

**Synthese und *in vivo* Charakterisierung von
⁵⁹Fe-markierten, monodispersen,
superparamagnetischen Eisenoxid-
Nanopartikeln**

Dissertation

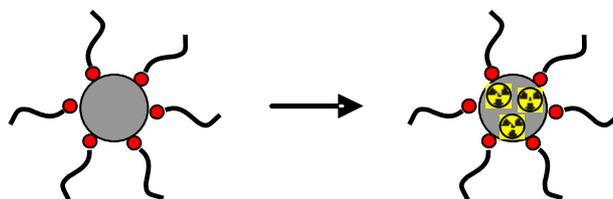
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Barbara Freund

aus München



Hamburg

2012

Die vorliegende Arbeit wurde von März 2009 bis März 2012 im Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (kommissarischer Abteilungsdirektor Prof. Dr. Andreas Guse) unter der Anleitung von PD Dr. Dr. Peter Nielsen angefertigt. Teile der Arbeit entstanden in enger Kooperation mit dem Institut für Physikalische Chemie von Prof. Dr. Horst Weller an der Universität Hamburg sowie der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie von Prof. Dr. Gerhard Adam am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

1. Gutachter: PD. Dr. Dr. Peter Nielsen

2. Gutachter: Prof. Dr. Horst Weller

Disputation: 11.05.2012

Für Lutz und meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Nanotechnologie.....	2
1.1.1 Allgemeines zu Nanotechnologie	2
1.1.2 Verwendung von Nanopartikeln in der Medizin	3
1.1.2.1 Goldnanopartikel	4
1.1.2.2 Halbleiternanopartikel	5
1.1.2.3 Eisenoxidnanopartikel.....	6
1.1.2.3.1 Magnetische Eigenschaften	6
1.1.2.3.2 Synthese	7
1.1.2.3.3 Magnetresonanztomographie	9
1.1.2.3.4 Thermotheapie.....	11
1.1.2.3.5 Gezielter magnetischer Wirkstofftransport	12
1.2 Verwendung von radioaktiven Nukliden in der Medizin	12
1.2.1 Bildgebende Verfahren unter Verwendung radioaktiver Nuklide.....	14
1.2.1.1 Szintigraphie.....	14
1.2.1.2 Single Photon Emission Computer Tomography (SPECT).....	15
1.2.1.3 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)	15
1.2.2 Verwendung von radioaktiven Nukliden in der Therapie	16
1.2.3 Verwendung von radioaktiven Nukliden in der Forschung	17
1.3 Radioaktiv markierte Nanopartikel	17
1.3.1 Markierung der Hülle	17
1.3.2 Markierung des Kerns	20
1.4 Aufgabenstellung	23
2. Ergebnisse und Diskussion	24
2.1 Synthese von superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln.....	24
2.2 Oberflächenmodifikationen für wasserlösliche SPIOs	26
2.3 Radioaktive Markierung von ölsäurestabilisierten SPIOs	28
2.3.1 Neutronenaktivierung von SPIOs.....	28
2.3.2 ⁵⁹ Fe-Austauschmarkierung von SPIOs und Qualitätskontrollen.....	29
2.4 Untersuchungen der Verteilung und des Verbleibs von SPIOs <i>in vivo</i>	39
2.4.1 Absorption und Administration	40
2.4.1.1 Einfluss der Form der Administration auf die Verteilung der SPIOs	40
2.4.1.2 Absorption der SPIOs aus dem Blut, Bluthalbwertszeit	44
2.4.2 Distribution	46
2.4.2.1 Ermittlung der Verteilung von SPIOs <i>in vivo</i>	46
2.4.2.2 Aus der Verteilung resultierende Anwendungen der SPIOs	53
2.4.3 Metabolismus	55
2.4.3.1 Eisenstoffwechsel.....	55
2.4.3.2 Metabolismus in Abhängigkeit von der Kerngröße des SPIOs	60
2.4.3.3 Metabolismus in Abhängigkeit des absorbierenden Zelltyps	63
2.4.3.4 Modelle zur Beschreibung des Metabolismus	70
2.4.3.5 Veränderungen der magnetischen Eigenschaften von SPIOs durch den Metabolismus.....	73

Inhaltsverzeichnis

2.4.4 Exkretion	76
2.5 Quantifizierung von Lipoproteinstoffwechselwegen mittels radioaktiver SPIOs <i>in vivo</i>	82
2.6 Auf dem Weg zu spezifischen Kontrastmitteln	86
2.6.1 Kopplung von Transferrin an polymerumhüllte SPIOs	86
2.6.2 Markierung der äußeren Hülle von SPIOs mit Transferrin und ⁵⁹ Fe	90
3. Zusammenfassung	94
4. Summary	96
5. Material und Methoden	98
5.1 Chemikalien	98
5.2 Synthese der superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikel	98
5.3 Überführung der ölsäurestabilisierten SPIOs ins wässrige Medium	98
5.3.1 Ligandenaustausch mit phosphorylierten Polyethylenglykolmonomethylethern	99
5.3.2 Verkapselung in ein amphiphiles Polymer	99
5.3.3 Einbetten von SPIOs in Lipidmizellen	100
5.3.3.1 Rekombinante triglyceridreiche Lipoproteine	100
5.3.3.2 Rekombinante high-density Lipoproteine	101
5.4 ⁵⁹ Fe-markierte SPIOs	101
5.4.1 Radioaktive Markierung von ölsäurestabilisierten SPIOs	101
5.4.2 Kinetik des Einbaus in Anwesenheit verschiedener Zusätze	102
5.4.3 Einfluss der zugesetzten Eisenmenge auf die Inkorporation	102
5.4.4 Kontrollierter Verdau der SPIOs mit Salzsäure	102
5.5 Kopplung von Biomolekülen an polymerumhüllte SPIOs	103
5.6 Charakterisierungsmethoden	103
5.6.1 Dynamische Lichtstreuung	103
5.6.2 Eisenbestimmung	104
5.6.2.1 Photometrische Bestimmung	104
5.6.2.2 Atomabsorptionsspektroskopie	104
5.6.3 Gelelektrophorese	104
5.6.4 Größenausschlusschromatographie	104
5.6.5 Radioaktivitätsmessungen	105
5.6.6 Magnetresonanztomographie	106
5.7 Mausmodelle und <i>in vivo</i> -Untersuchungen	106
5.7.1 Bestimmung der Bluthalbwertszeit	106
5.7.2 Bestimmung der Organverteilung	107
5.7.3 Messung der Erythrozyteninkorporation	107
5.7.4 Ganzkörperretention	107
5.7.5 Suszeptibilitätsmessungen	108
5.7.6 Statistik	110
6. Literatur	111

Inhaltsverzeichnis

7. Anhang	129
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	129
7.2 Chemikalien.....	132
7.3 Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge.....	133
7.3.1 Gefahrensymbole.....	133
7.3.2 Hinweise auf besondere Gefahren (R-Sätze).....	133
7.3.3 Kombination der R-Sätze.....	134
7.3.4 Sicherheitsratschläge.....	136
7.3.5 Kombination der S-Sätze.....	137
7.4 Danksagung.....	139
7.5 Lebenslauf.....	140
7.6 Erklärung.....	143

1. Einleitung

Als Geburtsstunde der Nanotechnologie wird oft die wegweisende Rede „There’s plenty at the bottom“ (Viel Spielraum nach unten)¹ des Nobelpreisträgers Richard Feynman aus dem Jahr 1959 angesehen, der eine direkte Manipulation auf atomarer Ebene als neue Möglichkeit der chemischen Synthese und der Schaffung neuer Materialeigenschaften voraussagte. Seitdem hat sich in dieser „Nanowelt“ viel getan und der Begriff „Nano“ wird heute fast inflationär gebraucht.

Eine Suche bei Pubmed nach dem Begriff „Nanopartikel“ ergibt über 52.000 Treffer und über 95 % dieser Publikationen sind in den letzten 10 Jahren veröffentlicht worden. Eines der Haupteinsatzgebiete von Nanotechnologie ist die Medizin, wo einzelne Nanopartikel bereits Einzug in den klinischen Alltag gehalten haben und wo man sich von zukünftigen intelligenten Nanodevices nichts weniger als eine Revolution in Diagnostik und Therapie verspricht.

In der Nanomedizin sind viele potentielle Anwendungen bereits in Machbarkeitsstudien beschrieben worden. Die aktuelle Forschung beschäftigt sich deshalb zunehmend auch mit der Optimierung und Weiterentwicklung der bestehenden Systeme. Dies ist ein wichtiger Aspekt, da die meisten Nanosysteme noch nicht für den Einsatz im Patienten bereit sind. Eine der größten Barrieren auf dem Weg vom Reagenzglas in die Klinik ist das Verhalten der Nanopartikel *in vivo*. Erkenntnisse über die Halbwertszeit, die Bioverteilung, den Metabolismus und die Exkretion sind unerlässlich für die Zulassung eines Medikaments und somit auch eines Nanopartikels. Darüber hinaus sind sie ein wichtiger Aspekt in der Nutzen-Risiko-Bewertung einer neuartigen Therapie. Dabei müssen Effekte der Nanopartikel *in vivo* quantitativ erfasst werden.

Traditionell ist die radioaktive Markierung in der Biochemie der sensitivste Weg, um quantitative Ergebnisse über das Verhalten *in vivo* zu erlangen. In der vorliegenden Arbeit sollen deshalb neuartige, monodisperse SPIOs radioaktiv markiert werden, um mit ihrer Hilfe tiefere Einblicke in das Schicksal dieser Partikel im Körper zu erhalten.

Im Folgenden werden die Nanotechnologie und Aspekte der Radioaktivität näher vorgestellt. Hierbei soll ins Besondere auf die Verwendung in der Nanomedizin eingegangen und bereits bekannte Verknüpfungen beider Technologien beleuchtet werden.

1.1 Nanotechnologie

1.1.1 Allgemeines zu Nanotechnologie

Der Ausdruck Nano leitet sich von dem lateinischen Wort nanus oder dem griechischen Wort nanos für der Zwerg ab. Die Zahl an Definitionen ist genauso vielfältig wie die Technologie, aber ihnen ist gemeinsam, dass die Nanotechnologie sich mit Partikeln im Größenbereich zwischen 1 nm und 100 nm beschäftigt. Viele in der Natur vorkommende Biomoleküle wie Enzyme, Antikörper und Viren fallen ebenfalls in diesen Größenbereich (siehe Abbildung 1.1).

Im Jahre 2000 legte die US National Nanotechnology Initiative eine präzisere Definition fest: Nanotechnologie beschäftigt sich mit Materialien und Systemen, deren Strukturen und Bestandteile neuartige und signifikant verbesserte, physikalische, chemische und biologische Eigenschaften besitzen. Diese Phänomene und Prozesse basieren auf ihrer nanoskaligen Größe.²

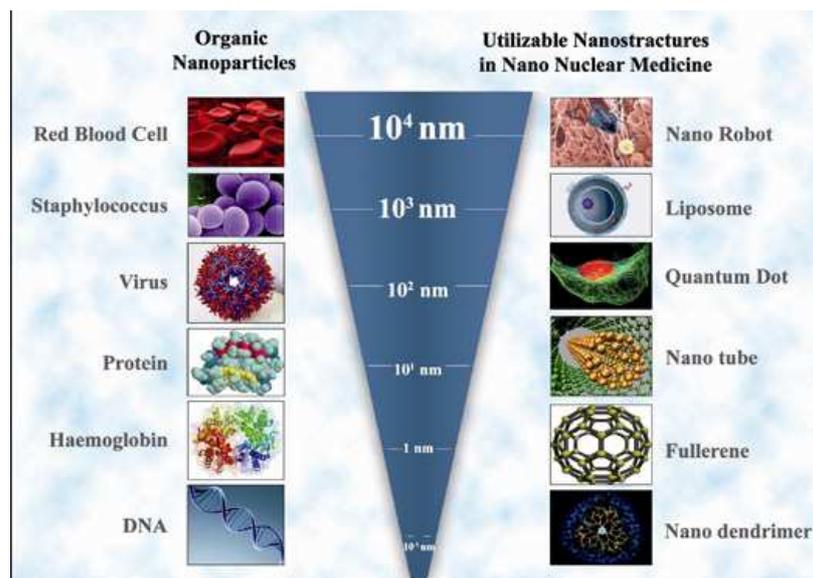


Abbildung 1.1: Größenvergleich der in der Natur vorkommenden Biomoleküle und Systeme mit den im Labor hergestellten Nanosystemen. (Graphik entnommen aus ³).

Nanopartikel lassen sich als Übergang zwischen den atomaren und molekularen Bereichen zu ausgedehnten Festkörperstrukturen betrachten.⁴ Für die besonderen physikalischen und chemischen Eigenschaften sind unter anderem zwei Aspekte wichtig. Zum einen gelten in so kleinen Systemen im Gegensatz zu Festkörperstrukturen nicht die Gesetze der klassischen Physik, sondern die der Quantenmechanik.⁵ Zum anderen ist bei Nanopartikeln die Oberfläche im Verhältnis

zum Volumen sehr groß. Bei kleinen Nanopartikeln befinden sich etwa genauso viele Moleküle auf der Oberfläche wie im Inneren des Partikels.⁴

Obwohl es sich um eine neue Technologie handelt, haben die Nanopartikel bereits Einzug in unseren Alltag genommen. Sie werden in der Technik zur Beschichtung verwendet, dienen in der Farb- und Lebensmittelindustrie zur Optimierung von Produkten und werden verschiedenen Kosmetika wie zum Beispiel Sonnenmilch zugesetzt.

Auf Grund ihrer großen Oberfläche, an die Biomoleküle gekoppelt werden können und ihrer speziellen gut kontrollierbaren Eigenschaften, sind die Nanopartikel besonders attraktiv für den Einsatz in der biochemischen Forschung und der Medizin.

1.1.2 Verwendung von Nanopartikeln in der Medizin

In der Medizin werden häufig Nanopartikel aus im Körper vorkommenden Substanzen eingesetzt. Vor allem Nanopartikel aus Albumin und Liposomen finden Verwendung. Sie werden hauptsächlich zur Verbesserung des Wirkstofftransports zum Zielorgan verwendet.

2006 genehmigte die amerikanische Arzneimittelzulassungsbehörde FDA (Food and Drug Administration) den Einsatz von Abraxane[®] in der Behandlung von metastasierendem Brustkrebs. Bei diesem Medikament handelt es sich um Paclitaxel, das an 130 nm große Albuminnanopartikel gebunden wurde und zur Gruppe der Taxane gehört. Diese sind sehr effiziente, aber auch sehr lipophile Chemotherapeutika. Durch die Bindung an Albumin wird das Medikament wasserlöslich, so dass auf zusätzliche organische Lösungsmittel verzichtet werden kann. Auch die Effizienz, mit der das Medikament das Zielgewebe erreicht, wird durch die Bindung an die Albumin-Nanopartikel erhöht.⁶

Liposomen sind künstliche Phospholipidvesikel mit einem hydrophilen Kern, der von einer Lipiddoppelschicht umgeben ist. Sie können mit hydrophilen Wirkstoffen, oft Chemotherapeutika, beladen werden, um die Bioverfügbarkeit eines Medikaments zu erhöhen.⁷ Es gibt Versuche, ihre Oberfläche mit Biomolekülen zu beschichten, damit es zu einer spezifischen Anreicherung z.B. im Tumor kommt. Zumeist ist eine Anreicherung im Tumor aber hauptsächlich durch einen Effekt, der auf der verstärkten Permeabilität und Retention (enhanced permeability and retention effect (EPR)) beruht, zu erklären. Dieser rührt daher, dass der Tumor über ein löchriges Endothel verfügt,

das den Nanopartikeln die Aufnahme in die Tumorzellen ermöglicht. Der Transport aus diesen Zellen heraus ist aber wegen der fehlenden lymphatischen Drainage größtenteils unterbunden.^{8,9}

Trotz der vielversprechenden Aspekte dieser Systeme handelt es sich hierbei nicht um klassische Nanokristalle.

1.1.2.1 Goldnanopartikel

Goldnanopartikel (AuNP) gehören zu den aussichtsreichen Kandidaten für die Verwendung in der Medizin, da sie sich in biologischen Systemen meist inert verhalten. In *in vivo* Versuchen über einen Zeitraum von 90 Tagen zeigten sie keine toxischen Effekte.^{10,11} Wenn doch Toxizität auftritt, liegt das meist an den Oberflächengruppen.¹²

Die Synthese der AuNP erfolgt hauptsächlich durch ein kolloidales Ausfällen des Goldes. Viele dieser Synthesen sind schon lange bekannt und die Größe und Form der Partikel lässt sich leicht einstellen.

Auf Grund der starken Wechselwirkung zwischen Goldoberflächen und Thiolen sowie dem einfachen Aufbringen von verschiedenen Stabilisatormolekülen während der Synthese können diese Nanopartikel sehr leicht mit Biomolekülen funktionalisiert werden. So gibt es Ansätze, DNA-Plasmide an die Oberfläche zu koppeln und diese zur Gentherapie zu verwenden.¹³ Auch den Wirkstofftransport versucht man auf diese Weise zu optimieren.¹⁴

AuNP können auch zur Detektion verwendet werden. Durch die Bestrahlung mit Nahinfrarot-Licht wird die Oberflächenplasmonenresonanz (OPR) angeregt und es kommt dadurch zu einer Rotverschiebung der Extinktionsspektren. So werden z.B. Aptamere an AuNP gekoppelt und die Technologie genutzt, um die Bindung an Tumorzellen sichtbar zu machen.¹⁵ Die bei der OPR entstehende Wärme könnte auch zur thermischen Therapie von Tumorerkrankungen verwendet werden, auf die später in dieser Arbeit eingegangen wird. Auch eine Kombination aus Therapie und Diagnostik, die so genannte Theranostik, wäre denkbar, wenn Bildgebung und Thermotherapie kombiniert werden. Hierzu ist aber eine spezifische Anreicherung im Tumor nötig, die durch die Kopplung eines Antikörpers (Ak) an die AuNP erreicht werden soll.¹⁶⁻¹⁹

Zurzeit sind noch keine AuNP in der Klinik zugelassen.

1.1.2.2 Halbleiternanopartikel

Bei Halbleiterkristallen mit einer Größe unter 100 nm kommt es zu einer energetischen Aufspaltung der Bänder in diskrete gequantelte Niveaus, weshalb sie als Quantumdots (QD) bezeichnet werden. Dabei entsteht eine Bandlücke zwischen dem Leitungs- und dem Valenzband. Wenn es nun zu einer optischen oder elektrischen Anregung des Halbleiters kommt, wird ein Elektron vom Valenzband ins Leitungsband angehoben und lässt im Valenzband ein Loch zurück. Bei der Rekombination von Elektron und Loch wird die dabei freiwerdende Energie als Lichtquant abgegeben. Die Wellenlänge des ausgesendeten Lichts hängt vom Material und der Größe der Bandlücke ab. Das Ausmaß der Bandlücke ist wiederum von der Ausdehnung des QDs abhängig. Je größer das Teilchen (2 - 10 nm), desto kleiner die Bandlücke und desto langwelliger das ausgesandte Licht (siehe Abbildung 1.2).^{4,20}

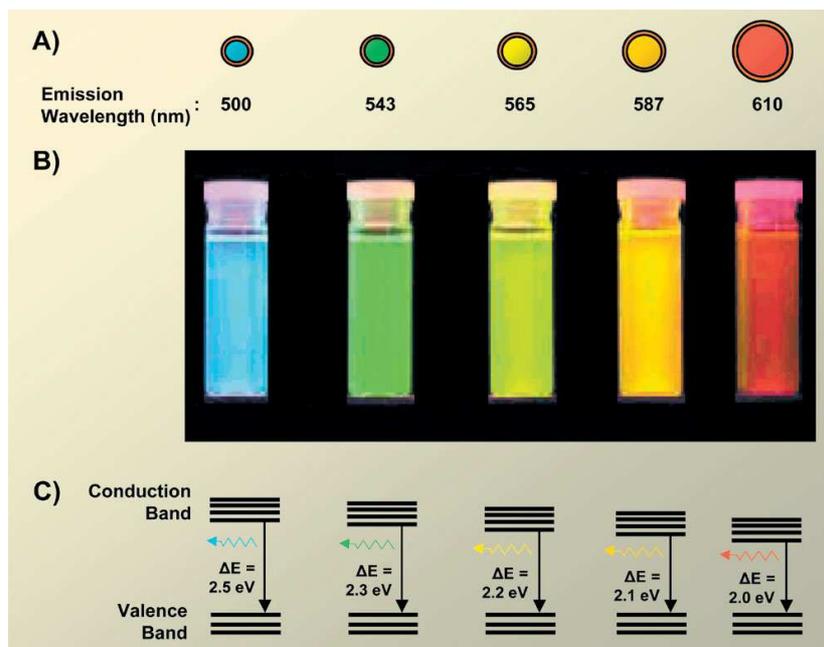


Abbildung 1.2: Abhängigkeit der optischen Eigenschaften von der Teilchengröße A) Schematische Darstellung der Größenabhängigkeit. Mit zunehmender Größe verschiebt sich die Emission von blau nach rot. B) Foto von mehreren Vials, die unterschiedlich große Quantumdots in Chloroform enthalten und mit einer UV-Lampe angeregt werden. C) Korrespondierende Energie der Bandlücken (Graphik übernommen aus ²⁰).

Die ersten QDs wurden hergestellt, indem Cadmium mit Sulfiden gemischt wurde.²¹ Diese CdS-QDs wurden weiterentwickelt und verfügen heutzutage über eine höhere Stabilität, da sie aus einem CdSe-Kern, der von einer CdS-Schale umgeben und einer weiteren ZnS-Schicht überzogen ist, bestehen. Sie werden als Core-Shell-Shell-Partikel bezeichnet.²²⁻²⁴

Im Gegensatz zu den organischen Farbstoffen zeichnen sich die QDs durch eine höhere Photostabilität, eine verlängerte Fluoreszenzlebensdauer und einen sehr hohen molaren Extinktionskoeffizienten aus. Ihre Emissionsspektren sind gaußförmig und von deutlich geringerer Spektralbreite als die der organischen Farbstoffe, während ihre Absorptionsspektren sehr breit sind.^{25,26} Diese Eigenschaften machen sie zu attraktiven Kandidaten für das Fluoreszenzimaging im Körper. So könnten sie z.B. an Biomoleküle gekoppelt und deren Verteilung und / oder Anreicherung mittels Fluoreszenz verfolgt werden. Allerdings enthalten QDs Schwermetalle wie Cd, Zn, Hg oder Pb, was erhebliche Bedenken hinsichtlich der Toxizität verursacht und eine Anwendung im Menschen bis jetzt in weite Ferne rücken ließ.²⁰

1.1.2.3 Eisenoxidnanopartikel

Nanopartikel aus Eisenoxid (iron oxide) verfügen über superparamagnetische Eigenschaften und werden deshalb als superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIOs) bezeichnet. Dieses spezielle magnetische Verhalten macht sie attraktiv für die Verwendung in der Medizin als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie (MRT), als Vehikel im Wirkstofftransport oder als Agens für die Thermotherapie.

1.1.2.3.1 Magnetische Eigenschaften

Ferromagnete bestehen aus einzelnen Bereichen gleicher Magnetisierungsrichtung, den so genannten Weisschen Bezirken, welche energieminiert ausgerichtet sind. Typischerweise sind diese Domänen ca. 100 nm groß, im Fall von Ferrit 128 nm. Wird der Partikel genügend klein, so besteht er nur noch aus einer Domäne.

Bei Ferromagneten kommt es zur Hysterese. Beim Anlegen eines stärker werdenden Magnetfelds kommt es zu einer Magnetisierung des Materials, bis die Sättigungsmagnetisierung erreicht ist. Wenn jetzt die Feldstärke wieder auf Null reduziert wird, bleibt eine Magnetisierung zurück, die sogenannte Remanenzmagnetisierung (M_r). Zur vollständigen Entmagnetisierung muss ein gegenläufiges Magnetfeld der Koerzitivfeldstärke H_C auf die Probe einwirken. H_C ist von der Teilchengröße abhängig. Bei Multidomänen-Materialien ist sie zuerst sehr gering, nimmt dann aber mit abnehmender Partikelgröße zu, bis beim Erreichen der Eindomänen-Größe ein Maximum erreicht wird. Dann fällt die Koerzitivfeldstärke

wieder bis sie den Wert Null erreicht. Ab dieser Größe und kleiner sind die Partikel superparamagnetisch und zeigen keine Hysterese mehr (siehe Abbildung 1.3).^{27,28}

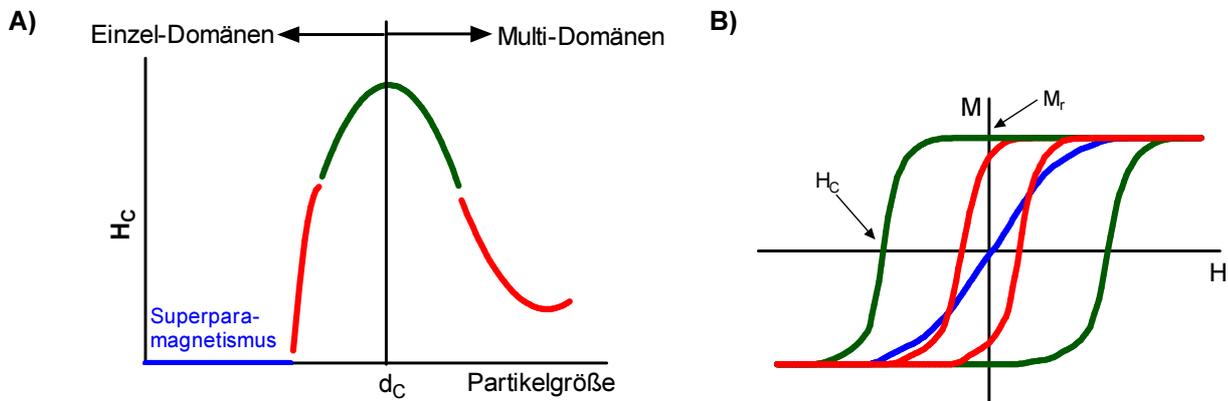


Abbildung 1.3: Darstellung der magnetischen Eigenschaften A) Abhängigkeit der Koerzitivfeldstärke (H_C) vom Partikeldurchmesser, B) Hysteresekurven für verschieden große Partikel, M_r = Remanenzmagnetisierung.

Die magnetischen Eigenschaften der SPIOs sind also sehr stark von ihrer Größe und ihrer Kristallinität abhängig, weshalb diese Parameter in der Synthese genau einstellbar sein müssen.

1.1.2.3.2 Synthese

SPIOs können auf vier verschiedenen Wegen synthetisiert werden: durch Co-Präzipitation, unter hydrothermalen Bedingungen, in Mizellen oder aus organometallischen Vorläuferverbindungen in hochsiedenden Lösungsmitteln.²⁹

Die Co-Präzipitationsmethode ist eine lange bekannte und weitverbreitete Technik SPIOs herzustellen. Alle auf dem Markt befindlichen MRT-Kontrastmittel, die aus eisenbasierten Nanopartikeln bestehen, wurden auf diese Art hergestellt (siehe Tabelle 1.1). Die Methode beruht darauf, Fe(II)- und Fe(III)- Salze in wässriger Lösung durch die Zugabe einer Base auszufällen. Dies kann bei Raumtemperatur oder höheren Temperaturen geschehen. Durch die Zugabe von Stärke, Dextranen etc. als Hülle entstehen wasserlösliche SPIOs. Der klare Vorteil dieser Methode besteht darin, dass sie reproduzierbar in großem Maßstab, also auch als technische Synthese, durchgeführt werden kann. Allerdings ist die Größenverteilung der Partikel schwierig zu kontrollieren. Dies ist ein großer Nachteil, da die Größe starken Einfluss auf die Magnetisierung und die Curie-Temperatur hat. Diese Polydispersität kann zwar durch

die Zugabe von Stabilisatoren etwas vermindert werden, doch auch die Kristallinität der Partikel ist geringer als bei anderen Methoden. Außerdem zeigen die Partikel eine Neigung zur Aggregation.

Name		Status	Applikation	Administration	Hülle	Kerngröße
AMI-121	Lumirem [®] und Gastromark [®]	USA und Europa	MDT	oral	Silica	300
OMP	Abdoscan [®]	Europa	MDT	oral	Polystyrene	300
AMI-25	Endorem [®] und Feridex [®]	USA	Leber / Milz	i.v.	Dextran	5,6
SHU-55A	Resovist [®]	nicht mehr auf dem Markt	Leber / Milz	i.v.	Carbo- Dextran	4,2
AMI-227	Sinerem [®] und Combidx [®]	in klinischer Prüfung	Lymphknoten, Knochenmark	i.v.	Dextran	4 - 6
NC100150	Clariscan [®]	abgebrochen	Perfusion / Angiographie	i.v.	Carbo- Hydrat- PEG	5 - 7
SHU-55C	Supravist [®]	präklinisch	Perfusion, Lymphknoten, Knochenmark	i.v.	Carbo- Dextran	3 - 5
MION 46	-	präklinisch	Angiographie, Lymphknoten, Tumor, Infarkt	i.v.	Dextran	4 - 6

Tabelle 1.1: Stand der aktuellen SPIO-Kontrastmittel in der Entwicklung und auf dem Markt. MDT = Magen-Darm-Trakt, i.v. = intravenös (Tabelle modifiziert nach ³⁰).

Bei der hydrothermalen oder auch solvothermalen Synthese wird die Reaktion in einem Autoklaven ausgeführt, wobei das Lösungsmittel auf Temperaturen oberhalb seines Siedepunktes erhitzt wird und somit eine superkritische Flüssigkeit entstehen kann. Auch bei dieser Synthese kann durch Zugabe von Stabilisatoren eine weniger variable Größenverteilung erreicht werden. Im Vergleich zur Co-Präzipitation verfügen die SPIOs über eine höhere Kristallinität.

Eine weitere Variante besteht darin, SPIOs in Mizellen zu synthetisieren. Hierbei bestimmt die Größenverteilung der Mizellen die Größe der SPIOs und muss daher streng kontrolliert werden. Die Reaktion findet meist bei Raumtemperatur statt, kann aber auch durch Erhitzen zum Reflux beschleunigt werden. Sowohl diese Art der

Synthese als auch die hydrothermale können auch mit Hilfe von Mikrowellen durchgeführt werden.

Die besten Ergebnisse in Bezug auf Reproduzierbarkeit, hohe Kristallinität und geringe Größenvariation werden erreicht, wenn sich organometallische Precursor in hochsiedenden, unpolaren Lösungsmitteln zersetzen oder Metallsalze unter diesen Bedingungen reduziert werden. Diese Synthese scheint dem LaMer-Konzept^{31,32} zu folgen und kann somit in eine Nukleations- und Wachstumsphase unterteilt werden. Um monodisperse Nanopartikel zu erhalten, ist es wichtig, dass Nukleation und Kristallwachstum getrennt sind und die Nukleationsphase kurz gehalten wird. In der organometallischen Hochtemperatursynthese kann dies einfach durch die Kontrolle der Parameter wie Reaktionstemperatur, Heizgeschwindigkeit und -dauer sowie Konzentration der Precursor und Stabilisatoren gewährleistet werden. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass die erhaltenen SPIOs von Ölsäure stabilisiert werden. Um die SPIOs wasserlöslich zu machen und sie somit *in vivo* einsetzen zu können, muss die Oberfläche der Nanopartikel nach der Synthese in einem zweiten Schritt modifiziert werden.²⁹

1.1.2.3.3 Magnetresonanztomographie

Auf Grund ihrer besonderen magnetischen Eigenschaften können SPIOs als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie (MRT) verwendet werden.

Das Prinzip der MRT-Bildgebung beruht darauf, dass ein homogenes externes Magnetfeld auf die Protonen in einem Gewebe einwirkt. Es kommt zu einer Präzision der Spins um die Richtung des Magnetfeldes (z) mit einer Rotation in der Lamorfrequenz (ω_0). Die Spins können in zwei möglichen Ausrichtungen vorliegen. Durch das Magnetfeld wird die Entartung der beiden Zustände aufgehoben, wobei die günstigere Ausrichtung entlang des Magnetfelds energetisch herabgesetzt und die ungünstigere heraufgesetzt wird. Es stellt sich ein Boltzmannverteilter Besetzungsunterschied zwischen den beiden Niveaus ein.

Durch das Einstrahlen einer elektromagnetischen Radiofrequenz in der Lamorfrequenz werden die Spins in die transversale (x,y) Richtung ausgelenkt. Bei der Rückkehr in den Ausgangszustand treten zwei unterschiedliche Relaxationsprozesse auf. Bei der longitudinalen (T_1 -) Relaxation, auch als Spin-Gitter-Relaxation bezeichnet, findet ein Energietransfer an die Umgebung (Gitter) statt. Dadurch wird die Boltzmann-Verteilung

wieder hergestellt. Die Dephasierung der Spins erfolgt ohne Energieabgabe und resultiert in einem Verlust der transversalen Magnetisierung. Diese wird als transversale oder Spin-Spin-Relaxation bezeichnet. Hierbei spielen zwei Aspekte eine Rolle, die eigentliche transversale Relaxationszeit (T_2) und die effektive transversale Relaxationszeit (T_2^*), für die lokale Inhomogenitäten des Magnetfelds verantwortlich sind. Beide Relaxationen führen zu einem Signalverlust in der Detektorspule und können so gemessen werden. Durch das Anlegen eines Magnetfeldgradienten kann die Larmofrequenz ortsabhängig moduliert werden, wodurch man eine Ortsauflösung erreicht. Gewebe haben in Abhängigkeit von Wasser-, Fett- und Eisengehalt, sowie der Viskosität unterschiedliche Relaxationszeiten und erscheinen dadurch in der MRT-Aufnahme unterschiedlich hell.^{33,34}

Außer bei sehr kleinen Partikeln³⁵ haben SPIOs einen größeren (verkürzenden) Einfluss auf die transversale Relaxationszeit. Dadurch sinkt die Signalintensität und das Bild erscheint dunkler (siehe Abbildung 1.4). Daher werden sie auch als negative Kontrastmittel bezeichnet.

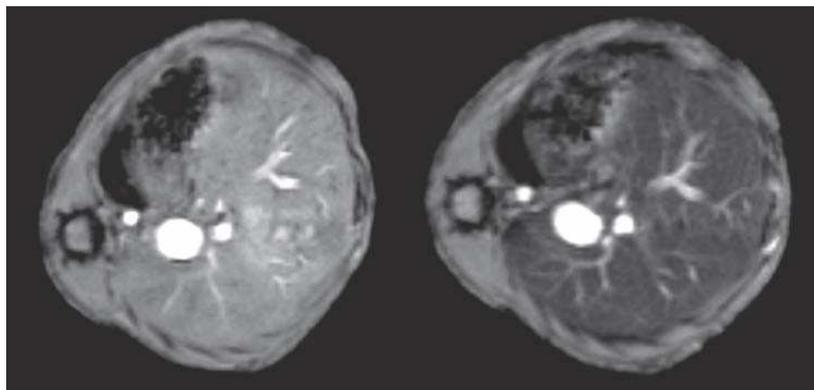


Abbildung 1.4: Magnetresonanztomographische Aufnahme der Leber einer Maus vor (links) und nach (rechts) der Gabe eines negativen Kontrastmittels. Die Leber erscheint nach der Kontrastmittelgabe dunkler. (Abbildung entnommen aus³⁶).

1988 wurde das erste Mal über den Einsatz von SPIOs als Kontrastmittel im Menschen berichtet.³⁷ Die SPIOs werden im Körper vor allem von den Organen des retikuloendothelialen Systems (RES), hauptsächlich der Leber und der Milz, aufgenommen.^{38,39} So dienen viele der kommerziell erhältlichen SPIOs der Auffindung von Leberläsionen (siehe auch Tabelle 1.1).⁴⁰ Auch in Tumoren kommt es auf Grund des EPR-Effekts zu einer unspezifischen Anreicherung.⁴¹⁻⁴⁵ Bei der Bildgebung von Lymphknotenmetastasen versucht man den Umstand zu nutzen, dass SPIOs in großer Menge von Makrophagen aufgenommen werden.⁴⁶ Des Weiteren ist es möglich, auf

diese Weise Makrophagen in Plaques von arteriosklerotisch veränderten Gefäßwänden sichtbar zu machen, um akute Entzündungsreaktionen und somit die Gefahr einer Ruptur zu erkennen.⁴⁷⁻⁵⁰

Bei all diesen Anwendungen handelt es sich um eine unspezifische Anreicherung. Die Zukunft liegt jedoch in spezifischen Kontrastmitteln, die die Anwendungsmöglichkeiten der SPIOs im MRT erweitern würden. So wird versucht die SPIOs mit Biomolekülen wie Zuckern, Antikörpern, Nanobodies oder Aptameren zu funktionalisieren und dadurch eine Anreicherung im Zielgewebe zu erreichen.²⁹ Besonders häufig wurde in der Vergangenheit Transferrin (Tf) verwendet, da der Transferrinrezeptor (TfR) in schnellwachsenden Tumorgeweben oft überexprimiert wird.⁵¹⁻⁵⁵ Ähnliches gilt für Folat,^{56,57} aber auch therapeutische Antikörper wie Herceptin[®] kommen zum Einsatz.^{58,59} Die Liste an Beispielen könnte beliebig fortgesetzt werden.⁶⁰⁻⁶²

Wie bei den AuNP hofft man auch bei funktionalisierten SPIOs auf eine theranostische Anwendung. Hierfür soll neben dem Biomolekül, das für die spezifische Anreicherung benötigt wird, ein Wirkstoff auf der Oberfläche aufgebracht werden. Darüber hinaus kann auch das Nanopartikel selbst zum Beispiel durch Wärme (siehe AuNP und nächstes Kapitel) als Therapeutikum genutzt werden.^{61,63}

1.1.2.3.4 *Thermotherapie*

Die Hyperthermie bei der ein ganzer Patient oder einzelne Körperteile von außen erwärmt werden, ist seit vielen Jahren eine experimentelle Therapie in der Krebsbehandlung von meist austherapierten Patienten.⁶⁴ Durch die magnetischen Eigenschaften der SPIOs ergibt sich aktuell eine neue Art der internen Thermotherapie.

Durch das Anlegen eines alternierenden Magnetfelds entsteht Wärme und das den SPIO umgebende Gewebe, im besten Fall der Tumor, erwärmt sich. Es konnte gezeigt werden, dass ab einer Temperatur von 40 - 42 °C die toxischen Effekte der Chemotherapie oder Bestrahlung verstärkt werden und sogar Apoptose des Gewebes ausgelöst werden kann.^{65,66} Zurzeit wird der SPIO noch direkt in den Tumor injiziert, doch auch hier besteht ein Bedarf an spezifischen SPIOs, die sich nach intravenöser Gabe im Tumor anreichern.^{67,68}

1.1.2.3.5 Gezielter magnetischer Wirkstofftransport

Es ist gerade in der Krebstherapie oft ein Problem, den Wirkstoff in ausreichender Menge in den Tumor zu transportieren und gleichzeitig dafür zu sorgen, die Nebenwirkungen durch Aufnahme des Therapeutikums in anderen Zellen so gering wie möglich zu halten. Neben Strategien, den Wirkstoff und ein Biomolekül, das die Aufnahme in den Tumor vermittelt, an den Nanopartikel zu koppeln, gibt es Versuche den Magnetismus der SPIOs zu nutzen. Hierfür werden durch ein lokal plaziertes Magnetfeld, die mit dem Therapeutikum verknüpften SPIOs im Tumor zurückgehalten und dadurch angereichert.^{42,68-70}

Diese Technik könnte auch dazu genutzt werden, die Verteilung von Zellen, die vorher mit SPIOs markiert wurden, im Körper durch das Anlegen eines Magnetfelds zu beeinflussen. Für Hepatozyten konnte dies bereits gezeigt werden.⁷¹ Dieser Vorgang wäre besonders für die Stammzellentherapie attraktiv und ist ein weiteres Beispiel für eine theranostische Anwendung, da die Verteilung der Zellen zusätzlich via MRT verfolgt werden könnte.

