

Aus der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie
Geschäftsführender Direktor:
Univ.-Prof. Dr. Andreas H. Mahnken

in Zusammenarbeit mit der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
Geschäftsführender Direktor:
Univ.-Prof. Dr. med. Tilo Kircher

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



**Untersuchungen zu SPIO-Partikeln: SPIO-Markierung *in vitro*,
Differenzierungspotential humaner mesenchymaler Stamm-
zellen und Relaxivitätsmessungen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt

von

Ekaterina Barkova

aus Simferopol (USSR jetzt: Russland)

Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
22.05.2017

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

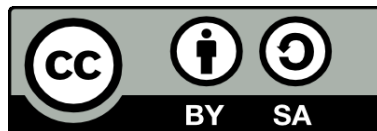
Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. A. Jansen / Prof. Dr. W. Hundt

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. M. Lohoff

2. Korreferent: Herr Prof. Dr. W. Parak

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
4.0 International Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.de>

„Überall erforschet ohne Unterlaß,
was herrlich ist und wunderschön,
was die Welt noch nicht geseh'n.“

Michail Vasil'evic Lomonosov

Zusammenfassung

Magnetische Nanopartikel finden eine breite biomedizinische Anwendung als Biosensoren und als KM in der Bildgebung, ferner werden sie eingesetzt, wenn eine gezielte Wirkstoffabgabe erreicht werden soll. Außerdem spielt die molekulare MRT eine wichtige Rolle bei der Tumordiagnostik. Die schnelle Entwicklung der Nanotechnologie und die zunehmende Anzahl unterschiedlicher Nanomaterialien, die aufgrund ihrer besonderen physikalischen Eigenschaften und der guten Biokompatibilität metallischer und anorganischer Nanopartikel zum Einsatz kommen, führen dazu, dass immer mehr neue Nanostrukturen in Kontakt mit Mensch und Umwelt kommen.

Eisenoxidbasierte MRT-Kontrastmittel umfassen SPIO-Partikel. Sie werden klinisch bei der Leberbildgebung eingesetzt und vom mononukleären Phagozytensystem aufgenommen. Außerdem können Zellen mit SPIO-Partikeln markiert und als *In-vivo*-Kontrastmarker für die MRT-Bildgebung verwendet werden. Bei der Zellmarkierungstechnik sollen unterschiedliche Parameter optimiert werden, z. B. Größe, Beschichtung und Dosis der Partikel sowie die Inkubationszeit. Derzeit liegt deshalb der Fokus vieler Studien auf modifizierten und unterschiedlich beschichteten SPIO-Partikeln.

In der vorliegenden Arbeit wurden 2 verschiedene SPIO-Formulierungen getestet und es wurde die Aufnahme der SPIO-Partikel in unterschiedliche Zelltypen – murine Makrophagen, humane leukämische Monocyten sowie humane mesenchymale Stammzellen – untersucht. Viele Forscher versuchen eine spezifische Markierung durch modifizierte SPIO-Partikel zu erreichen. Hierbei gibt es allerdings starke Bedenken, was die Biosicherheit solcher Partikel angeht. In dieser Arbeit wurden SPIO-Formulierungen verwendet, die ohne Modifizierungen und bei einer relativ niedrigen Konzentration gute Ergebnisse erzielten.

Phagozytierende Zellen wurden mit 2,79 µg Fe/ml und 27,92 µg Fe/ml inkubiert. Nach 12 h lag der Eisengehalt pro J774A.1-Zelle bei $13,77 \pm 0,5$ pg. Bei THP-1-Zellen konnte eine geringere Aufnahme beobachtet werden, das intrazelluläre Eisen betrug 24 h nach der Markierung $9,84 \pm 1,6$ pg Fe pro Zelle.

Aufgrund ihrer hervorragenden Eigenschaften besitzen Stammzellen ein großes Potential in der regenerativen Medizin. Die Mechanismen, die der Transplantation von Stammzellen in ein Target-Organ zugrunde liegen, sind jedoch noch nicht verstanden. Nach einer Markierung der Zellen mit SPIO-Partikeln kann die Migration der Zellen nach der

Abstract

Transplantation mittels MRT beobachtet werden. In dieser Arbeit wurden humane mesenchymale Stammzellen mit SPIO, aber ohne die Hilfe eines Transfektionsagens markiert. Bei der Markierung der Stammzellen wurde mit einer höheren Konzentration von SPIO-Partikeln (25 µg Fe/ml) im Vergleich zur Markierung phagozytischer Zellen begonnen. Die Markierung von hMSC war effizient. Eine der wichtigsten Eigenschaften von Stammzellen ist ihre Differenzierungsfähigkeit, die in dieser Arbeit ebenfalls untersucht wurde. Die Markierung mit SPIO-Partikeln beeinflusste das Differenzierungspotential von hMSC zu Osteoblasten und Adipozyten nicht.

Um herauszufinden, ob SPIO-Partikel einen T_2 -verstärkenden Effekt haben, wurden die T_1 - und T_2 -Werte unterschiedlicher KM-Lösungen bei 7 T gemessen und das r_2/r_1 -Verhältnis berechnet. Sowohl $1/T_1$ als auch $1/T_2$ nahmen linear mit der SPIO-Konzentration zu. Für das untersuchte eisenoxidhaltige KM wurde ein r_2 -Wert von $178 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ in Wasser ermittelt. Das Verhältnis r_2/r_1 lag bei 66 (gemessen in Wasser). Mit Erhöhung der Viskosität nahm auch r_2 zu, sodass in Mausplasma ein r_2 -Wert von $184,6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ bestimmt wurde. Die getesteten SPIO-Partikel wiesen ein Verhältnis r_2/r_1 von 108,6 bei 7 T auf (in Mausplasma, gemessen bei RT). Die bei 7 T zu erwartenden höheren r_2 -Werte im Vergleich zu einem aus der Literatur bekannten Wert von Ferucarbotran (diente als Referenz-KM), gemessen bei 4,7 T, konnten nicht beobachtet werden, was an den unterschiedlichen Temperaturen und einer möglichen Feldinhomogenität bei den Messungen liegen könnte.

Abstract

Magnetic nanoparticles are widely used in biomedical sciences as biosensors and as contrast agents in imaging applications. They are also used if the targeted release of a drug is required. In addition, molecular MRI plays an important part in tumor diagnostics. Due to the rapid development of nanotechnology, the increasing number of different nanomaterials which are used because of their special physical properties, and the good biocompatibility of metal and anorganic nanoparticles, a growing number of new nanostructures come into contact with man and environment.

Iron oxide based MRI contrast agents include SPIO particles. They are used clinically in liver imaging and absorbed by the mononuclear phagocyte system. Moreover, cells can be labeled with SPIO particles and used as *in vivo* contrast markers for MR-Imaging. The cell labeling technique should optimize various parameters, such as size, coating and

particle dose as well as incubation time. For this reason, the current focus of many studies is on modified and differently coated SPIO particles.

For the present thesis, two different SPIO formulations were tested and the uptake of SPIO particles into various cell types – murine macrophages, human leukaemic monocytes and human mesenchymal stem cells – has been studied. Many researchers try to achieve a specific labeling by modified SPIO particles. In this respect, however, there are strong doubts concerning the biosafety of these particles. In this thesis, SPIO formulations that achieved good results without modifications and at a relatively low concentration were used.

Phagocytic cells were incubated with 2.79 $\mu\text{g Fe/ml}$ and 27.92 $\mu\text{g Fe/ml}$. After 12 h, the iron concentration per J774A.1 cell was $13.77 \pm 0.5 \text{ pg}$. With THP-1 cells, a lower uptake could be observed; the intracellular iron was $9.84 \pm 1.6 \text{ pg Fe per cell}$ 24 h after labeling.

Due to their outstanding properties, stem cells have great potential in regenerative medicine. Nevertheless, the mechanisms on which the transplantation of stem cells into a target organ is based are not yet understood. After labeling the cells with SPIO particles, cell migration can be observed by means of MRI after transplantation. For this study, human mesenchymal stem cells were labeled with SPIO, but without the aid of a transfection agent. Labeling the stem cells was started with a higher concentration of SPIO particles (25 $\mu\text{g Fe/ml}$) compared to the labeling of phagocytic cells. Labeling of hMSC was efficient. One of the most important properties of stem cells is their ability to differentiate, which was investigated in this thesis as well. The labeling with SPIO particles did not affect the differentiation potential of hMSC to osteoblasts and adipocytes.

To determine if SPIO particles have a T_2 -intensifying effect, the T_1 and T_2 values of various contrast agent solution at 7 T were measured and the r_2/r_1 ratio calculated. Both $1/T_1$ and $1/T_2$ increased linearly with the SPIO concentration. For the iron oxide containing contrast agent under analysis, an r_2 value of $178 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ in water was determined. The r_2/r_1 ratio was 66 (measured in water). With an increase of the viscosity, r_2 also increased so that an r_2 value of $184.6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ in mouse plasma was determined. The tested SPIO particles showed an r_2/r_1 ratio of 108.6 at 7 T (in mouse plasma, measured at RT). The higher r_2 values expected at 7 T, compared to published reference contrast agent Ferucarbotran values when measure at 4.7 T, were not observed. This may have been due to the different temperatures and a possible field inhomogeneity during the measurements.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	v
Abstract	vi
Inhaltsverzeichnis	viii
1. Allgemeine Einleitung	1
1.1. An der Schnittstelle zwischen Nanomaterialien und biologischen Systemen .	1
1.2. Magnetresonanztomographie (MRT)	5
1.2.1. Physikalische Grundlagen der MRT	5
1.2.2. Relaxation	8
1.2.3. Sequenzen	9
1.3. Magnetismus	10
1.3.1. Dia- und Paramagnetismus	10
1.3.2. Kooperativer Magnetismus	11
1.3.3. Superparamagnetismus.....	12
1.4. MR-Kontrastmittel.....	13
1.4.1. Extrazelluläre KM	14
1.4.2. Intrazelluläre KM.....	15
1.4.3. RES und MPS	15
1.4.4. Blood-Pool-KM	16
1.4.5. Superparamagnetische Eisenoxidpartikel (SPIOs)	17
1.5. Zetapotential	19
1.6. Zielsetzung.....	23
2. Untersuchung der Aufnahme von SPIO-Partikeln durch THP-1- und J774A.1-Zellen.....	25
2.1. Einleitung	25
2.2. Material und Methoden.....	28
2.2.1. Kultivierungsbedingungen	29
2.2.2. Zellzahlbestimmung.....	29
2.2.3. Trypanblaufärbung	29
2.2.4. Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	29
2.2.5. Kultivierung/Differenzierung THP-1-Zellen.....	30
2.2.6. Kultivierung J774A.1-Zellen.....	30
2.2.7. Verwendetes Kontrastmittel.....	31

Inhaltsverzeichnis

2.2.8. Markierungsprotokoll	31
2.2.9. Kolorimetrischer Ferrozin-basierter Assay zur Quantifizierung von Eisen in SPIO enthaltenden Zellen	31
2.2.10. Berliner-Blau-Färbung	32
2.2.11. Statistische Auswertung.....	33
2.3. Ergebnisse und Diskussion	33
3. SPIO-Markierung von hMSC und deren Differenzierungspotential nach magnetischer Markierung	41
3.1. Einleitung	41
3.1.1. Stammzellen und Therapiemöglichkeiten	41
3.1.2. Migration und Verfolgung markierter Stammzellen	45
3.2. Material und Methoden.....	49
3.2.1. Kultivierung von hMSC	49
3.2.2. Adipogene Differenzierung von hMSC nach der Markierung mit SPIO, Oil-Red-O-Färbung zum Nachweis der adipogenen Differenzierung	50
3.2.3. Osteogene Differenzierung von hMSC nach der Markierung mit SPIO, Alizarin-Red-S-Färbung zum Nachweis der osteogenen Differenzierung	51
3.2.4. Verwendetes Kontrastmittel.....	51
3.3. Ergebnisse und Diskussion	52
3.3.1. SPIO-Markierung der hMSC	52
3.3.2. Differenzierungspotential der Stammzellen nach SPIO-Markierung.....	55
4. Relaxivitätsmessungen bei 7 T	69
4.1. Einleitung	69
4.2. Material und Methoden.....	72
4.3. Ergebnisse und Diskussion	75
Schlußfolgerung.....	82
Ausblick	84
Anhang	86
Literaturverzeichnis	86
Abkürzungsverzeichnis	101
Chemikalienliste	102
Lebenslauf.....	104
Verzeichnis der akademischen Lehrer	105
Danksagung	106
Ehrenwörtliche Erklärung.....	107

1. Allgemeine Einleitung

1.1. An der Schnittstelle zwischen Nanomaterialien und biologischen Systemen

Die Definition von Nanotechnologie bezieht sich auf die Längenabmessung; dabei liegen die Längen üblicherweise im Bereich zwischen 1 und 100 nm. Die stetige Zunahme von Nanotechnologieverfahren erhöht auch die Kontaktfrequenz zwischen Nanomaterialien und dem Menschen. Vielfältige Nanopartikel-(NP-)Interaktionen mit Proteinen, Membranen, Zellen, DNA, Organellen und biologischen Flüssigkeiten sind sowohl von kolloidalen als auch dynamischen biophysikochemischen Kräften abhängig. Diese Wechselwirkungen führen zur Bildung der Proteinkorona, also der Partikelumhüllung, sowie zur intrazellulären Aufnahme und zu biokatalytischen Prozessen, die einerseits biokompatible, andererseits auch nachteilige, negative Wirkungen haben können. Weiterhin können Biomoleküle eine Phasenumwandlung, Auslösung freier Energie, Umstrukturierung oder Auflösung der Partikeloberfläche induzieren. Zunächst wird ein sogenannter *initial corona layer* gebildet, d. h. Proteine mit der höchsten Affinität kommen in Kontakt mit der Oberfläche der NP, dann erfolgt eine Interaktion zwischen NP und Proteinen mit hoher Affinität und zuletzt mit Proteinen niedriger Affinität, die durch Interaktion mit schon adsorbierten Biomolekülen adsorbiert werden. Eine Bio-Nano-Verbindung (engl. *bio-nano-interface*) wird als Interaktion zwischen NP und den Komponenten biologischer Flüssigkeit, z. B. Proteinen oder Phospholipiden, oder mit den Zellkomponenten (Membranen, endocytotische Vesikel und andere Organellen) definiert. Dabei werden mehrere Verbindungen aufgebaut, die von kolloidalen Kräften, einer dynamischen biophysikochemischen Kinetik und thermodynamischem Austausch zwischen Nanomaterialoberfläche und der biologisch relevanten Oberfläche abhängig sind. Diese Verbindungen führen oft zur Bildung biomolekularer *corona layer*, zur intrazellulären Aufnahme und zu biokatalytischen Prozessen.

Das Erforschen dieser Interaktionen ermöglicht die Entwicklung von funktionsspezifischen Nanomaterialien, deren Eigenschaften wie Größe, Oberflächenbeschichtung,

Form und Rauheit ihre Struktur und Aktivität bestimmen. Die Schnittstelle zwischen Nanomaterialien und biologischen Systemen umfasst die dynamischen physikochemischen Interaktionen, die Kinetik und den thermodynamischen Austausch zwischen NP-Oberfläche und den Komponenten des biologischen Systems. Allerdings ist die Berücksichtigung aller biophysikochemischen Interaktionen in einem *bio-nano-interface* oft sehr schwierig. Für die Oberflächeneigenschaften von entscheidender Bedeutung sind die NP-Charakteristika: chemische Zusammensetzung, Form, Oberflächenfunktionalisierung, Porosität, Krümmungswinkel, Heterogenität, Rauheit und Hydrophobie/Hydrophilie (Nel *et al.*, 2006; Oberdörster *et al.*, 2005; Vertegel *et al.*, 2004). Andere quantifizierbare Eigenschaften der NP, beispielsweise effektive Oberflächenladung (Zetapotential), Partikelaggregation, Dispersion, Stabilität/biologische Löslichkeit, Bioabbaubarkeit, Hydratation und die Valenz der Oberfläche, werden von den unten angegebenen Faktoren des Suspensionsmediums, z. B. Ionenstärke, pH-Wert, Temperatur, Vorhandensein großer organischer Moleküle oder Detergenzien, bestimmt (Sigmund *et al.*, 2005). Das Medium, in dem die Partikel verteilt sind, entscheidet über die Stabilität der NP-Dispersion, je nach pH-Wert, Ionenstärke, Detergenzien, Temperatur und Proteinkonzentration. Die Zellprodukte, die von den Zellen sekretiert werden, können die Eigenschaften des Suspensionsmediums ändern. Durch die Bindung der Biomoleküle mit den Partikeln ist es möglich, die Partikeleigenschaften so zu beeinflussen, dass freie Oberflächenenergie verändert wird oder Konformationsänderungen bzw. Oxidationsschädigungen durch ROS (reaktive Sauerstoffspezies, engl. *reactive oxygen species*) auftreten. Die Interaktionen zwischen NP und Zellen erfolgen nach den gleichen Prinzipien wie bei kolloidalen Partikeln, nämlich über Van-der-Waals-(VDW-), elektrostatische, Solvations- und solvophobe Kräfte sowie Verarmungseffekte (Nel *et al.*, 2009). Die Wechselwirkungen zwischen der Zelle und den NP (Abb. 1) werden durch elektrodynamische (VDW-), elektrostatische, sterische und Polymerüberbrückungskräfte beeinflusst, wenn die NP zwischen 1 und 100 nm groß sind. Bei NP mit einer Größe zwischen 1 und 10 nm wird die NP-Zell-Interaktion durch Solvationskräfte reguliert. Zwischen größeren nanoskaligen Materialien von 10^2 und 10^6 nm und den Zellen herrschen hydrodynamische Interaktionen wie die Brown'sche Bewegung (Nel *et al.*, 2009). Der Partikeldurchmesser und die Zahl der Atome auf der Oberfläche korreliert mit der Oberflächenenergie der NP. Je mehr Atome an der Partikeloberfläche und je kleiner das Partikel, desto höher der Anteil der Oberflächenenergie. So sind bei Partikeln von 10 nm Größe, die aus 30000 Atomen zusammengesetzt sind, bereits 20 % der Atome an der Partikeloberfläche (Wegner *et al.*, 2003).

NP mit verschiedenen Modifizierungen finden eine breite biologische Anwendung, u. a. in der gezielten Wirkstoffabgabe oder in der Bildgebung. Es ist z. B. für die Gentherapie

wünschenswert, dass die NP effizienter mit den Zellen interagieren, während bei anderen Anwendungen, beispielsweise beim vaskulären Imaging, diese Interaktion minimiert werden muss. Eine Interaktion der NP ist von deren physikalischen Charakteristika – Größe, Form, Oberflächenladung oder bei modifizierten NP von den zellpenetrierenden Peptiden oder speziellen Liganden – abhängig sowie von den Eigenschaften der Zellmembran. Die Zellmembraneigenschaften, z. B. Membranfluidität, Rezeptortyp und Rezeptordichte, beeinflussen die NP-Interaktion und ihre Internalisierung. Viele Studien verfolgen die Optimierung der Aufnahmeeffizienz bei gleichzeitiger Reduzierung der Toxizität oder umgekehrt, die Minimierung der NP-Interaktion bei mit hydrophilen Polymeren modifizierten NP.

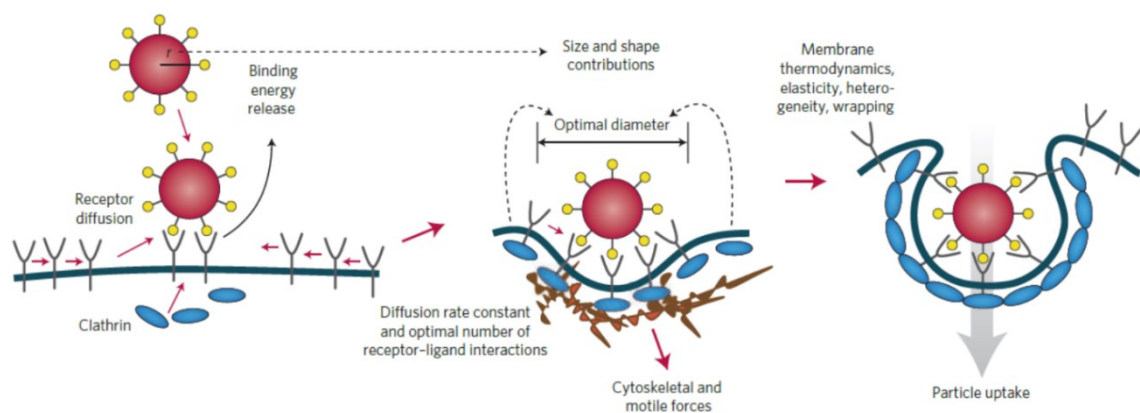


Abb. 1: Interaktion eines NP mit der Zellmembran und Aufnahme des NP. Zur Partikelaufnahme muss die Freisetzung freier Energie an der Kontaktstelle entweder durch eine spezifische (Ligand-Rezeptor-) oder unspezifische (hydrophobe oder Coulomb-Kräfte-) Bindungswechselwirkung verringert werden, um die unterschiedlichen Widerstandskräfte, wie Dehnung, Elastizität, thermische Schwankungen oder Rezeptordiffusion zu überwinden. Das NP ist in der Abb. als rote Kugel dargestellt, seine Liganden als gelbe Punkte und Clathrin als blaue Ellipsen. Die Liganden binden an Y-förmige Membranrezeptoren. (aus Nel *et al.*, 2009)

NP in einer biologischen Flüssigkeit können durch die Bindung an Proteine zur Entstehung neuer antigener Epitope, die eine Immunreaktion auslösen können, und folglich zu Konformationsänderungen führen. Aus diesem Grund ist das Verständnis von NP-Protein-Interaktionen und der Ausbildung der Proteinkorona von Bedeutung. Die NP-Protein-Bindung kann generell auch die Proteinfunktionen verändern, wodurch die enzymatische Aktivität des Proteins verloren gehen kann. So bindet sich z. B. Hühnerei-Lysozym an Siliziumdioxid-NP und induziert die Entfaltung der α -Helix, welche die katalytische Aktivität des Enzyms unterbricht (Vertegel *et al.*, 2004). Auf die Interaktion zwischen NP und Proteinen haben sowohl die Eigenschaften der Partikeloberfläche als auch die Proteinkonzentration und die biologische Flüssigkeit Einfluss, in der die Partikel suspendiert

sind. Manche Proteine bilden mit NP kurzlebige Komplexe. Dabei binden sich Albumin, Immunglobuline, Proteine des Komplementsystems, Fibrinogen und Apolipoprotein am stärksten an Kohlenstoff-Nanoröhren, Eisenoxid-NP, Liposome und polymere NP. Die Bindung durch Immunglobuline und Komponenten des Komplementsystems kann zur Opsonierung der Partikel und nachfolgend zur rezeptorvermittelten Phagozytose führen.

Die Bildung einer biomolekularen Korona auf der Oberfläche nackter (unfunktionalisierter) NP kann zur spezifischen ligandvermittelten oder zur unspezifischen NP-Aufnahme führen. Funktionalisierte NP sind mit einer Hülle beschichtet, die zur Stabilität der NP beiträgt, weil sie gegen Oxidationsprozesse, Schäden durch Säure und Aggregation schützen kann. Dabei ist wichtig, dass diese Beschichtung biokompatibel ist, d. h. hydrophil und nicht toxisch. Das bedeutet, dass in einer Polymerhülle das Polymer die sterische und elektrostatische Stabilität gewährleistet. Die Art der Oberflächenbeschichtung und die Länge der Polymerkette bestimmen die Gesamtgröße des Partikels und spielen eine Rolle bei der Bioverteilung. Hydrophile Stoffe besitzen entweder elektrische Dipole in Form funktioneller Gruppen, z. B. $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, oder feste Ionen wie NH_3^+ und COO^- . Partikel mit hydrophober Oberfläche werden nach intravenöser Verabreichung mit Plasmakomponenten, besonders Proteinen, opsoniert, während die Partikel mit hydrophiler Oberfläche gegen Opsonierungsprozesse resistent sind.

Die Zellmembran ist eine robuste Barriere für die meisten Moleküle und in der Lage, die Homöostase aufrechtzuerhalten. Die Oberfläche der Membran ist eine nichtstarre konforme heterogene Struktur, die sich aufgrund ihrer Fluidität und thermodynamischen Eigenschaften anpassen kann. Über die Zellmembran kommt es zu einem regelmäßigen Austausch von Ionen, Proteinblöcken, Lipiden oder Signalmolekülen mit der Umgebung oder benachbarten Zellen. Der Transport in die bzw. aus der Zelle wird selektiv erlaubt und durch Carrier-Proteine und Ionenkanäle, die sich innerhalb der Membran befinden, reguliert. Dabei spielt die Ladung der Partikel eine wichtige Rolle für den Kontakt mit geladenen Phosphatgruppen des Phospholipids oder mit Rezeptoren auf der Zellmembran (Abb. 2). Je ausgeprägter der ionische Charakter der SPIO-Partikel, desto effizienter werden sie von Makrophagen aufgenommen. In der Regel üben kationische Oberflächeneinheiten stärkere Effekte aus als anionische. NP, die eine hydrophobe Oberfläche haben, neigen zur Agglomeration und werden daher schnell vom retikuloendothelialen System (RES) entfernt. SPIO-Partikel mit Carboxydextran-Beschichtung sind hydrophil, was zur Stabilität der Eisenoxide beiträgt sowie eine unspezifische Proteinbildung oder Zellinteraktion *in vivo* und *in vitro* reduziert.

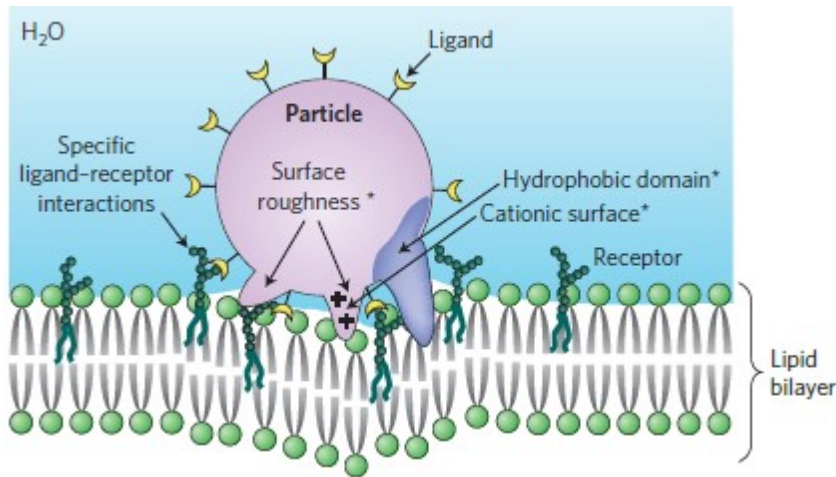


Abb. 2: Rezeptorvermittelte Aufnahme der NP. Oberflächeneigenschaften wie Rauheit, Hydrophobie oder kationische Ladung (*) führen zu unspezifischen Bindungskräften, die die Aufnahme in die Zelle fördern. Die spezifischen Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen führen im Allgemeinen zur Endocytose. Die Zellmembran hat durch die Phosphatgruppen der Phospholipide eine negative Ladung an ihrer Oberfläche. Dies bewirkt eine Anlagerung von positiv geladenen NP. (aus Nel *et al.*, 2009)

1.2. Magnetresonanztomographie (MRT)

Die magnetresonanztomographischen Verfahren beruhen auf dem Prinzip der Kernspinresonanz – der elektromagnetischen Anregung von Atomkernen (Protonen) und der anschließenden Messung des Signals, welches von den Protonen bei der Rückkehr in die Ausgangslage (Relaxation) ausgesendet wird. Die MRT verwendet sehr starke Magnete. Die derzeit am häufigsten in der Medizin eingesetzten Geräte besitzen eine Feldstärke von 1,5 T. Zum Vergleich: 1 T entspricht 10000 Gs und das Magnetfeld der Erde ist nur 0,5 Gs stark (Novelline, 2001).

1.2.1. Physikalische Grundlagen der MRT

Atomkerne mit einer ungeraden Anzahl an Protonen und Neutronen besitzen in ihrem Grundzustand einen nicht verschwindenden Kernspin \vec{I} , mit dem wie folgt ein magnetisches Dipolmoment $\vec{\mu}$ assoziiert ist:

$$\vec{\mu} = \gamma \times \vec{I}$$

-Formel 1-

Gyromagnetisches Verhältnis γ [$\frac{\text{MHz}}{\text{T}}$]

$$\vec{\mu} \left[\frac{\text{J}}{\text{T}} \right]$$

Das gyromagnetische Verhältnis ist eine Konstante, die für jedes Element einen typischen Wert besitzt, für Protonen ist $\gamma = 42,58 \text{ MHz/T}$ (Weishaupt *et al.*, 2006).

Für MR-Anwendungen sind Wasserstoff (^1H), Kohlenstoff (^{13}C), Natrium (^{23}Na) und Phosphor (^{31}P) die wichtigsten Atomkerne. Das einfachste natürlich vorkommende Atom ist das Wasserstoffatom, dessen Kern aus einem einzigen Proton besteht. Da unser Körper hauptsächlich (zu 70 %) aus Wassermolekülen besteht, diese wiederum aus Wasserstoff und Sauerstoff zusammengesetzt sind und das Wasserstoffatom das Atom mit der höchsten MR-Sensitivität darstellt, wird dieses vorrangig für die klinische MRT genutzt. Jedes Wassermolekül besteht aus 2 Wasserstoff- und 1 Sauerstoffatom, das entspricht ca. 11 % Wasserstoff pro Unit des Wassergewichts. Bei der MRT stammen die meisten Signale von den Protonen des Wassers, weil diese sich in der Überzahl gegenüber den Protonen organischer Komponenten befinden. Letztere sind Bestandteile einer breiten Varietät von Makromolekülen, welche Festkörpereigenschaften haben können. Die Protonen von Festkörpern sind im MRT aufgrund ihrer sehr kurzen T_2 -Relaxationszeiten unsichtbar.

Durch das statische Magnetfeld wird das magnetische Moment (Spin) der Protonen im Körper des Menschen ausgerichtet. Durch die Emission eines Hochfrequenz-(HF-)Impulses werden die Spins angeregt und die bei der Relaxation entstehenden Signale mithilfe magnetischer Gradientenfelder lokalisiert. Mittels Empfangsspulen werden diese Signale dann elektronisch verarbeitet und in Bilddaten umgewandelt.

Definitionsgemäß bezeichnet man die Richtung des statischen Magnetfelds B_0 als longitudinale oder auch z-Achse und die senkrecht dazu liegende Achse als xy-Achse bzw. Transversalachse (Abb. 3).

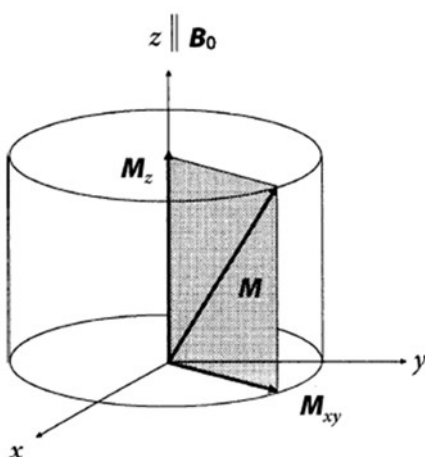


Abb. 3: Die Magnetisierung M wird in Längsmagnetisierung M_z parallel zur Achse des statischen B_0 -Felds und in die rotierende Quermagnetisierung M_{xy} senkrecht zu dieser Achse zerlegt. (aus Reiser & Semmler, 2002)

Die longitudinale Magnetisierung (Längsmagnetisierung) M_z ist der Anteil des Vektors in Richtung z-Achse, also entlang des äußeren Magnetfelds (Abb. 3). Die Transversalmagnetisierung (Quermagnetisierung) M_{xy} ist die Komponente des Vektors, die in der xy-Ebene um das äußere Magnetfeld rotiert.

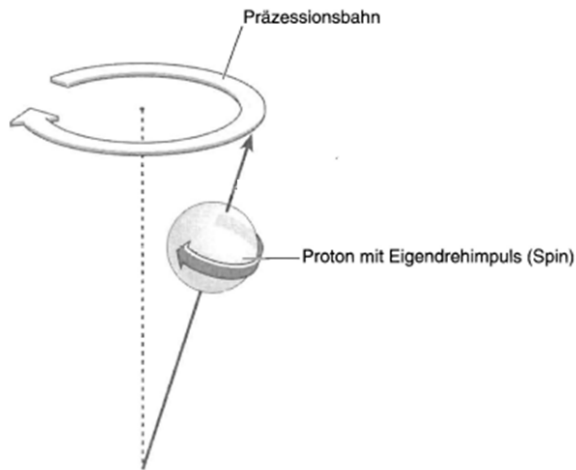


Abb. 4: Spinpräzession. Der Spin präzediert in einem konstanten Winkel, analog einem Kreisel, um die Richtung des äußeren Magnetfelds. (aus Jackson & Thomas, 2009)

Das magnetische Moment oder der Spin (Abb. 4) präzediert mit einer spezifischen Frequenz, der sogenannten Larmorfrequenz ω (auch Präzessionsfrequenz genannt). Dabei ist die Präzessionsfrequenz abhängig von der statischen Magnetfeldstärke. Je größer das anliegende Magnetfeld, desto größer ist die Präzessionsfrequenz. Die Larmorfrequenz wird durch die Larmorgleichung ausgedrückt:

$$\omega = \gamma \times B_0$$

-Formel 2-

$$\omega \text{ [Hz]}$$

$$B_0 \text{ [T]}, 1 \text{ T} = 1 \frac{\text{Weber}}{\text{m}^2} = 1 \frac{\text{Vs}}{\text{m}^2}$$

Durch ihr magnetisches Moment verhalten sich Protonen wie kleine „Stabmagnete“ und können sich in einem starken äußeren Magnetfeld entlang der Hauptfeldlinien entweder parallel oder antiparallel ausrichten (Abb. 5). Mit der Ausrichtung sind verschiedene energetische Zustände verbunden, wobei die parallele Ausrichtung dem Grundzustand und die antiparallele dem angeregten Zustand auf einem höheren Energieniveau entspricht.

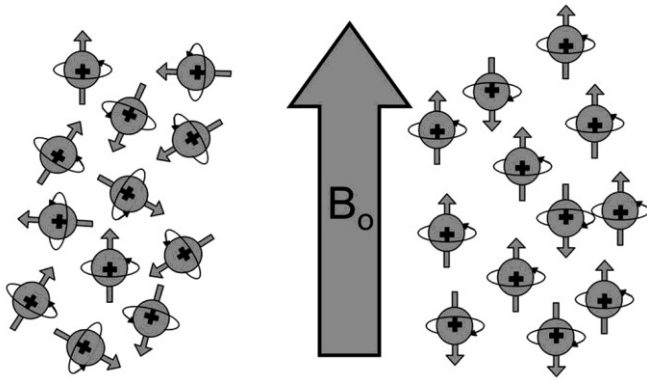


Abb. 5: Ausrichtung von Protonen ohne und unter einem Magnetfeld. Unter Normalbedingungen befinden sich die Protonen in einer zufälligen Orientierung. Das ändert sich, wenn sie einem starken Magnetfeld (B_0) ausgesetzt werden; dann werden sie entweder parallel oder antiparallel zum äußeren Magnetfeld ausgerichtet. (aus Pooley, 2005)

1.2.2. Relaxation

Den Übergang eines Systems von einem Anregungs- hin zum Gleichgewichtszustand bezeichnet man als Relaxation. Es werden 2 Relaxationsformen unterschieden: Längs- oder Spin-Gitter-Relaxation (T_1) und Quer- oder Spin-Spin-Relaxation (T_2). Die Spin-Gitter-Relaxation ist ein Prozess, der die Energieabgabe der durch die Radiofrequenz angeregten Kerne an deren Umgebung (das Gitter) beschreibt. Die Relaxationszeit T_1 ist die Zeit, die M_z braucht, um wieder 63 % der Gleichgewichtsmagnetisierung M_0 zu erreichen (Abb. 6).

Die Spin-Spin-Relaxation ist ein Prozess, der die Ordnung, die nach einem Radiofrequenzimpuls herrscht, zerstört. Die einzelnen Kerne verlieren ihre synchrone Anordnung und rotieren in der Transversalebene mit verschiedenen Geschwindigkeiten. Die T_2 -Relaxation ist die Zeit, bis zu der die xy -Komponente des magnetischen Moments auf ca. 37 % ihres Anfangswerts unmittelbar nach der Anregung abgefallen ist. T_2 ist stets kürzer als T_1 .

Zur Erklärung der Querrelaxation wird die Quermagnetisierung M_{xy} in verschiedene Magnetisierungskomponenten zerlegt, die aufgrund der lokalen fluktuierenden Felder mit unterschiedlichen Larmorfrequenzen präzedieren. Unmittelbar nach der Anregung zeigen alle Komponenten in die gleiche Richtung, danach präzedieren einige Komponenten schneller, andere langsamer, sodass es zu einer Dephasierung der Anteile kommt und die resultierende Quermagnetisierung abnimmt.

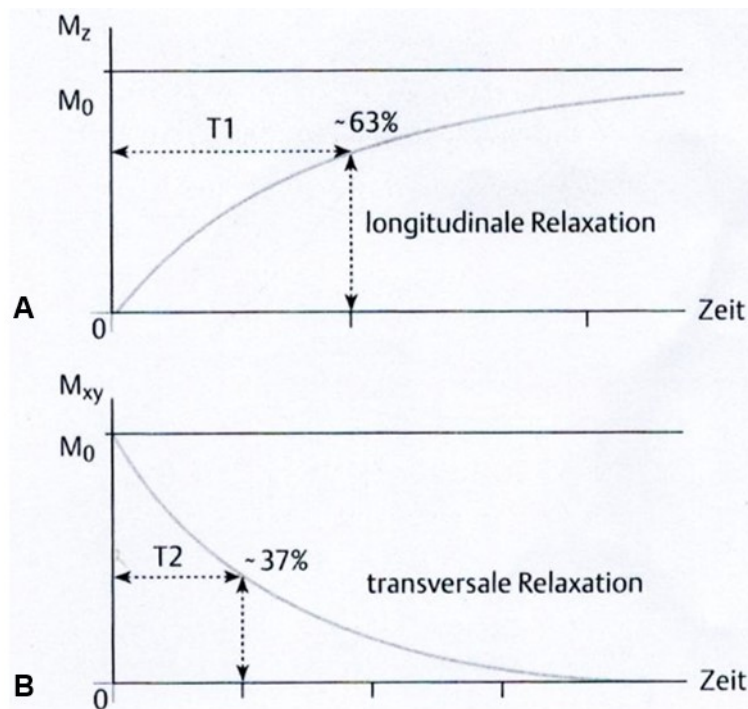


Abb. 6: Relaxation der Längs- und Quermagnetisierung. In der T_1 -Relaxationszeit ist die Längsmagnetisierung M_z nach der Anregung wieder auf 63 % des Gleichgewichtswertes M_0 angestiegen (A). In der T_2 -Relaxationszeit ist die Quermagnetisierung M_{xy} auf 37 % ihres ursprünglichen Wertes abgefallen (B). (aus Bücheler *et al.*, 2006)

Bei Messungen und MR-Untersuchungen ließ sich beobachten, dass dieselbe Probe bei gleicher Feldstärke 2 verschiedene T_2 -Relaxationszeiten aufweisen kann. Verantwortlich dafür sind 2 Effekte: erstens die Dephasierung von Komponenten der Quermagnetisierung, zweitens Störungen im statischen Hauptmagnetfeld B_0 , sog. Feldinhomogenitäten. Die beiden Effekte überlagern sich. Dadurch zerfällt das beobachtete Signal schneller als in T_2 . Dieser Vorgang wird als T_2^* (T-zwei-Stern) bezeichnet.

1.2.3. Sequenzen

Eine bestimmte Abfolge von HF-Impulsen (Pulsen), die üblicherweise wiederholt wird, bezeichnet man als Impulssequenzen (Pulssequenzen). Es gibt eine große Vielzahl von Sequenzen, die seit der klinischen Einführung des MRI 1984/85 entwickelt wurden. Generell kann zwischen den Spin-Echo-(SE-) und den Gradienten-Echo-(GE-)Sequenzen unterschieden werden, die überwiegend genutzt werden. Die wichtigsten Größen werden hier im Zusammenhang erläutert. Die Echozeit (TE, engl. *echo time*) ist die Zeit zwischen dem HF-Puls und dem Ausleseintervall. Die Repetitionszeit (TR, engl. *repetition*

time) ist die Zeit zwischen aufeinanderfolgenden HF-Pulsen. Durch Änderung der TR- und TE-Zeiten kann die relative Signalintensität unterschiedlicher Organe beeinflusst werden. Die Datenerfassung bei der MR-Bildgebung wird als Akquisition bezeichnet.

1.3. Magnetismus

Physikalisch sind alle Stoffe magnetisch. Die elementaren Träger des Magnetismus sind die um den Kern sowie ihre eigene Achse rotierenden Elektronen, die ein magnetisches Moment erzeugen. Das magnetische Moment eines Atoms setzt sich aus verschiedenen Teilmomenten zusammen: Spinmomenten, Bahnmomenten und Kernmomenten. Letztere sind häufig von untergeordneter Bedeutung.

1.3.1. Dia- und Paramagnetismus

Beim Dia- und Paramagnetismus handelt sich um die magnetischen Eigenschaften eines einzelnen Atoms. Im Gegensatz dazu steht der „kollektive“ Magnetismus, bei dem man sich die magnetischen Eigenschaften nicht nur eines Atoms, sondern eines ganzen Atomverbands anschaut.

