen. Das Magnetfeld wird zweimal hoch und wieder heruntergefahren, so dass die einzelnen Punkte vier mal gemessen werden. Hieraus werden dann Mittelwert und Standardabweichung ermittelt.

Tabelle 3: Berechnung der Eisenkonzentration in der Einwaage EW.

	Volumen [μl]	Trockengewicht [mg]	C(Fe) ¹ [mg/ml]	Trockenmasse [Fe/mg]	EW [mg]	EW [Fe/mg]
N50	500	30,38	1,80	0,90	6,01	0,178
B102	200	16,75	18,48	3,70	13,04	2,877
N130	200	11,90	7,40	1,48	8,54	1,062
N70	500	4,72	1,55	0,78	2,27	0,373
N20	200	2,91	7,84	1,57	1,26	0,679
Resovist	1000	159,23	27,37	27,37	12,82	2,204

¹Eisenkonzentration der Eisenoxidpartikel

4.3.3.3 Auswertung

Die magnetische Suszeptibilität χ_g lässt sich nach Gl. 4.8 aus den Messwerten wie folgt berechnen:

$$\chi_g = -\frac{981 \cdot (m_g + r_k)}{m_{\text{Probe}} \vec{H} \cdot \text{grad } \vec{H}} + \frac{D_d}{m_{\text{mol}}} \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{g}} \right], \quad (4.11)$$

wobei r_k die diamagnetische Röhrchenkorrektur und D_d die diamagnetische Korrektur des Gerätes sind. Die Magnetisierung kann nun mit Gl. 4.9 oder 4.10 berechnet werden.

4.3.4 Photometrische Bestimmung des Eisengehaltes von Magnetpartikeln

Da sich die Eisenkonzentration der Eisenoxidpartikelsuspensionen durch die Kopplungsschritte verändert, wird die entgültige Eisenkonzentration nach folgender Methode ermittelt:

Als erstes wird eine Eichgerade durch wohldefinierte Eisenkonzentrationen ermittelt. 50 μl Eisenstandard (Titrisol) und 50 μl konzentrierte Salzsäure werden in einem 10-ml-Röhrchen mit Schraubverschluss 10 min bei 70 °C inkubiert, um das Eisen aus seiner Verbindung zu lösen, und anschließend 10 min lang auf Raumtemperatur abgekühlt. Zu diesem Gemisch werden 4,9 ml Citronensäure-Phosphat-Puffer gegeben. Die erhaltene Eisenlösung wird als Eisen-

standard verwendet. Nun werden verschiedenen Verdünnungen des Standards zur Ermittlung der Eichgeraden in einer Mikrotiterplatte hergestellt. Danach wird jeweils 15 µl Fe-AN (Eisen-Test-Kit) und 135 µl Citronensäure-Phosphat-Puffer hinzugegeben und gut vermischt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wird die Verfärbung in einem Mikroplattenleser bei 592 nm quantifiziert.

Danach erfolgt die Präparation der Probensuspension. Die Partikelsuspensionen sollten eine Eisenkonzentrationen von 5–10 mg/ml aufweisen. 2 x 20 µl Partikelsuspension werden jeweils mit 100 µl konzentrierter Salzsäure in je einem 10-ml-Röhrchen mit Schraubdeckel 10 min bei 70 °C inkubiert, um das Eisen aus seiner Verbindung zu lösen, und danach auf Raumtemperatur abgekühlt. 4880 µl Citronensäure-Phosphat-Puffer wird zur aufgeschlossenen Partikelsuspension gegeben. Danach wird 150 µl dieser Lösung in ein Well gefüllt und mit 135 µl Citronensäure-Phosphat-Puffer verdünnt. Für eine weitere Eisen-Konzentrationsbestimmung in einem anderen Verdünnungsbereich wird 50 µl der Lösung in ein zweites Well gefüllt und mit 235 µl Citronensäure-Phosphat-Puffer verdünnt. Es werden jeweils 15 µl Fe-AN in beide Wells gegeben und gut vermischt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wird die Verfärbung in einem Mikroplattenleser bei 592 nm quantifiziert.

Die Auswertung erfolgt mit den Eisenkonzentrationen in den Wells der Eichgeraden. Sie betragen:

Well	c (Fe)	Well	c (Fe)
A	5,0000	E	0,3125
B	2,5000	F	0,1560
C	1,2500	G	0,0780
D	0,6250	H	0,0000

Der Eisengehalt in den Partikelsuspensionen kann dann wie folgt berechnet werden:

$$c(Fe) \text{ [mg/ml]} = 0,5 \cdot c(Fe, \text{Well1}) \text{ bzw.} \quad (4.12)$$

$$c(Fe) \text{ [mg/ml]} = 1,5 \cdot c(Fe, \text{Well2}) \quad (4.13)$$

wobei $c(Fe)$ die Endkonzentration des Eisens und $c(Fe, \text{Well})$ die Eisenkonzentration im jeweiligen Well angibt.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Zellkultur

4.4.1.1 Endothelzellen (HUVEC)

Endothelzellen exprimieren sowohl den VEGFR-1 als auch den VEGFR-2 und kleiden die Gefäßwände aus. Als Zellmodell werden Endothelzellen aus der Nabelschnur verwendet. Die HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) werden aus einer frischen Nabelschnur gewonnen. Die Nabelschnur wird äußerlich mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Die Vene wird mit 25 ml PBS (*phosphate-buffered saline*) durchspült. Danach wird die Vene unten abgeklemmt und mit 10 ml Collagenase-Lösung (0,1% in PBS) gefüllt und oben ebenfalls abgeklemmt. Die Nabelschnur wird für 15 min bei 37 °C in eine Petrischale gelegt. Der Veneninhalt wird in ein 50 ml Röhrchen gegossen und die Vene wird mit 25 ml PBS nachgespült. Die Zellen werden danach 10 min bei 1000 g zentrifugiert, der Überstand wird abgezogen und das Zellpellet wird in 5 ml HUVEC-Medium resuspendiert. Danach werden sie in einer 25-cm²-Zellkulturflasche (Sarstedt) ausgesät.

Die Zellen wachsen adhärent als lückenhafte Monolayer und bilden nach einiger Zeit einen Zellrasen. Für die Subkultivierung werde die Zellen zunächst mit PBS (37 °C) gespült und danach mit Trypsin abgelöst. Hierfür wird zunächst 5 ml Trypsin-Lösung 15 s auf die Zellen gegeben, dann abgezogen und die Zellen für 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen werden mit Medium abgespült, abgezogen, gezählt und wieder (wie oben beschrieben) kultiviert. Die Zellen werden nach der Trypanblau-Methode gezählt. Hierbei wird ein Aliquot von 30 µl mit demselben Volumen Trypanblau-Lösung versetzt und 1 min inkubiert. Danach wird in einer Neubauerkammer die Zellzahl ermittelt und die Zellen in einer 75-cm²-Zellkulturflasche ausgesät.

4.4.1.2 Humane Glioblastoma-Zelllinie U118

Als Referenzmodell, um die unspezifische Partikelaufnahme der umliegenden Zellen zu untersuchen, werden humane Tumorzellen der Glioblastoma-Zelllinie U118 verwendet. U118-Zellen exprimieren ebenfalls den VEGFR-2 allerdings 200fach geringer als die HUVEC-Zellen (Mentlein et al., 2004). Die humane Glioblastoma-Zelllinie U118 wurde vom Deutschen Krebsforschungszentrum (Heidelberg) bezogen und bei 80 K in einem Einfriermedium (DMSO-Medium) aufbewahrt. Aufgetaut werden die Zellen in einem Wasserbad bei 37 °C und dann in ein Röhrchen mit 6 ml Medium überführt. Danach werden die Zellen bei 800–1000 g, 5 min lang bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abgezogen. Das Zellpellet wird nun in 5 ml Medium resuspendiert und mit zusätzlichen 15 ml Medium in einer 75-cm²-Zellkulturflasche ausgesät. Die Zellen wachsen adhärent als Monolayer und bilden nach einiger

Zeit einen dichten Zellrasen; teilweise wachsen sie auch übereinander. Für die Subkultivierung werden die Zellen mit PBS (37 °C) gespült und danach mit Trypsin abgelöst. Hierfür wird zunächst 5 ml Trypsin-Lösung 15 s auf die Zellen gegeben, dann abgezogen und die Zellen für 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen werden mit Medium abgespült, abgezogen, gezählt und wieder (wie in Abschnitt 4.4.1.1 beschrieben) kultiviert.

4.4.2 Kopplung von Antikörpern an Eisenoxidpartikel

Um Antikörper an dextranummantelte Eisenoxidpartikel (z.B. Nanomag-D 70 nm) zu koppeln, wird zunächst BrCN in Acetonitril (1 g/ml) gelöst. 250 µl der Nanomag Eisenoxidpartikel wird mit 20 µl BrCN-Acetonitril-Lösung bei 4 °C und 10 min geschüttelt, so dass die OH-Gruppen der Dextranhülle zu einer reaktiven Imidogruppe modifiziert werden.

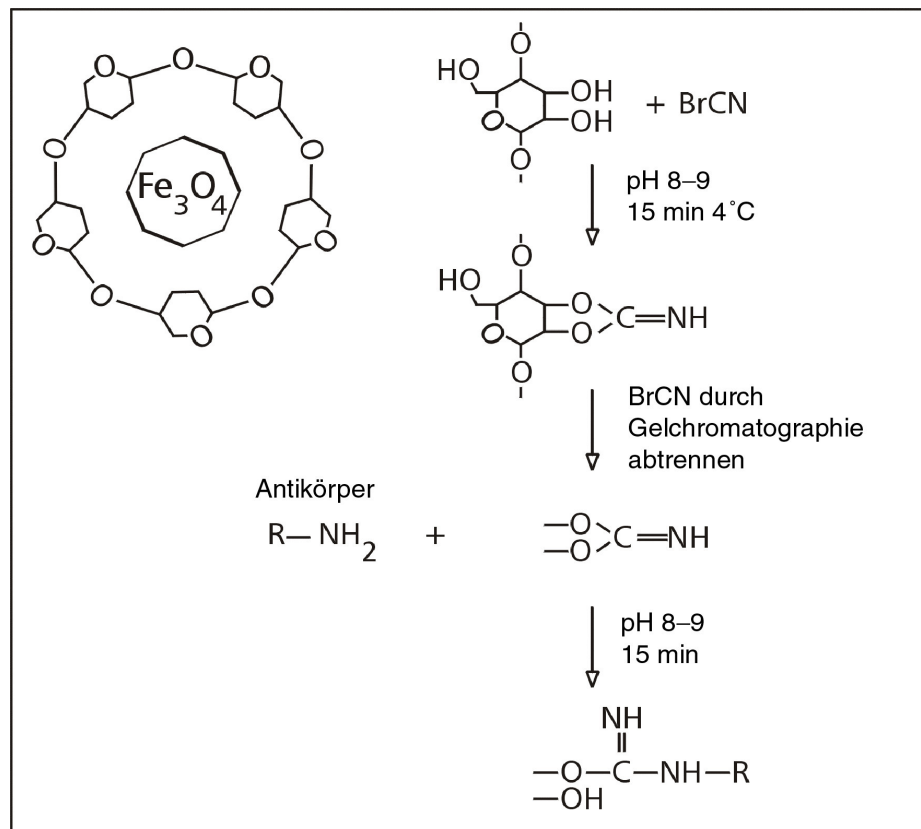


Abbildung 15: Schematische Beschreibung der Kopplung von Antikörpern an dextranummantelte Eisenoxidpartikel. Zunächst werden die OH-Gruppen der Dextranhülle durch BrCN zu einer reaktiven Imidogruppe modifiziert. Das überschüssige BrCN wird durch eine Chromatographiesäule entfernt. Die Imidogruppe des Dextran reagiert mit den am N-Terminus und an Lysin-Resten vorliegenden Aminogruppen der zugegebenen Antikörper, so dass diese an das Dextran gebunden werden.

Das überschüssige BrCN wird nun mit einer Sephadex G-25 Chromatographiesäule (15 x 0,5 cm) und 0,1 M NaHCO_3 -Puffer, pH 8,3 entfernt. Zu 250 µl der gereinigten und aktivierten

Lösung wird nun 80 µl VEGFR-1-Antikörper (anti-VEGFR-1, 0,5 mg/ml Lösung) oder 200 µl VEGFR-2-Antikörper (anti-VEGFR-2, 0,1 mg/ml Lösung) gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Imidogruppe des Dextran reagiert mit den am N-Terminus und an Lysin-Resten vorliegenden Aminogruppen der zugegebenen Antikörper, so dass diese an das Dextran gebunden werden können. Nun wird 50 µl 0,2 M Tris-Puffer pH 8,5 zu dieser Probe gegeben und für 5 min bei 4 °C geschüttelt. Da Tris ein aminhaltiger Puffer ist, werden die noch aktivierten Imidogruppen geblockt. Die überschüssigen, nichtgebundenen Antikörper werden nun mittels einer Sephacryl S-300 HR Gelchromatographiesäule (90 x 1 cm) und Hepes-Puffer (0,14 M NaCl, 10 mM Hepes), pH 7,4 entfernt (Abbildung 15).

4.5 Probenpräparation

4.5.1 Eisenoxidpartikel in Puffer (MRT)

Die Eisenoxidpartikel werden für die Herstellung der Phantome in 20 ml Röhren (Sarstedt) mit 0,14 M NaCl, 10 mM Hepes-Puffer pH 7,5 homogen gemischt. Es werden Phantome verschiedener Konzentrationen (0,04–1,3 mM Fe) hergestellt.

4.5.2 Eisenoxidpartikel internalisiert in Zellen (MRT)

Die U118-Zellen werden mit den ungekoppelten Eisenoxidpartikel (N20, N50, N70, B102 und Resovist) 1 h mit einer Inkubationskonzentration von 5–60 µg Fe/ml Medium bei 37 °C inkubiert. Danach werden sie mit warmen PBS zweimal gründlich gewaschen und in 10 ml PBS abgekratzt. Die Zellen werden dann nach der Trypanblau-Methode gezählt (Abschnitt 4.4.1.1). Ein Teil der Zellen (500.000–2 Mio) wird für die Eisenquantifizierung mittels TRFA abgenommen. Der verbleibende Rest ca. 6 Mio Zellen werden in einem Röhren (Eppendorf) bei 1000 g für 5 min zentrifugiert, so dass sich ein Zellpellet bildet. Das Volumen des Pellets kann mit

$$V_{\text{Pellet}} = \frac{1}{3} \pi \cdot r^2 \cdot h \quad (4.14)$$

berechnet werden, wobei r den Röhren Innenradius am oberen Pelletende und h die Pellethöhe bezeichnet.

Das Röhren wird nun mit 1%igem Agarosegel aufgefüllt und das Zellpellet somit fixiert. Für die Messung im MRT wird das Röhren in einem mit Wasser gefülltem Behältnis plaziert, um ein ausreichendes Signal zu erhalten und Suszeptibilitätsartefakte zu vermeiden.

4.5.3 Spezifische und unspezifische Aufnahme (TRFA)

Die HUVE- und U118-Zellen werden in kleinen Petrischalen (Durchmesser 3,5 cm) angezogen, bis sie einen Zellrasen bilden. Die Zellen werden jeweils mit ungekoppelten N70 Partikeln, N70+anti-VEGFR-1-Konjugat und N70+anti-VEGFR-2-Konjugat inkubiert. Pro Zellart wird jeweils die Inkubationszeit (15 min bis 7 h, 10 Messpunkte) und die Inkubationskonzentration (5–160 $\mu\text{g Fe/ml}$, 4–5 Messpunkte) variiert. Für je drei Inkubationszeiten und je zwei Inkubationskonzentrationen werden jeweils drei Proben hergestellt, um den Messfehler zu ermitteln. Danach wird das Medium von den Schälchen abgezogen, die Zellen mit warmem PBS zweimal gründlich gewaschen und in 10 ml PBS abgekratzt. Die Zellen werden wie in 4.3.1.4 beschrieben präpariert und das aufgenommene Eisen mittels TRFA quantifiziert.

4.5.4 Spezifische und unspezifische Aufnahme an HUVE-Zellen (MRT)

Die HUVE-Zellen (75-cm²-Zellkulturflaschen) werden mit den ungekoppelten N70-Eisenoxidpartikeln, N70-aVEGFR-1-Konjugat und N70-aVEGFR-2-Konjugat bei vier verschiedenen Inkubationszeiten (15–60 min) in 15 min Abständen inkubiert. Für jede Inkubationszeit werden zwei Proben hergestellt. Danach wird das Medium abgezogen, die Zellen mit warmen PBS zweimal gründlich gewaschen und in 10 ml PBS abgekratzt. Ein Teil der Zellen wird wie in 4.3.1.4 beschrieben präpariert und das aufgenommene Eisen mittels TRFA quantifiziert. Die T_2 - und T_1 -Zeiten werden wie in Abschnitt 4.6 beschrieben ermittelt.

4.5.5 Eisenoxidpartikel intrazellulär und an die Zellmembran angelagert

Die U118-Zellen (zwei 75-cm²-Zellkulturflaschen) werden mit den ungekoppelten N70-Eisenoxidpartikel 1 h bei 4 °C mit einer Inkubationskonzentration von 20 $\mu\text{g Fe/ml}$ Medium inkubiert. Es ist wichtig, dass die Zellen bei einer Temperatur von 4 °C inkubiert werden, da bei dieser Temperatur die Internalisierung der Partikel unterbunden wird (Wilhelm et al., 2002). Danach werden die Zellen mit 4 °C PBS zweimal gründlich gewaschen. Die Zellen in der einen Zellkulturflasche werden nun in 10 ml PBS bei 4 °C abgekratzt, zu der anderen Flasche wird warmes Medium hinzugegeben, und diese 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Temperaturänderung auf 37 °C ermöglicht nun, dass die an der Membran befindlichen Partikel nun internalisiert werden können. Diese Zellen werden mit 10 ml PBS bei 37 °C abgekratzt und wieder auf 4 °C abgegekühlt. Die Proben werden nach der Trypanblau-Methode gezählt (s. Abschnitt 4.4.1.1). Ein Teil der Zellen (je drei Proben à 1 Mio Zellen) wird für die Eisenquantifizierung mittels TRFA abgenommen. Die restlichen Zellen werden zu je drei Proben à 6 Mio Zellen wie in Abschnitt 4.3.1.4 beschrieben präpariert und das aufgenommene Eisen mittels TRFA quantifiziert. Die T_2 -Zeiten wurden wie in Abschnitt 4.6 beschrieben ermittelt. Dies geschieht ebenfalls bei 4 °C.

4.5.6 Konjugat intrazellulär und an den Rezeptor gebunden

Die HUVE-Zellen (75-cm²-Zellkulturflaschen) werden mit den ungekoppelten N70-Eisenoxidpartikeln, N70+anti-VEGFR-1-Konjugat und N70+anti-VEGFR-2-Konjugat bei vier verschiedenen Inkubationszeiten (15–60 min) in 15 min Abständen inkubiert. Für jede Inkubationszeit wurden zwei Proben hergestellt. Danach wurde das Medium abgezogen. Die Zellen werden mit Trypsin abgelöst. Hierfür wird zunächst 5 ml Trypsin-Lösung 15 s auf die Zellen gegeben, dann abgezogen und die Zellen für 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen werden wie in 4.3.1.4 beschrieben präpariert und das aufgenommene Eisen mittels TRFA quantifiziert. Trypsin spaltet Peptidbindungen nach Lysin und Arginin, so dass durch die Inkubation mit diesem die Oberflächenrezeptoren der Zelle zerstört werden (Alberts et al., 1995). Die T_2 - und T_1 -Zeiten wurden wie in Abschnitt 4.6 beschrieben ermittelt.

4.6 MRT-Messung

Die MRT-Experimente werden an einem 1,5 T Philips Intera (Philips Medical Systems, Best, Niederlande) mit einer Oberflächenspule (C1, Durchmesser 15 cm) durchgeführt. Für die T_1 -Messung wird eine *inversion recovery*-Spinecho-Sequenz (IR-SE, siehe Abschnitt 3.5.2) mit folgenden Parameter verwendet: $T_R = 10$ s, $T_E = 15$ ms, Anzahl der Scans 1, Matrix 192 x 192 (Rekonstruktion auf 256 x 256), Schichtdicke 1,5 mm, FOV (*field of view*) 160 x 160 mm², $\tau = 50$ –5000 ms. Es werden Aufnahmen bei neun verschiedenen Wartezeiten τ gemacht. Die T_2 -Messung werden mit einer Multi-Spinecho-Sequenz (Multi-SE, s. Abschnitt 3.5.2) bei $T_R = 2$ s, $T_E = 20 \cdot 10$ ms, Anzahl der Scans 1, Matrix 128 x 128, Schichtdicke 3 mm, FOV 110 x 110 mm² durchgeführt. T_2^* -Messung werden mit einer Gradientenecho-EPI-Sequenz (FFE-EPI, s. Abschnitt 3.5.4) aufgenommen. Dabei werden folgende Parameter verwendet: $T_R = 98$ ms, $T_E = 27$ ms, EPI-Faktor 21, Drehwinkel $\alpha = 30^\circ$, Anzahl der Scans 3, Matrix 256 x 256, Schichtdicke 10 mm, FOV 140 x 140 mm². Die Signalintensitäten werden durch homogene ROIs (*region of interest*) gemessen. Die T_2 -Zeit erhält man durch Kurvenregression der Signalintensität als eine Funktion von T_E mit konstantem T_R . Aus Gl. 3.15 folgt:

$$SI \propto e^{-\frac{T_E}{T_2}} \quad (4.15)$$

Die T_1 -Zeit erhält man durch eine Kurvenregression der Signalintensität als eine Funktion von τ mit konstantem T_E . Aus Gl. 3.16 folgt:

$$SI \propto (1 - 2e^{-\tau/T_1}) \quad (4.16)$$

Die Kurvenregressionen wird mit dem Programm Igor 4 (WaveMetrics Inc., USA) durchgeführt. Für die T_2^* -Zeit-Auswertung wird ein IDL-Programm (Research Systems Inc., USA) verwendet, welches von Dr. H. Dahnke (Philips Forschungslabor, Hamburg) zur Verfügung gestellt wurde. Dieses Programm ermöglicht eine Pixelweise Auswertung der Bilder und erstellt T_2^* -Karten durch eine Kurvenregression für die einzelnen Pixel nach Gl. 4.15. Die Messungen der Relaxationszeiten werden dreimal wiederholt, um eine statistische Auswertung zu ermöglichen. Die Eisenkonzentrationen in mM in den MRT-Proben werden aus dem durch die TRFA ermitteltem Eisengehalt, bezogen auf die Zellmenge im MRT und dem nach Gl. 4.14 berechnetem Zellvolumen berechnet.

4.7 Analyse-Methoden

4.7.1 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgt mit dem Programm JMP (SAS Institute Inc., USA). Eine Vielzahl von Zusammenhängen wird mittels linearer Regressionsrechnung ermittelt. Die Steigung der Geraden wird dabei als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Das Signifikanzniveau wird mit p bezeichnet. r^2 ist das Bestimmtheitsmaß der Gerade.

Im Falle von multiplen Einflussfaktoren wird eine multifaktorielle lineare Regression durchgeführt. Hierbei wird auf zwei Größen eingegangen: Zum einen kann ermittelt werden, ob der Abstand der Geraden zueinander, also ihr Offset, signifikant unterschiedlich ist und zum anderen ist der so genannte Interaktionsterm ein Maß für die Änderung der Steigung der beiden Geraden zueinander. Ist dieser signifikant, so sind die Steigungen der Geraden unterschiedlich. Ist er nicht signifikant, so sind die Steigungen identisch.

4.7.2 Detektion von Signalveränderungen im MRT

Bezüglich der Signalreduktion der Eisenoxidpartikel stellt sich die Frage, welche Eisenkonzentration der unterschiedlichen Partikel einen ausreichenden Signalunterschied hervorruft. Dies kann einerseits unter dem Gesichtspunkt einer Visualisierung („Ist der Kontrast im Bild erkennbar?“) und andererseits einer statistischen Analyse („Sind die Signalveränderungen statistisch signifikant unterschiedlich?“) erfolgen.

4.7.2.1 Visualisierung von Kontrasten: Das Rose-Kriterium

Um die Frage zu beantworten, welche Eisenkonzentration nötig ist, um eine sichtbare Signaländerung im MRT zu erzielen, wird das so genannte Rose-Kriterium (Burgess, 1999) angewandt. Das Rose-Kriterium wurde 1948 von Albert Rose entwickelt, um die

Detektierbarkeit bzw. Darstellbarkeit eines Objektes durch ein Röntgenbild bestimmen zu können (Rose, 1948). Es beschreibt das Signal-zu-Rauschen Verhältnis (SNR) für die Detektion eines flachen, scharfkantigen Objektes der Fläche A , mit der mittleren Signalintensität S vor einem homogenen Hintergrund. Das Rauschen im Hintergrund wird auf der gleichen Flächengröße wie das Signal ausgewertet. Rose definiert sein SNR_{Rose} durch

$$SNR_{Rose} = \frac{S}{SD}. \quad (4.17)$$

Hierbei gibt SD die Standardabweichung des Hintergrundes an. Rose zeigte, dass SNR_{Rose} einen Wert von ungefähr fünf oder größer annehmen muss, damit das Objekt verlässlich detektiert werden kann. Das Rose-Modell ist eine Approximation, die nur für Signale mit geringem Kontrast gültig ist.

Durch Messung der Relaxationsraten der Eisenoxidpartikel in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration erhält man durch die Steigung die Relaxivität (Tabelle A.1 und A.2). Die Streuung der Relaxationsratenmessungen um die Regressionsgeraden wird durch den so genannten *root-mean-square* Fehler (RMS) angegeben. Um nun die kleinste Eisenkonzentration C_{min} abzuschätzen, die eine signifikante Relaxationsratenänderung hervorruft, kann man das zuvor beschriebene Rose-Kriterium verwenden. Zwei Relaxationsraten sollen also ungefähr um das fünffache ihres RMS-Fehlers auseinander liegen, um visuell unterscheidbar zu sein. Es ergibt sich also aus Gl. 4.17 das Kontrast-zu-Rausch Verhältnis (CNR) zwischen einem Bereich ohne Eisen und einem Bereich mit Eisen:

$$CNR = \frac{|R - R_0|}{RMS} \geq 5, \quad (4.18)$$

wobei R_0 die Relaxationsrate ohne Eisen definiert und R die Relaxationsrate mit Eisen.

Die *in vitro* bestimmten Relaxivität $r_{in\ vitro}$ und die minimal detektierbare Eisenkonzentration $C_{min, in\ vitro}$ ergeben sich aus der Gradengleichung zu

$$R = r_{in\ vitro} \cdot C_{min, in\ vitro} + R_0. \quad (4.19)$$

Aus Gl. 4.18 und Gl. 4.19 erhält man somit:

$$C_{min, in\ vitro} = \frac{5 \cdot RMS_{in\ vitro}}{r_{in\ vitro}} \quad (4.20)$$

4.7.2.2 Detektion von Kontrasten

Für eine statistische Analyse der Kontrastmitteleffekte ist es für den Nachweis eines Effektes nicht notwendig, dass der Kontrast visuell sichtbar wird. Es reicht, einen Tumor in einem Tierexperiment mit Eisenoxidpartikeln so zu markieren, dass sich das Signal vor der Kontrastmittelgabe von dem danach signifikant unterscheidet. Für die Analyse gibt es statistische Methoden, wie den so genannten T-Test, mit denen die Signifikanz der Unterschiede in den gemessenen Werten beschrieben werden können (Hulley et al., 1988). Der Grad der Irrtumswahrscheinlichkeit wird vorher festgelegt und mit α bezeichnet, normalerweise gilt $\alpha = 0.05$ (für 5% Irrtumswahrscheinlichkeit). Die so genannte Power ($1 - \beta$), Teststärke oder Macht beschreibt in der Statistik die Aussagekraft eines statistischen Tests, wobei β die Wahrscheinlichkeit bezeichnet, den Fehler 2. Art zu begehen. Im statistischen Testen von Hypothesen besteht ein Fehler 1. Art darin, eine Nullhypothese zurückzuweisen, obwohl sie wahr ist (beruhend auf falsch-positiven Ergebnissen). Ein Fehler 2. Art besteht darin, eine Nullhypothese für wahr zu halten, obwohl sie falsch ist (beruhend auf falsch-negativen Ergebnissen).

Der Stichprobenumfang N , der pro Gruppe benötigt wird, um durch den T-Test bei gegebener Standardabweichung SD einer Variablen und einer gewünschten Effektgröße E signifikant zwischen den Gruppen unterscheiden zu können, kann nach folgender Gleichung berechnet werden (Hulley et al., 1988):

$$N = \frac{SD^2}{2 \cdot E^2} \cdot \left[\left(\frac{1}{q_1} + \frac{1}{q_2} \right) \cdot (z_\alpha + z_\beta)^2 \right] \quad (4.21)$$

mit z_α der Normalabweichung von α und z_β der von β . Für $\alpha = 0,05$ und $\beta = 0,2$ ergibt sich $z_\alpha = 1,93$ und $z_\beta = 0,84$. q_1 bezeichnet den Anteil der Gruppe 1 und q_2 den der Gruppe 2. Sind die beiden Gruppen gleich groß folgt daraus $q_1 = q_2 = 0,5$. In unserem Fall gibt E die Differenz der Relaxationsraten ΔR an. Für Gl. 4.21 ergibt sich somit:

$$N = \frac{SD^2}{\Delta R^2} \cdot 15,68 \quad (4.22)$$

5 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Experimente vorgestellt. In Abschnitt 5.1 wurde die unspezifische Aufnahme der verschieden aufgebauten Eisenoxidpartikeln in Abhängigkeit der Inkubationskonzentration untersucht, um ein Eisenoxidpartikel für die Entwicklung des Konjugates auszuwählen. Die spezifische und unspezifische Aufnahme des entwickelten anti-VEGFR-Konjugates wurden in Abhängigkeit der Inkubationskonzentration an den hauptsächlich spezifisch aufnehmenden HUVE-Zellen und den eher unspezifisch aufnehmenden U118-Zellen untersucht, um die Aufnahmeparameter zu optimieren. In Abschnitt 5.2 wurden die Relaxationseigenschaften der Eisenoxidpartikel in Puffer und Zellen gemessen und mit Voraussagen der in Abschnitt 3.6 vorgestellten Theorie verglichen. Es wurde die Unterscheidbarkeit des Kontrastes zwischen spezifisch und unspezifisch markierten Zellen im MRT ermittelt und der in einem Tierexperiment benötigte signifikante Kontrastunterschied abgeschätzt.

5.1 Zelluläre Aufnahme von Eisenoxidpartikeln

In diesem Abschnitt werden zunächst die Ergebnisse des mittels Transmissions-Elektronen-Mikroskopie untersuchten Aufbaus der Partikel vorgestellt. Durch Inkubation von U118-Zellen mit wachsenden Eisenkonzentrationen konnte die unspezifische Aufnahme der Partikel untereinander untersucht werden. Das internalisierte Eisen wurde durch TRFA quantifiziert. Für die spezifische Zellmarkierung ist eine geringe unspezifische Aufnahme der Eisenoxidpartikel in die Zelle wünschenswert. Um Zellen spezifisch labeln zu können, sollen in dem Konjugat aus Eisenoxidpartikel und Antikörper möglichst viele Antikörper an das Eisenoxidpartikel gekoppelt werden. Dies wurde durch eine Optimierung der Kopplungsschritte erreicht. Durch eine Markierung der Antikörper mit dem radioaktiven Jod-Isotop ^{125}I und eine darauf folgende Quantifizierung der an die Eisenoxidpartikel gekoppelten Antikörper konnten die Kopplungsparameter immer weiter optimiert werden und die Anzahl von Antikörper pro Eisenoxidpartikel bestimmt werden.

Im nächsten Schritt wurde die Aufnahmebereitschaft des entwickelten Konjugates bei unterschiedlichen Inkubationskonzentrationen und -zeiten an HUVE-Zellen und U118-Zellen untersucht. Da HUVE-Zellen die VEGF-Rezeptoren an ihrer Oberfläche exprimieren wurde hier eine starke spezifische Aufnahme erwartet. U118-Zellen besitzen die Rezeptoren nicht bzw. nur in sehr geringen Mengen. Hier wurde eine hohe unspezifische Aufnahme erwartet.

5.1.1 Aufbau der Eisenoxidpartikel

Um den Aufbau der Eisenoxidpartikel darzustellen, wurden die Eisenoxidpartikel N20, N50, N70, B102 und Resovist mit dem TEM untersucht (s. Abschnitt 4.2.1). Abbildung 16 zeigt eine Zusammenstellung dieser Aufnahmen. Hierbei ist zu sehen, dass die N20-Partikel bestehend aus Maghemit ohne Hülle nahezu homogen verteilt sind. Die N70-Partikel, welche aus N20-Kristallen eingebettet in eine Dextranmatrix bestehen, wirken stärker geclustert.

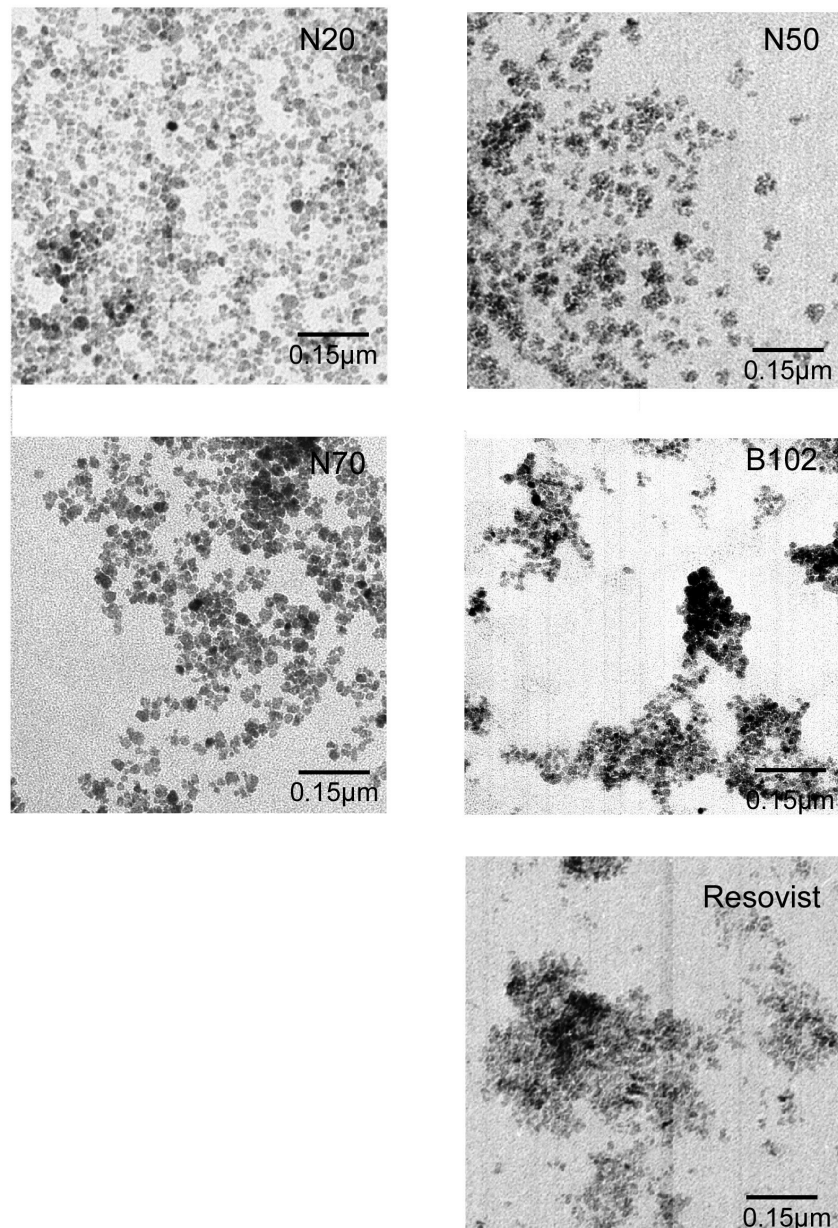


Abbildung 16: TEM Aufnahmen von unterschiedlichen Eisenoxidpartikeln. N20-Partikel bestehen aus Maghemit ohne Hülle und sind nahezu homogen verteilt. Die N70-Partikel, welche aus N20-Kristallen bestehen, wirken stärker geclustert. Dies ist durch ihre Dextranhülle bedingt. Das gleiche gilt für N50-Partikel. B102- und Resovist-Partikel sind stärker geclustert.