1.2 Verwendung von radioaktiven Nukliden in der Medizin

Bereits 1913 entwickelte George de Hevesy das Tracer-Konzept, das heute noch die Grundlage der modernen Nuklearmedizin ist. Er gab radioaktives Radon zu einer bekannten Menge an Blei und konnte so den Weg der Bleiatome verfolgen. 1923 verwendete er dieses Prinzip erstmals zur Lösung eines biologischen Problems und benutzte radioaktives Blei, um die Verteilung von Bleinitrat in Bohnenpflanzen zu untersuchen.⁷²

Ein weiterer wichtiger Schritt hin zur modernen Nuklearmedizin war die Entdeckung der künstlichen Radioaktivität 1933 durch Frédéric und Irène Joliot-Curie, der Tochter von Marie Curie. Auf der Nobelpreiskonferenz 1935, bei der die beiden den Preis im Fach Chemie erhielten, sagten sie bereits die Verwendung der künstlichen Isotope in Medizin und Forschung voraus.⁷³ Seitdem sind über 2000 neue radioaktive Nuklide dargestellt worden. Diese künstlichen Atomarten werden zum Beispiel in Reaktoren durch die Bestrahlung von Elementen mit Kernen und Kernbausteinen, wie Helium-, Wasserstoffkernen, Protonen, Elektronen und Neutronen, gewonnen.

Neben der Entwicklung radioaktiver Substanzen war auch der Fortschritt in der Detektortechnologie entscheidend für die Verwendung in Medizin und Forschung. 1952 beschrieb Hal Anger die erste *in vivo* Anwendung einer Gamma-Kamera (auch Szintillations- oder Angerkamera genannt) (siehe Abbildung 1.5).

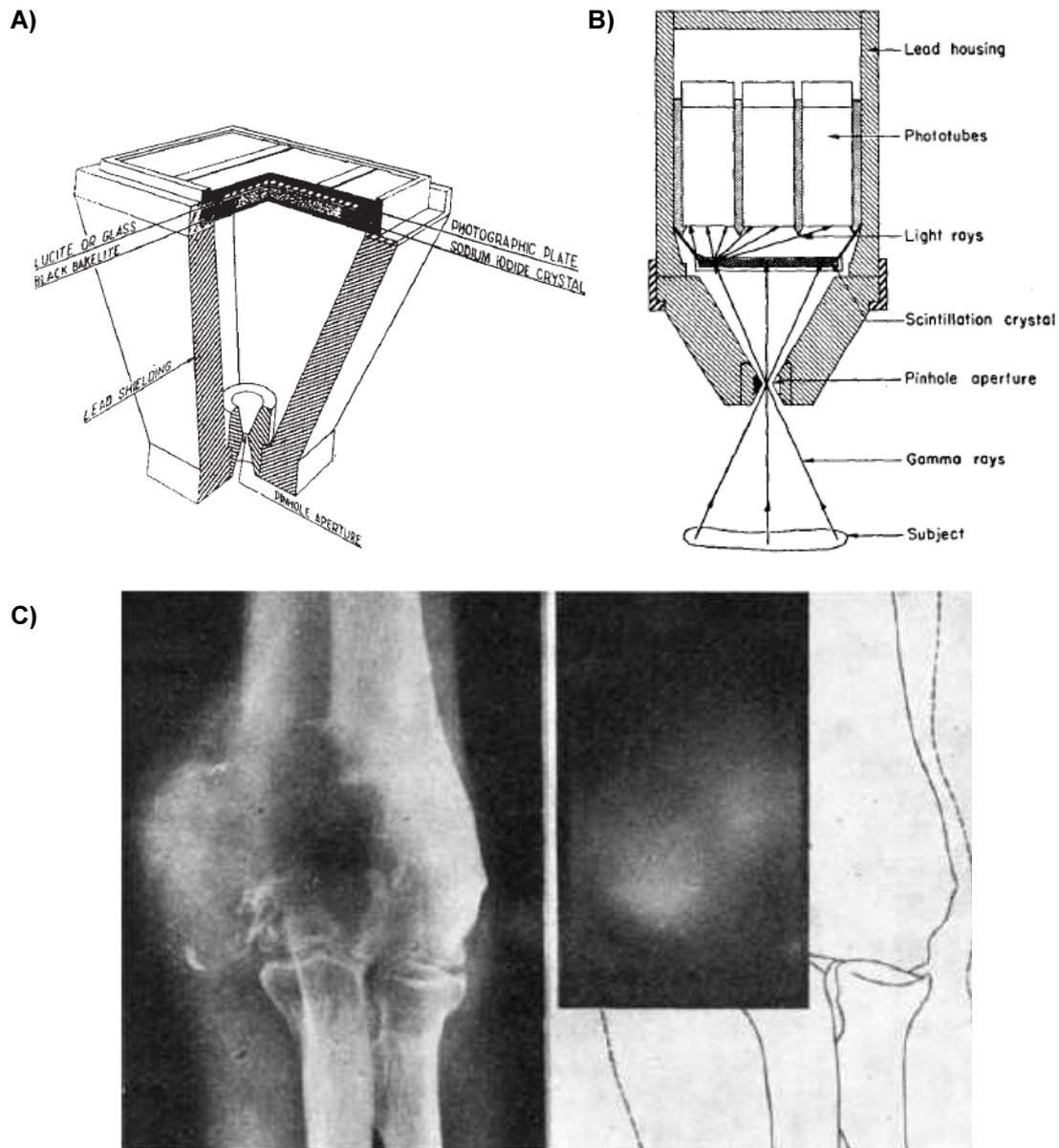


Abbildung 1.5: Aufbau und erste *in vivo* Bilder einer Gamma-Kamera. **A)** Schematischer Aufbau der ersten Gamma-Kamera: Ein γ -Strahl gelangt durch die Lochblende ins Innere der Kamera, wo er in einem geraden Strahl auf einen Szintillationskristall aus Natriumiodid trifft. Das dabei entstehende Licht wird mittels einer fotografischen Platte detektiert.⁷³ **B)** Weiterentwicklung der Gamma-Kamera durch Anger: Es wird anstelle des fotografischen Films ein Photomultiplier verwendet.⁷⁴ **C)** Erste Aufnahme mit der Gamma-Kamera: Links: Röntgenbild des Ellenbogens des Patienten. Rechts: Aufnahme einer Metastase eines Thyroidkarzinoms im Ellenbogen des Patienten 24 h nach der Gabe von ^{131}I .⁷³

Bei dieser handelt es sich um eine Lochblenden-Kamera. Der γ -Strahl gelangt durch das Loch in der Blende aus Blei ins Innere der Kamera. In einem geraden Strahl trifft

er auf einen thalliumaktivierten Natriumiodidkristall. Durch den Compton- (ein Teil der Energie des γ -Quants wird auf ein Elektron übertragen) und den Photoeffekt (die gesamte Energie des γ -Quants wird auf ein Elektron übertragen) entstehen freie Elektronen, die bis zu einem mm im Kristall wandern können. Das Licht, das dabei entsteht, wird ausgesandt und auf einer fotografischen Platte detektiert. 1958 entwickelte Hal Anger die Kamera nochmals weiter, indem er anstatt des fotografischen Films mehrere Photomultiplier zur Detektion verwendete (siehe Abbildung 1.5).⁷⁴

Mittlerweile wurde die Technologie weiterentwickelt, aber die Gamma-Kamera ist immer noch der Detektor der heutigen nuklearmedizinischen Bildgebung.

1.2.1 Bildgebende Verfahren unter Verwendung radioaktiver Nuklide

1.2.1.1 Szintigraphie

Bei der Szintigraphie wird mit einer Gamma-Kamera eine planare Aufnahme eines Organs nach der Gabe einer radioaktiven Substanz erstellt. Es werden ausschließlich γ -Emitter verwendet. Besonders häufig kommt ^{99m}Tc zum Einsatz. Auf Grund seiner kurzen Halbwertszeit von 6,02 h und da es sich um einen reinen γ -Strahler handelt, kann die Strahlungsbelastung für den Patienten gering gehalten werden. Die radioaktiven Substanzen werden zumeist als Salze oder Chelate eingesetzt. Deshalb werden sie nur vom Blutstrom mitgetragen und nehmen nicht aktiv am Stoffwechsel teil. Das häufigste Einsatzgebiet der Szintigraphie ist das Auffinden von Knochenmetastasen. Doch auch in der Herzbildgebung, der Untersuchung von Schilddrüsenkrebs oder einer Überfunktion dieser Drüse sowie der Funktionsprüfung der Niere spielt diese Technik eine wichtige Rolle (siehe Tabelle 1.2).⁷⁵

Organ	Diagnostische Fragestellung	Präparat
Herz	Septum Defekte, Schlagvolumen	^{201}Tl -Chlorid, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Phosphat
Schilddrüse	Tumor, Überfunktion	^{131}I , ^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Pertechnetat
Lunge	Belüftung	^{133}Xe , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Makroalbumin
Knochen	Tumor	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Phosphate
Niere	Durchblutung, Sekretion, Exkretion	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Chelate

Tabelle 1.2: Anwendungen der Szintigraphie (Tabelle übernommen aus ⁷⁵)

1.2.1.2 Single Photon Emission Computer Tomography (SPECT)

Bei der Single Photon Emission Computer Tomography (SPECT (Deutsch: Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie)) handelt es sich um eine Erweiterung der Szintigraphie. Wie bei der Röntgen-Computertomographie (CT) handelt es sich um ein Schnittbildverfahren. Um den Patienten herum sind mehrere Gamma-Kameras angebracht, die um ihn rotieren. Durch computertomographische Methoden kann aus den verschiedenen Schnittebenen ein dreidimensionales Bild der Konzentration der radioaktiven Substanz im Körper des Patienten berechnet werden. Die SPECT wird immer dann verwendet, wenn eine dreidimensionale Darstellung nötig ist und somit die planare Bildgebung der Szintigraphie nicht ausreicht. Damit sind die Einsatzgebiete grundsätzlich in Tabelle 1.2 gegeben. Darüber hinaus ist die SPECT für die Vitalitätsdiagnostik des Herzmuskels unverzichtbar.⁷⁵⁻⁷⁷ Es werden die gleichen radioaktiven Strahler wie bei der Szintigraphie verwendet.

1.2.1.3 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

In der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) werden, wie in den beiden vorherigen Verfahren, γ -Quanten detektiert. Allerdings werden hier dem Patienten Biomoleküle, die mit einem Positronenemitter markiert wurden, appliziert. Im Körper

zerfällt dieser und gibt dabei ein Positron ab. Dieses kann im Körper je nach Energie bis zu 8 mm weit wandern. Dann kommt es zu einer Vereinigung mit einem Elektron. Die dabei entstehende Energie wird als Vernichtungsstrahlung bezeichnet und in Form von zwei γ -Strahlen mit einer Energie von 511 keV abgegeben. Auf Grund der Impulserhaltung werden die beiden Quanten in einem Winkel von 180° zueinander abgegeben. Wenn diese dann innerhalb von 10 - 20 s den Detektor erreichen, liegt die Quelle der Strahlung auf einer geraden Linie zwischen den beiden Detektoren.

Für PET-Untersuchungen sind vor allem die radioaktiven Isotope ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O und ^{18}F geeignet. Diese Nuklide zeichnen sich durch sehr kurze Halbwertszeiten aus. Dies reduziert zwar die Strahlungsbelastung für den Patienten, hat aber zur Folge, dass die Radionuklide immer nur relativ kurz vor der Verwendung hergestellt werden können. Viele Krankenhäuser verfügen deshalb über ein Zyklotron. Auch die Kopplung an ein Biomolekül muss schnell erfolgen. Das wohl am häufigsten verwendete Derivat ist ^{18}F -2-Deoxyglukose. Diese wird wie normale Glukose in Gewebe mit hohem Energiebedarf (Tumor, Entzündung) aufgenommen, kann dort aber nicht verstoffwechselt werden und reichert sich an.

Die PET kann unter anderem zur Untersuchung des Tumorstoffwechsels, zur Analyse des Glukosestoffwechsels in Gehirn und Herz sowie zur Auffindung von Durchblutungsstörungen verwendet werden.^{75,77-80}

Allerdings spielt Radioaktivität nicht nur in der Diagnostik, sondern auch in der Therapie eine wichtige Rolle.

1.2.2 Verwendung von radioaktiven Nukliden in der Therapie

Radioaktivität kommt auch in der Strahlentherapie, hauptsächlich zur Behandlung von Tumorerkrankungen, zum Einsatz. Neben der schon 1903 eingesetzten klassischen Radiotherapie, wird seit Anfang dieses Jahrhunderts eine Weiterentwicklung, die Radioimmunotherapie, verwendet. Diese basiert darauf, dass ein tumorspezifischer Antikörper mit einem radioaktiven Strahler gekoppelt wird und sich so nach i.v. Gabe im Tumorgewebe anreichert und dieses bestrahlt. Obwohl diese Idee schon lange existiert, gibt es auch heute erst zwei solcher Präparate auf dem Markt ^{90}Y -Ibritumomab-Tiuxetan und ^{131}I -Tositumomab, die beide zur Therapie von Non-Hodkin-Lymphomen eingesetzt werden.⁸¹ Das Problem besteht darin, dass der Antikörper auf

Grund seiner geringen Spezifität lange im Blut verweilt. Es wird große Hoffnung auf die Kombination mit der Nanotechnologie gesetzt, um eine Optimierung der Methode zu erreichen.

1.2.3 Verwendung von radioaktiven Nukliden in der Forschung

Die Bedeutung der Radioaktivität für die chemische, biologische, medizinische und pharmazeutische Forschung, lässt sich schon daran erkennen, dass 1943 die Erfindung der Tracertechnologie mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde. Viele Stoffwechselwege wie die Photosynthese konnten nur mit Hilfe von radioaktiven Isotopen aufgeklärt werden. Auch die für die Zulassung eines Medikaments notwendigen Verteilungs- und Metabolismusstudien werden oft mit Hilfe von radioaktiven Markierungen durchgeführt. Auf die Vorteile der Radioaktivität bei der Untersuchung des Schicksals eines eisenoxidbasierten Nanopartikels wird später noch genauer eingegangen.

1.3 Radioaktiv markierte Nanopartikel

1.3.1 Markierung der Hülle

Es gibt einige Beispiele, in denen die Hülle eines Nanopartikels radioaktiv markiert wurde. Dies geschieht zumeist durch ein radioaktiv markiertes Biomolekül, häufig einen Antikörper, der an die Oberfläche des Nanopartikels gekoppelt wird. Die so erhaltenen Nanopartikel kommen sowohl in der Bildgebung als auch in der Therapie zum Einsatz.

Die Vorteile von PET und SPECT sind ihre sehr hohe Sensitivität (picomolarer Bereich), die Möglichkeit der Quantifizierung und das Fehlen eines Gewebeeindringtiefenlimits. Ihr Nachteil ist jedoch die geringe Auflösung (> 1 mm). Durch eine Kombination aus radioaktivem Tracer und Nanopartikel hofft man diese verbessern zu können. Die Anwendungen sind vielfältig und in Tabelle 1.3 sind einige Beispiele zusammengefasst. Besonders großes Potential hat der Einsatz radioaktiv markierter Nanopartikel als dualmodale Bildgebungsagentien. Hierbei kombiniert man z.B. PET oder SPECT mit der MRT Bildgebung, wobei man die SPIOs als Kontrastmittel nutzt. Diese Kombination wirkt sich synergistisch aus, da die hohe Sensitivität der radioaktiven Methoden mit der hohen Auflösung des MRTs kombiniert

1. Einleitung

wird. Auch QDs kommen in der dualmodalen Bildgebung zum Einsatz, da hier eine Kombination mit optischer oder Fluoreszenz-Bildgebung möglich ist.^{3,82}

Oft werden die Nanopartikel mit einer radioaktiv markierten Hülle auch dazu verwendet, die Verteilung *in vivo* zu messen. Diese Untersuchungen sollten jedoch mit Vorsicht betrachtet werden, da sich das Radionuklid vom Biomolekül, das Biomolekül von der Hülle oder die Hülle vom Nanopartikel lösen kann.⁸² Für *in vivo* Untersuchungen sind Nanopartikel mit einem radioaktiv markierten Kern besser geeignet (siehe nächstes Kapitel).

Nanopartikel	Radionuklid	Bildgebung	Anwendung
SPIO	¹¹¹ In	γ-Kamera	Brustkrebs in Mäusen ⁸³
SPIO	⁶⁴ Cu	PET/MRT	Tumorangiogenese in Tieren ^{84,85}
SPIO	¹²⁴ I	PET/MRT	Lymphknoten Bildgebung in Ratten ^{86,87}
SPIO	¹⁸ F	Trimodell MRT/ PET- CT/ optische Bildgebung	<i>In vivo</i> PET-CT Bildgebung in Tieren ⁸⁸
Perfluoro- carbon (PFC)	¹¹¹ In	γ-Kamera	Tumorangiogenese in Kaninchen ^{89,90}
Kohlenstoff- nanoröhrchen	¹¹⁵ I, ¹¹¹ In, ⁸⁶ Y	PET	Verteilung in Mäusen, ^{82,91-95} Targeting von Integrin αvβ3-positiven Tumoren in Mäusen, ⁹⁴ Multimodale Bildgebung und molekulare Therapie ^{89,96,97}
Quantumdots	⁶⁴ Cu	PET/NIRF	Tumorangiogenese PET/NIRF Bildgebung, ⁹⁸⁻¹⁰² Humane Prostatakrebszellen in lebenden Mäusen wachsend, ¹⁰³ Nanokristall HDL in Apolipoprotein E in Mäusen ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶
Quantumdots	¹⁸ F	PET/ optische Bildgebung	<i>In vivo</i> multimodale Bildgebung, ¹⁰⁷ Wächterknoten Bildgebung, ¹⁰⁸ <i>in vivo</i> Fluoreszenz-Bildgebung des Reticoendothelialen Systems ¹⁰⁹
Liposomen	^{99m} Tc, ¹¹¹ In, ⁶⁷ Ga	γ-Kamera	Detektion von Tumoren, Infektionen, Entzündungen und Lymphoscintigraphie ¹¹⁰⁻¹¹⁴
Liposomen	¹¹¹ In	SPECT	Klinische Bioverteilung und Bildgebung von Brust-, Kopf-, Nacken-, Glioma- und Lungenkarzinomen in C-26 tumortragenden BALB/cByJ Mäusen ^{110,115,116}
Liposomen	¹¹¹ In, ¹⁷⁷ Lu	SPECT	Tumor Targeting für C26 und HT29/luc Tiermodelle ¹¹⁷⁻¹²⁰
Liposomen	¹⁸ F	PET	<i>In vivo</i> Tracking ¹¹⁹
Liposomen	⁶⁴ Cu	PET	gezielter Transport und Bildgebung mit biokonjugierten ⁶⁴ Cu-BATPEG-Liposomen ¹²¹
Immuno- liposomen	¹¹¹ In	γ-Kamera	Tumorvisualisierung in murinen Lewis Lungen- karzinomen und humanen HT-29 Tumoren ¹²²⁻¹²⁴
Polymer	^{99m} Tc	γ-Kamera	Tumorangiogenese ¹²⁵
Dendrimere	⁷⁶ B	PET	PET Bildgebung der Angiogenese ¹²⁶

Tabelle 1.3: Auswahl an möglichen Anwendungen radioaktiv markierter Nanopartikeln in der Diagnostik (Tabelle adaptiert aus ³).

1. Einleitung

Nanopartikel mit radioaktiv markierter Hülle können auch zur Therapie verwendet werden. So werden in der Radioimmunotherapie dem Patienten markierte Antikörper i.v. mit dem Ziel appliziert, sie im Tumor anzureichern und diesen durch die ionisierende Strahlung zu schädigen. Leider ist der Expressionslevel des Targets auf den Tumorzellen meistens sehr gering, so dass es sehr lange dauert bis der Antikörper sich anreichert. Durch die geringe Effizienz werden hohe Strahlendosen notwendig und es kommt zu Strahlenschäden auch in den gesunden Zellen des Körpers. Man hofft durch die Kopplung von mehr als einem Antikörper an die Oberfläche eines Nanopartikels, die Bindungsaffinität zu erhöhen. Dabei scheinen funktionalisierte Liposomen besonders für den Transport radioaktiver Substanzen in das Zielorgan geeignet zu sein. Tabelle 1.4 gibt einige Beispiele aktueller Studien zum Thema wieder.

Nanopartikel	Radionuklid	Behandlung	Anwendung
Liposomen	¹³¹ I, ⁶⁷ Cu, ¹⁹⁸ Au	Radiotherapie	interne Bestrahlung, ¹²⁷⁻¹³⁰ Nacktmäuse, die einen humanen Leberkrebs tragen, ¹³¹ "pre-targeted" Immunotherapie, ¹³² Brustkrebs ^{114,127,129,133,134}
Liposomen	⁹⁰ Y	Radiotherapie	interne Bestrahlung ^{108,135-137}
Liposomen	¹⁸⁸ Re	Radiotherapie	Eierstockkrebs, ¹³⁴ Kolonkarzinom in Mäusen, ^{138,139} interne Bestrahlung ¹³⁹⁻¹⁴⁶
Liposomen	¹¹¹ In, ¹⁸⁶ Re	Radiotherapie	Therapeutische Effizienzstudien von ¹¹¹ In/ ¹⁸⁶ Re-Liposomen in C26 und HT-29-tragenden Tiermodellen ^{138,147,148}
Liposomen	²²⁵ Ac	Radiotherapie	Therapeutikum für mikrometastasierende Karzinome ¹⁴⁹⁻¹⁵²
Liposomen	¹¹¹ In, ¹⁸⁸ Re	Radiochemotherapie	Bildgebung, Bioverteilung, Pharmakokinetik, therapeutische Effizienz und dosimetrische Studien an ¹¹¹ In/ ¹⁸⁸ Re-VNB/DXR-Liposomen in C26 und HT-29 Tumor/Ascitis-tragenden Tiermodellen, Ratten Hirntumor Modelle ^{139,145,146,148,153-155}
Immunoliposomen	⁹⁰ Y	Radiotherapie	Therapie mit "nanotargeted" Therapeutika aus ⁹⁰ Y-DTPA-Liposomen-IA (Integrin Antagonist) oder ⁹⁰ Y-DTPA-Liposomen-mAB ¹³⁷
Immunoliposomen	²²⁵ Ac	Radiotherapie	Mikrometastasierende Karzinome ¹⁴⁹⁻¹⁵²
Streptavidin	¹¹¹ In	Radiotherapie	¹¹¹ In-markierte 3-Komponenten Streptavidin (¹¹¹ In-MORF/tat/trastuzmab) Nanopartikel für Auger Elektronen induzierte Antisense-medierte Zytotoxizität in Tumorzellen ¹⁵⁶
Dendrimer	¹⁹⁸ Au	Radiotherapie	Melanoma Mausmodelle ¹⁵⁷

Tabelle 1.4: Auswahl an möglichen Anwendungen radioaktiv markierter Nanopartikeln in der Therapie (Tabelle adaptiert aus ³).

Der Vorteil von Nanopartikeln mit radioaktiv markierter Hülle im Vergleich zu denen, die zum Wirkstofftransport verwendet werden, besteht darin, dass sie weder extravasieren müssen, noch der Wirkstoff in der Zelle kontrolliert abgegeben werden muss, damit die Therapie effektiv ist. Allerdings ist auch bei der Radioimmunotherapie unter Verwendung von Nanopartikeln, die geringe Targeting-Effizienz immer noch ein großes Problem.⁸²

Neben dem Einsatz in Diagnose und Therapie können radioaktiv markierte Nanopartikel auch zur näheren Charakterisierung ihres Verhaltens (Aufnahme in Organe und Gewebe, Metabolisierung, Speicherung oder Exkretion) *in vivo* genutzt werden. Solche nanotoxikologischen Daten sind Grundlage jeder geplanten Anwendung beim Menschen. Viele dieser Fragen können nur durch eine genaue Quantifizierung der Vorgänge *in vivo* beantwortet werden. Dafür wäre eine radioaktive Markierung des Nanopartikels besonders geeignet, weil andere Methoden oft nicht sensitiv genug sind.

1.3.2 Markierung des Kerns

Grundsätzlich ist es möglich, die Konzentration eines für den Nanopartikel spezifischen Elements in Blut oder Organhomogenisat mit Atom-Absorptions-Spektroskopie-Methoden (AAS) oder Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) nachzuweisen. Bei AuNP und QDs ist dies gut möglich, da Au und Cd im Körper nur in kleinen Mengen vorkommen. Bei der Bestimmung des Eisens aus SPIOs hat man aber das Problem, dass Eisen ein natürlich vorkommendes Spurenelement ist und deshalb große Mengen an physiologischem Eisen als Hintergrund vorhanden sind. Trotz der niedrigen Nachweisgrenze von 10 µg/L für die AAS ist es schwierig, die zusätzliche kleine Menge aus applizierten SPIOs zu erfassen. Jain *et al.* konnten beispielsweise 6 h nach SPIO-Gabe nur in der Leber einen signifikanten Anstieg der Eisenkonzentration detektieren, als sie die Gewebe mit ICP-MS untersuchten.¹⁵⁸

Des Weiteren wäre für Eisen ein histochemischer Nachweis mit der Berliner-Blau-Färbung möglich, der durch eine Silbervariante nochmals empfindlicher gemacht werden kann.¹⁵⁹ Allerdings ist es nicht möglich, diesen Nachweis zu quantifizieren. Gleiches gilt für die Fluoreszenz der QDs im Gewebe oder die Aufnahmen im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) nach AuNP- oder SPIO-Gabe.

Eine Quantifizierung des Eisens aus SPIOs mittels MRT wird dadurch erschwert, dass die Relaxivitäten *in vivo* stark von Faktoren wie dem Anstieg des hydrodynamischen Durchmessers durch Agglomeration oder Opsonierung und / oder der Clusterung in Vesikeln der Zellen nach der Aufnahme beeinflusst wird. Diese Faktoren lassen sich schwer abschätzen.¹⁶⁰

Aus diesen Gründen ist eine radioaktive Markierung der Nanopartikel wünschenswert, um auf diese Weise eine genaue Quantifizierung zu ermöglichen. Die zuvor beschriebenen Markierungen der Hülle sind weniger gut geeignet, da es hier zu Modifizierungen *in vivo* kommen kann.⁸²

Für die radioaktive Markierung sind harte Gammastrahler wie ⁵⁹Fe besonders interessant, weil ihre Aktivität in einem Ganzkörperzähler gemessen und so die Retention, bzw. Exkretion am lebenden Versuchstier verfolgt werden kann. Dadurch ist im Fall von Eisen eine pharmakokinetische Beschreibung der Veränderungen des Eisenpools, z.B. durch den Abbau der SPIOs im Körper, möglich. Im Rahmen des Zulassungsverfahrens von Medikamenten wird grundsätzlich eine quantitative Beschreibung der Bioverteilung der betreffenden Substanz gefordert, was auch heute meist nur mit radioaktiv markierten Substanzen möglich ist. So wurden auch die zugelassenen MRT-Kontrastmittel wie Resovist[®] radioaktiv markiert und *in vivo* untersucht, wobei diese Studien meist von Pharmafirmen durchgeführt wurden und Details nicht publiziert sind.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Nanopartikel radioaktiv zu markieren. Eine besteht darin, bereits synthetisierte Nanopartikel in einem Reaktor einer Neutronenaktivierung zu unterziehen. Dieses Verfahren konnte bereits bei ¹⁹⁸AuNP erfolgreich durchgeführt werden, was auf Grund der einfachen Reaktion $^{197}\text{Au}(n,\gamma)^{198}\text{Au}$ effizient abläuft.^{161,162} Im Fall von ⁵⁹Fe-SPIOs würde man aber von einer natürlichen Isotopenverteilung mit 91,72 % ⁵⁶Fe, 2,2 % ⁵⁷Fe und nur 0,28 % ⁵⁸Fe ausgehen. Deshalb ist die Ausbeute der Reaktion $^{58}\text{Fe}(n,\gamma)^{59}\text{Fe}$ an ⁵⁹Fe sehr gering und es sind sehr lange Bestrahlungszeiten notwendig, bei denen hohe Temperaturen von über 400 °C nicht zu vermeiden sind. Eine Hitzeschädigung der organischen Struktur, besonders der empfindlichen monodispersen, ölsäurestabilisierten SPIOs, kann nicht ausgeschlossen werden. Trotzdem wurde dieses Verfahren schon bei polydispersen kommerziell erhältlichen SPIOs genutzt, um deren Verteilung im Körper zu untersuchen.^{163,164} Details zur notwendigen Qualitätskontrolle sind allerdings in entsprechenden Publikationen nicht beschrieben. Eine bessere Strategie im Falle von

SPIOs wäre, ^{58}Fe -angereichertes Ausgangsmaterial zu verwenden, was die Ausbeute erhöhen und die Bestrahlungszeiten deutlich reduzieren würde.

Bei SPIOs, die durch die Co-Präzipitationsmethode hergestellt werden, können einfach radioaktive ^{59}Fe -Salze, die leicht aus den kommerziellen Formen wie $^{59}\text{FeCl}_3$ herstellbar sind, für die Synthese verwendet werden.¹⁶⁵ Die so markierten SPIOs wurden in der Vergangenheit bereits verwendet, um die Bioverteilung in Abhängigkeit von der Größe, Ladung und der injizierten Dosis zu untersuchen.¹⁶⁶⁻¹⁶⁹ Sie wurden auch dazu genutzt, erste Erkenntnisse über den Abbau der SPIOs zu erlangen.^{165,170-173} Diese Methode kann jedoch nicht auf die Hochtemperaturmethode übertragen werden, da es sich hier bei den Edukten meist um komplexe Eisenverbindungen handelt. Precursor wie Eisenpentacarbonyl sind weder ^{59}Fe -markiert kommerziell erhältlich, noch können sie im normalen Laborbetrieb im kleinen Maßstab synthetisiert werden. Außerdem können die SPIO Synthesen nicht auf eine beliebig kleine Ansatzgröße herunterskaliert werden, was zur Folge hat, dass sehr hohe Aktivitäten bei der Synthese eingesetzt werden müssen, um eine angemessene spezifische Aktivität zu erhalten. Zudem stellt das Erhitzen radioaktiver Verbindungen auf über 300°C in einer komplexen Glasapparatur unter Schutzgas ein Sicherheitsrisiko für den Experimentator dar. Ein weiteres Problem ist die relativ geringe Halbwertszeit ($t_{1/2} = 45$ d) von ^{59}Fe . Eine hergestellte Charge kann z.B. für Tierversuche nur in einem kleinen Zeitfenster verwendet werden, danach müsste die Synthese wiederholt werden. Für QDs wurde die Methode allerdings schon erfolgreich zur Markierung mit $^{125\text{m}}\text{Te}$ verwendet.¹⁷⁴

1.4 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine einfache Methode zu entwickeln, mit der superparamagnetische eisenoxidbasierte Nanopartikel (SPIOs) radioaktiv markiert werden können. Diese radioaktiven SPIOs sollten dazu verwendet werden, in Tiermodellen grundlegende pharmakokinetische Parameter wie Bluthalbwertszeit, Bioverteilung, Metabolismus und Exkretion zu untersuchen, die das Verhalten von SPIOs *in vivo* charakterisieren. Auf dem Weg hin zu spezifischen Kontrastmitteln sollten die radioaktiven SPIOs im Weiteren dazu verwendet werden, biochemische Stoffwechselwege zu verfolgen und zu quantifizieren, sowie eine mögliche Funktionalisierung mit Biomolekülen zu untersuchen.

2. Ergebnisse und Diskussion

In dieser Arbeit sollten radioaktiv markierte SPIOs hergestellt werden. Einleitend ging es um die grundlegende Frage, welche Partikelsynthese für eine geplante Radiomarkierung geeignet ist. In der Literatur sind verschiedene Synthesemethoden für SPIOs beschrieben, die zu sehr unterschiedlichen Produkten führen können und die unterschiedlich gut geeignet für den Einbau radiomarkierter Vorstufen sind.

2.1 Synthese von superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln

Für eine Radiosynthese ist grundsätzlich eine miniaturisierbare und apparativ einfache Synthesemöglichkeit notwendig. Von den vier in der Einleitung beschriebenen Synthesemethoden scheinen die hydrothermale Synthese und die Präparation in Mizellen auf Grund des hohen technischen Aufwands wenig geeignet zu sein. Im Folgenden wurde sich daher nur mit der Co-Präzipitationsmethode und der organometallischen Hochtemperatursynthese beschäftigt.

Beide Synthesen wurden durchgeführt und die erhaltenen SPIOs im TEM verglichen. Die aus der Co-Präzipitation mit Stärke gewonnenen Partikel lagen sehr polydispers vor (siehe Abbildung 2.1A), auch durch Zentrifugation konnten die Partikel nicht in einheitlicherer Größe erhalten werden. Bei der Thermolyse von Eisenpentacarbonyl in Dioctylether wurde ein wesentlich gleichmäßigeres Partikelbild erhalten (siehe Abbildung 2.1B).

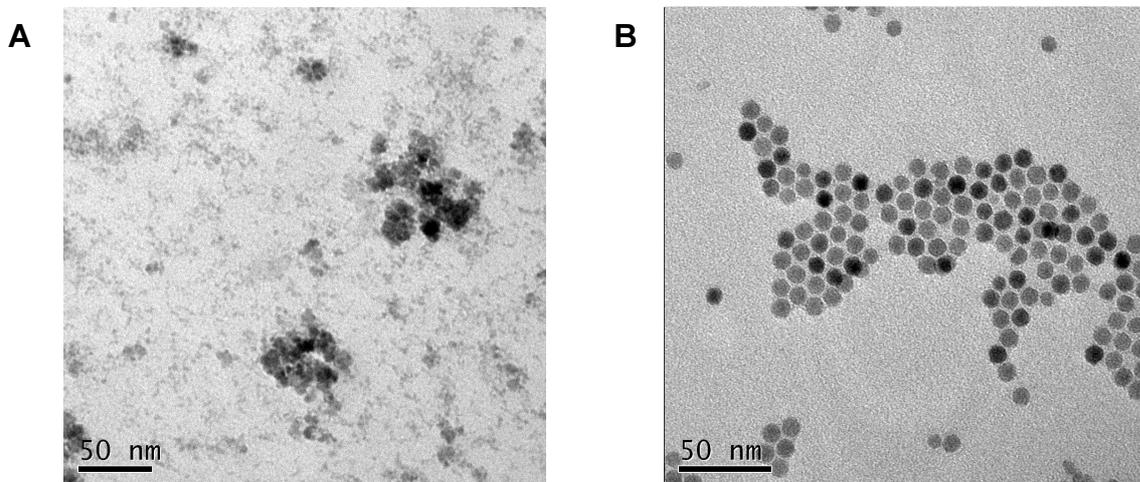


Abbildung 2.1: Transmissionselektronenmikroskop-Bilder der synthetisierten Partikel **A)** Die Co-Präzipitationsmethode liefert polydisperse Fe-Stärke-Nanopartikel. **B)** Als Produkt der Hochtemperatursynthese erhält man monodisperse, ölsäurestabilisierte SPIOs.

Auch wenn man die Co-Präzipitationsmethode sicher wesentlich optimieren kann, so bleiben doch grundlegende Mängel. Die hergestellten Nanopartikel sind relativ polydispers und verfügen über eine geringe Kristallinität. Gerade für spezifische *in vivo* Fragestellungen wäre dieses Material grundsätzlich problematisch, da man die zu untersuchende Wirkung eventuell nur einem undefinierten Teil der Teilchenpopulation zuschreiben kann. Auch für die Herstellung eines spezifischen Kontrastmittels durch die Kopplung eines Biomoleküls an das SPIO ist es sehr wichtig, dass die verwendeten SPIOs einer, aber auch verschiedener Chargen, immer die gleiche Morphologie haben. Anderenfalls kann nicht gewährleistet werden, dass die Kopplung und die erhaltenen MRT-Signale reproduzierbar sind. Des Weiteren ist es für ein gutes MRT-Signal wichtig, dass die SPIOs als Einkristalle vorliegen.

Beide Ziele scheinen am Besten durch die Synthese in einem hochsiedenden Lösungsmittel erreichbar.

Allerdings sind die aus dieser Synthese erhaltenen SPIOs ölsäurestabilisiert. Dabei bindet die Ölsäure über die Säurefunktion an die Partikeloberfläche (siehe Abbildung 2.2). Die langen hydrophoben Schwänze führen zu einer sterischen Abschirmung der SPIOs und verhindern dadurch eine Aggregation. Um die SPIOs wasserlöslich zu machen und sie somit *in vivo* einsetzen zu können, muss die Oberfläche der Nanopartikel nach der Synthese in einem zweiten Schritt modifiziert werden.

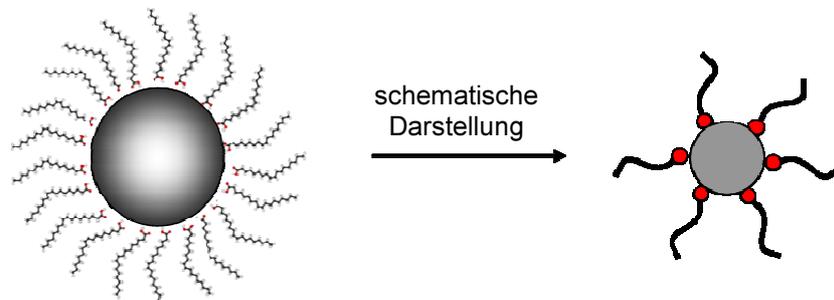


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines ölsäurestabilisierten SPIOs

2.2 Oberflächenmodifikationen für wasserlösliche SPIOs

Für diese Arbeit wurden drei verschiedene Oberflächenmodifikationen verwendet (siehe Abbildung 2.3).

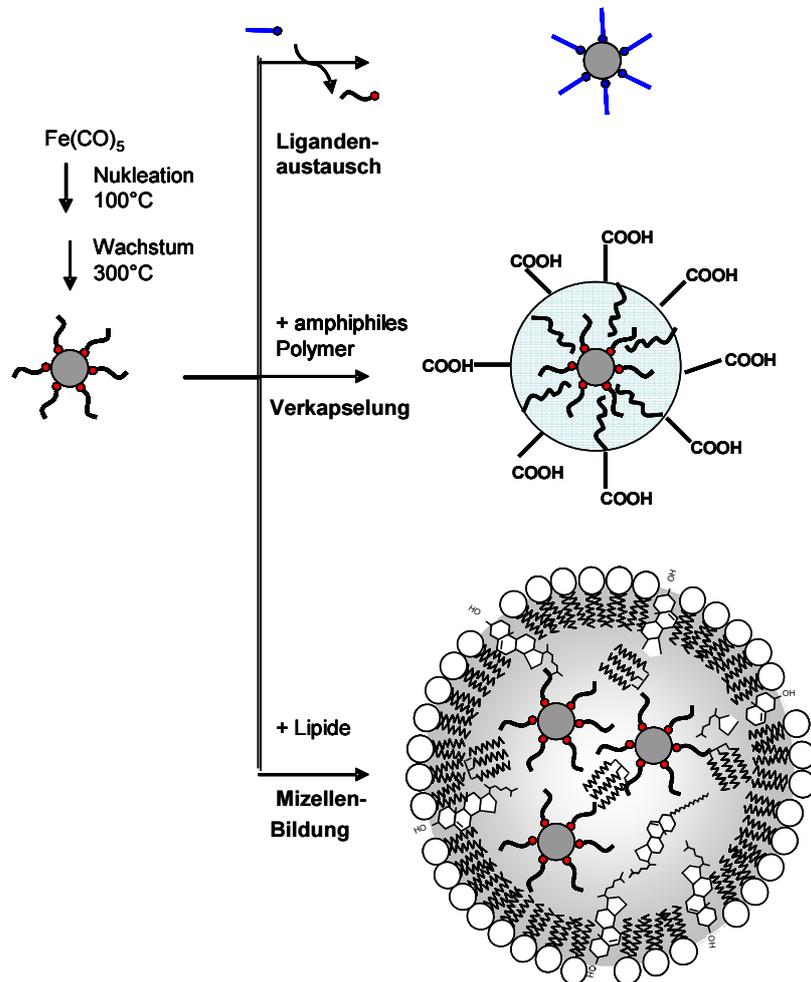


Abbildung 2.3: Syntheschema der SPIOs mit verschiedenen Verpackungen, die die Partikel wasserlöslich machen.