Wenn man einen Körper in ein homogenes magnetisches Feld einbringt, wird der Stoff entweder in das Magnetfeld hineingezogen (die magnetischen Feldlinien im Körper werden verdichtet) oder von einem Magnetfeld abgestoßen (die Feldlinien werden aus dem Körper hinaus gedrängt (siehe Abb. 7)). Der erste Fall wird als Paramagnetismus bezeichnet, letzterer als Diamagnetismus. Sind die Anzahl der Elektronen sowie ihre Bewegungsrichtung so aufeinander abgestimmt, dass es zu einer Kompensation der Bahn- und Spinmomente kommt, z. B. durch Bildung von Elektronenpaaren, ist das Atom diamagnetisch. In solchen Stoffen entsteht ein magnetisches Moment erst durch ein äußeres magnetisches Feld, das eine Präzessionsbewegung der Bahnebenen, d. h. eine Drehbewegung der Kreiselachse um die Vertikale, verursacht. Besitzen Atome, Moleküle oder Ionen ungepaarte Elektronen, ist der Stoff paramagnetisch. In Abwesenheit eines äußeren Magnetfelds ist die Magnetisierung eines Paramagneten gleich 0, da die stets vorhandene thermische Energie eine statistische Ausrichtung der magnetischen Momente bewirkt. Wird ein magnetisches Feld angelegt und in seiner Stärke langsam erhöht, richten sich die Momente zunehmend aus, was in einem langsamen Anstieg der Magnetisierung und einer positiven Suszeptibilität resultiert. Magnetische Suszeptibilität ist eine physikalische Größe und entspricht dem Verhältnis induzierter Magnetisierung einer Substanz zur magnetischen Feldstärke. Sie gibt die Magnetisierbarkeit von Materie

in einem externen Magnetfeld an und ist dimensionslos. Experimentell ist die Magnetisierung bei nicht zu großen Feldstärken proportional zu Feldstärke. Generell kann sie von vielen Parametern abhängig sein: vom Ort, der Frequenz des Magnetfelds und Vorhergehen der Magnetisierung. Paramagnetischen Materialien haben Suszeptibilitäten, die proportional zur Feldstärke und nicht gesättigt sind.

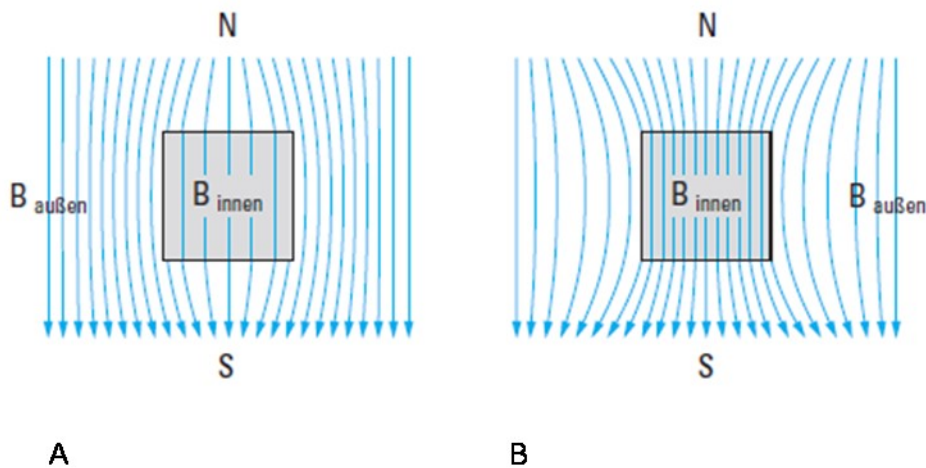


Abb. 7: Darstellung eines diamagnetischen (A) und eines paramagnetischen (B) Stoffes in einem homogenen Magnetfeld. Beim Einbringen eines Körpers in ein homogenes Magnetfeld ist im Inneren des Körpers nicht $B_{\text{außen}}$, sondern B_{innen} vorhanden. (aus Riedel & Janiak, 2011)

1.3.2. Kooperativer Magnetismus

Beim kooperativen Magnetismus werden die magnetischen Eigenschaften der Atome miteinander gekoppelt und können so nach außen hin ein größeres magnetisches Moment zeigen. Ferromagnetismus ist ein typisches kooperatives magnetisches Phänomen, welches nur bei Festkörpern auftritt. Beim Ferromagnetismus kommt es über die Austauschwechselwirkung der Elektronenspins zu einer Stabilisierung der parallelen Ausrichtung benachbarter Spins der Atome. Dies führt dazu, dass ein Ferromagnet in einem Magnetfeld selbst magnetisch wird. Ein Ferromagnet verstärkt ein äußeres Magnetfeld durch die eigene Magnetisierung. Oberhalb einer kritischen Temperatur, der Curie-Temperatur T_C , verschwindet der Ferromagnetismus. Ab dieser Temperatur wird ein Ferromagnet paramagnetisch. Ferromagnetismus tritt nur bei wenigen Stoffen auf. Er ist lediglich bei den 3d-Übergangsmetallen Fe ($T_C = 1043$ K), Ni ($T_C = 627$ K), Co ($T_C = 1388$ K) und bei den Lanthaniden Gd ($T_C = 292$ K) und Dy ($T_C = 88$ K) (Kittel, 1999) bekannt. In einem Antiferromagneten sind die magnetischen Momente antiparallel ausgerichtet;

sie kompensieren sich zu 0. Bei den Antiferromagneten gibt es ebenfalls eine charakteristische Temperatur, die Neel-Temperatur T_N , oberhalb derer ein Antiferromagnet paramagnetisch wird. Zu dieser Stoffgruppe zählen z. B. MnO, MnS, MnSe, MnF₂, FeO, FeCl₂, CoO, NiO, Cr. Beim Ferrimagnetismus kompensieren sich die magnetischen Eigenschaften der verschiedenen Untergitter nicht vollständig, daher verhalten sich Ferrimagnete wie schwächere Ferromagnete. Die bekanntesten ferrimagnetischen Materialien sind die Ferrite, die in kubische und hexagonale unterteilt werden können. Kubische Ferrite haben die allgemeine Zusammensetzung $MO \times Fe_2O_3$ (MFe_2O_4), wobei M ein divalentes Kation wie Ni²⁺, Co²⁺, Mn²⁺ oder Fe²⁺ ist. Der bekannteste Vertreter ist das Magnetit (Fe₃O₄).

1.3.3. Superparamagnetismus

Die magnetischen Momente der Atome richten sich in ferrimagnetischen Stoffen über größere Kristallbereiche zueinander aus. Dadurch treten in einem ferrimagnetischen Material Bereiche mit einem resultierenden magnetischen Moment auf, die als Domänen oder Weiß'sche Bezirke (Abb. 8) bezeichnet werden. Werden die Domänen durch Einfluss äußerer Felder ausgerichtet, bekommen die Substanzen selbst magnetische Eigenschaften. Eine wichtige Besonderheit magnetischer NP, der Superparamagnetismus, ergibt sich aus ihrer Größe. Bei größeren Teilchendurchmessern ist ein ferrimagnetischer Stoff in mehrere Bereiche aufgeteilt, die durch Domänenwände getrennt sind. Sind die Partikel klein genug (bei Fe₃O₄ < 150 nm) werden keine Weiß'schen Bezirke mehr ausgebildet, da dies energetisch nachteilig wäre. Es liegen Eindomänenpartikel vor, die nur noch aus einem magnetischen Bezirk bestehen und die deutlich höhere magnetische Momente als entsprechende paramagnetische Materialien haben. Deshalb werden diese als superparamagnetisch bezeichnet. Magnetische Domänen treten nicht nur in Ferrimagneten auf, sondern auch in Ferro- und Antiferromagneten.

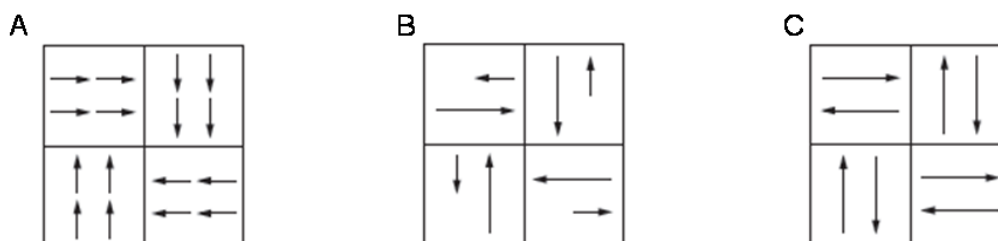


Abb. 8: Schematische Darstellung der Weiß'schen Bezirke in Ferromagneten (A), Ferrimagneten (B) und Antiferromagneten (C). Innerhalb dieser Domänen sind die magnetischen Momente ausgerichtet und die spontane Magnetisierung entspricht der Sättigungsmagnetisierung. Allerdings zeigt die Magnetisierung in verschiedenen Domänen in unterschiedliche Richtungen, sodass sich die Magnetisierungen der einzelnen Domänen nach außen aufheben können. (aus Riedel & Janiak, 2011)

Superparamagnetische Materialien können als thermodynamisch unabhängige Eindomänenpartikel angesehen werden. Die Suszeptibilität superparamagnetischer und ferromagnetischer Materialien steigt bei niedrigen Feldstärken linear an, bei höheren Feldstärken wird sie gesättigt. Superparamagnetische Substanzen haben höhere Suszeptibilitäten als paramagnetische Substanzen aufgrund der magnetischen Ordnung der Spins ungepaarter Elektronen von Eisen in der Kristallstruktur. Die Kristallstruktur des Magnetits resultiert in einer einzigartigen Empfindlichkeit zum äußeren Magnetfeld. Dieses fordert die Ausrichtung von benachbarten Spins zu diesem Feld sogar bei sehr niedriger Feldstärke, weshalb die Suszeptibilität pro Eisenatom 10- bis 1000-mal stärker ist als die magnetische Suszeptibilität normaler paramagnetischer Ionen. Superparamagnetische Materialien haben kein „magnetischen Gedächtnis“ und zeigen somit im Gegensatz zu Ferromagneten keine Restmagnetisierung.

1.4. MR-Kontrastmittel

Als Kontrastmittel (KM) bezeichnet man ein paramagnetisches Element (z.B. Mn, Gd oder Fe), das zur Intensitätsveränderung des Signals und damit möglichst zur Kontrasterhöhung in der MRT führt. In Deutschland sind KM Arzneimittel nach § 2 Abs. 1 Nr. 2 des Arzneimittelgesetzes (AMG). Nach der europäischen Richtlinie über *In-vitro*-Diagnostika (IVD) gelten KM als Medizinprodukte. Medizinprodukte unterscheiden sich von Arzneimitteln darin, dass sie keine pharmakologische Wirkung haben, sondern meist physikalisch wirken. Im Folgenden wird die Klassifikation der MR-KM anhand zweier Parameter beschrieben. Unterschieden wird zum einen anhand des Effekts des KMs auf die Signalintensität (positive Verstärkung oder longitudinale Relaxation und negative Verstärkung oder transversale Relaxation). Alle KM verkürzen sowohl die T_1 - als auch die T_2 -Relaxationszeiten (Caravan, 2006). Wichtig ist, welche Relaxationszeit in größerem Ausmaß verändert wird. Positive (sog. Relaxivitäts- oder T_1 -verstärkende) KM führen zu einer Verkürzung der T_1 -Relaxationszeit und verstärken die Signalintensität bei T_1 -gewichteten Sequenzen. Positive KM reduzieren die T_1 -Relaxivität stärker als die T_2 -Relaxivität. Negative (sog. T_2 -verstärkende oder Suszeptibilitäts-)KM verkürzen die T_2 -Relaxationszeit und verringern die Signalintensität bei T_2 -gewichteten Sequenzen. Negative KM zeigen bis zu einem gewissen Grade auch einen T_1 -Effekt. Man verwendet auch den reziproken Wert der Relaxationszeiten und spricht dann von Relaxationsraten (R_1 , R_2).

$$R_{1,2} = \frac{1}{T_{1,2}}$$

-Formel 3-

Relaxationsraten $R_{1,2}$ [s^{-1}]

Als Maß für die Wirksamkeit eines Kontrastmittels, welches unabhängig von dessen Konzentration ist, wird die Relaxivität (r_1 -Relaxivität bzw. r_2 -Relaxivität) mit der Einheit $mM^{-1}s^{-1}$ verwendet. Die Berechnung der Relaxivität erfolgt nach der Formel:

$$r_{1,2} = \frac{R_{1,2} - R^0_{1,2}}{c}$$

-Formel 4-

Relaxationsraten vor Kontrastmittelgabe R^0_1, R^0_2

Konzentration des Kontrastmittels c [mM]

Die Suszeptibilität ist ein Maß für die Magnetisierbarkeit von Materie. Sie wird als das Verhältnis von induzierter Magnetisierung zu dem von außen angelegten Feld definiert und ist auf die Existenz der ungepaarten Elektronen zurückzuführen (Adamek & Lauenstein, 2009). Die zweite Klassifizierung erfolgt anhand des Verteilungsmusters im Körper (extrazellulär, intrazellulär oder intravaskulär). Abb. 9 liefert einen Überblick über die verschiedenen MRT-KM.

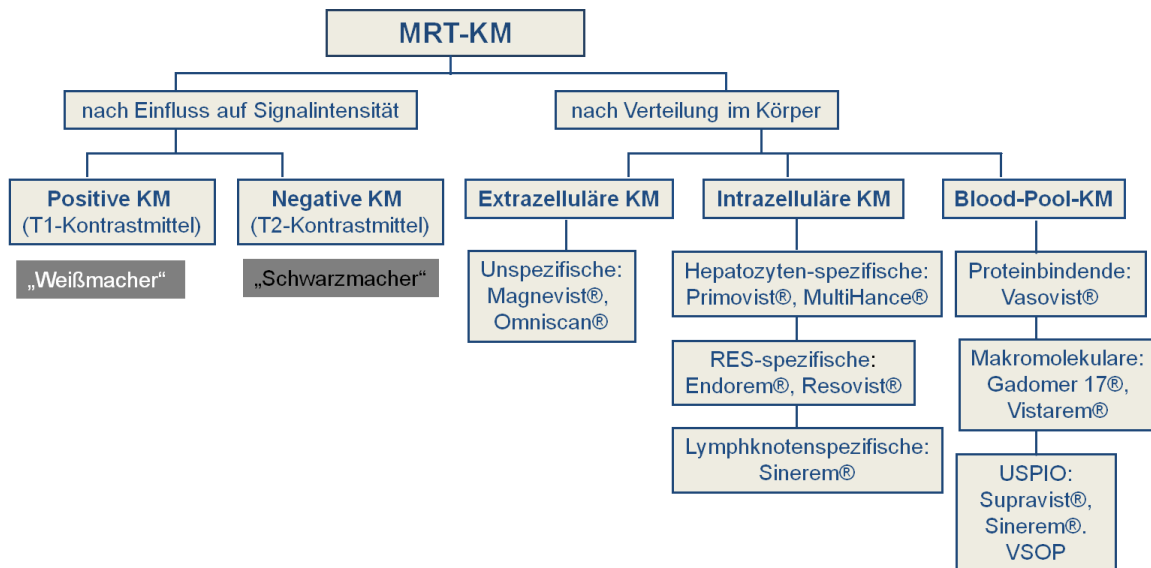


Abb. 9: Schematische Darstellung der Einteilung von MRT-KM in verschiedene Gruppen.

1.4.1. Extrazelluläre KM

Extrazelluläre Kontrastmittel können ungehindert aus dem Intravaskularraum in das Interstitium diffundieren. Dort verhalten sie sich inert, d. h., weder binden sie an andere

Moleküle, noch passieren sie intakte Zellmembranen. Zum Einsatz kommen extrazelluläre Kontrastmittel mit Gadolinium (Gd) als paramagnetisches Zentrum. Dabei werden Gadolinium(III)-Verbindungen intravenös appliziert. Wegen der starken Toxizität freier Gadoliniumionen setzt man Komplexierungsmittel mit einer hohen Komplexierungskonstante ein, beispielsweise die Chelate Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) und 1,4,7,10-Tetraazacyclododecantetraessigsäure (DOTA). Den Gd(III)-Komplex mit DOTA bezeichnet man als Gadotersäure. Die meisten Substanzen sind hydrophil und werden nahezu ausschließlich über die Niere ausgeschieden (Magnevist®, Omniscan®). Die Halbwertszeit all dieser Substanzen im Blut beträgt ca. 90 min (Vogler, 2006). Blut-Hirn- und Blut-Plazenta-Schranke werden nicht durchdrungen.

1.4.2. Intrazelluläre KM

Intrazelluläre KM bestehen aus freien Ionen, die über selektive Membrantransportmechanismen ins Zellinnere aufgenommen werden. Darunter gibt es hepatocytenspezifische (oder hepatobiliäre), RES- und lymphknotenspezifische KM. Hepatocytenspezifische KM werden nach intravenöser Applikation von Hepatocyten aufgenommen und primär biliär eliminiert. Sie reichern sich vorwiegend im gesunden Leberparenchym an, weshalb sie sich für die Detektion von malignen Lebertumoren eignen. Primovist® und MultiHance® verkürzen die T_1 -Relaxationszeit und bewirken einen Signalanstieg in der Leber. Die Kontrastmittelpartikel werden vom RES phagozytiert und führen im abgebildeten normalen Gewebe zu einem Signalintensitätsverlust. Klinisch zugelassene Vertreter dieser Kontrastmittelgruppe sind Endorem® und Resovist®. Lymphknotenspezifische KM wie das Sinerem® gelangen nach subkutaner, intralymphatischer oder intravenöser Applikation auf dem Lymph- oder Blutweg in die Lymphknoten, wo sie in analoger Weise zu einer Signalminderung von gesundem oder hyperplastischem, nicht jedoch von metastatisch verändertem Gewebe führen.

1.4.3. RES und MPS

Das RES ist die Gesamtheit aller Zellen des retikulären Bindegewebes, einschließlich derer, die zur Phagozytose fähig sind. Retikuläres Bindegewebe findet sich in Milz, Tonsillen, Lymphknoten, Knochenmark sowie in der *Lamina propria* des Darms und in der Leber.

Der Begriff RES wurde von L. Aschoff (1924) vorgeschlagen. Hierbei werden die Zellen unabhängig von der Herkunft nur nach ihrer Funktion zusammengefasst. Das MPS (mononukleäres Phagocytosesystem) ist eine relativ neue Nomenklatur, die 1972 von einer Gruppe von Pathologen aufgrund verschiedener Kriterien, wie Morphologie, Enzymausstattung, Oberflächenrezeptoren, Phagozytose, entworfen wurde (van Furth *et al.*, 1972). Dabei werden die Zellen anhand ihrer Herkunft aus dem Knochenmark zusammengefasst. Diese Begriffe werden trotz ihrer Unterschiedlichkeit oftmals synonym verwendet.

1.4.4. Blood-Pool-KM

Intravaskuläre KM (auch Blood-Pool-KM genannt) können in gesundem Gewebe den Intravaskularraum nicht verlassen. Die meisten paramagnetischen KM basieren auf Gadolinium, wohingegen die superparamagnetischen KM Eisenoxidpartikel sind. Zur Gruppe der Blood-Pool-KM gehören proteinbindende, makromolekulare KM und USPIO (engl. *ultrasmall superparamagnetic iron oxide*). Vasovist® ist ein Vertreter der proteinbindenden KM und ein Gd-Komplex mit einer zusätzlichen lipophilen Seitengruppe, die eine reversible Bindung an Plasmaalbumin bewirkt. Bei dieser Kontrastmittelgruppe kommt es in unterschiedlichem Ausmaß zu einer reversiblen Affinität zu Plasmaproteinen, die mit einer Erhöhung der Relaxivität im Plasma assoziiert ist. Aufgrund des Molekulargewichts von makromolekularen KM (> 6000 Da) diffundieren diese Blood-Pool-KM nicht oder nur in ganz geringem Ausmaß durch das vaskuläre Endothel. Vistarem® hat zwar ein Molekulargewicht von ca. 5000 Da, durch seine Neigung zur Selbstaggregation werden jedoch größere Molekularverbände erzeugt. Durch die Partikelgröße der USPIO wird deren Eliminierung verzögert bzw. deren intravasale Verweildauer verlängert. VSOP (engl. *very small iron oxide particles*) stellen eine neue Art von USPIO als Blood-Pool-KM dar. Durch die Beschichtung mit einem Monomer (Citrat) wurden sehr kleine SPIO-Partikel (VSOP) hergestellt. Sie haben einen Gesamtdurchmesser von unter 10 nm und eine enge Größenverteilung (Taupitz *et al.*, 2004). Hinsichtlich ihrer physikalischen und biologischen Eigenschaften zeichnen sich VSOP infolge ihrer T1-Relaxationszeitverkürzung durch ein hohes intravaskuläres Signal und infolge der geringen Extravasation durch einen lang anhaltenden Kontrast aus (Taupitz *et al.*, 2000).

1.4.5. Superparamagnetische Eisenoxidpartikel (SPIOs)

Schon seit mehreren Jahren werden auf dem Gebiet der MR-Bildgebung neue MRT-Kontrastmittel erforscht. Es wurden SPIO-Partikeln bestehend aus Eisenoxiden, z. B. Magnetit (Fe_3O_4) oder Maghemit ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$), oder anderen in Wasser unlöslichen Ferriten entwickelt (Weissleder & Papisov, 1992; Bonnemain 1998). Die Eisenoxidpartikel haben gewöhnlich eine Kern-Hülle-Struktur. Das Eisenoxid bildet kubische Kristalle, die den Kern der NP ausmachen. SPIO-Partikel (Ferumoxide, Ferucarbotran) sind biokompatibel und nicht toxisch, sie werden bei der Diagnostik von fokalen Leberläsionen und kolorektalen Metastasen eingesetzt. Zudem sind sie ideale Marker und Tracer für die zellbasierte Therapie. Um eine Aggregation zu verhindern und eine Stabilisierung zu gewährleisten, sind SPIO-Partikel mit unterschiedlichen Polymeren beschichtet. Man verwendet SPIO als intrazelluläres KM für das Zelltracking *in vivo*. Ferumoxide sind negativ geladene SPIO-Partikel, die sich schwer an der Zellmembran anheften lassen. Polykationische Transfektionsagenzien (TA) wiederum binden über eine elektrostatische Interaktion an Dextran (Kalish *et al.*, 2003). Bei den dextranbeschichteten NP ist Dextran nichtkovalent an Eisenoxid gebunden. Vermutlich wird die Dextranhülle an das Eisenoxid durch Wasserstoffbindungen zwischen den Hydroxylgruppen des Polymers und der Eisenoxidoberfläche gebunden.

Man hat sehr erfolgreich SPIO-TA-Komplexe für die magnetische Markierung von Stammzellen verwendet. Diese Komplexe waren effizient bei der zellulären Internalisierung (Bulte & Kraitchman 2004; Liu *et al.*, 2009; Thorek & Tsourkas, 2008). Um die zelluläre Aufnahme und Spezifität von Eisenoxidpartikeln zu steigern, werden diese auch mit kleinen Peptiden (Tat-Protein des HIV) konjugiert (Josephson *et al.*, 1999; Lewin *et al.*, 2000) oder mit Antikörpern (Ahrens *et al.*, 2003; Chen, G. *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2007), Lektinen (Bulte *et al.*, 1996) bzw. Dendrimeren (Bulte *et al.*, 2001; Bulte *et al.*, 2002a) gekoppelt. Diese Modifizierungen können jedoch die biologischen Funktionen der Stammzellen beeinträchtigen. Aus diesem Grund ist die genaue Untersuchung der physikalischen und biologischen Eigenschaften neuer modifizierter Partikel essenziell.

Anhand ihrer Größe können Eisenoxidpartikel in SPIO mit einer Partikelgröße von über 50 nm und in USPIO mit einer Partikelgröße von unter 50 nm unterteilt werden (Benderbous *et al.*, 1996; Taupitz *et al.*, 2003). USPIO-Partikel gehen durch Größenfraktionierung aus SPIO-Partikeln hervor. Monokristalline Eisenoxidnanopartikel (MION, engl. *monocrystalline iron oxide nanoparticles*) sind eine Gruppe von USPIO-Partikeln, die eine monokristalline Struktur (Weishaupt *et al.*, 2006) mit einem mittleren hydrodynamischen

Durchmesser von 20 – 45 nm haben (Tassa *et al.*, 2011). CLIO (engl. *cross-linked iron oxide*) wiederum ist eine Form von MION mit einer quer vernetzten Dextranbeschichtung. (Wang *et al.*, 2001; Tassa *et al.*, 2011). Polykristalline Eisenoxidpartikel sind magnetische Eisenoxidpartikel, die aus mehreren (mindestens 2) zusammenhängenden Kristallen bestehen. Die herkömmlichen partikulären KM setzen sich aus mehreren, in ihrer Struktur variablen Eisenkernen und einer aus Polymeren aufgebauten Hülle (sog. *coating*) zusammen. Der SPIO-Kern ist vorwiegend aus Fe_3O_4 und Fe_2O_3 zusammengesetzt. Beide Eisenoxide besitzen ähnliche Gitterparameter. Kubisch flächenzentrierter Magnetit mit einer Gitterkonstante von 0,8396 nm enthält sowohl dreiwertiges als auch zweiwertiges Eisen. Maghemit hat ebenfalls ein kubisch flächenzentriertes Gitter mit einem Gitterparameter von 0,8346 nm. Das Fehlen von Fe^{2+} wird durch die Bildung statistischer Fehlstellen im Oktaederlückengitter ausgeglichen. Magnetit kann zur Maghemit oxidieren. Die schematische Struktur von SPIO-Partikeln ist in Abb. 10 zu sehen.

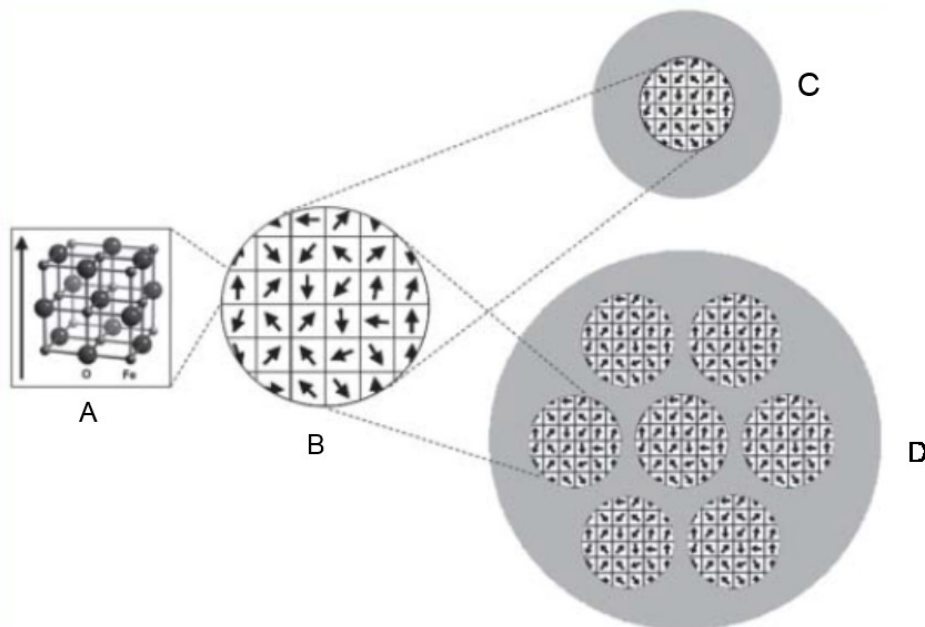


Abb. 10: Schematische Darstellung A) der Spinell-Kristallstruktur der SPIO-Domäne, B) eines SPIO-Kristalls mit mehreren magnetischen Domänen in zufälliger Orientierung, C) und D) eines vollständigen SPIO-KM mit Hülle. Fehlt ein magnetisches Feld, sind die magnetischen Momente zufällig ausgerichtet. Die magnetischen Domänen der Kristallstruktur des Eisenoxids bilden den SPIO-Kern/Kristall. Diese können mit einem stabilen Material beschichtet sein und so monokristalline (C) oder polykristalline (D) SPIO-Partikel bilden. (aus Wang *et al.*, 2001, modifiziert von Ittrich *et al.*, 2013)

Die beiden Strukturen werden als inverse Spinelle bezeichnet. Die Größe der Hülle schwankt dabei noch stärker als die der Eisenkerne und unterscheidet sich bei den einzelnen Kontrastmitteln je nach verwendetem Polymer (z. B. Dextrane, Polyethylenglycole) und der elektrischen Ladung. Die Funktion der Hülle besteht in erster Linie in der

Stabilisierung der Kontrastmittelteilchen in Lösung, da diese sonst unter physiologischen Bedingungen ausfallen würden. Weiterhin dient die Hülle der Reduktion des Ausmaßes der Adsorption von Proteinen und Zellen sowie der Maskierung von Oberflächeneigenschaften der Partikel. An die Hülle lagern sich Wassermoleküle an; dies wird bei der Bestimmung der mittleren hydrodynamischen Durchmesser mitberücksichtigt (Corot *et al.*, 2006).

Für die Erkennung durch das MPS sind die Oberflächenstruktur, die Ladung und die Größe ausschlaggebend. Je kleiner die Partikel sind, desto länger entgehen sie der Phagozytose beim Durchfluss durch Leber und Milz. So werden Partikel mit einem Durchmesser von unter 20 nm langsamer aus dem zirkulierenden Blut herausgefiltert und ermöglichen eine längere Bluthalbwertszeit. Auf der anderen Seite kann aufgrund der geringen Partikelgröße und der daraus resultierenden Bluthalbwertszeit eine Aufnahme in periphere Organe und die dortige Aufnahme durch Zellen des MPS, des Interstitiums und der Lymphknoten, stattfinden.

Die intrazelluläre Metabolisierung ist von der chemischen Zusammensetzung der Eisenoxidnanopartikel abhängig. Ferumoxtran-10 wurde in lysosomalen Kompartimenten der Makrophagen innerhalb von 7 Tagen vollständig abgebaut (Schulze *et al.*, 1995). Ferumoxtran wird in der Lymphknoten-Bildgebung verwendet und gehört zu den mit Dextran beschichteten USPIO-Partikeln. Die Dextranhülle wird von Dextranasen abgebaut und fast ausschließlich (89 % in 56 Tage) im Urin ausgeschieden. Eisen wird in die körpereigenen Eisenspeicher eingebaut, nach Markierung mit radioaktivem ^{59}Fe wurde es in den roten Blutkörperchen (Hämoglobin) gefunden. Ferritin ist eine Form der physiologischen Speicherung von Eisen (Speicherprotein). Ein Anstieg der Ferritin- und Transferrinwerte wurde in mehreren Studien nachgewiesen (Taylor *et al.*, 1999; Taupitz *et al.*, 2004). Ähnlich wie beim endogenen Eisen werden nur 16 – 21 % des aufgenommenen Eisens 84 Tage nach der SPIO-Injektion über den Fäzes ausgeschieden. Derselbe Metabolisierungsweg wurde für Ferumoxide beschrieben (Weissleder *et al.*, 1990). Es ist nicht immer möglich, die Pharmakokinetik, das metabolische Profil oder die subzelluläre Verteilung einer bestimmten Art von Eisenoxidnanopartikeln vorherzusagen, da ihre Beschichtungen großen Unterschieden unterliegen.

1.5. Zetapotential

Das Zetapotential spielt eine wichtige Rolle bei der elektrokinetischen Charakterisierung von Festkörper-Flüssigkeit-Verbindungen und wird als elektrisches Potential an der

Scherebene in der diffusen Schicht definiert (Abb. 11). Das Zetapotential ist eine Funktion der Ladungsdichte der Oberfläche, der Lokalisierung der Scherebene und der Struktur der Oberfläche. Letztere dient als sehr wichtiger Parameter für zahlreiche Eigenschaften dispergierter Materialien. Die Ladungsdichte wird als Differenz der Konzentrationen von Gegen- und Co-Ionen definiert. Sie sinkt mit zunehmender Entfernung von der Oberfläche des Partikels. Eine fundamentale Eigenschaft einer Metalloxydoberfläche ist ihre Tendenz, im Kontakt mit Wasser eine Oberflächenladung zu bilden. Das induziert elektrostatische Effekte in der Nachbarschaft der geladenen Partikel. Diese Nettoladung der Partikel beeinflusst die Verteilung umgebender Ionen, sodass die Konzentration von Gegenionen in Umgebung der Partikel steigt. Das bedeutet, dass die Ausdehnung der Doppelschicht von der ionischen Kraft der Lösung abhängt (Hunter *et al.*, 2001). Die Doppelschicht besteht aus einer starren (Helmholtz-)Schicht und einer diffusen Komponente (Abb. 11). Die diffuse Schicht besteht wiederum aus Gegenionen.

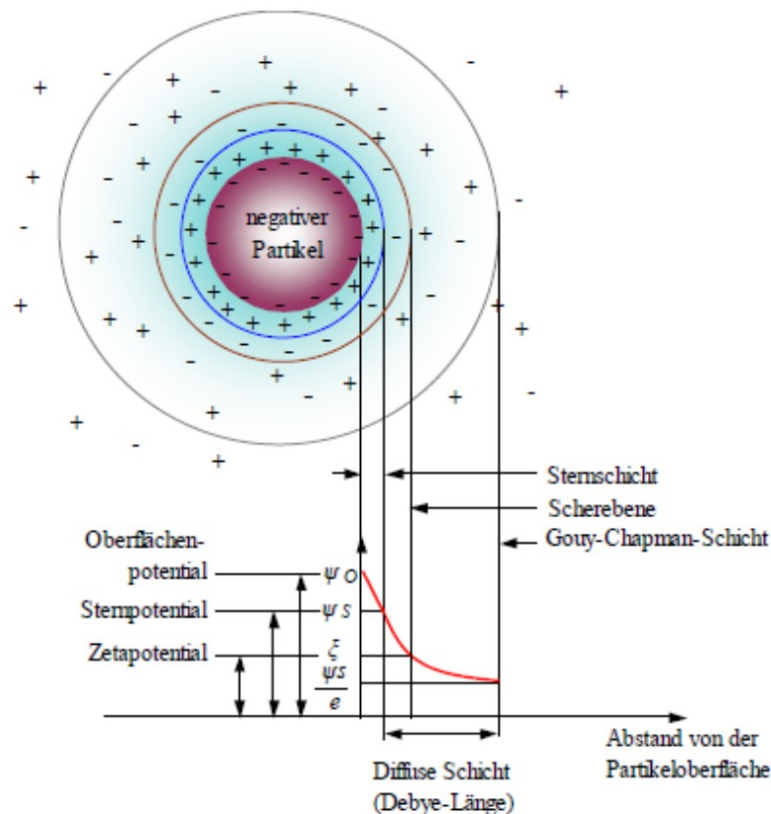


Abb. 11: Modell des Aufbaus der elektrochemischen Doppelschicht nach Stern. Wenn sich die Partikel in einer elektrolytischen Suspension befinden, bildet sich um die meist negativ geladenen Partikel eine elektrochemische Doppelschicht aus, die für die elektrostatische Abstoßung der Partikel untereinander verantwortlich ist. (aus Lagaly, 1997)

Die Ladungsstruktur wird als elektrochemische Doppelschicht definiert. Nach der starren Helmholtz-Schicht folgt ein diffuser Teil. Die Anionen oder Kationen werden an den kolloidalen Teilchen adsorbiert und bilden die teils starre, teils diffuse elektrochemische Doppelschicht. So wird rund um das Teilchen eine Ladungswolke gebildet. Diese positiven oder negativen Überschussladungen bewirken die abstoßenden Eigenschaften der Kolloide und sind für die Stabilität der Dispersionen verantwortlich.

Bei einer großen elektrochemischen Doppelschicht überwiegen die Abstoßungskräfte. Nach dem Hinzufügen von Elektrolyten zur kolloidalen Dispersion wird die Doppelschicht verkleinert, die Teilchen nähern sich an. Infolge weiterer Zugabe von Elektrolyten wird die elektrochemische Doppelschicht weiter komprimiert, Anziehungskräfte werden wirksam und es kommt zur Agglomeration der Teilchen.

Die Dicke der Doppelschicht ist von der Art der Ionen und ihrer Konzentration in der Lösung abhängig. Wenn sich die Elektrolytkonzentration ändert, kommt es zu Veränderungen in der Lokalisierung der Scherebene, entweder durch Veränderungen in der Dicke und Polarisierung der Doppelschicht oder durch eine Modifizierung der Oberflächenmorphologie. Wenn sich ein Partikel in einer Elektrolytlösung bewegt, wird mit dem Partikel auch eine dünne Flüssigkeitsschicht bewegt. Die Schicht zwischen beweglicher und nicht beweglicher Flüssigkeit wird als Gleitebene definiert.

Das Zetapotential ist ein Maß für die Oberflächenladung eines Teilchens in Lösung. Bei einem zu niedrigen Zetapotential tritt eine Agglomeration zwischen den Partikeln ein. Die Höhe des Zetapotentials wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, dazu gehören u. a. der pH-Wert, die Ionenkonzentration in der Lösung und die Art der oberflächenaktiven Substanzen. Für polare Lösungsmittel und kleine diffuse Schichten gilt die Smoluchowski-Gleichung (Thode *et al.*, 2000), für unpolare Lösungsmittel und große diffuse Schichten gilt die Hückel-Gleichung. Beide Gleichungen sind von der Henry-Gleichung abgeleitet.

Die Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek-(DLVO-)Theorie beschäftigt sich mit der Stabilität kolloidaler Systeme und betrachtet unterschiedliche anziehende und abstoßende Wechselwirkungsenergien. Nach dieser Theorie ist die Stabilität magnetischer Kolloide in Abwesenheit eines externen magnetischen Felds (Janssen *et al.*, 1990) vom Gleichgewicht zwischen Anziehungs- (Dipol-Dipol-, VDW-Wechselwirkungen) und Abstoßungskräften (sterische und elektrostatische Wechselwirkungen) abhängig. Dieses Gleichgewicht wird als Gesamtwechselwirkungspotential bezeichnet oder als energetische Barriere zwischen kolloidalen Partikeln (Valle-Delgado *et al.*, 2003). Dieses Ge-

samtwechselwirkungspotential ist u. a. von dem elektrischen Potential der Partikeloberfläche, der Elektrolytkonzentration im Medium, der Valenz der Gegenionen, der Partikelgröße sowie der Hamaker-Konstante abhängig. Die elektrostatische Wechselwirkungsenergie ist abhängig von der Elektrolytkonzentration, während die Anziehungskräfte nur von der spezifischen Natur der Partikel abhängig sind. Die Stabilität kolloidaler Dispersionen kann anhand der Veränderungen der Ionenkräfte in Lösung geprüft werden. Ist die sterische Stabilität der Partikel nicht ausreichend vorhanden, führt eine Erhöhung der Elektrolytkonzentration zu einer signifikanten Verringerung der Doppelschicht und folglich des Gesamtwechselwirkungspotentials.

Da die Stabilität auf der Partikeloberfläche eine hohe Ionenkraftempfindlichkeit und eine schwache Elektrolytresistenz zeigt, kann die Flockung eines Kolloids mittels sterischer Stabilisierung vermindert werden. Die modifizierten Partikel sind dann unabhängig von Ionenstärke und Ladung der vorhandenen Ladungsträger. Dadurch ist selbst bei höherem Salzgehalt und in einem breiten pH-Spektrum die Stabilität gewährleistet. Ein effizientes Coating magnetischer Partikel kann zu einer kombinierten elektrostatischen und sterischen (elektrosterischen) Stabilität führen (Ortega-Vinuesa *et al.*, 1996). Durch diese Kombination wurde die kolloidale Stabilität signifikant verbessert.

Bei sterisch oder elektrosterisch stabilisierten Partikeln kommt es an der Oberfläche zur Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht. Das Zetapotential wird durch die Bewegung des Partikels durch das Medium hervorgerufen. Hierbei bewegt sich das Partikel mit der Helmholtz-Schicht (starr) und einem Teil der diffusen Schicht. Das Zetapotential ist die Potentialdifferenz zwischen dem stationären und dem beweglichen Teil der elektrochemischen Doppelschicht. Die elektrostatische Stabilisierung ist dann gegeben, wenn die Resultierende aus den Abstoßungs- und den Anziehungskräften positive Werte annimmt, die Abstoßungskräfte werden infolge der Wirkung der elektrochemischen Doppelschicht überwiegen. Die Koagulation ist ein Kriterium für die Stabilität oder Instabilität des kolloid-dispersen Systems. Eine Koagulation tritt dann auf, wenn durch Elektrolytzugabe die Dicke der elektrochemischen Doppelschicht verringert wird, sodass die Anziehungskräfte überwiegen.

Das Zetapotential ist ein wichtiger Parameter zur quantitativen Beschreibung der Ladungseigenschaften von Kolloidteilchen und Grenzphasen. Außerdem kann die Zellaufnahme der SPIO-Partikel vom Zetapotential abhängig sein.

1.6. Zielsetzung

Eine schnelle Entwicklung der zellbasierten Therapie fordert eine Optimierung vorhandener Detektionsmethoden, mittels derer die Zellmigration nach der Transplantation visualisiert werden kann. Die MRT wird für das *In-vivo*-Zelltracking eingesetzt, da so das Zellschicksal in präklinischen Studien nicht invasiv verfolgt und untersucht werden kann. Die Zellen sind aber nur nach einer magnetischen Markierung mit SPIO-Partikeln zu detektieren.