Dies gilt ebenfalls für N50-Partikel, allerdings bestehen diese Partikel aus in eine Dextranmatrix eingebetteten 5–15 nm großen Magnetit-Kristallen. B102- und Resovist-Partikel sind stärker geclustert. Diese Cluster sind größer als die angegebenen Partikeldurchmesser von 60 nm, so dass davon ausgegangen werden kann, dass sich die einzelnen Partikel aneinander leicht anlagern und Konglomerate bilden. Hierbei bilden die Resovist-Partikel noch größere Cluster als die B102-Partikel. Die einzelnen Kristalle sehen bei allen Partikeln ungefähr gleich groß aus, außer die Kristalle der Resovist-Partikel, die kleiner wirken. Dies deckt sich auch mit den Angaben der Hersteller (Tabelle 2, Abschnitt 4.1.2), die für N20-, N50-, N70- und B102-Partikel eine Kristallgröße von 5–15 nm und für Resovist eine Kristallgröße von 3–5 nm angeben.

5.1.2 Unspezifische Eisenaufnahme in U118-Zellen

Durch eine Berlinerblaufärbung (s. Abschnitt 4.2.2.1) sollte ermittelt werden, wie die Eisenoxidpartikel von den Zellen aufgenommen werden. In Abbildung 17 ist eine Berlinerblaufärbung von U118-Zellen dargestellt. Die U118-Zellen wurden mit 20 $\mu\text{l/ml}$ Resovist für 3 h inkubiert. In der Vergrößerung ist deutlich sichtbar, dass sich die Eisenoxidpartikel sowohl außen an die Zellmembran anlagern als auch von den Zellen unspezifisch aufgenommen werden, wobei der letztere Anteil zu überwiegen scheint. Bei dieser Färbung ist die gesamte Zelle durch Kernechtrubin angefärbt worden.

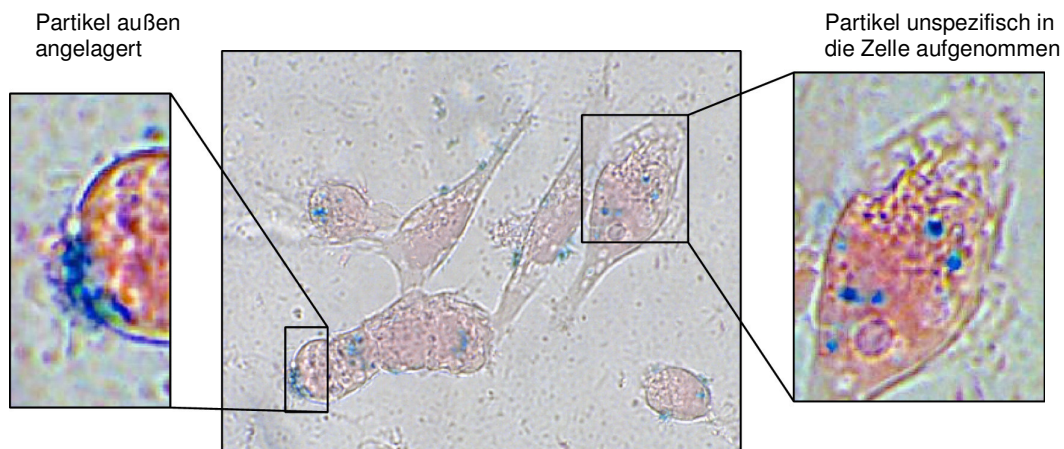


Abbildung 17: Lichtmikroskopische Aufnahme der Eisenblaufärbung von U118-Zellen inkubiert mit Resovist (20 $\mu\text{l/ml}$, 3 h). Die Eisenoxidpartikel lagern sich teilweise außen an der Zellmembran an. Hauptsächlich werden sie allerdings unspezifisch von den Zellen aufgenommen (siehe Vergrößerungen).

In einem weiteren Schritt wurde die gesamte Aufnahmemenge, d.h. sowohl internalisierte Partikel als auch an der Zellmembran gebundene, quantifiziert. Es ist bekannt, dass Eisenoxidpartikel unterschiedlicher Größe und mit unterschiedlichen Hüllmaterialien (s. Abschnitt 4.1.2) von Zellen verschieden stark aufgenommen werden (Raynal et al., 2004). Die

Eisenaufnahme von U118-Zellen bei einer Inkubationszeit von 1 h in Abhängigkeit von der Inkubationskonzentration wurde mittels TRFA quantifiziert (s. Abschnitt 4.5.3.). Abbildung 18 zeigt die durch TRFA bestimmte Eisenmenge, welche durch die U118-Zellen aufgenommen wurde, in Abhängigkeit von der Inkubationskonzentration. Die Zellen wurden inkubiert und dann gedrittelt, so dass von einer Inkubationszeit drei Proben vorlagen. Am stärksten wurden die kleinen N20-Partikel (Durchmesser 20 nm) aufgenommen. B102-, Resovist- und N70-Partikel haben ungefähr den gleichen Durchmesser von 50–70 nm. Allerdings wurden die Partikel mit einer Dextranhülle schwächer als Partikel mit einer Carboxy- (Resovist) oder Carboxymethyl- (B102) Dextranhülle aufgenommen. Es ist also bei der unspezifischen Aufnahme dieser Partikel das Hüllmaterial entscheidend. Für eine bevorzugte spezifische Aufnahme ist eine möglichst schwache unspezifische Aufnahme von Vorteil, so dass N70- und N50-Partikel für die spezifische Markierung diesbezüglich Vorteile haben.

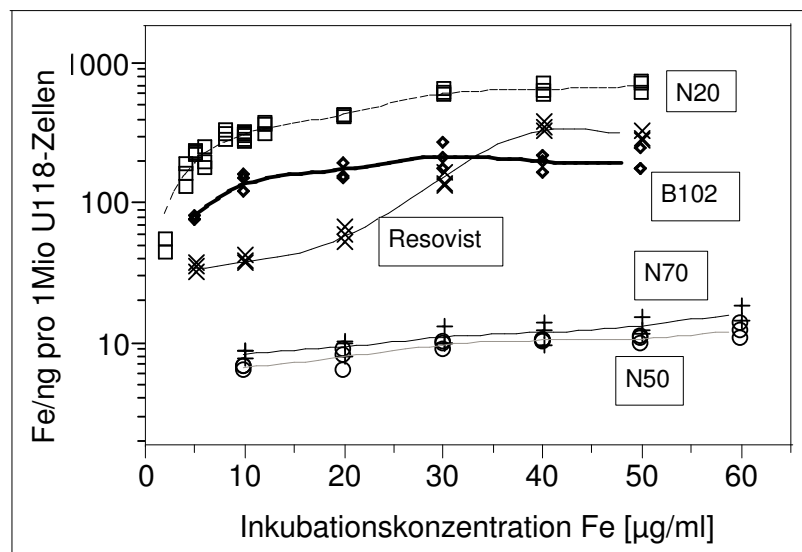


Abbildung 18: Unspezifische Partikelaufnahme von Eisenoxidpartikeln durch U118-Zellen von N20- (\diamond), B102- (\square), Resovist- (\times), N70- ($+$) und N50-Partikeln (\circ) in Abhängigkeit der Inkubationskonzentration nach einer Inkubationszeit von 1 h, bestimmt durch TRFA. Kleine Partikel ohne Hüllmaterial (N20) wurden am stärksten aufgenommen, gefolgt von Partikeln mit Carboxy- (Resovist) oder Carboxymethyldextran- (B102) Hülle. Partikel mit einer Dextranhülle (N50 und N70) wurden am schwächsten aufgenommen.

5.1.3 Spezifische Aufnahme

In diesem Abschnitt soll die spezifische Aufnahme eines anti-VEGFR-Konjugates anhand der VEGF-Rezeptor exprimierenden HUVE-Zellen untersucht werden. Als nur unspezifisch aufnehmendes Referenzzellmodell dienten U118-Zellen, da diese nur in geringem Maße VEGF-Rezeptoren exprimieren (VEGFR-2 200fach geringer als HUVEC, VEGFR-1 wird nicht exprimiert). Zunächst wird die Maximierung der Anzahl der an die Eisenoxidpartikel

koppelnden Antikörper beschrieben. Der nächste Teil behandelt die Optimierung der Inkubationsparameter Zeit und Konzentration zur Maximierung der spezifischen Aufnahme gegenüber der unspezifischen Aufnahme. Diese Versuche wurden sowohl mit N70-Partikeln (unspezifische Aufnahme) als auch mit N70-Konjugaten (spezifische Aufnahme) durchgeführt. Die N70-Partikel werden wie in Abschnitt 5.1.2 gezeigt bedingt durch ihre Dextranhülle unspezifisch nicht so stark aufgenommen wie Partikel mit einer Carboxy- oder Carboxymethyldextran-Hülle. Für eine bevorzugte spezifische Aufnahme ist eine möglichst schwache unspezifische Aufnahme von Vorteil, so dass N70-Partikel sich für die Entwicklung des Konjugates eignen. Auch erzielten diese Partikel hohe Relaxivitäten in Zellen, somit wurden für die weiteren Versuche die N70-Partikel verwendet.

5.1.3.1 Optimierung der Antikörper-Eisenoxidpartikel Kopplung

Um Zellen spezifisch labeln zu können, sollen möglichst viele Antikörper an das Eisenoxidpartikel gekoppelt werden. Dies wird durch eine Optimierung der Kopplungsschritte erreicht. Durch eine Markierung der Antikörper mit dem radioaktivem Jod-Isotop ^{125}I wird eine Quantifizierung der Menge der an das Eisenoxidpartikel gekoppelten Antikörper ermöglicht.

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Konjugat an einen Rezeptor bindet, ist höher, wenn an einem Eisenoxidpartikel mehrere Antikörper angekoppelt wurden. Die Größe des Konjugats verändert sich dadurch nicht sehr, da ein Antikörper nur ca. 5 nm groß ist. Um also ein möglichst effektives Konjugat zu erhalten, ist die Ermittlung der optimalen Kopplungsparameter wie die Konzentration des Bromzyans (BrCN) und des Antikörpers unerlässlich. Diese Versuche wurden mit den N70-Partikeln durchgeführt, da diese Partikel unspezifisch nicht sehr stark aufgenommen werden und hohe Relaxivitäten in Zellen erzielen. N70-Partikel sind für die Konjugatherstellung geeignet und sollen für die spezifische Markierung der HUVE-Zellen verwendet werden. Um die optimal detektierbare Antikörperkonzentration zu ermitteln, wurden Dot-Spot-Tests (Abschnitt 4.2.1) mit vier verschiedenen, an die N70-Partikel gekoppelten VEGFR-1-Antikörpermengen (10–100 μg) durchgeführt. Hiermit sollte die minimal gut detektierbare Antikörpermenge ermittelt werden. Da nicht bekannt war, welche Sekundärantikörpermenge vonnöten ist, um das Konjugat zuverlässig zu detektieren, wurden zusätzlich vier verschiedene Sekundärantikörperkonzentrationen verwendet. Als Kontrolle dienten nicht konjugierte Primärantikörper sowie nicht an Antikörper gekoppelte N70-Partikel. Die verwendete BrCN-Acetonitril-Menge betrug 50 μl . Die Dot-Spot-Tests sind in Abbildung 19 dargestellt. Um das N70+anti-VEGFR-1 Konjugat gut zu detektieren, wurde eine Sekundärantikörperverdünnung von 1:1000 in TBST benötigt. Es ist ersichtlich, dass sogar 10 μg anti-VEGFR-1 gekoppelt an 250 μl N70-Partikel noch ausreichen, um mit dem Sekundärantikörper (1:1000) detektiert zu werden. 100 μg anti-VEGFR-1 sind am besten mit allen Sekundärantikörpermengen zu erkennen, so dass davon ausgegangen werden

kann, dass bei dieser Menge ein hoher Antikörperüberschuss besteht. Die optimale Antikörpermenge (ausreichende Menge für die Kopplung, aber auch keinen zu großen Antikörperüberschuss) liegt daher zwischen 20 und 50 μg anti-VEGFR-1 gekoppelt an 250 μl N70-Partikel, da diese Mengen von allen Sekundärantikörpermengen detektiert werden können. Für die Kopplung wurden daher 40 μg anti-VEGFR-1 verwendet. Die Kontrolle zeigt, dass der Sekundärantikörper sich schon in geringer Konzentration an den Primärantikörper anlagert. Die N70-Partikel reagieren nicht mit dem Sekundärantikörper, wenn sie nicht mit dem Primärantikörper gekoppelt sind.

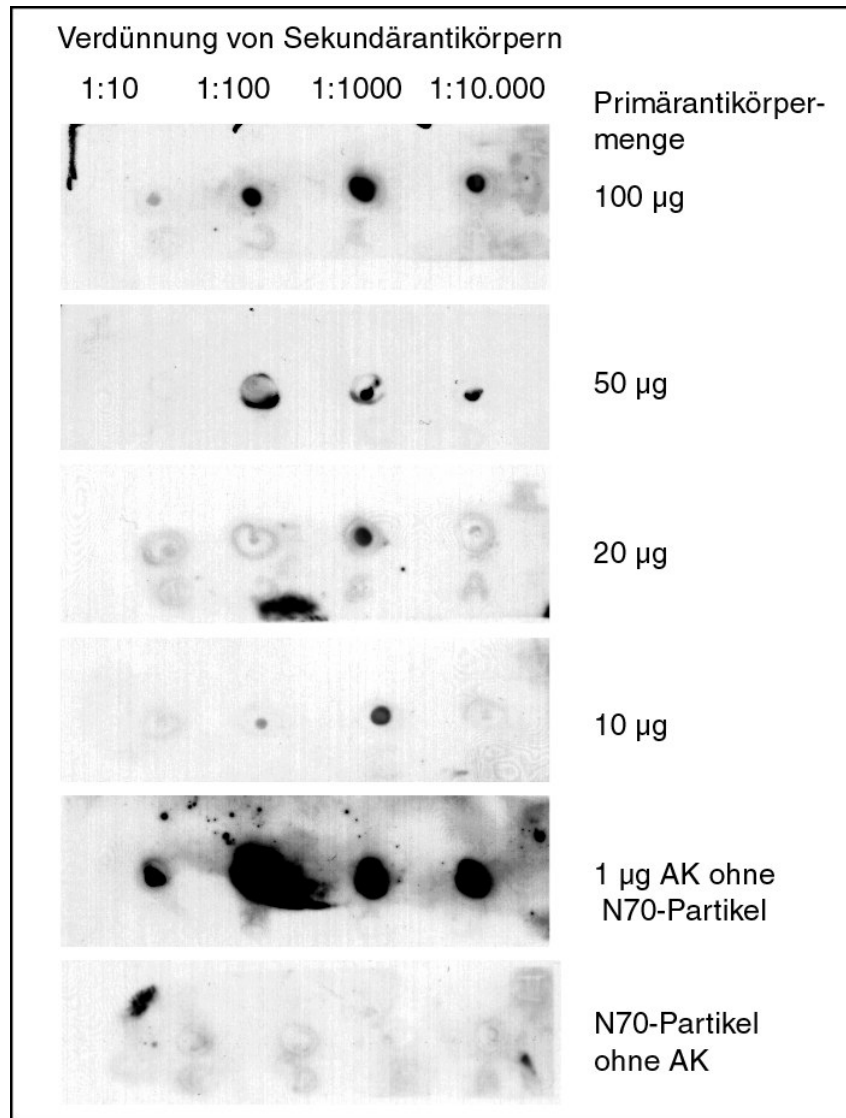


Abbildung 19: Ergebnisse des Dot-Spot-Tests für VEGFR-1. Die N70-Partikel wurden mit unterschiedlichen Primärantikörpermengen gekoppelt. Der Antikörper und die Eisenoxidpartikel alleine dienten als Kontrollen. Die optimale Primärantikörpermenge scheint zwischen 20 μg und 50 μg zu liegen, da hier eine ausreichend detektierbare Menge an die N70-Partikel gekoppelt wird, aber der Antikörperüberschuss beim Kopplungsverfahren nicht zu groß ist.

Die Ergebnisse dieses Versuches können auf den VEGFR-2-Antikörper übertragen werden, da die chemische Reaktion der Kopplung des Antikörpers an die Dextranhülle die gleiche ist. Lediglich die zur Detektion benötigte Sekundärantikörpermengung ändert sich. Da der VEGFR-2 Antikörper polyklonal und wesentlich teurer ist als der monoklonale VEGFR-1-Antikörper, wird hierfür eine Antikörpermengung von 20 µg für ausreichend befunden und an einem Dot-Spot getestet. Bei der Detektion des VEGFR-2 Antikörpers war ein starker Untergrund zu beobachten, da hier der Sekundärantikörper aus der Ziege stammt. Deswegen wurde dieser in einer wesentlich geringeren Konzentration von 1:30.000 eingesetzt.

Da mit dem Dot-Spot-Test nicht quantifiziert werden kann und diese Methode sich als nicht sensitiv genug auf Variation von BrCN gezeigt hat, wurde die Anzahl der Antikörper pro Eisenoxidpartikel durch Markierung mit dem radioaktiven Jod-Isotop ^{125}I quantitativ bestimmt (s. Abschnitt 4.3.2). Die Kopplung der VEGFR-1 Antikörper an die N70-Partikel wurde mit fünf verschiedenen BrCN-Mengen (5–150 µl BrCN-Acetonitril) durchgeführt, um die optimale für die Aktivierung der Dextranhülle benötigte Menge zu bestimmen.

Die Anzahl der Antikörper im Verhältnis zu den Eisenoxidpartikeln kann wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben gemessen und mit Gl. 4.7 berechnet werden. Tabelle 4 gibt die Anzahl der an jedes N70-Partikel gekoppelten Antikörper bei unterschiedlicher Aktivierung durch BrCN-Acetonitril an. Die höchste Antikörperkopplung von 47 Antikörpern an ein N70-Partikel erhält man durch Aktivierung mit 10 µl BrCN-Acetonitril. Bei einer Aktivierung mit 150 µl BrCN-Acetonitril flockte die Eisenoxidpartikellösung aus, was auf eine völlige Zerstörung der Dextranhülle schließen lässt. Diese Versuche können ebenfalls auf den VEGFR-2-Antikörper übertragen werden, da durch das BrCN nur die Dextranhülle des Eisenoxidpartikels verändert wird. Die chemische Reaktion der Ankopplung des Antikörpers an die Dextranhülle ist die gleiche.

Tabelle 4: Quantifizierung der Antikörper pro Eisenoxidpartikel bei unterschiedlichen Mengen BrCN

BrCN/µl ¹	Ak/N70 ²
5	11,5
10	47,8
20	15,5
50	4,4
150	Aggregation der Partikel

¹Volumen der zur Aktivierung des Dextrans verwendeten BrCN-Acetonitril-Lösung

²Verhältnis von Antikörpern zu einem N70-Partikel

5.1.4 Nachweis der VEGF-Rezeptoren an HUVE-Zellen

Es ist bekannt, dass Endothelzellen sowohl den VEGF-Rezeptor-1 als auch den VEGF-Rezeptor-2 exprimieren (Veikkola et al., 2000; Wang et al., 2002). Um sicher zu gehen, dass auch die hier als Modell verwendeten HUVE-Zellen diese Rezeptoren exprimieren, wurden immunhistochemische Färbungen der Rezeptoren mit VEGFR-1- und VEGFR-2-Antikörpern durchgeführt. Die immunhistochemischen Färbungen wurden, wie in Abschnitt 4.2.2.2 beschrieben, an auf Deckgläschen ausgesäten HUVE-Zellen durchgeführt. Abbildung 20 zeigt, dass die VEGF-Rezeptoren-1 und -2 (Abbildung 20A und B) gegenüber der Kontrolle (Abbildung 20C) deutlich rot angefärbt sind. Als Kontrolle dienten nicht mit den VEGFR-Antikörpern behandelte HUVECs. Dies bedeutet, dass sowohl der VEGFR-1 als auch der VEGFR-2 von den HUVE-Zellen exprimiert wird.

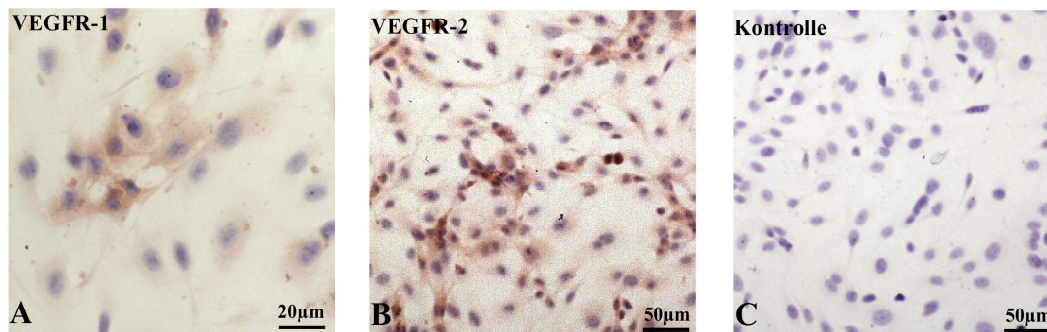


Abbildung 20: Lichtmikroskopische Darstellung der immunhistochemischen Färbung der VEGFR-1 und -2 (A und B) an HUVECs. C zeigt die nur mit dem Sekundäntikörper inkubierten HUVE-Zellen als Kontrolle.

5.1.4.1 Spezifische Eisenaufnahme in HUVE-Zellen

Um herauszufinden, ob die über die Rezeptoren (VEGFR-1 und -2) induzierte Endozytose höher ist als die unspezifische Endozytose, wurde die Aufnahme von N70+anti-VEGFR-1-Konjugaten und N70+anti-VEGFR-2-Konjugaten in HUVE-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationskonzentration und -zeit untersucht. Die Aufnahme der N70-Partikel über unspezifische Endozytose wurde als Kontrolluntersuchung mit durchgeführt.

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 4.5.3 beschrieben präpariert. Die Eisenaufnahme der Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationskonzentration wurde mittels TRFA quantifiziert und ist in Abbildung 21 dargestellt. Die Inkubationszeit betrug 3 h. Bei jeder Messreihe wurden vier verschiedene Inkubationskonzentrationen gemessen. An drei von diesen Messpunkten wurden dreifach Proben hergestellt und hieraus Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Diese Ergebnisse setzen sich dabei sowohl aus Eisenoxidpartikeln internalisiert in der Zelle als auch angelagert an die Zellmembran zusammen. Für kleine Inkubationskonzentrationen (5 µg Fe/ml)

war die spezifische Aufnahme über den VEGFR-1 um den Faktor 66,5 höher als die unspezifische Kontrolluntersuchung ($p = 0,0063$).

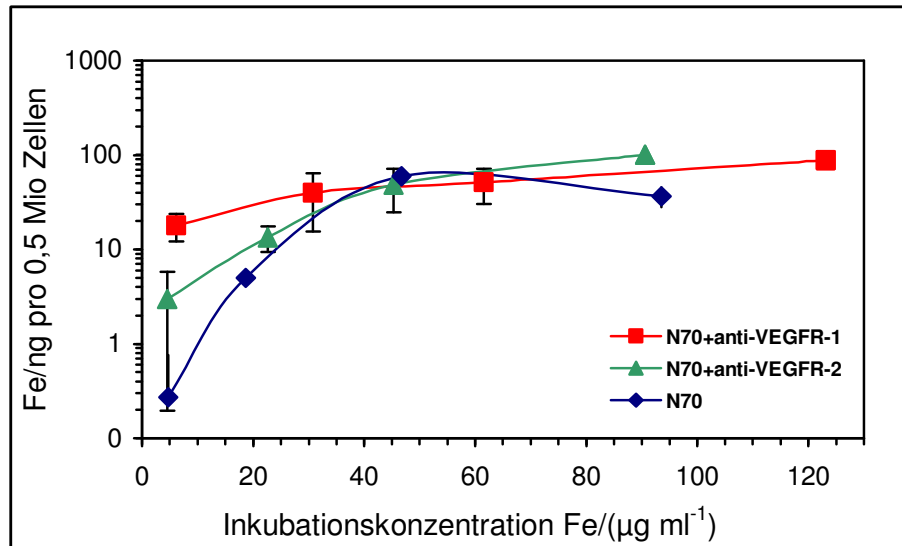


Abbildung 21: Aufnahme von N70-Eisenoxidpartikel, N70+anti-VEGFR-1-Konjugat und N70+anti-VEGFR-2-Konjugat in HUVE-Zellen bei einer Inkubationszeit von 3 h und in Abhängigkeit von der Inkubationskonzentration, bestimmt mittels TRFA. Die Rezeptor-induzierten Aufnahmen über VEGFR-1 ergaben die besten Ergebnisse und waren bis zu Inkubationskonzentrationen von 30 $\mu\text{g/ml}$ Fe höher als die unspezifische Aufnahme. Die Messwerte der Zellen wurden bei der Auswertung um das im PBS enthaltene Eisen korrigiert.

Sie übertraf außerdem die Aufnahme über den VEGFR-2 um den Faktor 6 ($p = 0,016$), wobei letzterer nicht signifikant um den Faktor 11 höher als die Kontrolluntersuchung lag ($p = 0,17$). Bis etwa 30 $\mu\text{g Fe/ml}$ Inkubationskonzentration war die spezifische Aufnahme noch höher als die unspezifische Aufnahme. Ab 30 $\mu\text{g Fe/ml}$ gingen sowohl die spezifische Rezeptor-induzierte Aufnahme, als auch die unspezifische Aufnahme in ein Plateau von ca. 40 ng Fe pro $5 \cdot 10^5$ Zellen über. Die Rezeptor-induzierte Aufnahme über VEGFR-1 blieb damit bis 30 $\mu\text{g Fe/ml}$ Inkubationskonzentration höher als die Aufnahme über VEGFR-2. Die Messwerte der Zellen wurden bei der Auswertung um das im PBS enthaltene Eisen korrigiert. Hierzu wurde das Eisen in drei Proben mit je 20 μl PBS quantifiziert. In 20 μl PBS ergab sich ein Eisengehalt von $2,46 \pm 0,48$ ng Fe. Der Eisengehalt von drei Proben $5 \cdot 10^5$ HUVE-Zellen in PBS betrug: $2,47 \pm 0,48$ ng Fe pro $5 \cdot 10^5$ Zellen. Somit existiert in den nicht inkubierten Zellen keine nennenswerte Eisenmenge, welche die Messungen verfälschen könnte.

Abbildung 22 zeigt die bei einer Inkubationskonzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ Fe aufgenommene Zeitkinetik in einem Bereich von 15 min bis 8 h. Bei jeder Messreihe wurden acht bis neun verschiedenen Inkubationszeiten gemessen. An drei von diesen Messpunkten wurden dreifach Proben hergestellt und hieraus Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Diese Ergebnisse setzen sich ebenfalls sowohl aus Eisenoxidpartikeln internalisiert in der Zelle als auch

angelagert an die Zellmembran zusammen. Die Aufnahme in Abhängigkeit von der Zeit über den VEGFR-1 war auch hier unter 2 h höher als über den VEGFR-2. Bei einer Inkubationszeit von 45 min zeigen die beiden Kurven der spezifischen Aufnahme ein Maximum.

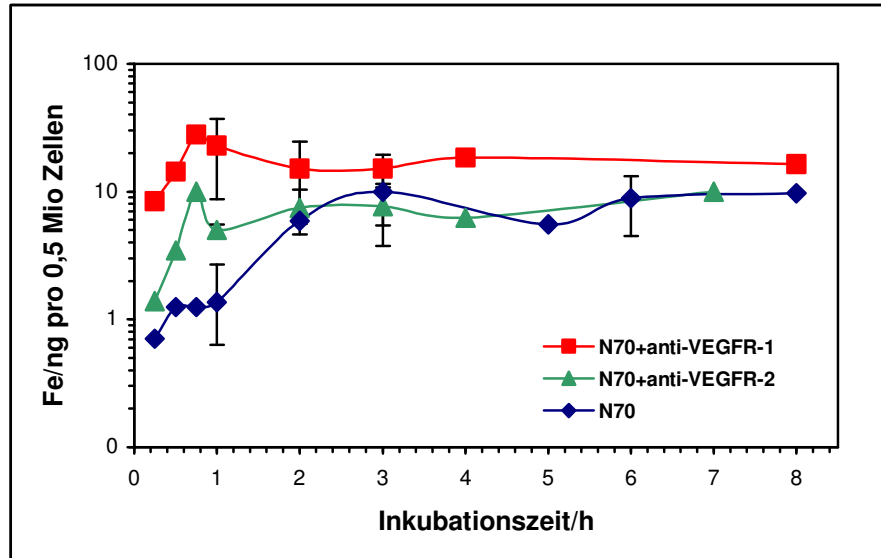


Abbildung 22: Unspezifische und rezeptorinduzierte Partikelaufnahme bei einer Inkubationskonzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ Fe in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Bei jeweils drei Messpunkten wird der Mittelwerte und die Standardabweichung über dreifach hergestellte Proben ermittelt.

Die Aufnahme über den VEGFR-1 ist hier 22fach höher als die unspezifische Aufnahme und fast dreimal so hoch wie die Aufnahme über den VEGFR-2. Ebenfalls eine Separation zeigten die Eisenoxidpartikel aufnahmen bei einer Inkubationszeit von 1 h. Hierbei war die spezifische Aufnahme über den VEGFR-1 um einen Faktor 16,8 höher als das Kontrollexperiment ($p < 0,05$). Sie übertraf außerdem die Aufnahme über den VEGFR-2 um den Faktor 4,6 ($p < 0,05$), wobei letzterer nicht signifikant um den Faktor 3,7 höher als die Kontrolluntersuchung lag ($p > 0,05$). Ab 2 h ist die spezifische Aufnahme nicht mehr signifikant unterschiedlich zu der unspezifischen Aufnahme. Sowohl die spezifische als auch die unspezifische Aufnahme erreicht ein Plateau bei der Eisenaufnahme von ca. 10 ng Fe pro $5 \cdot 10^5$ Zellen.

Durch die Berlinerblaufärbung (s. Abschnitt 4.2.2.1) sollte ermittelt werden, ob auch bei der spezifischen Markierung durch das Konjugat die Eisenoxidpartikel von den Zellen aufgenommen werden oder lediglich an den Rezeptoren der Zellmembran gebunden bleiben. In Abbildung 23 ist eine Berlinerblaufärbung von HUVE-Zellen dargestellt. Die HUVE-Zellen wurden vorher 45 min mit 20 $\mu\text{l/ml}$ N70+anti-VEGFR-1-Konjugat inkubiert. Sichtbar ist, dass sich Eisen sowohl an der Zellmembran als auch in der Zelle befindet. Allerdings werden die Eisenoxidpartikel hauptsächlich von der Zelle internalisiert.

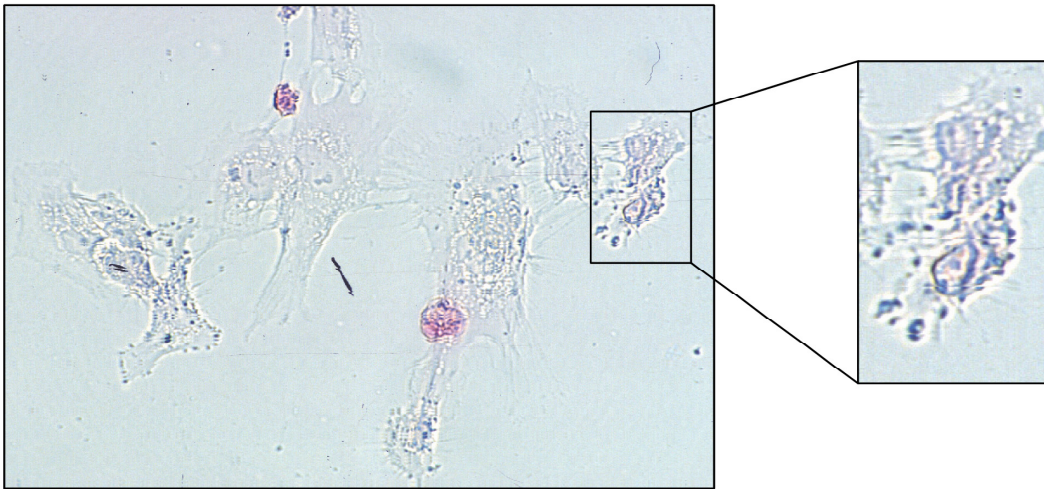


Abbildung 23: Lichtmikroskopische Aufnahme der Berlinerblaufärbung von Eisen in HUVE-Zellen, inkubiert mit N70+anti-VEGFR-1-Konjugat (20 $\mu\text{l/ml}$, 45 min). Zu erkennen ist, dass sich die Eisenoxidpartikel sowohl außen an die Zellmembran anlagern, als auch von den Zellen aufgenommen werden (Vergrößerung).

Die Zellkerne sind mit Kernechtrubin rot gefärbt. Die Blaufärbung in Abbildung 23 ist nicht so intensiv wie in Abbildung 17, da die Resovist-Partikel wesentlich stärker unspezifisch als die N70-Partikel aufgenommen werden (vgl. Abbildung 18).