Eine Möglichkeit der Oberflächenmodifikation stellt der Ligandenaustausch dar. Hierbei wird die Ölsäure durch einen Liganden ersetzt, der auf der einen Seite das SPIO wasserlöslich macht und auf der anderen Seite über eine funktionelle Gruppe verfügt, die in der Lage ist mit der Eisenoxidoberfläche zu interagieren. Damit der Ligand die Ölsäure verdrängen kann, ist es wünschenswert, dass die Interaktion des Liganden mit der Oberfläche stärker ist als die der Ölsäure. Deshalb wurde eine phosphorylierte Polyethylenglykolkette (PEG) (MW = 1100 Da) verwendet, bei der eine große Wechselwirkung zwischen Phosphor und Eisen möglich ist. Tromsdorf *et al.* konnten zeigen, dass dies die optimale Länge der PEG-Kette ist und dass bei diesen

Partikeln fast keine Opsonierung, d.h. Anlagerung von Plasmaproteinen, auftritt.³⁵ Im weiteren Verlauf der Arbeit werden diese Partikel als PEGylierte SPIOs bezeichnet. Eine weitere Möglichkeit, die SPIOs wasserlöslich zu machen, besteht darin, sie mit einem amphiphilen Polymer zu verkapseln. Dazu wurde das kommerziell erhältliche, gut charakterisierte und in der Literatur mehrfach beschriebene Polymer Poly(Maleinsäureanhydrid-*alt*-1-octadecen) (siehe Abbildung 2.4) verwendet.^{175,176} Hierbei interagieren die lipophilen Reste des Polymers mit der Ölsäure auf der Partikeloberfläche, während die negative Ladung der Carbonsäure, die bei der Reaktion des Anhydrids mit Wasser entsteht, die Partikel durch Abstoßung vor Agglomeration schützt und wasserlöslich macht. Im Folgenden werden diese Partikel als polymerumhüllte SPIOs bezeichnet. Diese Verpackung kann auch für QDs verwendet werden, die lipophile Stabilisatormoleküle auf der Oberfläche tragen.

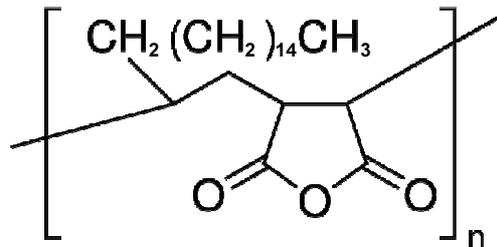


Abbildung 2.4: Strukturformel von Poly(Maleinsäureanhydrid-*alt*-1-octadecen)

Eine weitere Variante, die in dieser Arbeit verwendet wurde, um SPIOs ins Wässrige zu überführen, ist das Einbetten in ein rekombinantes Lipoprotein. Lipoproteine sind Mizellen aus Lipiden und Apolipoproteinen, die im Inneren lipophil sind und dazu dienen, wasserunlösliche Triglyceride und Cholesterinester im Körper zu transportieren. Man unterscheidet sie nach ihrer Größe und Dichte in mehrere Klassen.¹⁷⁷ Die 5 wichtigsten finden sich in Tabelle 2.1. Alle Lipoproteine tragen spezifische Apolipoproteine auf der Oberfläche und sind nach außen hin polar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Lipide von Chylomikronen und HDL verwendet, die aus humanen Blutproben gewonnen wurden. Bei der Rekonstitution dieser Mizellen können lipophile Nanopartikel (SPIOs oder QDs) in den Mizellen-Kern eingebettet werden. Wenn die rekombinanten Mizellen ins Blut gelangen, heften sich die entsprechenden Apolipoproteine an die Oberfläche und bilden je nach verwendeten Lipiden HDL-artige oder chylomikronenartige Lipoproteine. Diese werden, wenn mit Nanopartikeln beladen, auch als „Nanosomen“ bezeichnet.³⁶ Durch

diese Verpackung werden die Nanopartikel nicht nur wasserlöslich, sondern können auch als trojanisches Pferd verwendet werden, um die Lipoproteinstoffwechselwege im Körper zu verfolgen.^{36,178} Als Bezeichnungen werden im weiteren Verlauf „rekombinante TRL“, bzw. „rekombinante HDL“ verwendet.

Lipoproteinklasse	Hauptlipide	Apolipoproteine	Dichte [g/cm ³]	Partikeldurchmesser [nm]
Chylomikronen (auch als triglyceridreiche Lipoproteine (TRL) bezeichnet) und Reste	Triglyceride aus der Nahrung	A-I, A-II, B-48, C-I, C-II, C-III, E	< 0,95	80 - 500
Very Low Density-Lipoproteine (VLDL)	Endogene Triglyceride, Cholesterinester, Cholesterin	B-100, C-I, C-II, C-III, E	0,95 - 1,006	30 - 80
Intermediate Density-Lipoproteine (IDL)	Cholesterinester, Cholesterin, Triglyceride	B-100, C-III, E	1,006 - 1,019	25 - 35
Low Density-Lipoproteine (LDL)	Cholesterinester, Cholesterin, Triglyceride	B-100	1,019 - 1,063	18 - 28
High Density-Lipoproteine (HDL)	Cholesterinester, Cholesterin	A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, D, E	1,063-1,210	5 - 12

Tabelle 2.1: Merkmale der wichtigsten Lipoproteinklassen nach ¹⁷⁹.

2.3 Radioaktive Markierung von ölsäurestabilisierten SPIOs

2.3.1 Neutronenaktivierung von SPIOs

Wie in der Einleitung bereits diskutiert wurde, sind für eine Quantifizierung *in vivo* radioaktive SPIOs von Vorteil.

Da die SPIO-Synthesen nicht auf eine beliebig kleine Größe herunterskaliert werden können, müssten sehr hohe Aktivitäten eingesetzt werden, um eine angemessene spezifische Aktivität zu erhalten. Wünschenswert wäre daher eine relativ einfache Synthese, die die Radioaktivität erst in das bereits fertige Nanopartikel einführt. Dazu wäre die bereits beschriebene Neutronenaktivierung prinzipiell geeignet.

In dieser Arbeit wurde ein Versuch der Bestrahlung von monodispersen, ölsäurestabilisierten SPIOs im Helmholtz-Zentrum Berlin (HZB), ehemaliges Hahn-Meitner-Institut, durchgeführt. Es resultierte eine undefinierbare Substanz, die nicht

mehr in Chloroform löslich war. Besser geeignet wäre die Verwendung von SPIOs mit angereichertem stabilem ^{58}Fe im Ausgangsprodukt ($\text{Fe}(\text{CO})_5$) der SPIO-Synthese. Hierbei ergeben sich aber die gleichen Probleme, die in der Einleitung schon für die Verwendung von ^{59}Fe diskutiert wurden (schwierige Synthese im Labormaßstab, Problem der Miniaturisierung).

2.3.2 ^{59}Fe -Austauschmarkierung von SPIOs und Qualitätskontrollen

In der vorliegenden Arbeit wurde eine weitere postsynthetische Möglichkeit der Markierung verfolgt: die „Austauschmarkierung“. Dabei wurden ölsäurestabilisierte, monodisperse SPIOs in Chloroform mit wasserfreiem $^{59}\text{FeCl}_3$ inkubiert.

Es zeigte sich, dass es bei diesem einfachen Versuchsaufbau zu einem raschen und effizienten Einbau des radioaktiven Eisens kommt.

Eine mögliche Erklärung für diese Reaktion ist, dass Ölsäure, die auf der SPIO-Oberfläche locker gebunden ist und mit der umgebenden Lösung im Gleichgewicht steht, einen Eisenoleatkomplex mit den ^{59}Fe -Atomen bildet. Alle in dieser Arbeit verwendeten Synthesen verlaufen über eine Eisenoleat-Zwischenstufe, deren Zerfall die Nanokristalle wachsen lässt. Dies findet meist in unpolaren Lösungsmitteln bei ungefähr 300 °C statt. Trotzdem sollte dieser Vorgang auch in geringerem Maße bei Raumtemperatur (RT) möglich sein, was zu einer radioaktiven Markierung mit der Tracerdosis führen würde (siehe Abbildung 2.5).

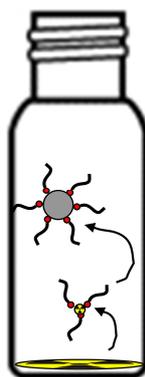


Abbildung 2.5: Schema der radioaktiven Markierung: Ölsäure bildet ^{59}Fe -Oleat und transportiert so das Isotop zum Partikel, wo es inkorporiert wird.

Um diese Reaktion näher zu beleuchten, wurden die Rahmenbedingungen variiert. Bei der Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel zeigte sich, dass die Inkorporation in verschiedenen organischen, unpolaren Lösungsmitteln stattfindet. Hexan und

Chloroform scheinen gleich gut geeignet für die Markierung, wohingegen die Reaktion in Toluol langsamer und in einem geringeren Ausmaß erfolgt (siehe Abbildung 2.6A). Hierbei sollte aber bedacht werden, das Toluol die höchste Siedetemperatur der drei verwendeten Lösungsmittel hat. Die höhere Einbauausbeute bei den Chloroform- und Hexan-Ansätzen könnte also auch daher rühren, dass hier ein Teil des Lösungsmittels verdampft ist und sich daher die Konzentration der SPIOs erhöht hat. Die Größe des Kerns scheint keinen Einfluss auf die Markierungsgeschwindigkeit zu haben, was wohl daran liegt, dass der Prozess so schnell abläuft, dass hier kleine Unterschiede nicht mehr detektiert werden können (siehe Abbildung 2.6B). Auch die Zugabe von Ölsäure, bzw. Natriumoleat hatte nur eine kleine Steigerung der Einbaurrate zur Folge (siehe Abbildung 2.6C). Dies ist vermutlich dadurch bedingt, dass sich die Ölsäurehülle bereits im Gleichgewicht mit der umgebenden Lösung befindet und so die zusätzliche Ölsäure nur einen geringen Einfluss hat.

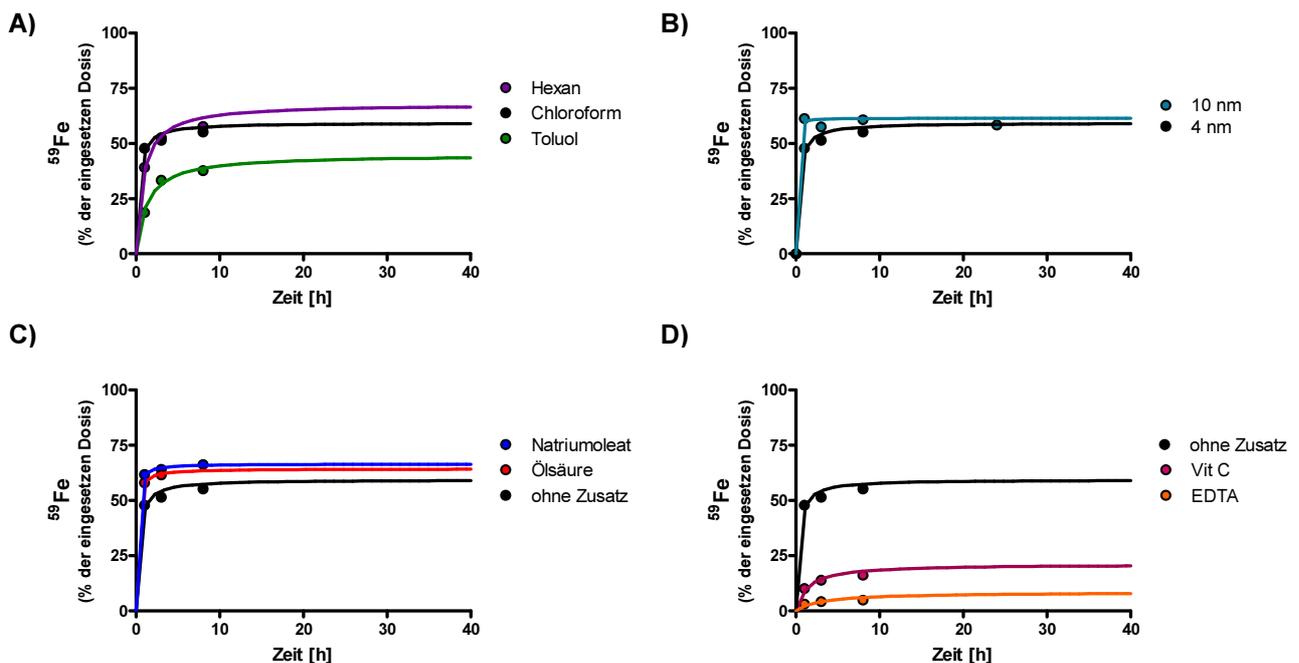


Abbildung 2.6: Einfluss verschiedener Faktoren auf die Inkorporation von ^{59}Fe **A)** Ein Wechsel des Lösungsmittels resultiert nicht in großen Unterschieden. Chloroform und Hexan haben eine ähnliche Kinetik, während der Einbau in Toluol geringer ist. **B)** Die Partikelgröße hat keinen Einfluss auf die Kinetik des Einbaus. **C)** Der Zusatz von Ölsäure oder Natriumoleat beschleunigt die Inkorporation nicht. **D)** Das Reduktionsmittel Vitamin C oder der Chelator Ethylendiamintetraacetat führen dazu, dass der Einbau fast vollständig unterbunden wird.

Große Effekte auf das Einbauverhalten hat es allerdings, wenn man Vitamin C oder Ethylendiamintetraacetat (EDTA) zur Lösung gibt. Vitamin C wirkt als Reduktionsmittel

und reduziert Fe^{3+} zu Fe^{2+} , zusätzlich wirkt es auch als Chelator. Der Zusatz des starken Chelators EDTA verhindert den Einbau fast vollständig (siehe Abbildung 2.6D). Während die Veränderungen der Randbedingungen bei gleichbleibender Partikel- und ^{59}Fe -Menge nur einen geringen Einfluss auf die Einbaueffizienz haben, hängt diese jedoch sehr stark von dem Verhältnis an eingesetzten Partikeln zu ^{59}Fe ab. Je nach Zusammensetzung des Ansatzes kann die Ausbeute an inkorporiertem Eisen zwischen 10 % und 70 % schwanken.

Welchen Einfluss die eingesetzte Partikelmenge hat, wird daraus ersichtlich, dass sich bei gleichbleibender eingesetzter Menge an ^{59}Fe der Anteil an eingebauter Radioaktivität von 7,8% auf 16,2% erhöht, wenn man die eingesetzte Trockenmasse SPIOs von 2,5 mg auf 5 mg verdoppelt.

Ähnliches findet man, wenn man die Menge an SPIOs konstant hält und die Menge an zugesetztem Eisen erhöht. Hierzu wurden zu einer Tracermenge ^{59}Fe kein, bzw. die 100-, 1000- und 10000-fache Menge an ^{56}Fe gegeben und alle Proben mit der gleichen Menge an SPIOs inkubiert. Die Menge an zugesetztem Eisen entsprach damit jeweils ca. 0,0004%, 0,04%, 0,4%, bzw. 4% des Eisens aus den SPIOs.

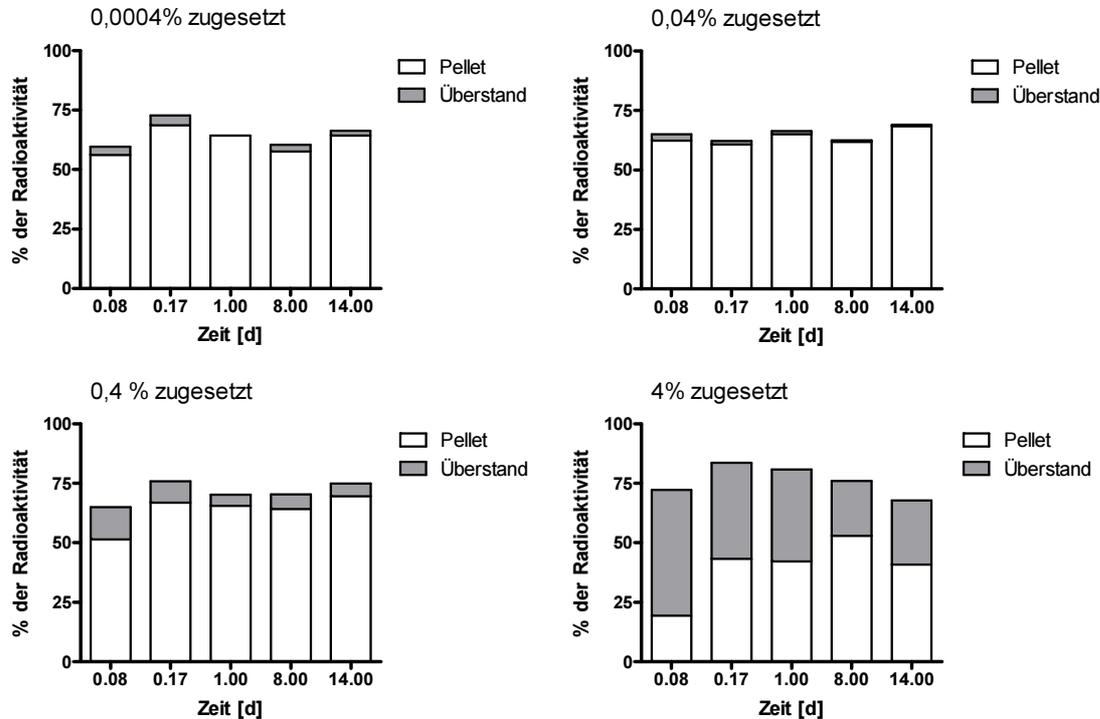


Abbildung 2.7: Zeitabhängige Verteilung des ^{59}Fe zwischen Pellet und Überstand nach dem Fällen der SPIOs mit Ethanol. Einer gleichbleibenden Menge an SPIOs wurden unterschiedliche Mengen an freiem Eisen zugesetzt. Die %-Angaben beziehen sich auf die zugesetzte Menge an freiem Eisen in Bezug auf die Eisenmenge in den SPIOs. Erst ab einer Zugabe von 4 % verändert sich die Verteilung und es wird wesentlich weniger freies Eisen in die SPIOs eingebaut.

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und die SPIOs mit Ethanol gefällt. Zwischen 0,0004% und 0,04% lässt sich kein Unterschied in der Inkorporation erkennen. 70 % der Aktivität können mit den SPIOs gefällt werden, während ca. 5 % als freies Eisen im Überstand verbleiben. Die noch fehlenden 25 % der Aktivität interagieren wahrscheinlich mit der Glaswand des Reaktionsgefäßes und bleiben dort zurück. Auch ein Anstieg der zugesetzten Masse auf 0,4 % der Eisenmenge der SPIOs hat nur eine geringe Erhöhung des ungebundenen ^{59}Fe im Überstand auf 10 % zur Folge. Allerdings zeigt sich deutlich, dass bei einer Erhöhung des zugesetzten Eisens auf 4 % der SPIO Eisenmenge, die Inkorporation langsamer und weniger vollständig verläuft. Auch nach 14 Tagen befindet sich noch ein großer Anteil des ^{59}Fe frei im Überstand (siehe Abbildung 2.7). Darüber hinaus kommt es zu einer makroskopischen und mikroskopischen Veränderung der Lösung. Es setzt sich ein brauner Feststoff ab, der auch im Elektronenmikroskop als nicht kristalliner Anteil zu erkennen ist und bei dem es sich wahrscheinlich um bulkartiges Eisenoxid handelt.

Daraus lässt sich schließen, dass nur eine begrenzte Menge an freiem Eisen in die SPIOs inkorporiert werden kann.

Zur ersten Überprüfung der Stabilität der Markierung wurden die SPIOs nach der Inkubation dreimal mit destilliertem Wasser ausgeschüttelt, um freies Eisen zu entfernen. Dabei verblieben mehr als 90 % der Radioaktivität in der organischen Phase. Auch die Verwendung 1M EDTA-Lösung, als effizienter Eisenchelator, konnte nur weitere 7,5% der Radioaktivität der organischen Phase entziehen. Der saure pH der EDTA-Lösung hatte allerdings bereits beim zweiten Ausschütteln die Denaturierung der SPIOs zur Folge. Wenn Chloroform ohne SPIOs mit ^{59}Fe inkubiert wurde, fand sich nach dreimaligem Ausschütteln über 70% der Radioaktivität in der wässrigen Phase, was darauf hindeutet, dass das radioaktive Eisen in die SPIOs inkorporiert wurde. Ein weiteres Indiz hierfür ist, dass bei einer Fällung der SPIOs mittels Ethanol und anschließender Zentrifugation über 95% der Radioaktivität im Pellet zu finden sind, wobei ein Ausfällen der freien Eisenionen mittels Ethanol nicht möglich ist.

Um weitere Tests zur Stabilität der Markierung durchzuführen, wurden SPIOs verwendet, die nach der Markierung mit ^{59}Fe mit Hilfe eines amphiphilen Polymers oder durch den Einbau in rekombinante TRL wasserlöslich gemacht wurden. Zunächst wurden die SPIOs mittels einer Zentrifugeneinheit (5 kDa, 2400 g) gefiltert, in destilliertem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert (siehe Abbildung 2.8).

Hierbei zeigte sich, dass nur ein kleiner Anteil der Radioaktivität als freies Eisen vorlag, der mit dieser Methode gut abgetrennt werden konnte. Es kam nicht zu einem „Ausbluten“ der radioaktiven Markierung. Gleiches konnte man auch bei der Dialyse beobachten. Nach 24 h fanden sich 2,2 % des ^{59}Fe im Dialysepuffer (phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH=7,5), auch bei erneutem Pufferwechsel fanden sich an Tag 2 und 3 jeweils über 99 % der Radioaktivität im Dialyseschlauch.

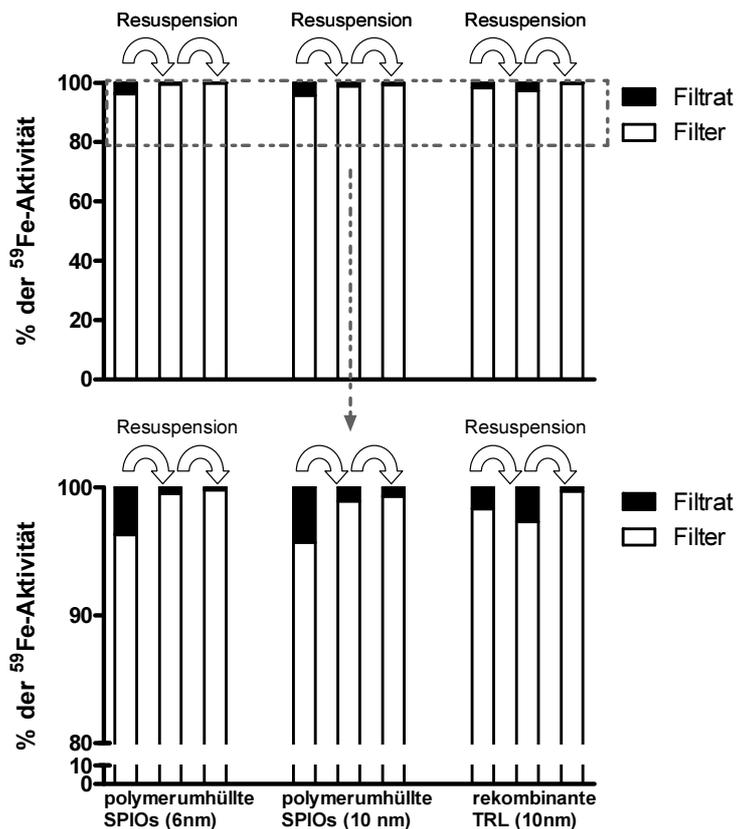


Abbildung 2.8: Filterung einer SPIO Probe mittels eines 5 kDa-Zentrifugationsfilters. Freies Eisen findet sich im Filtrat, während ^{59}Fe , das an die SPIOs gebunden ist, vom Filter zurück gehalten wird.

Eine vorher gefilterte Probe polymerumhüllter SPIOs wurde einer Größenausschlusschromatographie (SEC) unterzogen. Das UV-Profil wurde bei 280 nm aufgezeichnet und der Eisengehalt, so wie die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen gemessen (siehe Abbildung 2.9).

Es zeigt sich, dass alle drei Messmethoden ein ähnliches Elutionsprofil liefern. Mit einem Peak bei Minute 15, in dem der kleine Anteil an agglomerierten SPIOs eluiert wird und einem Hauptpeak bei Minute 23 – 25, in dem die monodispers verpackten SPIOs aus der Säule gespült werden. Der Peak für das ungebundene Eisen wäre bei Minute 40 - 42 zu erwarten.

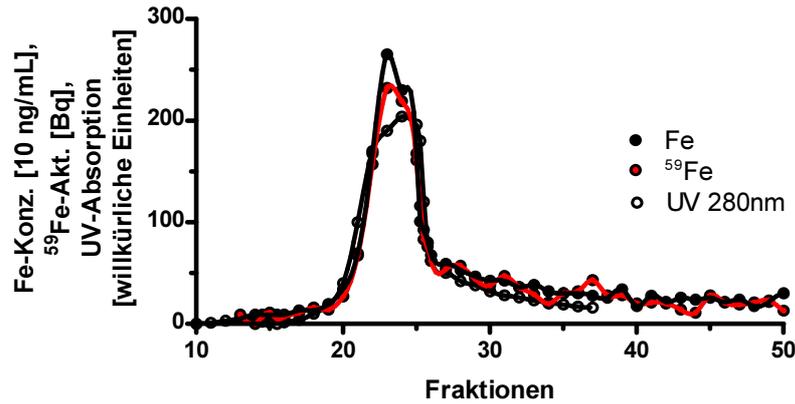


Abbildung 2.9: Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie (SEC) einer zentrifugierten SPIO-Probe, in den Fraktionen wurde die UV-Absorption, der Eisengehalt und die ⁵⁹Fe-Aktivität bestimmt. Es wird ersichtlich, dass Radioaktivität und SPIOs co-lokalisiert sind.

Um zu beweisen, dass die Ölsäure und das unpolare Lösungsmittel für den Einbau unerlässlich sind, wurden die SPIOs mit einem amphiphilen Polymer verpackt und dadurch wasserlöslich gemacht. Als diese SPIOs mit einer Tracerdosis ⁵⁹Fe inkubiert wurden, konnte keine stabile Markierung der Partikel erreicht werden. Die Probe wurde in einem Zentrifugationsfilter (5 kDa, 2400 g) eingeeengt und dann erneut in PBS aufgenommen und nochmals zentrifugiert. Die Radioaktivität fand sich fast komplett im Filtrat, was darauf hindeutet, dass es sich ausschließlich um freies Eisen handelt (siehe Abbildung 2.10).

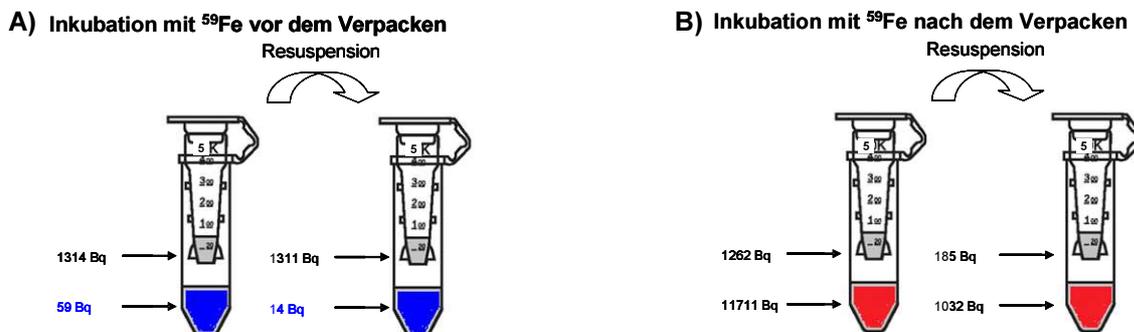


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der Filterversuche mittels einer Zentrifuge **A)** Wenn die SPIOs vor dem Verpacken mit ⁵⁹Fe inkubiert werden, ist das Eisen fest am SPIO gebunden und findet sich im Filter. **B)** Wird erst nach dem Verpacken mit dem radioaktiven Fe inkubiert, lässt sich die Radioaktivität „herauswaschen“.

Im Umkehrschluss erklärt dieser Befund auch, warum es nicht zu einem Ausbluten der Partikel kommt. Da es zu einer spontanen Inkorporation des ⁵⁹Fe kommt, muss davon ausgegangen werden, dass die Eisenatome des SPIOs sich in einem Gleichgewicht mit der umgebenden Flüssigkeit befinden und deshalb auch wieder aus dem Partikel heraustransportiert werden könnten. Die Umhüllung des SPIOs scheint diesen

Vorgang zu unterbinden und verhindert sowohl den Transport in als auch aus dem SPIO.

Auch die SEC zeigt, dass eine Co-Lokalisation des ^{59}Fe und der SPIOs nur vorliegt, wenn der SPIO vor der Verpackung mit der Tracerdosis inkubiert wurde (siehe Abbildung 2.11). Dies beweist ebenfalls, dass die Markierung nicht durch eine Interaktion der positiv geladenen Eisenionen mit der negativen Ladung der Hülle zu Stande kommt, sondern direkt mit der Struktur des SPIOs zu tun hat.

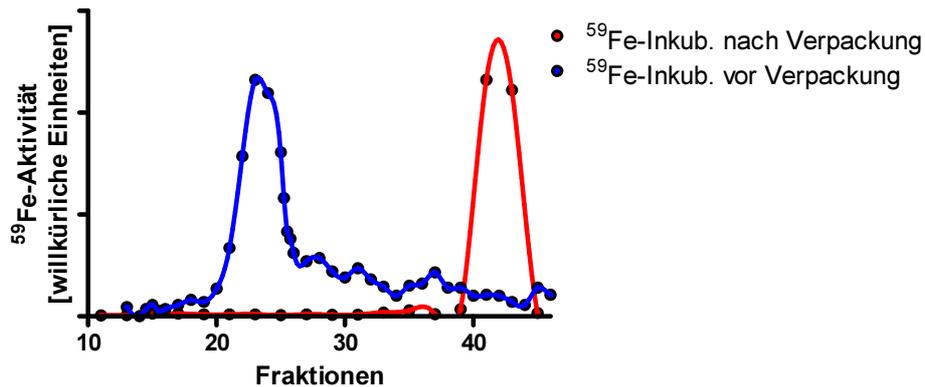


Abbildung 2.11: Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie einer vor und einer nach der Verpackung mit ^{59}Fe inkubierten Probe. Die Verpackung verhindert ein festes Anlagern des radioaktiven Eisens und so wird das Eisen in diesem Fall ausschließlich als freies Fe eluiert.

Zur genaueren Untersuchung der Rolle des SPIOs in der Anlagerung des radioaktiven Fe wurde unter gleichen Bedingungen eine Probe Quantumdots (CdSe/CdS/ZnS) mit einer Tracerdosis ^{59}Fe inkubiert und dann mit amphiphilen Polymer verpackt. In der anschließend durchgeführten SEC zeigte sich, dass es keine Co-Lokalisation zwischen den QDs und dem ^{59}Fe gibt und es sich auch hier ausschließlich um freies ^{59}Fe handelt (siehe Abbildung 2.12).

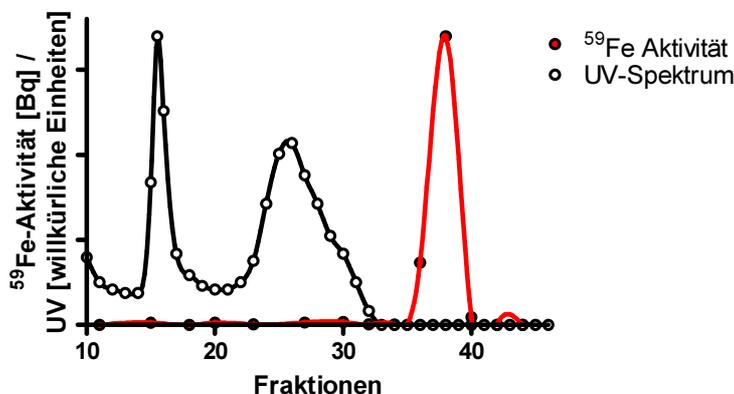


Abbildung 2.12: Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie einer mit ^{59}Fe inkubierten QD-Probe: Der QD und das ^{59}Fe sind nicht co-lokalisiert, d.h. es kam nicht zu einer radioaktiven Markierung des QDs.

Aus diesem Befund lassen sich zwei Schlussfolgerungen ableiten: Erstens handelt es sich bei der radioaktiven Markierung der SPIOs nicht um ein Artefakt aus der Verpackung mit dem Polymer. Zweitens scheint es sich um ein Aufwachsen des radioaktiven Eisens oder einen Austausch der Eisenatome im Kristallgitter des SPIOs zu handeln. Hierfür ist die Größe und Wertigkeit des Ions entscheidend, so dass ^{59}Fe nur in das Ferrit- nicht aber in das ZnS-Gitter eingebaut werden kann.

Nachdem wir zeigen konnten, dass die SPIOs durch unsere Methode radioaktiv markiert werden, ging es auch darum zu klären, wie die Freisetzung der Markierung verläuft. Hierzu wurden SPIOs verschiedener Kerngröße nach der Verpackung in unterschiedlich molarer Salzsäure bei 37 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, mittels Zentrifugationsfilter (5 kDa, 7200 g) wurde freies und an die SPIOs gebundenes ^{59}Fe separiert und zusätzlich neben der Radioaktivität die Eisenkonzentration im Filtrat bestimmt.

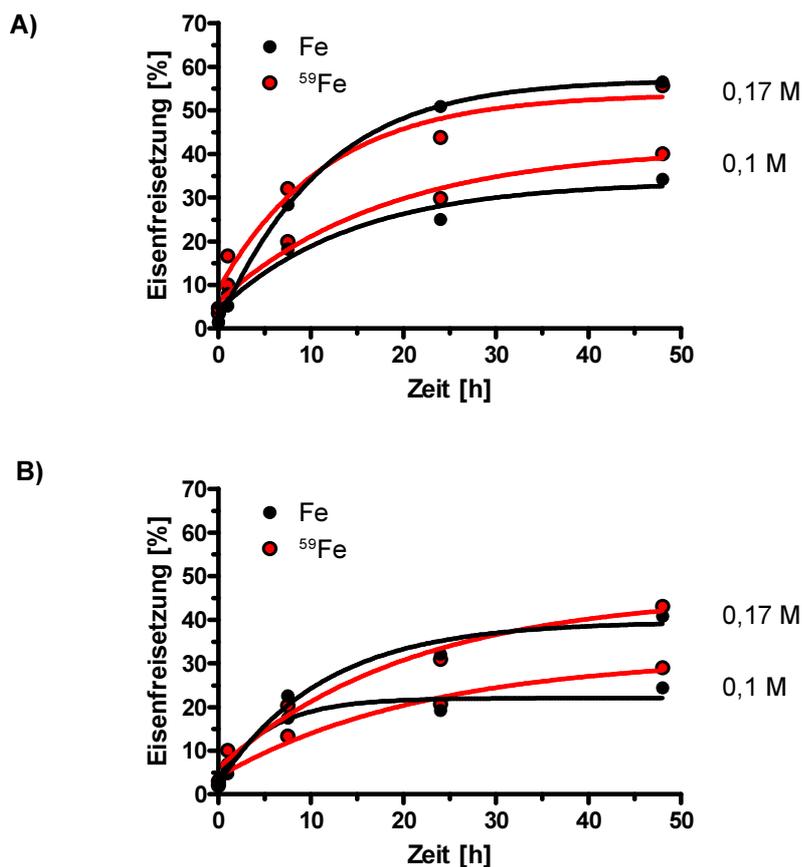


Abbildung 2.13: zeitabhängige Freisetzung von Fe und ^{59}Fe aus den radioaktiv markierten SPIOs mittels Salzsäure, A) Kerngröße 10 nm B) Kerngröße 6 nm Die beiden Freisetzungskurven folgen einem ähnlichen Verlauf.

Es zeigte sich, dass sowohl die ^{59}Fe - als auch die Fe-Freisetzung einem ähnlichen Verlauf folgen (siehe Abbildung 2.13), so dass unsere Technik als repräsentative radioaktive Markierung des Kerns verstanden werden kann.

Zuletzt galt es noch zu klären, ob die radioaktive Markierung einen Einfluss auf die Struktur oder die magnetischen Eigenschaften der SPIOs hat. Hierzu wurden TEM-Aufnahmen radioaktiv markierter, polymerumhüllter Kerne mit denen von unmarkierten, polymerumhüllten Kernen der gleichen Charge verglichen (siehe Abbildung 2.14). Es ließen sich keine Unterschiede in der Größe oder dem Agglomerationsverhalten der Partikel feststellen.

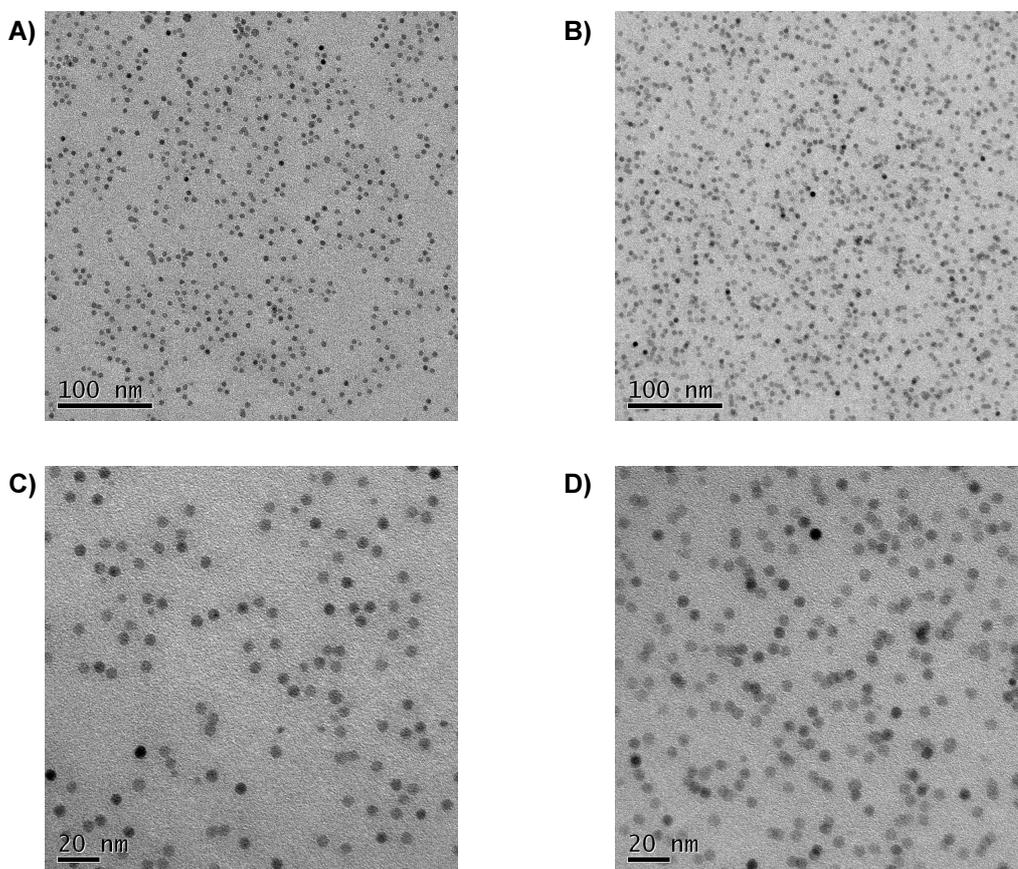


Abbildung 2.14: Vergleich der elektronenmikroskopischen Aufnahmen einer unmarkierten, polymerumhüllten (A, C) und einer radioaktiv markierten, polymerumhüllten (B, D) SPIO-Probe. Die Kerne entstammen derselben Charge. Es sind keine Unterschiede in Bezug auf Größe und Agglomerationsverhalten der Partikel zu erkennen.