Die Experimente sollten mit 2 unterschiedlichen SPIO-Formulierungen (FeraSpin™ R und FeraTrack™ Direct Contrast Particles) durchgeführt werden, die sich in ihrer Größe, Oberflächenladung und Hüllenschicht unterscheiden.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Effizienz der Markierung mit SPIO-Partikeln in phagozytierenden (humane leukämische Monocyten-Zelllinie und Maus-Makrophagen-Zelllinie) und nicht phagozytierenden Zellen (humane mesenchymale Stammzellen) untersucht werden. Die Markierungsversuche wurden bei 2 phagozytierenden Zelllinien bei unterschiedlichen SPIO-Konzentrationen und verschiedenen Inkubationszeiten durchgeführt.

Die Zellen, die zur Phagozytose fähig sind, besitzen einen SR-A1-Rezeptor, der negativ geladene Partikel erkennen kann. Die Aufnahme kann sowohl durch SR-A1 als auch durch clathrinvermittelte Endocytose oder Pinocytose erfolgen. Deshalb werden von phagozytierenden Zellen sowohl negative als auch positive Partikel aufgenommen. FeraSpin™ R sind negativ geladene SPIO-Partikel, die für die Markierung von J774A.1- und THP-1-Zellen verwendet wurden.

Um die Aufnahme von nicht phagozytierenden Zellen zu erhöhen, erwiesen sich negativ geladene Partikel zusammen mit TA als effizient. Dabei wird die Ladung dieses Komplexes durch TA positiv im Gegensatz zu Ferumoxiden allein. Da viele Arbeiten einen negativen Einfluss von Ferumoxiden mit TA auf das osteogene oder das chondroge Differenzierungspotential zeigten, bleibt die Verwendung von TA umstritten. FeraTrack™ Direct sind positiv geladene SPIO-Partikel, die man effizient ohne Verwendung von TA für die SPIO-Markierung von Stammzellen einsetzen kann. Da eine magnetische Markierung der Stammzellen nur dann effizient ist, wenn das Überleben, die Proliferation und Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie die Multipotenz der Zellen nicht beeinträchtigt werden, wurde das Differenzierungspotential zu Adipocyten und Osteoblasten nach der Markierung mit neuen SPIO-Partikeln geprüft.

Weiterhin sollten Phantomstudien durchgeführt werden. Für die Charakterisierung und den Vergleich der in dieser Arbeit verwendeten SPIO-Partikel mit kommerziell erhältlichen KM wurden ihre Relaxivitätswerte bestimmt; es wurden die T_1 - und T_2 -Relaxationzeiten verschiedener eisenoxidhaltiger KM-Lösungen bei 7 T gemessen und das r_2/r_1 -Verhältnis bei unterschiedlichen Eisenkonzentrationen in Wasser und Mausplasma im 7-T-MRT ermittelt.

2. Untersuchung der Aufnahme von SPIO-Partikeln durch THP-1- und J774A.1-Zellen

2.1. Einleitung

Im Folgenden werden Mechanismen dargestellt, durch die NP in die Zelle aufgenommen werden und die durch die physikalischen Charakteristika der NP, ihre Interaktion mit der biologischen Umgebung und die Zellmembraneigenschaften bestimmt sind. Die Größe und Form der NP sowie deren Oberflächenladung und Hydrophobizität können den Aufnahmeweg beeinflussen. Bei modifizierten NP ist ihre Aufnahme von konjugierten Liganden abhängig. Es sind mehrere Wege der Aufnahme in die Zelle bekannt. Es gibt 2 unterschiedliche Mechanismen: die Endocytose und die Phagocytose. Phagocytose kommt bei wenigen Zellarten vor. Bei diesem Prozess wird ein Bakterium oder ein großer Partikel aufgenommen. Die Endocytose kann man in 2 Kategorien einteilen: Pinocytose und rezeptorvermittelte Endocytose. Die Pinocytose ist eine unspezifische Flüssigkeitsaufnahme mit darin befindlichen kleinen und großen Molekülen. Sie ist also eine Internalisierung extrazellulärer Flüssigkeit und wird abhängig von der Größe der Zellmembraneinstülpung in Mikro- und Makropinocytose unterteilt. Dieser Weg der Aufnahme von NP in die Zelle kann ohne direkten Kontakt mit den NP erfolgen. Pinocytose ist der prädominante Weg für die Aufnahme großer NP und von Mikropartikeln. Die Mikropinocytose erfolgt in den meisten Zellen, während die Makropinocytose nur in spezifischen Zelltypen, z. B. in unreifen dendritischen Zellen, vorkommt. Die clathrinvermittelte Endocytose ist ein Mechanismus der zellulären Aufnahme, der die Bildung clathrinüberzogener Vesikel einschließt, die gewöhnlich ca. 100 nm im Durchmesser sind (Brodsky *et al.*, 2001; Ehrlich *et al.*, 2004). Dieser auch als rezeptorvermittelte Endocytose bezeichnete Vorgang wird durch die Bindung des Liganden an seinen Rezeptor auf der Zellmembran initiiert. Durch die clathrinvermittelte Endocytose werden ligandenkonjugierte NP in spezifische Zellen internalisiert. Bei der rezeptorvermittelten Endocytose müssen sich zuerst die Makromoleküle (Liganden) an Rezeptoren auf der Außenfläche

der Plasmamembran binden. Diese Rezeptoren sammeln sich in spezialisierten Abschnitten der Plasmamembran, die *coated pits*. Der Rezeptor-Ligand-Komplex wird in einem *coated pit* aufgenommen, das sich unter Bildung eines *coated vesicle* abschnürt. Dieses stößt dann aktiv seinen Clathrinbelag ab und es verbleibt ein frühes Endosom, das schließlich mit einem späten Endosom fusioniert. Danach gelangen die Liganden in ein Lysosom für die letzte chemische Abwandlung. Im frühen Endosom dissoziieren Liganden und Rezeptoren. Zu den Liganden, die durch rezeptorvermittelte Endocytose aufgenommen werden, gehören unter anderem LDL-(Lipoprotein niedriger Dichte, engl. *low density lipoprotein*-)Partikel, Transferrin, Insulin sowie die meisten Protein hormone. Man unterscheidet die Transcytose von anderen Zellaufnahmemechanismen; dabei erfolgt ein unverändertes Durchschleusen von Proteinen in Vesikeln. Eine weitere Form ist die caveolenabhängige Endocytose. Caveolen sind Vesikel mit 50–100 nm Durchmesser (Nabi & Le, 2003). Diese Vesikel sind von Sphingolipiden, Cholesterol und Caveolin umgeben. Über diesen Weg erfolgt meistens die Internalisierung anionischer Nanopartikel.

Die zelluläre Aufnahme von Eisen findet durch rezeptorvermittelte Endocytose über einen Fe-Transferrin-Komplex statt. Bei niedrigem pH-Wert in den Endosomen dissoziiert das Eisen vom Transferrin und wird ins Cytoplasma übertragen, wo es in den intrazellulären labilen Eisenpool eindringt, um niedermolekulare Eisenkomplexe zu bilden oder hochmolekulare Zwischenprodukte. Fe kann in Ferritin gespeichert werden oder zur Hämsynthese in den roten Blutzellen beitragen (Richardson & Ponka, 1997).

Bei einem Anstieg von freiem Fe im Serum steigt die Konzentration von Transferrin, welches freies Eisen in die Zelle transportiert. Ein Anstieg freien Eisens kann die Lipidperoxidation initiieren und letztendlich zur DNA-Beschädigung führen (Emerit *et al.*, 2001; Gutteridge *et al.*, 1982). Um die cytoplasmatische Eisenkonzentration aufrechtzuerhalten und die Entstehung von ROS zu verhindern, erfolgt eine Regulation durch die Interaktion zwischen Transferrin und Ferritin (Crimpton *et al.*, 2002; Crimpton & Ward, 2003; Garner *et al.*, 1998).

Die Scavenger-Rezeptoren (engl. *scavenger receptor*, SR) sind wichtige phagocytische Rezeptoren. Der Makrophagen-SR vermittelt die Erkennung eines breiten Spektrums negativ geladener Makromoleküle einschließlich modifizierter LDL und bindet diese Makromoleküle, z. B. modifizierte Proteine, Nukleinsäuren, Carbohydrate, genauso gut wie modifizierte Lipoproteine. SR vom Typ AI/II spielen eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von dextranbeschichteten SPIO durch Makrophagen *in vitro*. Sie vermitteln die opsoninunabhängige Internalisierung von dextranbeschichteten SPIO-Nanopartikeln über die positiv geladene extrazelluläre kollagenähnliche (engl. *collagen-like*, CL) Domäne.

Da dextranbeschichtete Partikel schwach anionisch sind, ist deren Erkennung meistens SR-abhängig. Es wurde nachgewiesen, dass dextranbeschichtete SPIO-Partikel an Kollagen Typ 1 binden konnten. SR-AI, CLP1, SR-PSOX und MARCO förderten die SPIO-Aufnahme durch HEK293T (Rezeptor-transfizierte Zellen).

SR-AI besteht aus einer cysteinereichen (engl. *cysteine rich*, CR) Domäne (110 Aminosäuren, AS), einer *collagen-like*-Domäne (72 AS), einer α -helikalen Coiled-Coil-Domäne (163 AS), einem Spacer (32 AS), einer Transmembrandomäne (26 AS) und einer zytoplasmischen Domäne (50 AS). Die CL-Domäne ist essenziell für die Bindung und Aufnahme der Liganden und stellt ein Cluster von positiv geladenen Aminosäuren dar. Eine Deletion in der CR-Domäne bei SR-AI führt zur verstärkten Aufnahme von SPIO. Durch eine Deletion in dieser Domäne bei MARCO wird dagegen die Aufnahme von SPIO abgebrochen. Chao *et al.* (2012) behaupten, dass es der unterschiedliche Effekt dieser CR-Domäne vom SR-Subtyp abhängt.

Vor Kurzem führten Chao *et al.* (2013) Studien zum Verständnis der Mechanismen von Bindung und Aufnahme der SPIO mittels SR-AI durch. Es wurde bewiesen, dass eine Dextranbeschichtung die Kernladung nicht neutralisiert. Aus diesem Grund sind Wechselwirkungen mit globulären kationischen Proteinen möglich. So wurde z. B. in den Studien die Bindung des Kininogens an 10-kDa-SPIO (dextranbeschichtete SPIO, Feridex, -13 mV Zetapotential), an 20-kDa-SPIO ($-7,3$ mV) und an quervernetzte dextranbeschichtete Eisenoxide (engl. *crosslinked nanoparticles*, CLIO) (-5 mV) nachgewiesen. Da Dextran nicht den ganzen Kern der Partikel beschichtet, entstehen einige Lücken und Poren, die den kleinen flexibleren Proteinen, einschließlich Protaminsulfat und Kininogen, den Zugang erlaubt. Solche Beschichtungen, z. B. PEG, Dextran, Poloxamer, Hydrogel, können die Bindung von Plasmaproteinen an NP nicht effizient verhindern. Nach der Bindung der Proteine an SPIO-Partikel werden sie von SR-AI nicht erkannt.

Chao *et al.* (2013) bestätigten, dass das Ausmaß der anionischen Ladung nicht mit der SR-AI-Erkennung korreliert. Allerdings gingen mit Zunahme des Molekulargewichts von SPIO die SR-AI-Bindung und -Aufnahme verloren. Die Autoren schlugen ein Modell für die Interaktion zwischen dem geladenen Lysin-Cluster (CL-Domäne) in SR-AI und der Kristallstruktur des Magnetits vor (Abb. 12). Dazu stellten sie 2 Hypothesen auf. Die erste lautet, dass die Interaktion aufgrund einer direkten Bindung der CL-Domäne mit der Kristalloberfläche möglich ist. Dabei befindet sich Dextran zwischen der Kristallstruktur der NP und der CL-Domäne. Die zweite Hypothese besagt, dass eine Interaktion zwischen SR-AI und den SPIO-Partikeln an denjenigen Stellen stattfindet, wo es kein Dextran gibt.

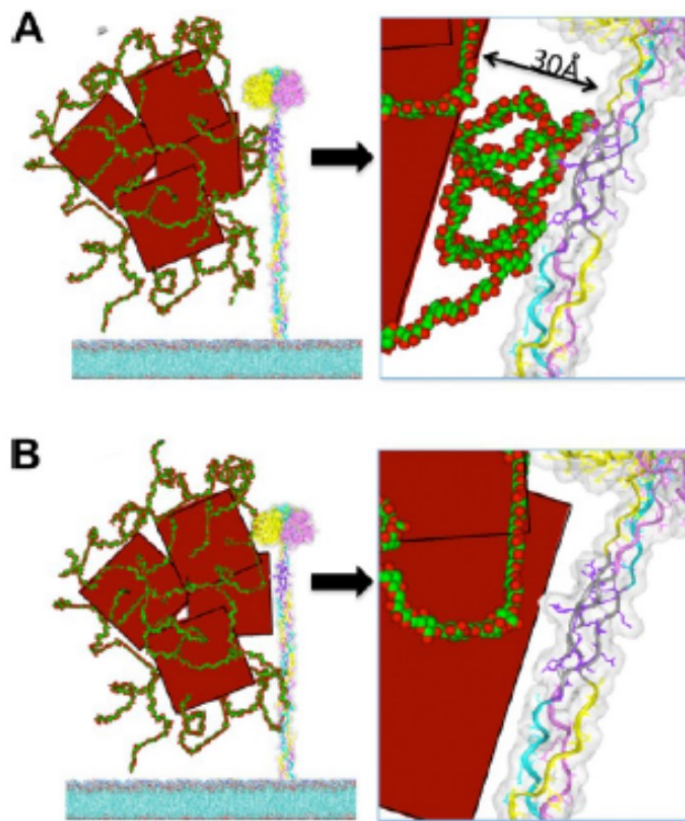


Abb. 12: Modell einer SR-AI-SPIO-Bindung. A) SPIO interagiert mit der CL-Domäne, Dextran liegt dazwischen. B) SPIO interagiert mit SR-AI-CLD an den Stellen, die nicht vollständig mit Dextran beschichtet sind. Und da bei einem Abstand von 30 Å (Dicke der Dextranbeschichtung) keine Interaktion stattfindet, wird die zweite Hypothese (B) akzeptiert. (aus Chao *et al.*, 2013)

In Computer-Modellierungs-Studien zeigte sich, dass die Bindung der CL-Domäne des SR-AI an den Fe_3O_4 -Kristallinkern an dem Ort geschieht, der nicht mit dem Polymer beschichtet ist. Manche Autoren bewiesen, dass eine Wechselwirkung mit Serumproteinen für eine zielgerichtete Zellaufnahme nötig ist. Die hydrodynamische Größe der NP in Wasser und in Medium mit Serumproteinen kann unterschiedlich sein. Eine Interaktion der Partikel mit Proteinen könnte zu einer Aggregation führen. Und da damit die Größe der NP zunimmt, kann das wiederum zu einer verbesserten Aufnahme führen.

2.2. Material und Methoden

Die für die Durchführung der folgenden Experimente benötigten Chemikalien sind im Anhang aufgelistet. Zum Ansetzen von Lösungen und Puffer wurde Reinstwasser benutzt. Die sterilen Arbeiten erfolgten in einer Sterilbank (Hera-safe, Type HS 12/2, Heraeus Instruments).

2.2.1. Kultivierungsbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden unter standardisierten Bedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Für die Erhaltungskultur wurden T-25- und T-75-Kulturflaschen (Sarstedt AG & Co) verwendet.

2.2.2. Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauer-Zählkammer (Neubauer improved, 0,0025 mm², 0,1 mm Tiefe, Assistent Glaswarenfabrik, Karl Hecht KG) verwendet. Die Zellkammer wurde mit ca. 20 µl der Zellsuspension gefüllt. Anschließend wurden 4 der großen Quadrate der Kammer ausgezählt. Die Zellzahl/ml wurde folgendermaßen berechnet: Mittelwert aus den 4 großen Quadranten x 10⁴.

2.2.3. Trypanblaufärbung

Um die Vitalität der Zellen zu ermitteln, wurde die Trypanblaufärbung durchgeführt. Zur Färbung wurden ca. 5 x 10⁵ Zellen 1 x mit PBS gewaschen und in einer 0,04%igen Trypanblaufärbelösung resuspendiert. Dann wurde die Zellsuspension 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Durch Auszählen in der Neubauer-Zählkammer wurde die Vitalität bestimmt.

2.2.4. Auftauen und Einfrieren von Zellen

Alle Zelllinien wurden im kryokonservierten Zustand geliefert. Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen ca. 2–3 min im Wasserbad (bei 37 °C) erwärmt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15-ml-Röhrchen überführt, in 9 ml Wachstumsmedium resuspendiert und zentrifugiert (125 g, 6 min). Nach Entnahme des Überstands wurden die Zellen in Wachstumsmedium resuspendiert, gezählt und die Vitalität mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Danach wurden die Zellen mit der von American Type Culture Collection (ATCC) empfohlenen Dichte in einem Zellkulturgefäß angesetzt. Um einen optimalen pH-Wert zu erreichen und eine übermäßige Alkalinität des Wachstumsmediums zu vermeiden, wurden die Zellen in ausreichend Kulturmedium 15 min im Brutschrank gehalten. 24 h nach dem Auftauen erfolgte ein Mediumwechsel. Aliquote von Zellen in der 2. bzw. 3. Passage wurden zur Langzeitaufbewahrung im Einfriermedium, das aus Wachstumsmedium mit 5 % (v/v) DMSO bestand, in sterilen Kryoröhrchen (Nalgene) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Ablösung der Zellen von der Oberfläche

(bei adhären Zellen) und Zentrifugieren wurden die Zellen im Einfriermedium resuspendiert und diese auf Kryoröhrchen aufgeteilt. Die Röhrchen wurden in einem mit Isopropanol gefüllten Gefriercontainer (Cryo 1°C Freezing Container, Nalgene) bei -80 °C über Nacht eingefroren. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in Flüssigstickstoff (-196 °C) überführt.

2.2.5. Kultivierung/Differenzierung THP-1-Zellen

Die hier verwendeten Zellen wurden bei ATCC (Manassas, VA, USA) erworben. Die THP-1-Zellen wurden aus dem Blut eines an akuter monocytärer Leukämie erkrankten einjährigen Jungen isoliert (Tsuchiya *et al.*, 1980). Sie weisen Merkmale von Monocyten auf, z. B. die Fähigkeit zur Phagozytose und die Produktion von Lysozymen. Die Kultivierung der THP-1-Zellen erfolgte in RPMI-1640 + 10 % hitzeinaktiviertes FCS + 10 mM HEPES + 1 % Pen/Str + 0,05 mM 2-Mercaptoethanol. Die Zellen wachsen in Suspension. Der Mediumwechsel erfolgte durch Zugabe von frischem Medium. Die Zellen wurden alle 3–4 Tage in einer Dichte von 3×10^5 /ml in frischem Zellkulturmedium neu ausgebracht. Zur Differenzierung der Monocyten in Makrophagen wurden THP-1-Zellen für 48 h (72 h) mit 40 nM PMA inkubiert. Die Differenzierung von THP-1-Zellen kann mit PMA oder 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induziert werden (Schwende *et al.*, 1996). So differenzierte THP-1-Zellen zeigen eine erhöhte Expression von Makrophagenoberflächenmarkern und sind effizienter bei der Phagozytose im Vergleich zu undifferenzierten Zellen (Schwende *et al.*, 1996; Daigneault *et al.*, 2010).

2.2.6. Kultivierung J774A.1-Zellen

Die J774A.1-Zellen wurden ursprünglich aus einem Sarkom des retikulären Gewebes einer weiblichen BALB/c-Maus isoliert (Ralph *et al.*, 1975). Sie sind zur Phagozytose fähig. Die makrophagenähnliche Zelllinie ist eine adhären wachsende Kultur. Die Zellen wurden in Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium + 10 % FCS + 1 % Pen/Str kultiviert. Die Zellaussaat erfolgte in einer Dichte von 5×10^3 – 7×10^3 lebender Zellen/cm². Beim Erreichen von 75–85 % konfluentem Wachstum (alle 3–4 Tage) wurden die Zellen vorsichtig durch Kratzen mit einem Zellschaber (BD Biosciences) abgelöst und subkultiviert. Bei der Zellzählung wurde die Vitalität durch Trypanblaufärbung bestimmt. Für diese Studie wurden murine Makrophagen sowie humane Monozyten aufgrund ihrer phagozytischen Kapazität ausgewählt, wodurch diese Zelltypen gut als *In-vitro*-Modell dienen können, um die Aufnahme von SPIO-Partikeln genauer zu untersuchen.

2.2.7. Verwendetes Kontrastmittel

FeraSpin™ R (Viscover™, Miltenyi Biotec) gehört zu den superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln. Die Partikel besitzen einen mittleren Durchmesser (hydrodynamischen Durchmesser) von 60 nm. Die Partikelsuspension liegt in einer Polydispersität vor und enthält Partikeldurchmesser zwischen 10 und 90 nm. Die Partikel sind polykristallin, d. h., sie bestehen aus mehreren (mindestens 2) zusammenhängenden Kristallen. Der kristalline Kern setzt sich aus Magnetit und Maghemit zusammen. Die Eisenoxide sind mit Carboxydextran beschichtet. Carboxydextran ist ein Dextran, das eine terminale Carboxylgruppe beinhaltet. Diese SPIO-Partikel haben eine negative Ladung, das Zetapotential liegt nach Angaben des Herstellers bei -25 mV.

2.2.8. Markierungsprotokoll

Die THP-1-Zellen wurden auf je 2 ml mit 5×10^5 Zellen/ml und die J774A.1-Zellen in einer Dichte von ca. $5,2 \times 10^4/\text{cm}^2$ (5×10^5 Zellen pro Well) in 6-Well-Platten ausgesät und mit SPIO-Partikeln ($2,79 \mu\text{g Fe/ml}$ oder $27,92 \mu\text{g Fe/ml}$) für 1, 4, 6, 12 und 24 h inkubiert. Die Zellen wurden in serumfreiem Medium inkubiert. Die hier getesteten SPIO-Partikel mit Carboxydextranbeschichtung sind hydrophil, was eine unspezifische Proteinbildung *in vivo* und *in vitro* reduziert. Dennoch wurde in dieser Studie ein serumfreies Medium für die Inkubation der Zellen mit Nanopartikeln gewählt, um eine mögliche Bildung einer Proteinkorona zu vermeiden.

2.2.9. Kolorimetrischer Ferrozin-basierter Assay zur Quantifizierung von Eisen in SPIO enthaltenden Zellen

Der Ferrozin-Assay wurde modifiziert nach Riemer *et al.* (2004) durchgeführt. Nach der Inkubation mit SPIO-Partikeln wurde die Zellsuspension (THP-1-Zellen mit dem SPIO beinhaltenden Medium) in ein 15-ml-Gefäß überführt und 5 min bei 125 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet 3 x mit 6 ml PBS bei 125 g für 5 min gewaschen, um die extrazellulären Nanopartikeln zu entfernen. Nach der Inkubation der J774A.1-Zellen mit SPIO-Partikeln wurde das alte Medium mit den restlichen SPIO abgenommen. Die auf 6-Well-Platten (Sarstedt AG & Co) gewachsenen J774A.1-Zellen

wurden vorsichtig mit einem Zellschaber von der Oberfläche abgelöst, in ein 15-ml-Gefäß mit frischem Medium überführt, abzentrifugiert und dann 3 x mit 6 ml PBS gewaschen (125 g, 5 min). Nach dem letzten Waschschrift wurde die Zellzahl jeder Probe bestimmt. Anschließend wurden die THP-1- und die J774A.1-Zellen mit 200 µl 50 mM NaOH lysiert. Nach 30 min Inkubation bei RT wurden die Proben in 1,5-ml-Eppendorfgefäße überführt. Nach der Zugabe von 200 µl Eisenfreisetzungsreagenz (4,5 % (w/v) Kaliumpermanganatlösung und 1,4 M HCl im Verhältnis 1:1) wurden die Proben 2 h lang bei 60 °C und 100 rpm im Schüttler (Infors AG, Minitron) inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 60 µl des Eisendetektionsreagenz (6,5 mM Ferrozin, 6,5 mM Neocuproin, 2,5 M Ammoniumacetat, 1 M Ascorbinsäure). Das Ferrozin lieferte mit Eisen einen violetten Farbkomplex. Zur Entwicklung des Ferrozin-Eisen-Farbkomplexes wurden die Proben kräftig mit der Hand geschüttelt und 1 min bei 200 g abzentrifugiert, danach wurden 200 µl der untersuchten Proben pro Well auf eine 96-Well-Platte überführt. Sodann wurde die Absorption bei 560 nm in einem ELISA-Reader (Multiskan Ascent Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific) gemessen. Als Standard wurde Eisen(III)chlorid verwendet. Das Eisen wurde durch die Behandlung mit salzsaurer Kaliumpermanganatlösung als Fe(III) freigesetzt und mit Ascorbinsäure zu Fe(II) reduziert. Anschließend wurde das freigesetzte Eisen durch den Eisenchelator Ferrozin gebunden. Durch Zugabe des Kupferchelators Neocuproin wurde die Bindung von Ferrozin an Kupfer verhindert. Zur Quantifizierung der Eisenkonzentration in den Proben wurde eine Standardkurve mit 0–400 µM FeCl₃ mitgeführt. Das Bestimmtheitsmaß R² lag bei 0,99. Beim Ferrozin-basierten Assay wurde die Kontrollprobe mitgeführt - also diejenigen Zellen, die ohne SPIO inkubiert worden waren. Der Eisengehalt der Probe wurde mittels ELISA-Reader gemessen und der so erhaltene, natürlich vorkommende Eisengehalt von jeder anderen Probe abgezogen.

2.2.10. Berliner-Blau-Färbung

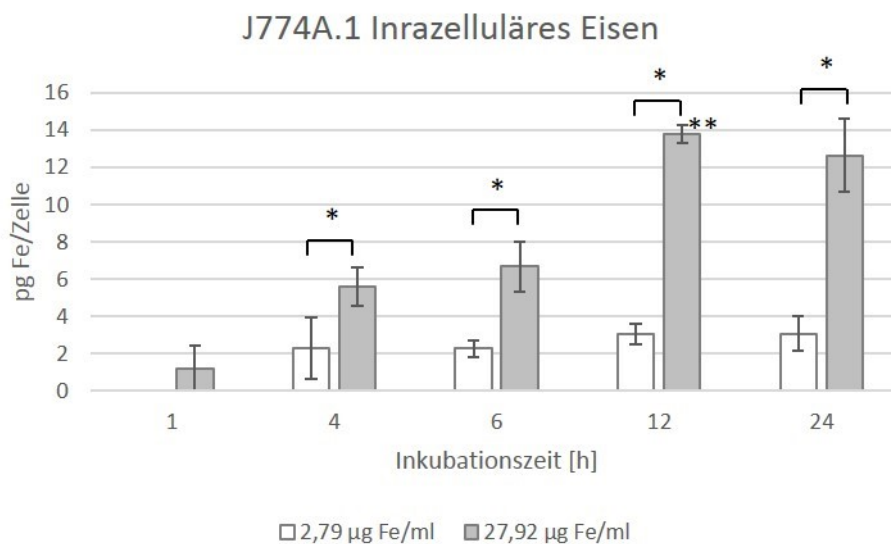
Für den lichtmikroskopischen Nachweis des zellulären Eisengehalts wurden PMA-stimulierte THP-1- und J774A.1-Zellen für 6, 12 bzw. 24 h mit SPIO-Partikeln unterschiedlicher Konzentrationen (2,79 µg Fe/ml und 27,92 µg Fe/ml) in 6-Well-Platten inkubiert. Die Zellzahl pro Well lag zwischen 5×10^5 und 1×10^6 . Vor der Fixierung wurden die Zellen mit SPIO und unbehandelte Zellen (Kontrollzellen) 3 x mit PBS gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden 15 min bei 4 °C mit 4 % Formalin fixiert und erneut 1 x mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit einer 5%igen Salzsäure- und einer 5%igen Kaliumferrocyanidlösung (direkt vor dem Versuch im Verhältnis 1:1 gemischt) 10 min lang gefärbt und 2 x mit Milipore-Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 10-15

min mit Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung gegengefärbt und 3 x mit Milipore-Wasser gewaschen. Für die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurde ein Zeiss Mikroskop des Typs Axio Observer.Z1 mit der Software-Version 4.8.2 von AxioVision verwendet und dazu das Objektiv EC Epiplan-Neofluar 20x/0,5 Pol genutzt. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einer Kamera des Modells AxioCam ICc1 erstellt.

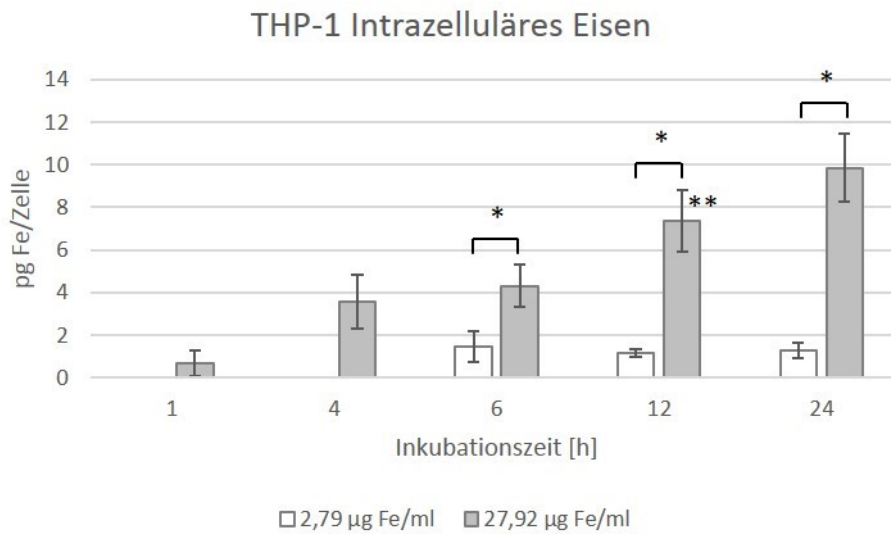
2.2.11. Statistische Auswertung

Die Messdaten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus n unabhängigen Experimenten dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit einem ungepaarten t-Test und einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgendem Tukey-Test durchgeführt. Ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Softwareprogramm SPSS Statistics 21.

2.3. Ergebnisse und Diskussion



A)



B)

Abb. 13: Intrazellulärer Eisengehalt von J774A.1- (A) und THP-1-Zellen (B) nach 1, 4, 6, 12 und 24 h Inkubation mit 2,79 µg Fe/ml bzw. 27,92 µg Fe/ml FeraSpin™ R. Der Eisengehalt in den Zellen wurde mittels Ferrozin-Test ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung von 2 unabhängigen Experimenten. Jede Probe wurde in Triplikaten getestet. * zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Proben einer Zelllinie, die mit 2,79 µg Fe/ml und 27,92 µg Fe/ml beladen wurden, bei jeder Inkubationszeit ($p \leq 0,05$).

** signifikanter Unterschied im Eisengehalt zwischen den J774A.1- und THP-1-Zellen bei jeder Konzentration und jeder Inkubationszeit ($p \leq 0,05$).

Die mit 2,79 µg Fe/ml inkubierten J774A.1-Zellen zeigten schon nach 4 h eine effiziente Aufnahme der Eisenpartikel in die Zellen (Abb. 13A), die THP-1-Zellen erst ab 6 h Inkubationszeit (Abb. 13B). Mit der Zunahme der Eisenkonzentration auf 27,92 µg Fe/ml konnte eine Aufnahme von SPIO schon ab 1 h in beiden untersuchten Zelllinien beobachtet werden. Bei dieser Konzentration steigerte sich die Aufnahme der Partikel mit zunehmender Inkubationszeit. Es bestand kein signifikanter Unterschied in dem Eisengehalt bei einer Konzentration von 2,79 µg Fe/ml zwischen 4, 6, 12 und 24 h in J774A.1-Zellen und zwischen 6, 12 und 24 h in THP-1-Zellen. Die Aufnahme der SPIO in J774A.1 und THP-1-Zellen bei einer Konzentration von 27,92 µg Fe/ml zwischen 4 und 6 h und zwischen 12 und 24 h unterschied sich nicht signifikant (Tukey-Test, $p \leq 0,05$).

Bei einer Konzentration von 2,79 µg Fe/ml und einer Inkubationszeit von 24 h zeigte sich in den J774A.1-Zellen eine Eisenaufnahme von 3,08 pg Fe/Zelle (Tab. 1). Bei einer 10-fachen Steigerung der SPIO-Konzentration und einer Inkubationszeit von 12 h stieg die Eisenaufnahme auf 13,77 pg Fe/Zelle.

Bei 2,79 µg Fe/ml FeraSpin™ R konnte nach 6 h Inkubation 1,47 pg Fe/Zelle in den THP-1-Zellen nachgewiesen werden. Bei einer SPIO-Konzentration von 27,92 µg Fe/ml

und nach 24 h Inkubation betrug die maximale Eisenaufnahme 9,84 pg Fe/Zelle. Die SPIO-Konzentration von 27,92 µg Fe/ml erwies sich als am effizientesten, da schon nach einer Inkubation von 1 h ein signifikanter Anstieg der Aufnahme von SPIO-Partikeln beobachtet wurde. Nach weiteren 4 und 6 h wiesen die Zellen einen erheblich höheren Eisengehalt im Vergleich zu 1 h Inkubationszeit auf. Bei einer Inkubationszeit von 24 h wurde noch deutlicher, dass die mit 27,92 µg Fe/ml SPIO-inkubierten THP-1-Zellen eine größere Menge Eisen enthielten als die mit 2,79 µg Fe/ml SPIO-inkubierten Zellen. Eine höhere Konzentration ermöglicht also bei einer geringeren Inkubationszeit eine effizientere Zellaufnahme.

Tabelle 1: Eisengehalt von J774A.1- und THP-1-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und verschiedenen Inkubationsbedingungen (2,79 µg Fe/ml Fe oder 27,92 µg Fe/ml). n.d. – *not detectable*

J774A.1			THP-1		
SPIO-Konzentration [µg Fe/ml]	Inkubationszeit [h]	Eisengehalt [pg Fe/Zelle]	SPIO-Konzentration [µg Fe/ml]	Inkubationszeit [h]	Eisengehalt [pg Fe/Zelle]
2,79	1	n.d.	2,79	1	n.d.
	4	2,29 ± 1,6		4	n.d.
	6	2,29 ± 0,4		6	1,47 ± 0,7
	12	3,05 ± 0,5		12	1,16 ± 0,2
	24	3,08 ± 0,9		24	1,27 ± 0,4
27,92	1	1,2 ± 1,2	27,92	1	0,67 ± 0,6
	4	5,61 ± 1		4	3,57 ± 1,2
	6	6,67 ± 1,3		6	4,32 ± 1
	12	13,77 ± 0,5		12	7,36 ± 1,5
	24	12,63 ± 1,9		24	9,84 ± 1,6

Die Berliner-Blau-Färbung ermöglichte die Visualisierung derjenigen Zellen, die Eisenoxidnanopartikel aufgenommen hatten, im Mikroskop.

Abb. 14 zeigt, dass der Eisengehalt der mit SPIO-Partikeln einer Konzentration von 2,79 $\mu\text{g Fe/ml}$ inkubierten J774A.1-Zellen (A, C) deutlich geringer war als der derjenigen Zellen, die mit 27,92 $\mu\text{g Fe/ml}$ inkubiert worden waren (B, D). Bei der höheren Konzentration wurde eine verstärkte Aufnahme blau angefärbter Eisenoxidpartikel sichtbar. Die stärkste Eisenaufnahme zeigten Zellen, die 12 h mit 27,92 $\mu\text{g Fe/ml}$ (Abb. 14 D) inkubiert worden waren.

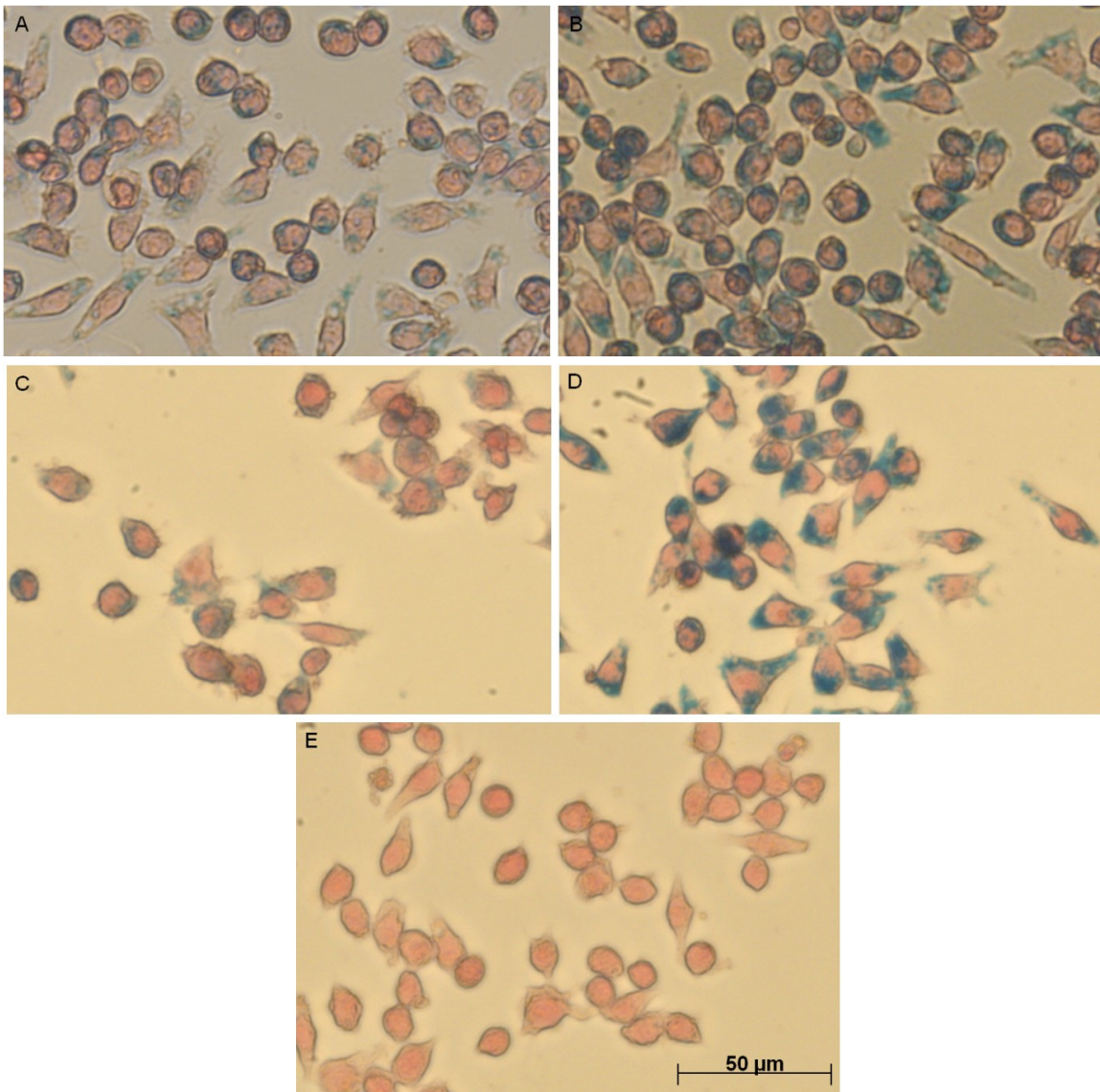


Abb. 14: Berliner-Blau-Färbung von J774A.1-Zellen nach 6 h Inkubation mit 2,79 $\mu\text{g Fe/ml}$ (A) bzw. 27,92 $\mu\text{g Fe/ml}$ (B) FeraSpin™ R; nach 12 h Inkubation mit 2,79 $\mu\text{g Fe/ml}$ (C) bzw. 27,92 $\mu\text{g Fe/ml}$ (D) FeraSpin™ R; und ohne SPIO-Partikel (E). Messbalken 50 μm . (Vergrößerung: 200x)

Die mit 2,79 $\mu\text{g Fe/ml}$ FeraSpin™ R inkubierten PMA-stimulierten THP-1-Zellen zeigten hier nach 12 h (Abb. 15A) bzw. nach 24 h (Abb. 15C) wenige intrazelluläre Partikel, während die Zellen nach Inkubation mit 27,92 $\mu\text{g Fe/ml}$ FeraSpin™ R eine Vielzahl intrazellulärer Einschlüsse aufwiesen (Abb. 15B, 15D).