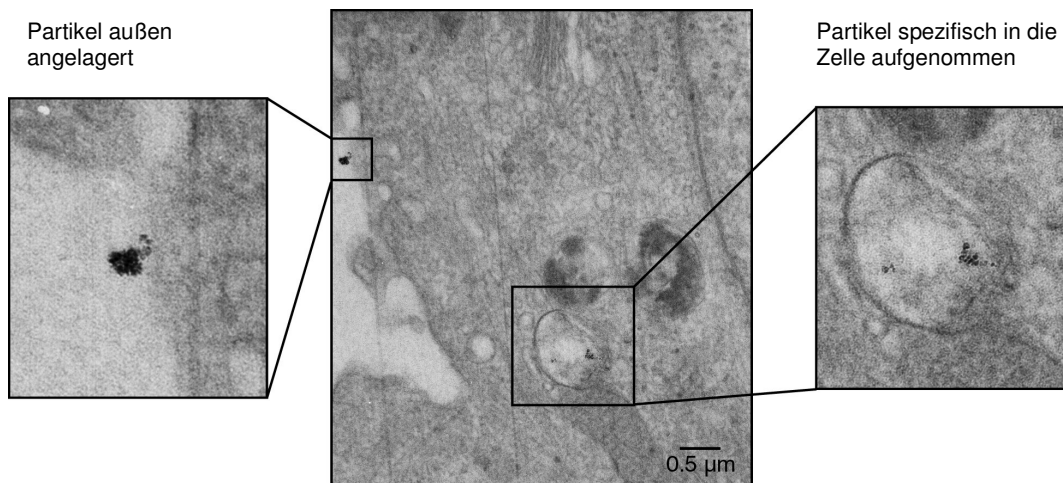


Abbildung 24: TEM-Aufnahme einer HUVE-Zelle. Die HUVE-Zelle wurde zuvor mit N70+anti-VEGFR-1 Konjugat 20 $\mu\text{g Fe/ml}$ 45 min bei 37 °C inkubiert. Das Konjugat lagert sich außen an der Zellmembran an und wird anschließend internalisiert (Vergrößerungen).

Mit dem TEM (s. Abschnitt 4.2.1.2) wurde ebenfalls die Fragestellung untersucht, wie die Konjugate von den Zellen aufgenommen werden und wo sie in der Zelle verbleiben. In Abbildung 24 ist eine TEM-Aufnahme einer HUVE-Zelle dargestellt. Die HUVE-Zellen wurden zuvor mit N70+anti-VEGFR-1 Konjugat 20 $\mu\text{g Fe/ml}$ 45 min bei 37°C inkubiert. In den Vergrößerungen ist zum einen N70+anti-VEGFR-1 Konjugat an die Zellmembran angelagert

(links) und zum anderen internalisiert in einem Lysosom (rechts) dargestellt. Dies bedeutet also, dass sich das Konjugat sowohl außen an die Zellmembran und dort vermutlich an einen Rezeptor bindet, als auch durch diesen von der Zelle internalisiert wird. Ebenso erfolgt die Konjugataufnahme über den VEGFR-2. Dies wurde allerdings nicht mit dem TEM untersucht.

5.1.4.2 Spezifische Eisenaufnahme in U118-Zellen

Da es das Ziel ist, ein Konjugat zu entwickeln, welches Endothelzellen während der Angiogenese bei Tumorwachstum markiert, ist es wichtig zu wissen, ob und wie das Konjugat von Tumorzellen aufgenommen wird. Um diese Frage zu beantworten, wurde die Konjugataufnahme in Abhängigkeit von der Inkubationskonzentration und -zeit an einer Glioblastomazelllinie (U118) untersucht. U118-Zellen exprimieren nur den VEGFR-1 und dies 200fach geringer als HUVE-Zellen (Mentlein et al., 2004). Es wird also hauptsächlich eine unspezifische Aufnahme erwartet. Die Zellen wurden wie in 4.5.3 beschrieben präpariert und die Eisenaufnahme wurde mit TRFA quantifiziert. Jede Messreihe umfasste vier bis fünf Messpunkte. Für jeweils drei Messpunkte wurden die Proben in dreifacher Ausführung hergestellt, so dass hieraus Mittelwert und Standardabweichung berechnet werden konnte. Abbildung 25 zeigt die Partikelaufnahme der ungekoppelten N70-Partikel, des N70+anti-VEGFR-1-Konjugates und des N70+anti-VEGFR-2-Konjugates in Abhängigkeit von der Inkubationskonzentration.

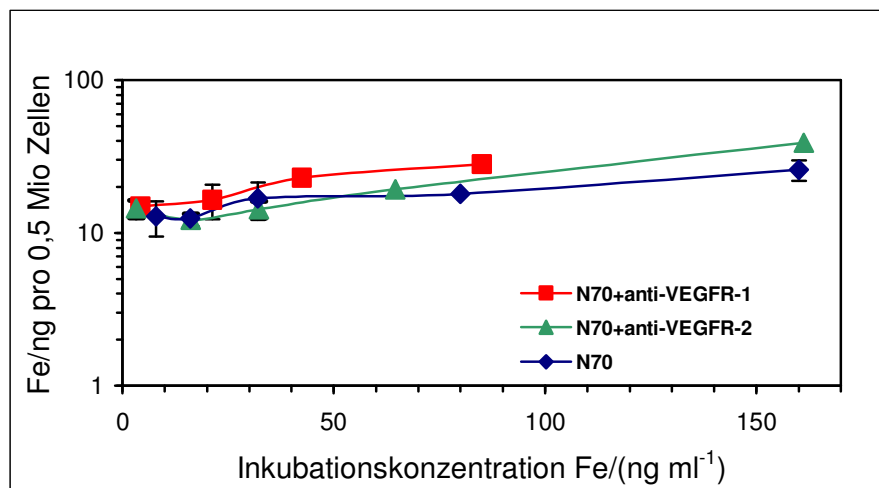


Abbildung 25: Aufnahme von N70-Eisenoxidpartikel, N70+anti-VEGFR-1-Konjugat und N70+anti-VEGFR-2-Konjugat in U118-Zellen mit einer Inkubationszeit von 5 h in Abhängigkeit von der Inkubationskonzentration. Die Aufnahmekurve der ungekoppelten N70-Partikel und des Konjugates zeigt keinen Unterschied. Jeweils drei Messpunkte einer Messreihe wurden über den Mittelwert dreier Proben bestimmt. Hieraus resultiert auch die angegebene Standardabweichung.

Die Aufnahmekurven der ungekoppelten N70-Partikel und der beiden Konjugate weisen innerhalb ihrer Variabilität keine Unterschiede auf, so dass davon ausgegangen werden kann, dass auch die Konjugate unspezifisch aufgenommen wurden, zumal die U118-Zellen nur den

VEGFR-1 in einer sehr geringen Menge exprimieren. Vergleicht man Abbildung 25 mit Abbildung 21 so fällt auf, dass die U118-Zellen schon bei kleinen Inkubationskonzentrationen ($< 20 \mu\text{g/ml}$) größere Eisenmengen (10–20 ng Fe pro 0,5 Mio Zellen) unspezifisch aufnehmen als die HUVE-Zellen über den VEGFR-2 und ähnlich viel wie die HUVE-Zellen über VEGFR-1. Allerdings ist die Inkubationszeit der U118-Zellen mit 5 h höher als die der HUVE-Zellen (3 h). Für die U118-Zellen wurde ebenfalls wie für die HUVE-Zellen eine Zeitkinetik (15 min bis 8 h) bei einer Inkubationskonzentration von $20 \mu\text{g/ml}$ Fe aufgenommen. Die Aufnahme in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ist in Abbildung 26 dargestellt. Die Aufnahmekurven der ungekoppelten Partikel und der Konjugate zeigen einen ähnlichen zeitlichen Verlauf. Die U118-Zellen nehmen folglich sowohl die ungekoppelten Partikel als auch das Konjugat hauptsächlich unspezifisch auf.

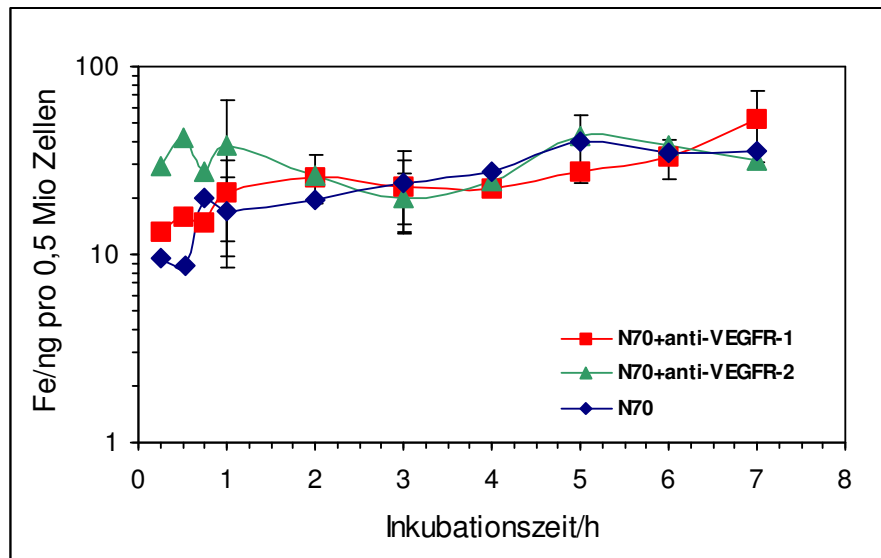


Abbildung 26: Aufnahmekinetik der U118-Zellen bei einer Inkubationskonzentration von $20 \mu\text{g Fe/ml}$. Die Aufnahme des Konjugates und der ungekoppelten Partikel zeigt den gleichen zeitlichen Verlauf. Jeweils drei Messpunkte einer Messreihe wurden über den Mittelwert dreier Proben bestimmt. Hieraus resultiert auch der angegebene Fehler (Standardabweichung).

5.1.5 Vergleichende Analyse der verschiedenen Partikel und Zellen

Zusammenfassend lässt sich Folgendes feststellen: Die nackten N20-Partikel werden am stärksten unspezifisch von den U118-Zellen aufgenommen, die dextranummantelten N70- und N50-Partikel am geringsten. Die Kopplungsschritte der Konjugatherstellung wurden optimiert. Es ergibt sich eine maximale Antikörperkopplung von 47–48 Antikörper an die Dextranhülle der Eisenoxidpartikel durch Aktivierung mit $10 \mu\text{l BrCN/Acetonitril-Lösung}$ und Inkubation mit $40 \mu\text{g Antikörper}$. Die optimalen Inkubationsparameter zur Separation der spezifischen und unspezifischen Aufnahme liegen bei einer Inkubationskonzentration von $20 \mu\text{g/ml Fe}$ und einer Inkubationszeit von 45 min. Dabei hat sich durch TEM-Untersuchungen und Eisenblau-

Färbungen gezeigt, dass der Großteil der Eisenoxidpartikel von den Zellen internalisiert wird und ein kleiner Teil an der Zellmembran gebunden bleibt. In Abschnitt 5.1.2 hat sich gezeigt, dass die unspezifische Aufnahme in U118-Zellen stark von der Partikelhülle abhängt. Resovist- und B102-Partikel, die mit Carboxymethyldextran umgeben sind, werden bis zu 10fach stärker aufgenommen als die mit dextranummantelten N70- und N50-Partikel, obwohl die Größe der Partikel sehr ähnlich ist.

Tabelle 5: Eisenkonzentration in ng pro 1 Mio Zellen und in mM bei 20 µg Fe und 1 h Inkubationszeit (Mittelwert ± Standardabweichung).

	N20	N50	N70	B102	Resovist
U118					
unspez Fe [ng]	420,92 ± 5,7	7,96 ± 1,27	9,46 ± 1,27	169,44 ± 22,9	58,93 ± 7,24
Fe [mM]	1,834 ± 0,025	0,037 ± 0,006	0,041 ± 0,006	0,631 ± 0,085	0,211 ± 0,026
HUVEC					
unspez Fe [ng]	—	—	2,72 ± 2,67	—	—
Fe [mM]	—	—	0,012 ± 0,011	—	—
HUVEC VEGFR-1					
Fe [ng]	—	—	45,80 ± 28,36	—	—
Fe [mM]	—	—	0,195 ± 0,121	—	—
HUVEC VEGFR-2					
Fe [ng]	—	—	9,99 ± 0,57	—	—
Fe [mM]	—	—	0,043 ± 0,002	—	—

Vergleicht man Abbildung 26 mit Abbildung 22, so internalisieren die U118-Zellen unspezifisch ähnlich viel Eisen (zwischen 20-30 ng Fe pro 0,5 Mio Zellen) wie die HUVEC-Zellen bei 20 µg Fe/ml Inkubationskonzentration mit N70+anti-VEGFR-1-Konjugat und variierender Inkubationszeit. Aus Abbildung 21 geht hervor, dass die unspezifische Aufnahme der N70-Partikel bei kleinen Inkubationskonzentrationen (< 30µg Fe/ml) in HUVEC-Zellen deutlich geringer ist als in U118-Zellen (Abbildung 25). Dies gilt ebenso für kurze Inkubationszeiten von < 2 h. Hieraus lässt sich folgern, dass U118-Zellen sofort die Partikel sehr stark unspezifisch aufnehmen, bei den HUVEC-Zellen jedoch ist dieser Vorgang konzentrations- und zeitabhängig. Die unspezifische Aufnahme in U118-Zellen kann allerdings nicht unbedingt mit der aus Abschnitt 5.1.4 und 5.1.4.2 ermittelten verglichen werden, da die Probenpräparation unterschiedlich erfolgt ist. Für die Experimente in Abschnitt 5.1.2 wurde jeweils eine Zellkulturflasche mit den jeweiligen Parameter inkubiert und dann gedrittelt. In den Abschnitten 5.1.4 und 5.1.4.2 wurden einzelne Proben dreifach hergestellt, so dass hier ein größerer Präparationsfehler vorliegt. Dennoch wurde zur Übersicht die Werte für 20 µg Fe Inkubationskonzentration und 1 h Inkubationszeit in einer Übersicht zusammengestellt (Tabelle 5). Hier wurden die Angaben auf Eisenkonzentration pro 1 Mio Zellen hochgerechnet.

5.2 MR-Kontrastverhalten von extra- und intrazellulären Eisenoxidpartikeln

Kontrastmittel im menschlichen Körper können sich in verschiedenen Umgebungen befinden, die ihre Relaxationseigenschaften unterschiedlich beeinflussen. Es wurde ermittelt, wie verschiedene Eisenoxidpartikel bei wachsender Konzentration suspendiert in Puffer als auch internalisiert in Zellen das MRT-Signal beeinflussen. Die jeweiligen Ergebnisse wurden dann mit der in Abschnitt 3.6.2 vorgestellten Theorie verglichen. Für die theoretische Betrachtung der Relaxivitäten wurde die Magnetisierung der Partikel benötigt, so dass diese mit einer Magnetwaage untersucht wurde. Für die Interpretation der Ergebnisse ist es wichtig, ob die Relaxivitäten der Partikel in Zellen vom Typ der Zelle abhängt oder nicht und ob durch die Markierung der Zellen über die Rezeptoren auch die Relaxivitäten beeinflusst werden, da sich die Rezeptoren mit den angekoppelten Konjugaten noch eine Zeit an der Zellmembrane befinden, bevor sie internalisiert werden. Durch eine Sensitivitätsabschätzung konnte ermittelt werden ob der Unterschied zwischen spezifischer und unspezifischer Markierung durch das N70-Konjugat groß genug ist, um eine signifikante Signaländerung im MRT *in vitro* hervorzurufen.

5.2.1 Magnetische Eigenschaften der Eisenoxidpartikel

Die magnetische Suszeptibilität der Eisenoxidpartikel induziert Magnetfeldinhomogenitäten, die wiederum hauptsächlich die transversale Relaxationszeit des umliegenden Gewebes reduziert. Für das Verständnis der Relaxationseigenschaften der Partikel ist es daher wichtig, deren magnetische Suszeptibilität zu kennen. Die Eisenoxidpartikel N20, N50, N70, B102 und Resovist wurden für die Messungen gefrieretrocknet. Danach wurden die magnetischen Suszeptibilitäten der Partikel, wie in Abschnitt 4.3.3 beschrieben, mit einer Faraday-Magnetwaage ermittelt. Die gemessenen magnetischen Grammsuszeptibilitäten beziehen sich auf die Masse des in den Partikeln enthaltene Eisen. Abbildung 27 zeigt die lineare Abhängigkeit der magnetischen Grammsuszeptibilität der Partikel vom angelegten Magnetfeld. Dies bedeutet, dass sich bei höheren Magnetfeldern auch die Suszeptibilität ändert. Allerdings ist die Änderung bei höheren Magnetfeldern (>10 kG) nicht mehr so stark, da die Magnetisierung in eine Sättigung übergeht. Aus der Abbildung 27 geht hervor, dass die Änderung der Suszeptibilität für die B102-Partikel größer ist als die Änderung der anderen Partikel. Die nach Gl. 4.10 berechnete Magnetisierung der Partikel sind in Tabelle 4 dargestellt. Resovist-, N20- und N70-Partikel haben bei 1,5 T und 298 K eine ähnlich hohe spezifische Magnetisierung, was darauf zurückzuführen ist, dass diese Partikel aus dem gleichen Material (Maghemit) zusammengesetzt sind. N50-Partikel bestehen aus Magnetit und haben dementsprechend auch eine etwas höhere Magnetisierung.

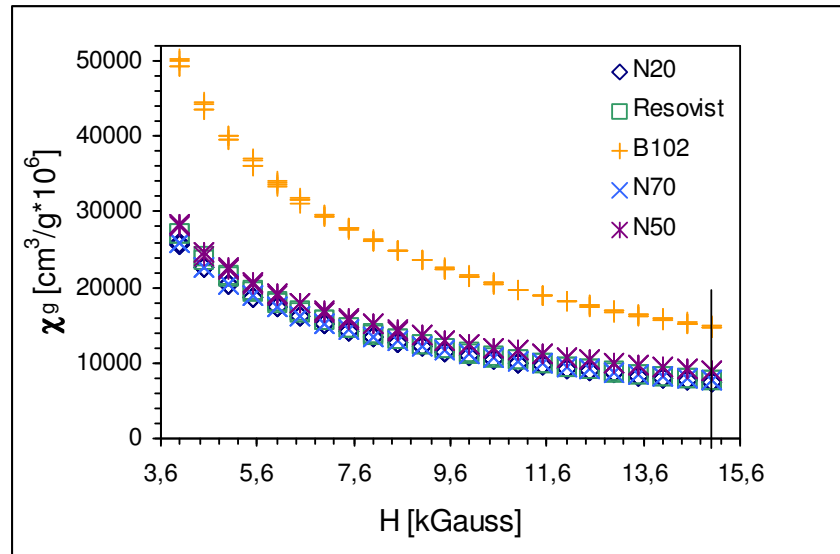


Abbildung 27: Darstellung der linearen Abhängigkeit der Grammsuszeptibilität der Partikel vom angelegten Magnetfeld. Bei steigendem Magnetfeld nähert sich die Suszeptibilität einer Sättigung. Dargestellt sind jeweils drei Messungen pro Feldstärke. Die Linie bezeichnet die Suszeptibilität bei 1,5 T.

Da die Magnetisierung der Partikel für die theoretischen Berechnungen in Gauss benötigt wird, muss diese nach Gl. 4.11 umgerechnet werden. Für diese Berechnung wird für Maghemit eine Dichte von $\rho = 5,2 \text{ g/cm}^3$ und für Magnetit eine Dichte von $\rho = 4,9 \text{ g/cm}^3$ verwendet (Cornell und Schwertmann, 2003).

Tabelle 6: Darstellung der Magnetisierung der Eisenoxidpartikel bei 1,5 T und 298 K. Die Magnetisierung wird in (emu/g), zum Vergleich mit Literatur-Werten und in (G) berechnet nach Gl. 4.11 für die theoretischen Berechnungen angegeben. $M(G)$ wird mit der Dichte für Maghemit ($\rho = 5,2 \text{ g/cm}^3$, N50- und B102-Partikel) und Magnetit ($\rho = 4,9 \text{ g/cm}^3$, Resovist-, N70- und N20-Partikel) berechnet (Cornell und Schwertmann, 2003).

Partikel	M (emu/g)	Literatur M (emu/g)	M (G)
N20	$112,76 \pm 5,64$	$108,7^*$	$552,52 \pm 29,32$
N50	$133,85 \pm 6,69$	$127,1^*$	$696,02 \pm 34,80$
N70	$116,06 \pm 5,80$	$108,7^*$	$568,69 \pm 30,18$
B102	$221,75 \pm 11,09$	—	$1088,05 \pm 57,73$
Resovist	$116,16 \pm 5,81$ ($107,61 \pm 1,37$) ^{***}	$107,0^{**}$	$569,09 \pm 45,71$

* (Bulte et al., 2001)

** bei 0,45T (Lawaczeck et al., 1997)

*** bei 0,45T

5.2.2 Relaxationseigenschaften von Eisenoxidpartikeln in Puffer

5.2.2.1 Experimentelle Ergebnisse

Es wurden die Relaxationseigenschaften der in isotonischem Puffer suspendierten Partikel ermittelt. Die Proben wurden wie in Abschnitt 4.5.1 beschrieben hergestellt und die Relaxationszeiten mit der in Abschnitt 4.6 dargestellten MR-Sequenzen gemessen. In Abbildung 28 sind die Relaxationsraten R_1 , R_2 und R_2^* der Eisenoxidpartikel N20, N50, N70, B102 und Resovist in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration aufgetragen. Die Änderungen der R_1 -, R_2 - und R_2^* -Raten mit der Eisenkonzentration zeigte bei allen Partikeln einen linearen Verlauf ($r^2 > 0,95$), wie durch Gl. 3.22 vorhergesagt. Die B102-Partikel zeigten die höchsten Relaxivitäten r_1 , r_2 und r_2^* in Pufferlösung (Abbildung 29 und Tabelle A.1). Ihre longitudinale Relaxivität r_1 ist etwa vierfach höher als die von N50, N70 und Resovist und doppelt so hoch wie die von N20. Die transversale Relaxivität r_2 der B102-Partikel ist doppelt so hoch wie die von N50 und fünfmal so hoch wie die von N20, N70 und Resovist. Die r_2^* -Relaxivitäten verhalten sich ähnlich den r_2 Relaxivitäten, nur r_2^* von Resovist ist etwa um einen Faktor 1,5 höher als r_2 . Damit reduzieren die B102-Partikel in Puffer die Relaxationszeiten mit wachsender Eisenkonzentration am stärksten.

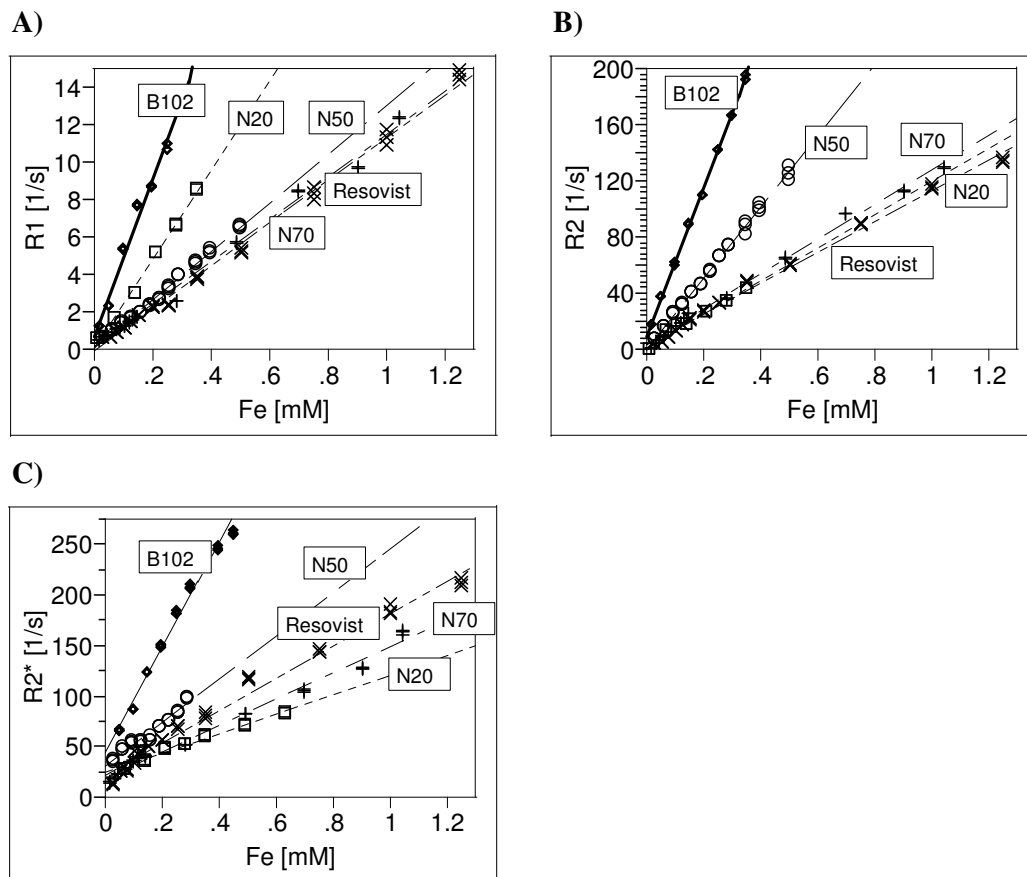


Abbildung 28: Relaxationsraten R_1 , R_2 und R_2^* der Eisenoxidpartikel N20 (\square), N50 (\circ), N70 (\triangle), B102 (\diamond) und Resovist (\times) in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration (1,5 T, 298 K).

Abbildung 29 zeigt eine T_2 -gewichtete MR-Messung (s. Abschnitt 4.6) der Eisenoxidpartikel-Puffer-Phantome. Die verschiedenen Eisenoxidpartikel reduzieren das Signal bei gleicher Eisenkonzentration unterschiedlich stark, z.B. N20- und B102-Partikel (bei 0,35 mM). Es wurden Aufnahmen bei zwei unterschiedlichen T_E -Zeiten ($T_E = 5$ ms und 50 ms) durchgeführt. Bei sehr kurzem T_E (5 ms) ist sogar noch ein Signal bei Phantomen mit sehr hohen Eisenkonzentrationen vorhanden. Bei einem eher langen T_E (50 ms) ist das Signal schon größtenteils abgefallen bzw. stark reduziert. Dies gilt vor allem für B102-Partikel Phantome, bei denen das Signal bei einer Eisenkonzentration von 0,05 mM nur noch schwach zu erkennen ist, während bei den N70-Partikel Phantomen noch genügend sichtbares Signal bei einer Eisenkonzentration von 0,139 mM (bei N70-Partikel Phantomen 0,211 mM Fe) vorhanden ist. Dies bedeutet, dass die B102-Partikel suspendiert in Puffer wesentlich stärker die transversale Relaxationszeit T_2 beeinflussen als die N70- und N20-Partikel. Auch ist in Abbildung 29 visualisiert, dass das Signal mit wachsender Eisenkonzentration der Puffer für B102-Partikel wesentlich schneller abnimmt als für N70- und N20-Partikel, wie dies ebenfalls in Abbildung 28 dargestellt ist.

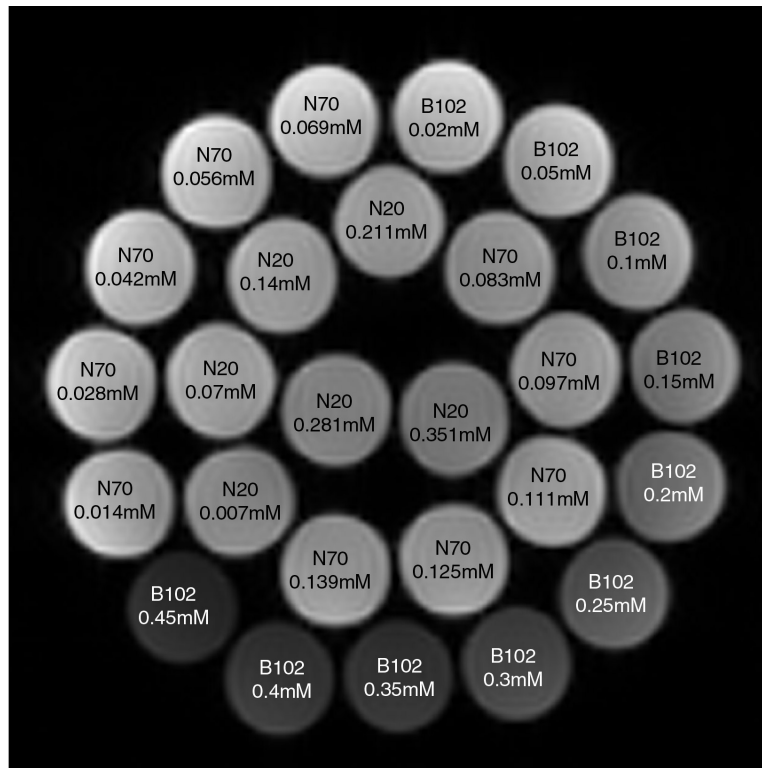
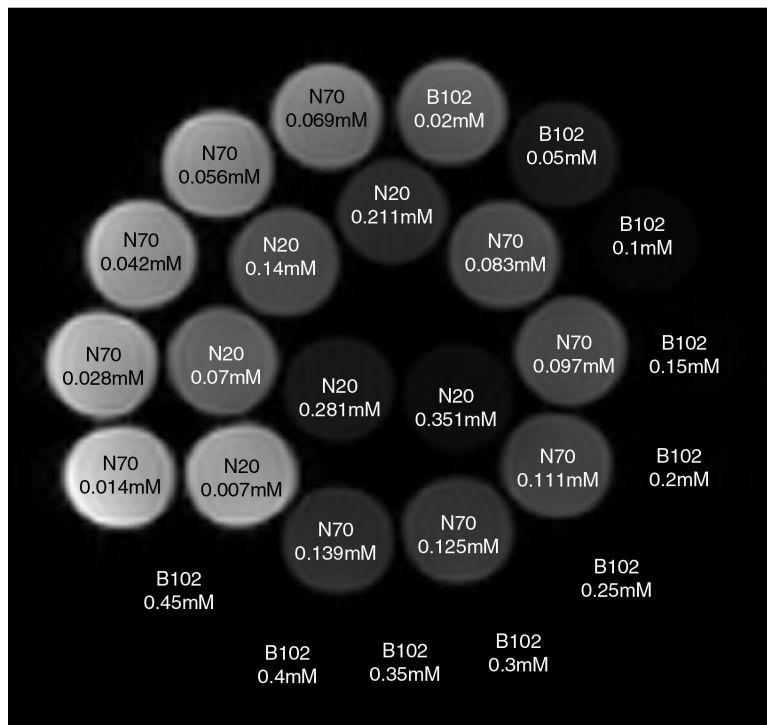
 $T_E = 5$ ms $T_E = 50$ ms

Abbildung 29: T_2 -gewichtete MR-Messung (s. Abschnitt 4.6) der Eisenoxidpartikel-Puffer-Phantome (für N20-, N70- und B102-Partikel) mit unterschiedlichen Eisenkonzentrationen und T_E -Zeiten von 5 und 50 ms. Für $T_E = 50$ ms beobachtet man einen deutlich stärkeren Abfall der Signalintensität als für $T_E = 5$ ms.

5.2.2.2 Theoretische Erklärung

SDR versus MNR

Für die Ermittlung, welche Theorie zur Beschreibung des Relaxationsverhaltens in Zellen und Puffer herangezogen werden kann, sind vergleichende Analysen mit SE- und GE-Sequenzen hilfreich. In Tabelle 7 sind die Charakteristika für SE- und GE-Sequenzen im MNR und SDR zusammengetragen (Erläuterungen zu den Formeln, s. Abschnitt 3.6.2 und 3.6.4). Hieraus geht hervor, dass die mit SE- und GE-Sequenz gemessenen transversalen Relaxationsraten im MNR identisch und vom Quadrat der Magnetisierung der Partikel ($\Delta\omega_r \sim M$) der Partikelkonzentration v und der Diffusionszeit τ_D abhängen. Im SDR hängt die mit einer SE-Sequenz gemessene effektive transversale Relaxationsrate $R_{2,SE}^*$ zusätzlich noch von der Echozeit im Quadrat ($\tau_{CP} = T_E/2$) sowie vom Verhältnis vom Partikelradius zum effektivem Radius (r/r') ab. $R_{2,GE}^*$, gemessen mit einer GE-Sequenz, ist nur abhängig von der Partikelkonzentration und ihrer Magnetisierung der Partikel.

Tabelle 7: Formeln für die durch Eisenoxidpartikel induzierte transversale Relaxation im MNR und SDR, gemessen mit SE- und GE-Sequenz (s. Abschnitt 3.6.2 und 3.6.4).

Sequenz	MNR ($\Delta\omega_r \cdot \tau_D \ll 1$)	SDR ($\Delta\omega_r \cdot \tau_D \gg 1$)
SE	$R_{2,Partikel} = \frac{4}{9} \cdot v \cdot \tau_D \cdot (\Delta\omega_r)^2$	$R_{2,Partikel} = 2,25 \cdot v \cdot \frac{(\Delta\omega_r \cdot \tau_{CP})^2}{\tau_D} \cdot \left(\frac{r}{r'}\right)^5$
GE	$R_{2,Partikel}^* = \frac{4}{9} \cdot v \cdot \tau_D \cdot (\Delta\omega_r)^2$	$R_{2,Partikel}^* = \frac{\sqrt{15}}{9} \pi \cdot v \cdot \Delta\omega_r$

Für die Abhängigkeit der gemessenen effektiven Relaxationsraten von der in der Zelle internalisierten Eisenkonzentration und den Sequenztypen wurde eine multifaktorielle lineare Regression durchgeführt (JMP, SAS Institute Inc., USA). Hierbei ergab sich, dass der Zusammenhang zwischen der gemessenen Relaxationsraten der B102-, N20-, N50- und N70-Partikel und der Eisenkonzentration keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Sequenztyps (SE- und GE-Sequenz) zeigte ($p > 0.5$). Für die Resovist-Partikel in Puffer ergab sich jedoch ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) zwischen den Sequenztypen.

Geht man für alle Partikel davon aus, dass ein Offset durch Magnetfeldinhomogenitäten des B_0 -Feldes entstehen kann ($R_{2,InhB-Feld}^*$), so deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass mit Ausnahme von Resovist das Relaxationsverhalten der Partikel in Puffer durch das MNR beschrieben werden kann (identische Steigung, $r_2 = r_2^*$). Der Offset ist bedingt durch die Inhomogenität des Hauptfeldes B_0 , die bei einer GE-Sequenz den T_2^* -Abfall beeinflusst, deren Effekt bei einer SE-Sequenz jedoch refokussiert wird (s. Abschnitt 3.4.2 und 3.6.4).