Gleiche Ergebnisse wurden erhalten, als eine radioaktive und eine unmarkierte Probe polymerumhüllter SPIOs im MRT verglichen wurden. Die Kerne entstammen derselben Charge. Es wurden verschiedene Verdünnungen untersucht. Es ließ sich keine Veränderung in der Signalintensität und somit im magnetischen Verhalten der SPIOs durch die radioaktive Markierung feststellen (siehe Abbildung 2.15)

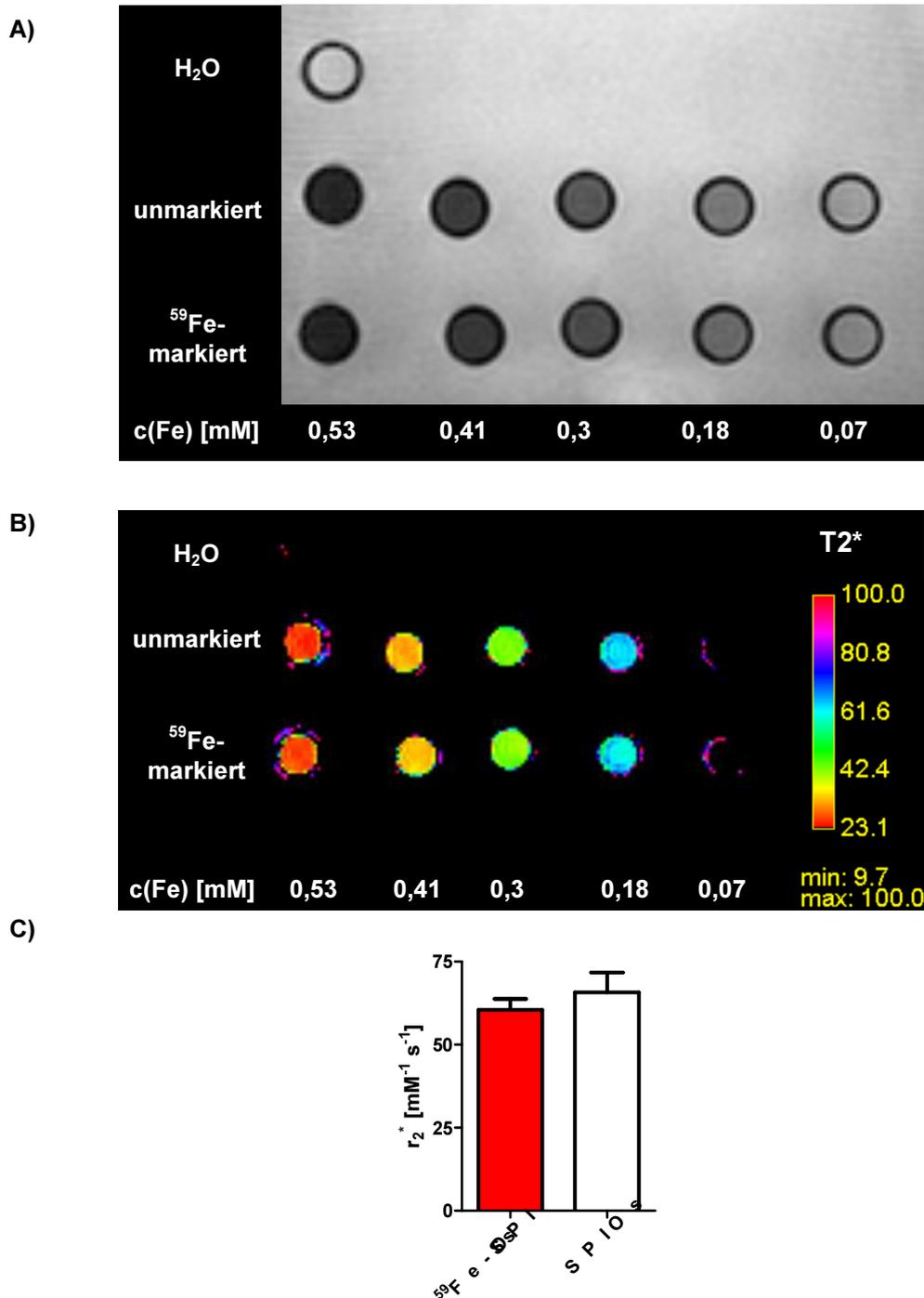


Abbildung 2.15: MRT-Untersuchungen verschiedener Verdünnungen von polymerumhüllten SPIOs: A) T_2^* -Aufnahme, B) korrespondierende relaxometrische T_2^* Map, C) Auswertung der r_2 Relaxivitäten. Es lassen sich keine Unterschiede zwischen markierten und unmarkierten SPIOs feststellen.

Die Erkenntnisse aus den Untersuchungen zum Mechanismus des Einbaus und der Stabilität der Markierung wurden in Abbildung 2.16 zusammengefasst. Die Stabilität der Markierung ist der kritischste Punkt und essentiell für die Aussagekraft der *in vivo* Experimente. Außerdem muss der Verbleib der Markierung als repräsentativ für das Partikel betrachtet werden können. Auch wenn unsere Untersuchungen zeigen, dass

es sich um ein stabiles Label handelt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass nur die Oberfläche der SPIOs markiert wurde. Allerdings deuten alle von uns durchgeführten Experimente darauf hin, dass die Stabilität des Labels auch im Körper gewährleistet werden kann und die Markierung repräsentativ für den Partikel ist. Somit sind die radioaktiv markierten SPIOs für die nachfolgenden *in vivo* Untersuchungen geeignet.

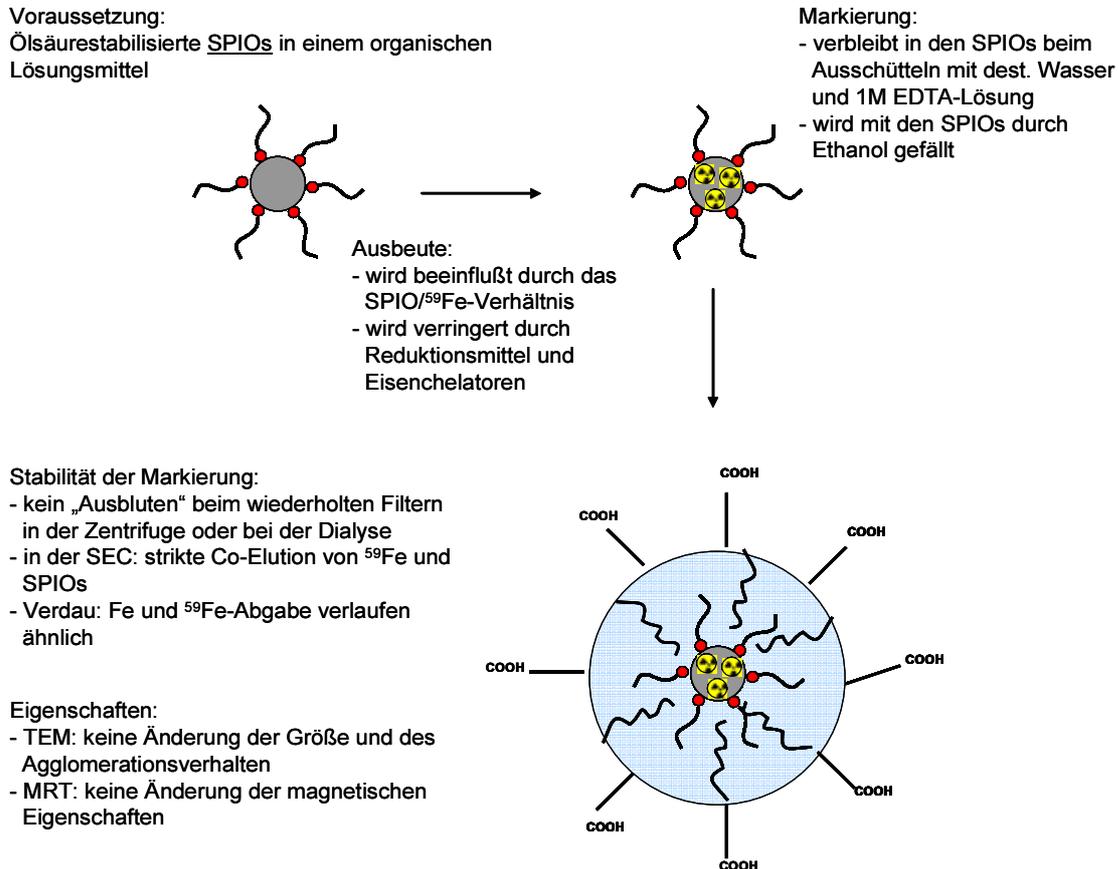


Abbildung 2.16: Zusammenfassung der Untersuchungen zum Einbau und der Stabilität der radioaktiven Markierung.

2.4 Untersuchungen der Verteilung und des Verbleibs von SPIOs *in vivo*

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, werden SPIOs als Kontrastmittel in der MRT-Bildgebung eingesetzt. Dabei werden sie dem Patienten meist i.v. gespritzt. Alle beim Menschen eingesetzten Präparate müssen vor einer gesetzlichen Zulassung definierte pharmakokinetische Untersuchungen unterlaufen. Im Falle von Nanopartikeln wird auch von einer „Partikokinetik“ gesprochen. Hierbei hat sich das „ADME“-Schema bewährt. Dies steht für Absorption/Administration, Distribution, Metabolismus und Exkretion. Im Folgenden wird gezeigt, dass alle diese Aspekte mit Hilfe der radioaktiven SPIOs beantwortet und quantifiziert werden können.

2.4.1 Absorption und Administration

2.4.1.1 Einfluss der Form der Administration auf die Verteilung der SPIOs

Nanopartikel können auf verschiedenen Wegen in den Organismus gelangen (siehe Abbildung 2.17). Hierbei wird zwischen einer unfreiwilligen Exposition gegenüber dem Nanopartikel und einer gezielten Verabreichung unterschieden. Dermal, nasal und pulmonal sind Aufnahmewege, die eher zur unfreiwilligen Exposition gezählt werden. Bei einer Aufnahme über die Haut, die Nase oder die Lunge sind die Barrieren, die die Partikel überwinden müssen, sehr groß, so dass der prozentuale Anteil an aufgenommenen Partikeln sehr gering ist und sich sehr kleine Transferfaktoren ergeben. Bei der oralen Administration ist der Anteil an aufgenommenen Partikeln auch eher gering, während er bei der intraperitonealen (i.p.) Gabe deutlich größer ist und bei der i.v. Gabe alle Nanopartikel im Blut auftauchen.

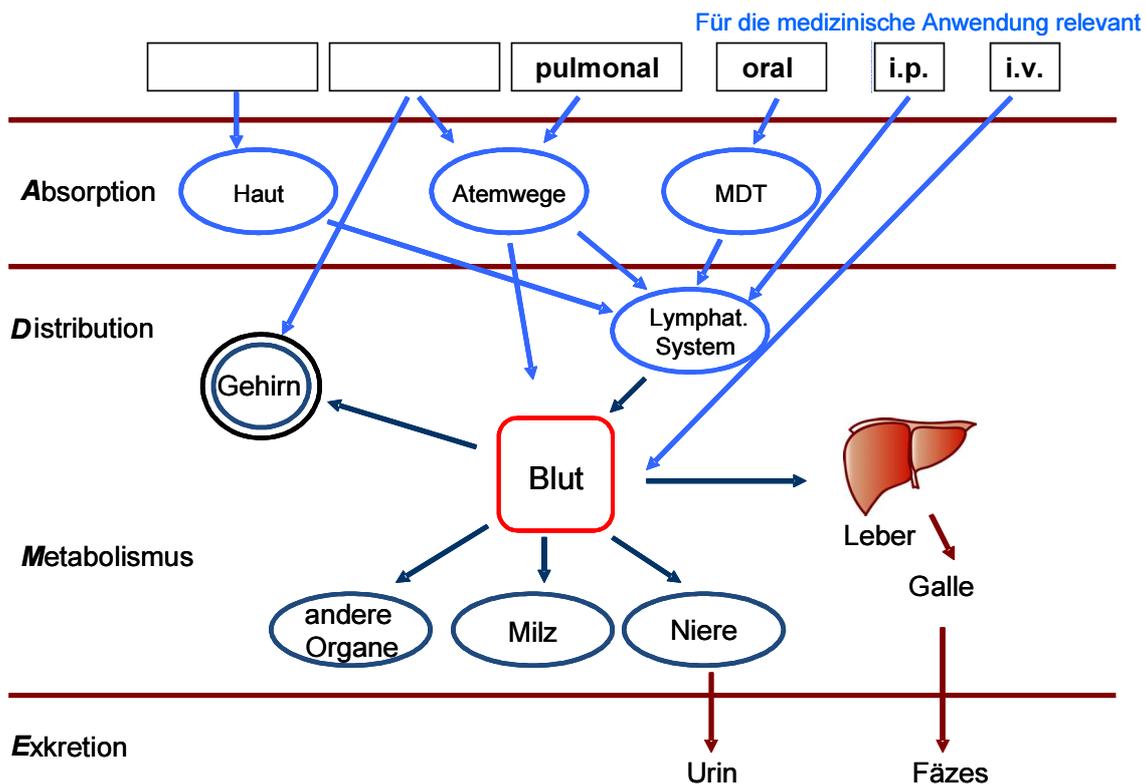


Abbildung 2.17: Verschiedene Möglichkeiten für Nanopartikel in den Körper zu gelangen und sich dort zu verteilen (Schema modifiziert aus ¹⁸⁰).

Im Folgenden sollen die Unterschiede in der Verteilung nach i.p. und i.v. Gabe untersucht werden, weil dies die relevantesten Zugangswege für MRT-Kontrastmittel sind. Es ist möglich und denkbar, dass eine Verteilung der Nanopartikel *in vivo* nach dermalen, nasalen, pulmonalen und oralen Aufnahme grundsätzlich anders verlaufen

kann, weil hier wesentlich geringere Mengen langsamer anfluten. Anders stellt es sich dar, wenn sich nach einer i.v. Gabe ein Bolus durch den Körper bewegt, der gegebenenfalls lokale Sättigungsphänomene zur Folge haben kann.

Um den Einfluss von i.p. und i.v. Applikation von ^{59}Fe -SPIOs exemplarisch zu verfolgen, haben wir sie in einem Arteriosklerose-Modell an der Maus untersucht.

Arteriosklerose ist eine der Haupt-Todesursachen in den westlichen Industriestaaten.¹⁸¹ Der Pathomechanismus beruht darauf, dass sich Cholesterin in Arterienwände an bestimmten Stellen einlagert und sich sogenannte Plaques bilden. Es ist bekannt, dass ein hoher LDL-Cholesterol-Plasmalevel mit einem erhöhten Arterioskleroserisiko und damit einem höheren kardiovaskulären Risiko assoziiert ist, wohingegen die HDL eine protektive Rolle spielen.¹⁸² Die Degradation der LDL scheint die Interaktion mit Makrophagen zu erhöhen,^{183,184} während das LDL-Cholesterol zur Bildung von Schaumzellen führt.^{185,186} Es wird angenommen, dass die Anreicherung von Makrophagen und Schaumzellen zusammen mit einer fibrösen Kappe zur Bildung von arteriosklerotischen Plaques führt.^{187,188}

Für das verwendete Mausmodell ist entscheidend, dass beide Lipoproteine in den Plaque aufgenommen werden.¹⁸⁹ In der Literatur sind deshalb auch bereits modifizierte Formen von LDL und HDL beschrieben, die zum Molecular Imaging von arteriosklerotischen Plaques verwendet wurden. Fayad *et al.* verwendete aus humanem Blut gewonnene HDL, die bei der Rekonstitution mit dem phospholipid-basierten Kontrastmittel Gadolinium-1,2-dimyristol-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-diethylen-triamin-pentaessigsäure (Gd-DPTA-DMPE) versetzt werden und damit als spezifisches T_1 -Kontrastmittel verwendet werden können.¹⁹⁰ Im Vergleich dazu verwendeten Mulder *et al.* nicht humane Phospholipide um HDL-ähnliche Konstrukte, zu synthetisieren in deren Mitte Nanopartikel aus Eisenoxid, Gold oder QDs eingebettet sind.¹⁰⁴ Der Körper sieht nach der Applikation nur die HDL-ähnliche Oberfläche, während das Nanopartikel es aber ermöglicht, den Weg des Lipoproteins nachzuverfolgen. Das Eisenoxid kann via MRT, der QD fluoreszenz-mikroskopisch und die AuNP über die Oberflächenplasmonenresonanz (OPR) und elektronenmikroskopisch detektiert werden.

Für unsere Versuche verwendeten wir eine Mischung aus beiden Systemen. Lipide wurden aus humanen Blutproben gewonnen und bei der Rekonstitution wurden lipophile ^{59}Fe -SPIOs in den Kern der HDL eingeschlossen und Mäusen i.v. oder i.p. appliziert. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Klinische und

Interventionelle Radiologie des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Es wurde die Bluthalbwertszeit (siehe Abbildung 2.18) und die Organverteilung nach 4 h ermittelt (siehe Abbildung 2.19).

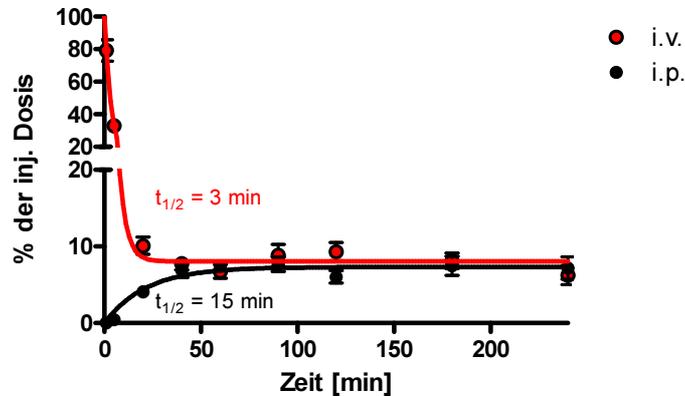


Abbildung 2.18: Bluthalbwertszeit nach i.v. und i.p. Gabe im Vergleich. Nach i.p. Gabe kommt es zu einem langsamen Anfluten (Halbwertszeit 15 min) der SPIOs im Blut, das erreichte Plateau zeigt eine kleine Population an sehr lange zirkulierenden HDL-Partikeln. Nach der i.v. Gabe wird ein Teil der HDL-Population schnell (Halbwertszeit 3 min) aus dem Blutstrom entfernt. Eine kleinere Menge (Anteil stimmt mit dem aus der i.p. Injektion überein) verbleibt als lange zirkulierende HDL-Partikel im Blut.

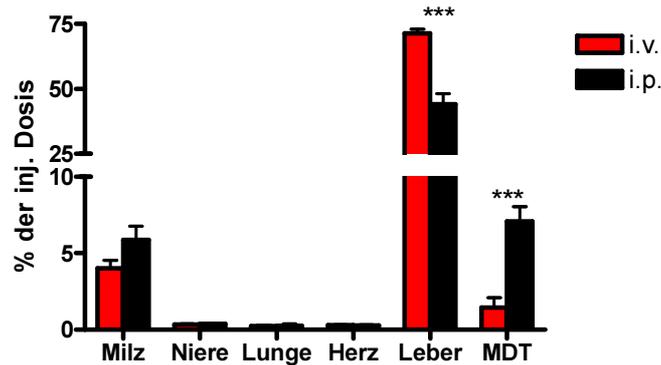
Körpereigene HDL sind ca. 10 nm groß und zirkulieren tagelang im Blut. Dynamic Light Scattering (DLS) Messungen der von uns hergestellten rekombinanten HDL ergaben Hinweise darauf, dass sich in der Probe nicht ausschließlich 10 nm große, sondern auch größere Mizellen befanden.

Bei der i.v. Gabe fällt der Spiegel an im Blut zirkulierenden rekombinanten HDL rasch ab ($t_{1/2} = 3$ min), dann flacht die Kurve ab und erreicht ein Plateau. Die Halbwertszeit dieser lange zirkulierenden Partikel kann nicht aus den Messpunkten berechnet werden. Dieser Befund lässt sich dadurch erklären, dass die Population großer Mizellen rasch vom RES, hauptsächlich der Leber und der Milz, aufgenommen wird. Die kleineren Mizellen, die in ihrer Physiologie eher den körpereigenen HDL entsprechen, zirkulieren länger im Blut.

Bei der i.p. Gabe werden die HDL-Mizellen in den Bauchraum gespritzt, von wo aus es zwei Möglichkeiten gibt, wie die SPIOs in den Blutstrom gelangen können. Eine Möglichkeit ist, dass sie im Bauchraum von Makrophagen aufgenommen werden, die dann ins Blut wandern und von dort aus in andere Gewebe, wie den arteriosklerotischen Plaques, aufgenommen werden. Andererseits wäre es auch denkbar, dass die rekombinanten HDL über die Lymphe das Blut erreichen. Da die Radioaktivität bereits nach weniger als 60 Minuten im Blut zu finden ist ($t_{1/2} = 15$ min), muss davon ausgegangen werden, dass es sich um einen Transport über die Lymphe

handelt, da eine Migration der Makrophagen wesentlich länger dauern würde. Ca. 90 Minuten nach der i.p. Gabe findet sich eine ähnliche Menge an lange zirkulierenden, rekombinanten HDL im Blut wie nach der i.v. Gabe. Es ist wahrscheinlich, dass die großen HDL-Mizellen im Bauchraum zurückgehalten werden und nur die kleinen funktionellen über die Lymphe den Blutkreislauf erreichen, wo sie den körpereigenen HDL entsprechend lange zirkulieren.

A)



B)

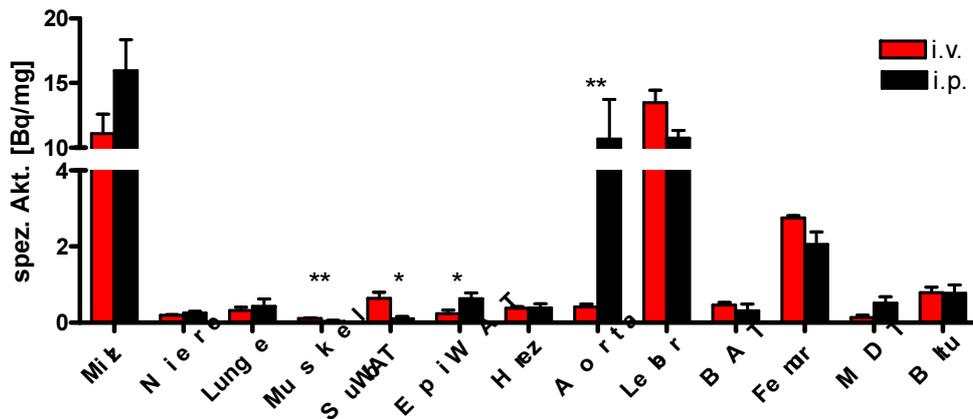


Abbildung 2.19: Organverteilung nach 4h **A)** prozentuale Verteilung der injizierten Dosis auf die Organe, MDT = Magen-Darm-Trakt, **B)** spezifische Aktivität in den unterschiedlichen Organen SubWAT = subkutanes weißes Fettgewebe, EpiWAT = epididymales weißes Fettgewebe, BAT = braunes Fettgewebe, ApoE-Knock out-Mäuse, Mittelwert +/- s.e.m. mit n≥4 (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

Die 4h-Organverteilung nach i.p. Gabe unterscheidet sich in vielen Organen signifikant von der nach i.v. Gabe. Allgemein zeigt sich, dass sich nach der i.p. Gabe prozentual weniger der Aktivität in der Leber findet. Dafür gibt es zwei mögliche Erklärungen: Erstens wird bei der i.p. Gabe ein nicht zu vernachlässigender Teil der SPIOs im Bauchraum zurückgehalten und erreicht so weder den Blutstrom noch die Leber. Zweitens steigt der HDL-Spiegel im Blut nach der i.p. Gabe nur sehr langsam an. Anders als bei der Bolusgabe, gibt es keine lokalen Sättigungsphänomene, bei denen die

Leber rasch die Partikel phagozytiert. Dadurch zirkulieren die HDL-Mizellen länger und werden spezifisch von rezeptortragenden Zellen aufgenommen, anstatt unspezifisch vom RES absorbiert zu werden. Dass es sich bei unseren Ergebnissen um eine Mischung der beiden Effekte handelt, erkennt man daran, dass die prozentuale Verteilung sich signifikant unterscheidet. Im Gegensatz dazu ist die spezifische Aktivität der Leber nach i.p. Gabe zwar geringer, aber nicht signifikant kleiner. Der signifikante Unterschied in der prozentualen Verteilung der Radioaktivität im MDT lässt sich damit erklären, dass bei der i.p. Gabe SPIOs direkt in dieses Gewebe appliziert werden können. Bei den spezifischen Aktivitäten zeigen sich Unterschiede im Muskel, subkutanen und epididymalen Fettgewebe. Allerdings sind die Differenzen, trotz ihrer Signifikanz, sehr klein und die aufgenommene Menge ist allgemein in diesen Geweben sehr gering.

Anders verhält es sich bei den Aorten. Da es sich bei den verwendeten Tieren um ältere ApoE-Knockout-Tiere handelte, muss davon ausgegangen werden, dass sich bei diesen Tieren bereits arteriosklerotische Plaques gebildet haben. Nach einer i.p. Gabe reicherte sich signifikant mehr des ^{59}Fe in den Aorten/Plaques an, was die Schlussfolgerung zulässt, dass für ein Molecular-Imaging-Experiment diese Darreichungsform geeigneter wäre. Die Gründe hierfür liegen in dem bereits erläuterten, langsameren Anfluten und dem schon bei der Bluthalbwertszeit ersichtlichen Umstand, dass nur die kleinen funktionellen HDL-Mizellen über die Lymphe den Blutstrom erreichen, während die großen unspezifischen Mizellen im Bauchraum zurückgehalten werden.

2.4.1.2 Absorption der SPIOs aus dem Blut, Bluthalbwertszeit

Mit Hilfe der radioaktiven SPIOs können nicht nur unterschiedliche Formen der Applikation untersucht werden, sondern auch der Einfluss von Hülle und Größe der SPIOs auf pharmakokinetische Parameter wie die Bluthalbwertszeit ($t_{1/2}$) exakt bestimmt werden. Die Bluthalbwertszeit ist die Zeitspanne, nach der die Konzentration einer Substanz um die Hälfte abgenommen hat (siehe Abbildung 2.20).

Bei einer Modellbetrachtung würde man als einfachste Variante ein sogenanntes „Ein-Kompartiment-Modell“ heranziehen. Bei diesem Modell wird der gesamte Körper als homogene Einheit angenommen und die Veränderung der Konzentration des SPIOs im Blut analysiert. Voraussetzung für dieses Modell ist, dass die

Verteilungsgeschwindigkeit zwischen Blut und Geweben verglichen mit der Ausscheidung schnell ist und als Reaktion erster Ordnung erfolgt. Die zu jedem Zeitpunkt aus dem Blut eliminierte Menge an SPIOs ist direkt proportional zu der noch im Blut verbliebenen Nanopartikelmenge. Eine weitere wichtige pharmakokinetische Größe ist die Fläche unter der Kurve (AUC, Area Under the Curve). Bei der i.v. Verabreichung ergibt sich eine Konzentrations-Zeit-Kurve, die praktisch nur durch die Kinetik der Organaufnahme bestimmt wird.

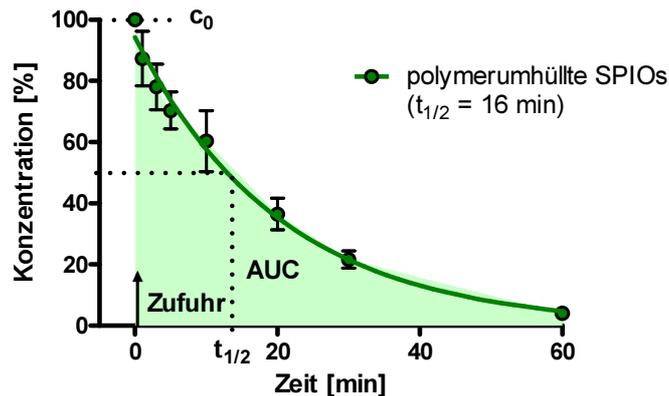


Abbildung 2.20: Konzentrations-Zeit-Kurve im Ein-Kompartiment-Modell für die polymerumhüllten SPIOs. Die Funktion entspricht einer Reaktion erster Ordnung ($c(t) = c_0 \cdot e^{-kt}$). c_0 ist die Ausgangskonzentration zum Zeitpunkt t_0 , $t_{1/2}$ stellt die Halbwertszeit dar. AUC bedeutet „Area Under the Curve“. Die Fläche unter der Kurve ist bei einer i.v. Bolusgabe allein von der Abflusskinetik (hier Aufnahme der SPIOs in Organ- und Gewebszellen) bestimmt.

Für die Versuche wurden ^{59}Fe -markierte SPIOs mit unterschiedlichen Hüllen versehen und in die Schwanzvene von Mäusen injiziert (siehe Abbildung 2.21). Zeitabhängig wurden Blutproben à ca. 50 - 80 μL entnommen und darin die ^{59}Fe -Aktivität bestimmt. Für alle untersuchten SPIOs ergeben sich Konzentrations-Zeit-Kurven, die sehr gut mit einem Ein-Kompartiment-Modell beschrieben werden können (siehe Abbildung 2.21). Dies spricht nochmals dafür, dass die ^{59}Fe -Markierung auch *in vivo* homogen mit einer Teilchenpopulation assoziiert ist.

Als Hüllen wurden rekombinante Lipoproteine, neben den bereits beschriebenen HDL auch Chylomikronen, verwendet, die im Inneren lipophile SPIOs tragen. Beide Präparationen zeichnen sich durch sehr kurze Bluthalbwertszeiten von ca. 3 Minuten aus. Es fällt auf, dass es bei den Chylomikronen den bei den HDL beschriebenen Anteil an länger zirkulierenden Partikeln nicht gibt und der Wert des rekombinanten TRL-Spiegels im Blut nach einer Stunde gegen Null geht. Dies war auf Grund des größeren Durchmessers der Mizellen zu erwarten.

Zum direkten Vergleich wurden auch polymerumhüllte SPIOs und solche, bei denen die Ölsäure auf der Oberfläche durch eine phosphorylierte PEG-Kette (MW=1100 Da) ersetzt wurde, untersucht. Es ist bekannt, dass diese PEG-Ketten die Interaktion mit den Plasmaproteinen verringern und dadurch die Aufnahme ins RES verlangsamen.^{191,192} Auch in unseren Experimenten zeigte sich, dass die Zirkulation der polymerverpackten SPIOs mit 16 Minuten länger ist als die der rekombinanten Lipoproteine. Die PEGylierung der Oberfläche hat eine weitere Verlängerung der Bluthalbwertszeit auf 24 Minuten zur Folge. Allerdings sollte bedacht werden, dass während für die Verpackung in das amphiphile Polymer und die Lipide, SPIOs mit einer Kerngröße von 10 - 12 nm verwendet wurden, für den Ligandenaustausch 4 nm große Kerne verwendet wurden, da diese als T₁-Kontrastmittel verwendet werden sollten.³⁵ Die geringere Größe der Partikel trägt ebenfalls zur längeren Zirkulationszeit bei.^{167,193}

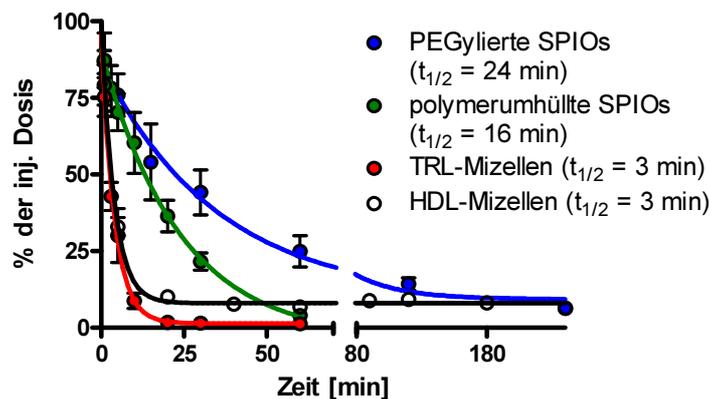


Abbildung 2.21: Bluthalbwertszeit der ⁵⁹Fe-markierten SPIOs mit unterschiedlichen Hüllen. Die durchgezogenen Linien entsprechen einer einfachen exponentiellen Fitfunktion (Graph Pad Prism) und zeigen jeweils eine perfekte Anpassung an ein Ein-Kompartiment-Modell.

2.4.2 Distribution

2.4.2.1 Ermittlung der Verteilung von SPIOs *in vivo*

Wie bereits bei den rekombinanten HDL-Mizellen gezeigt wurde, können die radioaktiv markierten SPIOs dazu verwendet werden, die Organverteilung nach verschiedenen Zeitpunkten zu ermitteln. Auch hier kann der Einfluss der Hülle auf die Verteilung des ⁵⁹Fe untersucht werden. Dazu wurden rekombinante Chylomikronen, polymerumhüllte SPIOs und zu Vergleichszwecken eine Tracerdosis (ca. 5 ng) ionisches Eisen (⁵⁹FeCl₃ in PBS) in die Schwanzvene von Mäusen injiziert und die Organverteilung bestimmt. Für die polymerumhüllten SPIOs und die rekombinanten Chylomikronen wurde als

Zeitpunkt für die Organentnahme 1 h gewählt, da hier für beide Darreichungsformen mindestens 4 Bluthalbwertszeiten vergangen sind. Für das ionische Eisen wurde ein Zeitpunkt nach 24 h gewählt, da es bei der Gabe von freiem Eisen zu vielen Umverteilungsphänomenen in den ersten Stunden kommt und ein reproduzierbarer Wert erhalten werden sollte (siehe Abbildung 2.22).¹⁹⁴ Eisenkinetiken nach i.v. Gabe von verschiedenen Substanzen (⁵⁹Fe-Transferrin, ⁵⁹Fe-Nitrilotriacetat) ist sehr gut untersucht und stark dosis- und substanzabhängig, da eine unterschiedlich schnelle Proteinbindung im Blut erfolgt.¹⁹⁴ Hier wurde bewusst eine kleine Menge ⁵⁹FeCl₃ gewählt, da dies die Eisenverbindung ist, die zur Markierung der SPIOs verwendet wurde. Somit würde bei einer nicht stabilen oder nicht vollständigen Markierung der SPIOs ⁵⁹Fe in dieser Form den Mäusen verabreicht.

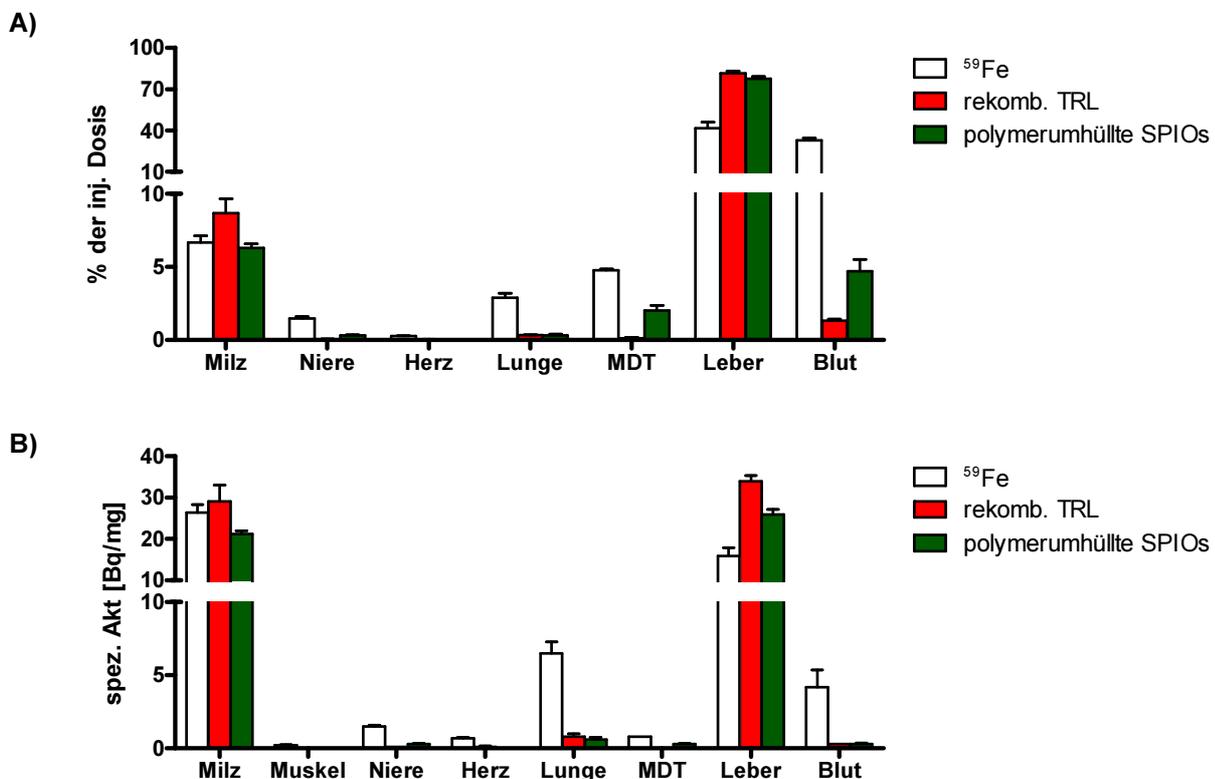


Abbildung 2.22: Organverteilung von ⁵⁹Fe 1 h, bzw. 24 h nach i.v. Injektion, A) prozentuale Verteilung in den Organen und Geweben, B) spezifische Aktivität in den unterschiedlichen Organen und Geweben, MDT = Magen-Darm-Trakt, BALB/C-Mäuse, Mittelwerte ± SEM, mit n ≥ 3.

Es zeigt sich, dass sich die Verteilung von ionischem Eisen stark von der Verteilung des an die SPIOs gebundenen ⁵⁹Fe unterscheidet. Es findet sich nur halb soviel Radioaktivität in der Leber und dafür wesentlich mehr im Blut, was mit der zu erwartenden Verteilung von Fe im Körper übereinstimmt. Dieser höhere Anteil von ⁵⁹Fe im Blut, könnte auch der Grund dafür sein, dass sich bei den Mäusen, denen das

ionische Eisen appliziert wurde, mehr Radioaktivität in den Nieren, im Herz und der Lunge findet, da diese Organe bei der Perfusion nur schwer komplett blutfrei gespült werden können. Die Unterschiede zwischen der Verteilung des ^{59}Fe aus rekombinanten Chylomikronen und den polymerumhüllten SPIOs sind zwar klein, aber signifikant. Hauptaufnahmeorgane sind wie erwartet in allen drei Formen der Administration Leber und Milz. Dass es dennoch Unterschiede gibt, spricht dafür, dass es unterschiedliche Aufnahmewege in die Zellen der einzelnen Gewebe gibt.

Der höhere ^{59}Fe -Anteil im Blut der Mäuse, die polymerumhüllte SPIOs erhalten haben, liegt in der um den Faktor fünf längeren Bluthalbwertszeit begründet.

Unsere Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit denen von Weissleder *et al.*¹⁶⁵ Sie fanden 1 h nach der i.v. Gabe von ^{59}Fe -markierten AMI-25, heute unter dem Namen Endorem[®] auf dem Markt, 82,6% der injizierten Dosis in der Leber und 6,7% in der Milz der Ratten.

Um dem hohen Anteil an Radioaktivität im Darm nach der Gabe der polymerumhüllten SPIOs nachzugehen, wurden in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Professor Hohenberg intravitalmikroskopische Aufnahmen des Darms gemacht (siehe Abbildung 2.23).

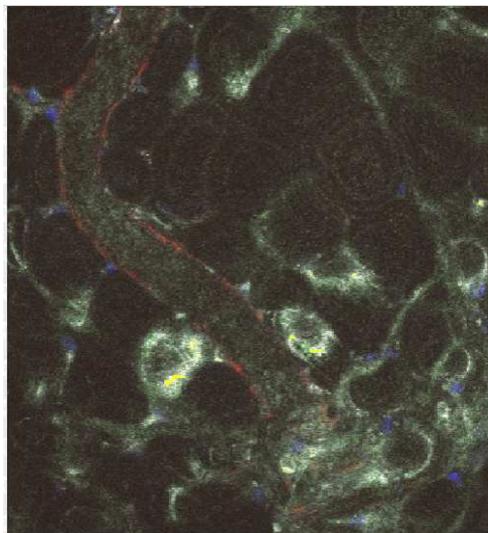


Abbildung 2.23: Intravitalmikroskopische Aufnahme des Darms (genauer des Mesenteriums) einer Maus nach i.v. Gabe polymerumhüllter QDs. Die QDs (rot) reichern sich in den Endothelzellen der Gefäße in diesem Bereich an.

Hierzu wurden an Stelle der SPIOs, QDs mit dem gleichen amphiphilen Polymer verpackt und i.v. appliziert. Es zeigte sich, dass sich QDs im Mesenterium des Darms anreichern, was den Anteil von etwa 6% der injizierten Dosis erklärt, der in den radioaktiven Versuchen gefunden wurde.

Auffällig ist, dass sich die Verteilung der polymerumhüllten SPIOs und der rekombinanten Chylomikronen zwischen den unterschiedlichen Organen und Geweben, trotz der stark unterschiedlichen Bluthalbwertszeiten, kaum unterscheidet. Das Hauptaufnahmeorgan ist die Leber und zu einem geringeren Maße die Milz. Die Gründe für die unterschiedlichen Aufnahmegeschwindigkeiten der Partikel liegen also nicht in der Absorption durch unterschiedliche Organe, sondern vielmehr in der Aufnahme in verschiedene Zelltypen begründet.

Die Leber ist aus verschiedenen Zellarten aufgebaut (siehe Abbildung 2.24). Das Grundgerüst bilden die Hepatozyten. Sie sind die größten Zellen der Leber und stellen den Hauptbestandteil der Zellmasse dar. Die Lebersinusoiden werden von den Endothelzellen (LSEC) ausgekleidet, des Weiteren finden sich hier noch die Kupfer Zellen (KZ).