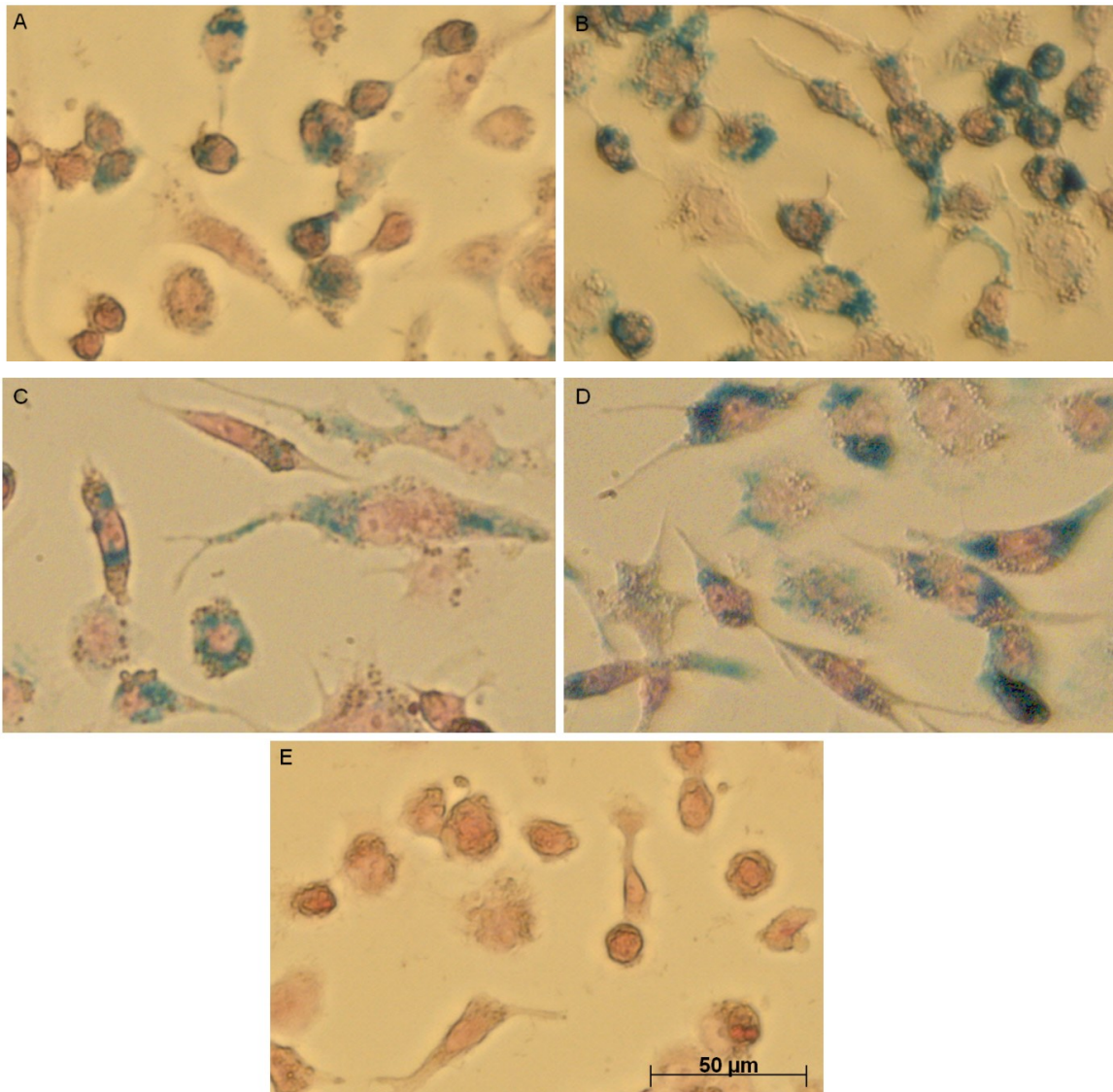


Abb. 15: Berliner-Blau-Färbung von PMA-stimulierten THP-1-Zellen nach 12 h Inkubation mit 2,79 µg Fe/ml (A) bzw. 27,92 µg Fe/ml (B) FeraSpin™ R; nach 24 h Inkubation mit 2,79 µg Fe/ml (C) bzw. 27,92 µg Fe/ml (D) FeraSpin™ R; und ohne SPIO-Partikel (E). Zur Differenzierung der Monocyten in Makrophagen wurden THP-1-Zellen für 48 h (A, B, E) und 72 h (C, D) mit 40 nM PMA inkubiert. Nach der Stimulation wurden adhärenz gewordene Zellen für 12 oder 24 h mit SPIO-Partikeln inkubiert. Die Makrophagen sind elongiert und haben lange Pseudopodien gebildet, die Monocyten sind rund bis eiförmig. Messbalken 50 µm. (Vergrößerung: 200x)

Für die sichere Anwendung von Nanotechnologien und Nanomaterialien ist das intrazelluläre Schicksal der NP von entscheidender Bedeutung. Die Makrophagen, die SPIO-Partikel *in vitro* aufgenommen haben, können nach Injektion in das Zielgewebe/-organ mittels MR verfolgt werden. Für dieses sogenannte *In-vivo*-Monitoring der Zellmigration sind SPIO besonders geeignet. Mit ähnlichen Ansätzen können unterschiedlichste Zelltypen *ex vivo* mit SPIO markiert werden.

In der vorliegenden *In-vitro*-Studie wurde die Aufnahme von carboxydextranbeschichteten SPIO-Partikeln in 2 phagozytierende Zelllinien untersucht. Der intrazelluläre Eisen-gehalt wurde photometrisch und mikroskopisch bestimmt. Es wurde eine adhären- te und eine Suspensionskultur verwendet. Beide Zelllinien werden häufig eingesetzt, um neue Partikel und deren Effizienz zu überprüfen (Corot *et al.*, 2006; Janic *et al.*, 2009; Lunov *et al.*, 2011; Mosqueira *et al.*, 1999; Serda *et al.*, 2010).

Partikelgröße, Partikelbeschichtung, Kulturmedium, Partikelkonzentration und Inkubati- onszeit sind wichtige Faktoren, die während der Zellaufnahme optimiert werden müssen. Die intrazelluläre Antwort nach der NP-Aufnahme wird durch ihre physikalisch-chemi- schen Eigenschaften, die intrazelluläre Konzentration, die Dauer des Kontakts sowie die Interaktion mit biologischen Molekülen beeinflusst. Oberflächeneigenschaften wie Rau- heit, Hydrophobizität und Ladung führen zu den unspezifischen Bindungskräften, die die Zellaufnahme fördern. Spezifische Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen führen im Allge- meinen zur endocytotischen Aufnahme. Partikelgröße, Form, Zelltypen und Stadium der Differenzierung sind wichtige Parameter bei der Wahl des endocytotischen Wegs. Die Bindung der Liganden an Transferrinrezeptoren kann eine Endocytose mittels *clathrin- coated pits* auslösen (Qian *et al.*, 2002). Caveolae sind in vielen Säugerzellen vorhanden (z. B. bei Adipocyten, Endothel- und glatten Muskelzellen, Fibroblasten, jedoch selten in anderen). Die Caveolae-vermittelte Endocytose ist bei der Aufnahme von Viren und vi- ralen Hüllproteinen beteiligt. Generell gilt, dass Phagozytose bei Teilchen $> 0,5 \mu\text{m}$ statt- findet. Viele nanoskalige Materialien agglomerieren zu dieser Größe. Hier sollte zwi- schen primären Partikeln, Aggregaten (stark gebundenen oder kondensierten Partikeln) und Agglomeraten (frei gebundenen Partikeln oder unter VDW-Kräften gebundene Teil- chen) (Min *et al.*, 2008; Oberdörster *et al.*, 2005) unterschieden werden. Bei manchen Partikeln kann der hydrodynamische Durchmesser in einer PBS-Lösung signifikant grö- ßer als in Wasser sein.

Metz *et al.* (2004) untersuchten die Aufnahme unterschiedlicher SPIO-Partikel durch hu- mane Monozyten bei Plasmakonzentrationen, z. B. $9 \mu\text{g Fe/ml}$ für Ferucarbotran, sowie bei einer Konzentration von $100 \mu\text{g Fe/ml}$. Yang *et al.* (2011) berichteten, dass bei der Bestimmung des Eisengehalts Ferucarbotran in das Kulturmedium für 24 h bei Konzent- rationen von $1-100 \mu\text{g Fe/ml}$ hinzugefügt wurde. Dabei konnte bei $100 \mu\text{g Fe/ml}$ eine signifikante Zunahme in der Proliferation der Zellen beobachtet werden. Bei einer Kon- zentration von $1-10 \mu\text{g Fe/ml}$ wurde keine Änderungen festgestellt. Roohi *et al.* (2012) verwendeten $300 \mu\text{M}$ für die Beladung der Makrophagenzelllinie P388-D1 mit carboxy- dextranbeschichteten SPIO. Für unsere Untersuchungen wurde eine etwas niedrigere

Dosis sowie eine höhere Dosis ausgewählt, jedoch keine allzu hohe, um eine toxische Wirkung auszuschließen.

Bei Inkubation von THP-1-Zellen mit SPIO-Partikeln konnte eine geringere Aufnahme von Eisen im Vergleich zu J774A.1-Zellen beobachtet werden. Bei den Versuchen mit der niedrigen Konzentration konnte der Eisengehalt in J774A.1-Zellen nach 1 h nicht detektiert werden. Nach einer Inkubationszeit von 4-24 h variierte das intrazelluläre Eisen in J774A.1-Zellen zwischen 2,29 und 3,08 pg pro Zelle. Bei den THP-1-Zellen war der Eisengehalt niedriger als bei den J774A.1-Zellen. Hier war die intrazelluläre Eisenmenge weder nach 1 h noch nach 4 h zu nicht detektieren. Allerdings wurde der Unterschied in der Eisenaufnahme zwischen beiden Zelllinien erst bei der höheren SPIO-Konzentration und nach einer Inkubation von 12 h signifikant.

Um die Eisenaufnahme der Zielzellen zu verbessern, wurde eine Differenzierung der THP-1-Zellen zu Makrophagen durch die Stimulation mit PMA induziert und danach eine Berliner-Blau-Färbung durchgeführt. Die mit PMA stimulierten differenzierten THP-1-Zellen sind besser geeignet für den Einsatz als Makrophagen (Lunov *et al.*, 2011). Damit ist eine verbesserte Aufnahme der verschiedenen Partikel und Substanzen gewährleistet, die allerdings noch nicht die Qualität menschlicher Makrophagen erreicht (Daigneault *et al.*, 2010).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten einen signifikant höheren Eisengehalt, wenn die THP-1-Zellen mit carboxydextranbeschichteten SPIO-Partikeln inkubiert wurden im Vergleich zu früheren Ergebnissen mit dextranbeschichteten Partikeln (Raynal *et al.*, 2004), wenngleich verschiedene Messverfahren (kolorimetrischer Ferrozin-Test vs. induktiv gekoppelte Plasma-Atom-Emissionsspektroskopie) und die unterschiedlich behandelten THP-1-Zellen (undifferenzierte vs. PMA-differenzierte) verwendet wurden.

Metz *et al.* (2004) konnten zeigen werden, dass in der Carboxydextran-Gruppe im Vergleich zur Dextran-Gruppe eine mehrfache Erhöhung der SPIO-Partikelaufnahme zu sehen war.

Einen mit vorliegender Studie vergleichbaren Eisengehalt in Makrophagen zeigte die Arbeit von Yang *et al.* (2011b). Die Autoren konnten keinen signifikanten Unterschied in der Eisenaufnahme in murinen Makrophagen (RAW264.7) zwischen 6 und 24 h nach der Inkubation mit carboxydextranbeschichteten Eisenoxidnanopartikeln beobachten. In vorliegender Arbeit konnte bei der geringeren SPIO-Konzentration von 2,79 µg Fe/ml keine Abhängigkeit zwischen Eisenaufnahme und Inkubationszeit festgestellt werden.

Allerdings nahm bei der höheren Eisenkonzentration der Eisengehalt in den Zellen bei längerer Inkubation im 24-h-Verlauf zu. Boutry *et al.* (2008) haben die SPIO-Aufnahme in nicht-phagozytierenden Zellen verglichen. Dabei konnten sie eine Beziehung zwischen Zelldichte und Eisenaufnahme feststellen und auf das Phänomen des „uptake yield“ zurückführen. So lag z. B. bei der magnetischen Markierung mit Endorem® die Zellanzahl von primären marrow stromal Zellen zwischen $2,41 \times 10^5$ und $3,1 \times 10^5$, und bei ansteigender Konzentration von $25 \mu\text{g Fe/ml}$ bis $200 \mu\text{g Fe/ml}$ wurden die unterschiedlichen Mengen an verfügbarem Eisen für jede Zelle in Abhängigkeit von Zellanzahl und SPIO-Konzentration berechnet. Dies spiegelte sich in der unterschiedlichen Menge des aufgenommenen intrazellulären Eisens pro Zelle wider, und zwar lag bei gleicher Zellanzahl mehr verfügbares Eisen pro Zelle bei höheren SPIO-Partikel-Konzentrationen vor als bei niedrigeren. Bei 3T6-Fibroblasten lag die Zellanzahl zwischen $1,68 \times 10^6$ und $2,31 \times 10^6$, der Eisengehalt stieg ebenfalls mit steigender Konzentration von $25 \mu\text{g Fe/ml}$ bis $1000 \mu\text{g Fe/ml}$ zusammen mit dem berechneten verfügbaren Eisen pro Zelle in Abhängigkeit von der Zellanzahl. In unserer Studie konnte bei einer SPIO-Konzentration von $2,79 \mu\text{g Fe/ml}$ keine zeitabhängige Aufnahme gezeigt werden. So war $2,79 \mu\text{g Fe/ml}$ eine nicht ausreichende Dosis, deshalb war die Eisenmenge pro Zelle zu gering, unter der Berücksichtigung, dass die Anzahl der Zellen pro Well bei der Inkubation mit SPIO bei 5×10^5 lag. Daher konnte keine kontinuierliche Eisengehaltserhöhung über die Zeit beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte bei der höheren Konzentration von $27,92 \mu\text{g Fe/ml}$ und bei gleicher Zellanzahl eine zeitabhängige Aufnahme gesehen werden. Es ist vorstellbar, dass bei einer kleineren Zelldichte als die in dieser Arbeit verwendete die SPIO-Konzentration von $2,79 \mu\text{g Fe/ml}$ ausreichend sein könnte für eine effiziente und zeitabhängige Aufnahme. Deswegen sind weitere Untersuchungen bzgl. der Abhängigkeit der Eisenaufnahme von der Zelldichte notwendig.

Eine Einschränkung dieser Studie ist, dass ein direkter Vergleich der absoluten aufgenommenen Eisenmenge der hier verwendeten Zellen mit primären Zellen nicht möglich ist. Zudem unterscheidet sich der Phänotyp der differenzierten THP-1-Zellen von dem der Makrophagen, und zwar in der Genexpression (Schwende *et al.*, 1996; Kohro *et al.*, 2004). Die Größenordnung der absoluten Eisenaufnahme ist jedoch durchaus vergleichbar.

Insgesamt bewirkte eine höhere SPIO-Partikeldosis eine erhöhte Eisenaufnahme in beiden Zelllinien. Eine kurze Inkubation mit hoher Eisendosis war effektiver als eine längere Inkubation mit niedrigeren Kontrastmitteldosen. Längere Inkubationszeiten führten bei hoher Konzentration zu einer höheren zellulären Eisenaufnahme.

3. SPIO-Markierung von hMSC und deren Differenzierungspotential nach magnetischer Markierung

3.1. Einleitung

3.1.1. Stammzellen und Therapiemöglichkeiten

In Abhängigkeit von der Abstammung werden Stammzellen in embryonal und adult klassifiziert. Embryonale Zellen sind pluripotent und aus der inneren Zellmasse der Blastocyste abgeleitet. Diese Zellen besitzen 2 einzigartige Eigenschaften, ein unbegrenztes Selbsterneuerungspotential und Pluripotenz – die Fähigkeit zur Differenzierung zu Zellen aller 3 Keimblätter: Entoderm, Ektoderm und Mesoderm. Adulte Stammzellen zeigen ein Kontinuum an Plastizität (Potential zur Ausreifung in verschiedene Zelltypen) oder anders genannt: Multipotenz. Das Knochenmark enthält wenigstens 3 anscheinend separate Stammzellpopulationen – hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen (engl. *mesenchymal stem cells*, MSC) sowie endotheliale Vorläuferzellen. Hämatopoetische Stammzellen sind die am besten untersuchten adulten Stammzellen. Sie haben wie die MSC einen mesodermalen Ursprung. Ein bekannter charakteristischer Marker für hämatopoetische Zellen ist CD 34. MSC sind die interessantesten unter den adulten Stammzellen. Allerdings sind sie bislang nicht gut charakterisiert. Aus diesem Grund gibt es z. B. Unklarheiten in der Nomenklatur. Manche Autoren bevorzugen eine andere Bezeichnung für mesenchymale Stammzellen wie „nicht-hämatopoetische Stammzellen“ oder „adulte nichthämatopoetische Stammzellen“ bzw. „plastikadhärente aus Knochenmark abgeleitete Stammzellen“. Früher wurde „Knochenmarkstromazellen“ als Synonym für MSC verwendet, was unkorrekt war, da Stromazellen alle Zellen umfassen, die im Knochenmark sind, außer dem Teil des hämatopoetischen Systems. Es sind 2 Morphologietypen von MSC bekannt: große und flache Zellen sowie Zellen mit einer fibroblastoiden Morphologie. Mit dem Alter geht die Zahl der MSC zurück.

MSC sind multipotente adulte Stammzellen, sie können sich zu mehreren Zelltypen differenzieren, u. a. Osteoblasten, Chondrocyten, Adipocyten, Hepatocyten, Kardiomyocyten, Monocyten, endotheliale und neuronale Zellen (Heino & Hentunen, 2008; Li *et al.*, 2007; Pittenger *et al.*, 1999; Satija *et al.*, 2009; Scavo *et al.*, 2004; Sgodda *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2008; Toma *et al.*, 2002; Yokoyama *et al.*, 2008). Es gibt auch Hinweise, dass sie sich zu weiteren Zelltypen differenzieren können, wie hepatische Sternzellen und renale Mesangiumzellen (Bhunchet & Wake, 1992; Hyink & Abrahamson, 1995). MSC haben einzigartige Eigenschaften, beispielsweise ein Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotential, sie können durch parakrine Mechanismen wirken und durch die Sekretion mehrerer Faktoren. Außerdem tragen MSC zur Verringerung einer Entzündung bei, befördern die Gewebereparatur und inhibieren bakterielles Wachstum (Bussolati *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2011). Sie sind einfach zu isolieren, haben eine große Expansionsrate und wirken immunsuppressiv. Sie sind in der Lage, die T-Zell-Proliferation *in vitro* und die Funktion naiver T-Zellen und T-Gedächtniszellen zu inhibieren (Di Nicola *et al.*, 2002; Krampera *et al.*, 2003; Meisel *et al.*, 2004). Zudem unterdrücken sie die Entwicklung von aus Monocyten abgeleiteten dendritischen Zellen in einem *In-vitro*-System (Zhang *et al.*, 2004).

Umfangreiche Tierversuche und klinische Studien zeigten, dass Zelltransplantation eine neue Möglichkeit für die zelluläre und funktionelle Reparatur verletzter Organe darstellt (Balsam *et al.*, 2004; Malhi *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2006). Auf dem interdisziplinären Gebiet der regenerativen Medizin gibt es neue Ansätze bei der Reparatur verschiedener Organe und Systeme – endokrines, Muskel-Skelett- oder kardiovaskuläres System (Anversa *et al.*, 2006; Yamada *et al.*, 2005) – sowie in der Therapie von bösartigen Tumorerkrankungen (Genre *et al.*, 2002).

MSC sind erfolgversprechend bei der Behandlung verschiedener Erkrankungen, für die derzeit noch keine effektive Therapie existiert, z. B. bei neurodegenerativen Erkrankungen (amyotrophe Lateralsklerose) (Canzi *et al.*, 2012) und der Parkinson-Krankheit (Freed *et al.*, 2001), oder zeigen ein Potential bei Myokardinfarkt (Peng *et al.*, 2013; Yoon *et al.*, 2005), Diabetes mellitus vom Typ I (Soria *et al.*, 2000), akuter Nierenverletzung (Ittrich *et al.*, 2007), Rückenmarksverletzung (Hu *et al.*, 2012), Leberfibrosis (Zhou *et al.*, 2010), Knochen- und Gelenkknorpeldefekten (van Buul *et al.*, 2011).

Es wurden mehrere Studien durchgeführt, die MSC für die Reparatur des Myokards nach einem Infarkt testeten (Janssens *et al.*, 2006; Kaminski *et al.*, 2008; Stamm *et al.*, 2003; Wollert *et al.*, 2004). Guo *et al.* (2007) berichteten, dass die Transplantation von MSC ins Herz in einem Herzinfarkt-Rattenmodell die Expression inflammatorischer Faktoren,

wie TNF- α , Interleukin-6 und Interleukin-1, sowie die Ablagerung von Kollagen vom Typ I und vom Typ III inhibiert.

Bei verschiedenen Nierenerkrankungen haben MSC auch einen therapeutischen Effekt, sie führen zur Reparatur beschädigter renaler Strukturen (Tögel *et al.*, 2005) und zur Verbesserung der Nierenfunktion, wie es in Knochenmarktransplantationsmodellen demonstriert wurde (Imasawa, 2003; Ito *et al.*, 2001).

Gelenkknorpeldefekte entstehen nach Traumata, bei Osteoarthritis und rheumatischer Arthritis. Die zellbasierte Knorpelreparaturtechnik entwickelt sich schnell und da der Gelenkknorpel nur eine beschränkte intrinsische regenerative Kapazität besitzt, werden MSC als ein wirksames Instrument bei fokalen Knorpeldefekten und Osteoarthritis (Centeno *et al.*, 2008; Wakitani *et al.*, 2007) angewendet. Die aktuelle zellbasierte Knorpelreparaturtechnik beruht auf der Wiederherstellung der funktionalen Eigenschaften des beschädigten Organs. Humane aus Knochenmark abgeleitete Stammzellen und Chondrocyten sind 2 Zelltypen, die man aktuell dafür nutzt (Brittberg *et al.*, 1994; Centeno *et al.*, 2010; van Osch *et al.*, 2009; Wakitani *et al.*, 2007). Es ist noch nicht geklärt, ob es zu einer Verbesserung in der Gewebereparatur durch die Host-Zellen kommt, die in einer Antwort auf die Implantation von Stammzellen rekrutiert werden, oder durch die Ansiedlung implantierter MSC (Oshima *et al.*, 2005; Quintavalla *et al.*, 2002). Allerdings scheint die Rekrutierung eigener Zellen viel wahrscheinlicher zu sein als die Ansiedlung implantierter MSC (Jing X. *et al.*, 2008).

Für die erfolgreiche Entwicklung der stammzellbasierten Therapie ist eine Verbesserung des *In-vivo*-Nachweises von transplantierten Zellen ein wichtiges Ziel. In der klinischen Anwendung der Zelltransplantation nach Zellmarkierung ist es entscheidend, dass die Fähigkeiten der transplantierten Zellen, nämlich die Migration zu entzündeten Lokalisationen/traumatisierten Geweben, das Überleben, das Differenzierungspotential sowie die Produktion von Wachstumsfaktoren und Cytokinen, unverändert bleiben (Sykova & Jendelova, 2007).

Kritische Parameter für die Evaluierung der therapeutischen Effizienz sind die Art der Verabreichung von Stammzellen, ihre Proliferation, die Lokalisierung der transplantierten Zellen, Zell-Homing und Engraftment. Das Ziel der in letzter Zeit gestarteten Studien ist die Entwicklung effektiver nicht invasiver und nicht toxischer Bildgebungstechniken für ein Zelltracking *in vivo*. Ein ideales Bildgebungsverfahren sollte eine Realtime-Visualisierung der Zellen, eine Bestimmung der Zelllokalisierung über die Zeit sowie eine

Quantifizierung der Anzahl von vitalen transplantierten Zellen ermöglichen. Mithilfe dieses Verfahrens sollte zudem die Untersuchung der Stammzellbiologie gewährleistet sein. Das alles kann mit SPIO-NP erreicht werden.

Magnetisch markierte aus Knochenmark abgeleitete mesenchymale Stammzellen (engl. *bone marrow-derived mesenchymal stem cells*, BMSC) konnten in einer fibrotischen Leber 12 Tage nach der Injektion mittels MRT detektiert werden. Man beobachtete das Homing der SPIO-markierten BMSC zur beschädigten Leber und eine Verhinderung des fibrotischen Prozesses in der Leber.

Hu *et al.* (2012) berichteten über eine signifikante Verbesserung der Bewegung und eine Reduzierung von Schäden nach Rückenmarksverletzungen nach der Implantation von aus Nabelschnurblut abgeleiteten MSC ins Rückenmark.

Canzi *et al.* (2012) beschrieben eine verbesserte motorische Aktivität nach einer intracerebroventrikulären Injektion von humanen skelettartigen muskelabgeleiteten Stammzellen in einem Mausmodell der amyotrophen Lateralsklerose. Sie zeigten die Hochexpression von Faktoren, die an der antiinflammatorischen Antwort beteiligt sind, wie IL-10 und sein Rezeptor IL-10RA. Cao *et al.* (2009) wiesen bei Ratten das Homing von aus Knochenmark abgeleiteten Stammzellen zur Seite der verletzten Halsschlagader an Tag 3 und Tag 7 nach der intravaskulären Transplantation nach.

Amsalem *et al.* (2007) zeigten, dass sowohl mit SPIO markierte als auch Kontroll-MSC ohne SPIO eine linksventrikuläre Dilatation und Dysfunktion nach einem Myokardinfarkt vermindern konnten. Die exakten Mechanismen dieser Regeneration sind noch nicht genau geklärt. Man konnte hier nur auf einen parakrinen Effekt der Stammzellen verweisen oder auf eine *In-situ*-Modulation.

MSC sind aus ethischen Gründen für Versuche sowie in der klinischen Anwendung zu bevorzugen, sie sind eine geeignete Zellpopulation für die Zelltherapie. BMSC können bei der autologen Transplantation verwendet werden und sind für die Behandlung von hämatopoetischen Erkrankungen bereits zugelassen. Da MSC die natürliche Fähigkeit zur Regeneration beschädigten Gewebes haben, sind sie ein vielversprechendes Mittel für die Therapie verschiedener Organe.

Eine stammzellbasierte Therapie kann dann erfolgreich sein und eine klinische Anwendung finden, wenn das SPIO-Labeling sich nicht nachteilig auf die Stammzeleigenschaften auswirkt. Stabilität und Effizienz der SPIO-Partikel hängen von der Oberflächenladung der Makromoleküle, der Konzentration der NP, dem pH-Wert der Lösung und von

der Zeit ab. Bei der Verwendung von SPIO treten als Probleme eine niedrige Aufnahmeeffizienz der Eisenoxid-NP, ihre Cytotoxizität und ein möglicher negativer Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung der Stammzellen auf (Chang *et al.*, 2007; Hill *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2007).

3.1.2. Migration und Verfolgung markierter Stammzellen

Man unterscheidet die direkte Markierungstechnik von der indirekten oder Reportergebildgebung. Je nach Bildgebungsmodalität können Zellen mit SPIO (MRT), Radionuklid (engl. *single-photon emission computed tomography* bzw. *positron emission tomography*, SPECT/PET), Quantum Dots oder Fluorophoren (optische Fluoreszenzbildgebung) markiert werden. Die direkte Markierung ist relativ einfach und günstig. MRT, SPECT-CT (engl. *computed tomography*) und PET-CT sind für das Kurzzeitmonitoring gut geeignet. Die Halbwertszeit von SPIO und Radionuklid bestimmt, wie lange die transplantierten Zellen verfolgt werden können. Eine Begrenzung dieser Markierungstechnik ist, dass nach der Zellteilung die Anzahl der SPIO oder Radionuklidmoleküle unverändert bleibt. In Studien von van Tiel *et al.* (2010) nahm die Anzahl SPIO-positiver Zellen nach einer 7-tägigen Expansion um ca. 75 % ab. In weiteren Untersuchungen wurde der Verlust von Eisen nach 5–8 Zellteilungen in HeLa-Zellen beobachtet (Arbab *et al.*, 2003b). Andererseits ist eine längere Detektion in langsam proliferierenden Zellen möglich.

SPECT bzw. PET haben eine hohe Sensitivität im nano- bzw. femtomolaren Bereich, was die Detektion von relativ niedrigen Signalen ermöglicht (Adonai *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2004).

Bei der Zellimplantation ist grundsätzlich die verwendete Injektionsroute zu beachten. Wenn die Injektion nicht in das Zielorgan erfolgt, müssen die transplantierten Zellen von der Injektionsstelle zur beschädigten Stelle migrieren, dabei können die Stammzellen in der Körperflüssigkeit verdünnt werden, sodass mehrere Injektionen erforderlich sind. Man unterscheidet die lokale Implantation der MSC – direkt in das beschädigte Gewebe, z. B. in das Myokardgewebe nach einem Herzinfarkt oder intraartikulär bei Gelenkknorpeldefekten – von der systemischen Implantation, z. B. intravenös oder intraarteriell. Bei diffusen Krankheiten ist eine intravaskuläre Injektion zu empfehlen, insbesondere für Leber oder Nieren, um eine Verteilung im ganzen Gewebe zu gewährleisten. Die lokale Implantation ist effektiver, weil alle Zellen in das Target-Organ injiziert werden, was aber oft invasiv und somit nicht möglich ist. Bei der intravenösen Injektion können die Zellen

durch Homing zur Läsionsstelle migrieren, allerdings ist die Migration langsam. Zudem kann die Behandlung eines Organs oft mehrere Injektionen erfordern, wie mehrere Studien feststellten (Bulte *et al.*, 1999; Bulte *et al.*, 2001; Hoehn *et al.*, 2002).

Ittrich *et al.* (2007) zeigten, dass die Detektion von SPIO-beladenen MSC 2 Wochen nach deren Verabreichung möglich war. $1,5 \times 10^6$ Zellen konnten *in vivo* visualisiert werden. Es wurde eine positive Wirkung auf funktionale Parameter der Nieren (CREA- und BUN-Werte) bei akuter Nierenverletzung beobachtet. Lee *et al.* (2012) beschrieben die Verfolgung heparinbeschichteter SPIO ohne TA innerhalb 1 Monats nach der Transplantation. Es existieren 2 Hypothesen zum Homing der Stammzellen. Die 1. Hypothese lautet, dass nekrotische Zellen an der beschädigten Stelle bestimmte Faktoren freisetzen, die zu einer lokalen Ansammlung von exogenen Stammzellen führen. Nekrotische Zellen sind Auslöser einer Signalkaskade, die die Migration von Stammzellen fördern. Zudem exprimiert das beschädigte Gewebe selbst spezifische Rezeptoren (Liganden), die die Stammzellen zur beschädigten Stelle ziehen. Nach der 2. Hypothese zirkulieren die Stammzellen dynamisch in verschiedenen Geweben unter normalen Bedingungen und verlassen als Antwort auf Gewebeverletzung das Blutssystem. Nach beiden Hypothesen ist der Knochenmarkpool eine Quelle für zirkulierende Stammzellen. Folgende Faktoren sind für das Homing und die Mobilisierung der Stammzellen verantwortlich: *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1) und sein Rezeptor (CXCR4), *stem cell factor* (SCF) und sein Rezeptor *c-kit*, *clone-stimulating factor* (CSF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und Integrin (Cao *et al.*, 2009).

Neri *et al.* (2008) zeigten, dass SPIO-markierter hNPC (humane neurale Vorläuferzellen) kurze Zeit nach der Transplantation einer geringen Anzahl (5×10^3 – 1×10^4) ins Gehirn der adulten Maus detektiert und für wenigstens 1 Monat in longitudinalen Studien visualisiert werden konnten. Auch unfraktionierte heparinbeschichtete SPIO-markierte hMSC konnten nach der Transplantation in die linke renale subkapsuläre Membran der Nacktmaus erfolgreich visualisiert und mittels MRT 1 Monat detektiert werden (Lee *et al.*, 2012).

Lalande *et al.* (2011) zeigten ein *In-vivo*-Monitoring von SPIO-markierten humanen aus Fettgewebe abgeleiteten stromalen Zellen, die in ein poröses auf Polysacchariden basierendes Scaffold ausgesät wurden, mittels MRT für mindestens 28 Tage. Mit SPIO markierte hBMSC konnten in einem Kollagengel und Kollagen-Scaffolds *in vitro* mittels MRT für über 1 Monat visualisiert werden (Terrovitis *et al.*, 2006). Mit Feridex markierte Zellen waren in einem Gelatine-Schaum-Scaffold *in vitro* und *in vivo* detektierbar (Ko *et al.*, 2007). In den oben genannten Studien wurden zur Unterstützung des Zellwachstums

und der Proliferation verschiedene Zellträger (Scaffolds) benutzt. MSC, die auf Scaffolds ausgesät werden, können einen Ersatz verschiedener Typen von Knochendefekten induzieren. Farrell *et al.* (2008) konnten transplantierte SPIO-markierte MSC auf Kollagen-GAG-(Glykosaminoglykan-)Scaffolds 7 Wochen nach der Implantation detektieren.

Bos *et al.* (2004) machten MSC in Rattenleber bis zu 12 Tage nach der Injektion in die Pfortader sichtbar. Die Autoren berichteten, dass die Markierung mit 100 µg Fe/ml die Proliferation der Ratten-MSK wesentlich beeinträchtigte. In vielen Studien wurden MSC mit unterschiedlichen SPIO-Konzentrationen beladen. Addicott *et al.* (2011) beobachteten eine Sättigung der Aufnahme von SPIO-Partikeln bei zunehmender SPIO-Konzentration, ein Plateau wurde bei einer Konzentration von 20–30 µg Fe/ml erreicht. Es kam zu einer Verringerung der Vitalität ab einer Konzentration von 100 µg Fe/ml.

In einem Herzinfarktmodell im Schwein konnten SPIO-markierte MSC 8 Wochen *in vivo* verfolgt werden (Yang K. *et al.*, 2011). Außerdem konnte in einem Rückenmarkverletzungsmodell eine geringe Anzahl (5×10^4) SPIO-markierter aus Nabelschnurblut abgeleiteter MSC 14 Tage nach der Transplantation effizient mittels MRT detektiert werden (Hu *et al.*, 2009). SPIO-markierte humane aus Nabelschnurblut abgeleitete MSC, die in das Rückenmark von Ratten transplantiert worden waren, wurden mittels MRT 8 Wochen verfolgt (Hu *et al.*, 2012). Arbab *et al.* (2003b) gaben als längste Tracking-Zeit 12 Wochen an. Amsalem *et al.* (2007) beobachteten bis zur 4. Woche eine Hypointensität im Bereich der Zelinjektionsstelle. Allerdings überlebten die MSC nicht und die SPIO-Partikel wurden später von Makrophagen phagozytiert, denn die meisten eisenpositiven Zellen waren auch ED1-positiv. In der Studie von Chen *et al.* (2012) betrug die *In-vivo*-Abbauzeit von Polyethylenimin-SPIO-Nanopartikeln 24 Wochen. Aber auch diese Autoren wiesen auf die Schwierigkeit der Unterscheidung zwischen SPIO-positiven Zellen und freiem Eisen und die Notwendigkeit eines doppelt positiven Nachweises hin. Weitere Studien sehen die SPIO-basierte Bildgebung als nicht geeignet an, Stammzellen über solch eine lange Zeit zu verfolgen (Bengel *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2008). Die MRT kann regenerative und differenzierte Zellen nicht von transplantierten unterscheiden, deshalb ist eine andere Nachweismethode für die doppelte Detektion notwendig. Die Bildgebungstechnik und die spezifischen Marker müssen weiterentwickelt und die Markierungsverfahren mit SPIO-Partikeln weiter evaluiert werden, weil die magnetische Beladung nicht mit dem Zelltod verschwindet. Dies kann zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse führen, wenn SPIO-positive Zellen, die nicht die ursprünglich markierten MSC sind, detektiert werden, wie es in Studien von Amsalem *et al.* (2007) gezeigt wurde.

Dabei wurden 2×10^6 SPIO-markierte BMSC und 2×10^6 unmarkierte BMSC zur Reparatur des Myokards nach einem Infarkt in einem Rattenmodell injiziert. Beide Stammzellinjektionen führten zu einer Verbesserung der kardialen Funktion. Allerdings waren die markierten MSC an der Infarktstelle 4 Wochen nach der Implantation nicht mehr präsent. Diejenigen Zellen, die SPIO-positiv waren, waren kardiale Makrophagen, die SPIO-Partikel aufgenommen hatten (Amsalem *et al.*, 2007). In einem Mausmodell zur Inflammation wurden ca. 10–20 % der lokalen Makrophagen nach der Injektion von SPIO-markierten BMSC SPIO-positiv (Pawelczyk *et al.*, 2009).

Alternativ findet eine Entwicklung von bifunktionalen Partikeln oder Partikeln mit binärer Modalität statt, die einen optischen sowie einen magnetischen Kontrast aufweisen. Lu *et al.* (2007) zeigten in zellulären Aufnahmen bifunktionale mit Fluoresceinisothiocyanat verbundene und mit Siliciumdioxid beschichtete SPIO-Partikel (SPIO@SiO₂ (FITC)) bei einer SPIO-Konzentration von 10 µg Fe/ml schon 30 min nach der Inkubation. Die minimale detektierbare Anzahl der hMSC lag dabei *in vitro* bei 10^4 und *in vivo* bei $1,2 \times 10^5$ Zellen, gemessen bei 1,5 T. Ein anderes Beispiel für NP mit dualer Modalität sind die Gd-Rhodamin-NP. Brusttumorzellen wurden mit solchen NP markiert und für das Zelltracking in eine hintere Extremität der Maus injiziert (Vuu *et al.*, 2005). Die Zellen konnten mittels MRT und optischer Bildgebung detektiert werden. Die Fluoreszenz-biokompatiblen NP wurden durch Polymerisation von Methyl-Metacrylat-Rhodamin-Komplexen hergestellt (Cova *et al.*, 2013). Mit diesen NP wurden *human amniotic fluid*-Zellen (hAFC, aus Fruchtwasser) markiert und in den lateralen Hirnventrikel der Maus injiziert. Die dreifach markierten hAFC (mit Fluoreszenz-NP, SPIO und Höchst 33258) waren für 14 Tage detektierbar.

Ein Nachteil der MRT ist u. a. die nicht ausreichende Sensitivität, um niedrige Signallevel zu detektieren – die Sensitivität der SPIO-basierten Markierung liegt im mikromolaren Bereich (10^{-5} mol/L) (Bengel *et al.*, 2005). Die Zellanzahl sollte bei mehr als 1×10^5 liegen (Kraitchman *et al.*, 2005). Die Sensitivität kann mit Hochfeldmagneten erhöht werden (11 T), dies ist jedoch in der klinischen Anwendung nicht möglich.

Bei Langzeituntersuchungen hat die Reporter-gen-Bildgebung mehrere Vorteile. Das Reporter-gen wird noch vor der Transplantation in die Zelle inkorporiert. Nach der Transplantation wird es exprimiert, wenn die Zellen vital sind. Nach der Expression kann man das Signal nicht invasiv detektieren (z. B. mittels Biolumineszenz oder Radionuklid-Bildgebung). Die meisten MR-Reporter-gene sind intrazelluläre Metallproteine wie Ferritin oder die Tyrosinase. Die indirekte Markierung ist für die klinische Umsetzung komplizierter als die direkte.

Für eine effektive Aufnahme der SPIO-Partikel durch nicht phagozytierende Zellen ist eine Entwicklung von modifizierten SPIO-Partikeln notwendig. Dextranbeschichtete SPIO werden effektiver im Komplex mit TA aufgenommen als ohne TA. Diese Komplexe werden an der Membran mittels elektrostatischer Interaktion adsorbiert und durch Endocytose aufgenommen. Durch die TA wird das Zetapotential der SPIO-Partikel geändert.

3.2. Material und Methoden

3.2.1. Kultivierung von hMSC

hMSC wurden von der Firma Lonza (Walkersville, USA) bezogen. Nach Angaben des Herstellers (Lonza) sind sie CD14-, CD34-, und CD45-negativ sowie CD105-, CD166-, CD29- und CD44-positiv, was mittels Durchflusszytometrie charakterisiert wurde. Die hMSC wuchsen unter Verwendung von MSCBM (Mesenchymal Stem Cells Basal Medium, Lonza) plus SingleQuots™-Kit (Lonza) mit folgenden Zusätzen: 10 % MSCGS (Mesenchymal Stem Cell Growth Serum), L-Glutamin, Gentamicin und Amphotericin-B mit einer finalen Konzentration von 30 µg/ml und 15 ng/ml entsprechend. Die Zellen wurden in einer Dichte von 5–6 x 10³ Zellen/cm² in 15 ml Wachstumsmedium in eine T-75-Flasche oder bei Vorbereitung der Versuche in 2 ml Medium pro Well in 6-Well-Platten ausgesät. Laut Hersteller beträgt das empfohlene Mediumvolumen 0,2–0,4 ml/cm². Das Medium wurde alle 3–4 Tage gewechselt. Nach dem Erreichen der Konfluenz (nach 6–7 Tagen) wurden die Zellen passagiert. Dafür wurden sie 3 x mit PBS gewaschen. Danach wurden 3,75 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro T-75-Flasche oder 480 µl pro Well einer 6-Well-Platte zugegeben und die Zellen für 5 min bei RT inkubiert. Bei weniger als 90 % abgelösten Zellen wurden sie weiter inkubiert und alle 3 min unter dem Mikroskop kontrolliert. Dabei war wichtig zu beachten, dass die Trypsin/EDTA-Lösung nicht länger als 15 min auf die Zellen einwirken darf. Die Trypsinwirkung wurde durch die Zugabe von Wachstumsmedium gestoppt.

Die hMSC wurden mit FeraTrack™ Direct Contrast Particles mit einer Konzentration von 25 µg Fe/ml über Nacht inkubiert. Nach Absaugen des Mediums mit SPIO, wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen, um verbleibende SPIO-Partikel zu entfernen. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit SPIO beladen worden waren. Die Berliner-Blau-Färbung erfolgte wie in Abschnitt 2.2.10 beschrieben. Für die Phasenkontrastaufnahmen wurde eine AxioCamMR3-Kamera verwendet.