In den theoretischen Berechnungen wird von der Annahme ausgegangen, dass für Eisenoxidpartikel suspendiert in Puffer die Formeln des MNR und für Eisenoxidpartikel internalisiert in Zellen die Formeln des SDR gelten. Diese Annahmen werden durch folgende Faktoren gestützt: Zum einen gilt laut Theorie für das SDR, dass die mit einer SE- und GE-Sequenz gemessenen transversalen Relaxationsraten unterschiedlich sind und zum anderen, dass die mit einer SE-Sequenz, nicht aber mit einer GE-Sequenz gemessenen transversalen Relaxationsraten von der verwendeten Echozeit T_E abhängig sind. Für das MNR gilt, dass die mit einer SE- und GE-Sequenz gemessenen transversalen Relaxationsraten gleich und von T_E unabhängig sind.

Der experimentell festgestellte Offset zwischen der mittels SE- und GE-Sequenz gemessenen Relaxationsraten kann alleine schon durch den Einfluss der B_0 -Feldinhomogenitäten erklärt werden eignet sich also nicht, die Gültigkeit von MNR von SDR abzuwägen. Die T_E -Abhängigkeit kann hier besser Aufschluss geben. Um die Abhängigkeit der Relaxationsrate von T_E zu überprüfen wurde dies für drei unterschiedliche Eisenkonzentrationen (0, 0,04 und 0,2 mM Fe) der N70-Partikel in Puffer suspendiert bei verschiedenen T_E (5, 10 und 20 ms) jeweils dreifach gemessen (Abbildung 30). Hierbei ergab sich keine signifikante Abhängigkeit der Relaxationsraten von T_E , ein Hinweis auf die Gültigkeit des MNR. Damit wird die obige Annahme bestätigt, dass für in Puffer suspendierte N70-Partikel das MNR angenommen werden kann. Die Resovist-Partikel befinden sich dabei in einem Zwischenzustand, in dem zwar noch die MNR-Theorie gilt, aber auch Verhaltensweisen des SDR zu beobachten sind.

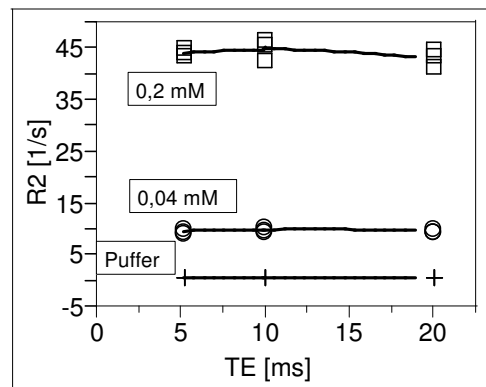


Abbildung 30: Variation von der Echozeit bei einem Multi-Spin-Echo Experiment. Es sind die transversalen Relaxationsraten von N70-Partikel suspendiert in Puffer dargestellt.

Abschätzung der Relaxationsrate

Für die Berechnungen der transversalen Relaxationsraten von Eisenoxidpartikeln in Puffer nach den Formeln des MNR ist primär der Einfluss der einzelnen Eisenoxid-Kristalle in den Partikeln nicht der Einfluss des gesamten Partikels relevant. Durch die schnelle Diffusion der Wasserprotonen werden Einflüsse der kleinen, durch $\Delta\omega_r$ bedingten Magnetfeldinhomogenitäten der in die in eine Dextranmatrix eingebetteten Kristalle (als separate Partikel angesehen) ausgemittelt. Dies kann wie folgt abgeschätzt werden:

Die N70-Partikel enthalten $2,9 \cdot 10^{-17}$ g Fe pro Partikel ein Eisenoxidkristall enthält $2,88 \cdot 10^{-18}$ g Fe (Angaben des Herstellers), somit besteht ein N70-Partikel aus ca. 10 mit Dextran umhüllten Partikeln. Mit einem mittleren Kristallradius von 5 nm können von den 10 Kristallen jeweils drei in jeder Raumrichtung und zwei diagonal angeordnet sein. Bei einem Partikeldurchmesser von 70 nm bedeutet dies, mit der Annahme, dass die Kristalle homogen verteilt sind, einen Abstand von Kristalloberfläche zu Kristalloberfläche von ca. 12,5 nm. Die im Partikel diffundierenden Wasserprotonen ($D = 2,5 \cdot 10^{-9}$ m²/s) benötigen bei einer verwendeten Echozeit $T_E = 10$ ms um eine Distanz von $d = 7$ μ m zurückzulegen (Diffusionsgleichung: $d = \sqrt{2 \cdot D \cdot T_E}$). Die Magnetfeldinhomogenitäten können also ausgemittelt werden, so dass die Annahme gerechtfertigt ist, die Kristalle als separate Partikel zu betrachten.

Die Relaxivitäten wurden nach Gl. 3.27 berechnet und sind in Tabelle B.1. aufgelistet. Für diese Berechnung wurden die Magnetisierung aus Tabelle 5 sowie die mittleren Radien aus Tabelle 2 verwendet. Das Volumen der Kristalle wurde nach $V = 4/3 \cdot \pi \cdot r^3$ und der Proportionalitätsfaktor zwischen Volumenverhältnis und Eisenkonzentration α nach Gl. 3.28 berechnet. Der Eisenoxidgehalt pro Kristall wurde durch Multiplikation des Volumens mit der Dichte von Eisenoxid ermittelt (s. Abschnitt 5.2.1). Der Eisengehalt pro Kristall ergab sich je nach Eisenoxidstufe durch Multiplikation mit 0,699 für Fe₂O₃ bzw. 0,723 für Fe₃O₄. Diese Faktoren resultieren aus dem Verhältnis von Eisen zu Sauerstoff in der jeweiligen Oxidationsstufe (z. B.: $2 \cdot \text{Fe} : 3 \cdot \text{O}$, d.h. $2 \cdot 55,85$ g/mol : $3 \cdot 16$ g/mol = 2,327 g/mol). Bei Fe₂O₃ existiert Fe₂ zu O₃ im Gewichtsverhältnis 1 : 2,327. Das Gewicht ($m_{\text{Fe}_2\text{O}_3}$) eines Fe₂O₃ setzt sich also aus folgenden Teilen zusammen: $x + 2,327 \cdot x = m_{\text{Fe}_2\text{O}_3} = 3,327 \cdot x$. Aus dieser Gleichung folgt für x der Gewichtsanteil des dreifachen Sauerstoffs. Den Gewichtsanteil des zweifachen Eisens erhält man durch Multiplikation mit 2,374. Aus dem Verhältnis von 3,327 zu 2,374, ergibt sich 0,699. Somit kann also das Eisengewicht des Kristalls bestimmt werden. Der Faktor 0,723 für Fe₃O₄-Kristalle ergibt sich analog.

Die berechneten Relaxivitäten geben die gemessenen für die B102- und N50-Partikel gut wieder (Abbildung 31E und C). Die gerechneten Relaxivitäten sind für N20- und N70-Partikel um einen Faktor 2 kleiner als die gemessenen Werte. Allerdings gibt die gerechnete Relaxivität

bei kleinen Eisenkonzentrationen ($< 0,2$ mM Fe) die gemessene Relaxivität der N70-Partikel gut wieder. Abweichungen können dadurch entstehen, dass für die Radien der Kristalle die Mittelwerte genommen wurden. Allerdings würde dies nicht alleine die Diskrepanzen erklären. Es liegt eher die Vermutung nahe, dass sich die Partikel durch Clustering in einem Übergangsregime bzw. schon im SDR befinden und die Formeln des MNR nicht mehr gelten. Ein Teil der Partikel kann durch das MNR und der andere Teil ggf. durch das SDR beschrieben werden, so dass ein Mischzustand entsteht.

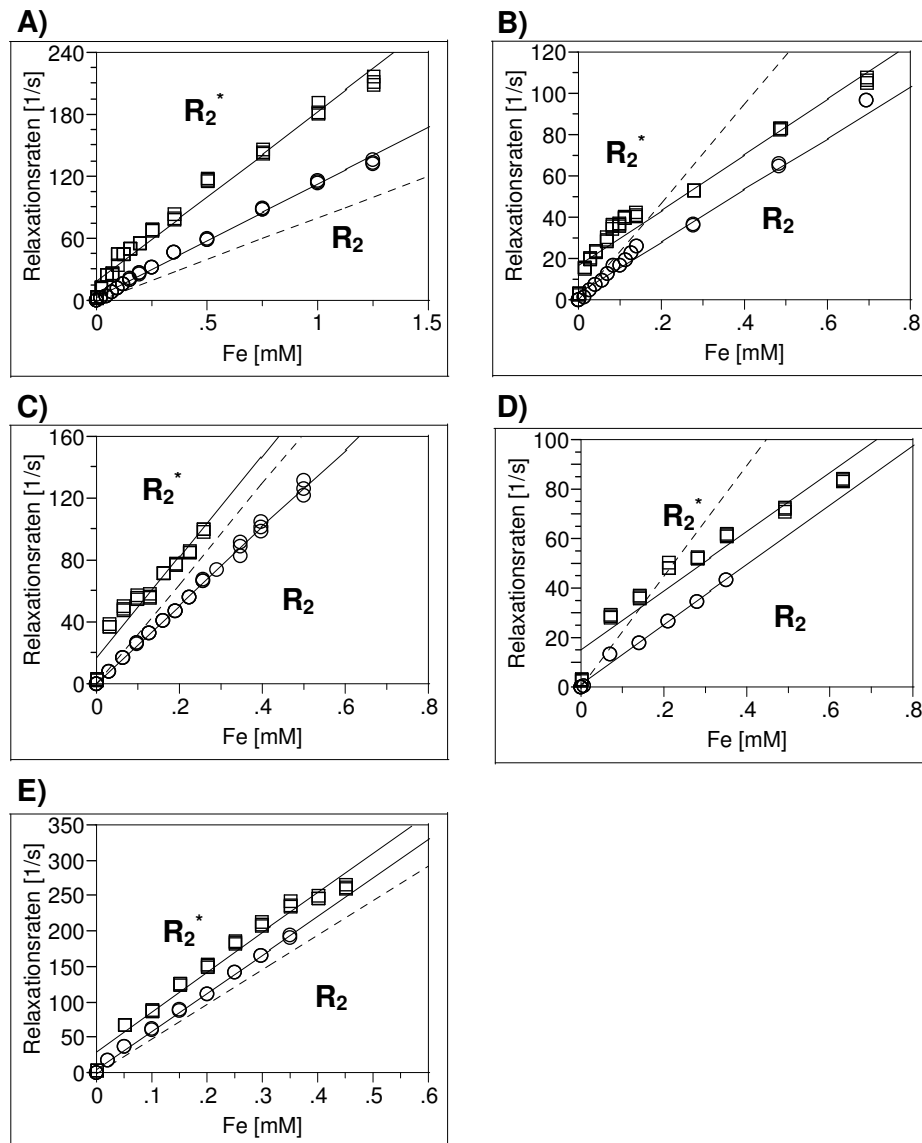


Abbildung 31: Gemessene transversale Relaxationsraten R_2 (O) und R_2^* (□) von Resovist- (A), N70- (B), N50- (C), N20- (D) und B102-Partikeln (E) in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration in Puffer. Die gestrichelte Linie gibt die nach Gl. 3.27 berechnete theoretische transversale Relaxivität an.

In Abbildung 31 sind die transversale Relaxationsrate R_2 und die effektive transversale Relaxationsrate R_2^* in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration in Puffer dargestellt. Die Relaxationsrate R_2 wurde dabei mit einer Spinecho-Sequenz (s. Abschnitt 3.5.2 und 3.6.4), die Relaxationsrate R_2^* hingegen mit einer Gradientenecho-EPI-Sequenz (s. Abschnitt 3.5.4 und 3.6.4) gemessen. Bei der SE-Sequenz trägt durch Refokussierung des suszeptibilitätsbedingten Anteils nur R_2 zur gesamten transversalen Relaxationsrate bei. Dies gilt allerdings nur, wenn der Diffusionskoeffizient D der Wasserprotonen nicht zu hoch ist, in welchem Falle die Bedingungen des SDR gelten würden ($\Delta\omega_r \cdot \tau_D \gg 1$; s. Abschnitt 3.6.2). Durch die GE-Sequenz wird zusätzlich der durch Suszeptibilitäten bedingte Anteil gemessen. Experimentell ergab sich für jedes Eisenoxidpartikel ein Offset zwischen den mit einer GE-Sequenz und den mit einer SE-Sequenz gemessenen Raten. Für den Mittelwert und die Standardabweichung dieser Offsets ergibt sich $21,24 \pm 5,66$ [1/s].

5.2.3 Relaxationseigenschaften von Eisenoxidpartikeln in und an Zellen

5.2.3.1 Experimentelle Ergebnisse bei unspezifischer Aufnahme

Der Einfluss der Eisenoxidpartikel auf die umliegenden Protonen in Zellen unterscheidet sich stark von dem in Wasser. Die Abbildung 32A und B zeigen die longitudinalen Relaxationsraten R_1 in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration im gemessenen Zellpellet (s. Abschnitt 4.6). Die longitudinale Relaxationsrate in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration zeigte für Resovist ein nicht lineares Verhalten (Abbildung 32A). Die Relaxationsrate R_1 von Resovist geht nach einem linearen Anstieg, ab einer Eisenkonzentration von 0,4 mM in ein Plateau über. Die N20-Partikel zeigten keine signifikante Veränderung der Relaxationsraten mit wachsender Eisenkonzentration (vgl. auch Tabelle A.2). Aus Abbildung 32A geht hervor, dass die Messpunkte der B102-Partikel sehr stark streuen ($r^2 = 0,27$). Die Relaxationsraten der N70- und N50-Partikel zeigen eine lineare Abhängigkeit von der Eisenkonzentration in den Zellen. Allerdings wurden nur sehr geringe Konzentrationen in der Zelle aufgenommen (etwa ein Zehntel der Eisenmenge, welche die Zellen durch die N20-, B102- oder Resovist-Partikel aufgenommen haben, vgl. auch Abbildung 18). Für alle Partikel gilt, dass die Änderung der longitudinalen Relaxationsrate R_1 mit steigender Eisenkonzentration der Zellen sehr gering ist (vgl. auch Tabelle A.2). Die Abbildung 32C und D zeigen die transversalen Relaxationsraten R_2 in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration der Zelle. Die Relaxationsrate von Resovist geht auch hier wieder nach einer linearen Abhängigkeit von der Eisenkonzentration ab 0,04 mM in ein Plateau über. In Tabelle A.2 ist der annähernd lineare Bereich (0–0,04 mM Fe) für die Bestimmung der Relaxivität verwendet worden. N20 zeigt hier eine lineare, deutliche Korrelation zwischen R_2 und der Eisenkonzentration der Zellen. Ein ebenfalls lineares Verhalten zeigen die N50-, B102- und N70-Partikel, allerdings in einem niedrigeren Konzentrationsbereich, aber darin mit vier- bis fünffach höheren Relaxivitäten.

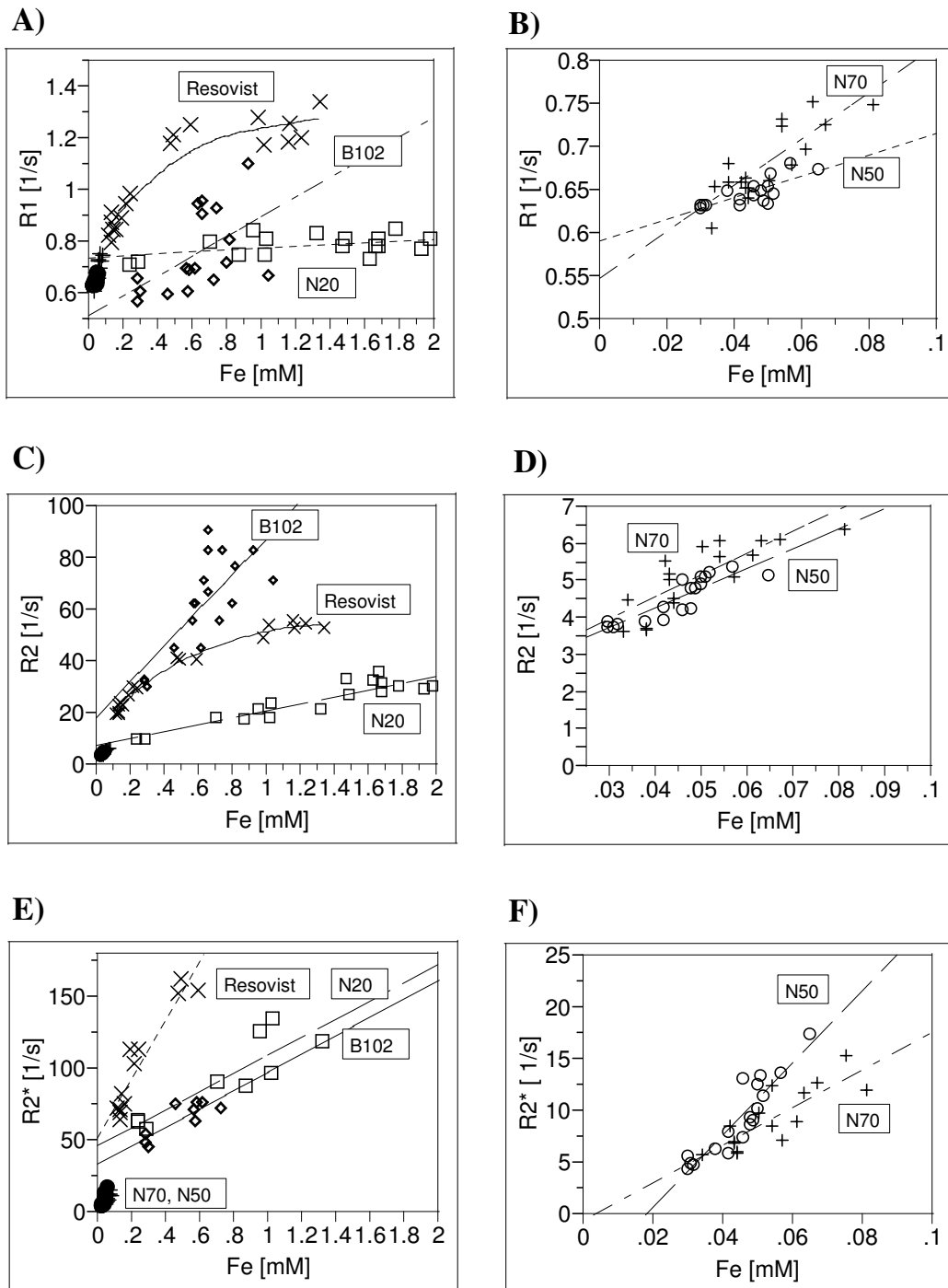


Abbildung 32: Die Relaxationsraten R_1 (A und B), R_2 (C und D) und R_2^* (E und F) von N20- (◻), N50- (○), N70- (+), B102- (◊) und Resovist-Partikel (x) in Abhängigkeit von der durch TRFA ermittelten Eisenkonzentration in U118-Zellen.

In Abbildung 32E und F ist die effektive transversale Relaxationsrate R_2^* in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration in den gemessenen Zellpellets dargestellt. Da die effektiven Relaxationsraten R_2^* bei den verwendeten Phantomen zum Teil sehr hoch sind, konnten einige von ihnen mit dem zur Verfügung stehenden MRT ($T_E > 5$ ms) nicht gemessen werden. Für diese Auswertung wurden folglich für N20- und Resovist-Partikel nur Berechnungen bis zu einer etwas niedrigeren maximalen Konzentration von 1,4 mM bzw. 0,6 mM durchgeführt. Die Relaxationsraten R_2^* von Resovist verbleiben bei Eisenkonzentrationen von 0–0,6 mM noch im annähernd linearen Bereich. Bei den übrigen Partikeln ist ebenfalls eine lineare Abhängigkeit von der Eisenkonzentration festzustellen. Die r_2^* -Relaxivität von N50 ist mit $r_2^* = 348 \pm 40$ 1/(mM·s) am höchsten. r_2^* von Resovist und N70 ist um 52% geringer. B102- und N20-Partikel haben die kleinsten r_2^* -Relaxivitäten. In Tabelle A.2 sind die durch eine lineare Regression ermittelten Relaxivitäten der unterschiedlichen Partikel dargestellt. In Abbildung 33 sind die in den U118-Zellen gemessenen maximalen Eisenkonzentrationen und Relaxationsraten R_1 , R_2 und R_2^* der N50-, N70-, Resovist-, B102- und N20-Partikel aus Abbildung 32 dargestellt. Bei allen Partikeln sind die R_2^* -Raten höher als die R_2 -Raten, außer bei den B102-Partikeln wo sie gleich sind. Mit den N20-, Resovist und B102-Partikeln wurden ähnlich hohe R_2^* -Raten gemessen, obwohl die Eisenkonzentrationen von Resovist mit 0,238 mM wesentlich kleiner als die Eisenkonzentration von den N20- (1,318 mM) und B102-Partikeln (0,729 mM) sind (vgl. Tabelle A.5).

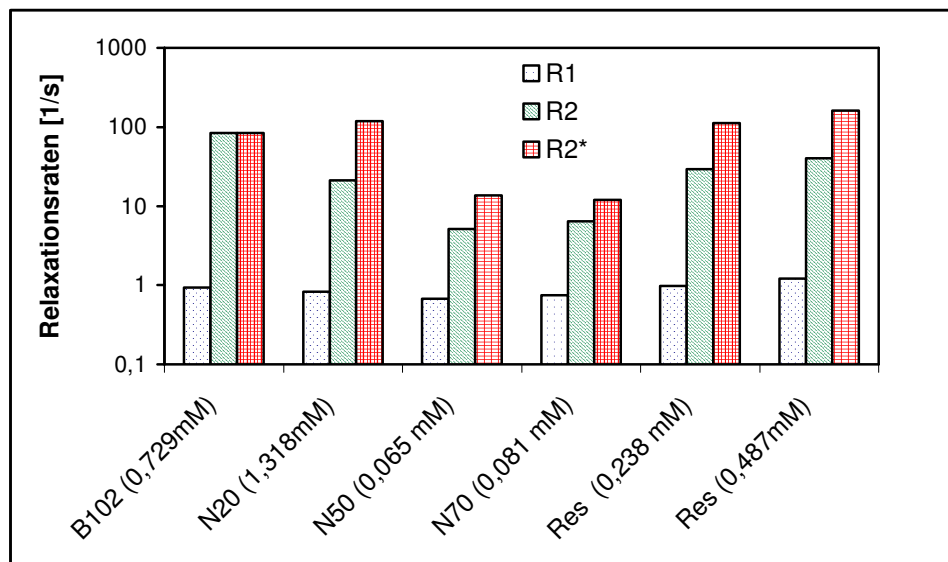


Abbildung 33: Darstellung der in U118-Zellen gemessenen maximalen Eisenkonzentrationen und Relaxationsraten R_1 , R_2 und R_2^* der N50-, N70-, Resovist-, B102- und N20-Partikeln.

Für die unspezifische Markierung von Zellen ist ebenfalls die Abhängigkeit der Relaxationsraten von der Inkubationskonzentration von Interesse. Abbildung 34 zeigt die Abhängigkeit der Relaxationsraten R_1 , R_2 und R_2^* der N20-, N50-, N70-, B102- und Resovist-Partikel von der

Inkubationskonzentration. Für die N20-Partikel wurden die R_2^* -Raten der 8 und 10 $\mu\text{g Fe/ml}$ aus den gemessenen Eisenkonzentrationen der Proben und der Reaktivität der Partikel in Zellen ($R_2^* = 63,19 \cdot C_{\text{Fe, Probe}}$) berechnet, da in diesen Proben der Eisengehalt so hoch war, dass die R_2^* -Rate nicht gemessen werden konnte. Für eine Inkubationskonzentration von 10 $\mu\text{g Fe/ml}$ wurden nun die Relaxivitäten der Partikel untereinander verglichen. Die Resovist-Partikel zeigen die höchste Relaxationsrate R_1 , wobei diese bei kleinen Inkubationskonzentrationen bis 30 $\mu\text{g Fe/ml}$ ansteigt und bei höheren Konzentrationen konstant bleibt (Abbildung 34A). Dies bedeutet, dass mit diesen Partikeln der größtmögliche T_1 -Effekt im MRT erzielt werden kann. Bei kleinen Konzentrationen (< 15 $\mu\text{g Fe/ml}$) sind die N20-Partikel genauso effektiv. N50- und N70-Partikel zeigen den geringsten Anstieg der R_1 -Werte bei steigenden Inkubationskonzentrationen.

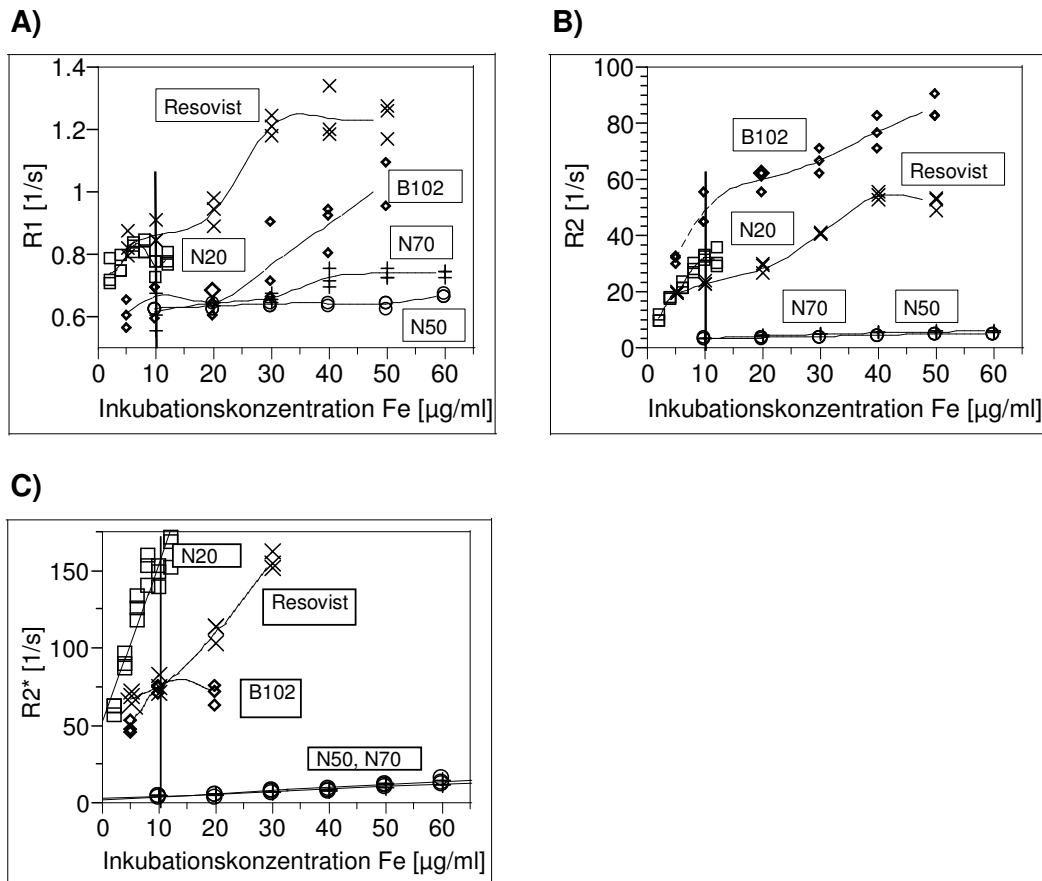


Abbildung 34: Abhängigkeit der Relaxationsraten R_1 (A), R_2 (B) und R_2^* (C) der N20- (\square), N50- (\circ), N70- (+), B102- (\diamond) und Resovist-Partikel (x) internalisiert in U118-Zellen von der Inkubationskonzentration bei einer Inkubationszeit von 1 h. Resovist zeigt die höchsten R_1 -Werte in Abhängigkeit von der Inkubationskonzentration, B102 die höchsten R_2 -Werte und N20 die höchsten R_2^* -Werte. Die vertikale Linie erleichtert den Vergleich der Relaxationsraten der unterschiedlichen Partikel bei einer Inkubationskonzentration von 10 $\mu\text{g Fe/ml}$, auf die im Text näher eingegangen wird.

B102-Partikel zeigen dagegen den höchsten Anstieg der transversalen Relaxationsraten bei steigender Inkubationskonzentration (Abbildung 34B), gefolgt von N20-Partikeln für kleine Inkubationskonzentrationen und Resovist. Die Relaxationsraten R_2 von N70- und N50-Partikeln verändern sich mit steigender Inkubationskonzentration nur sehr wenig, was für die N70- und N50-Partikel mit der schwachen unspezifischen Aufnahme der Partikel in U118-Zellen erklärt werden kann (vergl. Abbildung 34 und Abbildung 18). Die N20-Partikel zeigen die höchsten R_2^* -Änderungen bei steigender Inkubationskonzentrationen (Abbildung 25C). Resovist- (bei 20 $\mu\text{g Fe/ml}$) und B102-Partikel (bei 10 $\mu\text{g Fe/ml}$) zeigen eine halb so hohe Effektivität und N50- und N70-Partikel die geringste. Dies ist wiederum wie bei den R_2 Relaxationsraten dadurch bedingt, dass die Partikel nicht sehr stark unspezifisch aufgenommen werden (Abbildung 18).

Die Linien in Abbildung 34 heben die Relaxationsraten R_1 , R_2 und R_2^* der N20-, N50-, N70-, B102- und Resovist-Partikel in U118-Zellen bei einer Inkubationskonzentration von 10 $\mu\text{g Fe/ml}$ und einer Inkubationszeit von 1 h hervor. Dieser Wert wurde gewählt, da in diesem Bereich Messungen *in vivo* durchgeführt werden sollen. Hier wird deutlich, dass, bedingt durch die hohe über einen weiten Konzentrationsbereich unspezifische Aufnahme der N20-Partikel, diese den höchsten R_2^* -Wert erreichen, obwohl die Relaxivität r_2^* der Partikel in Zellen nicht sehr hoch ist (Tabelle A.2). Die für B102- und Resovist-Partikel erzielbaren Relaxationsraten R_2^* sind mit 75 s^{-1} nur halb so hoch. Obwohl N50 die höchste Relaxivität r_2^* in Zellen zeigte, erreichten die Partikel, bedingt durch die schwache Aufnahme in die Zelle, nur sehr geringe Relaxationsraten. Dies gilt ebenso für die N70-Partikel. Diese Partikel zeigten auch sehr geringe R_2 - und R_1 -Raten. Für B102-Partikel wurden die höchsten transversalen Relaxationsraten erzielt, die ungefähr doppelt so hoch waren wie für Resovist- und N20-Partikel. Die höchsten longitudinalen Relaxationsraten wurden für Resovist- und N20-Partikel gemessen. Allerdings ist bei den R_1 -Raten die Differenz der unterschiedlichen Partikel nicht so groß. Bei einer Inkubationskonzentration von 10 $\mu\text{g Fe/ml}$ variieren die Raten von 0,6 [1/s] (N50- und N70-Partikel) bis 0,8 [1/s] (N20- und Resovist-Partikel).

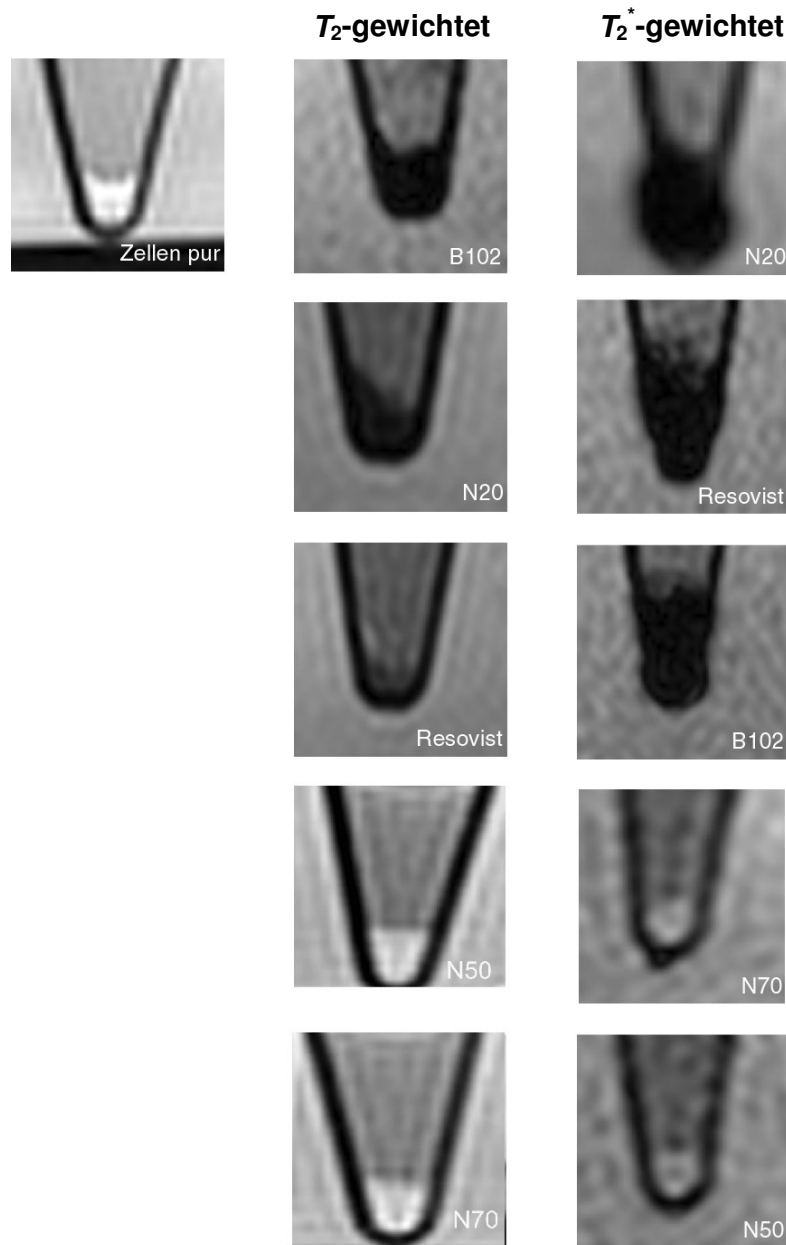


Abbildung 35: MRT-Bilder der unspezifisch in U118-Zellen aufgenommenen ungekoppelten Eisenoxidpartikel. In der Mitte sind T_2 -gewichtete Bilder mit einer Spinecho-Sequenz, rechts sind T_2^* -gewichtete Bilder mit einer Gradientenecho-Sequenz aufgenommen (Abschnitt 4.6). Diese MRT-Bilder geben die Signalreduktion bei einer Inkubationskonzentration von $10\mu\text{g/ml}$ Fe und einer Inkubationszeit von 1 h (vertikale Linie, Abbildung 25) wieder.