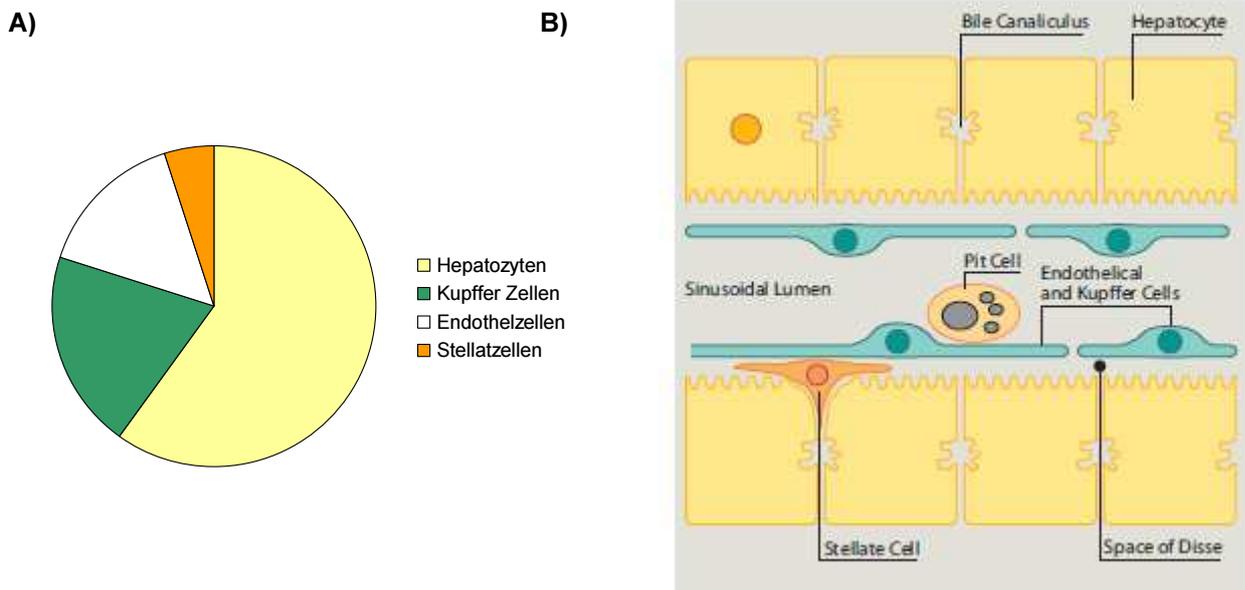


Abbildung 2.24: Struktureller Aufbau der Leber **A)** Prozentuale Verteilung der Zelltypen bezogen auf die Zellzahl, **B)** Schematischer Aufbau der Leber (beide Abbildungen adaptiert oder übernommen aus ¹⁹⁵).

KZ sind Makrophagen, deren wichtigste Aufgabe die Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigenen ist. Sie sind in der Lage, Fremdkörper aus dem Blutstrom zu phagozitieren.¹⁹⁵ LSEC sind Zellen mit hoher endozytotischer Aktivität. Unter anderem befinden sich auf ihrer Oberfläche Scavenger Rezeptoren, die verschiedene Moleküle, die lediglich eine starke negative Netto-Ladung gemeinsam haben, binden.^{196,197} Des Weiteren können LSEC die phagozytierenden Aufgaben von KZ übernehmen, wenn deren Funktion eingeschränkt ist oder sie gesättigt sind.¹⁹⁵ Als weiterer Zelltyp kommen im sogenannten Dissé-Raum hepatische Sternzellen

(Stellatzellen, Ito-Zellen) vor, deren Hauptaufgabe die Speicherung von Fett und Vitamin A ist.

Es wurde bereits von anderen Gruppen beschrieben, dass SPIOs in Abhängigkeit von ihrer Hülle von unterschiedlichen Zelltypen in der Leber aufgenommen werden. So konnte mittels Elektronenmikroskopie gezeigt werden, dass der polydisperse, mit Arabinogalaktan beschichtete Partikel AMI-HS von Hepatozyten und KZ aufgenommen wird, wohingegen der dextranumhüllte Partikel AMI-227 nur von KZ und LSEC absorbiert wird.¹⁹⁸

Um genauer zu untersuchen, welche Zellen die von uns verwendeten SPIOs aufnehmen, wurde der Umstand genutzt, dass sowohl das amphiphile Polymer als auch die rekombinanten Chylomikronen dazu verwendet werden können, QDs ins wässrige Medium zu überführen. Polymerumhüllte QDs wurden in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Professor Hohenberg i.v. Mäusen appliziert und ihre Aufnahme in die Leber wurde mittels Intravitalmikroskopie verfolgt. Die daraus gewonnenen Bilder wurden mit denen aus der Gruppe von Professor Heeren verglichen, die QDs in rekombinante Chylomikronen verpackt und deren Aufnahme in die Leber nach i.v. Gabe ebenfalls mit Intravitalmikroskopie untersucht haben.

Hierbei zeigten sich unterschiedliche Aufnahmemuster (siehe Abbildung 2.25). Die polymerumhüllten QDs wurden hauptsächlich von KZ und LSEC aufgenommen. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass sie wie die AMI-227-Partikel negativ geladen sind. So werden sie von KZ phagozytiert und von LSEC wahrscheinlich über Scavenger Rezeptoren endozytiert. Im Intravitalmikroskop war zu erkennen, dass einige Zellen in den Lebersinusoiden stark zu fluoreszieren begannen, wobei es sich vermutlich um KZ handelt. Zusätzlich begann auch das Endothel der Sinusoiden schwächer, aber deutlich sichtbar zu fluoreszieren. Dies spricht dafür, dass einzelne KZ viele Partikel phagozytieren, während eine Vielzahl von LSEC als Einzelzelle wenig, aber insgesamt wahrscheinlich mehr SPIOs aufnehmen als KZ.

Bei der Gabe der QD-markierten rekombinanten Chylomikronen, färbten sich ausschließlich sternförmige Zellen im Sinusoid. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um KZ, die die Chylomikronen über den LDL-Rezeptor und das Low Density-Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1) aufnehmen. Um dies näher zu untersuchen, wurden den Tieren zwei Tage vor der Mikroskopie clodronathaltige Liposomen gespritzt. Clodronat ist ein Bisphosphonat, das bei der Gabe in Form von Liposomen zu einer weitgehenden Depletierung der Makrophagen in der Leber für 7

Tage führt.¹⁹⁹ Phagozytierende Makrophagen, die diese Liposomen aufnehmen, sterben durch Apoptose ab. Die Vorbehandlung durch Clodronat hatte zur Folge, dass nach der Injektion von QD-haltigen rekombinanten Chylomikronen deutlich weniger sternförmige fluoreszierende Zellen zu sehen waren, was beweist, dass es sich bei den aufnehmenden Zellen um KZ handelt.

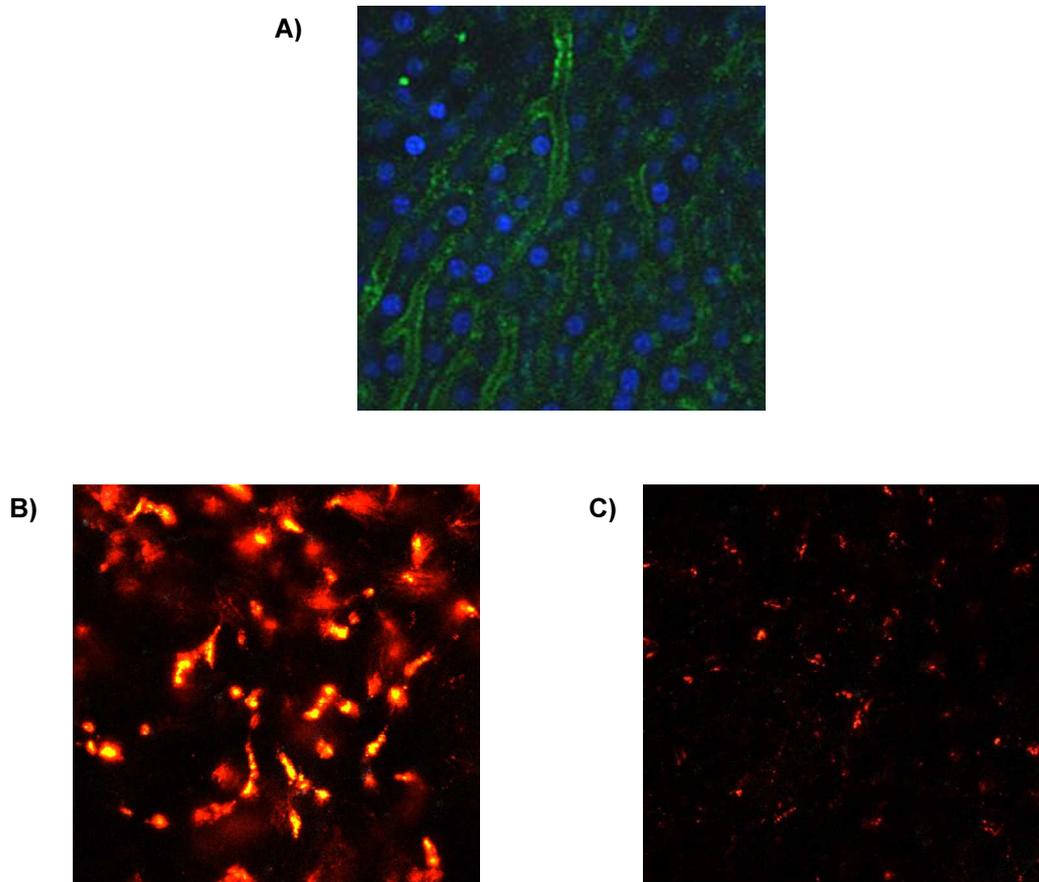


Abbildung 2.25: Intravitalmikroskopische Aufnahme fluoreszierender QDs in Mauslebern **A)** polymerumhüllte QDs reichern sich nach der Injektion in Kupfer und Endothelzellen an, **B)** QD-markierte rekombinante Chylomikronen reichern sich in sternförmigen Kupfer Zellen in der Leber an. Werden diese vor Injektion mit Hilfe von Clodronatliposomen depletiert, findet eine reduzierte Anreicherung in der Leber statt (**C**).

Um die Daten aus den Fluoreszenz-Untersuchungen weiter zu unterstützen, wurde die Bluthalbwertszeit von rekombinanten Chylomikronen in Mäusen mit und ohne Clodronatbehandlung verglichen (siehe Abbildung 2.26). Die Bluthalbwertszeit in den Mäusen ohne KZ war stark verlängert, was unterstreicht, dass die rekombinanten Chylomikronen hauptsächlich von den Makrophagen der Leber aufgenommen werden.

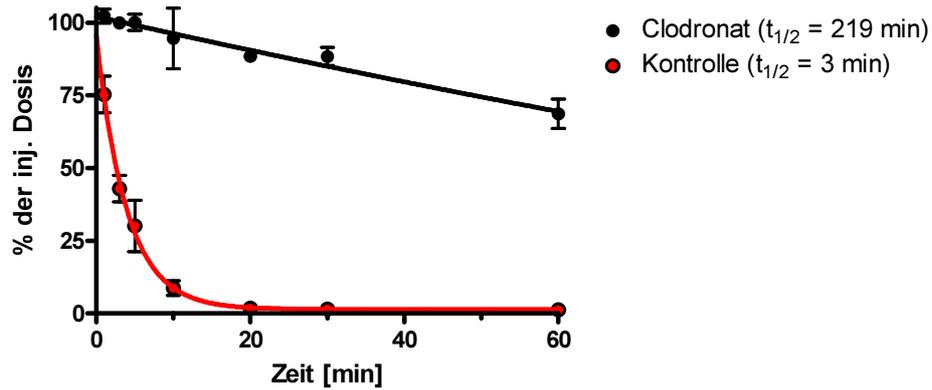


Abbildung 2.26: Bluthalbwertszeit von mit radioaktiven SPIOs markierten rekombinanten Chylomikronen: Durch die Behandlung mit Clodronat-Liposomen, die zur transienten Depletion der Kupffer Zellen in der Leber führt, ist die Zirkulationszeit stark verlängert.

Auch durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten diese Befunde verifiziert werden. So fanden sich die SPIOs der rekombinanten Chylomikronen 2 h nach Injektion hauptsächlich in endozytotischen Vesikeln der KZ (siehe Abbildung 2.27).

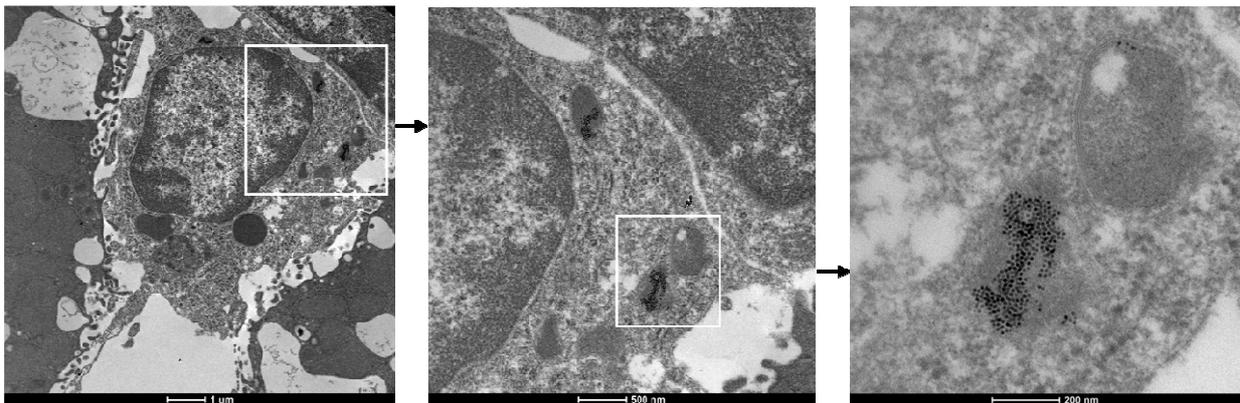


Abbildung 2.27: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Leber 2 h nach i.v. Gabe von rekombinanten Chylomikronen: Die SPIOs finden sich in endozytotischen Vesikeln der Kupfer Zellen.

Die polymerumhüllten SPIOs fanden sich in den endozytotischen Vesikeln der LSEC und KZ (siehe Abbildung 2.28). Hier fällt auf, dass in guter Übereinstimmung mit den Daten aus den Fluoreszenz-Experimenten in den Endothelzellen weniger SPIOs pro Zelle zu finden sind, als in den Makrophagen. Im Vergleich zu den Mäusen, denen rekombinante Chylomikronen gespritzt wurden, liegen die SPIOs hier vereinzelter und in geringerer Anzahl pro Vesikel vor. Dies ist wahrscheinlich dem Umstand geschuldet, dass die SPIOs einzeln von Polymer umhüllt sind, während die SPIOs in den rekombinanten Chylomikronen geclustert vorliegen.

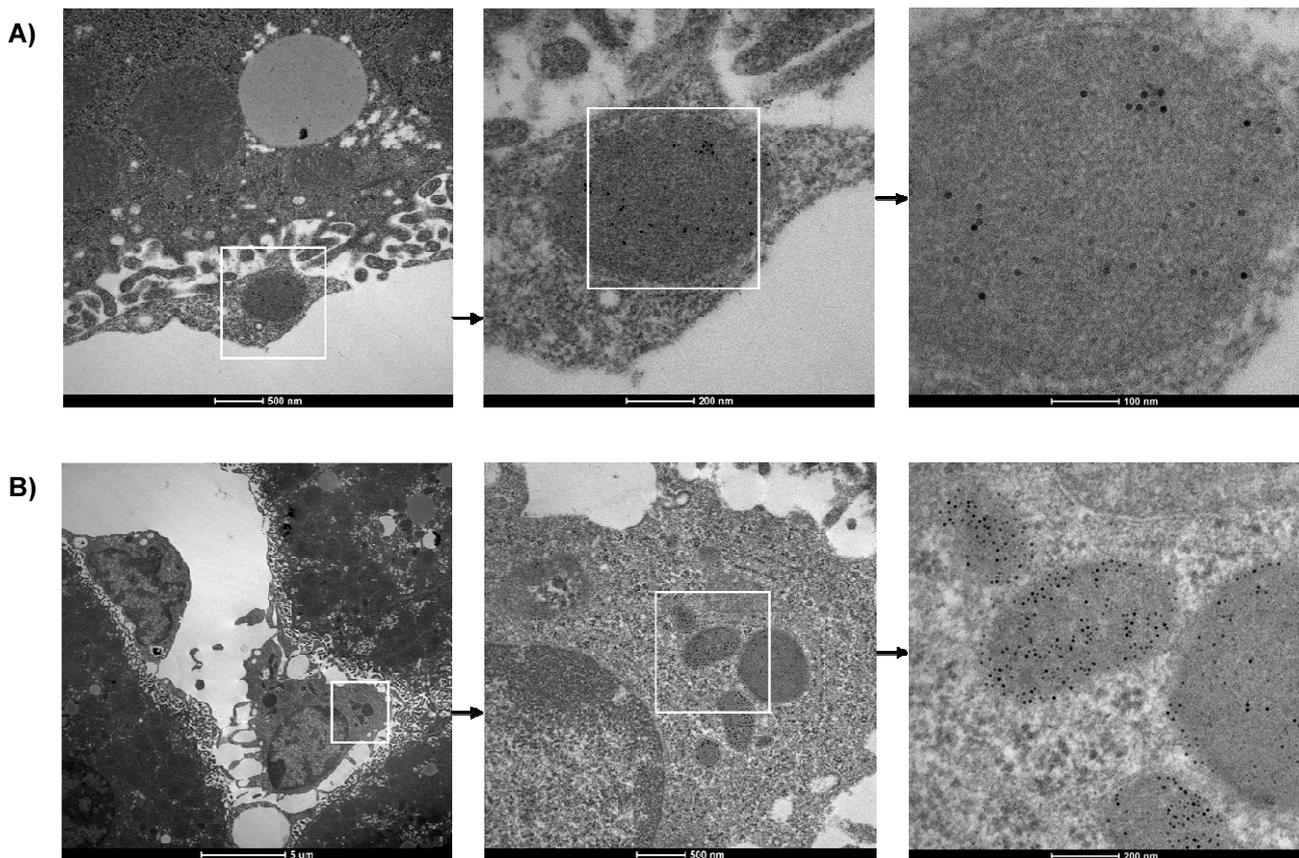


Abbildung 2.28: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Leber 2 h nach i.v. Gabe von polymerumhüllten SPIOs: Die SPIOs finden sich in endozytotischen Vesikeln der Endothel- (A) und der Kupffer Zellen (B).

Zusammenfassend ergibt sich damit, dass unterschiedliche Bluthalbwertszeiten nicht zwingend durch unterschiedliche Organe, die die Partikel absorbieren, bedingt sein müssen, sondern auch dadurch verursacht werden können, dass unterschiedliche Zelltypen die Partikel aufnehmen.

2.4.2.2 Aus der Verteilung resultierende Anwendungen der SPIOs

Die selektive Anreicherung von polymerumhüllten SPIOs in LSEC könnte den effektiven Transport von an SPIOs gekoppelten Faktoren (Proteine, Peptide, DNA, RNA, Aptamere) in diese Zellen ermöglichen. Eine solche Fragestellung wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Herkel (Innere Medizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) bearbeitet.

Diese Gruppe beschäftigt sich mit der Therapie von Autoimmunerkrankungen. Sie setzen hierbei auf eine besonders vielversprechende Art der Immuntherapie. Hierbei muss ein Antigen in die LSEC transportiert werden. Wenn die LSEC das Antigen präsentieren, führt dies zu einer Generation von autoantigenspezifischen

CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{reg}).²⁰⁰⁻²⁰³ Diese Zellen besitzen verschiedene sekretierte oder membrangebundene Moleküle, die inhibitorische Signale an Effektor-T-Zellen weitergeben und somit die Proliferation und die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen unterdrücken.^{204,205} Dadurch wird die Autoimmuntoleranz wiederhergestellt. Wenn Neuroantigen-spezifische T_{reg} gebildet werden, schützen diese vor autoimmunen neuroinflammatorischen Krankheiten wie der Multiplen Sklerose.²⁰⁶

Um zu gewährleisten, dass das Antigen wirklich in die LSEC transportiert wird, wurde das Peptid an die Oberfläche der polymerumhüllten SPIOs gebunden, da das kleine Peptid nicht in der Lage sein sollte, die Aufnahme der SPIOs in die Leber zu beeinflussen. Als Antigen wurde das encephalitogene Ac1-9 Peptid (Sequenz: Acetyl-ASQYRPSQR-COOH), abgeleitet von der Aminosäuresequenz des Myelin Basischen Proteins (MBP) verwendet. Es wurde mittels 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid (EDC) an die Carbonsäuregruppen des polymerumhüllten SPIOs gebunden. Die Tierversuche wurden von der Gruppe Herkel durchgeführt. Peptidgekoppelte und ungekoppelte SPIOs wurden B10.PL Mäusen, einen Tag nachdem bei ihnen eine experimentelle Autoimmun-Encephalomyelitis (EAE) durch Immunisierung mit MBP-Peptid ausgelöst wurde, injiziert.

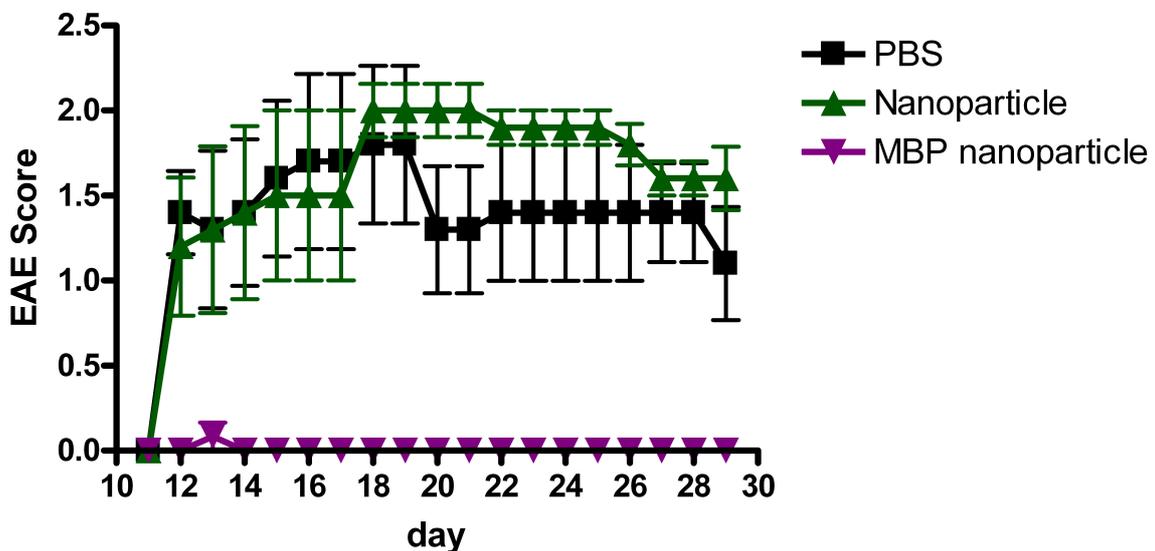


Abbildung 2.29: EAE-Score von Mäusen, die einen Tag nach der krankheitsauslösenden Immunisierung mit MBP-Peptid mit verschiedenen Lösungen behandelt wurden. Nur die Mäuse, denen MBP-tragende SPIOs injiziert wurden, waren vor der Krankheit geschützt. B10.PL Mäuse, Mittelwert \pm s.e.m. mit n = 6.

Nur die Neuropeptid-beladenen SPIOs induzierten einen vollständigen Schutz vor der klinischen EAE, während die mit ungekoppelten SPIOs behandelten Mäuse klinische

EAE-Scores entwickelten, die denen der mit PBS behandelten Mäusen ähnlich waren (siehe Abbildung 2.29).

Um zu zeigen, dass sich diese Form der Therapie grundsätzlich auf andere Peptide und damit vielleicht auch auf andere Autoimmunerkrankungen übertragen lässt, wurde auf gleiche Weise das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) (Sequenz: MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) an die Oberfläche der polymerumhüllten SPIOs gekoppelt. Auch hier zeigte sich im Tierversuch, bei dem die EAE durch die Immunisierung mit MOG-Peptid ausgelöst wurde, dass nur die Neuropeptid-tragenden SPIOs vor der Erkrankung schützen (siehe Abbildung 2.30).

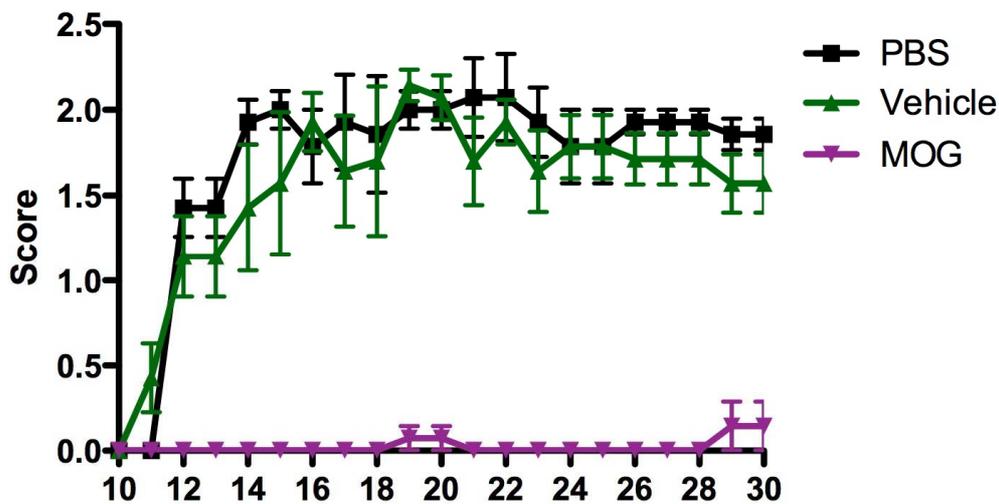


Abbildung 2.30: EAE-Score von Mäusen, die einen Tag nach der krankheitsauslösenden Immunisierung mit MOG-Peptid mit verschiedenen Lösungen behandelt wurden. Nur die Mäuse, denen MOG-tragenden SPIOs injiziert wurden, waren vor der Krankheit geschützt. Vehicle = ungekoppelter SPIO, C57BL/6 Mäuse, Mittelwert \pm s.e.m. mit $n = 7$.

Somit wurde gezeigt, dass polymerumhüllte SPIOs nach einer Kopplung an ein Peptid prinzipiell dazu geeignet sind, dieses in die LSEC zu transportieren und dadurch einen Schutz vor Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose zu induzieren.

2.4.3 Metabolismus

2.4.3.1 Eisenstoffwechsel

Eisen ist ein natürliches Spurenelement. Es wird im Darm aus der Nahrung ausschließlich in zweiwertiger Form als Häm-Eisen über den Hämtransporter 1 (HCP1) oder als ionisches Eisen über den Divalenten-Metall-Transporter (DMT1) in die Enterozyten des Dünndarms aufgenommen. Von dort aus wird das Eisen über den

Eisenexporter Ferroportin in die Pfortader entlassen und dabei von Hephästin zu Fe^{3+} oxidiert, das im Blut an Apotransferrin gebunden wird (siehe Abbildung 2.31A).²⁰⁷

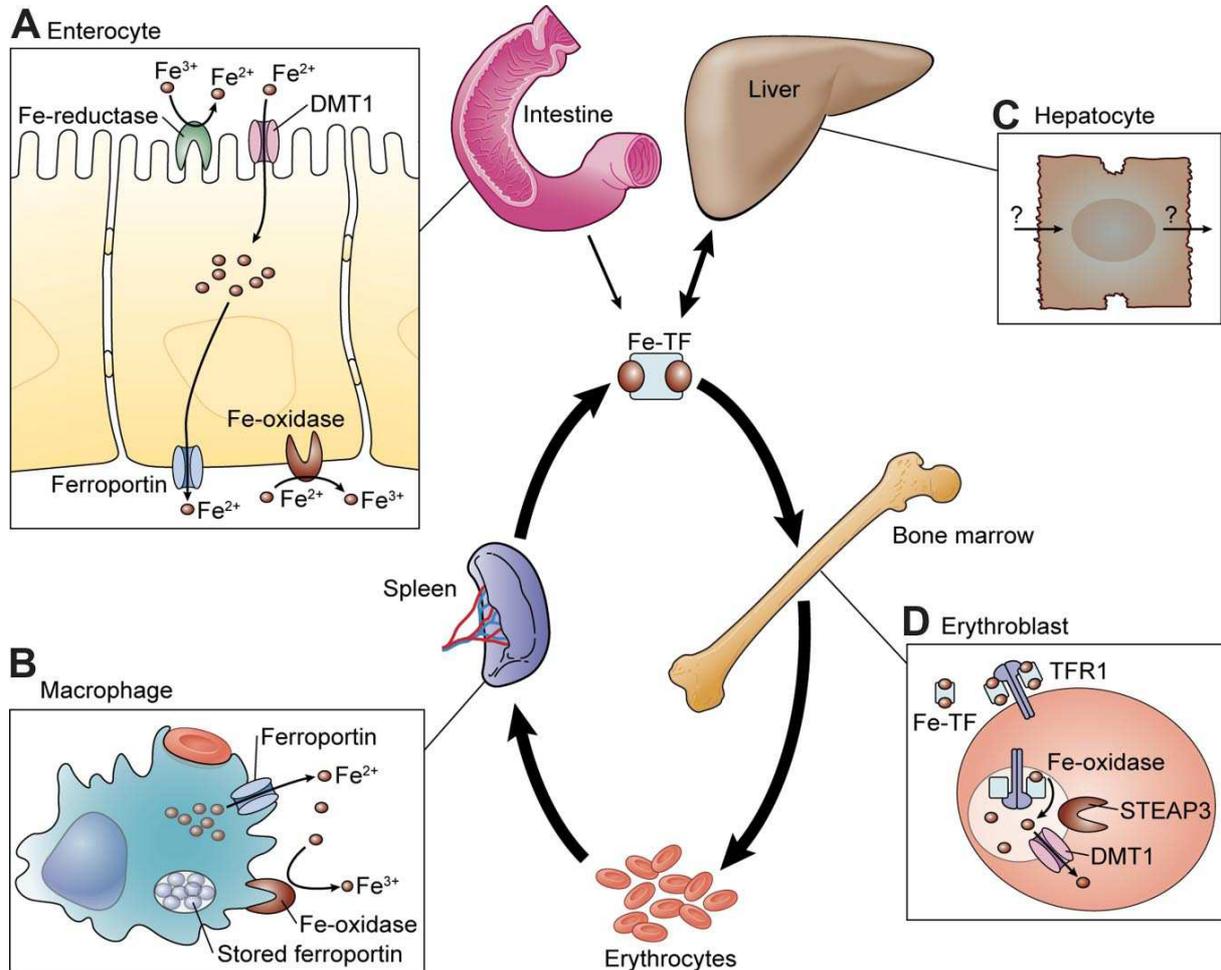


Abbildung 2.31: Überblick über die Eisenhomeostase. Mittig ist die Zirkulation des Eisens innerhalb des Körpers dargestellt. Es gelangt vom Dünndarm in den Blutstrom, wo es an Transferrin (Tf) gebunden wird. Dann wird es weiter zum Hauptverbraucher Knochenmark transportiert. Dort wird es in neugebildete Erythrozyten inkorporiert. Gewebsmakrophagen phagozytieren alternde Erythrozyten und verwerten so das Eisen wieder (Milz). Die Speicherung von Eisen erfolgt in den Hepatozyten in Form von Ferritin. Bei der Mobilisierung der Eisenspeicher wird das Eisen wieder an Tf gebunden und im Blut transportiert. Der zelluläre Eisentransport ist schematisch in den vier Ecken der Abbildung dargestellt:

A Nicht-Häm-Eisentransport durch einen intestinalen Enterozyten: Fe^{3+} aus der Nahrung wird von der Ferrireduktase Duodenal Cytochrom B (Dcytb) zu Fe^{2+} reduziert. Dieses wird über den Divalenten-Metall-Transporter (DMT1) in den Enterozyten transportiert. Der Export erfolgt über Ferroportin und Fe^{2+} wird dabei von Hephästin zu Fe^{3+} reoxidiert. Im Blutstrom bindet das Eisen an Apotransferrin.

B Erythrophagozytose und Eisenrecycling in einem Gewebsmakrophagen.

C Hepatozytärer Eisentransport. Die Pfeile deuten den nicht gänzlich geklärten Import und Export an.

D Eisenaufnahme durch den Transferrinzyklus im Erythroblasten.

(Graphik entnommen aus ²⁰⁸).

Transferrin (Tf) versorgt alle Zellen bedarfsangepasst mit Eisen, wobei die Erythropoese im Knochenmark für die Hämsynthese die Hauptmenge an Eisen benötigt. Nach der rezeptormediierten Aufnahme gelangt Tf in das Endosom. Das

saure Milieu führt zu einer Konformationsänderung, die die Freigabe von Eisen erleichtert. Das freigesetzte Eisen wird durch Ferrireduktase (STEAP3) zu Fe^{2+} reduziert, welches via DMT1 durch die Endosom-Membran ins Zytoplasma transportiert wird.²⁰⁹ Überschüssiges Eisen wird in Zellen der Leber, Knochenmark und Muskulatur in Form von Ferritin gespeichert, da freies Eisen in Zellen katalytisch aktiv (Fenton-Reaktion) und toxisch ist.

Die Eisenhomeostase wird von Hepcidin und Ferroportin kontrolliert. Hepcidin, ein Akutphasenprotein, steigt bei hohem Körpereisen an und induziert dann die Internalisierung und Degradation von Ferroportin. Dadurch wird die enterale Eisenresorption sowie die Freigabe von Eisen aus den Makrophagen oder Hepatozyten unterbunden (siehe Abbildung 2.32).

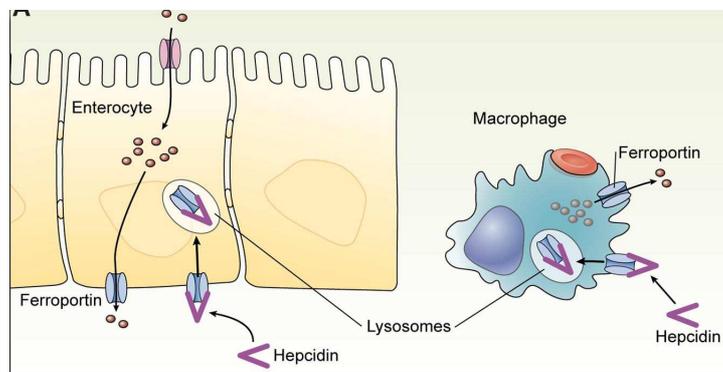


Abbildung 2.32: Wirkung des Hepcidins auf das Ferroportin der Enterozyten und Makrophagen. Hepcidin bindet an Ferroportin und triggert damit dessen Internalisierung und lysosomale Degradation. (Abbildung adaptiert aus²⁰⁸)

Wenn ein SPIO im Körper abgebaut wird, sollte das frei werdende Fe in den zellulären Eisenpool von z.B. einer KZ eingespeist werden. Dort wird es entweder als Ferritin gespeichert oder über Ferroportin ins Blut transportiert werden, wobei der Anteil jeweils vom Gesamteisenstatus des Körpers abhängt. Im Eisenmangel wird der Hauptanteil an freiem Eisen ins Knochenmark transportiert, bei gefüllten Eisenreserven ist der Anteil eher kleiner (siehe Abbildung 2.33). Daraus folgt, dass bei der Verwendung radioaktiv markierter SPIOs, ^{59}Fe -markierte Erythrozyten im Blut auftauchen müssten, wenn die Partikel degradiert werden.

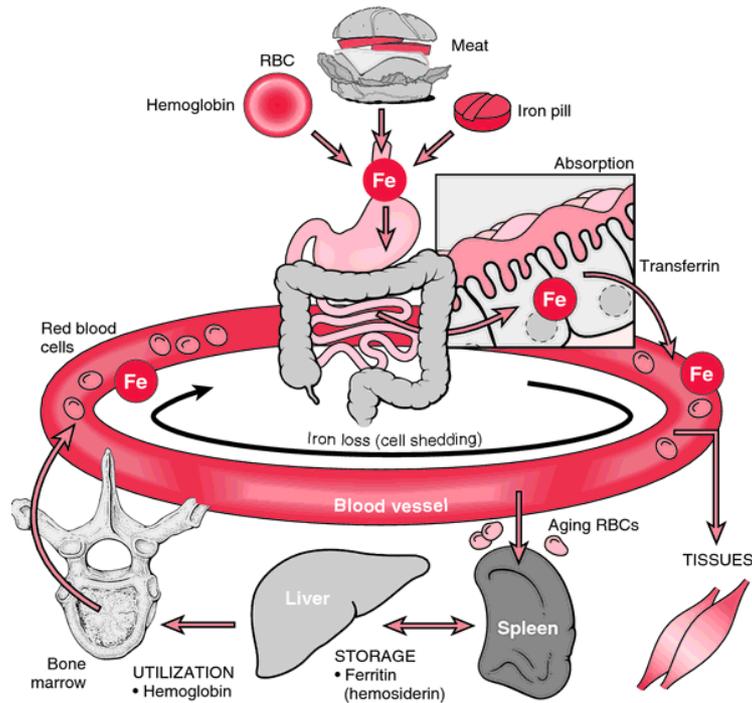


Abbildung 2.33 Eisenstoffwechsel im Körper: Eisen wird im Darm aus der Nahrung absorbiert, im Blut an Transferrin gebunden transportiert, in der Leber in Form von Ferritin gespeichert und im Knochenmark in neugebildete Erythrozyten eingebaut. (Abbildung übernommen aus²¹⁰).

In der Vergangenheit, fanden Weissleder *et al.* bereits, dass das Eisen aus dem polydispersen dextranhüllten SPIO AMI-25, biodegradierbar und bioverfügbar ist und in die Erythrozyten in Form von Hämoglobin inkorporiert wird.¹⁶⁵ In Studien, die Lichtmikroskope verwendeten, konnte gezeigt werden, dass das anfärbbare Eisen innerhalb von zwei Wochen nach i.v. Injektion aus der Leber der Ratten verschwand, während die ⁵⁹Fe-Daten auf eine 3 - 4-tägige Halbwertszeit in der Milz hindeuten.²¹¹ Auch im MRT zeigte sich sowohl im Tier als auch im Mensch, dass nach 3 - 7 Tagen die Schwärzung der Leber wieder in Richtung der Basislinie des normalen Gewebes rückläufig war.^{40,212}

Des Weiteren fand die Gruppe um Wisse, die ebenfalls AMI-25 verwendete, dass Kupffer Zellen das Eisen langsamer freisetzen als Endothelzellen.²¹³

Pouliquen *et al.* verwendeten ebenfalls einen dextranhüllten SPIO, der ungefähr halb so groß ist wie AMI-25. Durch Elektronenmikroskopie fanden sie heraus, dass dieser SPIO hauptsächlich von Makrophagen aufgenommen wird. Der Metabolismus erfolgte schnell. In Lysosomen fanden sich neben den SPIOs auch Ferritin, welches vermutlich aus der Verstoffwechslung stammt. Der Rückgang des T₂-Kontrastes auf den Anfangswert erfolgte schneller als bei AMI-25.¹⁷⁰

Skotland *et al.* verwendeten Clariscan[®], einen stärkeumhüllten 6,4 nm großen SPIO, um *in vitro* die Degradation in den Lysosomen nachzustellen. Der Abbau beschleunigt sich durch eine Erniedrigung des pH-Wertes von 5 auf 4,5 von 22 auf 10 Tage. Des Weiteren zeigte sich, dass die Degradation in einem Acetatpuffer langsamer als in einem chelatisierenden Citratpuffer verlief. Dies deutet darauf hin, dass bei dem Abbau der SPIOs *in vivo* nicht nur der saure pH der Lysosomen, sondern auch die endogenen Fe-chelatisierenden Verbindungen eine wichtige Rolle spielen.¹⁷¹

Die bisher bekannten Ergebnisse über den Abbau von SPIOs lassen folgenden Mechanismus vermuten: Der SPIO wird gegebenenfalls rezeptorvermittelt endozytiert. Das so entstandene frühe Endosom reift zum späten Endosom heran, durch die Fusion mit einem Lysosom entsteht ein Endolysosom. Durch den sauren pH-Wert und die Anwesenheit Fe-chelatisierender Substanzen wird der SPIO degradiert (siehe Abbildung 2.34).²¹⁴

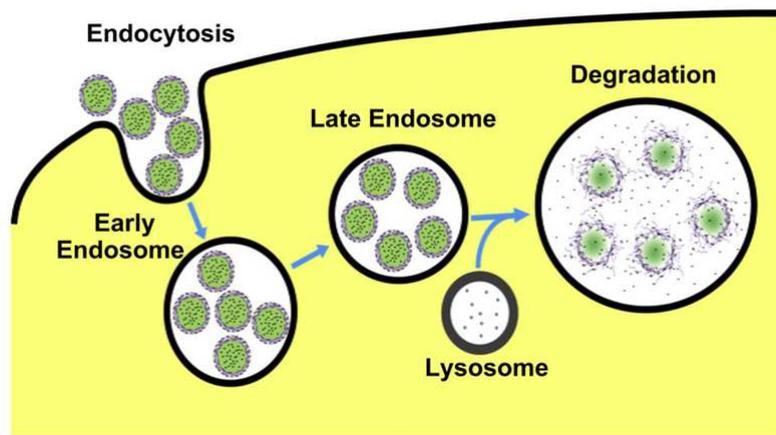


Abbildung 2.34: Aufnahme und Abbau von SPIOs in Zellen: Die SPIOs werden durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Das frühe Endosom wird zum späten Endosom, durch die Vereinigung mit einem Lysosom entsteht ein saures Milieu und es kommt zu Degradation der SPIOs. (Abbildung entnommen aus ²¹⁴).