3.2.2. Adipogene Differenzierung von hMSC nach der Markierung mit SPIO, Oil-Red-O-Färbung zum Nachweis der adipogenen Differenzierung

Für die adipogene Differenzierung wurden 2×10^5 hMSC der 5. Passage in 2 ml Wachstumsmedium pro Well der 6-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden alle 2–3 Tage mit frischem Wachstumsmedium gefüttert. Nach Erreichen der Konfluenz waren die Zellen bereit zur Induktion einer *In-vitro*-Adipogenese. Mit der Differenzierung wurde erstmals nach der Markierung mit SPIO-Partikeln begonnen. Optimale Bedingungen für eine adipogene Differenzierung sind 3 Zyklen der Induktion/Erhaltung. Jeder Zyklus besteht aus 3 Tagen Kultivierung in Induktionsmedium (Adipogenes Induktionsmedium, Lonza) supplementiert mit folgenden SingleQuotes™ (Lonza): h-Insulin, L-Glutamin, MCGS (Mesenchymal Cell Growth Supplement), Dexamethason, Indomethacin, IBMX (3-Isobutyl-1-methylxantin) und nachfolgender 1- bis 3-tägiger Kultivierung in Erhaltungsmedium (Adipogene Erhaltungsmedium (Lonza) mit folgenden Zusätzen: h-Insulin, L-Glutamin und MCGS. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur im Erhaltungsmedium gehalten wurden. Nach 3 kompletten Zyklen wurden die hMSC 7 Tage im Erhaltungsmedium kultiviert, mit einem Mediumwechsel alle 2–3 Tage.

Das Ausmaß der Differenzierung konnte anhand einer Oil-Red-O-Färbung ermittelt werden. Dabei erscheinen Lipidvakuolen orange oder rot. Eine Stocklösung wurde durch Einwaage von 0,3 g Oil Red O und Lösung in 100 ml 100%igem Isopropanol hergestellt. Die Lösung wurde über Nacht stehen gelassen. Für die Färbung wurden 30 ml dieser Stocklösung mit 20 ml Wasser zu einer Arbeitslösung verdünnt und nach 10-minütiger Inkubation filtriert (kurz vor dem Gebrauch). Vor der Färbung wurden die Zellen 1 x mit PBS gewaschen, 15 s an der Luft trocknen gelassen und dann mit 10%iger Formalinlösung für 2 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert, dann wurden sie mit 50%igem EtOH gewaschen. Die Färbung erfolgte in Oil-Red-O-Arbeitslösung für 20 min bei RT. Danach wurde erneut mit 50%igem EtOH gewaschen. Dann erfolgte ein Wachsschritt mit Wasser, wobei die Zellen 1 min lang geschwenkt wurden. Die Gegenfärbung wurde 1 min lang mit Hämatoxylin durchgeführt, danach wurden die Zellen 1 x mit Wasser gewaschen und mit wässrigem Medium überdeckt.

3.2.3. Osteogene Differenzierung von hMSC nach der Markierung mit SPIO, Alizarin-Red-S-Färbung zum Nachweis der osteogenen Differenzierung

3×10^4 Zellen wurden in 2 ml Medium pro Well auf einer 6-Well-Platte ausgesät. Bis zur Adhärenz (nach 4–24 h) wurden die Zellen in MSCGM (Mesenchymal Stem Cells Growth Medium) kultiviert. Ähnlich wie bei der adipogenen Differenzierung wurden die Zellen mit FeraTrack™ Direct Contrast Particles mit einer Fe-Konzentration von 25 µg/ml über Nacht inkubiert. Dann wurden sie 3 x mit PBS gewaschen und die osteogenen Differenzierungsversuche gestartet mittels Inkubation mit Osteogenesis-Induktionsmedium (Lonza) mit folgenden Zusätzen (SigleQuots™, Lonza): Dexamethason, Ascorbat, MCGS, L-Glutamin, Pen/Str und β-Glycerophosphat. Das Medium wurde hierbei alle 3–4 Tage gewechselt. Für die osteogene Differenzierung erfolgte die Kultivierung über einen Zeitraum von 2–3 Wochen. Als Kontrolle diente die Kultivierung von hMSC in Nicht-induktionsmedium. Vor der Initiierung der osteogenen Differenzierung wurden die 6-Well-Platten mit Collagen A (Biochrom) beschichtet.

Die Färbung erfolgte nach dem Protokoll von Digirolamo *et al.* (1999). Vor der Fixierung wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen. Vor der Färbung wurden die Zellen in eiskaltem 70%igem EtOH für 1 h fixiert. Dann wurden sie 1 x mit Wasser gewaschen und mit Alizarin-Red-S-Lösung (40 mM, pH = 4,1) für 10 min auf einem Schüttler inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen.

3.2.4. Verwendetes Kontrastmittel

FeraTrack™ Direct Contrast Particles (Miltenyi Biotec) sind SPIO-Partikel, die mit einem biokompatiblen Biopolymer (Dextran) beschichtet sind. Dextrane sind hochmolekulare, neutrale Biopolysaccharide aus D-Glukose. Die Größe der SPIO-Partikel liegt bei 100–200 nm. Die Größenverteilung verhält sich wie eine Gauß-Verteilung und die meisten Partikel (mehr als 50 %) haben eine Größe um 150 nm. Die Oberflächenladung wurde via Zetapotential-Messungen in 0,1 M NaCl auf einem Beckman Coulter Delsa Nano HC gemessen. Das Zetapotential liegt zwischen +15 und +20 mV. Alle physikochemischen Charakteristika der SPIO-Partikel stammen von den Angaben des Herstellers.

3.3. Ergebnisse und Diskussion

3.3.1. SPIO-Markierung der hMSC

Nach 16–17 h Inkubation mit SPIO-Partikeln waren über 95 % der Zellen eisenpositiv, was mittels Berliner-Blau-Färbung nachgewiesen wurde. Die Färbung zeigte eisenhaltige Stellen als blaue Körner an, die im Cytoplasma lokalisiert waren. Die Berliner-Blau-Färbung wies demnach eine effiziente intrazelluläre Aufnahme der SPIO-Partikel in das Cytoplasma markierter Stammzellen nach (Abb. 16).

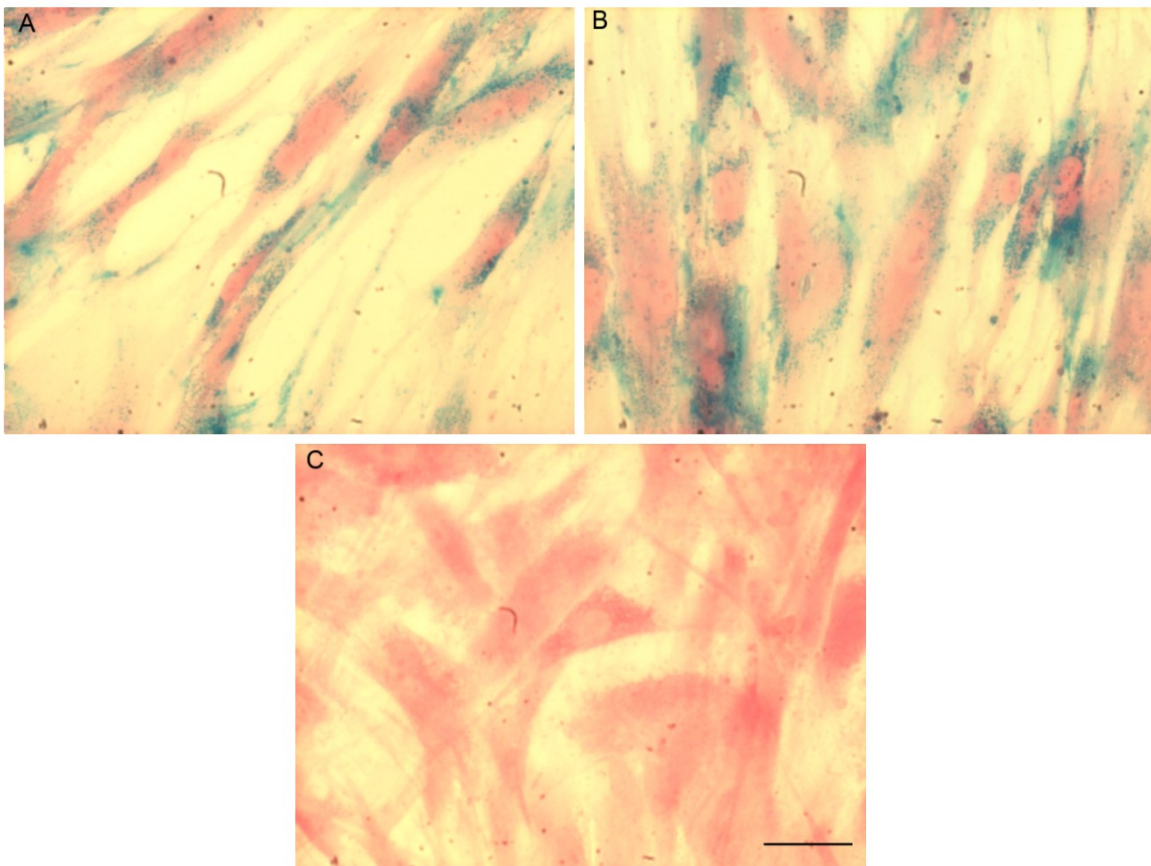


Abb. 16: Berliner-Blau-gefärbte, mit FeraTrack™ Direct Contrast Particles markierte hMSC. A, B) markierte hMSC, C) nicht markierte hMSC. SPIO-markierte Zellen waren mit 25 µg Fe/ml (A) und mit 50 µg Fe/ml (B) inkubiert worden. Die Aufnahmen erfolgten in 200-facher Vergrößerung 16 h nach der Markierung. Messbalken: 50 µm.

Für die Markierung von primären hMSC wurden Konzentrationen von 25 µg Fe/ml und 50 µg Fe/ml verwendet, die bei der Zellmarkierung am meisten verbreiteten SPIO-Konzentrationen. Da bereits bei der niedrigen Konzentration eine effiziente Aufnahme mittels Berliner-Blau-Färbung beobachtet werden konnte, wurde die Markierung der Zellen bei den nachfolgenden Differenzierungsversuchen mit 25 µg Fe/ml durchgeführt.

Die Markierung wurde bei einer niedrigen SPIO-Konzentration durchgeführt, weshalb auf Toxizitätsuntersuchungen verzichtet werden konnte. In der direkten Markierungstechnik sind unterschiedliche Markierungsprotokolle bekannt, meistens wurden Versuche mit 50 µg Fe/ml plus Poly-L-Lysin oder Protaminsulfat durchgeführt. Bei der SPIO-Markierung ohne TA wurden höhere Dosen SPIO-Partikel benötigt. In der vorliegenden Arbeit konnte mit FeraTrack™ Direct mittels Berlin-Blau-Färbung eine höhere SPIO-Aufnahme nachgewiesen werden.

Für eine erfolgreiche, klinisch zugelassene stammzellbasierte Therapie sind Methoden zu entwickeln, die das Schicksal der Zellen nach der Transplantation und deren Verteilung nicht invasiv beurteilen können. Aufgrund ihrer hohen räumlichen Auflösung kann das MR-Zelltracking einzigartige Informationen über die Zelldynamik in verschiedenen tierischen Krankheitsmodellen liefern. Für eine effiziente Aufnahme von magnetischen NP durch nicht phagozytierende Zellen, muss das KM optimiert oder modifiziert werden, z. B. Modifizierungen mit Peptiden (HIV), Antikörpern, Magnetodendrimeren oder TA. Es soll eine geeignete äußere Oberflächenschicht haben, um nicht nur an die Membran gebunden zu werden, sondern auch eine Aufnahme der Partikel in das Cytoplasma zu induzieren. SPIO-Partikel, die an die Zelloberfläche anbinden, können leicht wieder davon abgetrennt oder zu anderen Zellen übertragen werden. Wenn SPIO-Partikel unmodifiziert bleiben, wird eine höhere SPIO-Konzentration benötigt, was einen Einfluss auf den Zellmetabolismus haben kann. Andererseits kann es sich entweder auf das osteogene oder auf das chondrogene Differenzierungspotential nachteilig auswirken, wenn man die Zellen mit SPIO-TA-Komplexen markiert.

Bulte *et al.* (2004) schätzten die minimale Anfangsmenge von Eisen so ab, dass eine Zelle mindestens 25 pg Fe erhalten sollte, um im MRT 4 Zellteilungen lang detektierbar zu sein.

Jasmin *et al.* (2011) berichteten über eine induzierte Stammzelldifferenzierung nach Markierung mit FeProt-(Fe-Protamin-Chlorhydrat-)Komplexen (nach 4-stündiger Inkubation mit SPIO). In diesen Untersuchungen wurden auch die Vitalität und die Cytotoxizität mittels live/dead Kit von Invitrogen Inc. geprüft. Dabei wurden Änderungen in der Zellanzahl nach längerer Inkubation mit FeProt-Komplexen nachgewiesen (nach 3 oder 7 Tagen).

Ferner wurde gezeigt, dass für eine effiziente Aufnahme von Endorem® (15–20 pg Fe/Zelle) eine SPIO-Konzentration von 25 µg/ml zusammen mit 750 ng/ml Poly-L-Lysin (PLL) ausreichend ist (Arbab *et al.*, 2003a).

Toxizitätsuntersuchungen wurden mit ähnlich gebauten SPIO-Partikeln durchgeführt (z. B. mit Ferumoxid-PLL-Komplexen, Arbab *et al.*, 2003b). Zahlreiche Autoren untersuchten den Effekt der Markierung auf die Zellproliferation und die -viabilität. Beispielsweise analysierten Arbab *et al.* (2003b) den Einfluss von Fe-PLL-Komplexen auf die Zellviabilität. Arbab *et al.* (2004a) untersuchten mittels MTT-[(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid]- und ROS-Assays die Wirkung von Ferumoxid-Protaminsulfat-Komplexen. Hsiao *et al.* (2007) analysierten den Einfluss der Markierung mit Ferucarbotran auf verschiedenen Ebenen: die Zellviabilität mittels Trypanblau, die Zellproliferation mittels MTT-Assay, außerdem die Differenzierungskapazität der hMSC nach 24-stündiger Inkubation mit Ferucarbotran, die Produktion von ROS und die Änderung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP). Die Experimente wurden mit immortalisierten hMSC durchgeführt. Die Markierung der hMSC mit Ferucarbotran war effizient: 23,4 pg Fe/Zelle nach 24 h Inkubation mit 100 µg Fe/ml. Es wurden keine signifikanten Veränderungen von Viabilität, Proliferation, MMP, ROS-Produktion oder Differenzierungskapazität beobachtet. In der Arbeit von Soenen *et al.* (2012) wurden LDH-(engl. *lactate dehydrogenase*-) und MTT-Assays durchgeführt, um mögliche toxische Effekte von Endorem® zusammen mit Lipofectamin bei unterschiedlichen Konzentrationen zu ermitteln. Es wurde kein toxischer Einfluss bei niedriger Lipofectamin-Konzentration (2,5 µg/ml) und höherer Konzentration von Endorem® (bis zu 200 µg/ml) beobachtet.

Damit man die SPIO-Partikel sicher verwenden kann, sind Kenntnisse über die Toxizität der NP von entscheidender Bedeutung. SPIO-Partikel werden in Lysosomen abgebaut. Lysosomen sind in allen Körperzellen, besonders in Makrophagen, aber nicht in Erythrocyten vorhanden. Alle lysosomalen Enzyme sind nur im sauren Milieu aktiv. Um ihre enzymatische Aktivität zu gewährleisten, wird im Inneren der Lysosomen durch eine Protonenpumpe, die sich in der Membran befindet, ein pH-Wert von 4,5–5 aufrechterhalten. Die Protonenpumpe pumpt H⁺ ins Innere der Lysosomen. Intrazellulär und extrazellulär liegt der pH-Wert im neutralen Bereich. In den Lysosomen kommt es zur Auflösung von ZnO, sodass toxische Zn²⁺-Ionen frei werden. Bei der Freisetzung des Lysosomeninhalts ins Cytosol kann es zu einer mitochondrialen Störung und ROS-Produktion sowie zur Induktion der proinflammatorischen Cytokin- und Chemokinproduktion kommen. Nach der Ausschüttung lysosomaler Enzyme aus dem Lysosom ins Cytosol erfolgt kein Abbau von Bestandteilen des Cytosols, da diese Enzyme bei pH-Werten zwischen 7–7,3 inaktiv sind; allerdings kann dies zur Aktivierung von Bid- und Bax-Proteinen und der Procaspase führen (Xia *et al.*, 2008).

Kationische Nanopartikel sind in der Regel toxischer und die Wahrscheinlichkeit von Hämolyse und Trombocytanaggregation ist höher als bei neutralen und anionischen NP (Goodman *et al.*, 2004; Lewinski *et al.*, 2008).

Um die Cytotoxizität von NP zu reduzieren, werden unterschiedliche Beschichtungen einschließlich natürlichen Polymeren (Dextran), synthetischen (Polysteren), amphiphilen (Lipide) oder kleinen Molekülen (Citrat) eingesetzt. Aber jede Beschichtung kann die Zellaufnahme der NP behindern. Kleine neutrale Moleküle wie CO₂ oder O₂ können die Zellmembran frei passieren. Im Gegensatz dazu fördern bei großen Molekülen wie Zuckern, Aminosäuren oder Ionen (ähnlich wie bei NP) energieabhängige Transportmechanismen den Zugang in die Zelle und das Überwinden der Membran, die als Schutzbarriere dient.

Um eine effiziente Aufnahme von SPIO-Partikeln zu erreichen, ist es wichtig, den Zellzyklus zu beachten. Der Zellzyklus besteht aus 4 konsekutiven Phasen (G1, S, G2 und M), die jeweils potenziell unterschiedlich zur NP-Aufnahme beitragen. Die G1-Phase ist die Wachstumsphase der Zelle und gekennzeichnet durch hohe metabolische Raten. In dieser Phase findet die Proteinbildung statt, die Bildung einiger Enzyme, sowie der Histon- und Nucleohistonproteine, außerdem die Neubildung der Centriolen und ein Anstieg der RNA-Synthese. In der S-Phase läuft die DNA-Synthese ab. Die G2-Phase ist eine weitere Wachstumsphase, es kommt erneut zu hohen metabolischen Raten und zur Proteinsynthese. Ferner wird die Segregation der replizierten DNA vorbereitet. In der M-Phase wird die Zelle in 2 Tochterzellen geteilt. Manche Zellen der G1-Phase gehen in die G0-Phase über. So können sich die Zellen über eine längere Zeit im Ruhezustand befinden, ohne dabei ihre Regenerationsfähigkeit aufzugeben. Es wurde gezeigt, dass A549-Zellen, die sich in der G2- bzw. M-Phase befanden, die meisten fluoreszenzmarkierten carboxyfunktionalisierten Polystyren-NP aufgenommen haben (Kim *et al.*, 2012). Das niedrigste NP-Volumen wurde in Zellen der G1-Phase beobachtet, die NP-Aufnahme war auch niedrig in sich in der S-Phase befindenden Zellen.

3.3.2. Differenzierungspotential der Stammzellen nach SPIO-Markierung

Um die Plastizität der markierten hMSC zu bestimmen, wurden beide Zellpopulationen (SPIO-markierte und nicht markierte hMSC) in Kontrollmedium oder in einem Medium, das mit adipogenen (Abb. 17) und osteogenen Faktoren supplementiert wurde (Abb. 20), 20 Tage oder 18 Tage entsprechend kultiviert. Anhand histologischer Färbungen konnte

die Differenzierung zu Adipocyten und Osteoblasten nachgewiesen werden. Die Kultivierung über 18 Tage (bzw. 20 Tage) in den entsprechenden Differenzierungsmedien führte zu positiven Färbungen, sodass ein Auftreten von Lipidvakuolen, spezifische morphologische Veränderungen (Lipidtröpfchen), mittels Oil-Red-O-Färbung während der Differenzierung zu Adipocyten nachgewiesen wurde bzw. eine Calcifizierung, also ein erhöhter extrazellulärer Calciumgehalt im Vergleich zur Kontrolle demonstriert werden konnte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Markierung mit SPIO die Differenzierungskapazität mesenchymaler Stammzellen zu Adipocyten und Osteoblasten nicht beeinflusst.

Adipogene Differenzierung

In vielen unterschiedlichen Typen von Säugerzellen sind intrazelluläre neutrale Lipide in separaten Lipidtropfen gespeichert, die aus einem Kern aus Triacylglycerol und Cholesterolestern zusammengesetzt und von einem Phospholipid-Monolayer umgeben sind. Die kleinen an Cholesterolestern reichen Lipidtropfen in den steroidogenen Zellen der Nebennierenrinde, des Hodens und des Eierstocks sind z. B. eine Quelle für Cholesterol, das als Substrat für die Steroidhormonsynthese oder die Membranbiogenese verwendet werden kann.

Die Lipidtropfen werden vom endoplasmatischen Retikulum produziert. In frühen Stadien der Differenzierung wird ein an die Oberfläche gebundenes acyliertes Protein exprimiert, das ADRP (engl. *adipose differentiation related protein*). Während der weiteren Differenzierung wird ADRP durch Perilipin ersetzt. Dieses Protein dient als Marker für eine adipogene Differenzierung und schützt die Lipidvesikel vor intrazellulären Lipasen.

Bei Hellfeldaufnahmen ließen sich die Lipidtropfen durch fettlösliches Oil Red O nachweisen. In Kontrollzellen wurden vereinzelte Lipidtröpfchen (1 oder 2) beobachtet, die physiologisch in fast jeder Zelle entstanden waren (Abb. 17C und D).

SPIO-Markierung von hMSC und deren Differenzierungspotential nach magnetischer Markierung

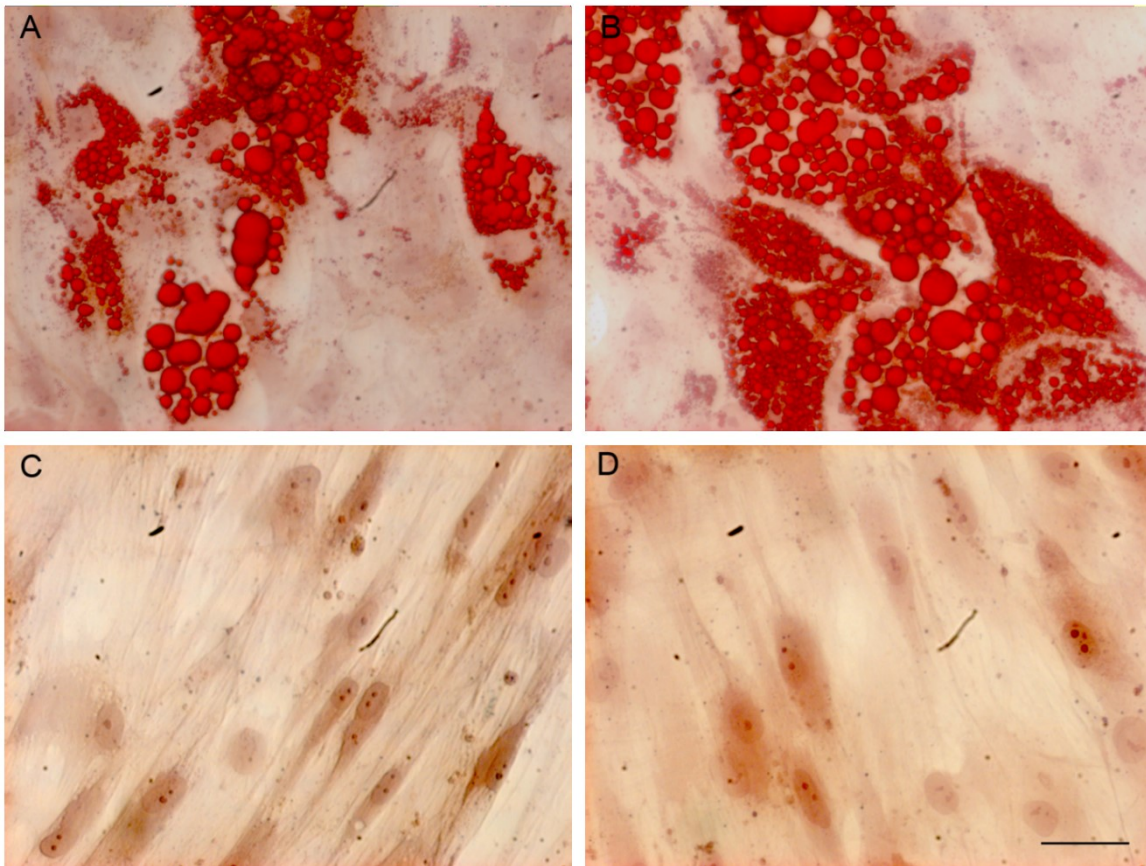


Abb. 17: Analyse zur Differenzierungskapazität von hMSC nach SPIO-Markierung. A, B) Adipogene Differenzierung 20 Tage nach der Kultivierung in adipogenem Medium. Die Färbung erfolgte mit Oil Red O, die Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Rote Tröpfchen repräsentieren Lipidvakuolen. Die beobachtete Neutrallipidakkumulierung diente als Nachweis der adipogenen Differenzierung *in vitro*. Die Lipidakkumulation in SPIO-markierten (A) und unmarkierten hMSC (B) erscheint vergleichbar. Als Kontrolle fungierten SPIO-markierte (C) und unmarkierte Zellen (D), die in Nichtdifferenzierungsmedium gehalten worden waren. Messbalken: 50 μm .

Die adipogene Differenzierung wurde durch folgende Faktoren induziert: h-Insulin, Dexamethason, Indomethacin und IBMX. Dem Erhaltungsmedium war nur h-Insulin zugegeben worden. Als Nachweis der adipogenen Differenzierung diente die morphologische Veränderung der hMSC nach der Kultivierung in Differenzierungsmedium sowie die Einlagerung von Lipidtropfen. Bei der Differenzierung werden zunächst aus Adipoblasten (Vorläuferzellen) Präadipocyten gebildet. Die Präadipocyten können morphologisch anhand kleiner Lipidvakuolen charakterisiert werden (Abb. 18A und B). Reife Adipocyten sind anhand ihrer großen Lipidtropfen gut erkennbar (Abb. 19), da während der Differenzierung kleine Lipidtropfen zu großen verschmelzen.

SPIO-Markierung von hMSC und deren Differenzierungspotential nach magnetischer Markierung

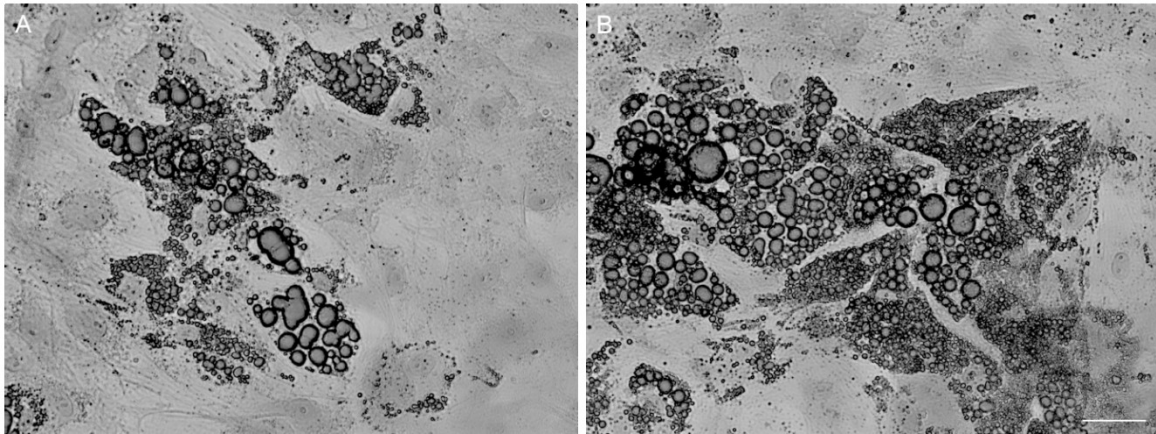


Abb. 18: Adipogene Differenzierung der hMSC. Dargestellt sind Phasenkontrastaufnahmen der SPIO-markierten (A) und nicht markierten (B) hMSC, die über 20 Tage in Differenzierungsmedium kultiviert worden waren. Messbalken: 50 μm .

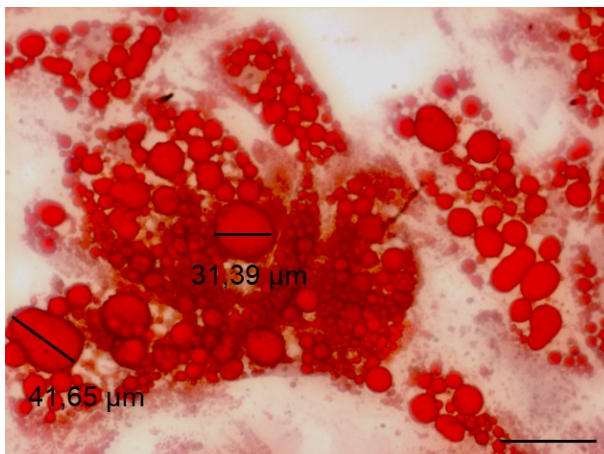


Abb. 19: Oil-Red-O-Färbung nicht markierter hMSC nach 20-tägiger Differenzierung in adipogenem Differenzierungsmedium. Es wurde die Größe einzelner Lipidtropfen gemessen. Messbalken 50 μm .

Bei Säugertieren ist vor allem das Fettgewebe der wichtigste Energiespeicher. In Adipocyten finden sich große Triacylglycerol-Lipidtropfen, die die Hauptenergieserven darstellen. Ein typischer Adipocyt in weißem Fettgewebe kann 1 oder mehrere große (ca. 10–100 μm im Durchmesser) Lipidtropfen beinhalten. Die Adipocyten des braunen Fettgewebes weisen viele kleine (2–10 μm im Durchmesser) Lipidtropfen und zahlreiche Mitochondrien auf.

Eine intrazelluläre Lipidspeicherung in Form von Lipidtropfen kommt auch in vielen anderen Zelltypen vor: in den Zellen von Leber, Muskel, Herz, Niere, Darm und Brustdrüse sowie in kultivierten Fibroblasten und Makrophagen. Dabei werden extrazelluläre Fettsäuren von den Zellen aufgenommen und verestert.

Osteogene Differenzierung

Knochen bilden das Stützgewebe und bestimmen die Form unseres Körpers. Manche Knochen schützen innere Organe. Knochen enthalten das Knochenmark mit hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen und sind die größten Calcium- und Phosphatmineralspeicher im Körper. Ferner stellen sie eines der dynamischsten Remodellierungsgewebe des Körpers dar.

Man kennt 2 verschiedene metabolische Prozesse des Knochens: den Knochenaufbau (Wachstum des Skeletts) und den Knochenumbau (Aufrechterhaltung von gesunden Knochen im Erwachsenenalter). Der Umbau ist ein lokaler Prozess und kommt temporär in den anatomischen Strukturen (Units genannt) der Osteoklasten und Osteoblasten vor (BMU, engl. *bone multicellular unit*). Diese Units sind abgeschlossene Kompartimente, in denen die Knochenresorption und die anschließende Knochenbildung reguliert werden. Für Wachstum und Aufrechterhaltung gesunder Knochen sind verschiedene Zelltypen von wichtiger Bedeutung: MSC, Osteoblasten, Osteocyten, Osteoklasten und hämatopoetische Stammzellen. Osteoblasten spielen eine zentrale Rolle im Knochenmetabolismus bei der Knochenbildung, aber auch bei der Regulierung von Bildung und Aktivität der knochenresorbierenden Zellen, den Osteoklasten. Die Differenzierung zu Osteoblasten erfolgt in mehreren Phasen wie Proliferation, Produktion und Reifung der extrazellulären Matrix (ECM) und ECM-Mineralisierung. Reife Osteoblasten sekretieren Moleküle des ECM. Osteoblasten synthetisieren das häufige Knochen-ECM-Protein, Typ-I-Kollagen, aber auch Nichtkollagen-ECM-Proteine. Die Mineralisierung der ECM wird durch Osteoblasten induziert. Osteoblasten können sich weiter zu Osteocyten differenzieren. Diese bilden ein sternförmiges Netz cytoplasmatischer Erweiterungen, mit dessen Hilfe ein Stoff- oder Informationsaustausch (z. B. bei Knochenschädigung) möglich ist. Osteoklasten haben eine andere Herkunft. Osteoblasten und Osteocyten produzieren den löslichen osteoklastenstimulierenden Faktor RANKL (engl. *receptor for activation of nuclear factor kappa B*) und M-CSF (Monocyten/Makrophagen-Kolonien-stimulierender Faktor), die binden zu ihrer Rezeptoren (RANKL bzw. c-Fms), und das induziert Differenzierung von Osteoklast-progenitor-Zellen und Fusion der mononukleären Zellen zu multinukleären TRAP (engl. *tartrate resistant acid phosphatase*)-positiven Osteoklasten. Außer RANKL wird von den Osteoblasten auch der Rezeptor OPG (Osteoprotegerin) produziert, der mit hoher Affinität RANKL bindet, was wiederum zur Inhibierung der Osteoklastenstimulation führt und nachfolgend zu einer sinkenden Knochenresorption.

Auf den Verlauf der osteogenen Differenzierung haben u. a. folgende Faktoren einen Einfluss: TGF- β 1 (*transforming growth factor beta 1*), Steroidhormone, Dexamethason,

SPIO-Markierung von hMSC und deren Differenzierungspotential nach magnetischer Markierung

1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ und Östrogene. In der vorliegenden Arbeit wurde Dexamethason wie vom Hersteller empfohlen ins Medium zugegeben zur Induzierung der osteogenen Differenzierung. Die Mineralisierung von hMSC wird durch Zusatz von β -Glycerophosphat gefördert. Die alkalische Phosphatase spaltet β -Glycerophosphat so, dass ein anorganisches Phosphat freigesetzt wird. Die alkalische Phosphatase ist ein Ektoenzym und an der Mineralisation beteiligt. Osteoblasten besitzen einen höheren Anteil an alkalischer Phosphatase. Ascorbinsäure wurde ebenfalls dem Differenzierungsmedium zugegeben, weil sie die Bildung der Kollagenmatrix fördert.

In reifen Osteoblasten wird die Expression der Gene für folgende Proteine erhöht: Osteocalcin, Typ-I-Kollagen, alkalische Phosphatase, Osteopontin.

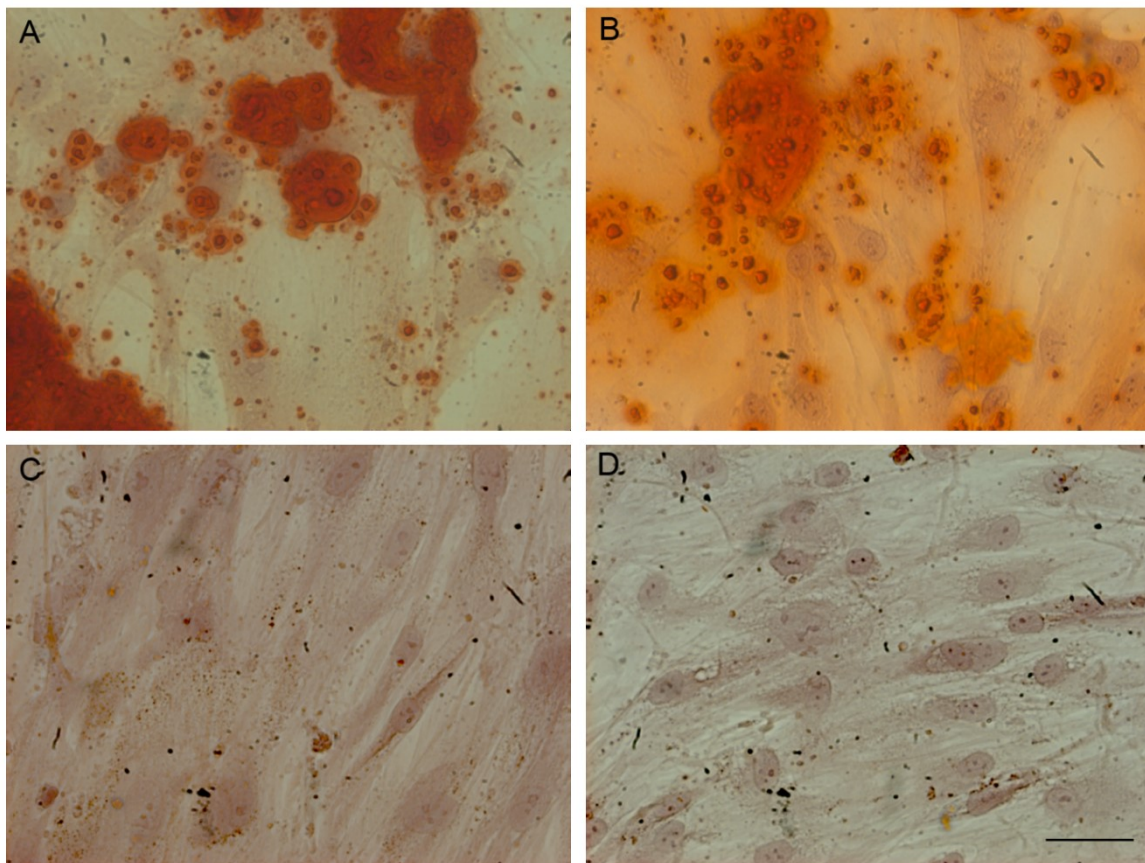


Abb. 20: Kultivierung SPIO-markierter und nicht markierter hMSC in osteogenem Differenzierungs- (A, B) und in Nichtdifferenzierungsmedium (C, D) über 18 Tage. Eine mit Alizarin-Rot S angefärbte Calcifizierung wurde als Resultat einer osteogenen Differenzierung in mit FeraTrack™ Direct Contrast Particles markierten hMSC (A) und in der Kontrolle, den unmarkierten hMSC (B) beobachtet. Die Zellen wurden bei 200-facher Vergrößerung fotografiert. Messbalken: 50 μ m.

Alizarin Red S bildet bei pH = 4,1–4,3 mit Calcium einen Chelatkomplex, dadurch lässt sich calcifizierte extrazelluläre Matrix orange anfärben. Calciumverbindungen wurden in

SPIO-Markierung von hMSC und deren Differenzierungspotential nach magnetischer Markierung

beiden Zellpopulationen (in markierten und nicht markierten) hMSC nach 18 Tagen Differenzierung in osteogenem Medium nachgewiesen (Abb. 20A, B). Im Gegensatz dazu zeigten die mit SPIO-markierten Zellen, die einer osteogenen Differenzierung unterzogen worden sind, eine stärkere Calciumablagerung als die nicht markierten Zellen und folglich einen schnelleren Differenzierungsverlauf (Abb. 21A, B). Dies kann allerdings bei nur morphologischer Ansicht nicht belegt werden.

Man konnte einzelne Calciumablagerungen bei Kontrollzellen (Abb. 20C, D) beobachten, was sich aufgrund der mit Typ-I-Kollagen modifizierten Oberfläche erklären ließ. Salasznyk *et al.* (2004) berichteten über einen Nachweis von Calciumphosphat, die bei mit Vitronectin und Kollagen I beschichteten Platten über 16 Tage kultiviert worden waren. Für die osteogene Differenzierung wurden 6-Well-Platten vor der Zellaussaat mit monomerem Kollagen A (Biochrom) beschichtet.

Eine histochemische Färbung der differenzierten hMSC zeigte, dass SPIO-Partikel keinen Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit haben. Im Vergleich mit den unmarkierten Zellen (Abb. 17A mit Abb. 17B und Abb. 20A mit Abb. 20B) waren Zellwachstum, Proliferation sowie adipogene als auch osteogene Differenzierung nicht beeinflusst.

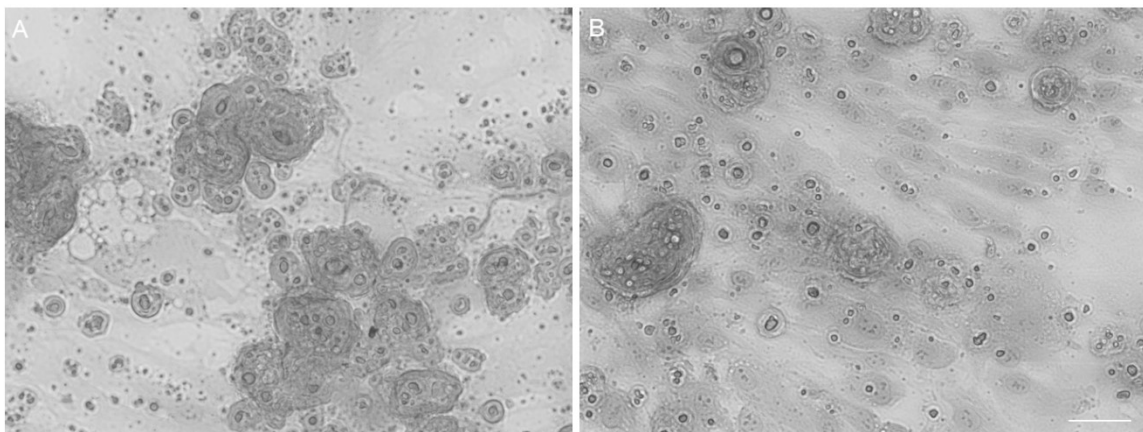


Abb. 21: Phasenkontrastaufnahmen von SPIO-markierten (**A**) und nicht markierten (**B**) hMSC nach 18-tägiger Differenzierung in osteogenem Differenzierungsmedium. Messbalken: 50 μm .