In Abbildung 35 sind die MRT-Bilder der Zellproben dargestellt. Die U118-Zellen werden zunächst mit $10\mu\text{l}$ Fe/ml 1 h inkubiert und präpariert. Danach werden T_2 -gewichtete Bilder mit einer SE-Sequenz (6 Mio U118-Zellen, $T_E = 40\text{ ms}$, $T_R = 2000\text{ ms}$, Matrix 256×256 , Rekonstruktion 512×512 , FOV 160, Schichtdicke = 2 mm) und T_2^* -gewichtete Bilder mit einer GE-Sequenz (6 Mio U118-Zellen, FFE, $T_E = 25\text{ ms}$, $T_R = 2000\text{ ms}$, 3 Akquisitionen, Drehwinkel = 27° , Matrix 256×256 , Rekonstruktion 512×512 , FOV 160, Schichtdicke 1,5 mm) aufgenommen (s. Abschnitt 4.6).

5.2.3.2 Experimentelle Ergebnisse bei spezifischer Aufnahme

Für HUVE-Zellen wurde untersucht, ob der in Abbildung 22 aufgezeigte, maximale Unterschied zwischen der spezifischen, Rezeptor-induzierten Aufnahme der N70+anti-VEGFR-1- und -2-Konjugaten und der unspezifischen der ungekoppelten N70-Partikel ausreicht, einen deutlichen Signalunterschied in den Relaxationsraten, messbar mit dem MRT, zu erhalten. Die HUVE-Zellen (5 Mio) wurden wie in Abschnitt 4.5.4 beschrieben mit nicht konjugierten N70-Partikeln sowie N70+anti-VEGFR-1- und -2-Konjugaten mit einer Inkubationskonzentration von 20 $\mu\text{g Fe/ml}$ über verschiedene Zeiträume inkubiert. Anschließend wurden die transversalen Relaxationsraten mittels MRT gemessen.

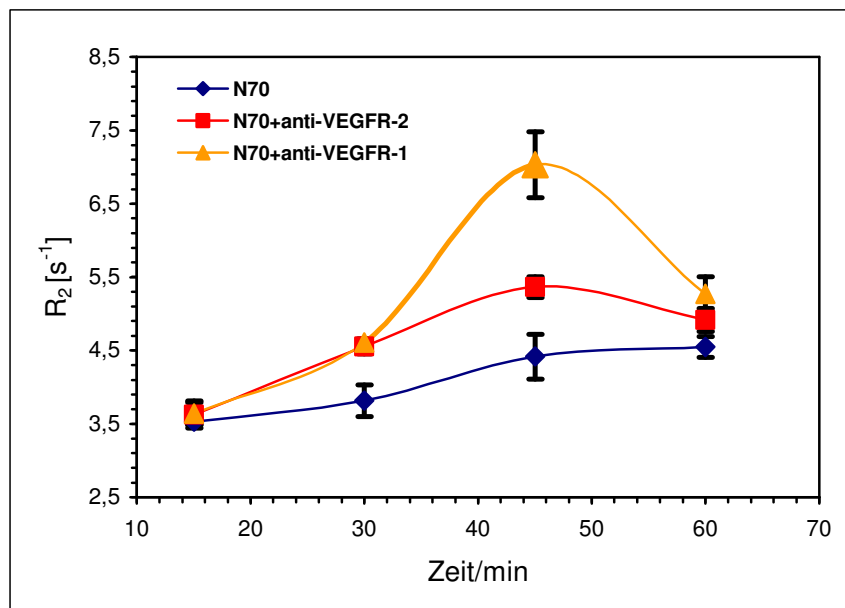


Abbildung 36: Die transversalen Relaxationsraten von HUVE-Zellen inkubiert mit nicht konjugierten N70-Partikeln sowie N70+anti-VEGFR-1- und -2-Konjugaten mit einer Inkubationskonzentration von 20 $\mu\text{g Fe/ml}$ in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Abbildung 36 zeigt, dass der maximale transversale R_2 Relaxationsratenunterschied zwischen der unspezifischen Aufnahme der ungekoppelten N70-Partikel und der rezeptorinduzierten Aufnahme der Konjugate wie bei den Inkubationskinetiken von Abschnitt 5.1.4.1 (vergl. Abbildung 22) ebenfalls bei einer Inkubationszeit von 45 min liegt. Die R_2 -Rate der HUVE-Zellen inkubiert mit dem N70+anti-VEGFR-1-Konjugat ist nahezu doppelt so hoch wie die R_2 -Rate der mit N70-Partikeln inkubierten HUVE-Zellen und signifikant unterschiedlich ($p < 0,015$) zu diesem. Abbildung 37 zeigt die Signalunterschiede bei 45 min Inkubationszeit (s. Abschnitt 4.6, Multi-SE, $T_E = 72$ ms, $T_R = 2$ s). HUVE-Zellen mit N70-Partikeln ohne angekoppelte Antikörper zeigen ein stärkeres Signal als mit N70+anti-VEGFR-1-Konjugat inkubierte HUVE-Zellen. Somit nehmen die HUVE-Zellen spezifisch über den VEGFR-1 eine ausreichend höhere Menge Eisen ($0,067 \pm 0,01$ mM Fe) auf, um das Signal von der

unspezifischen Aufnahme ($0,024 \pm 0,005$ mM Fe) unterscheiden zu können. Für die in Abbildung 37 gezeigten MRT-Bilder bei einer Multi-Spin-Echo-Sequenz ($T_E = 72$ ms, $T_R = 2$ s) unter der Verwendung der C1-Spule (Philips Medical Systems) ergibt sich für das Kontrast-zu-Rauschen-Verhältnis (*CNR*) zwischen nicht markierten und unspezifisch markierten Zellen ein $CNR = 2$. Das Kontrast-zu-Rauschen-Verhältnis ist wie folgt definiert (Stark und Bradley, 1988):

$$CNR = \frac{|S_1 - S_2|}{SD_{Rauschen}}, \quad (5.1)$$

wobei S_1 und S_2 die unterschiedlichen Signale sind. SD_{Rausch} gibt die Standardabweichung des Rauschens an. Hiernach ergibt sich zwischen spezifisch mit N70+anti-VEGFR-1 markierten und nicht markierten Zellen ein $CNR = 16,3$. Zwischen unspezifisch markierten und spezifisch markierten Zellen gilt $CNR = 13,3$. Das Rose-Kriterium besagt, dass ein $CNR \sim 5$ vom menschlichen Auge noch unterschieden werden kann (Burgess, 1999).

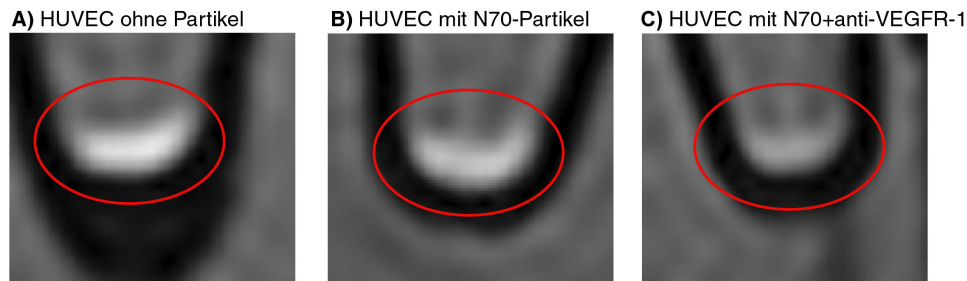


Abbildung 37: T_2 -gewichtete MR-Bilder (Multi-SE, $T_E = 72$ ms, $T_R = 2$ s) von 5 Mio HUVEC-Zellen (A) in Eppendorf-Caps inkubiert mit ungekoppelten N70-Partikeln (B) und N70+anti-VEGFR-1-Konjugat (C) (45 min, 20 μ g Fe/ml).

5.2.3.3 Einfluss des Zelltyps

In Tabelle A.2 sind die Relaxivitäten von N70-Partikeln in U118-Zellen dargestellt. Es sollte die Frage untersucht werden, ob der Zelltyp die Relaxivität der Partikel beeinflusst. Hierfür wurden die Relaxationsraten in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration in HUVE- und U118-Zellen gemessen (s. 4.5.4). Es wurden sowohl ungekoppelte N70-Partikel als auch das N70+anti-VEGFR-1 und -2 Konjugat für die Inkubation der HUVE-Zellen genutzt. Die U118-Zellen wurden nur mit ungekoppelten N70-Partikeln inkubiert (Abschnitt 4.5.2). Abbildung 38A und B zeigen die transversalen und longitudinalen Relaxationsraten der HUVE- und U118-Zellen. Die Auswertung für die gepoolten Zelldaten ergibt für eine lineare Regression: $r_1 = 3,49 \pm 0,63$ ($r^2 = 0,58$, $p < 0,0001$) und $r_2 = 58,90 \pm 5,27$ ($r^2 = 0,76$, $p < 0,0001$). Die Relaxivitäten der N70-Partikel in U118- und HUVE-Zellen variieren nicht signifikant ($r_1 : p = 0,87$, $r_2 : p = 0,3$). Auch sind die Achsenabschnitte bei der transversalen Relaxationsrate zwischen HUVE- und

U118-Zellen nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,08$). Durch die longitudinalen Relaxationsraten der HUVE-Zellen wurden zwei lineare Regressionen durchgeführt (Abbildung 38A). Gerade A gibt eine lineare Regression durch die Punkte bis 0,025 mM Fe, Gerade B eine lineare Regression der Messpunkte ab 0,025 mM Fe wieder. Die longitudinalen Relaxivitäten der N70-Partikel in U118- und HUVE-Zellen ab 0,025 mM variieren nicht signifikant ($p = 0,3$). Die longitudinalen Relaxivitäten der N70-Partikel in U118- und HUVE-Zellen bis 0,025 mM sind signifikant unterschiedlich ($p = 0,0036$). Die Achsenabschnitte sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,0001$).

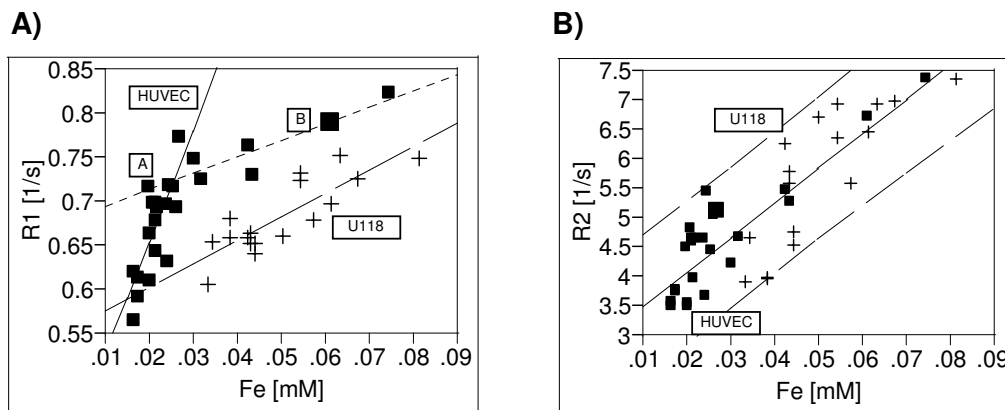


Abbildung 38: Relaxationsraten R_1 (A) und R_2 (B) in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration in HUVE- () und U118-Zellen (+).

5.2.3.4 Signalverhalten angelagerter versus internalisierter Partikel

Da in den vorhergehenden Experimenten eine große Diskrepanz zwischen den Relaxationsraten von N70-Partikeln in Puffer im Vergleich zu von Zellen internalisierten festgestellt wurde, wobei ebenfalls beobachtet wurde (s. Abschnitt 5.1.4.1), dass ein Teil der Partikel an der Zellmembran angelagert bleibt, ergab sich die Frage, ob N70-Partikel, die an die Zellmembran angelagert sind, eine andere Relaxationsrate ergeben als N70-Partikel, die in einer Zelle internalisiert und kompartimentalisiert sind. Um dies zu untersuchen, wurden die U118-Zellen gemäß der in Abschnitt 4.5.5 beschriebenen Prozedur präpariert. Die Messung erfolgt bei 4°C, um die Internalisierung durch Endozytose zu verhindern. Abbildung 39 zeigt die gemessenen R_2 -Raten für N70-Partikel angelagert an die Zellmembran und internalisiert in die Zellen. An der Zellmembran ist die transversale Relaxationsrate doppelt so groß wie in der Zelle. Diese Relaxationsraten lassen sich nicht direkt mit den in vorhergehenden Experimenten gemessenen R_2 -Raten vergleichen, da die Messungen bei 4°C durchgeführt wurden. Geringe Temperaturen beeinflussen die Diffusion der Wasserprotonen und diese wiederum die R_2 -Raten (s. Abschnitt 3.4).

Ebenfalls stellt sich die Frage, ob ein N70-Konjugat angelagert an die Rezeptoren der Zellmembran eine andere Relaxationszeit ergibt als internalisiert und kompartimentalisiert in einer Zelle. Hierfür werden HUVE-Zellen einmal durch Abkratzen und einmal mittels Trypsin von der Zellkulturflasche gelöst (s. Abschnitt 4.5.6). Trypsin spaltet Peptidbindungen nach Lysin und Arginin, so dass durch die Inkubation mit diesem die Oberflächenrezeptoren der Zelle zerstört werden (Alberts et al., 1995). Durch das Abkratzen der Zellen bleiben die Oberflächenrezeptoren erhalten. Der tryptische Verdau der Rezeptoren verhindert die spezifische Anlagerung der Konjugate an die Zellmembran. Dies bedeutet, dass bei der Verwendung von Trypsin die Konjugate sich nicht an die Rezeptoren binden können. Eisenoxid befindet sich also nur in der Zelle oder unspezifisch angelagert an die Membran. Bei den abgekratzten Zellen können sich die Konjugate auch noch an die Rezeptoren außen anlagern. Abbildung 40A zeigt die Abhängigkeit der transversalen Relaxationsrate der abgekratzten Zellen von der Eisenkonzentration, wobei zwischen N70 und den Konjugaten N70+anti-VEGFR-1 und -2 unterschieden wird. In Abbildung 40B ist die Abhängigkeit der transversalen Relaxationsrate der trypsinierten Zellen von der Eisenkonzentration dargestellt.

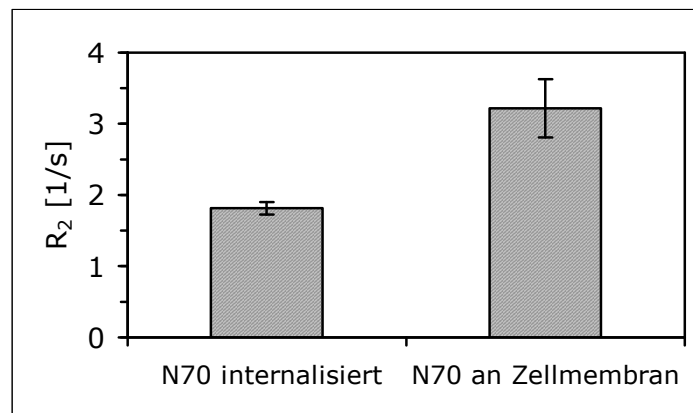


Abbildung 39: Mittelwert der R_2 -Raten jeweils dreier Proben mit N70-Partikeln angelagert an die Zellmembran und internalisiert in die Zelle. An der Zellmembran ist die transversale Relaxationszeit doppelt so hoch wie in der Zelle. Als Fehler ist die Standardabweichung dargestellt.

Tabelle 8 gibt die durch lineare Regression gewonnenen Relaxivitäten von N70, N70+anti-VEGFR-1- und -2-Konjugaten für abgekratzte und trypsinierte Zellen wieder. Für die Auswertung ist es irrelevant, ob das Konjugat an den VEGFR-1 oder -2 gebunden hat, so dass die Messungen zusammengefasst werden können. Die transversalen Relaxivitäten der unspezifisch in die HUVE-Zellen aufgenommenen N70-Partikel sind für abgekratzte und trypsinierte Zellen nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,676$). Für die spezifisch aufgenommenen Konjugate existiert sehr wohl ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0087$) zwischen den transversalen Relaxivitäten der abgekratzten und trypsinierten Zellen. Für abgekratzte Zellen gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen unspezifisch aufgenommenen N70-Partikeln

und spezifisch aufgenommenen Konjugaten ($p = 0,77$). Dagegen existiert eine Tendenz der Separation zwischen unspezifisch aufgenommenen N70-Partikeln und spezifisch aufgenommenen Konjugaten für trypsinierte Zellen ($p = 0,099$). Die transversale Relaxivität r_2 ist für spezifisch aufgenommene Konjugate in trypsinierten Zellen geringer als für abgekratzte Zellen an denen noch die Oberflächenrezeptoren vorhanden sind. Bedingt durch die Zugabe des Trypsins sind die Relaxationsraten bei nicht vorhandenem Eisen etwas höher als bei abgekratzten Zellen. Dies hat aber keinen Einfluss auf die Relaxivitäten.

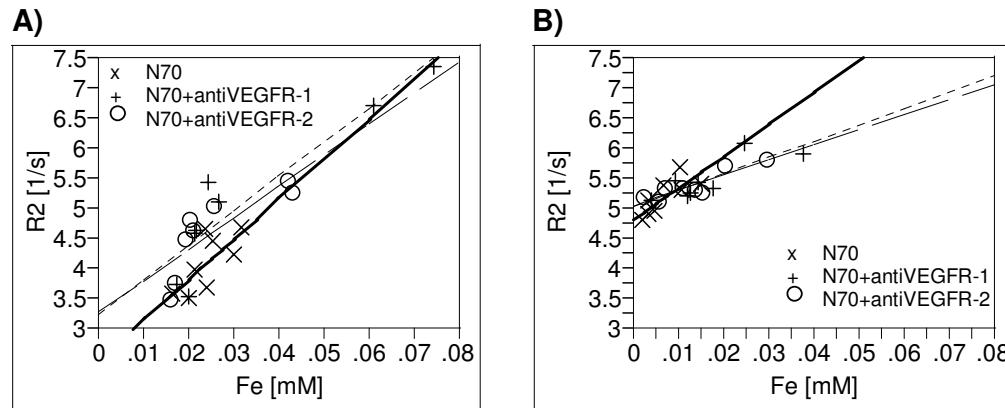


Abbildung 40: Abhängigkeit der transversalen Relaxationsrate der abgekratzten Zellen (A) und der trypsinierten Zellen (B) von ihrer Eisenkonzentration. Die Zellen wurden zuvor mit N70 (durchgehende Linie) und N70+anti-VEGFR-1- (fein gestrichelt) und -2-Konjugaten (grob gestrichelt) inkubiert.

Tabelle 8: Transversale Relaxivitäten von N70, N70+anti-VEGFR-1- und -2-Konjugaten in HUVE-Zellen, welche zuvor mit Trypsin abgelöst oder abgekratzt wurden. Die eckigen Klammern geben die Signifikanzen bzw. Tendenz an (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,1$; +: $p > 0,01$).

Partikel	Angelagert & Internalisiert		Angelagert	
N70	$r_2 = 66,65 \pm 26,34$ $p = 0,045, r^2 = 0,51$	+ +	$r_2 = 52,88 \pm 16,69$ $p = 0,02, r^2 = 0,63$	+ **
N70+anti-VEGFR-1	$r_2 = 52,12 \pm 14,82$ $p = 0,012, r^2 = 0,67$		$r_2 = 25,23 \pm 5,22$ $p = 0,003, r^2 = 0,79$	
N70+anti-VEGFR-2	$r_2 = 57,16 \pm 9,58$ $p = 0,001, r^2 = 0,86$		$r_2 = 27,17 \pm 7,11$ $p = 0,013, r^2 = 0,67$	
N70+Antikörper	$r_2 = 56,84 \pm 6,98$ $p < 0,0001, r^2 = 0,83$		$r_2 = 26,52 \pm 4,39$ $p < 0,0001, r^2 = 0,72$	
		*		

5.2.3.5 Theoretische Erklärung

In den theoretischen Berechnungen wird von der Annahme ausgegangen, dass für Eisenoxidpartikel internalisiert in Zellen die Formeln des SDR gelten. Diese Annahmen werden durch folgende Faktoren gestützt: Zum einen gilt laut Theorie für das SDR, dass die mit einer SE- und GE-Sequenz gemessenen transversalen Relaxationsraten unterschiedlich sind, und zum anderen, dass die mit einer SE-Sequenz, nicht aber mit einer GE-Sequenz gemessenen transversalen Relaxationsraten von der verwendeten Echozeit T_E abhängig sind.

Um die Abhängigkeit der Relaxationsrate von T_E zu überprüfen, wurde mit HUVE-Zellen ohne und mit internalisierten N70-Partikeln (0,02 und 0,235 mM Fe) die R_2 -Relaxationsraten bei T_E -Werten von 10, 15, 25 und 40 ms gemessen (Abbildung 41). Es ergaben sich signifikante Anstiege der Relaxationsrate ($p < 0,05$) der 0,235 mM Probe bei $T_E = 25$ ms und der 0,02 mM Probe bei $T_E = 40$ ms. Auch zeigten die $R_{2,SE}$ -Raten der 0,235 mM Probe eine quadratische Abhängigkeit von T_E ($R_2^2 = 0,12 \cdot T_E + 2,14$, $r^2 = 0,85$). Damit wird die obige Annahme bestätigt, dass für in hohen Eisenkonzentrationen in Zellen internalisierte N70-Partikel das SDR angenommen werden kann. N70-Partikel, die in geringen Eisenkonzentrationen in Zellen internalisiert sind, befinden sich dabei in einem Zwischenzustand, in dem entweder die MNR-Theorie oder ein Übergangszustand zwischen MNR und SDR das Relaxationsverhalten bestimmt.

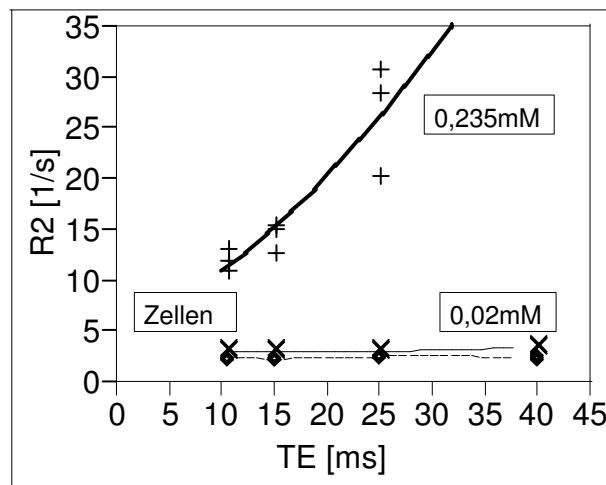


Abbildung 41: Variation von der Echozeit bei einem Multi-Spin-Echo Experiment. Es sind die transversalen Relaxationsraten von HUVE-Zellen und N70-Partikel internalisiert in HUVE-Zellen dargestellt.

Die Anwendung der Formeln des SDR auf die Messungen der transversalen Relaxationsraten in Abhängigkeit von den Eisenkonzentrationen erweist sich als sehr schwierig, da nicht bekannt ist, wie die Partikel in den Zellen clustern und sich resultierend hieraus der Radius und die

Magnetisierung ändern. Somit ist es nicht möglich, das Volumenverhältnis der Partikel zu ihrer Umgebung zu ermitteln. Man müsste also bei der Anwendung der theoretischen Formeln eine Vielzahl von Annahmen machen, welche den Umfang dieser Arbeit übersteigen würde. Daher wird hierauf im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

5.2.4 Vergleich der Relaxationseigenschaften von Eisenoxidpartikeln in Zellen und in Puffer

5.2.4.1 Experimentelle Ergebnisse für unspezifische Aufnahme und Puffer

Abbildung 42 zeigt die unterschiedlichen Relaxivitäten r_1 , r_2 und r_2^* für B102-, N20-, N50-, N70- und Resovist-Partikel in Puffer und in U118-Zellen. Die Auswertung erfolgte für Zellen und Puffer im jeweils gleichen Konzentrationsbereich. Die Relaxivitäten von N70, N50 und Resovist, variieren deshalb. Für die B102-Partikel sind die Relaxivitäten r_1 , r_2 und r_2^* in Zellen signifikant geringer als in Puffer. Sowohl r_2 als auch r_2^* sind in Wasser und Puffer nicht signifikant unterschiedlich, so dass $r_2 \approx r_2^*$. N20-Partikel haben ebenfalls signifikant höhere Relaxivitäten in Puffer als in Zellen. r_2 und r_2^* sind für N70-Partikel in Puffer gleich. In Zellen jedoch ist für N20-Partikel r_2^* 4,4fach höher als r_2 . N50, N70 und Resovist zeigen ein ähnliches Verhalten. In Zellen ist r_2^* 6,5fach, 3,4fach bzw. 2,3fach höher als r_2 . r_2^* ist in Zellen und Puffer für Resovist nicht signifikant ($p = 0,36$) unterschiedlich (Tabelle A.3 und A.4).

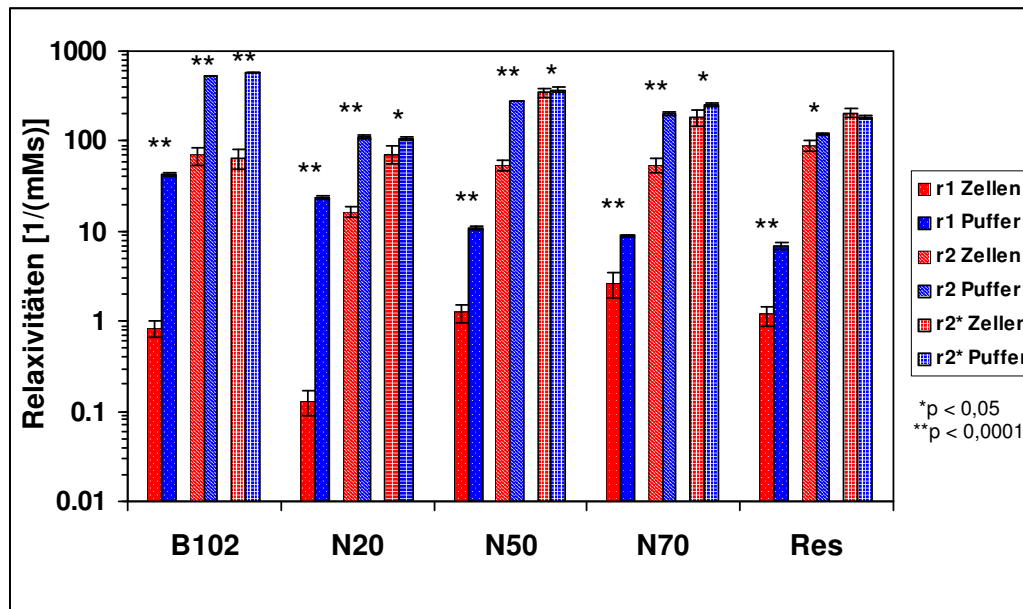


Abbildung 42: Die unterschiedlichen Relaxivitäten r_1 , r_2 und r_2^* sind für B102, N20, N50, N70 und Resovist in Puffer und in U118-Zellen einander gegenübergestellt. Die Auswertebereiche wurden so gewählt, dass das Konzentrationsniveau sowohl in Puffer als auch in Zellen erreicht werden konnte. Sie sind für B102- und N20-Partikel 0–1,0 mM Fe, für N50- und N70-Partikel 0–0,08 mM Fe und für Resovist-Partikel 0–0,25 mM Fe für r_1 und r_2 bzw. 0–0,6 mM Fe für r_2^* . Die Fehlerbalken geben den durch die lineare Regression ermittelten Standardfehler der Relaxivität an.

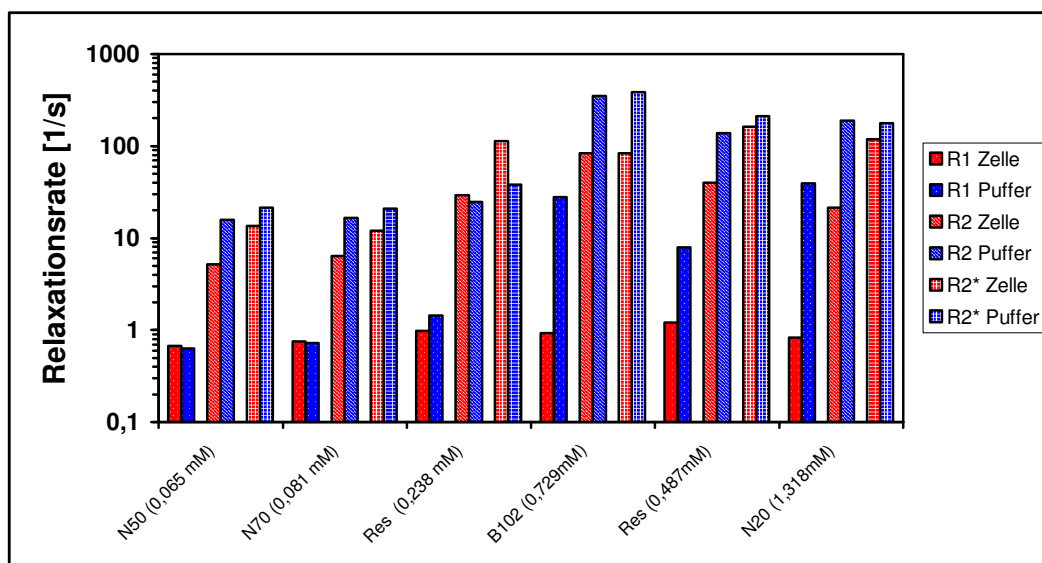


Abbildung 43: Maximal erzielbare bzw. messbare Relaxationsraten R_1 , R_2 und R_2^* der Eisenoxidpartikel N50, N70, Resovist, B102 und N20 in Zellen und berechnet für die gleiche Eisenkonzentration in Puffer (vgl. Tabelle A.5).

Abbildung 43 zeigt die maximal erzielbaren bzw. messbaren Relaxationsraten R_1 , R_2 und R_2^* der Eisenoxidpartikel N50, N70, Resovist, B102 und N20 in Zellen. Für die erzielten Eisenkonzentrationen wurden mit den Relaxivitäten der Partikel in Puffer (Tabelle A.1) die Relaxationsraten berechnet. Die Daten sind in Tabelle A.5 zusammengestellt. Für die Resovist-Partikel wurden zwei Eisenkonzentrationen verwendet, da Resovist ab einer Konzentration von ca. 0,4 mM in eine Sättigung übergeht. Es wurde also zum einen die maximal erzielbare Relaxationsrate des linearen Bereichs (0,238 mM Fe) und zum anderen die für den Sättigungsbereich (0,487 mM Fe) dargestellt. Es zeigt sich, dass mit den N20-Partikeln die höchste Eisenkonzentration (1,318 mM Fe) in U118-Zellen erreicht werden konnte. Die geringste maximale Eisenkonzentration wurde durch N50-Partikel (0,065mM Fe) erreicht. Im Allgemeinen sind die Relaxationsraten R_1 , R_2 und R_2^* bei gleicher Eisenkonzentration der Eisenoxidpartikel in Puffer höher als in Zellen. Eine Ausnahme besteht für N50- und N70-Partikel die eine geringfügig höhere (Differenz von 0,055 bzw. 0,03 [1/s]) longitudinale Relaxationsrate R_1 in Zellen aufweisen als in Puffer, und den Resovist-Partikeln, die für eine Eisenkonzentration von 0,238 mM Fe eine um den Faktor 1,2 höhere R_2 -Rate und eine um den Faktor 3 höhere R_2^* -Rate in den Zellen als in Puffer aufweisen. Allerdings ist darauf hinzuweisen, dass diesen Verhalten der Resovist-Partikel bei einer Eisenkonzentration von 0,487 mM nicht mehr aufgetreten ist.

5.2.4.2 Experimentelle Ergebnisse für spezifische Aufnahme und Puffer

Abbildung 44 zeigt die durch die spezifische Aufnahme der N70+anti-VEGFR-Konjugate und unspezifischen Aufnahme der N70-Partikel bei einer Inkubationskonzentration von 20 μg Fe/ml und –zeit von 45 min erzielte Eisenkonzentration in HUVE- Zellen sowie die gemessenen

Relaxationsraten R_1 und R_2 . Es sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus zwei Messungen dargestellt (vgl. Tabelle A.6). Zu den ermittelten Eisenkonzentrationen (Daten aus Abbildung 36) wurden die Relaxationsraten in Puffer mit der Relaxivität der N70-Partikel (s. Tabelle A.1) berechnet. Generell sind die Relaxationsraten bei gleicher Eisenkonzentration in Puffer höher als in HUVE-Zellen. Eine Ausnahme bildet die longitudinale Relaxationsrate R_1 des spezifisch über den VEGFR-2 aufgenommenen Konjugates. Die R_1 -Rate ist hier in der Zelle um das 1,3fache höher als suspendiert in Puffer.

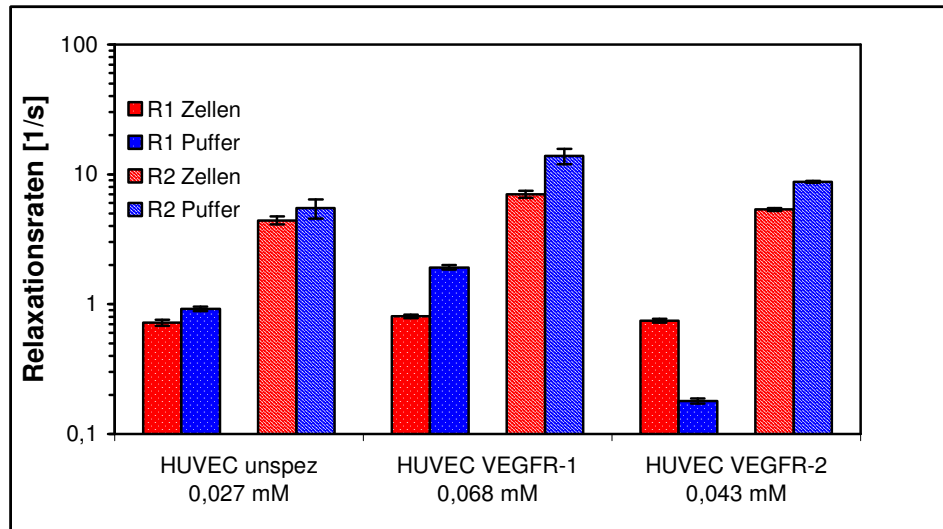


Abbildung 44: Relaxationsraten der bei einer Inkubationskonzentration von 20 $\mu\text{g Fe/ml}$ und einer Inkubationszeit von 45 min durch N70-Partikel und N70-Konjugaten erreichbaren Eisenoxidkonzentration (s. auch Abbildung 36). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung aus zwei Messungen.