Uns ging es darum zu untersuchen, ob die von uns verwendeten Hüllen und / oder der Zelltyp, in den die Partikel aufgenommen werden, einen Einfluss auf den Metabolismus haben.

2.4.3.2 Metabolismus in Abhängigkeit von der Kerngröße des SPIOs

Um zu untersuchen, in wie weit die Kerngröße des SPIOs einen Einfluss auf den Abbau des Partikels hat, wurde ein Ligandenaustausch (siehe Kapitel 2.2) bei Kernen der Größe 4 nm und 10 nm durchgeführt. Da der gleiche Ligand für beide Kerne verwendet wurde und die Aufnahme in verschiedene Organe wahrscheinlich zu großen Teilen von der Partikeloberfläche abhängt, kann davon ausgegangen werden, dass Unterschiede im Metabolismus hauptsächlich von der Kerngröße abhängen. Gerade der PEGylierte 4 nm SPIO könnte eine medizinisch hohe Relevanz erlangen, da er als T₁-Kontrastmittel verwendet werden könnte.³⁵

Die ⁵⁹Fe-markierten Kerne wurden nach dem Ligandenaustausch Mäusen i.v. appliziert. Es handelte sich dabei in allen Versuchen um junge Mäuse (8 - 12 Wochen) im Körperwachstum, die tendenziell einen leichten Eisenmangel aufwiesen (normaler Hämoglobin-Wert zwischen 11 und 13). In den Versuchen wurde den Mäusen zwischen 10 µg und 50 µg Eisen appliziert, das entspricht 0,4 - 2 mg/kg. Zur Einordnung dieser Werte sollte bedacht werden, dass die Leber einer eisendefizienten Maus 59,5 µg, einer eisenadäquaten Maus 106 µg und einer eisenüberladenen Maus durchschnittlich 1600 µg Fe enthält. Die Plasma-Eisen-Turnover-Rate beträgt im eisenadäquaten Fall 14 µg pro Maus pro Tag.¹⁹⁴ Es kommt also durch die Injektion der SPIOs nicht zu einer Eisenüberladung der Tiere.

Durch regelmäßige Blutabnahmen wurde die ⁵⁹Fe-Aktivität im Blut bestimmt. Aus dem berechneten Blutvolumen und der jeweils zeitnah gemessenen ⁵⁹Fe-Ganzkörperretention (GKR) lässt sich die Erythrozyteninkorporation (EI) ermitteln (⁵⁹Fe-Aktivität im Blut / ⁵⁹Fe-GKR). Es zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen der ionischen Tracerdosis und den SPIOs (siehe Abbildung 2.35). Die Tracerdosis taucht sehr schnell im Blut auf, bereits nach einer Woche finden sich ca. 80% der injizierten Dosis in den neugebildeten Erythrozyten wieder. Nach zwei Wochen sind es sogar bereits über 90%, was man bei einem Eisenmangel erwarten würde. Das ⁵⁹Fe aus den SPIOs erscheint langsamer im Blut, nach 7 Tagen sind erst ca. 30% in die Erythrozyten inkorporiert worden. Die maximale EI wird nach 3 - 4 Wochen erreicht und liegt bei ca. 60%. Es lassen sich kaum Unterschiede zwischen den zwei verschiedenen Kerngrößen feststellen, was darauf hindeutet, dass das Entfernen des Liganden und der Beginn des Verdauens der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Der Verdau an sich verläuft dann so schnell, dass der biologisch gesehen geringe

Unterschied zwischen einem 4 nm und einem 10 nm großen Partikel nicht detektiert werden kann.

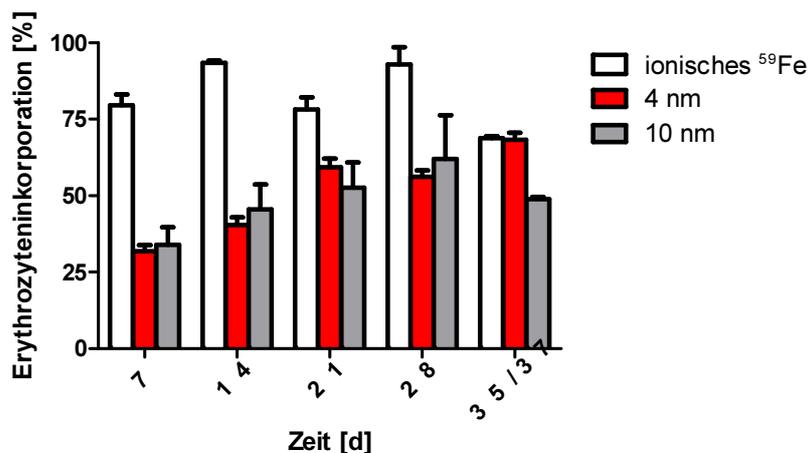


Abbildung 2.35: Erythrozyteninkorporation von ⁵⁹Fe nach i.v. Injektion: Die Abgabe des ⁵⁹Fe in den Körper-Eisen-Pool erfolgt langsamer für das Eisen aus den PEGylierten SPIOs (ca. 25 µg Fe / Maus) als für die Tracerdosis (ca. 5 ng Fe / Maus). Während fast alles Fe der ionischen Tracerdosis für die Erythropoese zur Verfügung steht, finden sich maximal 60% der Radioaktivität aus den PEGylierten SPIOs im Blut. Es kann kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Größen detektiert werden, BALB/C-Mäuse, Mittelwert ± s.e.m. mit n ≥ 3.

Um herauszufinden, ob die SPIOs wirklich in Leber und Milz abgebaut werden und das ⁵⁹Fe für die Erythropoese verwendet wird, wurden die Tiere nach 5 Wochen getötet und die prozentuale Organverteilung mit der nach 24 h im Falle der Tracerdosis (zur Ausblendung von Umverteilungsphänomenen) und nach 2 h (vier Halbwertszeiten) für die SPIOs, verglichen (siehe Abbildung 2.36). Im Fall der 10 nm Kerne stand nur eine Maus für den frühen Zeitpunkt zu Verfügung.

Es zeigte sich, dass in allen drei Fällen die Menge an ⁵⁹Fe in Leber und Milz stark abnimmt und wie erwartet in den neugebildeten Erythrozyten wieder auftaucht.

2. Ergebnisse und Diskussion

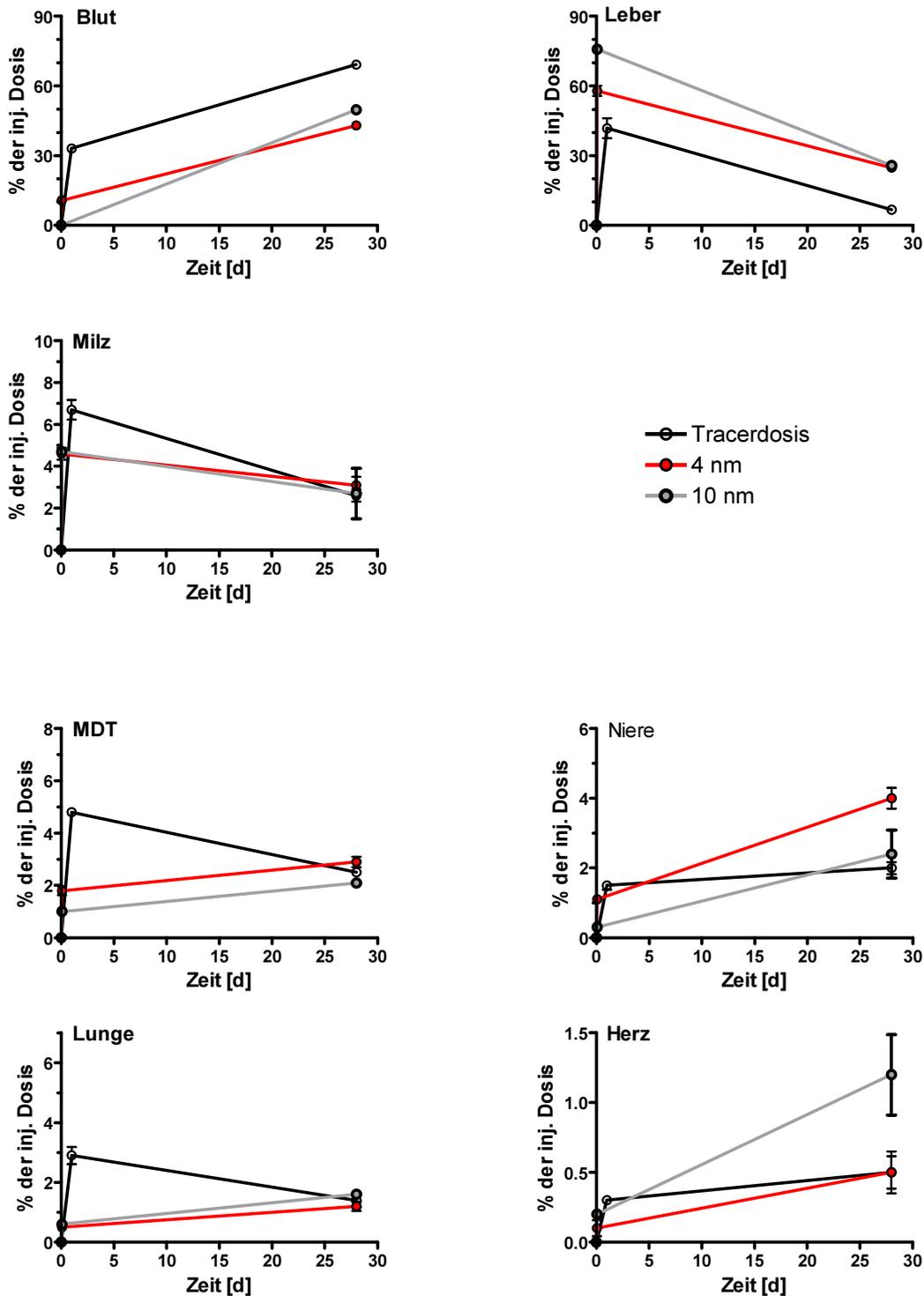


Abbildung 2.36: Organverteilung von ^{59}Fe kurz und 5 Wochen nach i.v. Injektion. Auf Grund der erheblichen Metabolisierung der SPIOs wird ^{59}Fe aus der Leber und der Milz freigesetzt, ins Knochenmark transportiert und in das Hämoglobin neugebildeter Erythrozyten inkorporiert. Der Umfang der Verstoffwechslung hängt von der Darreichungsform des ^{59}Fe ab. MDT = Magen-Darm-Trakt, BALB/C-Mäuse, Mittelwerte \pm SEM, mit $n \geq 1$.

Es sollte verifiziert werden, dass es sich bei der Radioaktivität in den Blutproben wirklich um einen Einbau in die Erythrozyten handelt. Dazu wurden die Erythrozyten

nachdem sie durch Zentrifugation vom Plasma getrennt wurden mittels Saponin aufgelöst und dann einer SEC unterzogen. Die Radioaktivität eluierte in den Fraktionen des Hämoglobins, der erste kleinere Peak ist wahrscheinlich ein Artefakt der Säule (siehe Abbildung 2.37).

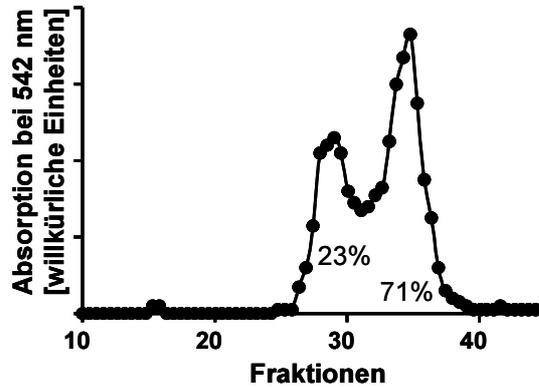
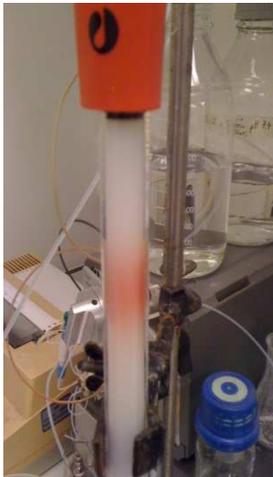


Abbildung 2.37: Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie einer mit Saponin aufgelösten Erythrozytenprobe. Die Radioaktivität wird in den Fraktionen des Hämoglobins eluiert.

Dass nicht alles ^{59}Fe aus den PEGylierten SPIOs für die Erythropoese zu Verfügung steht, könnte darauf hin deuten, dass die SPIOs von Zellen aufgenommen wurden, die sie unterschiedlich schnell metabolisieren können. Dieser Umstand sollte näher untersucht werden.

2.4.3.3 Metabolismus in Abhängigkeit des absorbierenden Zelltyps

Da wir bereits untersucht haben, von welchen Zellen die polymerumhüllten und in rekombinante TRL eingebetteten SPIOs aufgenommen werden, wurde der Abbau dieser SPIOs mit dem Stoffwechselweg einer ionischen Tracerdosis ^{59}Fe verglichen (siehe Abbildung 2.38).

Die Tracerdosis verhielt sich wie in Kapitel 2.4.3.2 beschrieben. Das ^{59}Fe aus den rekombinanten TRL tauchte langsamer als die ionische Tracerdosis in den Erythrozyten auf. Nach einer Woche fanden sich erst ca. 50 % im Blut, nach zwei Wochen stieg dieser Wert auf ca. 80 % und näherte sich einem Plateau. Die EI des ^{59}Fe aus den polymerumhüllten SPIOs verläuft nochmals langsamer, das Plateau wird erst nach drei Wochen erreicht und liegt bei 45%. Damit werden sie zu einem noch kleineren Anteil als die PEGylierten SPIOs verstoffwechselt (siehe Abbildung 2.35).

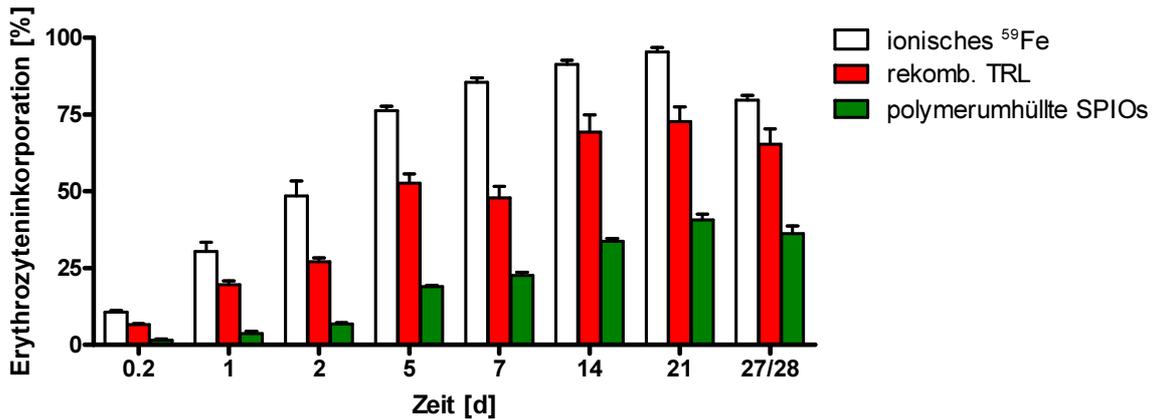


Abbildung 2.38: Erythrozyteninkorporation von ⁵⁹Fe nach i.v. Injektion: Die Abgabe des ⁵⁹Fe in den Körper-Eisen-Pool erfolgt langsamer für das Eisen aus den rekombinanten Chylomikronen (ca. 11 µg Fe / Maus) und nochmals langsamer für die polymerumhüllten SPIOs (ca. 47 µg Fe / Maus) im Vergleich zur ionischen Tracerdosis (ca. 16 ng Fe / Maus). Während fast das gesamte Fe der Tracerdosis und aus den rekombinanten Chylomikronen für die Erythropoese zur Verfügung steht, finden sich maximal 40 % der Radioaktivität aus polymerumhüllten SPIOs im Blut, BALB/C-Mäuse, Mittelwert ± s.e.m. mit n ≥ 3.

Diese Ergebnisse lassen verschiedene Interpretationen zu. Zum einen scheinen die SPIOs so gut wie ausschließlich in den KZ verstoffwechselt zu werden. Es ist wahrscheinlich, dass es sich bei den Vesikeln, die man im Elektronenmikroskop sieht (siehe Abbildung 2.27, Abbildung 2.28) und die die SPIOs enthalten, um Lysosomen handelt.^{215,216} Die SPIOs könnten dort durch den sauren pH aufgelöst werden. Während die KZ ihren aufgenommenen Anteil an SPIOs schnell wieder in Form von Eisen freisetzen, verhält es sich für die SPIOs, die in die LSEC aufgenommen wurden, anders. Die LSEC scheinen entweder gar nicht oder stark verlangsamt die SPIOs zu metabolisieren. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass es zwar zu einer Verstoffwechslung kommt, das Eisen jedoch nicht in den Blutkreislauf abgegeben wird. Ein verlangsamer Metabolismus und eine langsamere Freisetzung von Eisen aus Endothelzellen wurde bereits früher beschrieben.^{213,217} So konnte auch schon beobachtet werden, dass es bei einer Gabe von Eisendextranpräparaten beim Menschen zu einer als „residuelle Endothelsiderose“ bezeichneten Ablagerung von Eisen kommt, die noch Jahre nach der i.v. Injektion nachweisbar waren.²¹⁸

Das unterschiedliche Verhalten der Zellen führt dazu, dass auch zum Zeitpunkt der maximalen EI nur 40% der Radioaktivität aus den polymerumhüllten SPIOs sich im Blut findet, da hier ein großer Anteil von den Endothelzellen aufgenommen wurde. Bei den rekombinanten TRL wird der Großteil der Partikel von den KZ aufgenommen, die auf den Abbau und Abtransport von Eisen aus alten Erythrozyten spezialisiert sind. Hier steht das freigesetzte ⁵⁹Fe deswegen nach 1 - 2 Wochen für die Erythropoese zur

Verfügung. Des Weiteren fällt auf, dass die ionische Tracerdosis schneller im Blut auftaucht als das Eisen aus den rekombinanten TRL. Diese Verzögerung weist darauf hin, dass sowohl die Entfernung der Hülle als auch der Abbau des Kristalls Zeit in Anspruch nehmen. Dass es bei den polymerumhüllten SPIOs sogar 21 Tage braucht, bis das Maximum der EI erreicht ist, zeigt, dass die Entfernung des nicht im Körper natürlich vorkommenden Polymers nochmals länger dauert als die Entfernung der Lipide.

Die Organverteilung des ^{59}Fe ändert sich in allen drei Mausgruppen innerhalb von 4 Wochen signifikant. Der Anteil in Leber und Milz sinkt und die dort abgegebene Radioaktivität taucht im Blut auf (siehe Abbildung 2.39). Dass hier in vielen peripheren Geweben nach 4 Wochen ein erhöhter Anteil an ^{59}Fe gefunden wird, liegt wohl in der erhöhten spezifischen Aktivität des Blutes und der nicht perfekten Perfusion dieser Organe und Gewebe begründet.

2. Ergebnisse und Diskussion

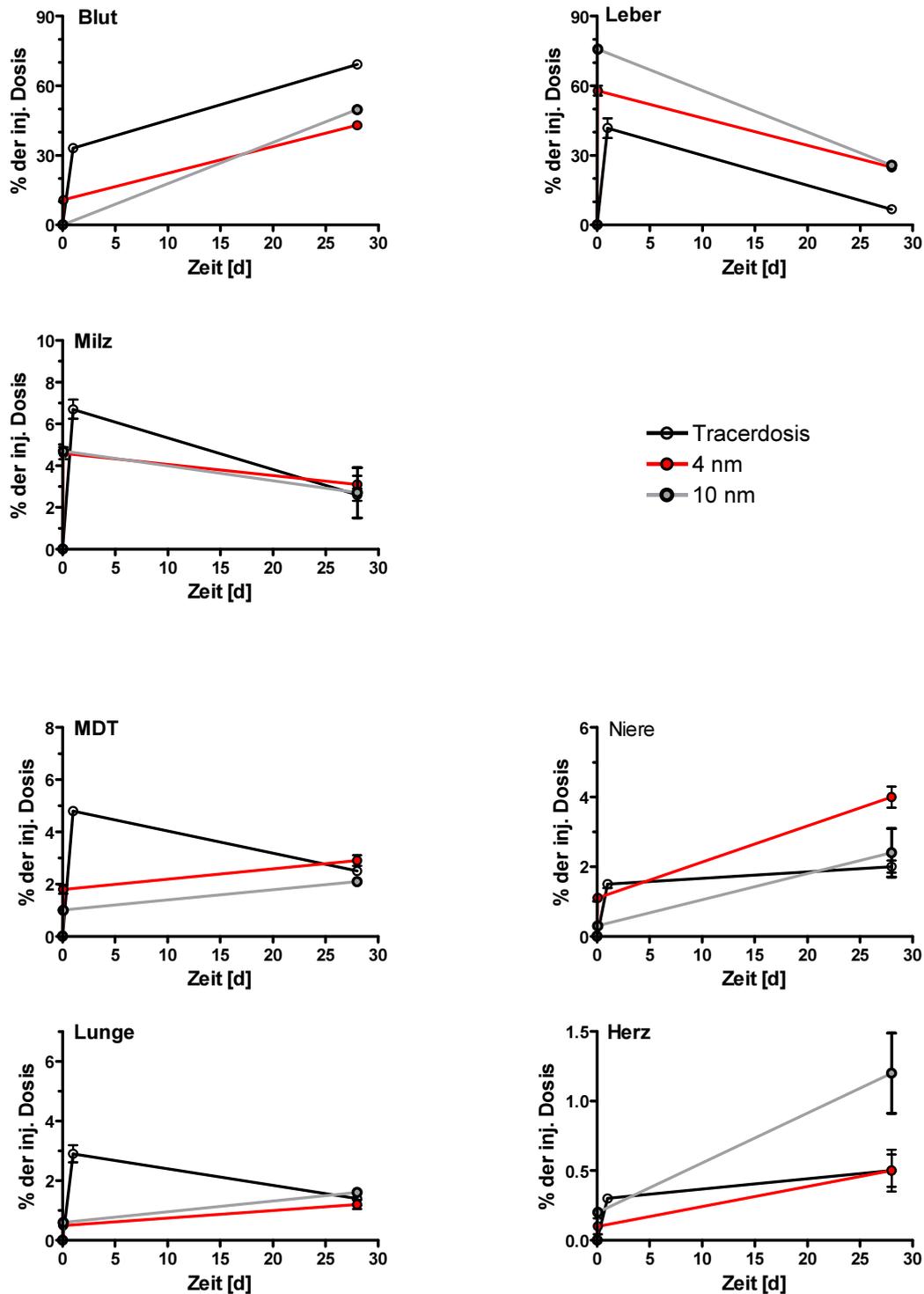


Abbildung 2.39: Organverteilung von ^{59}Fe kurz und 4 Wochen nach i.v. Injektion: Auf Grund der erheblichen Metabolisierung der SPIOs wird ^{59}Fe aus der Leber und der Milz freigesetzt, ins Knochenmark transportiert und in das Hämoglobin neugebildeter Erythrozyten inkorporiert. Der Umfang der Verstoffwechslung hängt von der Darreichungsform des ^{59}Fe ab. MDT=Magen-Darm-Trakt, BALB/C-Mäuse, Mittelwerte \pm SEM, mit $n \geq 3$.

Um zu verifizieren, dass der schnelle Abbau der SPIOs im Wesentlichen durch die Aufnahme in stoffwechselaktive KZ bedingt ist, wurden die Makrophagen mittels

Clodronat zwei Tage vor Injektion der SPIOs depletiert. Dann wurde ^{59}Fe in den oben genannten Formulierungen appliziert und erneut die ^{59}Fe -EI bestimmt (siehe Abbildung 2.40).

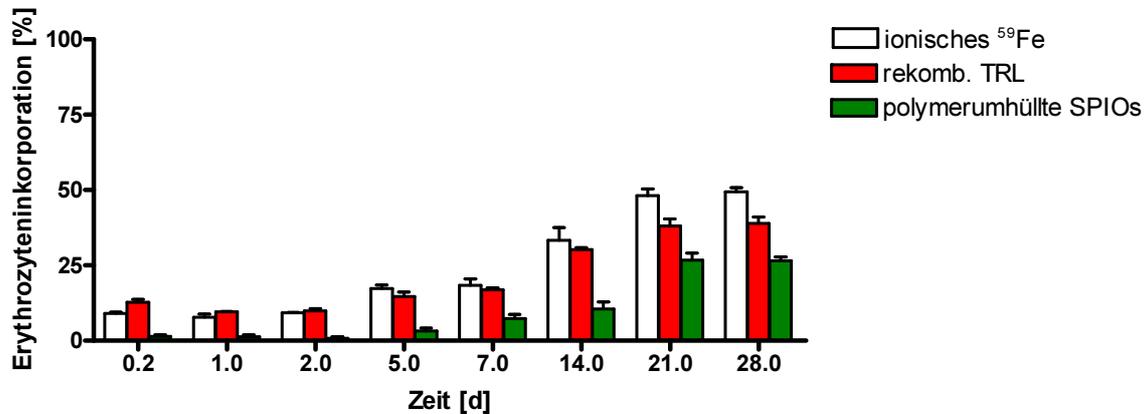


Abbildung 2.40: Erythrozyteninkorporation von ^{59}Fe nach i.v. Injektion, der eine Behandlung mit Clodronat-Liposomen vorangegangen ist: Nach der Depletion der Makrophagen ist die Inkorporation für alle drei Darreichungsformen stark verlangsamt, nur 50 % des Eisens aus der ionischen Tracerdosis (ca. 15 ng Fe / Maus), 40% des Eisens aus rekombinanten Chylomikronen (ca. 11 μg Fe / Maus) und sogar nur 25% des Fe aus polymerumhüllten SPIOs (ca. 23 μg Fe / Maus) erscheinen im Blut, BALB/C-Mäuse, Mittelwert \pm s.e.m. mit $n \geq 3$.

Es zeigt sich, dass die Depletion der Makrophagen die Inkorporation des ^{59}Fe stark hemmt. In allen drei Gruppen tauchen nach einer Woche nicht mehr als 20 % der Radioaktivität in den Erythrozyten auf. Wenn sich nach 5 Tagen neue Makrophagen in der Leber gebildet haben, scheint sich der Abbau der SPIOs zu beschleunigen. Doch auch die maximale ^{59}Fe -EI liegt bei der Gruppe, die die Tracerdosis erhalten hat, bei ca. 50 %, bei der Gruppe, der rekombinante TRL injiziert wurde, bei etwas über 40% und bei der Gruppe, die polymerumhüllte SPIOs erhalten hat, sogar nur bei 25%.

Dies spricht dafür, dass das ^{59}Fe in Zellen gelangt ist, die nicht in der Lage sind, das Eisen in gleichem Umfang wie die Makrophagen an das Blut abzugeben und die SPIOs in gewohnter Form zu verstoffwechseln. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Endothelzellen. Dass es besonders in den ersten 5 Tagen nur zu einer sehr geringen ^{59}Fe -Freisetzung kommt und erst mit dem Wiederauftauchen der hepatischen Makrophagen der Prozess der EI beschleunigt wird, lässt vermuten, dass die SPIOs aus den LSEC in die neugebildeten KZ gelangen. Eine Möglichkeit wäre, dass es einen Partikeltransport von den LSEC in die neugebildeten KZ gibt. Dafür wäre aber eine umfangreiche Exozytose der SPIOs notwendig, die so noch nie beschrieben wurde. Es ist daher wahrscheinlicher, dass eine Population von Endothelzellen nach Partikelaufnahme abstirbt und die Rückstände von einer neu gebildeten

2. Ergebnisse und Diskussion

Makrophagenpopulation übernommen werden und die SPIOs erst dann abgebaut werden.

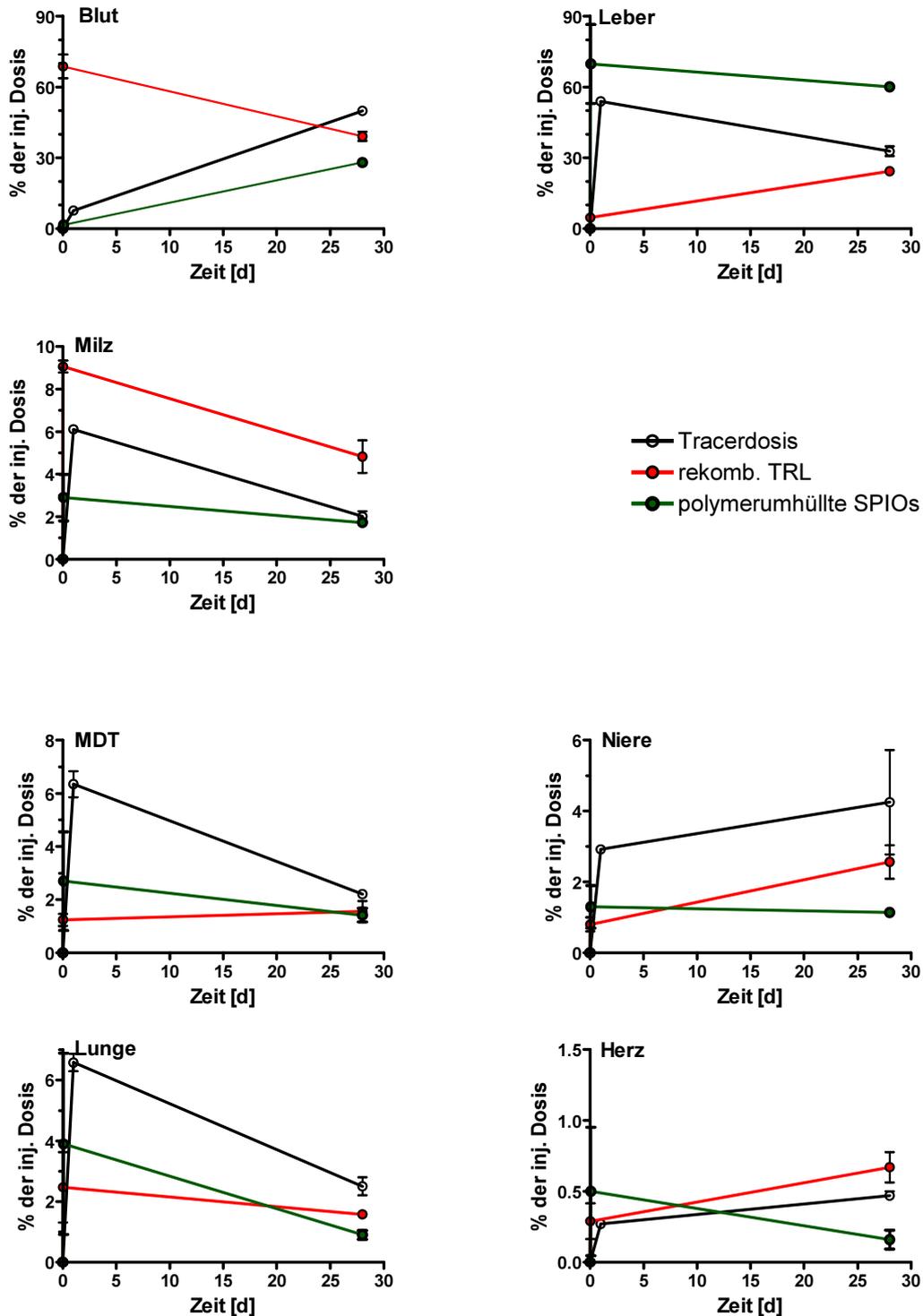


Abbildung 2.41: Organverteilung von ^{59}Fe kurz und 4 Wochen nach i.v. Injektion in Mäusen die zwei Tage vor Injektion mit Clodronat-Liposomen behandelt wurden. Der Umfang der Metabolisierung ist geringer, hängt aber immer noch von der Darreichungsform des ^{59}Fe ab. Leber und Milz geben freies ^{59}Fe ab, das dann in neugebildete Erythrozyten inkorporiert wird. BALB/C-Mäuse, Mittelwerte \pm SEM, mit $n \geq 2$.

Auch nach Clodronat-Gabe werden SPIOs in Milz und Leber abgebaut und das so freigesetzte Fe taucht im Blut auf (siehe Abbildung 2.41). Für die Mäuse, die die rekombinanten TRL erhalten haben, ist dieser Abfall in der Leber nicht zu beobachten, da die Aufnahme nach einer Stunde noch nicht abgeschlossen war und ein Großteil der Radioaktivität zu diesem Zeitpunkt noch im Blut zirkulierte. Der Zeitpunkt der Tötung war mit einer Stunde zu früh gewählt. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass sich hier der Abbau in Leber und Milz und das Auftauchen im Blut prinzipiell so wie in den anderen Fällen verhält.

Wenn man die Organverteilung nach 4 Wochen bei den Mausgruppen, die das ^{59}Fe in der gleichen Form aber mit oder ohne vorherige Clodronat-Gabe erhalten haben, vergleicht, lassen sich Unterschiede erkennen. Erwartungsgemäß finden sich in den Mausgruppen, die vorher Clodronat erhalten haben, nach 4 Wochen ein höherer Anteil an ^{59}Fe in der Leber und dafür ein geringerer Anteil im Blut.

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen lassen sich deutlich die Abbau-Produkte der SPIOs erkennen. Nach 4 Wochen finden sich in Zellen, oft KZ, Vesikel, die wenige intakte SPIOs, aber auch Bereiche mit nicht mehr runden kontrastreichen Strukturen enthalten (siehe Abbildung 2.42A). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um einzelne Ferritinpartikel, also Proteine, die der Eisenspeicherung dienen. Teilweise finden sich auch kleine Vesikel, die mit elektronendichten Strukturen sehr dicht gepackt sind. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich ebenfalls um eisenreiche Kerne aus Ferritin (siehe Abbildung 2.42B). Die von uns gefundenen Strukturen stimmen mit denen von Levy *et al.* beschriebenen überein, die auch SPIOs verabreichten.²¹⁶ Dass es sich bei diesen kontrastreichen Strukturen um Ferritin handelt, zeigt auch der Vergleich mit einer Arbeit von Iancu.¹¹⁸ Dieser beschreibt die Eisenverteilung in Lysosomen wie folgt: In Lysosomen (Siderosomen) findet sich Ferritin (HoloFerritin) mit einem elektronendichten Kern, das über einzelne membrangebundene Vesikel aufgenommen wurde. Im Inneren des Siderosoms assoziieren die Ferritin-Partikel mit Phospholipidmembranen und formen perlenschnurartige Strukturen oder Cluster. Nach der Degradation der Proteinhülle entsteht eine sehr elektronendichte Masse bei der es sich um Hemosiderin handelt.

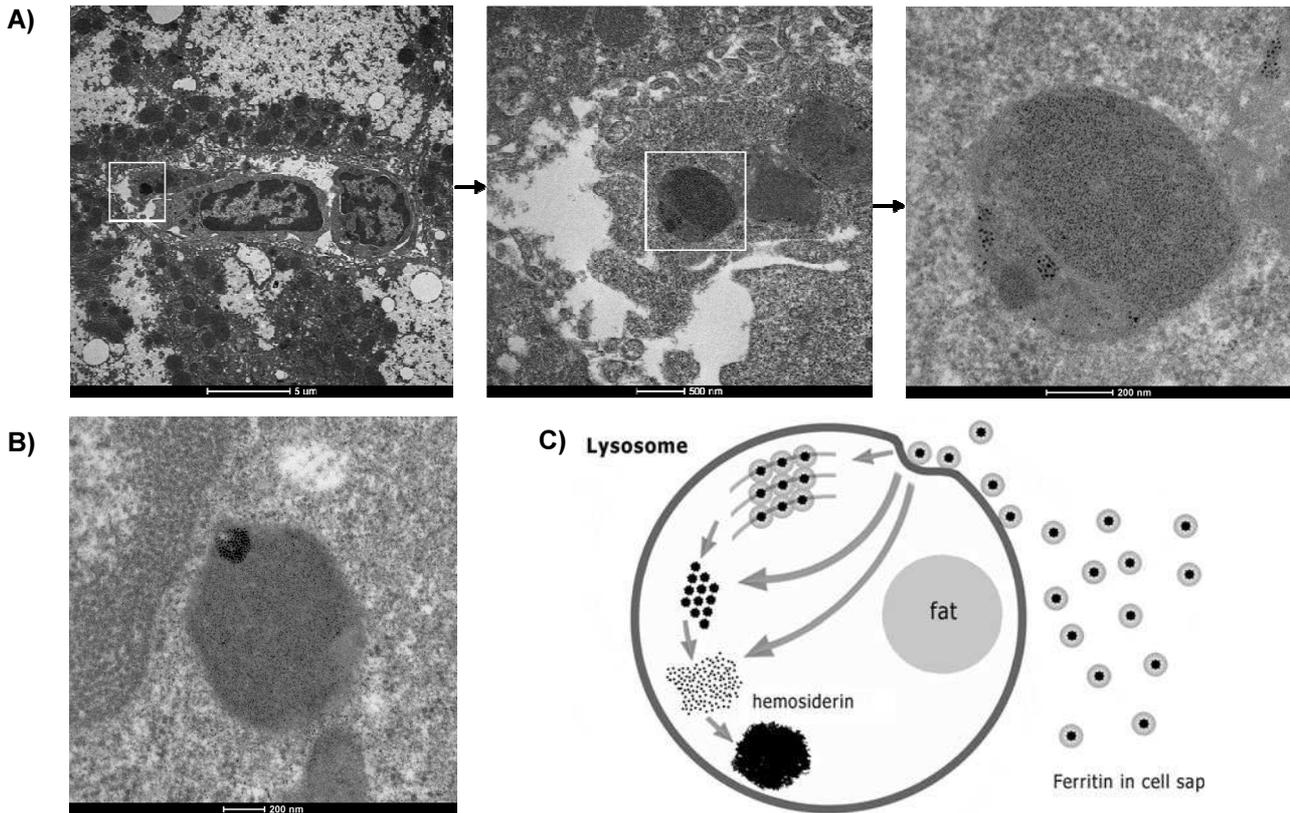


Abbildung 2.42: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Leber 4 Wochen nach i.v. Gabe von rekombinanten Chylomikronen. A) Es finden sich Vesikel in Makrophagen, die noch wenige intakte SPIOs enthalten, aber auch unförmig wirkende einzelne Ferritin-Partikel. Des Weiteren finden sich Vesikel, die einen hohen Kontrast aufweisen und eisenhaltige Kerne aus Ferritin/Hemosiderin enthalten (**B**). **C)** Wahrscheinlich verläuft der Eisenstoffwechsel in Lysosomen (Siderosomen) über Ferritin (Holo ferritin), das über einen elektronendichten Kern verfügt. Im Siderosom assoziieren die Ferritin-Partikel mit Phospholipidmembranen und Formen perlenschnurartige Anordnungen. Nach der Degradation der Proteinhülle entsteht eine sehr elektronendichte Masse bei der es sich um Hemosiderin handelt. (Graphik übernommen aus ¹¹⁸)

2.4.3.4 Modelle zur Beschreibung des Metabolismus

Das besondere an eisenbasierten Nanopartikeln ist, dass es für freigesetztes Eisen aus diesen Partikeln eine physiologische Funktion gibt, die leicht gemessen werden kann: die sogenannte ⁵⁹Fe-EI (siehe auch vorheriges Kapitel). Durch die zusätzliche Messung der ⁵⁹Fe-GKR können kinetische Parameter berechnet werden. Der Abbau der SPIOs kann durch ein einfaches Modell ([2+1]-Kompartiment-System) beschrieben werden (siehe Abbildung 2.43). Man kann davon ausgehen, dass es drei Eisenpools gibt, die im Gleichgewicht stehen:

$$U_{\text{ganzer Körper}} = U_{\text{Transfer}} + U_{\text{Metabolismus}} + U_{\text{Erythro}}$$

Der Eisenstoffwechsel gilt sowohl beim Menschen als auch bei der Maus als gut untersucht und es existieren viele weitere Eisenpools in verschiedenen Organen.¹⁹⁴ Die vielen verschiedenen Ratenkonstanten sind aber in unseren Experimenten nicht mit ausreichender Genauigkeit zu erfassen und werden hier in den Ratenkonstanten k_{ex} und k_{ts} zusammengefasst.