Weissleder (1999) hat als Erster das Konzept einer molekularen Bildgebung dargestellt, die Realtime-*in-vivo*-Bildgebung. Die molekulare Bildgebung ist die Visualisierung spezieller Moleküle in einem intakten Tier. Unter zellulärer Bildgebung ist eine Visualisierung bestimmter Zellen in einem intakten Tier zu verstehen. Die MRT erlaubt die Bildgebung

auf zellulärer und molekularer Ebene (Thorek *et al.*, 2006) und stellt eine nicht invasive *In-vivo*-Methode zur Untersuchung der Migration, des Homing und der Verteilung von transplantierten SPIO-beladenen Zellen (Bulte *et al.*, 2002b; Unger, 2003) dar. Die MRT findet eine breite Anwendung in der Diagnostik (Artemov *et al.*, 2003; Bulte *et al.*, 1990; Cerdan *et al.*, 1989; Kang *et al.*, 2002; Remsen *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1996; To *et al.*, 1992; Weissleder *et al.*, 1991; Weissleder *et al.*, 1992), in der Bildgebung der Transgenexpression (So *et al.*, 2005; Weissleder *et al.*, 2000) und im Zelltracking (Bulte & Kraitchman, 2004b; Modo *et al.*, 2005) mit SPIO-konjugierten Antikörpern oder AK-Fragmenten. Sie ist für die Diagnostik und das Management vieler Organpathologien und ihren Therapien wichtig, z. B. bei der Abstoßung des Transplantats nach einer Transplantation (Ho & Hitchens, 2004), bei der Adhäsion natürlicher Killerzellen an Tumoren (Kircher *et al.*, 2003) oder beim Homing der Lymphozyten in die Lymphknoten.

Da bei der Stammzelltransplantation viele Mechanismen noch unklar sind, beispielsweise die Interaktion der Stammzellen mit ihrer Mikroumgebung, die Interaktion zwischen den Stammzellen und die Differenzierungskapazität, laufen derzeit zahlreiche Studien dazu. Im Fokus stehen dabei hauptsächlich das Zelltracking, d. h. die Möglichkeit der Verfolgung der Zellen nach ihrer Transplantation, und die Markierung der Zellen für die Zellvisualisierung auf MRT-Bildern. Es wurde erstmals mittels Berliner-Blau-Färbung die Effizienz der SPIO-Partikelaufnahme durch hMSC und danach die Differenzierungsfähigkeit der hMSC zu Adipocysten und Osteoblasten nach der SPIO-Markierung untersucht.

Das Zetapotential von FeraTrack™ Direct liegt zwischen +15 und +20 mV, dadurch wird eine effiziente Aufnahme von Partikeln erreicht. In vom Hersteller durchgeführten Studien wurde nachgewiesen, dass eine effiziente Zellmarkierung bei Abwesenheit von TA dann erreicht wurde, wenn Partikel mit einem hohen Zetapotential verwendet wurden (+20 mV). Als Modell wurde eine fibroblastenähnliche NIH-3T3-Zelllinie gewählt. In ihrer Studie wurde die Markierungseffizienz in Abhängigkeit von der Oberflächenladung untersucht. Dabei wurden Partikel mit einem Zetapotential von +5 mV und von +20 mV mit neutralen Partikeln in Kombination mit lipidbasierten TA verglichen. Deswegen wurde in dieser Studie die Effizienz der Aufnahme in hMSC und deren Differenzierungspotential nach magnetischer Markierung mit SPIO-Partikeln untersucht, deren Effizienz bereits bestätigt worden war.

Der Effekt von Größe und Form der NP auf die zelluläre Aufnahme ist beträchtlich. Die Größe der NP beeinflusst ihre Interaktion mit der Zellmembran und folglich die intrazelluläre Aufnahme. Es wurde berichtet, dass NP, die nur etwa 50 nm im Durchmesser sind,

schneller von der Zelle aufgenommen werden als größere (Kumari & Yadav, 2011), weil die clathrinüberzogenen Vesikel und die caveolaren Zellmembraneinstülpungen einen Durchmesser von 50–200 nm haben (Doherty & McMahon, 2009) oder nach anderen Angaben ca. 100 nm (Brodsky *et al.*, 2001; Ehrlich *et al.*, 2004). NP, die kleiner als 25 nm sind, werden überwiegend mittels Pinocytose aufgenommen. Allerdings wurde auch nachgewiesen, dass größere Partikel sich schneller auf der Zelle absetzen können, da sie ein größeres Gewicht haben (Ogris *et al.*, 1998; van der Aa *et al.*, 2007). Der Zellaufnahmeweg ist auch vom Zelltyp abhängig.

Stabförmige NP haben eine niedrigere zelluläre Aufnahme als kugelförmige (Zhang *et al.*, 2012). NP mit einem AR (engl. *aspect ratio*, Verhältnis von Breite zu Höhe) von 4 zeigten eine niedrigere Zellaufnahme als solche mit einem AR von 1 oder 2 (Anderson, 1998; Chitrani *et al.*, 2006). Die zelluläre Aufnahme von SPIO-Partikeln findet mittels clathrinvermittelter Endocytose, Pinocytose oder Scavenger-Rezeptor-vermittelter Endocytose statt (s. Abschnitt 2.1.).

SPIO-Partikel werden vorübergehend in Endosomen/Lysosomen gespeichert. Danach wird Eisen ins Cytoplasma freigesetzt. In Studien von Arbab *et al.* (2003b) wird von einer nicht signifikanten Steigerung von ROS berichtet. Es ist sehr wahrscheinlich, dass freies Eisen ins Cytoplasma gelangt. Die Autoren vermuten, dass es innerhalb der Zellen bestimmte Mechanismen oder Signale gibt, die eine gleichzeitige Auflösung aller Fe-PLL-Komplexe und dadurch deren toxische Wirkung verhindern.

Arbab *et al.* (2005a) untersuchten den metabolischen Weg des Abbaus von dextranbeschichteten Eisenoxidnanopartikeln unter unterschiedlichen physiologischen Bedingungen. Dabei demonstrierten sie, dass Fe-PLL-Komplexe sich bei einem niedrigen pH-Wert (= 4,5) lösen. Am größten war die Eisenfreigabe in einem Modell der lysosomalen Umgebung mit Natriumcitrat als Puffersystem. Nach der Endocytose werden Eisenoxid-NP von frühen zu späten Endosomen (mit niedrigerem pH-Wert) transportiert, die danach mit Lysosomen fusionieren. In den Lysosomen findet der Abbau der SPIO-Partikel statt. Dabei wurde ein Anstieg der enzymatischen Aktivität in Lysosomen nach Eisenbeladung nachgewiesen (Link *et al.*, 1993; Schulze *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 2003). Manche Endosomen können mit Lysosomen fusionieren, die einen niedrigen pH-Wert haben und geeignete metallische Chelate besitzen, um die Fe-PLL-Komplexe zu lösen. SPIO, die in Endosomen verbleiben, werden bei einer MRT auf T_2 - und T_2^* -gewichteten Bildern als hypointense Regionen nachgewiesen.

Ein bekanntes Problem bei der Transfektion ist, dass das TA die DNA zwar in die Zelle inkorporiert, also in das Endosom befördert, dann aber die DNA oft nicht in den Zellkern eingeschleust wird. Dieser unerwünschte Effekt ist bei der Stammzellmarkierung mit SPIO-Partikeln gerade erwünscht. Frank *et al.* (2003) stellten die Hypothese auf, dass dextranbeschichtete Partikel über eine elektrostatische Interaktion mit dem TA interagieren. Bei alleiniger Verabreichung von Ferumoxiden kam es nur zu einer limitierten oder zu keiner Aufnahme, aber zusammen mit TA ergab sich eine 100%ige Effizienz der Beladung. In den Studien wurden Zellen unterschiedlicher Spezies – Maus, Ratte und Mensch – mittels einfacher Kombination von SPIO-Partikeln und unterschiedlichen TA markiert. Van Buul *et al.* (2009) wiesen einen höheren Eisengehalt bei der Beladung von hMSC mit Ferumoxid-Protamin-Komplexen im Vergleich zu Ferucarbotran nach, dabei wurden weniger extrazelluläre Eisenaggregate beobachtet.

Bei der Vielfalt der TA empfiehlt es sich, Protaminsulfat als für die Bindung mit SPIO-Partikeln geeignetes TA zu benutzen, was eine verbesserte Stammzellaufnahme zur Folge hat. Arbab *et al.* (2004a) zeigten, dass Protaminsulfat mit DNA 100 x effizienter im Vergleich zu anderen TA bei der Transfektion war.

Die Kombination von SPIO und TA kann aber auch Nachteile haben. Beispielsweise wurde über eine inhibierende Wirkung mancher TA, z. B. Poly-L-Lysin oder Polyethylenimin, auf die Zelldifferenzierung berichtet (Arbab *et al.*, 2004b; Kostura *et al.*, 2004; Wang Z. *et al.*, 2009), außerdem über deren Cytotoxizität.

Einige Autoren zeigten eine 90%ige Effizienz der SPIO-Markierung von MSC ohne Verwendung von TA (Hill *et al.*, 2003; Saldanha *et al.*, 2011). In Studien von Mailänder *et al.* (2008) wurde nachgewiesen, dass mit einer Erhöhung der SPIO-Partikelkonzentration der intrazelluläre Eisengehalt ansteigt und einen vergleichbaren Wert wie bei einer Markierung mit SPIO-TA-Komplexen erreicht.

Die vorliegende Arbeit belegt mittels direkter Markierungstechnik eine effektive Internalisierung humaner mesenchymaler Stammzellen von unmodifizierten positiv geladenen SPIO-Partikeln, ohne die Hilfe von TA und mit relativ niedriger Partikelkonzentration.

Es wurde in dieser Arbeit auch die Differenzierungsfähigkeit mesenchymaler Stammzellen nach der Markierung untersucht. *In-vitro*-Zelldifferenzierungsanalysen zeigten, dass die Zelldifferenzierung sowie die Zellmorphologie zwischen markierten und unmarkierten MSC ähnlich waren. Nach adipogener Induktion wurden intracytoplasmatische Lipidvesi-

kel beobachtet, die mittels Oil-Red-O-Färbung sowohl in markierten als auch in unmarkierten hMSC nachgewiesen wurden. Nach osteogener Induktion waren beide Zellpopulationen (markierte und nicht markierte hMSC) positiv mit Alizarin-Red S gefärbt.

Markierte und unmarkierte hMSC zeigten ein ähnliches Differenzierungsmuster bei der Adipogenese bzw. Osteogenese bei Kultivierung in entsprechenden Medien.

Zahlreiche Arbeiten belegen, dass eine SPIO-Beladung keinen Einfluss auf die morphologischen Eigenschaften von MSC (Balakumaran *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2011) sowie keinen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation von MSC verschiedenen Ursprungs (Arbab *et al.*, 2004a; Heymer *et al.*, 2008; Ito *et al.*, 2004; Kostura *et al.*, 2004; Kraitchman *et al.*, 2005; Schäfer *et al.*, 2010; Saldanha *et al.*, 2011) hat. He *et al.* (2007) demonstrierten eine unveränderte Viabilität und Proliferation von aus Knochenmark abgeleiteten MSC. Terrovitis *et al.* (2006) berichteten, dass eine Markierung mit Ferumoxiden keinen Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften von BMSC hat. In Studien von Sun *et al.* (2012) war kein signifikanter Unterschied in Viabilität, Proliferation, Membrantigenen und Multipotenz zwischen SPIO-markierten und unmarkierten Zellen zu sehen. Van Buul *et al.* (2011) konnten keinen Einfluss der Beladung von hMSC mit Fe-Protamin-Komplexen auf die Lebensfähigkeit, langzeitmetabolische Aktivität und Chondrogenese feststellen. Die SPIO-TA-Komplexe wurden biophysikalisch charakterisiert und deren Metabolisierung untersucht. Es zeigte sich keine Beeinträchtigung von Zellvitalität, Differenzierungskapazität und Phänotyp von mit SPIO-TA beladenen Stammzellen (Arbab *et al.*, 2003b; Frank *et al.*, 2003).

Huang *et al.* (2009) und Chang *et al.* (2012) berichteten, dass eine SPIO-Beladung die Proliferation von hBMSC fördert, was mit der zellulären Internalisierung von SPIO-NP verbunden sein kann. Van Buul *et al.* (2011) demonstrierten, dass die Sekretionsprofile 6 wichtiger Faktoren, die eine Rolle bei der Inflammation und dem Zellwachstum spielen, nach der SPIO-Beladung nicht beeinträchtigt waren.

Über die Wirkung der SPIO-Beladung auf das Differenzierungspotential gibt es jedoch unterschiedliche Berichte. In den meisten Studien wurde keine Beeinträchtigung der adipogenen und osteogenen Differenzierungsfähigkeit gefunden (Andreas *et al.*, 2012; Arbab *et al.*, 2003b; Arbab *et al.*, 2004a; Farrell *et al.*, 2008; Frank *et al.*, 2003; Heymer *et al.*, 2008; Hori *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2004; Jing *et al.*, 2008; Pawelczyk *et al.*, 2006; Schäfer *et al.*, 2008; Schäfer *et al.*, 2009; So *et al.*, 2010). Allerdings stellten Chen *et al.* (2010) fest, dass die Markierung von hMSC mit SPIO-Partikeln eine negative Wirkung auf die osteogene Differenzierung hat. Zugleich bleibt der Effekt der SPIO-Beladung auf

die chondrogene Differenzierung umstritten. Heymer *et al.* (2008) berichteten, dass die Beladung mit VSOP keinen Einfluss auf die chondrogene Differenzierung von hBMSC hat, was histologisch und mittels Genexpressionsanalyse ermittelt wurde. Die SPIO-Beladung hatte auch keine Auswirkungen auf die Chondrogenese von MSC in anderen Studien (Arbab *et al.*, 2004a; Arbab *et al.*, 2005b; Farrel *et al.*, 2008; Jing *et al.*, 2008; Nishida *et al.*, 2006; Wang L. *et al.*, 2009; Yang C.-Y. *et al.*, 2011a). Reddy *et al.* (2009) zeigten, dass die Beladung mit Polyvinylpyrrolidon-beschichteten SPIO-Partikeln das Differenzierungspotential von hBMSC nicht beeinträchtigte. Dagegen zeigten Kostura *et al.* (2004) einen inhibierenden Effekt der Beladung mit Ferumoxiden auf das Differenzierungspotential zu Chondrocyten. Bulte *et al.* (2004) berichteten ferner über die Inhibierung der Chondrogenese mit Ferumoxiden. Allerdings wurde hierfür Poly-L-Lysin verantwortlich gemacht (Arbab *et al.*, 2005b; Bulte *et al.*, 2004). Die chondrogene Differenzierungskapazität war auch beeinflusst nach der Beladung mit Aminoberfläche-modifizierten SPIO-NP (Chang *et al.*, 2012) sowie nach der Beladung mit citratbeschichteten SPIO-Partikeln (Andreas *et al.*, 2012). In Bezug auf andere Stammzelllinien fand sich kein Unterschied in der Differenzierungskapazität der mit Ferumoxid markierten humanen embryonalen Stammzellen (Nejadnik *et al.*, 2012) oder der mit SPIO markierten embryonalen oder neuronalen Stammzellen (Hoehn *et al.*, 2002; Watson *et al.*, 2006). Hu *et al.* (2009) demonstrierten einen negativen Einfluss von SPIO-Partikeln auf die Chondrogenese, als möglicher Grund wurde hier das verwendete TA genannt.

Es ist offensichtlich, dass die variierenden biologischen Effekte der SPIO-Partikel auf MSC mit der Partikelgröße, der Oberflächenbeschichtung, dem Eisengehalt, der Inkubationszeit, den TA sowie der Markierungstechnik zusammenhängen. Schäfer *et al.* (2009) berichteten, dass eine SPIO-Beladung mit oder ohne TA keinen Einfluss auf die Viabilität und das Differenzierungspotential von MSC hat, jedoch die Beladung der MSC unter Verwendung eines TA zu einer Senkung der Migrations- und Koloniebildungskapazität führt, im Vergleich zur Markierung ohne TA. Arbab *et al.* (2003a, 2003b, 2004b) untersuchten die Effekte von Ferumoxiden mit unterschiedlichen TA auf die Eisenkonzentration in der Zelle. Mit zunehmender Eisenkonzentration von 50–125 µg Fe/ml stieg das intrazelluläre Eisen innerhalb 24 h auf das 3-Fache. Allerdings war dies mit einer 40 % höheren Mortalität, verglichen mit unmarkierten Zellen, verbunden. Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass es für die Fe-Konzentration einen Threshold-Wert gibt, nach dessen Überschreiten SPIO-Partikel toxisch wirken können. Es wurde bereits berichtet, dass die Markierung mit Ferucarbotran effizienter ist als die mit Ferumoxiden. Ferucarbotran (Resovist®) hat eine hohe Beladungseffizienz für nicht phagozytierende

Zellen (Boutry *et al.*, 2008) und einen höheren Threshold-Wert für eine Toxizität im Vergleich zu Ferumoxiden (Niemeyer *et al.*, 2010). hMSC konnten effizient mit Ferucarbotran ohne TA markiert werden (Henning *et al.*, 2009b; Mailänder *et al.*, 2008), ferner beeinträchtigte eine hohe Ferucarbotrankonzentration die Zellviabilität nicht signifikant (Metz *et al.*, 2004). Allerdings verstärkte die Verwendung von Ferucarbotran die klinischen Symptome einer experimentell induzierten autoimmunen Enzephalomyelitis (Schäfer *et al.*, 2008). Es wurde auch von einem inhibierenden Effekt von Ferucarbotran auf die osteogene Differenzierung von hMSC berichtet (Chen *et al.*, 2010).

Chang *et al.* (2012) demonstrierten eine Beeinträchtigung des osteogenen und des chondrogenen Differenzierungspotentials nach der Beladung mit Aminoberfläche-modifizierten SPIO-Partikeln anhand einer veränderten Produktion von Cytokin- und Wachstumsfaktoren. Die Autoren der Studie glauben, dass die Oberflächenbeschichtung der SPIO-Partikel eine große Rolle spielt und sich deshalb ein Unterschied in den biologischen Effekten verschiedener SPIO zeigt.

Farrel *et al.* (2008) untersuchten die *In-vitro*-Differenzierung mittels histologischen und molekularen Analysen. Die Genexpressionsanalyse zeigte keinen Effekt der Beladung mit SPIO auf die adipogene und chondrogene Genexpression, allerdings fanden sich Unterschiede in Bezug auf die osteogene Differenzierung.

Hsiao *et al.* (2008) konnten keine Wirkung einer Markierung mit Gd-Fluoresceinisothiocyanat-mesoporösen Siliciumdioxidnanopartikeln auf die adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung von hMSC beobachten. Die Partikel wurden in späten Endosomen und Lysosomen lokalisiert.

Polyvinylpyrrolidon-beschichtete Partikel wurden in Studien von Reddy *et al.* (2009) mit Ferumoxiden (Endorem®, Feridex IV) verglichen. Dabei ergab sich keine Beeinträchtigung der Differenzierungskapazität von hBMSC nach der Beladung mit SPIO.

Ferucarbotran inhibierte die Chondrogenese, nach der Markierung mit Ferumoxiden und Protaminsulfat wurden die Zellen nicht beeinflusst, dagegen aber mit Poly-L-Lysin als TA (Arbab *et al.*, 2004a; Arbab *et al.*, 2005b; Bulte *et al.*, 2004; Kostura *et al.*, 2004). Es wurde festgestellt, dass die Partikelbeschichtung und das TA die Differenzierungskapazität der MSC beeinflussen.

Henning *et al.* (2009a) konnten keinen signifikanten Unterschied bei der Chondrogenese zwischen SPIO-markierten und unmarkierten hBMSC finden. Bei einer Reduzierung der Inkubationszeit folgte gleichzeitig eine Abnahme des intrazellulären Eisengehalts.

SPIO-Markierung von hMSC und deren Differenzierungspotential nach magnetischer Markierung

Ein Grund für die unterschiedlichen Wirkungen auf die Chondrogenese liegt darin, dass in einigen Studien die Zellen frisch isoliert waren, andere Forschungsgruppen dagegen kryokonservierte Zellen verwendeten. Außerdem gab es unterschiedliche Markierungsprotokolle. Van Buul *et al.* (2011) fanden keinen negativen Effekt der SPIO-Beladung auf die chondrogene Differenzierung von frisch isolierten Stammzellen. Dagegen ist ein inhibitorischer Effekt bei der Durchführung von Versuchen mit tiefgefrorenen Zellen erwiesen.

4. Relaxivitätsmessungen bei 7 T

4.1. Einleitung

Mit der Relaxivität (r_1 , r_2) kann man die Fähigkeit beliebiger magnetischer Partikel messen, wie entweder die T_1 -Relaxationszeit oder die T_2 -Relaxationszeit der umgebenden Wasser-Protonspins beeinflusst wird. Die Relaxivitätswerte zeigen die Relaxationserhöhung von Wasserprotonen bei einer KM-Konzentration von 1 mM. Die Relaxivität ist vom Gewebetyp, vom Partikelmaterial und von der Größe des magnetischen Felds abhängig.

Metallische Komplexe beeinflussen die Relaxationsrate im Gewebe, wobei das Ausmaß von unterschiedlichen Faktoren abhängig ist. Beispielsweise führen die chemische Umgebung und die Makromoleküle, die an KM binden, zu einer signifikanten Änderung der Relaxivität. Die Bildung der Proteinkorona kann leicht die Relaxivität von negativ geladenen SPIO erhöhen und die der positiv geladenen SPIO wesentlich senken, obwohl die Adsorption an der Oberfläche bei positiv geladenen SPIO-Partikeln signifikant niedriger ist als bei negativ geladenen (Amiri *et al.*, 2013). Außerdem kann eine Clusterung von NP r_2 stark verändern.

Es gibt die Relaxation der inneren Sphäre und die Relaxation der äußeren Sphäre. Im ersten Fall muss das paramagnetische Ion sich in der Nähe der Protonen der umgebenden Wassermoleküle befinden. Alle paramagnetischen KM bestehen aus Gd(III)- und Mn(II)-Chelaten, sie besitzen keinen metallischen Kern und keine Hülle. Obwohl paramagnetische KM Feldinhomogenitäten verursachen, ist ihr Einfluss auf die T_2 -Relaxationszeit der Protonen gewöhnlich niedriger als auf die T_1 -Relaxationszeit. Bei der Relaxation der äußeren Sphäre erzeugen SPIO große lokale Feldinhomogenitäten, was zu großen lokalen Feldgradienten führt. Dies beschleunigt die Dephasierung von Protonenspinn, was eine starke Reduzierung der T_2 -Relaxationszeit und einen relativ kleinen Einfluss auf die T_1 -Relaxationszeit zur Folge hat. Bei ferro- und ferrimagnetischen Materia-

lien erreicht die Magnetisierung bei hohen Magnetfeldstärken einen Sättigungswert. Daher werden alle Dipolmomente der Partikel in Richtung des Magnetfelds orientiert, sodass die maximale Anzahl atomarer Spins parallel ausgerichtet ist. Eine dipolare Interaktion zwischen Protonspin und Dipolmoment der Partikel findet durch die Diffusion von Protonen des Wassers, die benachbart zu den Partikeln sind, statt und wird als Relaxation der äußeren Sphäre bezeichnet. Man unterscheidet das Wasser, das mit Gd in Wechselwirkung tritt (innere Sphäre), und das Wasser der 2. Solvationshülle sowie dem Umgebungswasser (äußere Sphäre). Für T_1 -KM ist der Beitrag der inneren Sphäre für die Relaxation von großer Bedeutung. Detaillierte Wechselwirkungen zwischen Ion und Wasser lassen sich durch die Solomon-Bloembergen-Morgen-Theorie erklären. Hier wird nicht darauf eingegangen, da für negative KM nur die Äußere-Sphäre-Relaxation wichtig ist. Eisenoxide weisen eine Nettomagnetisierung (Summe der magnetischen Momente aller Spins entlang B_0) auf, die mit steigendem externen Magnetfeld ansteigt. Die Modulation dieser Nettomagnetisierung verursacht eine Protonenrelaxation (Curie-Spin-Relaxation). Das r_2/r_1 -Verhältnis steigt mit der Größe der Partikel an sowie mit zunehmender Anzahl von Aggregaten. Diese Aggregate können als große magnetisierte Sphäre betrachtet werden, deren magnetisches Moment mit zunehmender Feldstärke ansteigt. Das führt zum Suszeptibilitätseffekt, weshalb SPIO-Partikel als T_2 -Relaxationsagenzien wirken.

Der andere wichtige Faktor, der eine Rolle beim Einfluss des KM auf die Relaxationsrate spielt, ist die Kompartimentalisierung von Metallkomplexen in Gewebe. Dabei ist die Geschwindigkeit des Protonenaustausches zwischen den unterschiedlichen Kompartimenten wichtig im Vergleich zur T_1 -Relaxation aller Komponenten. In den meisten Fällen verhalten sich T_1 - und T_2 -Relaxationskurven monoexponentiell. Ein Grund für einen multiexponentiellen Verfall ist die Kompartimentalisierung, sodass sich die Gesamtrelexation aus der Relaxation individueller Komponenten zusammensetzt. Die tatsächliche Größe und Richtung magnetischer Feldverschiebungen ist stark von Größe und Form der biologischen Kompartimenten abhängig, in denen sich das KM befindet. Die Größe der Suszeptibilitätskontrasteffekte ist wiederum von der Wasserdiffusion abhängig. Die magnetische Suszeptibilität des KM kann eine Feldinhomogenität verursachen, wodurch sich T_2 reduziert. Die Wasserdiffusion führt zur Protonendephasing, aber auch ohne Wasserdiffusion verursachen Feldinhomogenitäten eine Intravoxeldephasierung und somit einen Signalverlust auf Gradienten-Echo-Bildern aufgrund unterschiedlicher mikroskopischer Magnetfelder innerhalb der Voxel.

Es gibt Unterschiede in der Wasserdiffusion in Abhängigkeit von der Kompartimentalisierung des KM, besonders für T_1 -KM. Befindet sich z. B. Gd-haltiges KM in einem Teströhrchen, wird dort das Wasser wenige Mikrosekunden brauchen, bis es zwischen den Gd-Molekülen diffundiert. Wenn allerdings das gleiche KM mikrovaskulär (in kleinen Blutgefäßen) kompartimentalisiert ist, braucht es einige Sekunden, bis das Wasser diffundieren kann. Simon *et al.* (2006) zeigten, dass freies extrazelluläres Ferumoxtran-10 (USPIO) höhere r_2 -Relaxivitätswerte im Vergleich zu interzellulär kompartimentalisierten USPIO aufwies. Bei gleichmäßig verteilten magnetischen Dipolen wurde ein schnellerer Verfall des statischen MR-Signals beobachtet als bei kompartimentalisierten magnetischen Dipolen.

Man unterscheidet schnellen, mittleren und langsamen Austausch von Wasser, je nachdem, wie schnell sich das Wasser zwischen den Kompartimenten bewegt. Manche biologischen Kompartimente haben einen langsamen Wasseraustausch, außer bei extrem hohen KM-Konzentrationen.

Der Diffusionskoeffizient von Wasser ist im Inneren der Zelle niedriger als in reiner Lösung. Die Membranen der Organellen sowie intrazelluläre Kompartimente sind diffusionsbegrenzt und somit ist die Zugänglichkeit der KM limitiert. In biologischen Geweben können die Moleküle aufgrund der großen Zahl makromolekularer Strukturen und dem Vorhandensein von Barrieren nicht mehr in alle Richtungen diffundieren. Man sagt, es liegt eine anisotrope Diffusion vor, diese spielt eine wichtige Rolle bei der Spin-Spin-Relaxation.

Die Kompartimentalisierung ist, wie schon früher erwähnt, entscheidend für die Bildgebung von T_1 -KM. Bei intrazellulären Gd-haltigen KM spielt die Verteilung des KM im Gewebe eine entscheidende Rolle für die effektive Relaxation, im Fall von eisenoxidbasierten KM hat sie aber aufgrund von Suszeptibilitätseffekten keine Wirkung auf den Kontrast.

Suszeptibilitätsbasierte T_2 - und T_2^* -KM, die zu lokalen Inhomogenitäten des Magnetfelds führen, sind dann anzuwenden, wenn die Wirkung der KM durch einen langsamen Wasseraustausch oder eine Kompartimentalisierung begrenzt ist, z. B. beim sogenannten First-pass-Perfusions-Imaging im Gehirn.

Der Einfluss von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf die Relaxationszeiten in einer homogenen Substanz lässt sich mithilfe der BPP-Theorie (Relaxationstheorie nach Bloembergen, Purcell und Pound) beschreiben. Es wird angenommen, dass die Diffusion in einer isotropen Umgebung richtungsabhängig stattfindet. Diese Annahme ist für Flüssig-

keiten gut erfüllt. Die BPP-Theorie verknüpft die Korrelationszeit mit den Relaxationszeiten der Spins. Es werden für die T_1 und T_2 Formeln hergeleitet, die neben den Korrelationszeiten von der Hauptmagnetfeldstärke, dem Abstand zwischen den Kernen und dem magnetischen Dipolmoment abhängen. Dabei wird gezeigt, dass T_2 mit steigender Korrelationszeit und Bildungstärke sinkt, während T_1 bei einer bestimmten Korrelationszeit ein Minimum erreicht und danach wieder steigt.

Die Korrelationszeit ist diejenige Zeit, in der ein bestimmter Zustand bewahrt bleibt oder sich die Molekülorientierung ändert. Je länger die Korrelationszeit ist, desto schneller ist die effektive Dephasierung der Spins. Ist die Korrelationszeit sehr kurz, ändern sich die Magnetfelder sehr schnell und die effektive Dephasierung läuft deutlich verlangsamt ab.

Die BPP-Theorie gilt also nur für mononukleäre Lösungsmittel (Wasser, Ethanol, Glycerol) und nicht für Gewebe, in denen das Verhältnis zwischen Makromolekülen und Wasser unterschiedlich ist und die als multikomponentär zu betrachten sind. Für visköse Flüssigkeiten sind beide Relaxationszeiten frequenzabhängig.

4.2. Material und Methoden

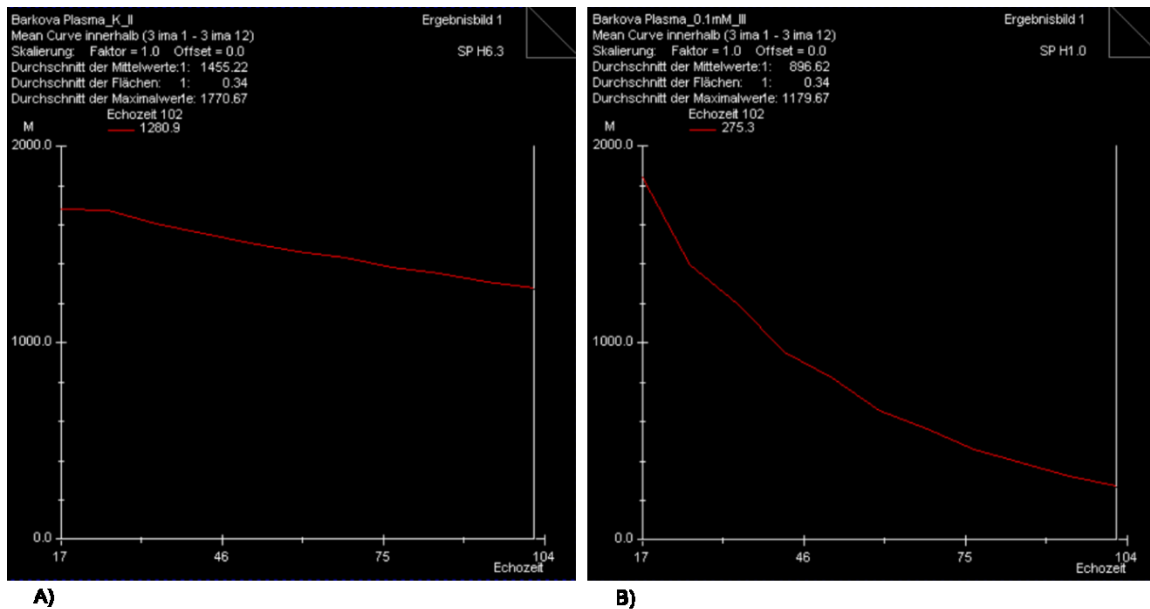
Die Messungen erfolgten in einem 7-T-Kleintier-MRT (ClinScan 70/30 USR, Bruker) unter Verwendung einer Birdcage-Spule. In allen Sequenzen wurden transversale Schichten mit einer Dicke von 2 mm gewählt. Für die Messung der T_2 -Relaxationszeit wurde eine SE-Sequenz mit folgenden Parametern verwendet: TR = 2500, TE = 8,5/17/25,5/34/42,5/51/59,5/68/76,5/85/93,5/102 ms, Matrix = 128 x 128 Pixel. Das FoV betrug 113 x 113 Pixel. Die Voxelgröße lag bei 0,883 x 0,883 x 2,00 mm. Die Akquisitionszeit betrug 5 min 23 s. Für die Bestimmung der T_1 -Relaxationszeit wurde eine TSE-Sequenz mit folgenden Parametern verwendet: TI = 500/1000 ms, TR = 7000 ms, TE = 7,9 ms, Turbofaktor = 7 und Matrix = 77 x 85 Pixel. Das FoV betrug 77 x 85 Pixel. Die Voxelgröße resultierte in 0,664 x 0,664 x 2,00 mm. Die Akquisitionszeit bei jeder TI betrug 2 min 6 s.

Die Messungen wurden in einer vorher angepassten ROI vorgenommen (Abb. 24), deren Größe bei allen Messungen bei 0,33 cm² lag. Die Auswertung der MRT-Daten erfolgte mithilfe der Software Syngo MR B15 (Siemens). Die Relaxationsraten R_1 und R_2 konnten nach Formel 3 berechnet werden und korrelierten linear mit der SPIO-Konzentration. Zur Bestimmung der Relaxivitäten r_1 und r_2 wurden die Relaxationsraten der

Konzentrationsreihe einer NP-Dispersion gegen die analytische Eisenkonzentration aufgetragen. Die Steigung der ermittelten Ausgleichsgeraden entsprach der konzentrationsunabhängigen Relaxivität.

FeraSpin™ R wurde freundlicherweise von der Firma nanoPET GmbH zur Verfügung gestellt. Die SPIO-Partikel lagen in einer isotonischen Lösung vor und wurden durch die Carboxydextranhülle stabilisiert. Durch Verdünnung der SPIO-Partikel mit Wasser (AppliChem GmbH) und dem Mausplasma (Na-heparinisiert, gesamter Proteingehalt lag bei 4,7 g/dl, der Albumingehalt bei 2,3 g/dl) wurden 4 Verdünnungsreihen angesetzt. Jede bestand aus je 3 verschiedenen Eisenoxidkonzentrationen: 0,1 mmol/L, 0,25 mmol/L und 0,5 mmol/L. Die MRT-Messungen wurden in einem Phantom, bestehend aus einer mit Wasser gefüllten Spritze, in der ein einzelnes Eppi platziert wurde, durchgeführt. Der Durchmesser des Eppi betrug 1 cm, das Volumen 1,85 ml.

Es wurden die T_1 - und T_2 -Relaxationzeiten verschiedener eisenoxidhaltiger KM-Lösungen bei 7 T gemessen. Das r_2/r_1 -Verhältnis sollte bei unterschiedlichen Eisenkonzentrationen in Wasser und Mausplasma im 7-T-MRT ermittelt werden. In Abb. 22 und 23 ist die T_2 -Signalintensität in Abhängigkeit von der Eisenoxidkonzentration und TE dargestellt.



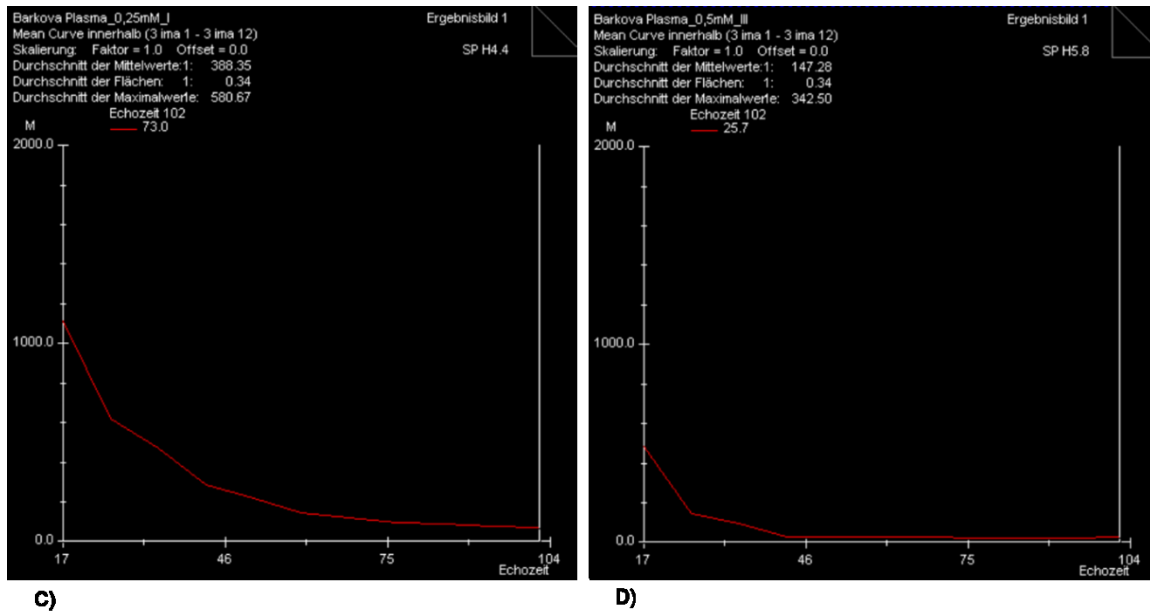


Abb. 22: Bestimmung der T_2 -Zeit. Bruker-Mean-Curve mit T_2 -Signalwert des Messfelds (ROI) vs. Echozeit. T_2 -Zeit wurde bei unterschiedlichen KM-Konzentrationen in Mausplasma gemessen: 0,1 mmol/L (B), 0,25 mmol/L (C) und 0,5 mmol/L (D) sowie ohne KM (A). Bei längerer TE und bei höheren KM-Konzentrationen war das Gesamtsignal so niedrig, dass es zur Signalauslöschung kam (D). Mit der Erhöhung der KM-Konzentration von 0,1 auf 0,5 mmol/L reduzierte sich die Signalintensität schneller (B–C–D).

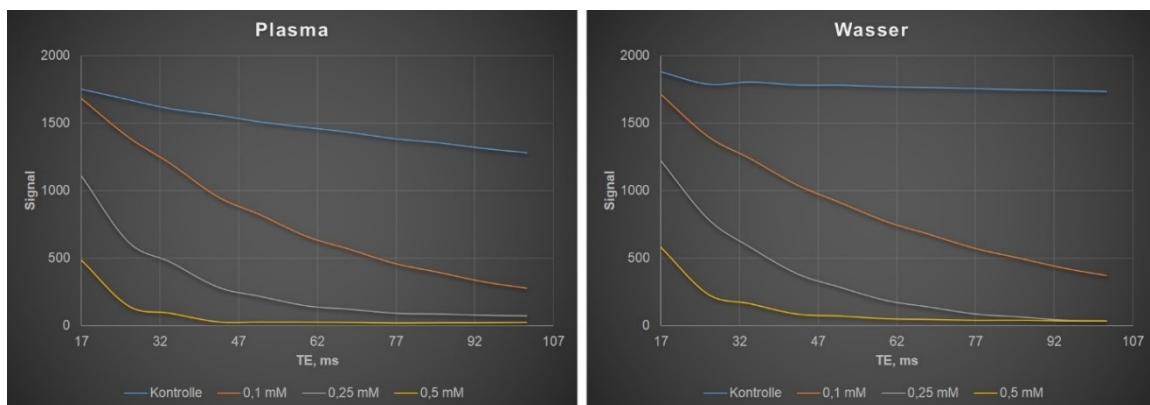


Abb. 23: Darstellung der Signalintensitäten bei verschiedenen KM-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Echozeit für T_2 -gewichtete Aufnahmen, gemessen in Plasma (links) und Wasser (rechts).

Im Anschluss an die MRT-Messung konnte die T_2 -Zeit durch exponentielle Kurvenanpassung an die zu verschiedenen Echozeiten (TE) ermittelten Signalwerte berechnet werden.

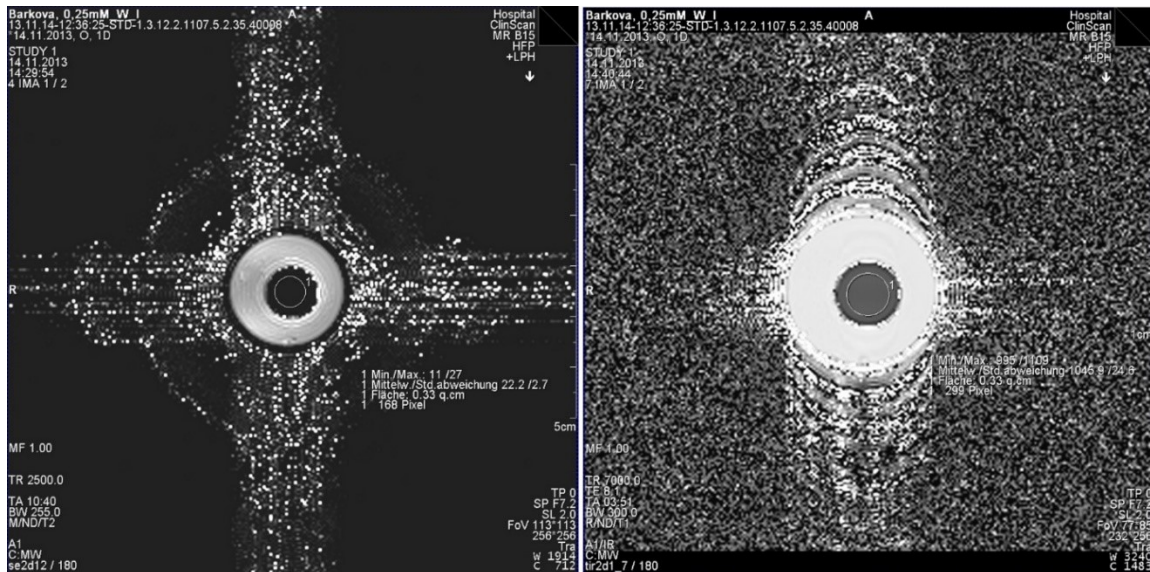


Abb. 24: Auswertungsbeispiel eines Phantoms. Messungen eines eisenoxidhaltigen MR-KM verdünnt in Wasser bei 7 T, Konzentration des KM = 0,25 mmol/L. Als Beispiel sind T2- (links) und T1-Auswertungsbilder (rechts) dargestellt. Es sind Mittelwert, Standardabweichung, Flächengröße und Pixelanzahl der ausgewählten ROI zu sehen.