5.2.4.3 Theoretische Erklärung

Durch die theoretischen Berechnungen der Relaxivitäten der Eisenoxidpartikel N20, N50, N70, B102 und Resovist in Puffer wurde ermittelt, dass hierfür die Theorie des MNR gilt. Das Produkt aus der charakteristischen Diffusionszeit τ_D und der Frequenzverschiebung an der Partikeloberfläche $\Delta\omega_r$ ist nur ein Zehntel kleiner als Eins (vgl. Tabelle B.1). Mit der Annahme, dass für kleinere Eisenoxidpartikelkonzentrationen in der Zelle die Partikel noch nicht clustern und somit der Parameter $\Delta\omega_r$ und das Volumenverhältnis v gleich sind. Mit der weiteren Annahme, dass nur τ_D in der Zelle größer ist als in Puffer, bedingt durch die geringere Diffusion der Wasserprotonen in der Zelle (vergl. Gl. 3.24), ergibt sich, dass in der Zelle die Theorie des SDR gilt. Durch eine Monte-Carlo-Simulation von Gillis et al. (2002) die den Verlauf der effektiven transversalen Relaxationsrate in Abhängigkeit von der charakteristischen Diffusionszeit τ_D (vgl. Abbildung 10) darstellt, kann gezeigt werden, dass beim Übergang zwischen MNR und SDR die R_2 -Rate höher ist als die R_2 -Rate bei einem höheren τ_D im SDR. Hierdurch kann also erklärt werden, dass bei kleinen Eisenkonzentrationen unter der

Bedingung, dass die Partikel noch nicht clustern, die Relaxationsraten in Puffer höher sind als in Zellen. Für größere Eisenkonzentration gilt dies nicht, da sich im SDR durch das Clustern der Eisenoxidpartikel sowohl der Radius als auch die Magnetisierung und das Volumenverhältnis ändert und die Parameter nun nicht mehr miteinander vergleichbar sind.

5.2.5 Sensitivitätsabschätzung für Zellmarkierung mittels Eisenoxidpartikel

5.2.5.1 Markierung in vitro

Die minimal durch die Quantifizierung der Relaxationszeiten detektierbare Eisenkonzentration in Puffer kann durch das Rose-Kriterium Gl. 4.20, die in den Abschnitten 5.2.2 ermittelten Relaxivitäten und deren daraus resultierenden *RMS* abgeschätzt werden. In Tabelle 9 sind die nach Gl. 4.20 für die verschiedenen Relaxivitäten r_1 , r_2 und r_2^* minimal signifikant detektierbaren Eisenkonzentrationen der verschiedenen Eisenoxidpartikel dargestellt.

Die geringste, durch die transversale Relaxationszeit T_2 detektierbare Eisenkonzentration in Puffer wird durch B102-Partikel erreicht. Mit diesen Partikeln kann eine Signaländerung signifikant unterschieden werden, die eine 0,022 mM Eisenkonzentration induziert. Für die effektive transversale Relaxationszeit T_2^* ist dies für eine N50-Partikel-Konzentration von 0,055 mM Eisen gegeben. Auch in Zellen können sehr kleine N50-Partikel-Konzentrationen von 0,027 mM Eisen durch T_2 -Messungen und 0,023 mM durch T_2^* -Messungen detektiert werden.

Tabelle 9: Angegeben sind die minimalen Eisenkonzentrationen in mM, welche eine signifikante Signaländerung nach Gl. 4.20 (R_1 , R_2 und R_2^*) in Puffer und Zellen bewirken.

Partikel	Puffer			Zellen		
	R_1	R_2	R_2^*	R_1	R_2	R_2^*
N20	0,054	0,083	0,117	1,462	0,989	1,020
N50	0,070	0,037	0,055	0,403	0,027	0,023
N70	0,185	0,076	0,101	0,044	0,051	0,048
B102	0,061	0,022	0,079	0,831	0,895	0,576
Resovist	0,215	0,139*	0,213	0,395	0,089*	0,313

* Auswertebereich 0-0,24 mM

5.2.5.2 Markierung in vivo

Wenn nun in einem im Tiermodell aufgenommenen MR-Bild der minimal sichtbare Kontrast zweier Objekte ermittelt werden soll, kann hier ebenfalls das Rose-Kriterium angewandt werden. Für Abschätzungen der minimalen Eisenkonzentration in Tierexperimenten kann die Standardabweichung des Hintergrundrauschens SD_T bei der Bildgebung einer Maus aus einem T_2 -Map mit $SD_T = 5,07$ ms abgeschätzt werden. Für das Tierexperiment wurden die T_2 -Bilder vor (T_{2v}) und nach (T_{2n}) Kontrastmittelgabe miteinander verglichen. Dort wo das Eisenoxidpartikel aufgenommen wurde, wird das Signal und die T_2 -Zeit reduziert. Durch die Fehlerfortpflanzung ergibt sich unter der Annahme, dass die Standardabweichungen des Hintergrundrauschens in beiden Bildern ungefähr gleich und voneinander unabhängig sind, für das Rauschen des Differenzbildes der Wert $\sqrt{2} \cdot SD$. Für den noch visuell detektierbaren Signalunterschied nach dem Rose-Kriterium folgt somit:

$$CNR = \frac{|T_{2v} - T_{2n}|}{SD_T} \geq 5\sqrt{2} \quad (5.2)$$

Da die Relaxationsraten R als die Inversen der Relaxationszeiten T definiert sind, kann für T_2 auch das jeweilige R_2 eingesetzt werden. Aus SD_T kann mit der Fehlerfortpflanzung $SD_R = \left(\frac{SD_T}{T}\right) \cdot R$ zu $SD_R = 3,25$ [1/s] (für T_2 von etwa 39,53 ms, bzw. R_2 von etwa 25,29 1/s) ermittelt werden. Mit der Geradengleichung 4.19 und Gl. 4.21 folgt somit für die minimal visuell detektierbare Eisenkonzentration $C_{min,invivo}$ für Differenz- T_2 -Maps in einem Tierexperiment:

$$C_{min,invivo} = \frac{5\sqrt{2} \cdot SD_R}{r_{Zellen}} \quad (5.3)$$

Hierbei ist r_{Zelle} die *in vitro* bestimmte Relaxivität des jeweiligen Partikels in der Zelle, wobei von der Annahme ausgegangen wird, dass diese *in vivo* unverändert bleibt

Die minimal durch eine T_2 -Map detektierbare Eisenkonzentration in einem Tierexperiment kann durch das Rose-Kriterium und die in dem Abschnitt 5.2.3 ermittelten Relaxivitäten und deren daraus resultierenden *RMS* abgeschätzt werden (vgl. Tabelle 9). Für das Tierexperiment wurden die T_2 -Bilder vor und nach Kontrastmittelgabe miteinander verglichen. Für T_2 kann auch R_2 eingesetzt werden. Somit gilt nach Gl. 5.3 für N70-Partikel in einem Differenzbild ein Detektionslimit von 0,429 mM.

Um visualisierbar zu sein, muss die durch die von den Zellen aufgenommenen Eisenmenge ein MR-Signal generieren, das einen ausreichenden Kontrast gemäß Gl. 5.3 ergibt. Ferner darf

die Anzahl der für die Untersuchung benötigten Rezeptoren nicht die Anzahl der Rezeptoren pro Zelle übersteigen. In der Literatur lassen sich quantitative Analysen der Anzahl der VEGF-Rezeptoren pro Zelle finden. Li et al. (2001) ermittelten durch Markierung von VEGF₁₆₅ mit dem radioaktiven Jod-Isotop ¹²⁵I 518 ± 124 hoch affine Bindungsstellen ($K_D = 26 \pm 6$ pM) und 6100 ± 450 niedrig affine Bindungsstellen ($K_D = 2070 \pm 520$ pM) pro HUVE-Zelle. Das Volumen einer HUVE-Zelle von 1915 ± 60 fl ($1,9 \cdot 10^{-12}$ l) kann durch AFM-Messungen bestimmt werden (Oberleithner et al., 2003). Mit einer Rezeptoranzahl von 6100 ergibt sich somit eine Rezeptordichte von $3,2 \cdot 10^{15}$ Rezeptoren pro Liter. Unter der Annahme, das Endothelzellen in einem Tumor im Verhältnis 1:500 existieren (Denekamp, 1992) ergibt sich somit eine Rezeptordichte von $6,4 \cdot 10^{12}$ Rezeptoren pro l oder 10,4 pmol/l, d.h. 10,7 fmol pro Gramm Tumorgewebe.

Die Messungen mit der TRFA haben eine spezifische Aufnahme von 27,85 ng Fe pro 0,5 Mio HUVE-Zellen, bei einer Inkubationszeit von 45 min und einer Inkubationskonzentration von 20 µg Fe pro ml ergeben. Für diese Zellmenge folgt somit aus dem Volumen der Zellen ($9,5 \cdot 10^{-7}$ l) und der Anzahl der Rezeptoren ($3,05 \cdot 10^9$) eine Rezeptorkonzentration *in vitro* von 5,2 nmol/l. Aus der Inkubationskonzentration von 20 µg Fe pro ml kann mit dem Eisengehalt der N70-Partikel von $2,9 \cdot 10^{-17}$ g Fe pro Partikel (Angaben des Herstellers) eine Partikelkonzentration von 1,68 nmol/l ermittelt werden. Vergleicht man nun die Rezeptorkonzentration mit der Partikelkonzentration, so ergibt sich ein 3facher Partikelüberschuss. Durch die aufgenommene Eisenmenge pro Zelle von $5,57 \cdot 10^{-14}$ g ergibt sich eine spezifische Partikelaufnahme von 1921 Partikeln pro Zelle. Mit 6100 Rezeptoren pro Zelle folgt heraus, dass ca. jeder dritte Rezeptor der HUVE-Zelle für die spezifische Aufnahme genutzt wurde.

Mit diesen Überlegungen können nun die zu erwarteten Kontrastverhältnisse für ein Tierexperiment abgeschätzt werden. Es werden 50 µl mit einer Konzentration von 1 g Fe pro l (0,895 µmol Fe) injiziert. Resovist wird dem Menschen in einer Konzentration von 0,012 mmol pro kg Körpergewicht injiziert. Mit einem Mausgewicht von ca. 20 g wird einer Maus eine Konzentration von 0,044 mmol pro kg Körpergewicht injiziert, also eine 3,8fach höhere Eisenkonzentration. Nach Nunn et al. (1997) gelangen bei Tumoren die kleiner als 5 g sind ca. 2% pro kg Tumor der injizierten Dosis in den Tumor. Dies bedeutet, dass eine Eisenkonzentration von 18 pmol/g sich im Tumor befindet. Vergleicht man dies mit dem von Nunn et al. (1997) angegebenen Detektionslimit von 50 nmol/g, so ist dieser um einen Faktor von 2780 höher. Unter der Annahme, dass die Endothelzellen genauso viel Eisen aufnehmen wie im Zellexperiment (0,0293 g Fe/l), da mit der gleichen Eisenkonzentration inkubiert wird (20 µg Fe/ml), ergibt sich eine Eisenkonzentration von 0,0293 g Fe/l. Unter der weiteren Annahme, das Endothelzellen in einem Tumor im Verhältnis 1:500 existieren folgt eine Eisenkonzentration von 1,05 nmol Fe pro Gramm Tumor (0,001 mmol). Dies ist nur einen Faktor 50 geringer als

das Detektionslimit. Diese Eisenkonzentration ruft eine Relaxationsratenänderung ($\Delta R_{2, N70} = 58,3 \cdot C_{Fe}$, Tabelle A.2) von $\Delta R_{2, N70} = 0,06$ 1/s hervor. Dies ist zu wenig, um es signifikant mit dem MRT zu detektieren. Allerdings sind die Endothelzellen nicht homogen im Tumor verteilt. Die Gefäße, welche die Endothelzellen auskleiden, durchziehen das Tumorgewebe sehr inhomogen, so dass die Eisenkonzentration an einigen Stellen im Tumor wesentlich höher sein kann. Allerdings beruht die Rezeptoranzahl der HUVE-Zellen auf Messungen an Zellkulturen. In vivo kann diese Expression, bedingt durch das angiogenetische Verhalten des Gewebes höher ausfallen. Auch existieren in der Literatur Angaben von 120.000 Rezeptoren pro HUVE-Zellen, welche ebenfalls durch Markierung von VEGF₁₆₅ mit dem radioaktiven Jod-Isotop ¹²⁵I ermittelt wurden (Dougher und Terman, 1999). Dieser Wert scheint jedoch sehr hoch, soll jedoch verdeutlichen, dass die Messergebnisse bei Rezeptor-Quantifizierungs-Methoden stark schwanken können. Dies kann zum einen an unterschiedlichen Medien liegen, welche die Rezeptorexpression beeinflussen. Zum anderen kann auch bei unterschiedlichen Subkulturen die Rezeptoranzahl variieren. Auch würde eine höhere Rezeptoranzahl nicht die aufgenommene Eisenkonzentration verbessern, sondern nur eine höhere Inkubationskonzentration. Allerdings haben die Aufnahmeexperimente gezeigt, dass dann ebenfalls die unspezifische Aufnahme stark zunimmt. Es kann ebenfalls sein, dass über die VEGF-Rezeptoren an HUVE-Zellen im Tumor mehr oder auch weniger als die 2% Inkubationskonzentration pro kg Tumormasse aufgenommen werden.

Mit der Annahme eines Tumors von 1 cm Durchmesser (Radius, $r = 5$ mm) ergibt sich nach $V = \frac{4}{3}\pi \cdot r^3$ ein Volumen von $5,23 \cdot 10^{-7}$ m³. Mit der weiteren Annahme, dass bei der MR-Messung eine Voxelgröße von $0,27 \times 0,27 \times 1,5$ mm³ verwendet wird, ergibt sich eine Voxelanzahl von 4798 Voxeln pro Tumor. Dies wird als Stichprobenumfang N bezeichnet. Mit der Voraussetzung, dass $\alpha = 0,05$ und $\beta = 0,2$ ist kann der maximal darstellbare Effekt für N70-Partikel nach Gl. 4.22 berechnet werden:

$$SD \leq \frac{\sqrt{N} \cdot \Delta R_{2, N70}}{\sqrt{15,68}}. \quad (4.23)$$

Aus einem älteren Tierexperiment ergab sich eine T_2 -Zeit im Tumor (Pankreas-Tumor, THP-1) von $T_2 = 72,85 \pm 33,02$ 1/s, d.h. $R_2 = 35,89 \pm 16,27$ (Mittelwert \pm Standardabweichung). Es kann also eine Relaxationsratendifferenz von $\Delta R_{2, N70} = 0,06$ 1/s mit den obigen Annahmen und Voraussetzungen nicht unterschieden werden. Mit einer Standardabweichung von 16,23 1/s wären ein Stichprobenumfang von $N = 7,07 \cdot 10^4$ Voxel nötig, um eine Relaxationsratenänderung von $\Delta R_{2, N70} = 0,06$ 1/s signifikant unterscheiden zu können.

Es kann ebenfalls ermittelt werden, wie groß die Relaxationsratendifferenz sein muss, um signifikant mit einem T-Test unter den Voraussetzungen von $SD = 16,23$ 1/s und $N = 4798$ Voxel unterscheidbar zu sein. Aus Gl. 4.23 folgt

$$\Delta R_{2,N70} \geq \frac{\sqrt{15,68} \cdot SD}{\sqrt{N}}. \quad (4.24)$$

Es ergibt sich somit $\Delta R_2 = 0,93$ 1/s. Für die N70-Partikel bedeutet dies eine Konzentration von $C_{Fe} = 0,016$ mM ($\Delta R_{2, N70} = 58,3 \cdot C_{Fe}$, Tabelle A.2). Folglich müsste eine 16fach höhere Eisenkonzentration von den Endothelzellen spezifisch aufgenommen werden, als zuvor (0,001 mM Fe) berechnet wurde, um eine R_2 -Ratenänderung unter den obigen Annahmen und Voraussetzungen signifikant unterscheiden zu können.

5.2.6 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt wurde dargestellt, dass sich die Relaxivitäten der N70- und N20-Partikel suspendiert in Puffer durch die Theorie des MNR vorhersagen lassen. Es konnte gezeigt werden, dass für Partikel suspendiert in Puffer die Theorie des MNR und für hohe Eisenkonzentrationen internalisiert in Zellen die Theorie des SDR gültig ist. Die Relaxivitäten der Partikel sind generell suspendiert in Puffer höher als internalisiert in Zellen. Dies wird auch nicht von dem Zellentyp beeinflusst. Allerdings wird die transversale Relaxationszeit stärker reduziert, wenn sich die Eisenoxidpartikel außen an die Zellmembran anlagern, anstatt internalisiert zu werden. Am stärksten unspezifisch werden die N20-Partikel aufgenommen, am schlechtesten die dextranummantelten N70- und N50-Partikel.

HUVE-Zellen inkubiert mit N70-Partikeln und N70+anti-VEGFR-1-Konjugat bei einer Inkubationskonzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ Fe und Inkubationszeit von 45 min zeigen signifikant unterschiedliche transversale Relaxationsraten. Das CNR von unspezifisch markierten Zellen kann durch eine spezifische Markierung um einen Faktor 5,6 noch erhöht werden. Spezifische und unspezifische Markierungen sind bei dem oben beschriebenen Versuchsaufbau gut zu unterscheiden. Abschätzungen für die minimale signifikant detektierbare Eisenkonzentration des Konjugates in einem Tiermodel ergaben nach dem Rose-Kriterium eine Konzentration von 0,429 mM Fe, nach Abschätzungen über die Eisenaufnahme wären nur 0,016 mM Fe vonnöten, um einen Tumor von 1 g signifikant durch einen T-Test unterschieden werden zu können.

6 Diskussion

Im vorherigen Abschnitt wurden die verwendeten unterschiedlichen Eisenoxidpartikel bezüglich ihres Aufbaus, ihrer magnetischen Eigenschaften und ihrer Relaxivitäten in unterschiedlichen Umgebungen (Puffer und Zellen) charakterisiert und mit den theoretischen Überlegungen verglichen. Die Aufnahme dieser Partikel wurde unspezifisch in Abhängigkeit ihrer Konzentration an U118-Zellen untersucht. Hierbei hat sich herausgestellt, dass Partikel ohne Hülle am stärksten unspezifisch aufgenommen werden.

Antikörper der VEGF-Rezeptoren wurden erfolgreich an dextranhüllte Eisenoxidpartikel gebunden. Für diese Kopplung wurden die Parameter für eine maximale Ausbeute von Antikörper pro Partikel ermittelt. Darüber hinaus wurde die spezifische und die rezeptorinduzierte Aufnahme der ungekoppelten Partikel und Konjugate in Abhängigkeit von Inkubationszeit und -konzentration an HUVE-Zellen und U118-Zellen ermittelt und gezeigt, dass die rezeptorinduzierte Aufnahme über den VEGFR-1 bei 20 µg Fe/ml und 45 min höher als die unspezifische Aufnahme ist. Dieser Effekt reicht aus, um diesen Unterschied auch im MRT *in vitro* sichtbar zu machen.

6.1 Charakterisierung der Partikel

Bei der Verwendung eines Kontrastmittels ist es notwendig, seinen Aufbau und seine magnetischen Eigenschaften zu kennen, da diese zum einen stark mit den Relaxationseigenschaften zusammenhängen (Pouliquen et al., 1992) und es zum anderen die Anwendung der Theorie erleichtert.

6.1.1 Aufbau der Partikel

Der Aufbau der verwendeten Eisenoxidpartikel N20, N70, N50, B102 und Resovist wurde mit dem Elektronenmikroskop untersucht, um die vorhandenen Angaben der Hersteller zu überprüfen (s. Abschnitt 4.1.2). Die Partikelverteilung und die einzelnen Eisenkristalle in den Partikeln können visualisiert werden. Das Hüllenmaterial der Partikel ist nicht zu erkennen, allerdings kann von der Konfiguration der Eisenoxidkristalle auf den Aufbau geschlossen werden.

Die N20-Partikel sind sehr homogen verteilt. Dies stützt die Aussage des Herstellers, dass diese Partikel nur aus reinen Eisenoxidkristallen ohne Hülle bestehen. N70-Partikel, bestehend aus N20-Partikeln in einer Dextranmatrix (laut Hersteller, s. Abschnitt 4.1.2), bilden stärkere

Cluster. Die Eisenoxidkristalle sind auch dunkler, was darauf schließen lässt, dass die Kristalle verstärkt übereinander angeordnet sind und dreidimensionale Cluster bilden. Dies gilt ebenso für die N50 Partikel. B102- und Resovist-Partikel bilden sehr große Kristallcluster. Diese Cluster haben einen deutlich größeren Durchmesser als die von den Herstellern angegeben 60 nm für ein Partikel (Lawaczeck et al., 1997). Hieraus kann geschlossen werden, dass die Partikel sehr leicht aneinander anlagern und Konglomerate bilden. Dies kann in Zellkompartimenten von Vorteil sein, da geclusterte Partikel die Relaxationszeiten stärker beeinflussen als frei verteilte (s. Abschnitt 3.6.2).

6.1.2 Magnetische Suszeptibilität der Partikel

Ebenfalls wichtig für die Einschätzung der Partikel als Kontrastmittel sind ihre magnetischen Eigenschaften, da diese wiederum die Relaxationseigenschaften der Partikel beeinflussen (s. Abschnitt 3.6). Es wurde die magnetische Grammsuszeptibilität bezogen auf den Eisengehalt der Partikel in Abhängigkeit vom Magnetfeld (0,4–1,5 T) bei Raumtemperatur (298 K) gemessen. Die spezifische Magnetisierung wurde, bezogen auf den Eisengehalt der Partikel, aus den gemessenen Grammsuszeptibilitäten bei 1,5 T und 298 K berechnet. N20-, N70- und Resovist-Partikel zeigen die gleiche Magnetisierung, was darauf zurückzuführen ist, dass diese Partikel hauptsächlich aus Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) bestehen. Allerdings ist ihre Magnetisierung mit 116 emu/g deutlich höher als der in der Literatur angegebene Wert für das feste Material Maghemit von 60–80 emu/g (Cornell und Schwertmann, 2003). Den gleichen Effekt finden man bei N50-Partikel, die eine Magnetisierung von 134 emu/g zum Literaturwert von festem Magnetit 92-100 emu/g (Cornell und Schwertmann, 2003) aufweisen. Diese Differenzen zu den Literaturwerten von Maghemit und Magnetit liegen darin begründet, dass die vorliegenden Partikel aus Nanokristallen bestehen, welche superparamagnetisch bei Raumtemperatur sind, und deswegen mit festem nicht kristallinem Maghemit und Magnetit nicht verglichen werden können. Bulte et al. (2001) gehen für Maghemit und Magnetit in Kristallen von einer Magnetisierung von 108,7 bzw. 127,1 emu/g aus. Diese Werte sind nur etwas geringer als die gemessenen Werte. Die Suszeptibilität von Nanokristallen (in der Größenordnung von Weiss'schen Bezirken) ist höher als die von größeren Kristallen (Cornell und Schwertmann, 2003). Die magnetische Suszeptibilität von Resovist bei 0,45 T und Raumtemperatur ($107,61 \pm 1,39$ emu/g) ist vergleichbar mit veröffentlichten Daten (107 emu/g, (Lawaczeck et al., 1997)). Die B102-Partikel bestehen aus einem Gemisch aus Maghemit und Magnetit. Diese Mischung könnte für die extrem hohe Magnetisierung (222 emu/g) verantwortlich sein. Nach (Leslie-Pelecky und Rieke, 1996) können durch bestimmte Kristallstrukturen Anisotropien im Kristall entstehen, welche die Magnetisierung erhöhen können (vgl. Abschnitt 3.6.1.5). Laut Theorie (s. Abschnitt 3.6), ist die effektive Relaxationsrate R_2^* abhängig von der Magnetisierung der Partikel, sowohl im MNR als auch im SDR,, so dass die B102-Partikel bedingt durch ihre

extrem hohe Magnetisierung (222 emu/g) die höchsten transversalen Relaxationsraten im MRT aufweisen müssten.

6.2 Relaxationseigenschaften der Eisenoxidpartikel

Zur Beantwortung der ersten zentralen Fragestellung dieser Arbeit, nach dem Einfluss der verschiedenen Eisenoxidpartikel auf das Signal im MRT, werden hier die Relaxationseigenschaften internalisiert in Zellen und suspendiert in Puffer diskutiert.

6.2.1 Vergleich der Relaxationseigenschaften internalisiert in Zellen und suspendiert in Puffer mit der Theorie

6.2.1.1 Vergleich der transversalen Relaxivitäten r_2^* und r_2 in Puffer

Suspendiert in Puffer entsprechen die gemessenen r_2 -Relaxivitäten der N20-, N50-, N70- und B102-Partikel den r_2^* -Relaxivitäten. Dieses Verhalten wird für das MNR vorhergesagt. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Partikel im Puffer homogen verteilt sind. Durch die schnelle Diffusion der Wasserprotonen werden die kleinen, durch die Eisenoxidpartikel induzierten und folglich durch $\Delta\omega_r$ bedingten, Magnetfeldinhomogenitäten ausgemittelt, so dass effektiv auf die Wasserprotonen keine Magnetfeldinhomogenitäten wirken und $R_{2,Partikel} = R_{2,Partikel}^*$ ist. Für die B102-, N50- und Resovist-Partikel suspendiert in Puffer entsprechen die nach den Formeln des MNR berechneten transversalen Relaxivitäten r_2 innerhalb der Variabilität den gemessenen Werten. Für N20- und N70-Partikel allerdings sind die berechneten r_2 -Relaxivitäten doppelt so hoch wie die gemessenen. Eine mögliche Erklärung wäre, da die Kristalle der N70- und N20-Partikel identisch sein sollen (s. Abschnitt 4.1.2), dass die Kristallgröße und damit der Radius kleiner ist als für die Berechnungen angenommen. Da die Diffusionszeit τ_D vom Radius der Kristalle quadratisch abhängt, bedeutet ein größerer Radius auch eine höhere Relaxivität.

Wie schon in Abschnitt 6.1.2 vermutet erreichen die B102-Partikel suspendiert in Puffer die höchsten r_1 -, r_2 - und r_2^* -Relaxivitäten, was auf die fast doppelt so hohe Magnetisierung im Vergleich zu den anderen Partikeln zurückgeführt werden kann. Die geringsten Magnetisierungen zeigen Resovist- N70- und N20-Partikel, welche ebenfalls die geringsten transversalen Relaxivitäten in Puffer aufweisen. N50-Partikel haben auf Grund ihrer etwas höheren Magnetisierung auch höhere transversalen Relaxivitäten in Puffer.

6.2.1.2 Vergleich der transversalen Relaxivitäten r_2^* und r_2 in Zellen

Internalisiert in Zellen sind die r_2^* -Relaxivitäten der N20-, N50-, N70- und Resovist-Partikel 2–6,5fach höher als die r_2 -Relaxivitäten. Eine mögliche Erklärung ist das Clustern der

Eisenoxidpartikel, welches vermutlich in den Endosomen der Zelle bei steigender Eisenkonzentration stattfindet. Damit steigt ebenfalls die Magnetisierung sowie der Radius dieser Konglomerate an. Die erwähnten Parameter haben im SDR einen großen Einfluss sowohl auf die R_2^* - als auch auf die R_2 -Raten (vgl. Abschnitt 3.6.2). Da die transversale Relaxationsrate von hohen Eisenkonzentrationen internalisiert in Zellen von der Echozeit abhängt, kann erwartet werden, dass hierfür die Formeln des SDR gelten. Für geringe Eisenkonzentrationen internalisiert in Zellen kann jedoch davon ausgegangen werden, dass der Übergangsbereich zwischen MNR und SDR aus Mischzuständen der beiden Regime besteht.

Die transversalen Relaxationsraten R_2 der Resovist-Partikel gehen bei wachsender Eisenkonzentration in eine Sättigung über. Dies scheint allerdings spezifisch nur für Resovist zu gelten, da durch die B102-Partikel mindestens genauso viel Eisen in die Zellen gelangt, die R_2 -Raten sich jedoch linear zur Eisenkonzentration verhalten. Dies kann durch die Annahme erklärt werden, dass die Resovist-Partikel mit steigender Eisenaufnahme in das SDR übergehen, also die R_2 -Raten quadratisch von der Magnetisierung der Kompartimente (Gl. 3.31) abhängen. Zu dieser Annahme passt auch die doppelt so hohe effektive transversale Relaxivität der Partikel. Dieses Verhalten der R_2 -Raten von Resovist wurde schon von Bowen et al. (Bowen et al., 2002) bei Resovist internalisiert in THP-1 Zellen beobachtet. Als Erklärung diente auch hier, dass das Relaxationsverhalten als eine Mischung aus MNR und SDR betrachtet werden kann. Durch die Berlinerblau-Färbung konnte das Eisen der Resovist-Partikel in den U118-Zellen vermutlich in den Endosomen und an der Zellmembran lokalisiert werden. Dies wurde schon für verschiedene Eisenoxidpartikeln an unterschiedlichen Zellen gezeigt (Moore et al., 1997; Bulte et al., 2001; Wilhelm et al., 2002; Billotey et al., 2003). Somit kann davon ausgegangen werden, dass sich die Eisenoxidpartikel in den Endosomen clustern und sich dadurch die Magnetisierung verstärkt. Das Relaxationsverhalten der B102-Partikel rechtfertigt die Annahme, dass sich diese Partikel sowohl suspendiert in Puffer als auch internalisiert in Zellen in einem Übergangsregime zwischen dem NMR und SDR befinden. Für dieses Übergangsregime gilt $R_{2,Partikel} = R_{2,Partikel}^*$, wobei eine lineare Abhängigkeit der transversalen Relaxationsraten mit der Magnetisierung vorliegt (Gl. 3.30). Diese Annahme wird durch die Messungen gestützt, welche nicht signifikant unterschiedliche Werte für $r_2 = r_2^*$ für B102-Partikel internalisiert in Zellen ergeben ($p < 0,0001$).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte für das MNR eine recht gute Übereinstimmung von Theorie und Experiment gezeigt werden. Die theoretischen Aspekte des SDR sind deutlich komplexer, da das Signal von weiteren Aspekten wie der von der Einkonzentration abhängigen Magnetisierung, dem Radius der Konglomerate und dem Volumenverhältnis bestimmt wird. Für zukünftige Experimente und Berechnungen wäre es sehr interessant zu erforschen, wie die verschiedenen Partikel mit wachsender Eisenkonzentration in den Zellen clustern und wie sich

hierdurch ihre Magnetisierung und das Volumenverhältnis ändert. Des Weiteren ist es ebenfalls für die Markierung und Quantifizierung der Eisenaufnahme in Zellen mittels MRT sehr wichtig, ausführlichere Experimente über das Relaxationsverhalten von Eisenoxidpartikel angelagert an die Zellmembran und internalisiert in der Zelle durchzuführen. Aus der Theorie lässt sich ableiten, dass durch Clustern der Eisenoxidpartikel in Zellen im SDR wesentlich höhere R_2^* - als R_2 -Raten erreicht werden können. Für die Auswahl von geeigneten Partikeln sollten die Relaxationsraten und Relaxivitäten in Zellen gemessen werden, da die Suszeptibilität der Partikel nicht ausschließlich die Relaxationseigenschaften eines Partikels bestimmt. Als Beispiel sind hier die B102- und Resovist-Partikel zu nennen. Die Suszeptibilität von Resovist-Partikeln ist nur halb so hoch (116 emu/g) wie die von den B102-Partikeln (222 emu/g) und trotzdem wurden in Zellen höhere R_2^* -Relaxationsraten mit Resovist-Partikeln als mit B102-Partikeln gemessen (s. Abbildung 43).

6.2.1.3 Vergleich der transversalen Relaxivitäten r_2^* und r_2 in Zellen und Puffer

Die gemessenen r_2 -Relaxivitäten sind für B102-, N20-, N50-, N70- und Resovist-Partikel jeweils in den Zellen signifikant geringer als in Wasser. Dieses Verhalten wurde ebenfalls für Magnetodendrimere (Bulte et al., 2001) und bei *in vivo* Untersuchungen (Majumdar et al., 1988) beobachtet. Eine Erklärung bieten die längeren Diffusionszeiten τ_D der Wasserprotonen in Zellen, die durch einen größeren Radius der sich clusternden Partikel und durch eine geringere Diffusion bedingt sind (Thelwall et al., 2002). Für Eisenoxidpartikel geclustert in Zellen erfolgt also ein Übergang in das SDR. Da die Diffusionszeit im SDR sehr lang ist im Verhältnis zum Einflussbereich der Partikel bzw. der Partikelkompartimente, können innerhalb von kurzen Echozeiten die dephasierten Spins wieder rephasiert werden. Es existiert also ein dephasierbarer Anteil R_2' , somit ist $R_{2,Partikel}^* \neq R_{2,Partikel}$. Befinden sich Protonen in unmittelbarer Nähe des Partikels, werden sie durch die dort herrschenden starken lokalen Magnetfeldgradienten dephasiert (Brooks, 2002; Gillis et al., 2002). Bei gleichen Eisenkonzentrationen kann also die Relaxationsrate der Eisenoxidpartikel suspendiert in Puffer wesentlich geringer als internalisiert in Zellen sein (siehe auch Abschnitt 5.2.4.3.). Durch eine Monte-Carlo-Simulation von Gillis et al. (2002) die den Verlauf der effektiven transversalen Relaxationsrate in Abhängigkeit von der charakteristische Diffusionszeit τ_D (vgl. Abbildung 10) darstellt, kann gezeigt werden, dass beim Übergang zwischen MNR und SDR die R_2 -Rate höher ist als die R_2 -Rate bei einem höheren τ_D im SDR. Hierdurch kann also erklärt werden, dass bei kleinen Eisenkonzentrationen unter der Bedingung, dass die Partikel noch nicht clustern, die Relaxationsraten in Puffer höher sind als in Zellen.

In Zellen und Wasser ist die r_2^* -Relaxivität nur für Resovist-Partikel nicht signifikant unterschiedlich. Dies kann wiederum darauf zurückgeführt werden, dass die Resovist-Partikel stark clustern. Kompartimentalisiert in den Zellen, steigt die Magnetisierung mit größer

werdenden Eisenkonzentration an und resultiert in einer wachsenden effektiven transversalen Relaxationsrate R_2^* . Da die r_1 - und r_2 -Relaxivitäten der N70-Partikel in den beiden Zelltypen U118 und HUVEC nicht signifikant unterschiedlich sind (r_1 : $p = 0,87$ und r_2 : $p = 0,36$), kann daraus geschlossen werden, dass die unspezifische Aufnahme und die Kompartimentalisierung in den Endosomen bei allen Zellen gleich ist.