Aus dem Transferpool ($U_{Transfer}$) wird das i.v. applizierte Eisen in die Organe verteilt und als Vereinfachung des Systems wird davon ausgegangen, dass die Ausscheidung aus diesem Pool erfolgt. Die Exkretion von Eisen steht im Gleichgewicht mit dem Gesamtkörper Eisen. Ein Teil des applizierten Eisens ist noch nicht frei verfügbar und befindet sich deswegen in einem Pool, in dem die SPIOs noch verstoffwechselt werden ($U_{Metabolismus}$). Als dritte Möglichkeit wird Eisen aus dem Metabolismuspool für die Erythropoese verwendet ($U_{Erythro}$).

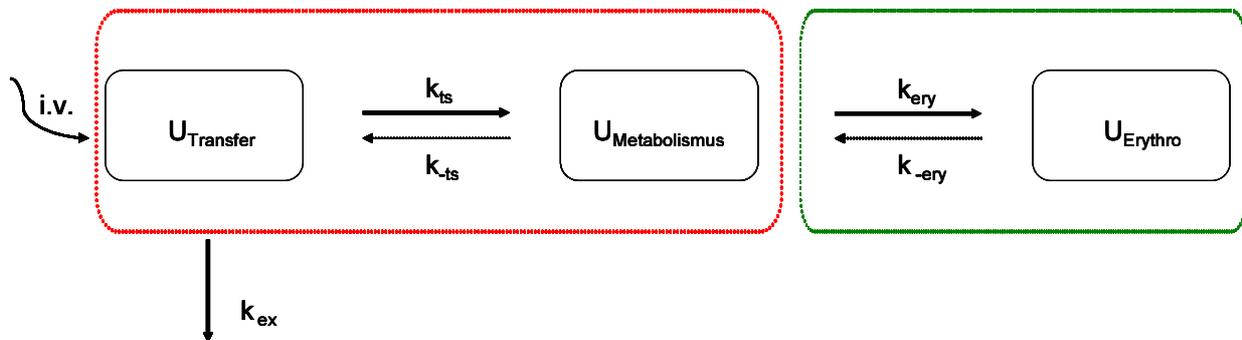


Abbildung 2.43: Modell zur Beschreibung des Metabolismus nach i.v. Bolus-Injektion.

Der linke Teil des Modells, namentlich k_{ex} und k_{ts} , können durch eine mathematische Beschreibung des Verlaufs der GKR dargestellt werden (siehe Kapitel 2.4.4).

Durch eine mathematische Analyse der Erythrozyteninkorporation kann nach Gleichung 2.1 die Sättigungserythrozyteninkorporation (EI_{sat}) und die Transferrate k_{ery} berechnet werden und dadurch das gesamte Modell des Metabolismus mit seinen Transferraten beschreiben werden.

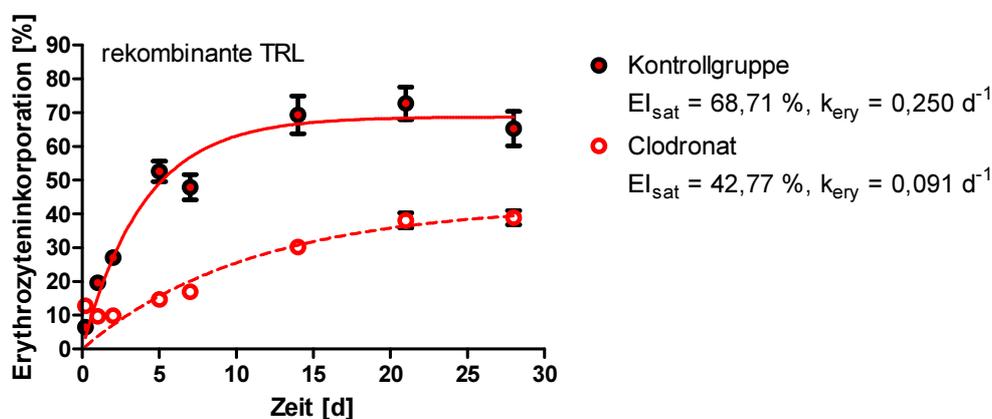
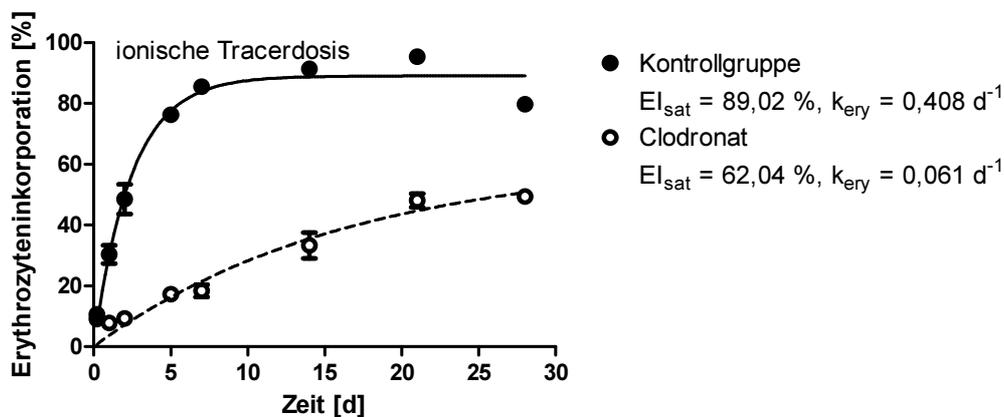
$$EI = EI_{sat} * (1 - \exp(-k_{ery} * t))$$

EI	=	Erythrozyteninkorporation
EI_{sat}	=	Sättigungserythrozyteninkorporation
t	=	Zeit
k_{ery}	=	Transferrate

Gleichung 2.1: Mathematischer Fit der Erythrozyteninkorporation.

Die Rückreaktion k_{ery} (siehe Abbildung 2.43) spielt für den untersuchten Zeitraum keine Rolle, da der Erythrozytenabbau erst zeitlich später beginnt (> 20 Tage) und kann daher vernachlässigt werden. Die relative Höhe von EI_{sat} gibt an, wie viel Eisen aus der betreffenden SPIO-Präparation mobilisiert werden kann, wobei die Daten der Versuche mit einer ionischen Dosis $^{59}\text{FeCl}_3$ als Referenz herangezogen werden. Die Kinetik der ^{59}Fe -EI gibt einen indirekten Eindruck, welche Prozesse in der Leber ablaufen.

Für die ionische Tracerdosis und die rekombinanten TRL ergibt sich sowohl in der Kontroll- als auch in der mit Clodronat behandelten Gruppe eine gute Anpassung des Modells an die experimentell erhaltenen Daten (siehe Abbildung 2.44). Bei den Mäusen, denen polymerumhüllte SPIOs injiziert wurden, war der Fit nur für die unbehandelten Mäuse gut. Die Daten der clodronatbehandelten Tiere konnten nicht mit dieser einfachen Formel beschrieben werden. Dies deutet daraufhin, dass in dieser Tiergruppe andere Transferraten wie die Exkretion so viel größer und geschwindigkeitsbestimmend sind, dass die Zerlegung des Gesamtmodells in zwei Einzelmodelle [2+1] nicht möglich ist (siehe auch Kapitel 2.4.4).



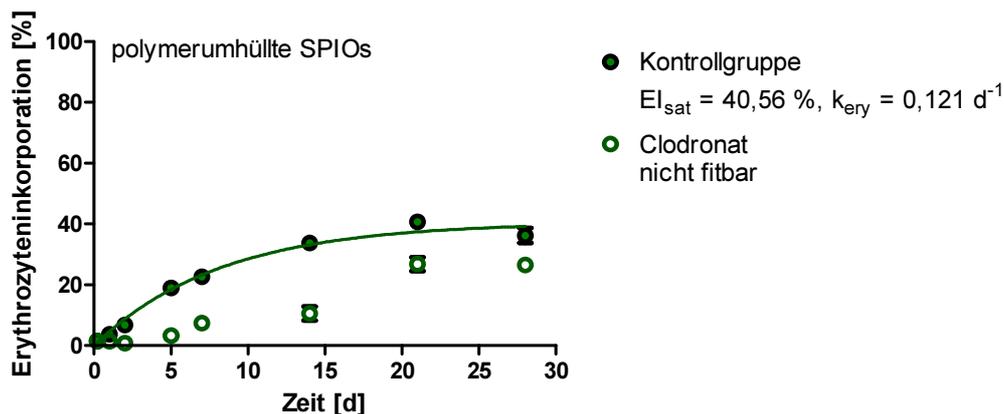


Abbildung 2.44: ^{59}Fe -Erythrozyteninkorporation nach i.v. Applikation von ^{59}Fe : Die experimentellen Daten lassen sich gut durch das [2+1]-Kompartiment-Modell beschreiben. Nur bei der Gruppe, die polymerumhüllte SPIOs und Clodronat erhalten hat, ist ein Fit nicht möglich. BALB/C-Mäuse, $n \geq 3$.

2.4.3.5 Veränderungen der magnetischen Eigenschaften von SPIOs durch den Metabolismus

Bei den SPIOs handelt es sich um superparamagnetische Partikel. Wenn diese abgebaut und die Eisenatome in das Hämoglobin eingebaut werden, gehen die superparamagnetischen Eigenschaften verloren und die erhaltene Verbindung wird paramagnetisch. Die Änderung dieser Suszeptibilität sollte mit einer supraleitenden Quanteninterferenzeinheit (SQUID) messbar sein. Levy *et al.* konnten zeigen, dass es möglich ist, mit der SQUID-Technologie diesen magnetischen Übergang *ex vivo* zu verfolgen. Wir wollten nun zeigen, dass dies auch am lebenden Tier möglich ist.

Den Mäusen wurden i.v. polymerumhüllte SPIOs, rekombinante TRL und Ferinject[®], eine nanopartikuläre Eisencarboxymaltose-Lösung, die zur Eisenmangeltherapie beim Menschen verwendet wird und nicht über superparamagnetische Eigenschaften verfügt, appliziert. Die Mäuse wurden 2 h nach der Injektion im Hamburg Biosuszeptometer gemessen (Abbildung 2.45). Es zeigte sich, dass die rekombinanten TRL eine höhere magnetische Suszeptibilität als die polymerumhüllten SPIOs haben. Tromsdorf *et al.* konnten *in vitro* zeigen, dass es bei der Verkapselung der SPIOs mit Lipiden zu keiner Änderung der Suszeptibilität im Vergleich zu den polymerumhüllten SPIOs kommt, da die SPIOs innerhalb der Mizellen einzeln dispergiert und nicht agglomeriert vorliegen.²¹⁹ Allerdings ändert sich die Situation *in vivo*. Es ist bekannt, dass die rekombinanten TRL über sehr hohe r_2 -Relaxivitäten im MRT verfügen, was zum einen auf die hohe Partikeldichte im Inneren der TRL zurückzuführen ist.²¹⁹ Zum

anderen kommt es innerhalb der Zellen zu einer Clusterung der SPIOs in Zellvesikeln, was zu einer Änderung der magnetischen Eigenschaften und wahrscheinlich auch einer Agglomeration führt.²²⁰ In den Zellen der Tiere, die rekombinante TRL erhalten haben, liegen mehr Partikel pro Vesikel vor als in den Mäusen, die polymerumhüllte SPIOs erhalten haben (siehe Abbildung 2.27, Abbildung 2.28). Dies könnte die höhere magnetische Suszeptibilität der rekombinanten TRL gegenüber den einzeln verpackten SPIOs erklären. Wie erwartet unterscheidet sich die Maus, die paramagnetisches Ferinject[®] erhalten hat, nicht von der Kontrollmaus. Daraus folgt, dass unter diesen Versuchsbedingungen und applizierten Mengen nur superparamagnetische SPIOs durch das SQUID detektiert werden können und nicht an Biomoleküle gebundene Fe-Atome. Somit kann ein Abbau durch eine Abnahme der Suszeptibilität mit Hilfe des SQUIDs untersucht werden.

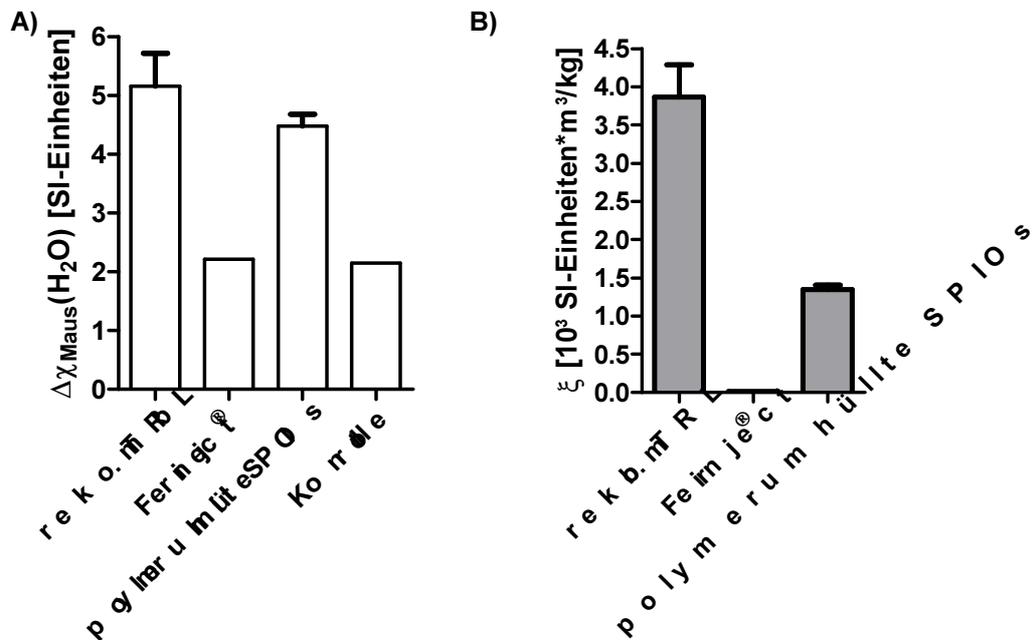


Abbildung 2.45: magnetische Suszeptibilität von Mäusen 2 h nach Injektion verschiedener eisenbasierter Nanopartikel: A) Suszeptibilitätsdifferenz in Bezug auf Wasser, **B)** spezifische Volumenssuszeptibilität der Eisenverbindungen, FVB-Mäuse, rekombinante TRL (40 μg Fe / Maus) / polymerumhüllte SPIOs (100 μg Fe / Maus): n = 3, Kontrolle / Ferinject[®] (4,6 mg Fe / Maus) n = 1.

Um den zeitlichen Verlauf zu untersuchen, wurden jeweils einer Maus mit und ohne Clodronat-Behandlung polymerumhüllte SPIOs, bzw. rekombinante TRL appliziert. Einer weiteren Maus wurde direkt nach der rekombinanten TRL-Gabe Heparin injiziert. Das Heparin führt zu einem Ablösen der Lipoproteinlipase (LPL) vom Endothel und verhindert dadurch die Aufnahme der TRL in die peripheren Gewebe.¹⁷⁸ Die Aufnahme

in die Leber wird erhöht und dadurch wahrscheinlich der Abbau der SPIOs beschleunigt.

Die Mäuse wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Injektion im Biosuszeptometer gemessen (siehe Abbildung 2.46). Auffällig ist, dass es nach 4 Tagen in allen 5 Fällen zu einem Ansteigen oder zumindest Gleichbleiben der Suszeptibilität kommt. Dies liegt wohl daran, dass es in Zellorganellen zur Clusterung der SPIOs kommt.²²⁰ Nach der endozytotischen Aufnahme der SPIOs werden diese zu den Lysosomen transportiert, wo sie vor dem Abbau in unmittelbare räumliche Nähe gebracht werden.

Bei den polymerumhüllten SPIOs zeigte sich, dass die magnetische Suszeptibilität in der clodronatbehandelten Maus größer ist. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass durch die Depletion der Makrophagen weniger Zellen für die Aufnahme der SPIOs zur Verfügung stehen und sie dadurch in den Zellen stärker geclustert werden. In guter Übereinstimmung zu den Daten aus den radioaktiven Versuchen geht die Suszeptibilität der Maus, die Clodronat und polymerumhüllte SPIOs erhalten hat, nicht auf Null zurück, was dafür spricht, dass nicht alle SPIOs abgebaut werden. In der Maus, die nicht vorher mit Clodronat behandelt wurde, sinkt die magnetische Suszeptibilität bereits zwei Wochen nach der Injektion von polymerumhüllten SPIOs auf Null, was im Kontrast zu den radioaktiven Daten steht. Das Absinken bedeutet aber nicht zwingend, dass alle SPIOs verstoffwechselt wurden. Da der Anfangswert sehr niedrig liegt, kann es sein, dass selbst wenn nach zwei Wochen nur ein Teil der SPIOs abgebaut wurde, die spezifische Volumensuszeptibilität der Partikel so gering ist, dass die verbleibenden SPIOs nicht mehr detektiert werden können.

Bei den Mäusen, die rekombinante TRL erhalten haben, sieht man deutlich, dass die Gabe von Clodronat den Abbau der SPIOs verlangsamt und ein Teil der SPIOs gar nicht verstoffwechselt wird, was sich mit den Daten aus den radioaktiven Experimenten deckt. Das der letzte Wert in der Clodronatgruppe so hoch liegt, könnte ein Hinweis auf eine Kontamination der Maus mit magnetischem Material sein. Die Gabe von Heparin beschleunigt wie erwartet den Abbau im Vergleich zum Kontrolltier.

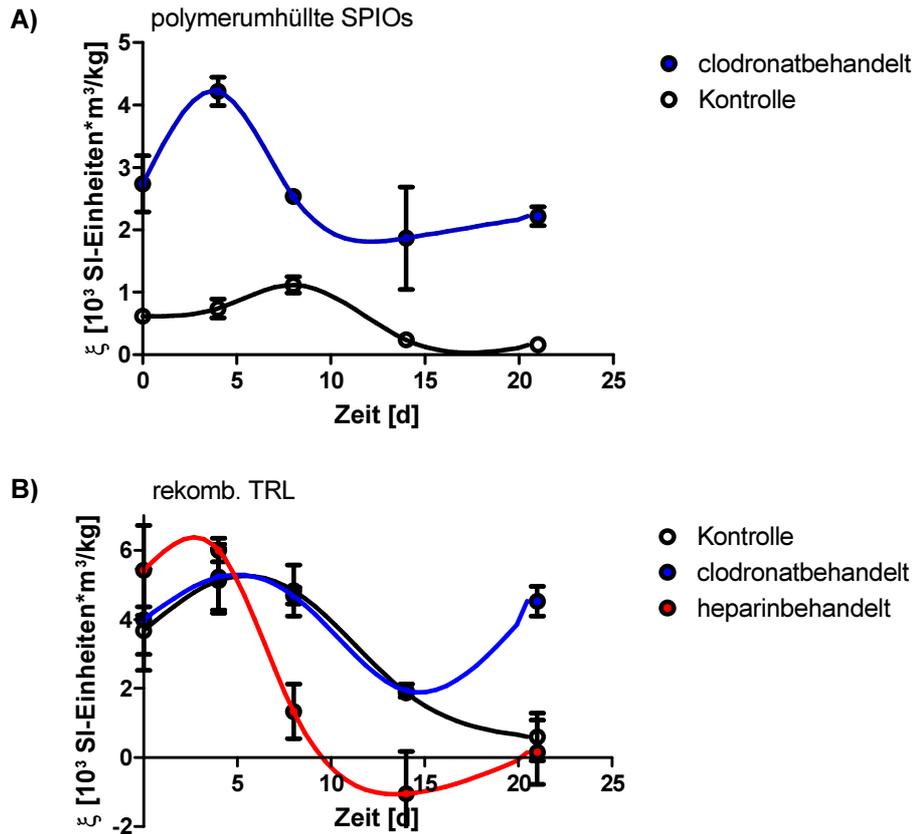


Abbildung 2.46: Änderung der magnetischen Suszeptibilität mit der Zeit nach der i.v. Injektion von polymerumhüllten SPIOs (47 bzw. 23 $\mu\text{g Fe / Maus}$) (A) und rekombinanten TRL (11 $\mu\text{g Fe / Maus}$) (B). BALB/C- Mäuse, $n = 1$

In dieser Pilotstudie konnte gezeigt werden, dass das Hamburg SQUID Biosuszeptometer und unser Aufbau dazu geeignet sind, den Abbau der SPIOs *in vivo* durch die Änderung der magnetischen Eigenschaften zu verfolgen. Im nächsten Schritt muss nun die eingesetzte Menge an SPIOs optimiert und mathematische Modelle, die die Clusterung und den Abbau beschreiben, errechnet werden.

2.4.4 Exkretion

Mit Hilfe des Hamburger Ganzkörperzählers (HAMCO) ist es möglich, die GKR der injizierten ⁵⁹Fe-Menge in lebenden Versuchstieren zu verfolgen. Ein Abfall der zeitkorrigierten Aktivität im Körper ist gleichbedeutend mit einer Ausscheidung von Eisen. Dabei ist die natürliche Ausscheidung von Eisen zu beachten. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um abgeschilferte Haut- und Epithelzellen sowie wenig Eisenverlust in Schweiß und Urin. Beim Menschen ist dieser Eisenverlust sehr gering (Eliminationsrate $0,032 \pm 0,012 \%$ / Tag bei Männern, $0,050 \pm 0,08 \%$ / Tag bei

menstruierenden Frauen) und die biologische Halbwertszeit von Eisen ist mit > 2000 Tagen sehr lang.²²¹

Bei der Maus ist die natürliche Ausscheidung einer i.v. applizierten Tracerdosis von ⁵⁹FeCl₃ offenbar deutlich höher (siehe Abbildung 2.47).

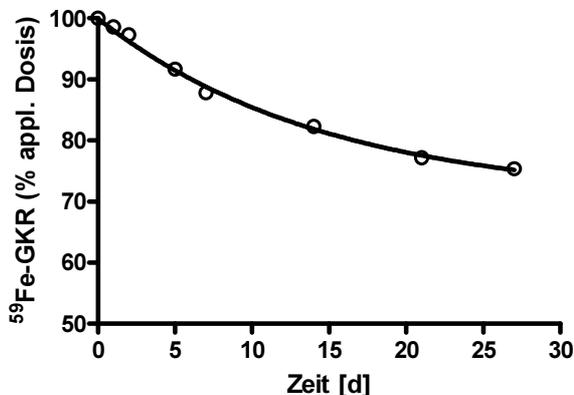


Abbildung 2.47: ⁵⁹Fe-Ganzkörperretention in Mäusen nach i.v. Applikation von ⁵⁹FeCl₃ (Tracerdosis), BALB/C- Mäuse, n = 3.

Wie bereits in Kapitel 2.4.3.4 erwähnt, kann der Metabolismus mit einem einfachen Modell beschrieben werden. Durch die Zerlegung des Modells in zwei Teile (siehe Abbildung 2.43), können aus der GKR nach Gleichung 2.2 die Transferraten für sowohl die Exkretion (k_{ex}) als auch den Transfer in den Metabolisierungspool (k_{ts}) berechnet werden.

$$GKR = 100 * (\exp(-(k_{ts} + k_{ex}) * t) * (1 - k_{ts} / (k_{ts} + k_{ex})) + k_{ts} / (k_{ts} + k_{ex}))$$

GKR	=	Ganzkörperretention
t	=	Zeit
k_{ex}, k_{ts}	=	Transferraten

Gleichung 2.2: Mathematischer Fit der Ganzkörperretention.

Bei der Auswertung der Daten der unterschiedlich großen PEGylierten SPIOs zeigte sich, dass das ⁵⁹Fe aus den PEGylierten SPIOs etwas länger im Körper zurückgehalten wird als das Eisen der Tracerdosis (siehe Abbildung 2.48). Bei den PEGylierten SPIOs, besonders betont bei den 10 nm großen SPIOs, lässt sich eine Retention von über 100 % in den ersten 4 Tagen feststellen. Hierbei muss es sich um ein Abschirmphänomen handeln, das den Wirkungsgrad im Ganzkörperzähler für ⁵⁹Fe verändert. Unser Großraumdetektor (HAMCO), dimensioniert für Menschen, ist zwar relativ unempfindlich gegen Lageveränderungen von Mäusen in einem kleinen Käfig, die Verteilung der Aktivität im Körper (verteilt im Blutraum oder konzentriert in einem

Organ) könnte aber einen kleinen Unterschied ausmachen. Hier wurde offenbar der 100 %-Wert zu einem Zeitpunkt gemessen, bei dem die Aktivität noch unverändert in der Leber konzentriert war. Prinzipiell verfügen alle Kurven über die gleiche Steigung wie die des natürlichen Eisenverlustes, allerdings kommt es zu einer Rechtsverschiebung. Dies deutet darauf hin, dass die Ausscheidung des ^{59}Fe erst zu einem späteren Zeitpunkt beginnt als bei der Tracerdosis, dann aber dem natürlichen Verlust von Eisen folgt. Diese Verzögerung in der Ausscheidung führt dazu, dass sich die Gleichung 2.2 nicht mehr optimal zur Beschreibung der GKR eignet und sich negative Werte für k_{ts} ergeben. Eine Anpassung des Modells wäre daher notwendig, war jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

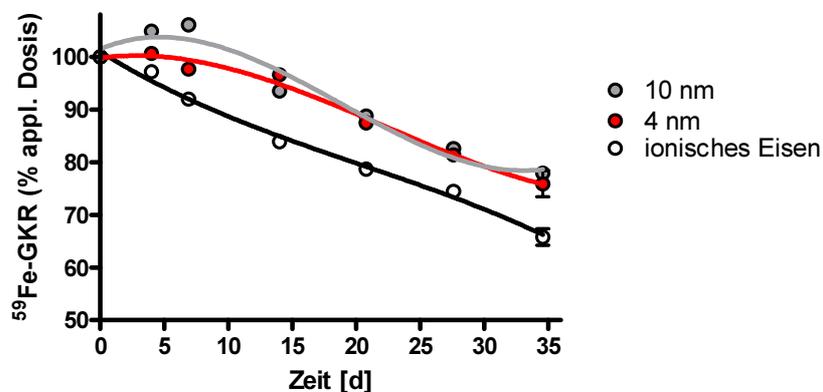


Abbildung 2.48: Ganzkörperretention von ^{59}Fe nach i.v. Gabe. Die Kurven folgen der gleichen Steigung. Es scheint, als ob die Ausscheidung des Eisens aus den PEGylierten SPIOs erst später beginnt und es dadurch zu einer Rechtsverschiebung kommt. Linien sind nur Orientierungshilfen, BALB/C-Mäuse, Mittelwerte \pm SEM, mit $n \geq 3$.

Da gerade die PEGylierten SPIOs mit einem 4 nm großen Kern einen sehr kleinen hydrodynamischen Durchmesser von ca. 10 nm besitzen, wurde mittels eines Stoffwechselläufigs überprüft, ob es zu einer renalen Ausscheidung kommt. Allerdings kam es in allen drei Fällen ausschließlich zu einer Exkretion über die Fäzes. Dies entspricht der Literatur, die beschreibt, dass der hydrodynamische Durchmesser unterhalb von 5,5 nm liegen muss, um eine Ausscheidung über die Nieren zu ermöglichen.²²²

Für die polymerumhüllten SPIOs und die rekombinanten TRL ergibt sich ein anderes Bild. Verfolgt man den Abbau dieser Nanopartikel, zeigt sich, dass für Mäuse die Ausscheidung des radioaktiven Eisens unabhängig von der Art der Darreichungsform ist (siehe Abbildung 2.49A) und nur etwas langsamer als nach der Injektion von ionischem Eisen verläuft. Nach 4 Wochen werden jeweils ca. 25 % der injizierten

Dosis ausgeschieden. In den ersten 48 h nach Applikation wurden die Mäuse in Stoffwechselkäfigen gehalten. Es zeigte sich, dass die Ausscheidung auch hier fast ausschließlich über die Fäzes und somit über die Galle erfolgt.

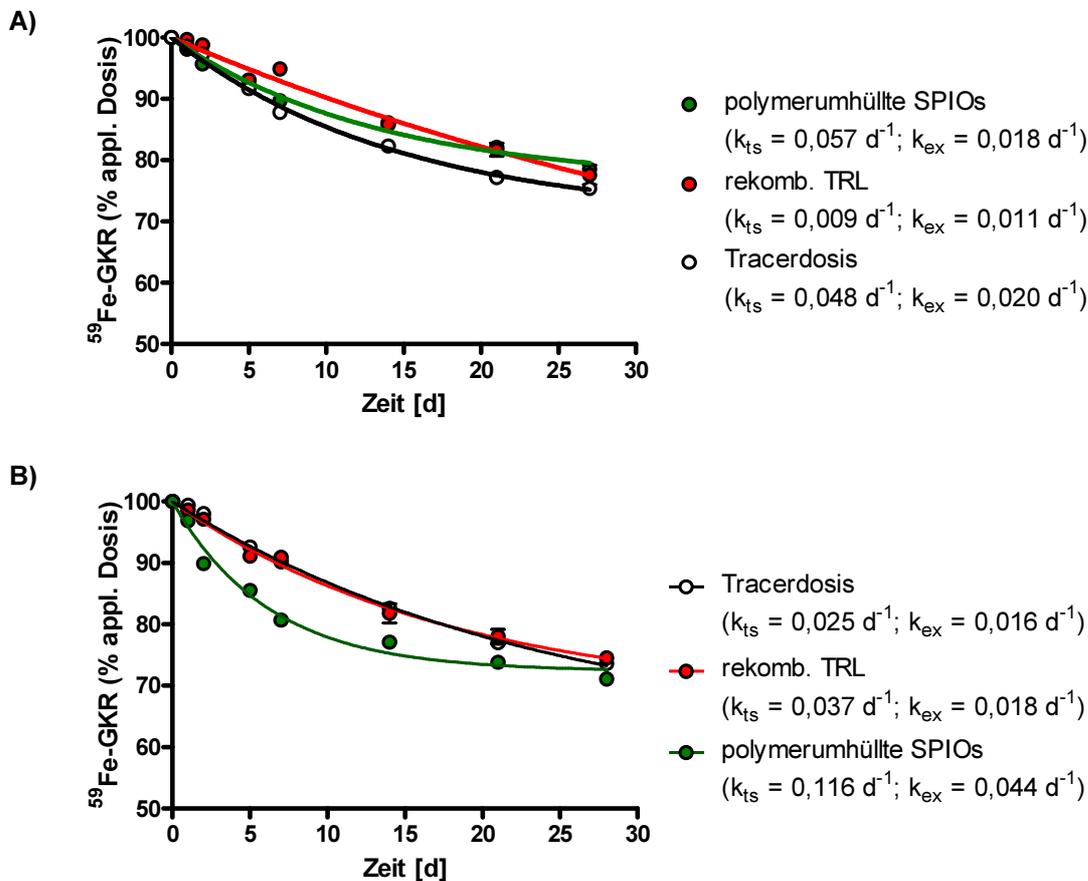


Abbildung 2.49: Ganzkörperretention von ⁵⁹Fe nach i.v. Gabe in der Kontroll- (A) und der clodronatbehandelten (B) Gruppe: Nach 4 Wochen wurden ca. 25 % des injizierten Eisens über die Fäzes ausgeschieden. Die Ausscheidung folgt dem natürlichen Verlust von Eisen. Nur bei der Gruppe, die Clodronat und polymerumhüllte SPIOs erhalten hat, lässt sich eine beschleunigte Exkretion beobachten. BALB/C-Mäuse, Mittelwerte ± SEM, mit n ≥ 3.

Wenn die Tiere vorher mit Clodronat-Liposomen behandelt werden, ändert sich die GKR im Fall der Tracerdosis und der rekombinanten TRL praktisch nicht (siehe Abbildung 2.49B). Nur bei der mit polymerumhüllten SPIOs behandelten Gruppe ist die Ausscheidung beschleunigt. Hier wurden 20 % in den ersten 7 Tagen exkretiert. Der sich daraus ergebende substantiell höhere Wert für k_{ex} (siehe Tabelle 5.2) erklärt, dass die EI dieser Tiere nicht mit unserem einfachen Modell gefittet werden kann (siehe Abbildung 2.44). Die vermehrte Exkretion überlagert hier den Einbau in die Erythrozyten.

2. Ergebnisse und Diskussion

i.v. Injektion	BHWZ [min]	Ganzkörper-eliminations-rate [%/d]	k_{ff} [d^{-1}]	k_{ex} [d^{-1}]	k_{ery} [d^{-1}]	El_{sat} [%]
a) ohne Clodronat-Gabe						
$^{59}\text{FeCl}_3$	n.g.	0,91	0,048	0,020	0,408	89,02
rekomb. TRL	3	0,83	0,009	0,011	0,250	68,71
polymerumh. SPIOs	16	0,80	0,057	0,018	0,121	40,56
b) nach Clodronat-Gabe						
$^{59}\text{FeCl}_3$	n.g.	0,98	0,025	0,016	0,061	62,04
rekomb. TRL	219	0,94	0,037	0,018	0,091	42,77
polymerumh. SPIOs	n.g.	1,39	0,166	0,044	n.d.	n.d.

Tabelle 5.2: Kinetische Parameter eines [2+1]-Kompartiment-Modells der Prozessierung von SPIOs in Mäusen. n.g. = nicht gemessen, n.d. = nicht determinierbar.

Dass die Elimination von ^{59}Fe aus den injizierten SPIOs ähnlich schnell verläuft wie aus ionischem Eisen, spricht für eine schnelle Prozessierung der Nanopartikel in der Leber. Dabei muss es eine Beteiligung der Hepatozyten geben, denn nur diese haben einen Zugang zum Gallensystem und damit zur Fäzesausscheidung. Zu diskutieren wäre eine direkte Aufnahme von Nanopartikeln in Hepatozyten, gefolgt von einer raschen Metabolisierung des Eisenoxids. Auf Grund der Größe der verwendeten Partikel sollte dies theoretisch möglich sein, da die Fensterung der Sinusoide von ca. 100 nm dies zulassen würde. In den TEM-Aufnahmen von Leberproben 2 h nach SPIO-Applikation finden sich jedoch in Hepatozyten nur sehr vereinzelt Nanopartikel, so dass dieser Weg vermutlich mengenmäßig keine Rolle spielt.

Daher ist es wahrscheinlicher, dass die SPIOs von KZ und LSEC aufgenommen werden, dann das ^{59}Fe in die Hepatozyten transportiert und von dort über die Galle ausgeschieden wird. Ein Transport intakter SPIOs erscheint unwahrscheinlich, da dies eine substantielle Trans- oder Exozytose von Nanopartikeln bedeuten würde, die bisher noch nie beschrieben wurde.

Eine andere Möglichkeit wäre die Prozessierung der SPIOs in Kupffer Zellen, gefolgt von einem Transport des Eisens in die Hepatozyten. Okon *et al.* fanden, dass nach der Gabe von dextranumhüllten SPIOs der Ferritingehalt der Hepatozyten anstieg.¹⁷³ Da sie auf Grund ihrer pharmakokinetischen Daten und der elektronenmikroskopischen Bilder eine direkte Aufnahme in die Hepatozyten ausschließen konnten, vermuteten sie einen Transport von ^{59}Fe aus den Makrophagen der Milz und der Leber in die Hepatozyten. Durch die Verwendung von markiertem Ferritin, konnte in der

Vergangenheit die Exkretion durch KZ und die Aufnahme durch Hepatozyten *in vitro* nachgestellt werden.²²³ Des Weiteren ist auch bekannt, dass Hepatozyten über Ferritinrezeptoren verfügen.^{224,225} Auf Basis dieser Vorarbeiten und ihrer Daten schlossen Okon *et al.*, dass ihre SPIOs von KZ aufgenommen werden. In einem zweiten Schritt wird nach der Metabolisierung das Eisen in den Blutstrom abgegeben, dort bindet es an Tf und Ferritin und wird in die Hepatozyten transportiert, von wo aus es für die Erythropoese mobilisiert werden kann.

Es ist davon auszugehen, dass es auch bei den hier verwendeten SPIOs zu einem solchen Transport von ⁵⁹Fe kommt. Zusätzlich ist es uns durch die GKR gelungen, die Ausscheidung des Eisens durch die Hepatozyten zu quantifizieren.

Warum es nach Clodronat-Gabe in der Gruppe, die polymerumhüllte SPIOs erhalten hat, zu einer schnelleren Ausscheidung des ⁵⁹Fe kommt, ist noch nicht umfassend geklärt. Speziell in dieser Gruppe wurde mit TEM untersucht, ob es zu einer partikulären Ausscheidung in den ersten 5 Tagen kommt. Es ergab sich dabei aber kein Hinweis darauf, dass unverdaute Partikel die Gallengänge erreichen. Das ist sicher kein endgültiger Beweis, macht aber eine substantielle Exozytose von SPIOs aus Hepatozyten heraus unwahrscheinlich.

Eine naheliegendere Erklärung wäre, dass die erhöhte SPIO-Belastung der LSEC die Lebensdauer dieser Zellen verringert und daraus eine erhöhte Ausscheidung von abgestorbenen Zellen resultiert.

Die Transportwege des ⁵⁹Fe nach i.v., polymerumhüllter SPIO-Gabe, werden in Abbildung 2.50 zusammengefasst. Für die rekombinante TRL ergibt sich ein ähnliches Bild, nur dass hier die SPIOs überwiegend von den KZ aufgenommen werden.

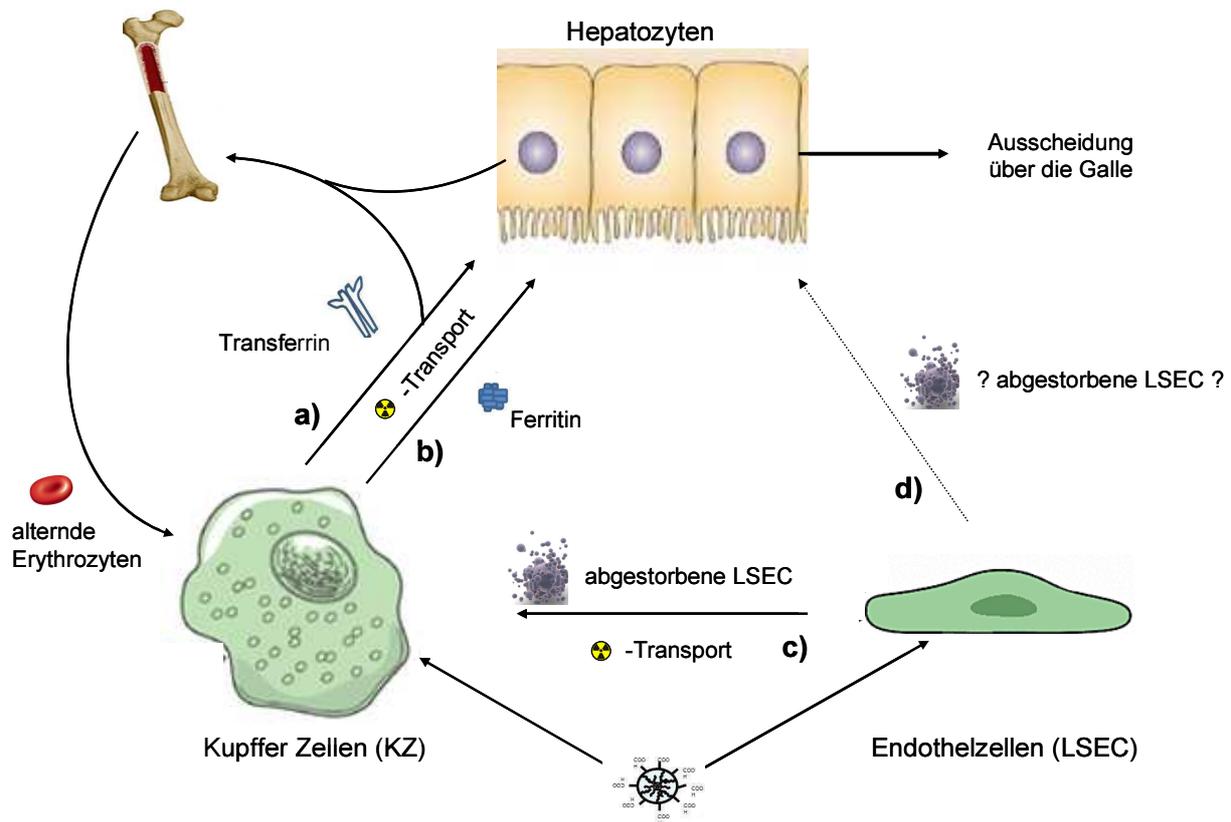


Abbildung 2.50: Schematische Darstellung der Transportwege von Eisen in der Leber nach Gabe von polymerumhüllten SPIOs: Die SPIOs werden von Kupfer Zellen (KZ) und Endothelzellen (LSEC) aufgenommen. Während die KZ in der Lage sind die SPIOs schnell zu verstoffwechseln, bilden sich Eisenablagerungen in den LSEC. **a)** KZ sind auf den Eisenstoffwechsel spezialisiert, da sie alternde Erythrozyten metabolisieren. Sie exportieren Eisen mittels Ferroportin ins Blut, wo es an Transferrin bindet. Es wird unter anderem ins Knochenmark zur Erythropoese transportiert, kann aber auch von Hepatozyten über den Transferrinrezeptor aufgenommen werden. **b)** KZ sind in der Lage Ferritin zu synthetisieren und Eisen in dieser Speicherform zu exkretieren. Hepatozyten verfügen über Ferritinrezeptoren, die die Aufnahme ermöglichen. **c)** Wenn LSEC absterben, werden die Zelltrümmer und somit auch die SPIOs von KZ phagozitiert. **d)** Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Ausscheidung von Eisen nach polymerumhüllter SPIO-Gabe nach Clodronatbehandlung wäre, dass in Abwesenheit der KZ die Zelltrümmer von den Hepatozyten aufgenommen und schnell über die Galle ausgeschieden wird.