4.3. Ergebnisse und Diskussion

Die magnetischen Eigenschaften der SPIO-Partikel und deren Blut-Pharmakokinetik sind wichtige Merkmale für die MRT-Bildgebung. Die magnetischen Eigenschaften werden durch den Eisenoxidkern vermittelt. Eine hohe Magnetisierung ist wichtig, da dadurch die Protonen-Relaxivität beeinflusst wird. Die Wirkung von KM wird über die Beschleunigung der Relaxation von Protonen in einer Lösung bestimmt. Die Relaxivität ist stark von der Partikelgröße, aber nicht von den Umhüllungsmaterialien abhängig (Roohi *et al.*, 2012), dabei steigt die T2-Relaxationsrate mit steigender Partikelgröße. Die Blut-Pharmakokinetik ist eine weitere wichtige Charakteristik der SPIO-Partikel. Hierbei beeinflussen sowohl die Partikelgröße als auch die Beschichtung die Blutkinetik unabhängig voneinander.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Relaxivitäten von KM (FeraSpin™ R) untersucht, um beurteilen zu können, welche Eigenschaften sie als MR-KM haben. Es wurden die magnetischen Relaxationszeiten in Wasser und Mausplasma bei unterschiedlichen KM-Konzentrationen gemessen. Für die grafische Darstellung in Abb. 25 und 26 wurden die R1- und R2-Werte gegen die KM-Konzentrationen aufgetragen. Mit steigender Eisenkonzentration nimmt R2 stark zu. Die R1- (Abb. 25) und R2-Werte (Abb. 26) zeigten eine lineare Abhängigkeit von der Eisenkonzentration.

Relaxivitätsmessungen bei 7 T

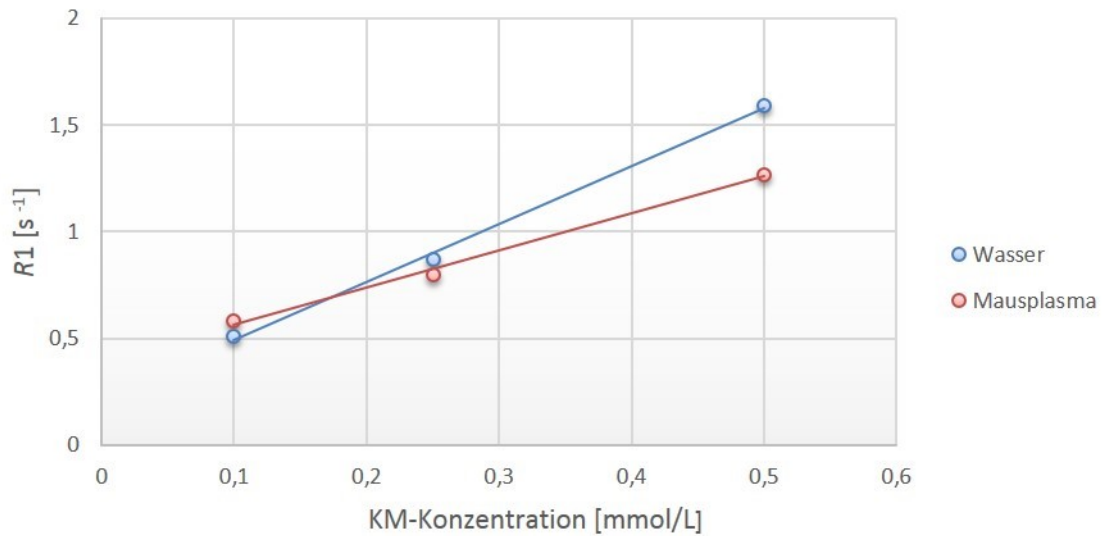


Abb. 25: R_1 -Relaxationsraten eisenoxidhaltiger KM-Lösungen bei RT, gemessen mittels 7-T-MRT. Die R_1 -Relaxationsraten sind als Funktion der SPIO-Partikelkonzentrationen in den untersuchten KM-Lösungen dargestellt. Die Versuche wurden mit FeraSpin™ R durchgeführt.

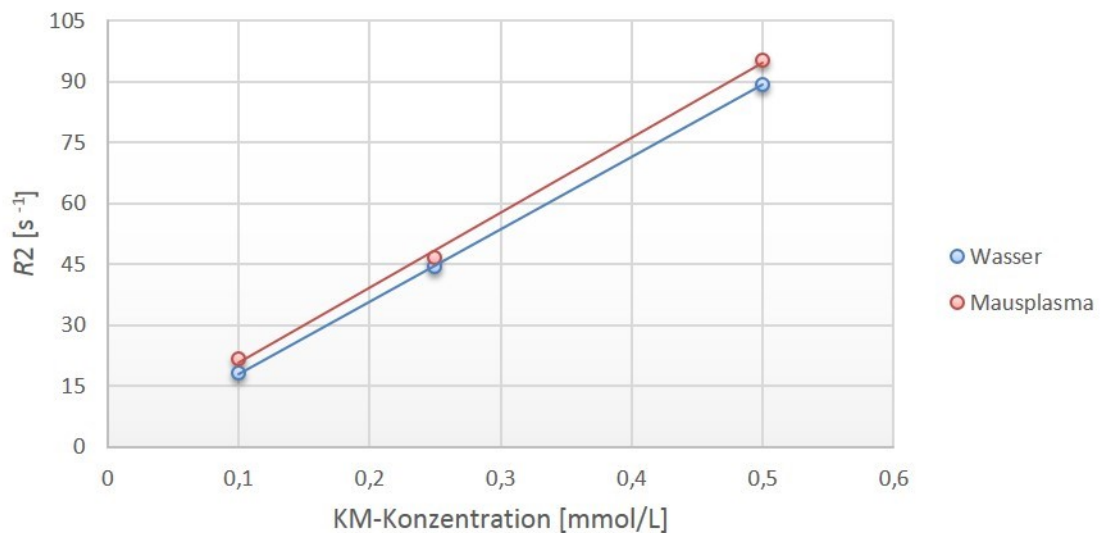


Abb. 26: R_2 -Relaxationsraten eisenoxidhaltiger KM-Lösungen bei RT, gemessen mittels 7-T-MRT. Die Experimente wurden mit FeraSpin™ R durchgeführt.

Die Ergebnisse der Relaxivitätsmessungen in den untersuchten Lösungen vor der Kontrastmittelgabe sind in Tab. 2 dargestellt. Am größten fällt die Differenz zwischen $1/T^0_2$ in Wasser und $1/T^0_2$ in Mausplasma aus. In Mausplasma kam es bereits ohne KM zu

einer deutlichen Verkürzung der T_2 -Zeit. Dies lässt sich durch die höhere Viskosität des Plasmas erklären. Tab. 3 zeigt die r_1 - und r_2 -Werte sowie das r_2/r_1 -Verhältnis der untersuchten SPIO-Partikel in Wasser und Mausplasma.

Tab. 2: Relaxationsraten* der untersuchten Lösungen bei RT, gemessen mittels 7-T-MRT

	$1/T^0_1$	$1/T^0_2$
Wasser	0,3	0,83
Mausplasma	0,45	3,2

*Werte in s^{-1}

Tab. 3: Relaxivitäten* des eisenoxidhaltigen KM in Wasser und Mausplasma bei RT, gemessen mittels 7-T-MRT, sowie r_2/r_1 -Verhältnis

	r_1	r_2	r_2/r_1
Wasser	2,7	178	66
Mausplasma	1,7	184,6	108,6

*Werte in $mM^{-1}s^{-1}$

Die *In-vitro*-Relaxometrie der Proben in Wasser ergab für die longitudinale Relaxivität einen Wert von $r_1 = 2,7 mM^{-1}s^{-1}$. Für die transversale Relaxivität wurde ein Wert von $r_2 = 178 mM^{-1}s^{-1}$ in Wasser ermittelt. Die Messung der Protonenrelaxation von mit Carboxydextran beschichteten SPIO-Partikeln ergab Werte von 1,7 für $r_1 mM^{-1}s^{-1}$ und von 184,6 $mM^{-1}s^{-1}$ für r_2 , gemessen in Mausplasma bei 7 T und RT. Bei der Messung in Mausplasma zeigte sich, dass der r_2 -Wert höher war gegenüber dem, der in Wasser gemessen wurde.

SPIO-basierte-KM können die T_2 -Relaxation verkürzen und ihre Gesamteffektivität ist durch die T_2 -Relaxivität (r_2) darstellbar. Die T_2 -Relaxivität der SPIO-Partikel ist abhängig von dem umgebenden Magnetfeld, der Partikelgröße, der Zusammensetzung der SPIO und dem Grad der SPIO-Clusterung. Aggregate aus mehreren SPIO-Nanokristallen haben bei gleicher Eisenkonzentration einen stärkeren T_2 -Effekt als nicht aggregierte, einzelne Nanokristalle. Eine Clusterung von SPIO-Partikeln in dichten Vakuolen bringt einen besseren lokalen Kontrast als SPIO, die im Cytoplasma verteilt sind. Bei der Clusterung der SPIO-Partikel in den Lysosomen der Kupffer-Zellen kommt es zum T_2/T_2^* -Effekt. Der T_2^* -Effekt ist von der räumlichen Verteilung der SPIO-Partikel und

der Clustergröße abhängig, da große Cluster eine größere lokale magnetische Verzerrung erzeugen. Der T_2 -Effekt wird durch die Interaktion zwischen Wasser und magnetischem Zentrum beeinflusst. Hier ist die räumliche Verteilung wichtiger als die Clustergröße. Die Clusterung führt zur Zunahme der mittleren Distanz zwischen magnetischem Zentrum und Wassermolekülen. Der T_1 -Effekt tritt aufgrund der Zirkulation einzelner SPIO-Partikel im Blut auf und wird als Blut-Pool-Effekt bezeichnet.

T_2 -negative KM werden eingesetzt, um die transversale Relaxationszeit T_2 eines Gewebes zu verkürzen und um den Unterschied zwischen normalem und pathologischem Gewebe zu intensivieren. Neben den pharmakologischen Eigenschaften (Verteilung im Körper) ist die Effizienz eines KM von den magnetischen Eigenschaften (z. B. Relaxivität) abhängig (Heiland *et al.*, 2010; Lauffer, 1987). Die Relaxivität (r_1 , r_2) mit der Einheit $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ wird als Maß für die Wirksamkeit eines Kontrastmittels, die unabhängig von dessen Konzentration ist, verwendet. SPIO-Partikel (z. B. Endorem®, Resovist®) haben ein hohes r_2/r_1 -Verhältnis und kurze Bluthalbwertszeiten (< 10 min), während USPIO ein niedriges r_2/r_1 -Verhältnis und lange Bluthalbwertszeiten (< 2 h) aufweisen (Hamm *et al.*, 1994; Josephson *et al.*, 1988; McLachlan *et al.*, 1994; Reimer & Tombach, 1998). Das Verhältnis r_2/r_1 gibt an, ob das KM bei einer ausgewählten Sequenz positiv (T_1 -KM) oder negativ (T_2 -KM) ist. Da die T_1 - und T_2 -Zeiten von der Magnetfeldstärke beeinflusst werden (Pintaske *et al.*, 2006; Rohrer *et al.*, 2005), wurden die r_1 - und r_2 -Werte (bei 7 T) der hier getesteten SPIO-Partikel mit den Werten für Resovist®, einem klinisch zugelassenen Vertreter negativer MRT-KM, die bei geringeren Magnetfeldstärken in der Literatur beschrieben sind, verglichen (Tab. 4).

Im biologischen Milieu sind die Relaxationszeiten T_1 und T_2 von dem molekularen Aufbau, der Packungsdichte, der molekularen Beweglichkeit, der Temperatur sowie der Viskosität abhängig (Zeitler, 1984). Das r_2/r_1 -Verhältnis hängt sehr stark von der Größe der Partikel ab, mit zunehmendem Durchmesser nimmt es zu (Allkemper *et al.*, 2002). Die Relaxivität ist sowohl von der Kerngröße als auch vom hydrodynamischen Durchmesser der Partikel abhängig, der von der Beschichtung beeinflusst wird (Josephson *et al.*, 1988; Weissleder *et al.*, 1995).

Tabelle 4. Vergleich von r_1 - und r_2 -Werten von Carboxydextran-beschichteten Eisenoxid-Nanopartikeln

Autor	Temperatur (°C)	Feldstärke (T)	Lösung	Resovist®		Carboxydextran-beschichtete SPIO, 60 nm		FeraSpin™ R	
				r_1^*	r_2^*	r_1^*	r_2^*	r_1^*	r_2^*
Lawaczek <i>et al.</i> , 1997	40	0,47	Wasser	24,7±0,2	163,8±5,5				
Schering AG	37	1,5	Blut	7,2±0,1	82±6,2				
Roohi <i>et al.</i> , 2012	40	1,4	Wasser			8,8±0,1	303±1		
Miltenyi Biotech	37	1,41	Wasser					10	185
	37	1,5	Rattenplasma					7	95
Rohrer <i>et al.</i> , 2005	37	3	Wasser	4,6 (4,3–4,9)	143 (132–154)				
	37	4,7	Wasser	2,8 (2,7–2,9)	176 (167–185)				
	37	3	bovines Plasma	3,3 (3,1–3,5)	160 (140–180)				
	37	4,7	bovines Plasma	1,7 (1,6–1,8)	118 (110–126)				
vorliegende Studie	RT**	7	Wasser					2,7	178
	RT**	7	Mausplasma					1,7	184,6

*Werte in $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$

**Raumtemperatur

Magnetisch wirksame Substanzen, die als KM geeignet sind, müssen zur Beeinflussung der Protonenrelaxation ungepaarte Elektronen aufweisen, da das magnetische Moment des Protons 657-mal und das des Neutrons 963-mal schwächer ist als das des Elektrons (Lissner & Baierl, 1990). Ungepaarte Elektronen besitzen einen Spin und damit ein magnetisches Moment. Durch eine Veränderung des lokalen Magnetfelds bewirken diese Substanzen eine Verkürzung der Relaxationszeit. Das hier verwendete KM, dessen magnetischer Kern aus polykristallinem Eisenoxid besteht, wurde für die negative Bildgebung entwickelt. Eine Bedingung für seinen Einsatz ist die Maximierung des Verhältnisses der transversalen Relaxivität r_2 zur longitudinalen Relaxivität r_1 . Höhere Magnetfeldstärken ermöglichen eine höhere Signalintensität und eine Verbesserung des Signal-zu-Rausch-(S/R-)Verhältnisses. In der vorliegenden Arbeit waren höhere r_2 -Relaxivitätswerte, eine starke Verkürzung der T_2 - und T_2^* -Zeit sowie zusätzlich in einem geringeren Ausmaß eine Verkürzung der T_1 -Zeit zu erwarten. Dies sollte durch mehrere Messungen von unterschiedlichen KM-Konzentrationen in Wasser und Mausplasma jeweils bei RT veranschaulicht werden.

FeraSpin™ R führte durch eine Verminderung der T_2 -Zeit von Wasserstoffprotonen zu einem Abfall der Signalintensität in T_2 -gewichteten Bildern. Bei einer KM-Konzentration von 0,1 mmol/L konnte die T_2 -Relaxationszeit von Wasser von $1204,2 \pm 36,5$ ms auf $55,3 \pm 0,7$ ms verkürzt werden; die T_2 -Zeit von Mausplasma wurde bei gleicher KM-

Konzentration von $311,6 \pm 13,6$ ms auf $45,8 \pm 0,55$ ms verkürzt. Um genauere Relaxivitätswerte zu erhalten, wurden die T_2 - und die T_1 -Zeit bei 0,25 mmol/L und 0,5 mmol/L gemessen. In den meisten Fällen stieg die Relaxationsrate proportional zur Konzentration des KM. Und da die Abhängigkeit zwischen den Relaxationsraten und der Konzentration des KM linear war (Abb. 25, 26), entsprach die Steigung aus der linearen Regressionsgeradengleichung der Relaxivität.

Die aus Relaxivitätsmessungen ermittelten Relaxivitätswerte stellen ein relatives Maß für die Bestimmung der Wirksamkeit des KM dar. Diese Werte konnten für einen KM-Vergleich herangezogen werden. Da die hier dargestellten Werte bei RT gemessen wurden, war ein Vergleich mit früheren Ergebnissen nur eingeschränkt möglich. Als Referenz diente ein Relaxivitätsvergleich mit Resovist®, dessen r_1 - und r_2 -Werte bekannt sind. Die Messungen von SH U555A (Resovist®) wurden vorwiegend bei 0,47 T und 1,5 T entweder spektroskopisch oder mit einem bildgebenden Verfahren durchgeführt (Tab. 4). Der Vergleich der r_2 - und r_1 -Relaxivitätswerte von Referenz-KM und FeraSpin™ R in Wasser ergab, dass die r_2 - und die r_1 -Werte bei 7 T mit den Werten, die von Rohrer *et al.* (2005) bei 4,7 T ermittelt wurden, vergleichbar sind. Ihre Studien belegen, dass die bei 4,7 T durchgeführte KM-gestützte MRT in der Lage ist, einen stärkeren T_2 -Effekt im Vergleich zur Bildgebung bei 1,5 T und 3 T zu erzielen. Die bei einer höheren Magnetfeldstärke zu erwarteten höheren r_2 -Relaxivitätswerte konnten hier nicht beobachtet werden. Das war offenbar auf die Unterschiede in den Bedingungen, und zwar in der Temperatur von 37 °C gegenüber RT zurückzuführen. Ein anderer Haupteffekt, der einen Einfluss auf die Relaxometrie und deren Parameter zeigt, ist die Feldinhomogenität. Da die Dephasierung nach dem 90°-Impuls bei der Inhomogenität rascher erfolgt und das Magnetfeld im 7-T-Kleintier-MRT möglicherweise homogener ist als beim Ganzkörper-MRT-Scanner, könnte man demzufolge etwas kürzere T_2 -Relaxationszeiten im klinischen Ganzkörper-MRT erwarten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lieferten einen etwas höheren r_2 -Wert in Mausplasma als in Wasser (Tab. 3). Dies lässt sich durch die unterschiedliche Viskosität der untersuchten Lösungen erklären. Die Relaxation in Lösung wird von den Rotationsbewegungen der Moleküle beeinflusst. Diese Bewegungen ändern sich mit der Viskosität und der Temperatur der untersuchten Lösungen. Bei einer niedrigen Temperatur wie der RT rotieren die Moleküle langsamer. Zudem beeinflussen die Viskosität und die Gesamtproteinkonzentration die T_1 - und T_2 -Zeiten (Zeitler, 1984). Auch Rohrer *et al.* (2005) zeigten einen leichten Abfall von r_1 und einen deutlichen Anstieg von r_2 im Vergleich von Wasser zu Plasma und Blut. Außerdem wurde in den Studien gezeigt, dass die Relaxivität stark von

der Partikelgröße, aber nicht von der Partikelbeschichtung abhängig ist. Es wurden Partikel (Größe 50 nm) mit unterschiedlichen Beschichtungen, wie Polyacrylsäure, Carboxydextran, Stärke, und PEG-Partikel untersucht, die den gleichen magnetischen Kern hatten. In einem magnetischen Feld ist die Reaktion dieser Kerne vergleichbar und der Polymer-Layer trägt nicht signifikant zur Bildung oder Orientierung schon vorhandener magnetischer Domänen und/oder Kristallstrukturen bei.

Es konnte gezeigt werden, dass bei 7 T in Plasma ein höherer r_2 -Relaxivitätswert im Vergleich zu 1,5 T ermittelt wurde (vgl. Herstellerangaben, Miltenyi Biotec, 2010, Tab. 4). Hier wurde für FeraSpin™ R ein r_1 von 2,7 in Wasser und ein r_1 von 1,7 in Plasma gemessen (Tab. 3). Die r_1 -Relaxivität in Plasma nahm im Vergleich zum Wasser aufgrund des zunehmenden T_2 -Effekts ab.

Da die Relaxationsmechanismen stark vom Gesamtdurchmesser-Kern-Verhältnis der Partikel und damit von diesen Parametern abhängig sind, sollte hier auf die genannten Eigenschaften eingegangen werden. Bei Resovist® liegt das Verhältnis von Gesamtdurchmesser zu Eisenoxidkerndurchmesser bei 6,78 (Briel, 2007). Für die T_2 -Relaxivität ist ein niedrigeres Verhältnis zu bevorzugen, das im Bereich von 1,5–3 liegen oder kleiner als 1,5 sein sollte, da bei größerem Eisenoxidkerndurchmesser eine höhere r_2 -Relaxivität beobachtet wurde. Die Arbeiten von Roohi *et al.* (2012) zeigten auch einen Einfluss der Partikelgröße auf die T_2 -Zeit bzw. r_2 -Relaxivität. Es wurden mit Carboxydextran-beschichtete SPIO-Partikel definierter Größe untersucht. r_2 stieg bis zu einem Partikeldurchmesser von 60 nm linear an und blieb dann für größere Partikel konstant. Die Partikelgrößen von FeraSpin™ R variieren im Bereich zwischen 10 und 90 nm; somit besitzt FeraSpin™ R eine breite Größenverteilung. Aus diesem Grund wurde das gemessene Signal entsprechend nicht exakt beschrieben, da die getestete SPIO-Fraktion sowohl Teilchen mit schnelleren als auch mit langsameren Relaxationszeiten im Vergleich zur mittleren Relaxationszeit einschließt. Allerdings demonstrierten diese SPIO-Partikel bei allen getesteten Eisenkonzentrationen den stärksten T_2 -Effekt. Es wurde auch ein T_1 -Effekt von den in Lösungen befindlichen Eisenoxid-NP erzielt.

FeraSpin™ R bewirkte aufgrund seiner hohen r_2 -Relaxivität schon bei relativ niedrigen Konzentrationen ein Absinken der Signalintensität. Infolge der höheren r_2 - gegenüber der r_1 -Relaxivität war ein hohes r_2/r_1 -Verhältnis zu verzeichnen, was zu einer Verstärkung des T_2 -Effekts führte. Das hier verwendete KM eignet sich somit als exzellentes KM für T_2 -gewichtete Sequenzen.

Schlußfolgerung

Die Ergebnisse der hier präsentierten Arbeit tragen zur Optimierung der Bedingungen bei der Zellmarkierung mit SPIO-Partikeln bei. Für eine erfolgreiche SPIO-Aufnahme von phagozytierenden Zellen wird eine Konzentration von 27,92 µg Fe/ml und eine Inkubationszeit zwischen 12 und 24 h benötigt. Diese Angaben gelten für mit Carboxydextran beschichtete SPIO-Partikel, die negativ geladen sind. In Experimenten zur Effizienz der Aufnahme von SPIO konnte eine dosisabhängige und bei einer Konzentration von 27,92 µg Fe/ml eine zeitabhängige Beziehung zwischen dem intrazellulären Eisengehalt und der SPIO-Konzentration bei der Markierung muriner Makrophagen und humaner leukämischer Monocyten gezeigt werden. Bei einer SPIO-Konzentration von 2,79 µg Fe/ml wurde kein zeitabhängiger Effekt bei der Markierung dieser Zelltypen festgestellt.

Im Hinblick auf die magnetischen Eigenschaften der SPIO-Partikel, mit denen Versuche mit J774A.1- und THP-1-Zellen durchgeführt wurden, wurden während Relaxivitätsmessungen die Relaxivitätswerte eisenoxidhaltiger KM in Wasser und Mausplasma bei RT – gemessen bei 7 T – ermittelt. Bei allen Eisenkonzentrationen wurde ein starker T₂-Effekt beobachtet.

Für die Stammzellmarkierung wurden dextranbeschichtete Ferumoxide mit einer Größe von 100–200 nm und ohne Transfektionsagens verwendet, da diese Partikel eine positive Ladung und ein Zetapotential von +15 bis +20 mV haben, im Gegensatz zu Endorem® und zu der anderen in dieser Arbeit untersuchten SPIO-Formulierung. Da es für die Stammzelltherapie essenziell ist, dass die Funktionsfähigkeit der Stammzellen nach der magnetischen Markierung unbeeinträchtigt bleibt, wurde nach der SPIO-Markierung mit positiv geladenen SPIO-Partikeln die Differenzierung zu Osteoblasten und Adipocytten induziert, und zwar direkt nach der SPIO-Inkubation mit 25 µg Fe/ml bei einer Inkubationszeit von ca. 16 h. Es konnte gezeigt werden, dass die Differenzierungsfähigkeit der Stammzellen *in vitro* nach der magnetischen Markierung nicht beeinflusst wurde. Am Tag 18 der Differenzierung zu Osteoblasten wurde extrazelluläres Calcium mittels Alizarin-Red-S-Färbung sowohl bei markierten als auch bei unmarkierten Zellen nachgewiesen. Die Lipidvakuolen in den differenzierten Adipocytten konnten 20 Tage nach der Induzierung der Differenzierung mittels Oil-Red-O-Färbung in markierten und unmarkierten Zellen beobachtet werden.

Es gibt viele Arbeiten, die sich mit dem Differenzierungspotential der Stammzellen nach der Markierung mit SPIO beschäftigen, aber nur in wenigen Publikationen sind die genauen Bedingungen beschrieben. Daher stellte sich die Frage, ob die Differenzierung gleich nach der Markierung induziert wurde oder die Zellen für eine bestimmte Zeit in

Schlußfolgerung

normalem Medium kultiviert worden waren, bevor man die Induzierung der Differenzierung startete. Das hier beschriebene Protokoll entspricht am ehesten den Bedingungen, die für das *Ex-vivo*-Labeling und das *In-vivo*-Zelltracking relevant sind.

Insgesamt konnten aus den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen wichtige Erkenntnisse bzgl. der direkten Markierungstechnik mit SPIO und über die magnetischen Eigenschaften der SPIO-Partikel gewonnen werden.

Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bieten einen guten Ausgangspunkt zur Erforschung der Wirksamkeit zweier SPIO-Formulierungen (FeraSpin™ R und FeraTrack™ Direct), die hier untersucht wurden, für die *In-vivo*-Bildgebung. Es sollten die zellulären Ergebnisse, die bei den *In-vitro*-Untersuchungen gewonnen wurden, mit den *In-vivo*-Ergebnissen in Bezug auf die Bewertung der intrazellulären Aufnahme von SPIO und die Regenerationskapazität der hMSC nach der SPIO-Markierung verglichen werden. Daher ist eine Untersuchung im Mausmodell notwendig.

Die klinische MRT ist bisher zumeist bei Feldstärken von bis zu 1,5 T durchgeführt worden. Mit steigender Magnetfeldstärke nimmt die Signalstärke der einzelnen Punkte eines MR-Bildes zu. Durch eine höhere räumliche Auflösung lassen sich mit einem 7-T-MRT somit kleinere Gewebeveränderungen darstellen. Hierbei wäre als Erstes die Klärung der Fragestellungen anhand von Ergebnissen, die bei 1,5 T (oder 3 T) gemessen wurden, und mit höherer Magnetfeldstärke von großer Bedeutung. Die Möglichkeiten eines 7-T-Geräts sowie die neu entwickelten SPIO-Partikel bieten die besten Voraussetzungen, um eine Qualitätsverbesserung in der Bildgebung zu erreichen.

FeraSpin™ R hat eine breite Größenverteilung, wünschenswert sind allerdings praktisch monodisperse Reinheiten von mehr als 90 %. Aus diesem Grund werden SPIO-Chargen bestimmter Größen mittels magnetischer Separation getrennt. Es gibt neu entwickelte SPIO-Partikel, die von definierter Größe sind und eine enge Partikelgrößenverteilung haben. Solche Partikel werden bereits kommerziell vertrieben und besitzen in Abhängigkeit von der Größe optimale Werte für die r_1 - oder die r_2 -Relaxivität. Des Weiteren erscheint es sinnvoll, in diesem Zusammenhang die Rolle von SPIO-Partikeln definierter Größe zu untersuchen. Es sollte deshalb in weiteren Studien geklärt werden, inwieweit SPIO-Partikel, deren Größenverteilung optimiert wurde, zu einer Verbesserung in der MRT-Diagnostik der Leber führen können und inwieweit diese Partikel auch die Anforderungen, die im Hinblick auf die Gefäßdarstellung an ein geeignetes Kontrastmittel gestellt werden, erfüllen können.

Es ist notwendig, die therapeutischen Eigenschaften von Stammzellen genau zu untersuchen, denn die stammzellbasierte Strategie ist bei einigen Erkrankungen die einzige Therapiemöglichkeit und die Markierung der Zellen mit SPIO dient hierbei zur Dokumentation der Lokalisation und Migration der transplantierten Stammzellen. Des Weiteren wäre es sinnvoll, die transplantierten Zellen nicht nur mittels MRT, sondern auch mittels

Biolumineszenz-Bildgebung zu überwachen. Ein doppelter Nachweis von transplantierten und lebenden Zellen könnte zur Aufklärung vieler Fragen bezüglich der Zelltracking- und Homing-Mechanismen beitragen. Dabei wird die Visualisierung der Zellwanderung und des Zellüberlebens in lebenden Organismen durch SPIO-Partikel und z. B. die transgene Expression lumineszierender Enzyme ermöglicht.

Es sind weitere Studien notwendig, um die SPIO-Aufnahme unter Einbeziehung weiterer Zelltypen und die Differenzierungskapazität von anderen differenzierten Zelltypen von hMSC (z. B. Chondrocyten und Kardiomyocyten) zu untersuchen sowie die adipogene, osteogene und chondrogene Genexpression zu analysieren.

Anhang

Literaturverzeichnis

1. Adamek, H. E. & Lauenstein, T. C. (2009): MRT in der Gastroenterologie. Georg Thieme Verlag.
2. Addicott, B. *et al.* Mesenchymal stem cell labeling and in vitro MR characterization at 1.5 T of new SPIO contrast agent: Molday ION Rhodamine-B™, *Contrast Media Mol. Imaging* **6**, 7–18 (2011).
3. Adonai, N. *et al.* Ex vivo cell labeling with ⁶⁴Cu-pyruvaldehyde-bis(N4-methylthiosemicarbazone) for imaging cell trafficking in mice with positron-emission tomography, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 3030–3035 (2002).
4. Ahrens, E. T. Feili-Hariri, M. Xu, H. Genove, G. & Morel, P. A. Receptor-mediated endocytosis of iron-oxide particles provides efficient labeling of dendritic cells for in vivo MR imaging, *Magn. Reson. Med.* **49**, 1006–1013 (2003).
5. Allkemper, T. Bremer, C. Matuszewski, L. Ebert, W. & Reimer, P. Contrast-enhanced blood-pool MR angiography with optimized iron oxides: effect of size and dose on vascular contrast enhancement in rabbits, *Radiology* **223**, 432–438 (2002).
6. Amiri, H. *et al.* Protein corona affects the relaxivity and MRI contrast efficiency of magnetic nanoparticles, *Nanoscale* **5**, 8656–8665 (2013).
7. Amsalem, Y. *et al.* Iron-oxide labeling and outcome of transplanted mesenchymal stem cells in the infarcted myocardium, *Circulation* **116**, 138–45 (2007).
8. Anderson, R. G. The caveolae membrane system, *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 199–225 (1998).
9. Andreas, K. *et al.* Highly efficient magnetic stem cell labeling with citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MRI tracking, *Biomaterials* **33**, 4515–4525 (2012).
10. Anversa, P. Leri, A. & Kajstura, J. Cardiac regeneration, *J. Am. Coll. Cardiol.* **47**, 1769–1776 (2006).
11. Arbab, A. S. *et al.* Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI, *Blood* **104**, 1217–1223 (2004a).
12. Arbab, A. S. Bashaw, L. A. Miller, B. R. Jordan, E. K. Bulte, J. W. & Frank, J. A. Intracytoplasmic tagging of cells with ferumoxides and transfection agent for cellular magnetic resonance imaging after cell transplantation: methods and techniques, *Transplantation* **76**, 1123–1130 (2003a).
13. Arbab, A. S. *et al.* Characterization of Biophysical and Metabolic Properties of Cells Labeled with Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles and Transfection Agent for Cellular MR Imaging, *Radiology* **229**, 838–846 (2003b).
14. Arbab, A. S. Wilson, L. B. Ashari, P. Jordan, E. K. Lewis, B. K. & Frank, J. A. A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging, *NMR Biomed.* **18**, 383–389 (2005a).
15. Arbab, A. S. *et al.* Labeling of cells with ferumoxides-protamine sulfate complexes does not inhibit function or differentiation capacity of hematopoietic or mesenchymal stem cells, *NMR Biomed.* **18**, 553–559 (2005b).

16. Arbab A. S. *et al.* Comparison of transfection agents in forming complexes with ferumoxides, cell labeling efficiency, and cellular viability. *Molecular Imaging* **3**, 24–32 (2004b).
17. Artemov, D. Mori, N. Okollie, B. & Bhujwala, Z. M. MR molecular imaging of the Her-2/neu receptor in breast cancer cells using targeted iron oxide nanoparticles, *Magn. Reson. Med.* **49**, 403–408 (2003).
18. Aschoff, L. (1924) Reticulo-endothelial system (Janeway Lecture, New York), Lectures on Pathology (delivered in the United States, 1924). New York: Paul B. Hoeber, Inc. pp. 1-33.
19. Balakumaran, A. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles labeling of bone marrow stromal (mesenchymal) cells does not affect their "stemness", *PLoS ONE* **5**, e11462 (2010).
20. Balsam, L. B. Wagers, A. J. Christensen, J. L. Kofidis, T. Weissman, I. L. & Robbins, R. C. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium, *Nature* **428**, 668–673 (2004).
21. Benderbous, S. Corot, C. Jacobs, P. & Bonnemain, B. Superparamagnetic agents: physicochemical characteristics and preclinical imaging evaluation, *Acad. Radiol.* **3 Suppl 2**, S292-4 (1996).
22. Bengel, F. M. Schachinger, V. & Dimmeler, S. Cell-based therapies and imaging in cardiology, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **32 Suppl 2**, S404-16 (2005).
23. Bhunghet, E. & Wake, K. Role of mesenchymal cell populations in porcine serum-induced rat liver fibrosis, *Hepatology* **16**, 1452–1473 (1992).
24. Bonnemain, B. Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: physicochemical characteristics and clinical applications. A review, *J. Drug Target.* **6**, 167–174 (1998).
25. Bos, C. *et al.* In vivo MR imaging of intravascularly injected magnetically labeled mesenchymal stem cells in rat kidney and liver, *Radiology* **233**, 781–789 (2004).
26. Boutry, S. Brunin, S. Mahieu, I. Laurent, S. Elst, L.V. & Muller, R.N. Magnetic labeling of non-phagocytic adherent cells with iron oxide nanoparticles: a comprehensive study, *Contrast Media & Molecular Imaging* **3**, 223-232 (2008).
27. Briel, A. *et al.* *Magnetische Eisenoxidpartikel enthaltende Zusammensetzung und deren Verwendung in bildgebenden Verfahren* (Google Patents, 2007), <http://www.google.com/patents/EP1738773A1?cl=de>.
28. Brittberg, M. Lindahl, A. Nilsson, A. Ohlsson, C. Isaksson, O. & Peterson, L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation, *N. Engl. J. Med.* **331**, 889–895 (1994).
29. Brodsky, F. M. Chen, C. Y. Knuehl, C. Towler, M. C. & Wakeham, D. E. Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 517–568 (2001).
30. Bücheler, E. Lackner, KJ. & Wittenberg, J. Einführung in die Radiologie. Diagnostik und Interventionen. 11 v. überarb. und erw. Auflage, Georg Thieme Verlag KG (2006)
31. Bulte, J. W. *et al.* Passage of DMP across a disrupted BBB in the context of antibody-mediated MR imaging of brain metastases, *Acta Neurochir. Suppl. (Wien)* **51**, 43–45 (1990).
32. Bulte, J. W. *et al.* Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells, *Nat. Biotechnol.* **19**, 1141–1147 (2001).

33. Bulte, J. W. Laughlin, P. G. Jordan, E. K. Tran, V. A. Vymazal, J. & Frank J. A. Tagging of T cells with superparamagnetic iron oxide: uptake kinetics and relaxometry, *Acad. Radiol.* **3 Suppl 2**, S301-3 (1996).
34. Bulte, J. W. *et al.* Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors: magnetic resonance tracking of cell migration and myelination, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 15256–15261 (1999).
35. Bulte, J. W. Arbab, A. S. Douglas, T. & Frank, J. A. Preparation of magnetically labeled cells for cell tracking by magnetic resonance imaging, *Meth. Enzymol.* **386**, 275–299 (2004).
36. Bulte, J. W. *et al.* Monitoring stem cell therapy in vivo using magnetodendrimers as a new class of cellular MR contrast agents, *Acad. Radiol.* **9 Suppl 2**, S332-5 (2002a).
37. Bulte, J. W. Duncan, I. D. & Frank, J. A. In vivo magnetic resonance tracking of magnetically labeled cells after transplantation, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **22**, 899–907 (2002b).
38. Bulte, J. W. & Kraitchman, D. L. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging, *NMR Biomed.* **17**, 484–499 (2004a).
39. Bulte, J. W. & Kraitchman, D. L. Monitoring cell therapy using iron oxide MR contrast agents, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **5**, 567–584 (2004b).
40. Bulte, J. W. Kraitchman, D. L. Mackay, A. M. & Pittenger, M. F. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells is inhibited after magnetic labeling with ferumoxides, *Blood* **104**, 3410-2; author reply 3412-3 (2004).
41. Bussolati, B. Tetta, C. & Camussi, G. Contribution of stem cells to kidney repair, *Am J Nephrol.* **28**, 813–822 (2008).
42. Canzi, L. *et al.* Human skeletal muscle stem cell antiinflammatory activity ameliorates clinical outcome in amyotrophic lateral sclerosis models, *Mol. Med.* **18**, 401–411 (2012).
43. Cao, A. H. Shi, H. J. Zhang, Y. & Teng, G. J. In vivo tracking of dual-labeled mesenchymal stem cells homing into the injured common carotid artery, *Anat. Rec. (Hoboken)* **292**, 1677–1683 (2009).
44. Caravan, P. Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents, *Chem. Soc. Rev.* **35**, 512–523 (2006).
45. Centeno, C. J. Busse, D. Kisiday, J. Keohan, C. Freeman, M. & Karli, D. Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells, *Pain Physician* **11**, 343–353 (2008).
46. Centeno, C. J. Schultz, J. R. Cheever, M. Robinson, B. Freeman, M & Marasco, W. Safety and complications reporting on the re-implantation of culture-expanded mesenchymal stem cells using autologous platelet lysate technique, *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **5**, 81–93 (2010).
47. Cerdan, S. Lötscher, H. R. Künnecke, B. & Seelig, J. Monoclonal antibody-coated magnetite particles as contrast agents in magnetic resonance imaging of tumors, *Magn. Reson. Med.* **12**, 151–163 (1989).
48. Chang, J.-S. Chang, K. L., Hwang, D.-F. & Kong, Z.-L. In vitro cytotoxicity of silica nanoparticles at high concentrations strongly depends on the metabolic activity type of the cell line, *Environ. Sci. Technol.* **41**, 2064–2068 (2007).
49. Chang, Y.-K. Liu, Y.-P. Ho, J. H. Hsu, S.-C. & Lee, O. K. Amine-surface-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles interfere with differentiation of human mesenchymal stem cells, *J. Orthop. Res.* **30**, 1499–1506 (2012).