6.2.2 Relaxationseigenschaften von Eisenoxidpartikel intrazellulär und angelagert an die Zellmembran

Der Einfluss der Kopplung an die VEGF-Rezeptoren der Zellmembran im Vergleich zu einer Internalisierung in die Zelle wurde an HUVEC-Zellen genauer untersucht (s. Abbildung 45). In dem ersten Experiment wurden die Oberflächenrezeptoren durch Trypsin zerstört. In einem zweiten Experiment blieben diese durch Abkratzen der Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflasche erhalten (s. Abschnitt 5.2.3.4). Zwischen den gemessenen transversalen Relaxivitäten, verursacht durch die unspezifische Aufnahme von N70-Partikel, der Zellen ohne Oberflächenrezeptoren und mit ergibt sich kein Unterschied ($p = 0,68$). Dies war zu erwarten, da das Trypsin die unspezifische Aufnahme der Partikel in die Zelle nicht beeinflusst. Die r_2 -Relaxivitäten von unspezifisch aufgenommenen N70-Partikeln und der Rezeptor-induzierten Aufnahme des N70-VEGFR-Antikörper-Konjugats zeigten an Zellen mit Oberflächenrezeptoren ebenfalls keinen signifikanten Unterschied.

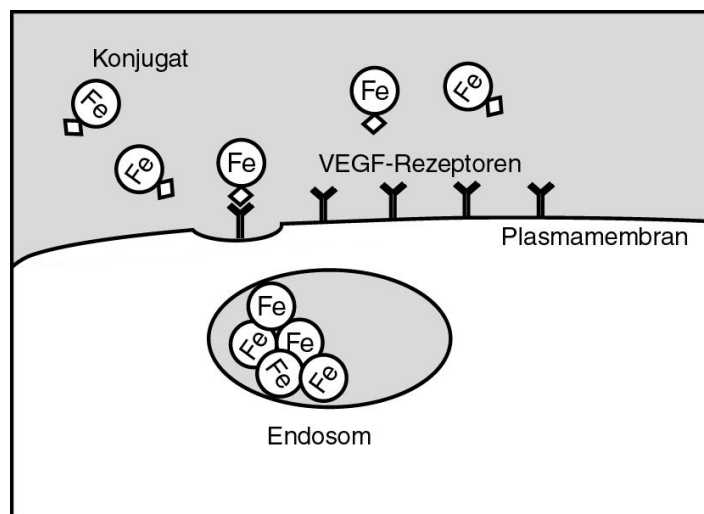


Abbildung 45: Schematische Darstellung der spezifischen Markierung der Zelle. Das N70+anti-VEGFR-Konjugat lagert sich an die VEGF-Rezeptoren der Zellmembran an und wird vermutlich dann internalisiert. Die Eisenoxidpartikel akkumulieren sich zuletzt in der Zelle.

Dies kann durch die schnelle Internalisation der Rezeptor-Antikörper-Eisenkomplexe erklärt werden, so dass sich in der Zelle mehr Eisenoxidpartikel befinden als bei der unspezifischen Aufnahme, an der Zellenmembran selbst aber weniger. Eine Tendenz ($p = 0,099$) zur Unterscheidbarkeit zeigen die r_2 -Relaxivitäten von unspezifisch aufgenommenen N70-Partikeln und

spezifisch aufgenommenen N70-VEGFR-Antikörper-Konjugaten. Durch die Trypsinierung der Zellen sind die Oberflächenrezeptoren zerstört worden. Nur die internalisierten Partikel und ein geringer Anteil unspezifisch angelagerter Partikel tragen zum Signal bei, so dass dieses bei gleicher Eisenmenge geringer wird. Deshalb zeigen auch die r_2 -Relaxivitäten spezifisch aufgenommener N70-VEGFR-Antikörper-Konjugate an Zellen mit Oberflächenrezeptoren gegenüber Zellen ohne Oberflächenrezeptoren einen signifikanten Unterschied ($p = 0,0087$). Mit den Experimenten wurde gezeigt, dass bei gleicher Menge Eisen an die Zellmembran angelagerte Eisenoxidpartikel die transversalen Relaxationszeiten stärker reduzieren, als Eisenoxidpartikel in Zellen internalisierte (Abbildung 39). Dies ist durch die schnelle Diffusion der Wasserprotonen bedingt, durch die die Magnetfeldinhomogenitäten der Eisenoxidpartikel ausgemittelt werden, so dass auf die Wasserprotonen effektiv keine Magnetfeldinhomogenitäten wirken. Der Effekt tritt allerdings nur im MNR und im Übergangsbereich auf, wenn $\Delta\omega_r \cdot \tau_D \leq 1$ (Gillis et al., 2002). Sobald durch die Internalisierung und verstärkte Clusterung der Partikel in den Zellen das SDR erreicht wird, hängt die transversale Relaxationsrate quadratisch von der Echozeit ab.

6.2.3 Eisenoxidpartikel für die molekulare MR-Bildgebung

Es gestaltet sich sehr schwierig, die unterschiedlichen in der Literatur vorkommenden Partikel miteinander zu vergleichen. Zum einen werden die Relaxivitäten der Partikel bei unterschiedlichen Feldstärken (0,5, 1,5 oder 4,7 T) und Temperaturen (20°C oder 37°C) gemessen, zum anderen wird meistens nicht die Umgebung angegeben, in der die Partikel gemessen wurden (Wasser, Blut, etc.). Beispielsweise finden sich für MION-46L-Partikel (Maghemit-Partikel mit einer Dextranhülle) bei 0,5 T und 37°C Relaxivitäten von $r_1 = 16$ [1/mM·s] und $r_2 = 35$ [1/mM·s] (Zimmer et al., 1995). Für andere SPIO-Partikel (Magnetit, Polysaccharid-Hülle) werden die Relaxivitäten in Flüssigkeit bei 0,5 T und 21°C mit $r_1 = 20,31$ [1/mM·s] und $r_2 = 209$ [1/mM·s] angegeben (Ahrens et al., 2003). (Josephson et al., 1999) haben die Relaxivitäten ($r_1 = 22,4$ [1/mM·s] und $r_2 = 74,2$ [1/mM·s]) von Eisenoxidpartikeln (CLIO-HIV-tat-Partikel) internalisiert in Lymphozyten bei 1,5 T gemessen. Die für die N50-, N70-, und Resovist-Partikel ermittelte longitudinale Relaxivität in U118-Zellen sind 8–18fach geringer, allerdings sind die transversalen Relaxivitäten der N50-, N70- und Resovist-Partikel $r_2 = 53,25$ – $89,68$ [1/mM·s] mit den der CLIO-Partikel vergleichbar.

Es stellt sich auch die Frage, welches der in dieser Arbeit untersuchten Partikel die optimalen Eigenschaften für die molekulare MR-Bildgebung aufweist. Die N70- und N50-Partikel zeigen keine hohe unspezifische Aufnahme, so dass die spezifische Aufnahme höher ist. Mit diesen Partikel können allerdings keine hohen transversalen Relaxationsraten erreicht werden, so dass das Signal im MRT nicht sehr stark reduziert wird. Höhere transversale Relaxationsraten

werden durch B102- und Resovist-Partikel erreicht (Abbildung 43). Diese Partikel werden sehr stark unspezifisch aufgenommen. Es kann bei diesen Partikeln somit nicht vorhergesagt werden, ob die spezifische Aufnahme höher sein wird als die unspezifische. Die B102-Partikel zeigen höhere R_2 -Raten als Resovist, dafür zeigen die Resovist-Partikel höhere R_2^* -Raten als die B102-Partikel (Abbildungen 32 und 33). Für den in der molekularen MR-Bildgebung benötigten maximalen Kontrast bei einer möglichst kleinen Konzentration eignen sich die Resovist-Partikel für eine R_2 -gewichtete Bildgebung und die B120-Partikel für eine R_2^* -gewichtete Bildgebung folglich am besten. Es ist allerdings offen, ob sie sich diese Partikel auch zur spezifischen Markierung von Zellen eignen.

Für die Evaluierung von neuen Eisenoxidpartikeln für die molekulare MR-Bildgebung ist es wichtig vorher zu wissen, wie eine Zelle markiert werden soll. Befindet sich das Target an der Zelloberfläche und soll das Eisenoxidpartikel nicht von der Zelle aufgenommen werden, so können bis zu 250 nm große Partikel verwendet werden. Diese Partikel sollten dann als Sphäre mit möglichst viel geclusterten Eisenoxidpartikeln konzipiert sein, so dass das SDR nachgeahmt wird und sich hohe R_2^* -Raten ergeben können. Sollen die Eisenoxidpartikel von der Zelle aufgenommen werden, müssen die Partikel ebenfalls möglichst viel Eisen enthalten aber immer noch so klein <100 nm sein, dass sie problemlos von der Zelle aufgenommen werden. Außerdem sollten die Partikel in der Zellen stark clustern, so dass sich große Konglomerate bilden und bedingt durch das SDR sich wiederum hohe R_2^* -Raten ergeben können.

6.3 Spezifische und unspezifische Aufnahme von Eisenoxidpartikel

6.3.1 Unspezifische Aufnahme

Für die Auswahl des optimalen Kontrastmittels ist es wichtig, die Aufnahmecharakteristik der Eisenoxidpartikel zu kennen. Zur Quantifizierung der von den Zellen aufgenommenen und angelagerten Eisenmenge hat sich die TRFA als erfolgreiche und zuverlässige Methode erwiesen. Es wurde also die Partikelaufnahme in Abhängigkeit der Inkubationskonzentration gemessen. Hierbei zeigte sich, dass die Eisenaufnahme über die N20-Partikel am höchsten war. Dies könnte zum einen an der Größe der Partikel liegen, die mit 20 nm halb so groß wie die der restlichen Partikel ist, oder aber daran, dass diese Partikel kein Hüllmaterial besitzen. Da sich in kleinen Partikeln nicht so viel Eisen befindet wie in großen Partikeln, müssen also mehr kleine Partikel von der Zelle aufgenommen werden. In Zelleexperimenten wurde gezeigt, dass mehr Eisen durch große Partikel (SPIO) in die Zellen gelangt als durch kleine Partikel (USPIO) (Metz et al., 2004). Dieses Verhalten wurde auch für kleine und große Partikel in Mäusen beobachtet (Chouly et al., 1996; Roser et al., 1998; Billotey et al., 2003). Die Aufnahme der Partikel von

Zellen in Zellkultur hängt ebenfalls von der Oberflächenladung der Partikel ab. Roser et al. (1998) zeigten, dass Partikel ohne Oberflächenladung wesentlich geringer von Makrophagen aufgenommen wurden als Partikel mit einer Oberflächenladung. Die stärkste Aufnahme wurden durch Partikel mit einer positiven Ladung erzielt. *In vivo* in Ratten konnte dieser Effekt allerdings nicht beobachtet werden. Nach Bulte et al. (2001) werden nicht umhüllten Partikel bedingt durch entstehende Wechselwirkungen mit der Zellmembran stärker internalisiert als ummantelte Partikel. Nackte Eisenoxidpartikel sind jedoch schädlich für den Organismus, so dass diese Partikel nicht *in vivo* eingesetzt werden dürfen (Taupitz et al., 2003).

B102- und Resovist-Partikel werden ähnlich stark aufgenommen. Da beide ungefähr gleich groß und ähnlich aufgebaut sind (s. Abschnitt 4.1.2), liegt dies vermutlich an den ionischen Hüllen der Partikel. Metz et al (2004) haben gezeigt, dass Partikel mit einer ionischen Hülle (Resovist) unspezifisch von Monozyten am stärksten aufgenommen werden ($50 \cdot 10^{-12}$ g Fe/Zelle). Im Vergleich hierzu haben die U118-Zellen 160fach weniger Resovist-Partikel aufgenommen ($0,3 \cdot 10^{-12}$ g Fe/Zelle, vergl. Abbildung 18). B102-Partikel haben eine Carboxymethyldextran-Hülle, Resovist-Partikel eine Carboxydextran-Hülle (Lawaczeck et al., 1997). Am wenigsten Eisen wird über die beiden mit Dextran ummantelten Partikel N50 und N70 von den U118-Zellen internalisiert. Mit 50 bzw. 70 nm haben sie einen ähnlichen Durchmesser wie Resovist und B102, werden aber wesentlich schwächer (10fach geringer) unspezifisch aufgenommen. Um die unspezifische Aufnahme weiter zu erhöhen, nutzen einige Forschergruppen an Eisenoxidpartikel gekoppelte HIV-Tat-Peptide (Josephson et al., 1999) und erreichen so eine 13fach höhere Internalisierung der Partikel (2500 ng Fe/1 Mio Zellen) verglichen mit der Aufnahme der N20-Partikel in U118-Zellen (190 ng Fe/1 Mio Zellen). Mit dieser Strategie kann also eine noch höhere unspezifische Eisenaufnahme erreicht werden.

Um eine effektive spezifische Markierung der Zelle zu erreichen, ist es wichtig, dass die unspezifische Aufnahme der Zelle möglichst gering ist. Bei einer hohen unspezifischen Markierung der Zelle ist der Unterschied zur spezifischen Markierung nicht mehr so groß. Für N50- und N70-Partikel kann also eine größere Differenz zwischen spezifischer und unspezifischer Aufnahme erreicht werden.

6.3.2 Spezifische Aufnahme über die VEGF-Rezeptoren

Für die spezifische Zellmarkierung mit einem Konjugat ist es wichtig zu wissen, bei welchen Inkubationsparametern die generelle Aufnahme und die Differenz zur unspezifischen Aufnahme am höchsten ist. Dies geschieht durch die Messung der Aufnahme in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und -konzentration.

Die Methode der Kopplung der Antikörper an die dextranummantelten Eisenoxidpartikel durch Aktivierung mit einer Lösung BrCN-Acetonitril hat sich als sehr erfolgreich erwiesen. Mittels Gelchromatographie konnten überschüssige Reagenzien, wie BrCN oder Antikörper, zuverlässig abgetrennt werden. Durch den Dot-Spot-Test und die radioaktive Markierung der Antikörper konnten die Parameter der maximalen Antikörperanzahl pro Eisenoxidpartikel ermittelt werden.

Es wird im Folgenden die dritte Fragestellung dieser Arbeit, die spezifische und unspezifische Aufnahme der Eisenoxidpartikel von HUVE- und U118-Zellen bei unterschiedlichen Inkubationsparameter, diskutiert. Bei den HUVE-Zellen wurde die höchste Aufnahme und die größte Separation zwischen unspezifischer und rezeptorinduzierter Aufnahme bei einer Inkubationskonzentration von 20 µg Fe/ml und einer Inkubationszeit von 45 min ermittelt. Die spezifische Aufnahme über den VEGFR-1 ist bei diesen Parametern 22fach höher als die unspezifische des ungekoppelten N70-Partikels. Man kann von einer noch geringeren unspezifische Aufnahme des Konjugats ausgehen, da der Partikeldurchmesser der N70+anti-VEGFR-1 ca. 10 nm größer ist als der Partikeldurchmesser der N70-Partikel, bedingt dadurch, dass die Antikörper eine Länge von 5 nm aufweisen (Alberts et al., 1995) und sich an der Partikeloberfläche befinden. Ein Nachteil der spezifischen Markierung von Endothelzellen ist, dass hier die spezifische Aufnahme (27,85 ng Fe/0,5 Mio Zellen) nur etwas höher ist als die unspezifische durch U118-Tumorzellen mit den gleichen Inkubationsparametern, d.h. mit einer Inkubationskonzentration von 20 µg/ml und -zeit von 45 min (16,45 ng Fe/0,5 Mio Zellen).

Vergleicht man die in den Abbildungen 22 und 23 dargestellten von den HUVE-Zellen aufgenommen Eisenmengen bei einer Inkubationskonzentration von 20 µg Fe/ml und Inkubationszeit von 3 h, so ist die über den VEGFR aufgenommene Eisenmenge in Abbildung 21 fast doppelt so hoch (ca. 30 ng/0,5 Mio Zellen) wie in Abbildung 22 (15, 11 ± 4,35 ng Fe pro 0,5 Mio Zellen). Dies kann dadurch erklärt werden, dass der Messpunkt bei einer Inkubationskonzentration von 30,8 µg Fe/0,5 Mio Zellen einen sehr großen Fehler aufweist (39,84 ± 24,26 ng Fe/ 0,5 Mio Zellen). Dieser große Fehler ist durch einen Ausreißer der dreifach Messung bedingt, der bei der geringen Anzahl von Messungen zu einem hohen Fehler führt. Die Werte für die Kontrollmessung und die Aufnahme über den VEGFR-2 liegen innerhalb der Standardabweichung (10,01 ± 4,58 ng Fe/0,5 Mio Zellen zu ca. 6 ng Fe/0,5 Mio Zellen bzw. 7,64 ± 3,89 ng Fe/0,5 Mio Zellen zu ca. 11 ng Fe/0,5 Mio Zellen).

Die Eisenaufnahme der Zelle kann durch unterschiedliche Subkulturen der verwendeten HUVE-Zelle variieren. HUVE-Zellen sollten nach der sechsten Subkultur nicht mehr verwendet werden, meisten gehen sie aber schon davor ein. Ein anderer Faktor, welcher die Eisenaufnahme beeinflusst ist das Medium. Werden Medien unterschiedlicher Chargen verwendet, kann die Zusammensetzung und die Güte des Mediums ändern und das Verhalten

von nicht sehr robusten Zellen, wie den HUVE-Zellen verändern. Somit können die Messergebnisse eines Zellansatzes miteinander gut verglichen werden, wie beispielsweise die vorgestellten Experimente in Abbildung 21 und 22. Die in Abbildung 36 vorgestellten Experimente sind wesentlich später (1 Jahr) gemacht worden, so dass sich hierbei die Charge des Mediums geändert hat. Die HUVE-Zellen haben hier 3fach weniger Eisen über den VEGFR-1 aufgenommen. Der Verlauf der Eisenaufnahme in Abhängigkeit von der Zeit ist allerdings innerhalb der Experimente vergleichbar. Ein weiterer Punkt, welcher die Eisenaufnahme beeinflussen kann ist der Zeitpunkt des letzten Mediumswechsel. „Hungern“ die Zellen gerade, so nehmen sie stärker unspezifisch die angebotenen Eisenoxidpartikel auf.

Fehler bei der Zellpräparation treten ebenfalls bei der Zellzählung durch die Trypanblau-Methode auf. Da die HUVE-Zellen leicht klumpen ist es schwierig ein repräsentatives Aliquot für die Zählung zu erhalten. Bei der Präparation von Mehrfachmessungen ist es empfehlenswert eine große Zellkulturflasche zu präparieren und die Menge dann zu dritteln, da bei der Präparation von einzelnen Flaschen mehr Fehler auftreten können, z. B. bei der Aussaat der Zellen und der Inkubation.

6.3.3 VEGF-Rezeptoren als Target für die molekulare MR-Bildgebung

Die Zugänglichkeit für die intravenös injizierten Partikel bzw. Konjugate zu den Endothelzellen ist wesentlich besser als zu den Tumorzellen, da die Endothelzellen die Gefäße auskleiden. Im Tumor existieren die Endothelzellen in einem Verhältnis von im Mittel 1:500 bis 1:1000 zu Tumorzellen (Denekamp, 1992). Dieses Verhältnis ist von der Art des Tumors abhängig und kann sich je nach Tumortyp verändern. Die Anzahl der VEGF-Rezeptoren in der Literatur variiert stark: (Dougher und Terman, 1999) haben durch Markierung von VEGF₁₆₅ mit dem radioaktiven Jod-Isotop ¹²⁵I 120.000 Rezeptoren pro HUVE-Zellen mit einer Affinität von 150 pM ermittelt. Li et al. (2001) ermittelten ebenfalls durch Markierung von VEGF₁₆₅ mit dem radioaktiven Jod-Isotop ¹²⁵I 518 ± 124 hoch affine Bindungsstellen ($K_D = 26 \pm 6$ pM) und 6100 ± 450 niedrig affine Bindungsstellen ($K_D = 2070 \pm 520$ pM) pro HUVE-Zelle. (Wang et al., 2002) haben die Zeitintervalle der VEGF-Rezeptor Internalisierung durch Markierung von VEGF₁₆₅ mit dem radioaktiven Jod-Isotop ¹²⁵I und Anlagerung an die Rezeptoren untersucht. Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Gesamtanzahl von Rezeptoren in den ersten 30 min ansteigt und dann leicht wieder abfällt. Die Anzahl der internalisierten Rezeptoren zeigt einen ähnlichen Verlauf. Die Anzahl der Oberflächenrezeptoren zeigt ein Maximum nach 15 min und fällt dann ebenfalls ab. Die Rezeptoren benötigen außerdem 90 min, um nach der Internalisation wieder zur Zelloberfläche zurückzukehren. Der in Abbildung 22 dargestellte zeitliche Verlauf der Eisenoxidpartikel-VEGFR-Konjugate zeigt einen ähnlichen Verlauf. Die höchste Aufnahme der Konjugate findet sich bei 45 min, danach lässt die Aufnahmebereitschaft nach. Dies stimmt ungefähr mit der maximalen Anzahl von bereitgestellten VEGFR nach 30 min überein. Zu

berücksichtigen ist außerdem, dass bei Angiogenese im Allgemeinen die Expression der VEGF-Rezeptoren durch verstärktes Ausschütten des VEGFs hoch reguliert wird (Carmeliet und Jain, 2000; Veikkola et al., 2000; Robinson und Stringer, 2001).

Vergleicht man die spezifische Aufnahme der HUVE-Zellen über den VEGFR-1 (13,93 ng Fe/1 Mio Zellen) mit der spezifischen Aufnahme von CLIOs über E-Selektin, so ist die gemessene Aufnahme dort bis zu 7fach höher (83–104 ng Fe/1 Mio Zellen, (Kang et al., 2002)). Allerdings wurden hier die HUVE-Zellen zuvor mit IL-1 behandelt und so die Rezeptorexpression hoch geregelt. Diesen Effekt könnte man sich auch für zukünftige Experimente an HUVE-Zellen zu nutze machen. Die VEGF-Rezeptoren können durch Zugabe von VEGF hoch geregelt werden. Hierbei sollte beachtet werden, dass die VEGF-Rezeptoren zunächst heruntergeregelt werden (24 h, (Wang et al., 2000) und erst danach eine stärkere Expression zu beobachten ist. Für die Aufnahme spielt auch die Affinität der Antikörper für den Rezeptor eine große Rolle (Alberts et al., 1995). Leider wurde dies bei den verwendeten VEGFR-Antikörpern noch nicht ermittelt.

Für die molekulare MR-Bildgebung wurden auch andere Antikörper-Nanopartikel-Konjugate entwickelt und in Tierversuchen getestet. (Winter et al., 2003) haben einen Antikörper gegen das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin an ein 273 nm großen Gadolinium-Komplex gekoppelt und mit diesem Konjugat bei atherosklerotischen Kaninchen eine T_1 basierte Signalerhöhung von $47 \pm 5\%$ erzielt. Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ gehört zu den α_v -Integrinen und besitzt die gleiche β_3 -Untereinheit wie der Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa (α_{IIb}/β_3), welcher ausschließlich auf Thrombozyten vorkommt. Untersuchungen haben gezeigt, dass $\alpha_v\beta_3$ auf Zellen der Neointima bei Gefäßproliferation überexprimiert ist. (Artemov et al., 2003) haben Antikörper gegen den Her-2/neu-Rezeptor an SPIO-Partikel gekoppelt und diese Konjugate an Brusttumorzellen (MDA-MB-231) getestet. Es ergab sich ein Detektionslimit von $5 \cdot 10^4$ Rezeptoren pro Zelle. Dies wären halb so viele VEGF-Rezeptoren an HUVE-Zellen, wenn eine Anzahl von 120.000 zugrunde gelegt werden würde, aber 10mal mehr, wenn man von 6100 VEGF-Rezeptoren ausgeht.

Als Target für die molekulare Bildgebung scheinen die VEGF-Rezeptoren ebensogut gut geeignet zu sein wie das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und das E-Selektin, zumal die Affinität für E-Selektin geringer ist ($K_D < 1 \mu\text{M}$, (Wild et al., 2001)) als die Affinität der VEGF-Rezeptoren für ihre Liganden. Auch sind sie über die Blutbahn gut zugänglich und spezifisch für die Angiogenese. Das N70-Partikel hat als Kontrastpartikel für die molekulare Bildgebung Vor- und Nachteile. Positiv ist, dass es unspezifisch nicht so gut aufgenommen wird, so dass die Differenz zur spezifischen Markierung möglichst groß ist. Der Nachteil des Partikels sind die geringen maximal erreichbaren R_2 und R_2^* Relaxationsraten in Zellen. Hier zeigt das Resovist-Partikel

wesentlich höhere R_2 und R_2^* Relaxationsraten. Allerdings wird diese Partikel auch unspezifisch sehr stark aufgenommen, so dass nicht vorhergesagt werden kann, ob eine spezifische Markierung der Zelle mit Resovist höher als die unspezifische Aufnahme ist. Dies wäre eine interessante Fragestellung für Zukunftsexperimente.

6.4 Signalunterschiede im MRT

Zur Beantwortung der zweiten und vierten Fragestellung dieser Arbeit, werden im Folgenden die Signalunterschiede von Eisenoxidpartikel suspendiert in Puffer und der spezifischen und unspezifischen Markierungen *in vitro* und *in vivo* diskutiert.

6.4.1 In vitro

Ein ausreichender Signalunterschied zwischen mit Eisenoxidpartikel spezifisch markierten Zellen und dem umliegenden Gewebe im MRT hängt maßgeblich von einem möglichst hohem Verhältnis von spezifischer zu unspezifischer Aufnahme sowie von der Eigenschaft des verwendeten Eisenoxidpartikels ab, das Signal stark zu reduzieren. Alle untersuchten unspezifisch in U118-Zellen internalisierten Partikel ($10 \mu\text{g Fe/ml}$, 1 h) zeigen bei T_2 - und T_2^* -gewichteten Sequenzen einen Signalunterschied zu nicht inkubierten Zellen. Ebenso konnte ein Signalunterschied zwischen mit N70-Partikeln unspezifisch markierten HUVE-Zellen und spezifisch mit N70+anti-VEGFR-1-Konjugat markierten HUVE-Zellen (bei inkubiert mit $20 \mu\text{g Fe/ml}$ 45 min) durch eine T_2 -gewichtete Sequenz im MRT dargestellt werden. Damit zeigte die spezifische Markierung bei gleichen Inkubationsparametern eine höhere Aufnahme der Eisenoxidpartikel und damit einen größeren Signalunterschied. Für die spezifische Markierung mit dem N70+anti-VEGFR-1-Konjugat wurde eine Relaxationsrate von $R_2 = 7,032 \pm 0,454$ [1/s] und für die unspezifische Markierung mit dem ungekoppelten N70-Partikel eine Relaxationsrate von $R_2 = 4,416 \pm 0,303$ [1/s] (Abbildung 36). Es konnte zwischen spezifisch mit dem N70+anti-VEGFR-1-Konjugat markierten HUVE-Zellen und nicht markierten HUVE-Zellen ein CNR von 16,3 mit einer SE-Sequenz ($T_E = 72$ ms, $T_R = 2$ s) erreicht werden.

Vergleicht man die spezifische Aufnahme der N70+anti-VEGFR-1-Konjugate von HUVE-Zellen und die erzielten Signalmindernung mit MRT-Bildern sowie den Angaben aus der Literatur (Morawski et al., 2004), so ist der erzielte Signalunterschied gering. Morawski et al. haben Gd-Perfluorcarbon-Nanopartikel entwickelt, die über eine Biotin-Avidin-Bindung leicht an Antikörper gebunden werden können. Die Antikörper sind jeweils spezifisch gegen verschiedene molekulare Epitope auf Zelloberflächen gerichtet, beispielsweise gegen den *smooth muscle cell* (SMC) Gewebe-Faktor (Morawski et al., 2004). Um ein CNR~5 im Zellexperiment zu erreichen wird eine Gadoliniumkonzentration von 0,011 mM benötigt. Dies

ist geringer als die in dieser Arbeit bestimmte Menge von 0,03 mM Eisen. Kang et al. (2002) (Kang et al., 2002) haben die spezifische Aufnahme eines Eisenoxidpartikels (CLIO) gekoppelt mit einem Antikörper gegen das E-Selektin für HUVE-Zellen mit 0,1 pg Fe/Zelle gemessen. Die von Kang et al. durch eine T_2 -gewichtete Sequenz gemessenen Signalunterschiede der markierten Zellen im MRT sind somit entsprechend höher, wobei die Autoren das leider nicht quantifiziert haben. Somit ist das entwickelte Konjugat nicht so gut wie vergleichbare Präparate.

Die geringste nach dem Rose-Kriterium durch die transversale Relaxationsrate R_2 detektierbare Eisenkonzentration in Puffer wird durch B102-Partikel erreicht. Mit diesen Partikeln kann eine Signaländerung, die eine 0,022 mM Eisenkonzentration induziert, nach dem Rose-Kriterium unterschieden werden. Für die effektive transversale Relaxationsrate R_2^* ist dies für eine N50-Partikel-Konzentration von 0,055 mM Eisen gegeben. Auch in Zellen können sehr kleine N50-Partikel-Konzentrationen von 0,027 mM Eisen durch R_2 -Messungen und 0,023 mM durch R_2^* -Messungen nach Rose minimal unterschieden werden.

Eine Zukunftsstrategie wäre die Verwendung von zugelassenen Kontrastmitteln, da diese Partikel schon auf ihren Einsatz im Menschen getestet wurden. Die Verwendung von als Medikament zugelassenen Antikörpern, wie beispielsweise PTK/ZK von Schering und Novartis (Schering, 2004), hätte ebenfalls Vorteile. Ein hieraus resultierendes Konjugat könnte schneller für den Einsatz im Menschen zugelassen werden. Die Wahl eines höher exprimierten Rezeptors und einer daraus resultierenden stärkeren Aufnahme der Eisenoxidpartikel könnte das Signal weiter reduzieren.

Eine weitere Strategie wäre auch die Zellen mit größeren Partikeln zu labeln, welche nicht von den Zellen aufgenommen werden, so kann durch eine zweite unspezifische Markierung der Partikel die Effektivität der Markierung verdoppelt werden. Außerdem könnte man bei der Herstellung von größeren Partikeln versuchen, die Eisenoxidkristalle in den Partikeln zu clustern, um so die Effekte des SDR auszunutzen und hohe R_2^* -Raten zu erreichen.

6.4.2 In vivo

Das abgeschätzte Detektionslimit für ein Differenzbild aus zwei T_2 -Maps nach dem Rose-Kriterium ist mit einer Eisenkonzentration von 0,429 mM sehr hoch. Die erzielte Eisenkonzentration in spezifisch markierten HUVE-Zellen beträgt 0,067 mM. Allerdings wurde für die Kalkulation des Detektionslimits eine ältere Messung verwandt, die eine geringe Auflösung von 0,3 x 0,3 x 1 mm pro Pixel hatte. Dies bedeutet, dass verschiedene Gewebearten zu dem Signal im Pixel beitragen. Bei einer geringeren Auflösung kann spezifischer ausgewertet werden, und der Fehler wird kleiner. Auch ist die Rezeptorexpression der Endothelzellen *in vivo* höher als in Zellkultur, so dass eine höhere spezifische Aufnahme zu erwarten ist. Allerdings kann man auch

von einer höheren unspezifischen Aufnahme der Zellen in der Umgebung des Tumors ausgehen. Für ein Tierexperiment sollte also ein möglichst stark vaskularisierter Tumor verwendet werden, um die spezifische Aufnahme des Konjugates zu steigern. Die in Abschnitt 5.2.5 durchgeführte Abschätzung der zu erwartenden Differenzrelaxivität ergab für N70-Partikel $\Delta R_{2, N70} = 0,06$ 1/s. Mit einem T-Test kann die Signifikanz zwischen dem Signal eines Tumor in einem Tierexperiment vor und nach der Kontrastmittelgabe geprüft werden. Es wurde ebenfalls ermittelt, dass für eine Relaxationsratendifferenz von $\Delta R_{2, N70} = 0,21$ 1/s ein Voxelanzahl von $N = 7,07 \cdot 10^4$ Voxel nötig wäre, die Signale signifikant unterscheiden zu können. Mit einer realistischen Voxelanzahl von $N = 4798$ wäre nach Gl. 4.24 eine Relaxationsratendifferenz von $\Delta R_2 = 0,93$ 1/s nötig, um die Signale mit einem T-Test signifikant unterscheiden zu können. Für die N70-Partikel bedeutet dies eine Konzentration von $C_{Fe} = 0,016$ mM ($\Delta R_{2, N70} = 58,3 \cdot C_{Fe}$, Tabelle A.2). Folglich müsste eine 16fach höhere Eisenkonzentration von den Endothelzellen spezifisch aufgenommen werden, als über die Abschätzung der Rezeptoren berechnet wurde, um eine R_2 -Ratenänderung unter den obigen Annahmen und Voraussetzungen signifikant unterscheiden zu können.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Eisenoxidpartikel-Antikörper-Konjugat zur spezifischen Markierung von angiogenetischen Prozessen und Visualisierung mittels Magnetresonanztomographie neu entwickelt. Hierbei wurde ein Antikörper des Angiogenesefaktors VEGF an ein mit Dextran-ummanteltes Eisenoxidpartikel gekoppelt. Durch die Optimierung der Kopplungsparameter mittels radioaktiver Markierung des Antikörpers konnte ein Maximum von 47 Antikörpern an das Eisenoxidpartikel gekoppelt werden. Es hat sich gezeigt, dass der größtmögliche Unterschied zwischen spezifischer und unspezifischer Markierung der HUVE-Zellen bei einer Inkubationskonzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ Fe und einer Inkubationszeit von 45 min erzielt werden kann. Hierbei wurde das neu entwickelte Konjugat über den VEGFR-1 22fach stärker aufgenommen als die nicht konjugierten N70-Partikel. Bei diesen Experimenten hat sich die Methode der TRFA als sehr gut einsetzbare Referenzmethode zur Eisenquantifizierung in Zellen erwiesen. Desweiteren wurden verschiedene Eisenoxidpartikel hinsichtlich ihrer Relaxationseigenschaften in unterschiedlichen Umgebungen im MRT untersucht, um das optimale für die molekulare MR-Bildgebung benötigte Partikel zu ermitteln. Relevante Eigenschaften sind hierbei eine geringe unspezifische Aufnahme der Partikel und eine hohe Signalreduktion bei möglichst kleiner Eisenkonzentration in der Zelle. Bei Aufnahmeexperimenten der Partikel in die Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass dextranummantelte Partikel um einen Faktor 40 schlechter unspezifisch aufgenommen werden als nackte Partikel und 10–20fach schlechter als mit Carboxydextran-ummantelte Partikel. Die ermittelten Relaxivitäten der Partikel wurden mit theoretischen Voraussagen verglichen. Hierbei stellte sich heraus, dass die Relaxationsphänomene in Puffer durch das so genannte *motional narrowing* Regime sowie die Relaxationsphänomene der Partikel internalisiert in Zellen durch das *static dephasing* Regime beschrieben werden können. Diese Theorien erklären ebenfalls den entdeckten Unterschied der Relaxationszeiten von gleichen Eisenkonzentrationen intra- und extrazellulär. Dies bedeutet bei den untersuchten Partikeln, dass die Relaxationszeitenänderungen der Eisenoxidpartikel in Zellen geringer oder genauso hoch sind wie suspendiert in Puffer. Berechnungen nach dem Rose-Kriterium ergaben, dass um eine minimal sichtbare R_2 -Signaländerung zu erreichen, 0,022 mM Fe der B102-Partikel in Puffer benötigt werden. Für eine minimal sichtbare R_2^* -Signaländerung wird 0,055 mM Fe der N50-Partikel in Puffer benötigt. In Zellen werden 0,05 mM Fe der N70-Partikel für eine minimal sichtbare R_2 -Signaländerung und 0,048 mM Fe für eine minimal sichtbare R_2^* -Signaländerung benötigt. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine spezifische Markierung mit dem N70+anti-VEGFR-1-Konjugat eine signifikante R_2 -Relaxationsratenänderung *in vitro* erreicht wird. Die Frage, ob

das Konjugat *in vivo* eine signifikante Signaländerung hervorruft, wurde durch eine theoretische Abschätzung beantwortet. Eine detektierbare R_2 -Relaxationsratenänderung kann im Tierexperiment bei einer Tumormasse von 1 g durch eine Eisenkonzentration von 0,016 mM Fe der N70-Partikel erreicht werden. Für das Tierexperiment sollte ein stark vaskularisierter Tumor verwendet werden, um eine möglichst hohe Eisenkonzentration und eine damit deutliche Signaländerung zu erreichen.