50. Chao, Y. *et al.* Direct recognition of superparamagnetic nanocrystals by macrophage scavenger receptor SR-AI, *ACS Nano* **7**, 4289-4298 (2013).
51. Chao, Y. *et al.* Recognition of dextran-superparamagnetic iron oxide nanoparticle conjugates (feridex) via macrophage scavenger receptor charged domains, *Bioconjugate Chem.* **23**, 1003-1009.
52. Chen, G. *et al.* MRI-visible polymeric vector bearing CD3 single chain antibody for gene delivery to T cells for immunosuppression, *Biomaterials* **30**, 1962–1970 (2009).
53. Chen, H.-Z. *et al.* [MR imaging of polyethylenimine-superparamagnetic iron oxide nanoparticle labeled bone marrow mesenchymal stem cells in vitro], *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **43**, 578–583 (2012).
54. Chen, I. Y. *et al.* Comparison of optical bioluminescence reporter gene and superparamagnetic iron oxide MR contrast agent as cell markers for noninvasive imaging of cardiac cell transplantation, *Mol. Imaging Biol.* **11**, 178–187 (2009).
55. Chen Y.C. *et al.* The inhibitory effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticle (Ferucarbotran) on osteogenic differentiation and its signaling mechanism in human mesenchymal stem cells, *Toxicology And Applied Pharmacology* (2010 Jun 1).
56. Chithrani, B. D. Ghazani, A. A. & Chan, W. C. W. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells, *Nano Lett.* **6**, 662–668 (2006).
57. Corot, C. Robert, P. Idée, J.-M. & Port, M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 1471–1504 (2006).
58. Cova, L. *et al.* Biocompatible fluorescent nanoparticles for in vivo stem cell tracking, *Nanotechnology* **24**, 245603 (2013).
59. Crichton, R. R. & Ward, R. J. An overview of iron metabolism: molecular and cellular criteria for the selection of iron chelators, *Curr. Med. Chem.* **10**, 997–1004 (2003).
60. Crichton, R. R. Wilmet, S. Legssyer, R. & Ward, R. J. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells, *Journal Of Inorganic Biochemistry* (2002 Jul 25).
61. Daigneault, M. Preston, J. A. Marriott, H. M. Whyte, Moira K B & Dockrell, D. H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages, *PLoS ONE* **5**, e8668 (2010).
62. Di Nicola, M. *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli, *Blood* **99**, 3838–3843 (2002).
63. Digirolamo, C. M. Stokes, D. Colter, D. Phinney, D. G. Class, R. Prockop, D. J. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate, *British journal of haematology* **107**, 275–281 (1999).
64. Doherty, G. J. & McMahon, H. T. Mechanisms of endocytosis, *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 857–902 (2009).
65. Ehrlich, M. *et al.* Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits, *Cell* **118**, 591–605 (2004).
66. Emerit, J. Beaumont, C. & Trivin, F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury, *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* (2001 Jul).

67. Farrell, E. *et al.* Effects of iron oxide incorporation for long term cell tracking on MSC differentiation in vitro and in vivo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 1076–1081 (2008).
68. Frank, J. A. *et al.* Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents, *Radiology* **228**, 480–487 (2003).
69. Freed, C. R. *et al.* Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease, *N Engl J Med* **344**, 710–719 (2001).
70. Genre, D. *et al.* Modulations of dose intensity of doxorubicin and cyclophosphamide in association with G-CSF and peripheral blood stem cells in adjuvant chemotherapy for breast cancer: comparative evaluation of completion and safety of three intensive regimens, *Bone Marrow Transplant.* **29**, 881–886 (2002).
71. Goodman, C. M. McCusker, C. D. Yilmaz, T. & Rotello, V. M. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains, *Bioconjug. Chem.* **15**, 897–900 (2004).
72. Guo, J. Lin, G. S. Bao, C. Y. Hu, Z. M. & Hu, M. Y. Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction, *Inflammation* **30**, 97–104 (2007).
73. Gutteridge, J. M. Rowley D. A. & Halliwell, B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals and lipid peroxidation in the presence of iron salts. Detection of 'catalytic' iron and anti-oxidant activity in extracellular fluids, *Biochem.* **206**, 605–609 (1982).
74. Hamm, B. *et al.* Contrast-enhanced MR imaging of liver and spleen: first experience in humans with a new superparamagnetic iron oxide, *J. Magn. Reson. Imaging* **4**, 659–668 (1994).
75. He, G. *et al.* In vivo imaging of bone marrow mesenchymal stem cells transplanted into myocardium using magnetic resonance imaging: a novel method to trace the transplanted cells, *International Journal of Cardiology* **114**, 4–10 (2007 Jan 2).
76. Heiland, S. Erb, G. Ziegler, S. & Krix, M. Where contrast agent concentration really matters - a comparison of CT and MRI, *Invest. Radiol.* **45**, 529–537 (2010).
77. Heino, T. J. & Hentunen, T. A. Differentiation of osteoblasts and osteocytes from mesenchymal stem cells, *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **3**, 131–145 (2008).
78. Henning, T. D. *et al.* The influence of ferucarbotran on the chondrogenesis of human mesenchymal stem cells, *Contrast Media Mol. Imaging* **4**, 165–173 (2009a).
79. Henning, T. D. *et al.* Relaxation effects of ferucarbotran-labeled mesenchymal stem cells at 1.5T and 3T: Discrimination of viable from lysed cells, *Magn. Reson. Med.* **62**, 325–332 (2009b).
80. Heymer, A. *et al.* Iron oxide labelling of human mesenchymal stem cells in collagen hydrogels for articular cartilage repair, *Biomaterials* **29**, 1473–1483 (2008).
81. Hill, J. M. *et al.* Serial cardiac magnetic resonance imaging of injected mesenchymal stem cells, *Circulation* **108**, 1009–1014 (2003).
82. Ho, C. & Hitchens, T. K. A non-invasive approach to detecting organ rejection by MRI: monitoring the accumulation of immune cells at the transplanted organ, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **5**, 551–566 (2004).
83. Hoehn, M. *et al.* Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 16267–16272 (2002).

84. Hori, J. Deie, M. Kobayashi, T. Yasunaga, Y. Kawamata, S. & Ochi, M. Articular cartilage repair using an intra-articular magnet and synovium-derived cells, *J. Orthop. Res.* **29**, 531–538 (2011).
85. Hsiao, J.-K. *et al.* Magnetic nanoparticle labeling of mesenchymal stem cells without transfection agent: cellular behavior and capability of detection with clinical 1.5 T magnetic resonance at the single cell level, *Magn. Reson. Med.* **58**, 717–724 (2007).
86. Hsiao, J.-K. *et al.* Mesoporous silica nanoparticles as a delivery system of gadolinium for effective human stem cell tracking, *Small* **4**, 1445–1452 (2008).
87. Hu, S.-L. *et al.* In vivo magnetic resonance imaging tracking of SPIO-labeled human umbilical cord mesenchymal stem cells, *J. Cell. Biochem.* **113**, 1005–1012 (2012).
88. Hu, S.-L. *et al.* In vitro labeling of human umbilical cord mesenchymal stem cells with superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *J. Cell. Biochem.* **108**, 529–535 (2009).
89. Huang, D.-M. *et al.* The promotion of human mesenchymal stem cell proliferation by superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *Biomaterials* **30**, 3645–3651 (2009).
90. Hunter, R. J. *Foundations of colloid science* (Clarendon Press, 2nd ed. Oxford, 2001).
91. Hyink, D. P. & Abrahamson, D. R. Origin of the glomerular vasculature in the developing kidney, *Semin. Nephrol.* **15**, 300–314 (1995).
92. Imasawa, T. Roles of bone marrow cells in glomerular diseases, *Clin. Exp. Nephrol.* **7**, 179–185 (2003).
93. Ito, A. *et al.* A new methodology of mesenchymal stem cell expansion using magnetic nanoparticles, *Biochemical Engineering Journal* **20**, 119–125 (2004).
94. Ito, T. Suzuki, A. Imai, E. Okabe, M. & Hori, M. Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling, *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 2625–2635 (2001).
95. Ittrich, H. Peldschus, K. Raabe, N. Kaul, M. & Adam, G. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles in biomedicine: applications and developments in diagnostics and therapy, *RöFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Röntgenstrahlen und der Nuklearmedizin* **185**, 1149–1166 (2013).
96. Ittrich, H. *et al.* In vivo magnetic resonance imaging of iron oxide-labeled, arterially-injected mesenchymal stem cells in kidneys of rats with acute ischemic kidney injury: detection and monitoring at 3T, *J. Magn. Reson. Imaging* **25**, 1179–1191 (2007).
97. Jackson, S. A. & Thomas, R. M. CT, MRT, Ultraschall auf einen Blick. 1 Aufl., Elsevier, München (2009).
98. Janic, B. *et al.* Optimization and validation of FePro cell labeling method, *PLoS ONE* **4**, e5873 (2009).
99. Janssen, J. J. M. Baltussen, J. J. M. van Gelder, A. P. & Perenboom, J. A. A. J. Kinetics of magnetic flocculation. II. Flocculation of coarse particles, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **23**, 1455–1460 (1990).
100. Janssens, S. *et al.* Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial, *Lancet* **367**, 113–121 (2006).
101. Jasmin *et al.* Optimized labeling of bone marrow mesenchymal cells with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and in vivo visualization by magnetic resonance imaging, *J. Nanobiotechnology* **9**, 4 (2011).
102. Jing, Y. *et al.* Quantitative intracellular magnetic nanoparticle uptake measured by live cell magnetophoresis, *FASEB J.* **22**, 4239–4247 (2008).

103. Jing, X. H. *et al.* In vivo MR imaging tracking of magnetic iron oxide nanoparticle labeled, engineered, autologous bone marrow mesenchymal stem cells following intra-articular injection. *Joint Bone Spine: Revue Du Rhumatisme* **75**, 432–438 (2008 Jul).
104. Josephson, L. Lewis, J. Jacobs, P. Hahn, P. F. & Stark, D. D. The effects of iron oxides on proton relaxivity, *Magn. Reson. Imaging* **6**, 647–653 (1988).
105. Josephson, L. Tung, C. H. Moore, A. & Weissleder, R. High-efficiency intracellular magnetic labeling with novel superparamagnetic-Tat peptide conjugates, *Bioconjug. Chem.* **10**, 186–191 (1999).
106. Kalish, H. *et al.* Combination of transfection and magnetic resonance contrast agents for cellular imaging: Relationship between relaxivities, electrostatic forces, and chemical composition, *Magnetic Resonance In Medicine: Official Journal Of The Society Of Magnetic Resonance In Medicine / Society Of Magnetic Resonance In Medicine* **50** (2003 Aug).
107. Kaminski, A. & Steinhoff, G. Current status of intramyocardial bone marrow stem cell transplantation, *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **20**, 119–125 (2008).
108. Kang, H. W. Josephson, L. Petrovsky, A. Weissleder, R. & Bogdanov, A. Magnetic resonance imaging of inducible E-selectin expression in human endothelial cell culture, *Bioconjug. Chem.* **13**, 122–127 (2002).
109. Kim, J. A. Åberg, C. Salvati, A. & Dawson, K. A. Role of cell cycle on the cellular uptake and dilution of nanoparticles in a cell population, *Nat. Nanotechnol.* **7**, 62–68 (2012).
110. Kircher, M. F. *et al.* In vivo high resolution three-dimensional imaging of antigen-specific cytotoxic T-lymphocyte trafficking to tumors, *Cancer Res.* **63**, 6838–6846 (2003).
111. Kittel, C., Einführung in die Festkörperphysik, R. Oldenbourg Verlag, München, 12 Aufl. (1999)
112. Ko, I. K. Song, H. T. Cho, E. J. Lee, E. S. Huh, Y. M. & Suh, J. S. In vivo MR Imaging of Tissue-engineered Human Mesenchymal Stem Cells Transplanted to Mouse: a Preliminary Study, *Ann. Biomed. Eng.* **35**, 101–108 (2007).
113. Kohro, T. *et al.* A Comparison of Differences in the Gene Expression Profiles of Phorbol 12-Myristate 13-Acetate Differentiated THP-1 Cells and Human Monocyte-Derived Macrophage, *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, **11**, 88–97 (2004).
114. Kostura, L. Kraitchman, D. L. Mackay, A. M. Pittenger, M. F. & Bulte, J. W. Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis, *NMR Biomed.* **17**, 513–517 (2004).
115. Kraitchman, D. L. *et al.* Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction, *Circulation* **112**, 1451–1461 (2005).
116. Krampera, M. *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide, *Blood* **101**, 3722–3729 (2003).
117. Kumari, A. & Yadav, S. K. Cellular interactions of therapeutically delivered nanoparticles, *Expert Opin. Drug Deliv.* **8**, 141–151 (2011).
118. Lagaly, G. Schulz, O. & Zimehl, R. Dispersionen und Emulsionen. Eine Einführung in die Kolloidik feinverteilter Stoffe einschließlich der Tonminerale (Steinkopff, Darmstadt, 1997).

119. Lalande, C. *et al.* Magnetic resonance imaging tracking of human adipose derived stromal cells within three-dimensional scaffolds for bone tissue engineering, *Eur. Cell Mater.* **21**, 341–354 (2011).
120. Lauffer, R. B. Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging: theory and design, *Chem. Rev.* **87**, 901–927 (1987).
121. Lawaczeck, R. *et al.* Magnetic iron oxide particles coated with carboxydextran for parenteral administration and liver contrasting. Pre-clinical profile of SH U555A, *Acta Radiol.* **38**, 584–597 (1997).
122. Lee, J. W. Fang, X. Krasnodembskaya, A. Howard, J. P. & Matthay, M. A. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells for Acute Lung Injury: Role of Paracrine Soluble Factors, *Stem Cells* **29**, 913–919 (2011).
123. Lee, J.-h. *et al.* Heparin-coated superparamagnetic iron oxide for in vivo MR imaging of human MSCs, *Biomaterials* **33**, 4861–4871 (2012).
124. Lewin, M. *et al.* Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells, *Nat. Biotechnol.* **18**, 410–414 (2000).
125. Lewinski, N. Colvin, V. & Drezek, R. Cytotoxicity of nanoparticles, *Small* **4**, 26–49 (2008).
126. Li, X. *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **42**, 295–303 (2007).
127. Li, Z. *et al.* Comparison of reporter gene and iron particle labeling for tracking fate of human embryonic stem cells and differentiated endothelial cells in living subjects, *Stem Cells* **26**, 864–873 (2008).
128. Link, G. Pinson, A. & Hershko, C. Iron loading of cultured cardiac myocytes modifies sarcolemmal structure and increases lysosomal fragility, *J. Lab. Clin. Med.* **121**, 127–134 (1993).
129. Lissner, J. & Baierl, P. (Hrsg.) (1990): *Klinische Kernspintomographie*. 2. Aufl. Enke, Stuttgart.
130. Liu, G. *et al.* Cell labeling efficiency of layer-by-layer self-assembly modified silica nanoparticles, *J. Mater. Res.* **24**, 1317–1321 (2009).
131. Lu, C.-W. *et al.* Bifunctional magnetic silica nanoparticles for highly efficient human stem cell labeling, *Nano Lett.* **7**, 149–154 (2007).
132. Lunov, O. *et al.* Differential uptake of functionalized polystyrene nanoparticles by human macrophages and a monocytic cell line, *ACS Nano* **5**, 1657–1669 (2011).
133. Mailänder, V. *et al.* Carboxylated superparamagnetic iron oxide particles label cells intracellularly without transfection agents, *Mol. Imaging Biol.* **10**, 138–146 (2008).
134. Malhi, H. Irani, A. N. Gagandeep, S. & Gupta, S. Isolation of human progenitor liver epithelial cells with extensive replication capacity and differentiation into mature hepatocytes, *J. Cell. Sci.* **115**, 2679–2688 (2002).
135. McLachlan, S. J. *et al.* Phase I clinical evaluation of a new iron oxide MR contrast agent, *J. Magn. Reson. Imaging* **4**, 301–307 (1994).
136. Meisel, R. Zibert, A. Laryea, M. Göbel, U. Däubener, W. & Dilloo, D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation, *Blood* **103**, 4619–4621 (2004).

137. Metz, S. Bonaterra, G. Rudelius, M. Settles, M. Rummeny, E. J. & Daldrup-Link, H. E. Capacity of human monocytes to phagocytose approved iron oxide MR contrast agents in vitro, *Eur. Radiol.* **14**, 1851–1858 (2004).
138. Meyer, G. P. *et al.* Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial, *Circulation* **113**, 1287–1294 (2006).
139. Min, Y. Akbulut, M. Kristiansen, K. Golan, Y. & Israelachvili, J. The role of interparticle and external forces in nanoparticle assembly, *Nat. Mater.* **7**, 527–538 (2008).
140. Modo, M. Hoehn, M. & Bulte, J. W. Cellular MR imaging, *Mol. Imaging* **4**, 143–164 (2005).
141. Montet-Abou, K. Montet, X. Weissleder, R. & Josephson, L. Transfection agent induced nanoparticle cell loading, *Mol. Imaging* **4**, 165–171 (2005).
142. Moore, A. Josephson, L. Bhorade, R. M. Basilion, J. P. & Weissleder, R. Human transferrin receptor gene as a marker gene for MR imaging, *Radiology* **221**, 244–250 (2001).
143. Mosqueira, V. C. Legrand, P. Gref, R. Heurtault, B. Appel, M. & Barratt, G. Interactions between a macrophage cell line (J774A1) and surface-modified poly (D,L-lactide) nanocapsules bearing poly(ethylene glycol), *J. Drug Target.* **7**, 65–78 (1999).
144. Nabi, I. R. & Le, P. U. Caveolae/raft-dependent endocytosis, *The Journal of Cell Biology* **161**, 673–677 (2003).
145. Nejadnik, H. *et al.* Somatic differentiation and MR imaging of magnetically labeled human embryonic stem cells, *Cell Transplant.* **21**, 2555–2567 (2012).
146. Neri, M. *et al.* Efficient in vitro labeling of human neural precursor cells with superparamagnetic iron oxide particles: relevance for in vivo cell tracking, *Stem Cells* **26**, 505–516 (2008).
147. Niemeyer, M. *et al.* Non-invasive tracking of human haemopoietic CD34+ stem cells in vivo in immunodeficient mice by using magnetic resonance imaging, *Eur. Radiol.* **20**, 2184–2193 (2010).
148. Nishida, K. *et al.* Magnetic targeting of bone marrow stromal cells into spinal cord: through cerebrospinal fluid, *Neuroreport* **17**, 1269–1272 (2006).
149. Novelline, R. A. Squire's Radiologie: Grundlagen der klinischen Diagnostik für Studium und Praxis. Dt. Bearb. 2. Auflage, Schattauer Stuttgart (2001).
150. Oberdörster, G. *et al.* Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy, *Part. Fibre Toxicol.* **2**, 8 (2005).
151. Ogris, M. Steinlein, P. Kurs, M. Mechtler, K. Kircheis, R. & Wagner, E. The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells, *Gene Ther.* **5**, 1425–1433 (1998).
152. Ortega-Vinuesa, J. L. Martin-Rodriguez, A. & Hidalgo-Alvarez, R. Colloidal Stability of Polymer Colloids with Different Interfacial Properties: Mechanisms, *Journal of colloid and interface science* **184**, 259–267 (1996).
153. Oshima, Y. Watanabe, N. Matsuda, K. Takai, S. Kawata, M. & Kubo, T. Behavior of transplanted bone marrow-derived GFP mesenchymal cells in osteochondral defect as a simulation of autologous transplantation, *J. Histochem. Cytochem.* **53**, 207–216 (2005).

154. Pawelczyk, E. Arbab, A. S. Pandit, S. Hu, E. & Frank, J. A. Expression of transferrin receptor and ferritin following ferumoxides-protamine sulfate labeling of cells: implications for cellular magnetic resonance imaging, *NMR Biomed.* **19**, 581–592 (2006).
155. Pawelczyk, E. *et al.* In vivo transfer of intracellular labels from locally implanted bone marrow stromal cells to resident tissue macrophages, *PLoS ONE* **4**, e6712 (2009).
156. Peng, C. *et al.* Effect of transplantation with autologous bone marrow stem cells on acute myocardial infarction, *Int. J. Cardiol.* **162**, 158–165 (2013).
157. Pintaske, J. *et al.* Relaxivity of Gadopentetate Dimeglumine (Magnevist), Gadobutrol (Gadovist), and Gadobenate Dimeglumine (MultiHance) in human blood plasma at 0.2, 1.5, and 3 Tesla, *Invest. Radiol.* **41**, 213–221 (2006).
158. Pittenger, M. F. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells, *Science* **284**, 143–147 (1999).
159. Pooley, R. A. AAPM/RSNA physics tutorial for residents: fundamental physics of MR imaging, *Radiographics* **25**, 1087-1099 (2005).
160. Qian, Z. M. Li, H. Sun, H. & Ho, K. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway, *Pharmacol. Rev.* **54**, 561–587 (2002).
161. Quintavalla, J. *et al.* Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects, *Biomaterials* **23**, 109–119 (2002).
162. Ralph, P. Prichard, J. & Cohn, M. Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody-dependent cell-mediated immunity, *J. Immunol.* **114**, 898–905 (1975).
163. Raynal, I. Prigent, P. Peyramaure, S. Najid, A. Rebutzi, C. & Corot, C. Macrophage endocytosis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: mechanisms and comparison of ferumoxides and ferumoxtran-10, *Invest. Radiol.* **39**, 56–63 (2004).
164. Reddy, A. M. *et al.* Functional characterization of mesenchymal stem cells labeled with a novel PVP-coated superparamagnetic iron oxide, *Contrast Media Mol. Imaging* **4**, 118–126 (2009).
165. Reimer, P. & Tombach, B. Hepatic MRI with SPIO: detection and characterization of focal liver lesions, *Eur. Radiol.* **8**, 1198–1204 (1998).
166. Reiser, M. & Semmler, W. *Magnetresonanztomographie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2002).
167. Remsen, L. G. *et al.* MR of carcinoma-specific monoclonal antibody conjugated to monocrySTALLINE iron oxide nanoparticles: the potential for noninvasive diagnosis, *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **17**, 411–418 (1996).
168. Richardson, D. R. & Ponka, P. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells, *Biochim. Biophys. Acta* **1331**, 1–40 (1997).
169. Riedel, E. & Janiak C. *Anorganische Chemie*. 8 Aufl., Berlin (2011).
170. Riemer, J. Hoepken, H. H. Czerwinska, H. Robinson, S. R. & Dringen, R. Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells, *Anal. Biochem.* **331**, 370–375 (2004).
171. Rohrer, M. Bauer, H. Mintorovitch, J. Requardt, M. & Weinmann, H.-J. Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths, *Invest. Radiol.* **40**, 715–724 (2005).

172. Roohi, F. Lohrke, J. Ide, A. Schütz, G. & Dassler, K. Studying the effect of particle size and coating type on the blood kinetics of superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *Int. J. Nanomedicine* **7**, 4447–4458 (2012).
173. Salasznyk, R. M. Williams, W. A. Boskey, A. Batorsky, A. & Plopper, G. E. Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells, *J. Biomed. Biotechnol.* **2004**, 24–34 (2004).
174. Saldanha, K. J. Doan, R. P. Ainslie, K. M. Desai, T. A. & Majumdar, S. Micrometer-sized iron oxide particle labeling of mesenchymal stem cells for magnetic resonance imaging-based monitoring of cartilage tissue engineering, *Magn. Reson. Imaging* **29**, 40–49 (2011).
175. Satija, N. K. *et al.* Mesenchymal stem cell-based therapy: a new paradigm in regenerative medicine, *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **13**, 4385–4402 (2009).
176. Scavo, L. M. Karas, M. Murray, M. & Leroith, D. Insulin-like growth factor-I stimulates both cell growth and lipogenesis during differentiation of human mesenchymal stem cells into adipocytes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 3543–3553 (2004).
177. Schäfer, R. *et al.* The use of clinically approved small particles of iron oxide (SPIO) for labeling of mesenchymal stem cells Aggravates Clinical Symptoms in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Influences Their In Vivo Distribution, *Cell Transplant.* **17**, 923–941 (2008).
178. Schäfer, R. *et al.* Functional investigations on human mesenchymal stem cells exposed to magnetic fields and labeled with clinically approved iron nanoparticles, *BMC Cell Biol.* **11**, 22 (2010).
179. Schäfer, R. *et al.* Labeling of human mesenchymal stromal cells with superparamagnetic iron oxide leads to a decrease in migration capacity and colony formation ability, *Cytotherapy* **11**, 68–78 (2009).
180. Schering AG; Resovist® [Datenblatt], 2002.
181. Schulze, E. Ferucci J. T. Poss, K. Lapointe, L. Bogdanova, A. & Weissleder, R. Cellular uptake and trafficking of a prototypical magnetic iron oxide label in vitro, *Invest Radiol* **30**, 604–610 (1995).
182. Schwende, H. Fitzke, E. Ambs, P. and Dieter, P. Differences in the State of Differentiation of THP-1 Cells Induced by Phorbol Ester and 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, *Journal of Leukocyte Biology* **59**, 555–561 (1996).
183. Serda, R. E. *et al.* Logic-embedded vectors for intracellular partitioning, endosomal escape, and exocytosis of nanoparticles, *Small* **6**, 2691–2700 (2010).
184. Sgodda, M. *et al.* Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo, *Experimental Cell Research* **313**, 2875–2886 (2007).
185. Shi, X.-L. Gu, J. Y. Han, B. Xu, H. Y. Fang, L. & Ding, Y. T. Magnetically labeled mesenchymal stem cells after autologous transplantation into acutely injured liver, *World J. Gastroenterol.* **16**, 3674–3679 (2010).
186. Shi, X.-L. *et al.* Optimization of an effective directed differentiation medium for differentiating mouse bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytes in vitro, *Cell Biology International.* **32**, 959–965 (2008).
187. Sigmund, W., Pyrgiotakis, G. & Daga, A. “II Powder Processing at the Nanoscale „Theory and Application of colloidal Processing“, ” in *Chemical Processing of Ceramics*, Lee B. I. and Komarneni, S. Eds., ed: CRC Press (2005)

188. Simon, G. H. *et al.* T1 and T2 relaxivity of intracellular and extracellular USPIO at 1.5T and 3T clinical MR scanning, *Eur. Radiol.* **16**, 738–745 (2006).
189. So, P.-W. *et al.* Efficient and rapid labeling of transplanted cell populations with superparamagnetic iron oxide nanoparticles using cell surface chemical biotinylation for in vivo monitoring by MRI, *Cell Transplant.* **19**, 419–429 (2010).
190. Soenen, S. J. De Smedt, S. C. & Braeckmans, K. Limitations and caveats of magnetic cell labeling using transfection agent complexed iron oxide nanoparticles, *Contrast Media Mol. Imaging* **7** (2), 140–52 (2012)
191. Song, M. Moon, W. K. Kim, Y. Lim, D. Song, I.-C. & Yoon, B.-W. Labeling efficacy of superparamagnetic iron oxide nanoparticles to human neural stem cells: comparison of ferumoxides, monocrySTALLine iron oxide, cross-linked iron oxide (CLIO)-NH₂ and tat-CLIO, *Korean J. Radiol.* **8**, 365–371 (2007).
192. Soria, B. Roche, E. Berna, G. Leon-Quinto, T. Reig, J. A. & Martin, F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice, *Diabetes* **49**, 157–162 (2000).
193. Stamm, C. *et al.* Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration, *Lancet* **361**, 45–46 (2003).
194. Sun, J.-H. *et al.* Assessment of biological characteristics of mesenchymal stem cells labeled with superparamagnetic iron oxide particles in vitro, *Mol. Med. Rep.* **5**, 317–320 (2012).
195. Suzuki, M. Honda, H. Kobayashi, T. Wakabayashi, T. Yoshida, J. & Takahashi, M. Development of a target-directed magnetic resonance contrast agent using monoclonal antibody-conjugated magnetic particles, *Noshuyo Byori* **13**, 127–132 (1996).
196. Sykova, E. & Jendelova, P. In vivo tracking of stem cells in brain and spinal cord injury, *Prog. Brain Res.* **161**, 367–383 (2007).
197. Tassa, C. Shaw, S. Y. & Weissleder, R. Dextran-coated iron oxide nanoparticles: a versatile platform for targeted molecular imaging, molecular diagnostics, and therapy, *Acc. Chem. Res.* **44**, 842–852 (2011).
198. Taupitz, M. Schmitz, S. & Hamm, B. Superparamagnetische Eisenoxidpartikel: Aktueller Stand und zukünftige Entwicklungen, *RöFo* **175**, 752–765 (2003).
199. Taupitz, M. *et al.* New generation of monomer-stabilized very small superparamagnetic iron oxide particles (VSOP) as contrast medium for MR angiography: preclinical results in rats and rabbits, *J. Magn. Reson. Imaging* **12**, 905–911 (2000).
200. Taupitz, M. *et al.* Phase I clinical evaluation of citrate-coated monocrySTALLine very small superparamagnetic iron oxide particles as a new contrast medium for magnetic resonance imaging, *Invest. Radiol.* **39**, 394–405 (2004).
201. Taylor, A. M. *et al.* Safety and preliminary findings with the intravascular contrast agent NC100150 injection for MR coronary angiography, *J. Magn. Reson. Imaging* **9**, 220–227 (1999).
202. Taylor, P. R. Martinez-Pomarez, L. Stacey, M. Lin, H. H. Brown, G. D. & Gordon, S. Macrophage receptors and immune recognition, *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 901–944 (2005).
203. Terrovitis, J. V. *et al.* Magnetic resonance imaging of ferumoxide-labeled mesenchymal stem cells seeded on collagen scaffolds-relevance to tissue engineering, *Tissue Eng.* **12**, 2765–2775 (2006).

204. Thode, K. Müller, R. H. & Kresse, M. Two-time window and multiangle photon correlation spectroscopy size and zeta potential analysis--highly sensitive rapid assay for dispersion stability, *Journal of pharmaceutical sciences* **89**, 1317–1324 (2000).
205. Thorek DL & Tsourkas A. Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells, *Biomaterials* **29**, 3583–3590 (2008 Sep).
206. Thorek, Daniel L J, Chen, A. K. Czupryna, J. & Tsourkas, A. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging, *Ann. Biomed. Eng.* **34**, 23–38 (2006).
207. To, S. Y. Castro, D. J. Lufkin, R. B. Soudant, J. & Saxton, R. E. Monoclonal antibody-coated magnetite particles as contrast agents for MR imaging and laser therapy of human tumors, *J. Clin. Laser Med. Surg.* **10**, 159–169 (1992).
208. Tögel, F. Hu, Z. Weiss, K. Isaac, J. Lange, C. & Westenfelder, C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **289**, F31-42 (2005).
209. Toma, C. Human Mesenchymal Stem Cells Differentiate to a Cardiomyocyte Phenotype in the Adult Murine Heart, *Circulation* **105**, 93–98 (2002).
210. Tsuchiya, S. Yamabe, M. Yamaguchi, Y. Kobayashi, Y. Konno, T. & Tada, K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1), *Int. J. Cancer* **26**, 171–176 (1980).
211. Unger, E. C. How can superparamagnetic iron oxides be used to monitor disease and treatment?, *Radiology* **229**, 615–616 (2003).
212. Valle-Delgado, J. J. Molina-Bolivar, J. A. Galisteo-Gonzalez, F. & Galvez-Ruiz, M. J. Study of the colloidal stability of an amphoteric latex, *Colloid & Polymer Science* **281**, 708–715 (2003).
213. van Buul, G. M. *et al.* Ferumoxides-protamine sulfate is more effective than ferucarbotran for cell labeling: implications for clinically applicable cell tracking using MRI, *Contrast Media Mol. Imaging* **4**, 230–236 (2009).
214. van Buul, G. M. *et al.* Clinically translatable cell tracking and quantification by MRI in cartilage repair using superparamagnetic iron oxides, *PLoS ONE* **6**, e17001 (2011).
215. van der Aa, M. A. E. M. *et al.* Cellular uptake of cationic polymer-DNA complexes via caveolae plays a pivotal role in gene transfection in COS-7 cells, *Pharm. Res.* **24**, 1590–1598 (2007).
216. van Furth, R. Cohn, Z. A. Hirsch, J. G. Humphrey, J. H. Spector, W. G. & Langevoort, H. L. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells, *Bull. World Health Organ.* **46**, 845–852 (1972).
217. van Osch, Gerjo J. V. M. *et al.* Cartilage repair: past and future - lessons for regenerative medicine, *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **13**, 792–810 (2009).
218. van Tiel, S. T. Wielopolski, P. A. Houston, G. C. Krestin, G. P. & Bernsen, M. R. Variations in labeling protocol influence incorporation, distribution and retention of iron oxide nanoparticles into human umbilical vein endothelial cells, *Contrast Media Mol. Imaging* **5**, 247-257 (2010).
219. Viscover™ Miltenyi Biotec, FeraSpin R [Datenblatt], 2010 <http://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Products/Import/0001900/IM0001914.ashx>

220. Vogler, H. (2006): MRT Kontrastmittel - Strukturen und Wirkungsweisen, Kind & Radiologie Bd., 8, 51-53
221. Vuu, K. *et al.* Gadolinium-rhodamine nanoparticles for cell labeling and tracking via magnetic resonance and optical imaging, *Bioconjug. Chem.* **16**, 995–999 (2005).
222. Wakitani, S. Nawata, M. Tensho, K. Okabe, T. Machida, H. & Ohgushi, H. Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **1**, 74–79 (2007).
223. Wang, Y. X. Hussain, S. M. & Krestin, G. P. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging, *Eur. Radiol.* **11**, 2319–2331 (2001).
224. Wang, Z. *et al.* Self-assembly of magnetite nanocrystals with amphiphilic polyethylenimine: structures and applications in magnetic resonance imaging, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **9**, 378–385 (2009).
225. Watson, D. J. Walton R. M. Magnitsky, S. G. Bulte, J. W. Poptani, H. & Wolfe, J. H. Structure-specific patterns of neural stem cell engraftment after transplantation in the adult mouse brain, *Hum. Gene Ther.* **17**, 693–704 (2006).
226. Wegner, K., Pratsinis, S. E. & Köhler, M (2003): Nanomaterialien und Nanotechnologie, S. 821-905, in Winnacker/Küchler: Chemische Technik: Prozesse und Produkte, Band 2. Neue Technologien, Wiley-VCH Verlag.
227. Weishaupt, D. Köchli, V. D. & Marincek, B. (2006): Wie funktioniert MRI?, Springer, 5 Auflage.
228. Weissleder, R. Elizondo, G. Wittenberg, J. Rabito, C. A. Bengele, H. H. & Josephson, L. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging, *Radiology* **175**, 489–493 (1990).
229. Weissleder, R. *et al.* Polyclonal human immunoglobulin G labeled with polymeric iron oxide: antibody MR imaging, *Radiology* **181**, 245–249 (1991).
230. Weissleder, R. Lee, A. S. Khaw, B. A. Shen, T. & Brady, T. J. Antimyosin-labeled monocrySTALLINE iron oxide allows detection of myocardial infarct: MR antibody imaging, *Radiology* **182**, 381–385 (1992).
231. Weissleder, R. Bogdanov, A. Neuwelt, E. A. & Papisov, M. Long-circulating iron oxides for MR imaging, *Advanced Drug Delivery Reviews* **16**, 321–334 (1995).
232. Weissleder, R. & Papisov, M. (1992): Pharmaceutical iron oxides for MR Imaging. *Rev. Magn. Reson. Med.* **4**: 1-20
233. Wollert, K. C. *et al.* Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial, *Lancet* **364**, 141–148 (2004).
234. Wu, J. C. Tseng, J. R. & Gambhir, S. S. Molecular imaging of cardiovascular gene products, *J. Nucl. Cardiol.* **11**, 491–505 (2004).
235. Xia, T. *et al.* Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties, *ACS Nano* **2**, 2121–2134 (2008).
236. Yamada, S. Terada, K. Ueno, Y. Sugiyama, T. Seno, M. & Kojima, I. Differentiation of adult hepatic stem-like cells into pancreatic endocrine cells, *Cell Transplant.* **14**, 647–653 (2005).

237. Yang, C.-Y. *et al.* Direct labeling of hMSC with SPIO: the long-term influence on toxicity, chondrogenic differentiation capacity, and intracellular distribution, *Mol. Imaging. Biol.* **13**, 443–451 (2011a).
238. Yang, C.-Y. *et al.* Mechanism of cellular uptake and impact of ferucarbotran on macrophage physiology, *PLoS ONE* **6**, e25524 (2011b).
239. Yang, K. *et al.* Magnetic resonance evaluation of transplanted mesenchymal stem cells after myocardial infarction in swine, *Can. J. Cardiol.* **27**, 818–825 (2011).
240. Yokoyama, M. Miwa, H. Maeda, S. Wakitani, S. & Takagi, M. Influence of fetal calf serum on differentiation of mesenchymal stem cells to chondrocytes during expansion, *J. Biosci. Bioeng.* **106**, 46–50 (2008).
241. Yoon, Y.-S. Lee, N. & Scadova, H. Myocardial regeneration with bone-marrow-derived stem cells, *Biol. Cell* **97**, 253–263 (2005).
242. Yu, Z. Persson, H. L. Eaton, J. W. & Brunk, U. T. Intralysosomal iron: a major determinant of oxidant-induced cell death, *Free Radical. Biology & Medicine* (2003 May 15).
243. Zeitler, E. (1984): Kernspintomographie: Einführung für Ärzte und Medizinstudenten. Köln: Dt. Ärzte-Verlag.
244. Zeng, G. *et al.* Human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles: the effect on neuron-like differentiation in vitro, *Mol. Cell. Biochem.* **357**, 331–341 (2011).
245. Zhang, C. *et al.* Specific targeting of tumor angiogenesis by RGD-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles using a clinical 1.5-T magnetic resonance scanner, *Cancer Res.* **67**, 1555–1562 (2007).
246. Zhang, W. *et al.* Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells, *Stem Cells Dev.* **13**, 263–271 (2004).
247. Zhang, Y. *et al.* Permission to enter cell by shape: nanodisk vs nanosphere, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **4**, 4099–4105 (2012).
248. Zhou, B. *et al.* MR tracking of magnetically labeled mesenchymal stem cells in rats with liver fibrosis, *Magn. Reson. Imaging* **28**, 394–399 (2010).

Abkürzungsverzeichnis

g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
BMSC	aus Knochenmark abgeleitete mesenchymale Stammzellen/ <i>bone marrow-derived mesenchymal stem cells</i>
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	fetales Kälberserum/ <i>fetal bovine serum</i>
GE-Sequenz	Gradienten-Echo-Sequenz
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N-(2-ethansulfonsäure)
HF	Hochfrequenz
hMSC	menschliche mesenchymale Stammzellen/ <i>human mesenchymal stem cells</i>
Hz	Hertz
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
J774A.1	Maus-Makrophagen-Zelllinie
KM	Kontrastmittel
LDL	Lipoprotein niederer Dichte/ <i>low density lipoprotein</i>
MPS	mononukleäres Phagocytensystem
MRT	Magnetresonanztomographie
NP	Nanopartikel
PEG	Polyethylenglycol
Pen/Str	Penicillin/Streptomycin
PLL	Poly-L-Lysin
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetat
RES	retikuloendotheliales System
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	interessierende Region/ <i>region of interest</i>

Anhang

ROS	reaktive Sauerstoffspezies/ <i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
SE-Sequenz	Spin-Echo-Sequenz
SPIO	superparamagnetische Eisenoxidpartikel/ <i>superparamagnetic iron oxide particles</i>
T	Tesla
TA	Transfektionsagent/ <i>transfection agent</i>
THP-1	menschliche leukämische Monocytenzelllinie
USPIO	ultrakleine superparamagnetische Eisenoxidpartikel/ <i>ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles</i>
VDW-Wechselwirkung/Kraft	Van-der-Waals-Wechselwirkung/Kraft
VSOP	sehr kleine superparamagnetische Eisenoxidpartikel/ <i>very small iron oxide particles</i>
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Chemikalienliste

Bezeichnung	Hersteller/Firma	Artikelnummer
Alizarin Red S	Sigma-Aldrich	A5533-25G
Ammoniumacetat	Carl Roth	7869.2
Ammonium hydroxide solution, 28,0-30,0 % NH ₃ basis	Sigma-Aldrich	221228-100ml-A
Ascorbinsäure	Merck	127.0100
Collagen A	Biochrom	L7220
DMEM	ATCC	ATCC 30-2002
DMSO	ATCC	ATCC 4-X
FBS	Biochrom	S 0615
FeraTrack™ Direct MRI contrast agent	Miltenyi Biotec	130-104-185
Ferrozine	Alfa Aesar	L10607
HEPES	Biochrom	L 1613
hMSC	Lonza	PT-2501

Anhang

hMSC Adipogenic BulletKit	Lonza	PT-3004
hMSC Osteogenic BulletKit	Lonza	PT-3002
J774A.1	ATCC	ATCC TIB 67
Kaliumpermanganat	Carl Roth	KK08.1
Mausplasma	Innovativ Research	IMS-CD1-N-P
2-Mercaptoethanol	Life Technologies	21985023
MSCGM BulletKit	Lonza	PT-3001
Natriumhydroxid	Acros Organics	206060010
Neocuproin Hemihydrat	Carl Roth	KK32.1
Oil Red O	Sigma-Aldrich	00625-25G
PBS w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom	L 1825
Penicillin/Streptomycin	Biochrom	A 2212
PMA	Sigma-Aldrich	P8139-1MG
Reinstwasser, steril	Biochrom	L0015
Roti-Histofix 4% Formaldehydlösung	Carl Roth	P087.4
RPMI-1640	Biochrom	FG 1215
Salzsäure 32%	Carl Roth	X896.1
Trypsin/EDTA	Lonza	CC-3232
THP-1	ATCC	ATCC TIB-202
Wasser	AppliChem	A4042,0500

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Darmstadt: Fournier, Fuchsbauer, Heinzel-Wieland, Koepp-Bank, Meyer-Almes, Pollet, Schön.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jansen für die Übernahme des Referats.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Hundt, dass er mir den Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt hat, für die Überlassung des Themas und für die Freiheiten bei der Gestaltung der Arbeit.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich bei Frau Beate Kleb für die ständige Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der zellbiologischen Experimente.

Herrn Dr. A. Briel und Frau Dr. A. Kirchherr (nanoPET Pharma GmbH, Berlin) danke ich für die Bereitstellung der Probe von FeraSpin™ R.

Den Mitarbeitern in der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Janine Donges, Maximilian Völker, Alexander König, Steve Braun und Daniel Sasse, danke ich für die Beratung und Unterstützung bei den MRT-Messungen.

Ein großer Dank gilt ebenso meinen Eltern und meiner Schwester, die mir mit Ihrer Unterstützung diese Dissertation ermöglicht haben und mir immer zur Seite standen.