Eine andere zu beantwortende Fragestellung wäre die Erprobung von neuen Angiogenesemarkern und Eisenoxidpartikeln. Hierbei ist es empfehlenswert schon am Menschen einsetzbare Medikamente – so genannte Angiogenesehemmer – und schon zugelassene Kontrastmittel zu verwenden, da diese dann schneller als Konjugat einsetzbar sind. Der entscheidende Test des entwickelten Konjugates wäre die Einsetzbarkeit am Menschen. Durch das am MRT neuartige Ganzkörper-Screening wäre es möglich, in Voruntersuchungen Tumore schon im Frühstadium zu erkennen, wie es zur Zeit nur mit dem PET möglich ist. Die Vorteile der MR-Tomographie sind die zusätzlichen anatomischen Informationen und die Vermeidung von Radioaktivität. Eine weitere diagnostische Einsetzbarkeit betrifft die Nachsorge von Patienten nach radikaler Operation: Im Bereich der Tumorresektion findet sich häufig Narbengewebe, das nicht immer eindeutig von vitalem Tumorgewebe zu unterscheiden ist. Dies trifft auch für die Nachsorge nach Chemo- sowie Strahlentherapie zu. Die frühe Erkennung sowohl des Tumors selber als auch eines Rückfalles kann sich unter Umständen als sehr schwierig wenn nicht unmöglich erweisen. Hier könnte das Konjugat zur bessere Detektierbarkeit eingesetzt werden. Zur Therapiekontrolle von neuartigen Medikamenten wäre eine Einsetzbarkeit ebenfalls gegeben, da es eine Quantifizierung der Eisenaufnahme ermöglicht. Hieraus kann dann wiederum auf die Menge der angiogenen Zellen und auf die Wirksamkeit der Therapie geschlossen werden.

Anhang

A. Relaxationsraten der Eisenoxidpartikel

Tabelle A.1: Die Relaxivitäten der Eisenoxidpartikel N20, N50, N70, B102 und Resovist bei 1,5 T und 21°C suspendiert in salinem Puffer.

Partikel	r_1	r_2	r_2^*
N20	$r_1 = 23,58 \pm 0,62$ $p < 0,0001, r^2 = 0,98$	$r_2 = 112,83 \pm 4,54$ $p < 0,0001, r^2 = 0,98$	$r_2^* = 106,82 \pm 2,99$ $p < 0,0001, r^2 = 0,98$
N50	$r_1 = 12,84 \pm 0,18$ $p < 0,0001, r^2 = 0,99$	$r_2 = 251,58 \pm 2,51$ $p < 0,0001, r^2 = 0,99$	$r_2^* = 257,11 \pm 8,76$ $p < 0,0001, r^2 = 0,98$
N70	$r_1 = 11,31 \pm 0,18$ $p < 0,0001, r^2 = 0,99$	$r_2 = 123,75 \pm 1,73$ $p < 0,0001, r^2 = 0,99$	$r_2^* = 129,64 \pm 2,41$ $p < 0,0001, r^2 = 0,98$
B102	$r_1 = 41,96 \pm 1,83$ $p < 0,0001, r^2 = 0,99$	$r_2 = 526,81 \pm 5,1$ $p < 0,0001, r^2 = 0,99$	$r_2^* = 582,04 \pm 7,69$ $p < 0,0001, r^2 = 0,99$
Resovist	$r_1 = 11,37 \pm 0,13$ $p < 0,0001, r^2 = 0,99$	$r_2 = 109,66 \pm 1,39$ $p < 0,0001, r^2 = 0,99$	$r_2^* = 160,46 \pm 3,29$ $p < 0,0001, r^2 = 0,98$

Tabelle A.2: Die Relaxivitäten der Eisenoxidpartikel N20, N50, N70, B102 und Resovist bei 1,5 T und 21°C internalisiert in U118-Zellen.

Partikel	r_1	r_2	r_2^*
N20	$r_1 = 0,04 \pm 0,02$ $p = 0,06, r^2 = 0,22$	$r_2 = 13,48 \pm 1,50$ $p < 0,0001, r^2 = 0,84$	$r_2^* = 63,19 \pm 12,94$ $p = 0,0018, r^2 = 0,77$
N50	$r_1 = 1,24 \pm 0,26$ $p = 0,0003, r^2 = 0,59$	$r_2 = 53,25 \pm 7,26$ $p < 0,0001, r^2 = 0,77$	$r_2^* = 348,35 \pm 39,76$ $p < 0,0001, r^2 = 0,83$
N70	$r_1 = 2,68 \pm 0,45$ $p = 0,0041, r^2 = 0,70$	$r_2 = 58,30 \pm 10,59$ $p < 0,0001, r^2 = 0,67$	$r_2^* = 181,07 \pm 35,09$ $p = 0,0002, r^2 = 0,67$
B102	$r_1 = 0,38 \pm 0,16$ $p = 0,03, r^2 = 0,27$	$r_2 = 69,11 \pm 14,42$ $p = 0,0002, r^2 = 0,59$	$r_2^* = 63,97 \pm 15,89$ $p = 0,005, r^2 = 0,70$
Resovist	(0–0,24 mM) $r_1 = 1,19 \pm 0,29$ $p = 0,0042, r^2 = 0,71$	(0–0,24 mM) $r_2 = 89,68 \pm 13,16$ $p = 0,0002, r^2 = 0,87$	$r_2^* = 204,65 \pm 22,98$ $p < 0,0001, r^2 = 0,89$

Tabelle A.3: Die Relaxivitäten der Eisenoxidpartikel N20, N50, N70, B102 und Resovist bei 1,5 T und 21°C suspendiert in salinem Puffer. Die Auswertebereiche sind für B102- und N20-Partikel 0–1,0mM Fe, für N50- und N70-Partikel 0–0,08 mM Fe und für Resovist-Partikel 0–0,25 mM Fe bzw. 0–0,6 mM Fe für r_2^* .

Partikel	r_1	r_2	r_2^*
N20	$r_1 = 23, \pm 0,62$ $p < 0,0001, r^2 = 0,98$	$r_2 = 112,83 \pm 4,56$ $p < 0,0001, r^2 = 0,98$	$r_2^* = 106,82 \pm 2,99$ $p < 0,0001, r^2 = 0,98$
N50	$r_1 = 11,03 \pm 0,43$ $p < 0,0001, r^2 = 0,99$	$r_2 = 277,48 \pm 0,41$ $p < 0,0001, r^2 = 0,99$	$r_2^* = 372,58 \pm 29,81$ $p = 0,0002, r^2 = 0,95$
N70	$r_1 = 8,89 \pm 0,25$ $p < 0,0001, r^2 = 0,99$	$r_2 = 203,86 \pm 6,51$ $p < 0,0001, r^2 = 0,99$	$r_2^* = 256,24 \pm 9,4$ $p < 0,0001, r^2 = 0,98$
B102	$r_1 = 41,96 \pm 1,83$ $p < 0,0001, r^2 = 0,99$	$r_2 = 526,81 \pm 5,1$ $p < 0,0001, r^2 = 0,99$	$r_2^* = 582,04 \pm 7,69$ $p < 0,0001, r^2 = 0,99$
Resovist	$r_1 = 6,92 \pm 0,68$ $p < 0,0001, r^2 = 0,91$	$r_2 = 119,56 \pm 2,28$ $p < 0,0001, r^2 = 0,99$	$r_2^* = 183,24 \pm 6,57$ $p < 0,0001, r^2 = 0,98$

Tabelle A.4: Die Relaxivitäten der Eisenoxidpartikel N20, N50, N70, B102 und Resovist in U118-Zellen bei 1,5 T und 21°C internalisiert in U118 Zellen. Die Auswertebereiche sind für B102- und N20-Partikel 0–1,0mM Fe, für N50- und N70-Partikel 0–0,08 mM Fe und für Resovist-Partikel 0–0,25 mM Fe bzw. 0–0,6 mM Fe für r_2^* .

Partikel	r_1	r_2	r_2^*
N20	$r_1 = 0,13 \pm 0,04$ $p = 0,03, r^2 = 0,72$	$r_2 = 16,32 \pm 2,05$ $p = 0,0013, r^2 = 0,94$	$r_2^* = 71,35 \pm 15,50$ $p = 0,0037, r^2 = 0,78$
N50	$r_1 = 1,24 \pm 0,26$ $p = 0,0003, r^2 = 0,59$	$r_2 = 53,25 \pm 7,26$ $p < 0,0001, r^2 = 0,77$	$r_2^* = 348,35 \pm 39,76$ $p < 0,0001, r^2 = 0,83$
N70	$r_1 = 2,63 \pm 0,78$ $p = 0,0041, r^2 = 0,41$	$r_2 = 53,58 \pm 9,59$ $p < 0,0001, r^2 = 0,59$	$r_2^* = 181,77 \pm 34,87$ $p = 0,0002, r^2 = 0,68$
B102	$r_1 = 0,83 \pm 0,16$ $p = 0,03, r^2 = 0,27$	$r_2 = 69,11 \pm 14,42$ $p = 0,0002, r^2 = 0,59$	$r_2^* = 63,97 \pm 15,89$ $p = 0,005, r^2 = 0,70$
Resovist	$r_1 = 1,19 \pm 0,29$ $p = 0,0042, r^2 = 0,71$	$r_2 = 89,68 \pm 13,16$ $p = 0,0002, r^2 = 0,87$	$r_2^* = 204,65 \pm 22,98$ $p < 0,0001, r^2 = 0,89$

Tabelle A.5: Die bei der maximalen von U118-Zellen internalisierten Eisenkonzentration gemessenen Relaxationsraten der unterschiedlichen Eisenoxidpartikel im Vergleich zu den bei der gleichen Eisenkonzentration errechneten Relaxationsraten (Relaxivitäten s. Tabelle A.1) in Puffer.

Partikel	Fe [mM]	Zelle			Puffer		
		R_1	Rr_2	R_2^*	R_1	R_2	R_2^*
B102	0,729	0,93	83,33	83,33	27,86	349,80	386,47
N20	1,318	0,83	21,28	118,26	39,30	187,97	177,96
N50	0,065	0,675	5,15	13,63	0,62	15,81	21,23
N70	0,081	0,75	6,41	11,96	0,72	16,51	20,75
Resovist	0,238	0,979	29,20	112,72	1,43	24,86	38,11
	0,487	1,208	40,04	161,94	7,97	137,85	211,28

Tabelle A.6: Die bei einer Inkubationskonzentration von 20 $\mu\text{g Fe/ml}$ und Inkubationszeit von 45 min durch unspezifische und Rezeptor-induzierte Aufnahme über den VEGFR-1 und -2 erreichbaren Eisenkonzentrationen in HUVE-Zellen und die bei diesen Konzentrationen gemessenen Relaxationsraten R_1 und R_2 (s. auch Abbildung 36). Die Relaxationsraten in Puffer wurden für die ermittelten Konzentrationen mit den jeweiligen Relaxivitäten der Partikel (Tabelle A.1) berechnet. Dargestellt sind jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung.

	Fe [mM]	Zelle		Puffer	
		R_1 [1/s]	R_2 [1/s]	R_1 [1/s]	R_2 [1/s]
HUVEC unspez	0,027 \pm 0,0045	0,722 \pm 0,037	4,416 \pm 0,302	0,24 \pm 0,04	5,50 \pm 0,92
HUVEC VEGFR-1	0,068 \pm 0,0094	0,806 \pm 0,024	7,032 \pm 0,454	0,61 \pm 0,08	13,86 \pm 1,92
HUVEC VEGFR-2	0,043 \pm 0,0009	0,746 \pm 0,024	5,364 \pm 0,142	0,38 \pm 0,008	8,76 \pm 0,18

B. Theoretische Berechnung der Relaxivitäten

Tabelle B.1: Die verwendeten Parameter zur theoretischen Berechnung der transversalen Relaxivität im MNR nach Gl. 3.27 und 3.28.

Partikel	Radius (nm)	τ_D (10^{-9} s)	$\Delta\omega$ (10^7 rad/s)	α (10^{-5})	V_{Kristall} (10^{-23} m ³)	$m_{\text{Fe,Kristall}}$ (10^{-18} g)	M (G)	r_2 (1/m·Ms)
B102	3,75	5,63	10,9	1,48	2,21	0,76	1088,05	486,54
N20	5,00	10,00	5,55	1,01	5,24	1,79	552,52	223,05
N50	5,00	10,00	6,99	9,80	5,24	1,97	696,02	322,46
N70	5,00	10,00	5,71	1,01	5,24	1,79	568,69	236,30
Resovist	2,30	2,12	5,71	1,54	1,13	4,11	569,09	80,27

Literaturverzeichnis

- Ahrens, E. T., M. Feili-Hariri, et al. (2003). "Receptor-mediated endocytosis of iron-oxide particles provides efficient labeling of dendritic cells for in vivo MR imaging." Magn Reson Med **49**(6): 1006-13.
- Alberts, B., D. Bray, et al. (1995). Molekularbiologie der Zelle. Weinheim [u.a.], Jaenicke, L.
- Alfke, H., M. Kalinowski, et al. (2000). "[A review of molecular radiology. I: Gene therapy]." Röfo Fortschr Geb Röntgenstr Neuen Bildgeb Verfahr **172**(12): 949-956.
- Alfke, H., F. Nocken, et al. (2001). "[Molecular radiology. II: Molecular imaging]." Röfo Fortschr Geb Röntgenstr Neuen Bildgeb Verfahr **173**(5): 391-398.
- Anderson, S. A., R. K. Rader, et al. (2000). "Magnetic resonance contrast enhancement of neovasculature with alpha(v)beta(3)-targeted nanoparticles." Magn Reson Med **44**(3): 433-439.
- Artemov, D., N. Mori, et al. (2003). "Magnetic resonance molecular imaging of the HER-2/neu receptor." Cancer Res **63**(11): 2723-2727.
- Augustin, H. G. (2003). "[Angiogenesis research--quo vadis?]." Ophthalmologe **100**(2): 104-110.
- Barleon, B., S. Sozzani, et al. (1996). "Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1." Blood **87**(8): 3336-3343.
- Billotey, C., C. Wilhelm, et al. (2003). "Cell internalization of anionic maghemite nanoparticles: Quantitative effect on magnetic resonance imaging." Magn Reson Med **49**(4): 646-654.
- Bloch, F., W. W. Hanson, et al. (1946). "Nuclear induction." Phys. Rev. **69**: 127-132.
- Boenisch, T. (2003). Immunchemische Färbemethoden. Carpineteria, Hamburg, DakoCytomation Corp.
- Bowen, C. V., X. Zhang, et al. (2002). "Application of the static dephasing regime theory to superparamagnetic iron-oxide loaded cells." Magn Reson Med **48**(1): 52-61.
- Bremer, C., A. A. Bogdanov, et al. (2001). "[Imaging of angiogenesis]." Radiologe **41**(2): 138-145.
- Brooks, R. A. (2002). "T(2)-shortening by strongly magnetized spheres: a chemical exchange model." Magn Reson Med **47**(2): 388-391.
- Brooks, R. A., F. Moyny, et al. (2001). "On T2-shortening by weakly magnetized particles: the chemical exchange model." Magn Reson Med **45**(6): 1014-1020.
- Bulte, J. W., R. A. Brooks, et al. (1999). "Relaxometry and magnetometry of the MR contrast agent MION-46L." Magn Reson Med **42**(2): 379-384.
- Bulte, J. W., T. Douglas, et al. (2001). "Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells." Nat Biotechnol **19**(12): 1141-1147.
- Burgess, A. E. (1999). "The Rose model, revisited." J Opt Soc Am A **16**(3): 633-646.
- Carmeliet, P. und R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." Nature **407**(6801): 249-257.

- Chouly, C., D. Pouliquen, et al. (1996). "Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution." J Microencapsul **13**(3): 245-255.
- Cornell, R. M. und U. Schwertmann (2003). The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses, Wiley-VCH.
- Cullinan-Bove, K. und R. D. Koos (1993). "Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth." Endocrinology **133**(2): 829-837.
- de Vries, C., J. A. Escobedo, et al. (1992). "The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor." Science **255**(5047): 989-991.
- Demtröder, W. (1995). Experimentalphysik 2 - Elektrizität und Optik. Berlin, Springer-Verlag.
- Denekamp, J. (1992). "Inadequate vasculature in solid tumours: consequences for cancer research strategies." BJR Suppl **24**: 111-7.
- Dössel, O. (2000). Bildgebende Verfahren in der Medizin: Von der Technik zur medizinischen Anwendung. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag.
- Dougher, M. und B. I. Terman (1999). "Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization." Oncogene **18**(8): 1619-1627.
- Ferrara, N. und T. Davis-Smyth (1997). "The biology of vascular endothelial growth factor." Endocr Rev **18**(1): 4-25.
- Ferrara, N., H. P. Gerber, et al. (2003). "The biology of VEGF and its receptors." Nat Med **9**(6): 669-676.
- Flacke, S., S. Fischer, et al. (2001). "Novel MRI contrast agent for molecular imaging of fibrin: implications for detecting vulnerable plaques." Circulation **104**(11): 1280-1285.
- Fleige, G., B. Hamm, et al. (2000). "[Molecular MR imaging. State of the research with examples describing individual results]." Röfo Fortschr Geb Röntgenstr Neuen Bildgeb Verfahr **172**(11): 865-871.
- Folkman, J. (1971). "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." N Engl J Med **285**(21): 1182-6.
- Folkman, J. (1995). "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." Nat Med **1**(1): 27-31.
- Folkman, J. (2002). "Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis." Semin Oncol **29**(6 Suppl 16): 15-18.
- Folkman, J., T. Browder, et al. (2001). "Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application." Thromb Haemost **86**(1): 23-33.
- Folkman, J., E. Merler, et al. (1971). "Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis." J Exp Med **133**(2): 275-88.
- Gillis, P. und S. H. Koenig (1987). "Transverse relaxation of solvent protons induced by magnetized spheres: application to ferritin, erythrocytes, and magnetite." Magn Reson Med **5**(4): 323-345.
- Gillis, P., F. Moiny, et al. (2002). "On T(2)-shortening by strongly magnetized spheres: a partial refocusing model." Magn Reson Med **47**(2): 257-263.

- Gillis, P., A. Roch, et al. (1999). "Corrected equations for susceptibility-induced T2-shortening." J Magn Reson **137**(2): 402-407.
- Gitay-Goren, H., R. Halaban, et al. (1993). "Human melanoma cells but not normal melanocytes express vascular endothelial growth factor receptors." Biochem Biophys Res Commun **190**(3): 702-708.
- Gossuin, Y., P. Gillis, et al. (2002). "Susceptibility-induced T(2)-shortening and unrestricted diffusion." Magn Reson Med **47**(1): 194-195.
- Hogemann, D., J. P. Babilion, et al. (2001). "[Molecular imaging in magnetic resonance tomography and nuclear medicine]." Radiologe **41**(2): 116-120.
- Hogemann-Savellano, D., E. Bos, et al. (2003). "The transferrin receptor: a potential molecular imaging marker for human cancer." Neoplasia **5**(6): 495-506.
- Hulley, S. B., S. R. Cummings, et al. (1988). Designing Clinical Research - An Epidemiologic Approach. Baltimore, Hong Kong, London, Sydney, Williams & Wilkins.
- Isner, J. M. und D. W. Losordo (1999). "Therapeutic angiogenesis for heart failure." Nat Med **5**(5): 491-492.
- Josephson, L., J. Lewis, et al. (1988). "The effects of iron oxides on proton relaxivity." Magn Reson Imaging **6**(6): 647-653.
- Josephson, L., C. H. Tung, et al. (1999). "High-efficiency intracellular magnetic labeling with novel superparamagnetic-Tat peptide conjugates." Bioconjug Chem **10**(2): 186-191.
- Kang, H. W., L. Josephson, et al. (2002). "Magnetic resonance imaging of inducible E-selectin expression in human endothelial cell culture." Bioconjug Chem **13**(1): 122-127.
- Katoh, O., H. Tauchi, et al. (1995). "Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation." Cancer Res **55**(23): 5687-5692.
- Kennan, R. P., J. Zhong, et al. (1994). "Intravascular susceptibility contrast mechanisms in tissues." Magn Reson Med **31**(1): 9-21.
- Klockenkämper, R. (1997). Total-Reflection X-Ray Fluorescence Analysis. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Klockenkämper, R., J. Knoth, et al. (1992). "Total-Reflection X-Ray Fluorescence Spectroscopy." Analytical Chemistry **64**(23): 1115 -1121.
- Koch, A. E., L. A. Harlow, et al. (1994). "Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis." J Immunol **152**(8): 4149-4156.
- Koenig, S. H. und K. E. Kellar (1995). "Theory of 1/T1 and 1/T2 NMRD profiles of solutions of magnetic nanoparticles." Magn Reson Med **34**(2): 227-233.
- Lauterbur, P. C. (1973). "Image formation by induced local interactions: examples of employing nuclear magnetic resonance." Nature **242**: 190-195.
- Lawaczeck, R., H. Bauer, et al. (1997). "Magnetic iron oxide particles coated with carboxydextran for parenteral administration and liver contrasting. Pre-clinical profile of SH U555A." Acta Radiol **38**(4 Pt 1): 584-597.
- Leslie-Pelecky, D. L. und R. D. Rieke (1996). "Magnetic Properties of Nanostructured Materials." Chem. Mater.(8): 1170-1783.

- Li, S., M. Peck-Radosavljevic, et al. (2001). "Characterization of (123)I-vascular endothelial growth factor-binding sites expressed on human tumour cells: possible implication for tumour scintigraphy." Int J Cancer **91**(6): 789-96.
- Losordo, D. W., P. R. Vale, et al. (1999). "Gene therapy for myocardial angiogenesis." Am Heart J **138**(2 Pt 2): S132-141.
- Loughna, S. und T. N. Sato (2001). "Angiopoietin and Tie signaling pathways in vascular development." Matrix Biol **20**(5-6): 319-25.
- Majumdar, S., S. Zoghbi, et al. (1988). "Quantitation of MR relaxation effects of iron oxide particles in liver and spleen." Radiology **169**(3): 653-658.
- Mansfield, P. und A. A. Maudsley (1976). "Line scan proton spin imaging in biological structures by NMR." Phys Med Biol **21**(5): 847-852.
- Mansfield, P., I. L. Pykett, et al. (1978). "Human whole body line-scan imaging by NMR." Br J Radiol **51**(611): 921-922.
- Mellman, I. (1996). "Endocytosis and molecular sorting." Annu Rev Cell Dev Biol **12**: 575-625.
- Mentlein, R., F. Forstreuter, et al. (2004). "Functional significance of vascular endothelial growth factor receptor expression on human glioma cells." J Neurooncol **67**(1-2): 9-18.
- Metz, S., G. Bonaterra, et al. (2004). "Capacity of human monocytes to phagocytose approved iron oxide MR contrast agents in vitro." Eur Radiol.
- Moore, A., R. Weissleder, et al. (1997). "Uptake of dextran-coated monocrySTALLINE iron oxides in tumor cells and macrophages." J Magn Reson Imaging **7**(6): 1140-1145.
- Morawski, A. M., P. M. Winter, et al. (2004). "Targeted nanoparticles for quantitative imaging of sparse molecular epitopes with MRI." Magn Reson Med **51**(3): 480-486.
- Muller, R. N., P. Gillis, et al. (1991). "Transverse relaxivity of particulate MRI contrast media: from theories to experiments." Magn Reson Med **22**(2): 178-182; discussion 195-196.
- Nunn, A. D., K. E. Linder, et al. (1997). "Can receptors be imaged with MRI agents?" Q J Nucl Med **41**(2): 155-62.
- Oberleithner, H., S. W. Schneider, et al. (2003). "Endothelial cell swelling by aldosterone." J Membr Biol **196**(3): 163-72.
- Pauls, S., R. Sokiranski, et al. (2003). "[Value of spiral CT and MRI (1.5 T) in preoperative diagnosis of tumors of the head of the pancreas]." Rontgenpraxis **55**(1): 3-15.
- Pouliquen, D., H. Perroud, et al. (1992). "Investigation of the magnetic properties of iron oxide nanoparticles used as contrast agent for MRI." Magn Reson Med **24**(1): 75-84.
- Purcell, E. M., H. C. Torrey, et al. (1946). "Resonance absorption by nuclear magnetic moments in solid." Phys. Rev. **69**: 37-41.
- Raith, W. (1999). Bergmann/ Schäfer - Lehrbuch der Experimentalphysik - Elektromagnetismus. Berlin [u.a.], de Gruyter.
- Ravindranath, N., L. Little-Ihrig, et al. (1992). "Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary." Endocrinology **131**(1): 254-260.
- Raynal, I., P. Prigent, et al. (2004). "Macrophage endocytosis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: mechanisms and comparison of ferumoxides and ferumoxtran-10." Invest Radiol **39**(1): 56-63.

- Ringertz, H., B. Hamberger, et al. (2003). "[Paul C Lauterbur and Peter Mansfield. Winners of the 2003 Nobel Prize in medicine or physiology. Magnetic resonance imaging--a breakthrough in clinical medicine and research]." Lakartidningen **100**(41): 3198-3201.
- Robinson, C. J. und S. E. Stringer (2001). "The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors." J Cell Sci **114**(Pt 5): 853-865.
- Rose, A. (1948). "The sensitivity performance of the human eye on an absolute scale." J Opt Soc Am **38**: 196-203.
- Roser, M., D. Fischer, et al. (1998). "Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats." Eur J Pharm Biopharm **46**(3): 255-263.
- Saini, S., D. D. Stark, et al. (1987). "Ferrite particles: a superparamagnetic MR contrast agent for enhanced detection of liver carcinoma." Radiology **162**(1 Pt 1): 217-222.
- Saini, S., D. D. Stark, et al. (1987). "Ferrite particles: a superparamagnetic MR contrast agent for the reticuloendothelial system." Radiology **162**(1 Pt 1): 211-216.
- Schellenberger, E. A., A. Bogdanov, Jr., et al. (2002). "Annexin V-CLIO: a nanoparticle for detecting apoptosis by MRI." Mol Imaging **1**(2): 102-107.
- Schering (2004). http://www.schering.de/scripts/de/50_media/2004/pi/Q2/040603_PTK.php.
- Stark, D. D. und W. G. Bradley (1988). Magnetic Resonance Imaging. St. Louis, Washington, D.C., Toronto, Mosby Inc.
- Taupitz, M., S. Schmitz, et al. (2003). "[Superparamagnetic iron oxide particles: current state and future development]." Röfo Fortschr Geb Röntgenstr Neuen Bildgeb Verfahr **175**(6): 752-765.
- Terman, B. I., M. Dougher-Vermazen, et al. (1992). "Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor." Biochem Biophys Res Commun **187**(3): 1579-1586.
- Thelwall, P. E., S. C. Grant, et al. (2002). "Human erythrocyte ghosts: exploring the origins of multiexponential water diffusion in a model biological tissue with magnetic resonance." Magn Reson Med **48**(4): 649-657.
- Thurston, G. (2003). "Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis." Cell Tissue Res **314**(1): 61-8.
- Veikkola, T., M. Karkkainen, et al. (2000). "Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors." Cancer Res **60**(2): 203-12.
- Vlaardingerbroek, M. T. und J. A. den Boer (2003). Magnetic Resonance Imaging - Theory and Practice. Berlin [u.a.], Springer.
- Wang, D., D. B. Donner, et al. (2000). "Homeostatic modulation of cell surface KDR and Flt1 expression and expression of the vascular endothelial cell growth factor (VEGF) receptor mRNAs by VEGF." J Biol Chem **275**(21): 15905-15911.
- Wang, D., R. E. Lehman, et al. (2002). "Expression and endocytosis of VEGF and its receptors in human colonic vascular endothelial cells." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **282**(6): G1088-1096.
- Weissleder, R., H. C. Cheng, et al. (1997). "Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging." J Magn Reson Imaging **7**(1): 258-263.
- Weissleder, R. und U. Mahmood (2001). "Molecular imaging." Radiology **219**(2): 316-333.

- Weissleder, R., D. D. Stark, et al. (1989). "Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity." AJR Am J Roentgenol **152**(1): 167-173.
- Wild, M. K., M. C. Huang, et al. (2001). "Affinity, kinetics, and thermodynamics of E-selectin binding to E-selectin ligand-1." J Biol Chem **276**(34): 31602-12.
- Wilhelm, C., F. Gazeau, et al. (2002). "Interaction of Anionic Superparamagnetic Nanoparticles with Cells: Kinetic Analyses of Membrane Adsorption and Subsequent Internalization." Langmuir **18**: 8148-8155.
- Winter, P. M., S. D. Caruthers, et al. (2003). "Improved molecular imaging contrast agent for detection of human thrombus." Magn Reson Med **50**(2): 411-416.
- Winter, P. M., A. M. Morawski, et al. (2003). "Molecular imaging of angiogenesis in early-stage atherosclerosis with alpha(v)beta3-integrin-targeted nanoparticles." Circulation **108**(18): 2270-4.
- Yablonskiy, D. A. und E. M. Haacke (1994). "Theory of NMR signal behavior in magnetically inhomogeneous tissues: the static dephasing regime." Magn Reson Med **32**(6): 749-763.
- Zhao, M., D. A. Beaugard, et al. (2001). "Non-invasive detection of apoptosis using magnetic resonance imaging and a targeted contrast agent." Nat Med **7**(11): 1241-1244.
- Zimmer, C., R. Weissleder, et al. (1995). "MR imaging of phagocytosis in experimental gliomas." Radiology **197**(2): 533-8.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig von mir verfasst und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Diese Arbeit hat weder in gleicher, noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Kiel, 17. Dezember 2004

(Jennifer Wolter)

Lebenslauf

Name		Jennifer Wolter (geb. Stöber)
Anschrift		Koppelsoll 13 24145 Kiel
Geboren		17. April 1976 in Hamburg
Familienstand		verheiratet
Staatsangehörigkeit		deutsch
Hochschulausbildung	seit Dez. 2001	Promotion am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Klinik für Diagnostische Radiologie, Arbeitsgruppe Medizinische Physik
	Okt. 96 – Dez.01	Studium der Physik an der Christian- Albrechts-Universität zu Kiel, Abschluss Diplom, Diplomarbeit bei Prof. Dr. U. Stroth, Institut für Experimentelle und Angewandte Physik der Christian- Albrechts-Universität zu Kiel, Thema: Aufbau eines Mikrowellen- Interferometers am Torsatron TJ-K
Schulbildung	1986 – 1996	Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Quickborn
	1992 – 1993	Tri-Valley High School, Pennsylvania, USA
	1982 – 1986	Kronstiege Grundschule Hamburg

Danksagung

Mein Dank gilt **Herrn Prof. Dr. Claus-Christian Glüer**, Leiter der Arbeitsgruppe Medizinische Physik am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel für die Themenstellung und die Promotionsstelle. Er konnte mir bei vielen wissenschaftlichen Fragestellungen zur Seite stehen und so zum Gelingen dieser Arbeit beitragen.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Seydel, Leiter der Laborgruppe Biophysik am Forschungszentrum Bostel, danke ich dafür, dass er mich als „Adoptiv-Doktorandin“ aufgenommen hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Bei **Herrn Prof. Dr. Rolf Mentlein**, Anatomisches Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, möchte ich mich an dieser Stelle ganz besonders für die tolle Kooperation im Bereich der Molekularbiologie sowie die fachliche Unterstützung und die gute Betreuung bedanken. Auch gilt mein Dank seinen kompetenten Assistenten/-innen **Martina Burmeister**, **Miriam Lemmer**, **Dagmar Freier**, **Ulla Prange** sowie **Jörg Krause**, die mir die molekularbiologischen und zellbiologischen Arbeitsmethoden näher gebracht und mich tatkräftig unterstützt haben.

Vielen herzlichen Dank an **Herrn Dr. Michael Wentzler** und **Herrn Dr. Carsten Liess** für die hilfreichen und konstruktiven Diskussionen im Bereich der MR-Physik. Einen großen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe der Medizinischen Physik für die gute Kameradschaft.

Herrn Dr. Ulrich Reus, **Herrn Dipl. Ing. Burkhard Erbslöh**, **Herrn Prof. Dr. Andreas Prange** und **Frau Dr. Heike Helmholtz**, Institut für Küstenforschung, GKSS-Forschungszentrum Geesthacht, danke ich für die Nutzung der TRFA, die Betreuung und fachliche Unterstützung.

Herrn Dr. Herbert Pausch und **Frau Maren Rasmussen** sei zum einen für die Durchführung der Suszeptibilitätsmessungen am Institut für Anorganische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und zum anderen für die Diskussion der Messergebnisse gedankt.

Frau Maren Wolter danke ich ganz herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Ganz herzlich möchte ich mich bei **meinen Eltern** bedanken, die mich nicht nur während der Studienzeit immer unterstützt, sondern das Studium überhaupt erst ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann **Lars** für seine tatkräftige Unterstützung und den liebevollen Halt, den er mir gegeben hat.