2.5 Quantifizierung von Lipoproteinstoffwechselwegen mittels radioaktiver SPIOs *in vivo*

Bruns *et al.* konnten zeigen, dass man mit SPIOs, die in das lipophile Innere von Chylomikronen eingebettet sind, Aufnahmewege dieser Lipoproteine in die Leber via MRT untersuchen kann.³⁶ In Zusammenarbeit mit Dr. Bartelt und Prof. Heeren wurde diese Technik dazu genutzt, Veränderungen im Lipoproteinstoffwechsel unter Kälteadaptation zu untersuchen.¹⁷⁸ Die ⁵⁹Fe-markierten SPIOs sollten ins Besondere dazu genutzt werden, diese Effekte zu quantifizieren.

Das braune Fettgewebe (BAT) kann Fettsäuren verbrennen, um Wärme zu produzieren. Über Jahre war bekannt, dass BAT in Nagetieren und auch in menschlichen Neugeborenen vorkommt. Relativ neu wurde gefunden, dass offenbar auch Erwachsene über entsprechende Fettdepots verfügen.²²⁶⁻²²⁸ Unklar ist, welche Rolle die Aufnahme von Fettsäuren in das BAT spielt. Fettsäuren werden in Form von Triglyceriden im Inneren von Lipoproteinen transportiert. Das Enzym Lipoproteinlipase (LPL) kann im Blutstrom Fettsäuren aus den Triglyceriden freisetzen.²²⁹ Die freien Fettsäuren werden von peripheren Geweben wie dem Fettgewebe, die dabei gebildeten cholesterolreichen Remnants von der Leber aufgenommen.²²⁹

Wenn man die rekombinanten TRL-Partikel neben den ⁵⁹Fe-SPIOs zusätzlich mit ³H-Triolein (ein in TRL natürlich vorkommendes Triglycerid, dessen Fettsäuren radioaktiv markiert sind) kennzeichnet, erhält man eine Doppelmarkierung. Auf Grund der unterschiedlichen Strahlungsarten der beiden Isotope ist es leicht möglich zwischen Partikel- und freier Fettsäure-Aufnahme zu unterscheiden. Diese doppelmarkierten TRL wurden Mäusen i.v. gespritzt. 15 min nach der Injektion wurden die Tiere getötet und der ⁵⁹Fe-Gehalt der Organe im Ganzkörperzähler und der ³H-Triolein-Gehalt nach der Solubilisierung der Organe mittels β -Counting bestimmt. Der ³H / ⁵⁹Fe-Quotient ist im epididymalen und subkutanen Fettgewebe signifikant höher, weil erwartungsgemäß von diesen im Vergleich zu den anderen Geweben verhältnismäßig mehr freie Fettsäuren als TRL-Partikel aufgenommen werden (siehe Abbildung 2.51).

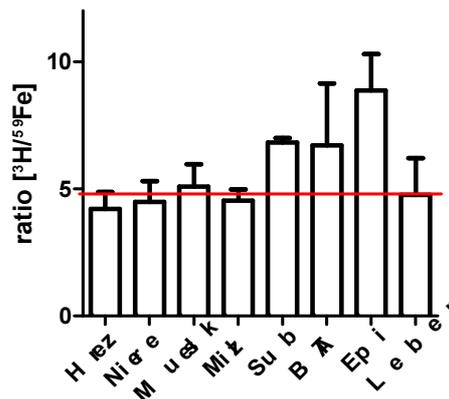


Abbildung 2.51: Verhältnis von ³H-Triolein- zu ⁵⁹Fe-SPIO-Aufnahme der einzelnen Gewebe nach i.v. Gabe doppelmarkierter rekombinanter TRL: Das epididymale (Epi) und das subkutane (Sub) Fettgewebe nehmen im Vergleich zu den anderen Geweben im Verhältnis mehr freie Fettsäuren als Partikel auf. BAT = braunes Fettgewebe FVB-Mäuse, Mittelwerte \pm SEM, mit $n \geq 3$.

In weiteren Versuchen wurde untersucht, ob eine kurzzeitige Kälteexposition der Mäuse einen Einfluss auf den TRL-Stoffwechsel hat. Hierzu wurden die Mäuse über

Nacht in einem Kälteraum bei 4° C gehalten, während eine Kontrollgruppe bei 22°C verblieb. Den Mäusen wurden ⁵⁹Fe-SPIOs in rekombinante TRL verpackt i.v. appliziert und die Bluthalbwertszeit bestimmt. Es zeigte sich, dass bei den kälteadaptierten Tieren die Aufnahme der rekombinanten TRL stark beschleunigt war (siehe Abbildung 2.52).

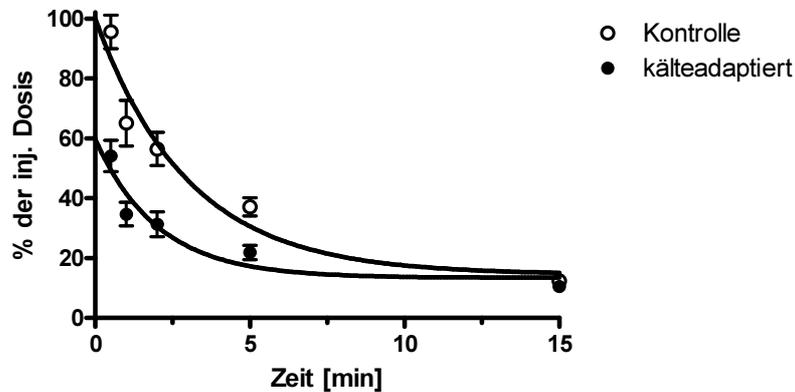


Abbildung 2.52: Bluthalbwertszeit der ⁵⁹Fe-SPIO-markierten rekombinanten TRL nach i.v. Injektion: Es zeigt sich, dass in den vorher kälteadaptierten Tieren die TRL signifikant schneller aufgenommen werden als in den Kontrolltieren, FVB-Mäuse, Mittelwerte ± SEM, mit n ≥ 6.

Um zu klären welche Organe für die schnellere Aufnahme verantwortlich sind, wurden die Tiere 15 min nach Injektion getötet und die Radioaktivität in den Organen bestimmt. Es zeigte sich, dass in den kälteadaptierten Tieren die prozentuale Aufnahme in die Leber signifikant reduziert ist, während die prozentuale Aufnahme in das interskapuläre BAT (iBAT) signifikant erhöht ist (siehe Abbildung 2.53A). Wenn man die spezifische Aktivität der Gewebe betrachtet, zeigt sich, dass die Aufnahme des BAT dem der Leber entspricht (siehe Abbildung 2.53B). Das bedeutet, dass es durch die Kälteadaptation zu einer Veränderung im Lipidstoffwechsel kommt. Das BAT wird aktiviert und steigt auf Fettverbrennung um. Damit die notwendigen Fettsäuren zur Verfügung stehen, nimmt das BAT dazu große Mengen an TRL auf. Die TRL-Aufnahme aus dem Blut wird somit von der Leber auf das BAT verschoben.

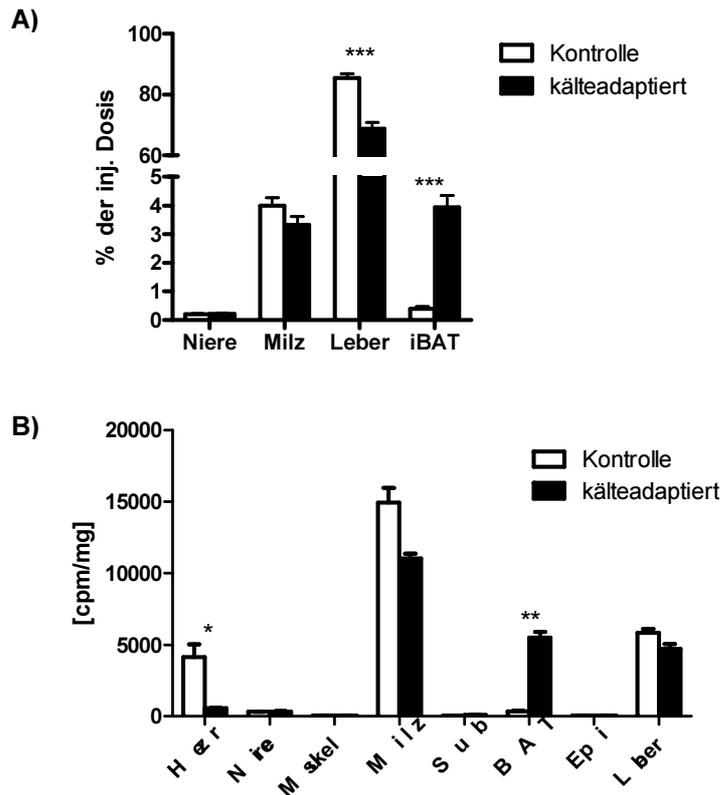


Abbildung 2.53: Organverteilung 15 min nach der i.v. Injektion von ⁵⁹Fe-SPIO-markierten rekombinanten TRL: A) prozentuale Aufnahme der Organe: Die Leber nimmt signifikant weniger auf, während die Aufnahme durch das iBAT steigt. **B)** spezifische Aktivität der Organe: Durch die Kälteadaptation steigt die spezifische Aktivität der Leber auf ein ähnliches Maß an wie das der Leber. FVB-Mäuse, Mittelwerte ± SEM, mit n ≥ 3. (*p<0.0,; **p<0.01; ***p<0.001).

Erhöhte Triglyceride und verlängerte Zirkulationszeiten der Remnants sind Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen.²³⁰⁻²³² Da durch die Kälteadaptation auf relativ einfache Weise der TRL-Spiegel im Blut verringert werden kann und BAT auch im Menschen zu finden ist, besteht Hoffnung, dass diese Ergebnisse auf den Menschen übertragen werden können und somit eine weitere Therapie der Dyslipidämie zur Verfügung steht.

2.6 Auf dem Weg zu spezifischen Kontrastmitteln

2.6.1 Kopplung von Transferrin an polymerumhüllte SPIOs

Transferrin (Tf) ist ein 80 kDa großes Glykoprotein, das aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist, die jeweils in der Lage sind, ein Eisenatom zu binden.²³³ Freies Eisen wird im Körper an Tf gebunden und transportiert, um die Zellen vor oxidativem Stress, der durch redoxaktive Eisenionen ausgelöst wird, zu schützen. Es bindet an den Transferrinrezeptor (TfR), ein zellmembran-assoziiertes Glykoprotein, das für die Eisenaufnahme der Zelle verantwortlich ist und darüber hinaus auch ihr Wachstum reguliert.²³³ Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass in vielen Tumorerkrankungen dieser Rezeptor in den Krebszellen hochreguliert ist.²³⁴⁻²⁴² Es wird vermutet, dass der Grund für diese Hochregulierung der erhöhte Bedarf an Eisen als Cofaktor der Ribonukleotid-Reduktase ist, einem Enzym, das in der DNA-Synthese sich schnell teilender Zellen eine Rolle spielt.^{243,244} Bereits 1998 koppelten Kresse *et al.* humanes Tf an durch Co-Präzipitation gewonnene SPIOs in der Hoffnung, damit Tumore besser im MRT sichtbar machen zu können. Es kam zu einer Anreicherung im Vergleich zu mit unspezifischen humanen Serumalbumin gekoppelten SPIOs, allerdings blieben Leber und Milz die Hauptaufnahmeorgane.⁵³ Ähnliches konnten Högemann-Salvellano *et al.* zeigen. Sie verglichen zwei verschiedene Arten Tf an SPIOs zu koppeln. Dabei konnten sie zeigen, dass es in humanen Mammakarzinomproben Unterschiede in der TfR-Expression zwischen gesundem und krankem Gewebe gab, die theoretisch mit ihrem System sichtbar gemacht werden könnten.²⁴⁵ Zhang *et al.* behandelten humane Leukämie-Zellen mit dem Eisenchelator Desferrioxamin. Dadurch kommt es zu einer nochmals erhöhten Überexpression des TfR und diese Zellen ließen sich besser mit Tf- oder TfR-Antikörper-tragenden SPIOs im MRT abbilden.²⁴⁶ Weissleder *et al.* nutzten das Tf-TfR-System um zu zeigen, dass es möglich ist mittels, spezifischer SPIOs die Genexpression im MRT sichtbar zu machen. Hierzu wurden Mäusen Tumore, die den TfR überexprimieren und Kontrolltumore eingepflanzt. Mit Hilfe von an SPIOs gekoppeltem Tf konnten die Tumore im MRT unterschieden werden.²⁴⁷ Für unsere Versuche wurde Tf kovalent an einen polymerumhüllten SPIO gekoppelt. Dafür wurde eine Amidbindung zwischen einer Carboxylgruppe des den SPIO umgebenden Polymers und einer Aminogruppe des Tf mit Hilfe von EDC in Anlehnung an eine in der Literatur beschriebene Kopplung gebildet.²⁴⁸ Es wurden verschiedene

Mengen an EDC eingesetzt, um das optimale Verhältnis von EDC zu SPIO zu ermitteln. Es wurde jeweils ein 500-facher Überschuss an Tf verwendet und unterschiedliche SPIO / EDC-Verhältnisse (1:10000; 1:1000, 1:100) hinzugegeben. Die Ansätze wurden nach der Kopplung elektrophoretisch in einem 2% Agarosegel separiert. Anhand der Bandenfärbung lässt sich feststellen, dass alle Banden kürzer laufen als die ungekoppelten SPIOs (siehe Abbildung 2.54A). Es ist also zu einer Vergrößerung des hydrodynamischen Durchmessers und somit zu einer Bindung des Tf an den SPIO gekommen. Des Weiteren zeigt sich, dass je höher das SPIO / EDC-Verhältnis ist, desto kürzer ist die Laufstrecke und desto mehr Tf wurde gebunden. Dass kaum ein Unterschied zwischen 1:1000 und 1:10000 in der Laufstrecke zu finden ist, spricht dafür, dass hier bereits eine Sättigung der SPIO-Oberfläche mit Tf erfolgt ist. Deswegen wurde das Verhältnis 1:1000 SPIO / EDC für die weiteren Kopplungsansätze verwendet. Um zu zeigen, dass sich wirklich Peptide auf der SPIO-Oberfläche befinden, wurde das Gel mit Coomassie Blue angefärbt. Nur die Bahnen, in denen der gekoppelte Partikel oder ungekoppeltes Tf aufgetragen wurden, konnten angefärbt werden (siehe Abbildung 2.54B).

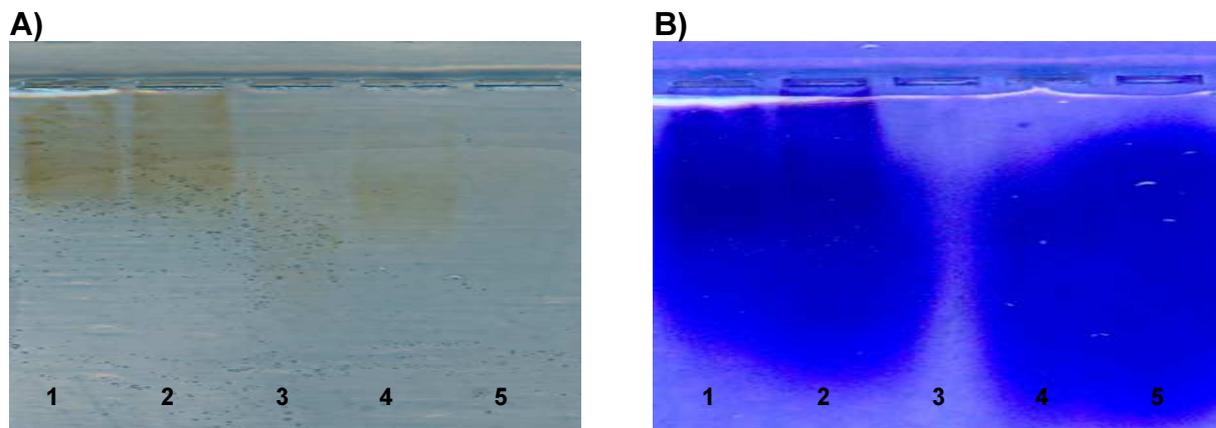


Abbildung 2.54: Agarose(2%)-Gelelektrophorese der mit unterschiedlichen Mengen EDC an Tf gekoppelten SPIOs: Bahn 1: SPIO / EDC 1:10000, Tf 500-facher Überschuss; Bahn 2: SPIO / EDC 1:1000, Tf 500-facher Überschuss; Bahn 3: ungekoppelter SPIO; Bahn 4: SPIO / EDC 1:100, Tf 500-facher Überschuss; Bahn 5: ungekoppeltes Tf. Foto des Gels vor (A) und nach Coomassie Blue Färbung (B).

Die Größenzunahme der SPIOs durch die Bindung von Tf konnte ebenfalls durch die SEC bestätigt werden. Im Vergleich zur ungekoppelten Charge wird der Hauptpeak der gekoppelten SPIOs früher eluiert, die SPIOs sind somit größer (siehe Abbildung 2.55). Allerdings zeigt sich bei den gekoppelten SPIOs ein zusätzlicher Peak bei Minute 33. Hierbei handelt es sich um freies Tf.

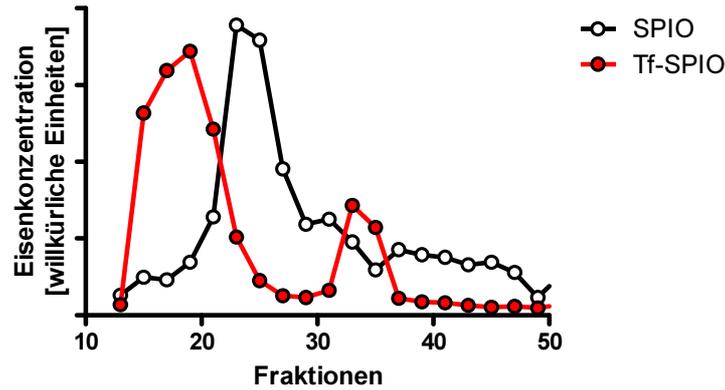


Abbildung 2.55: Vergleich des Eisengehalts der Fraktionen eines Größenausschlusschromatographielaufes eines an Transferrin gekoppelten und eines ungekoppelten SPIOs: Durch die Kopplung verschiebt sich der Hauptpeak zu kleineren Fraktionen, zusätzlich tritt ein freier Tf-Peak auf. (SPIO / EDC 1:1000, Tf 500-facher Überschuss).

Neben dem SPIO / EDC-Verhältnis sollte auch der Tf-Überschuss optimiert werden. Es wurden mehrere Ansätze mit einem gleichbleibenden Verhältnis SPIO / EDC 1:1000, aber unterschiedlichen Mengen an Tf (100-, 250-facher Überschuss) zur Reaktion gebracht und anschließend mittels Gelelektrophorese aufgereinigt. Wieder zeigte sich, dass die gekoppelten SPIOs auf Grund ihrer größeren Geometrie kürzer im Gel laufen (siehe Abbildung 2.56A). Es ließen sich Unterschiede zwischen dem 100-fachen Überschuss, der weiter lief als der 250-fache, feststellen. Die Coomassie Blue Färbung bestätigte, dass es in beiden Fällen zu einer Kopplung von Peptid an den SPIO kam (siehe Abbildung 2.56B)

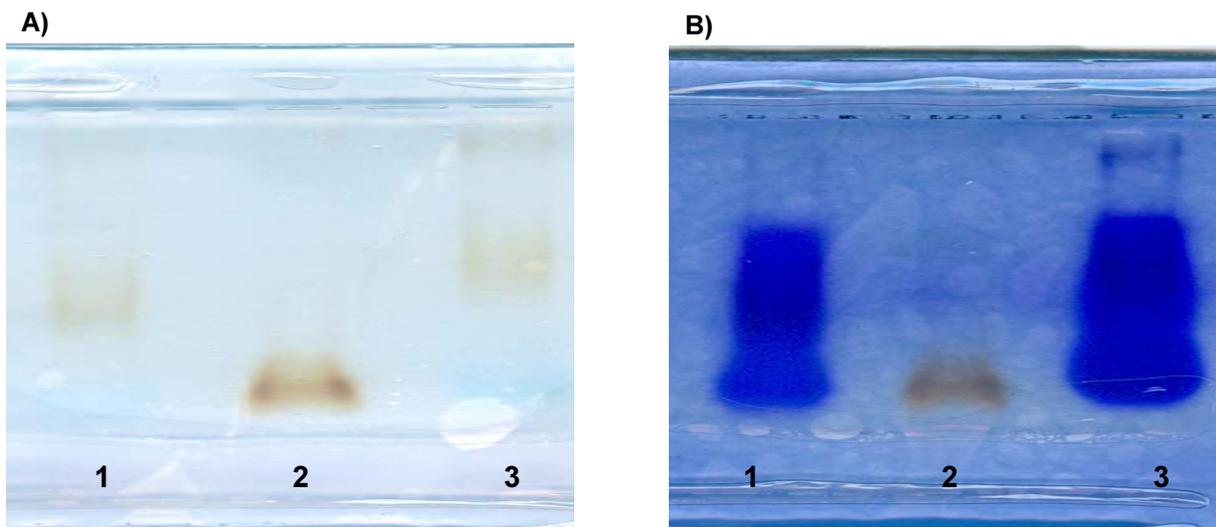


Abbildung 2.56: Agarose(1%)-Gelelektrophorese der mit unterschiedlichen Mengen an Tf gekoppelten SPIOs: Bahn 1: SPIO / EDC 1:1000, Tf 100-facher Überschuss; Bahn 2: ungekoppelter SPIO; Bahn 3: SPIO / EDC 1:1000, Tf 250-facher Überschuss; Foto des Gels vor (A) und nach Coomassie Blue Färbung (B).

Wie sich in den SEC-Profilen und der starken Blaufärbung nach der Behandlung mit Coomassie Blue zeigt, findet sich noch viel ungebundenes Tf in den Ansätzen. Um dieses abzutrennen, wurden die Ansätze mittels eines Zentrifugationsfilters (100 kDa, 3400 g, RT) aufgearbeitet. Dazu wurde die Probe mehrfach in PBS resuspendiert und erneut gefiltert. Die so aufgereinigten Ansätze aus Abbildung 2.54 wurden ebenfalls einer Gelelektrophorese unterzogen. Die Coomassie Blue Färbung fällt wesentlich weniger intensiv aus, was darauf hindeutet, dass Protein aus den Ansätzen entfernt wurde (siehe Abbildung 2.57).

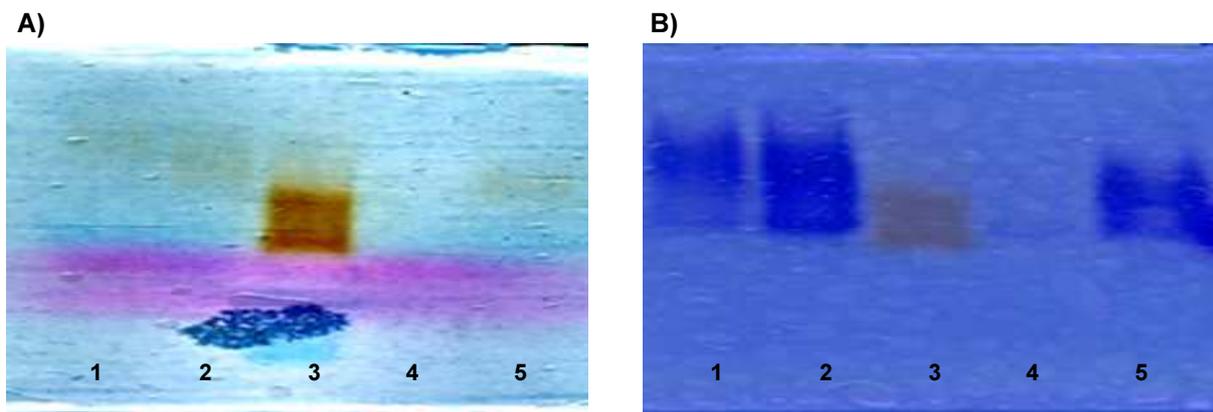


Abbildung 2.57: Agarose(1%)-Gelelektrophorese der mit unterschiedlichen Mengen EDC an Tf gekoppelten SPIOs, die nach der Kopplung mit Hilfe von Zentrifugationsfiltern aufgereinigt wurden: Bahn 1: SPIO / EDC 1:10000, Tf 500-facher Überschuss; Bahn 2: SPIO / EDC 1:1000, Tf 500-facher Überschuss; Bahn 3: ungekoppelter SPIO; Bahn 4: ungekoppeltes Tf.; Bahn 5: SPIO / EDC 1:100, Tf 500-facher Überschuss; Foto des Gels vor (A) und nach Coomassie Blue Färbung (B)

Der Ansatz mit dem SPIO / EDC-Verhältnis 1:10000 wurde vor und nach der Zentrifugation einer SEC unterzogen. Es zeigte sich, dass der freie Anteil an Tf (Minute 33) stark reduziert werden konnte. Allerdings war der Anteil an agglomerierten SPIOs bei Minute 15 durch die Zentrifugation etwas erhöht (siehe Abbildung 2.58). Um das freie Tf komplett zu entfernen, müsste noch weitere Male zentrifugiert werden.

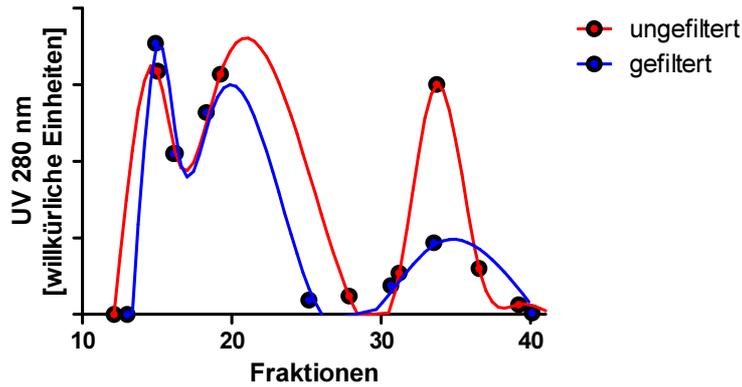


Abbildung 2.58: UV-Profil einer Größenausschlusschromatographie eines mit Tf gekoppelten SPIOs vor und nach Aufreinigung mittels Zentrifugationsfilter: Durch das Abtrennen des freien Tf wird der Peak bei Minute 33 kleiner. (SPIO / EDC 1:10000, Tf 500-facher Überschuss).

Der Einsatz der so erhaltenen spezifisch funktionalisierten SPIOs in Tumormodellen steht noch aus und konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter analysiert werden. Die Befunde zur Kopplung geben allerdings Anlass zur Hoffnung, dass ein spezifisches Kontrastmittel synthetisiert wurde.

2.6.2 Markierung der äußeren Hülle von SPIOs mit Transferrin und ^{59}Fe

Da Tf physiologischerweise Fe^{3+} bindet, sollte es möglich sein, das an die SPIOs gebundene Transferrin nachträglich mit ^{59}Fe zu markieren. In der Literatur wurde bereits das Tf vor der Kopplung mit ^{125}I markiert.²⁴⁵ Unsere Art der radioaktiven Markierung hat jedoch den Vorteil, dass mit ihr überprüft werden kann, ob das an den SPIO-gekoppelte Tf noch bindungsfähig und somit funktionell ist.

Es wurden drei verschiedene Ansätze mit einer Tracerdosis $^{59}\text{FeCl}_3$ über Nacht bei RT inkubiert. Neben den ungekoppelten Partikeln wurden die Tf-SPIOs auf zwei verschiedene Arten inkubiert. Ein Ansatz wurde mit Essigsäure-Acetat-Puffer angesäuert (pH 4,75), was Eisen aus Tf wieder freisetzen würde. Da Holotransferrin zur Kopplung verwendet wurde, sollten alle Tf-Moleküle mit Fe-Atomen abgesättigt sein. Durch das Ansäuern sollten diese Atome abdissoziieren und könnten dann nach einer Stunde und nach der Neutralisation mit Bicarbonatpuffer (pH 7,6) durch ^{59}Fe ersetzt werden. Die andere Probe wurde mit destilliertem Wasser an Stelle des sauren Puffers behandelt und dann ebenfalls über Nacht in Bicarbonatpuffer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die verschiedenen Ansätze mittels SEC verglichen.

Die ungekoppelten SPIOs zeigten wie bereits in Kapitel 2.3 beschrieben keine Interaktion mit dem ^{59}Fe , somit wurde die Radioaktivität vollständig in der Fraktion von Minute 41 als freies Eisen eluiert (siehe Abbildung 2.59).

Bei der unter neutralen Bedingungen inkubierten Probe zeigt sich der Peak mit der höchsten Radioaktivität bei Minute 15, also in der Fraktion, in der die agglomerierten SPIOs eluiert werden. Zwischen Minute 16 und 21 findet sich eine breite Schulter, in der die monodispersen SPIOs aus der Säule gespült werden. Jeweils kleinere Peaks finden sich bei Minute 35, hier wird das freie Tf und Minute 41, hier wird das freie Eisen eluiert. Es hat also einen Austausch zwischen dem an das Tf gebundene Eisen und dem ^{59}Fe gegeben.

Bei den gekoppelten SPIOs, die vorher angesäuert wurden, wurde mehr Radioaktivität aufgenommen als bei dem neutralen Ansatz. Allerdings wird die höchste Radioaktivität in den Fraktionen bei Minute 35 gemessen, es handelt sich also um freies Tf. Dies deutet darauf hin, dass es zu einer säurekatalysierten Hydrolyse der Amidbindung gekommen ist und sich dadurch ein sehr hoher Anteil an freiem Tf im Ansatz findet. Zwischen Minute 13 und 30 findet sich ein breiter Peak, in dem die gekoppelten SPIOs eluiert werden. Eine klare Unterscheidung zwischen agglomerierten und monodispersen SPIOs ist nicht möglich.

Die Ergebnisse zeigen, dass das Tf trotz seiner Kopplung an den SPIO seine physiologische Rolle erfüllen kann und dass die Bindung zwischen Tf und SPIO nicht säurestabil ist.

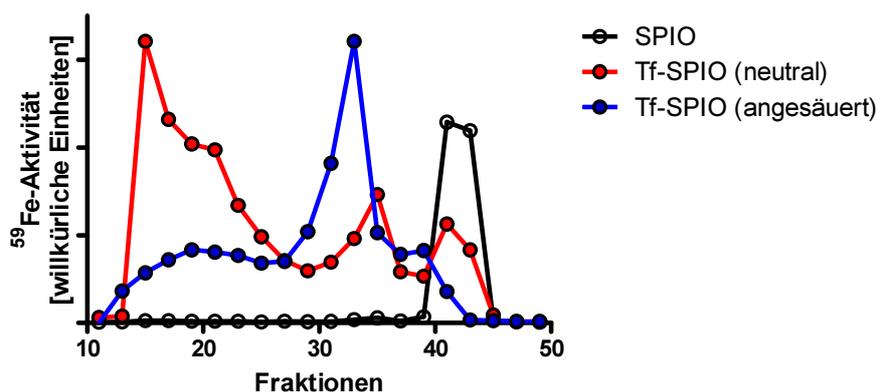


Abbildung 2.59: ^{59}Fe -Aktivität der Fraktionen einer Größenausschlusschromatographie, nachdem die SPIOs über Nacht mit ^{59}Fe inkubiert wurden. (SPIO / EDC 1:1000, Tf 500-facher Überschuss, gefiltert).

Es sollte sichergestellt werden, dass es sich bei dem freien Tf im Fall der vorher angesäuerten Probe um ein Produkt der säurekatalysierten Hydrolyse der Bindung

handelt. Im Neutralen sollte diese Bindung jedoch stabil sein. Deshalb wurden die Fraktionen zwischen Minute 14 - 25 gepoolt und nochmals einer SEC unterzogen (siehe Abbildung 2.60). Es zeigt sich zwar, dass in der Probe ein hoher Anteil an freiem Eisen vorhanden ist, es kommt aber nicht zu einem weiteren Ablösen des Tf. Die Radioaktivität folgt ansonsten dem Elutionsprofil agglomerierter und monodisperser SPIOs.

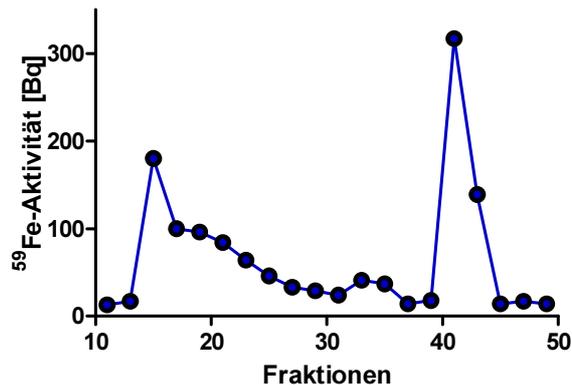


Abbildung 2.60: ^{59}Fe -Aktivität der Fraktionen einer Größenausschlusschromatographie der gepoolten Fraktionen 14 - 25 der im Sauren mit ^{59}Fe inkubierten SPIOs. (SPIO / EDC 1:1000, Tf 500-facher Überschuss, gefiltert).

Als weiterer Stabilitätstest der Bindung zwischen Tf und dem SPIO wurde überprüft, ob das Tf mit bovinen Serumalbumin (BSA) auf der Partikeloberfläche verdrängt werden kann. In der SEC zeigte sich, dass sich die Profile vor und nach BSA-Inkubation ähneln und es zu keiner Tf-Freisetzung kommt (siehe Abbildung 2.61).

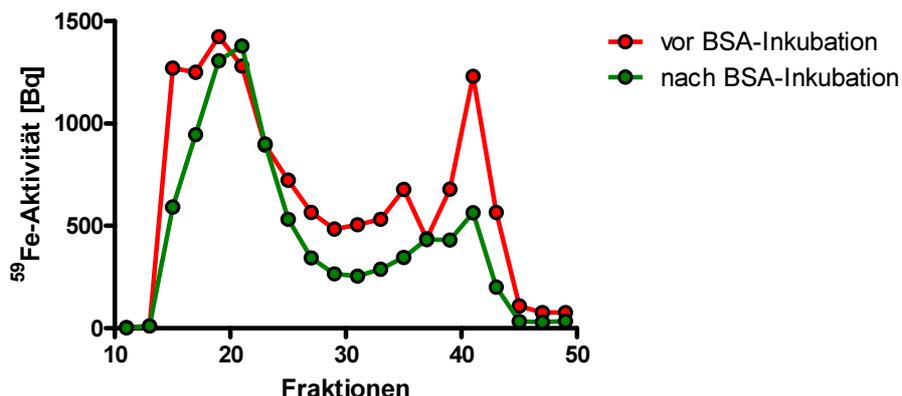


Abbildung 2.61: ^{59}Fe -Aktivität der Fraktionen einer Größenausschlusschromatographie einer radioaktivmarkierten Tf-SPIO-Probe vor und nach der Inkubation mit BSA. (SPIO / EDC 1:1000, Tf 100-facher Überschuss, gefiltert).

Auch die Stabilität der Bindung zwischen dem Tf und dem ^{59}Fe sollte überprüft werden. Hierfür wurden die Fraktionen Minute 14 - 23 gepoolt und gegen zwei

verschiedene Medien dialysiert. In beiden Fällen kam es zu einer Abgabe von freiem ^{59}Fe . Während es bei der Probe, die gegen destilliertes Wasser dialysiert wurde zu einem fast vollständigen Verlust des radioaktiven Eisens kam, was auf den pH-Wert von 5 zurückzuführen ist und somit der physiologischen Funktion entspricht, wurden beim Dialysepuffer (PBS, pH=7) ca. 50% des ^{59}Fe abgegeben. Danach kam es zu keiner weiteren Dissoziation (siehe Abbildung 2.62).

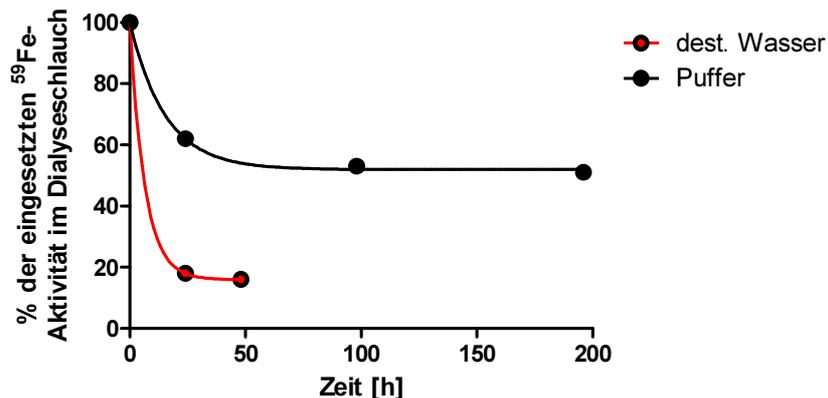


Abbildung 2.62: Dialyse von mit ^{59}Fe -markierten Tf-SPIOs gegen verschiedene Medien.

Es wurde somit eine Methode etabliert, auch die Hülle von SPIOs radioaktiv mit ^{59}Fe zu markieren. Die Untersuchungen zur Stabilität dieses Labels *in vivo* und die Verwendung der Tf-SPIOs für Untersuchungen *in vivo* stehen noch aus und konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Diese Hüllenmarkierung könnte in zukünftigen Studien dazu genutzt werden, eventuell die Frage zu beantworten, was mit der Hülle und den Proteinen, die an die Hülle gebunden sind, passiert. Es könnte unter Umständen geklärt werden, ob die Proteine auf der Hülle mit dem SPIO zusammen internalisiert werden oder schon im Blutstrom durch andere Proteine ersetzt werden. Da Tf auch andere Metallionen fest binden kann, wäre außerdem eine Doppelmarkierung denkbar.

3. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel (SPIOs) postsynthetisch radioaktiv mit ^{59}Fe zu markieren. Die Technik ist universell für SPIOs verschiedener Größe, die durch nasschemische organometallische Hochtemperatursynthesen hergestellt wurden, einsetzbar. Ferrit-Nanopartikel, die auf diesem Weg synthetisiert wurden, zeichnen sich durch eine enge Größenverteilung und hohe Kristallinität aus, die sie in ihren magnetischen Eigenschaften den kommerziell erwerbbaaren polydispersen SPIOs überlegen machen. Die von uns entwickelte Markierungsmethode hat viele Vorteile. Da die Radioaktivität erst nach Fertigstellung der SPIOs in das Partikel bei Raumtemperatur eingeführt wird, kann das Risiko für den Experimentator auf Grund des einfachen Aufbaus minimiert werden. Des Weiteren können die Partikel vor der Markierung bereits vollständig charakterisiert und die Ansatzgröße auf beliebig kleine Größen herunterskaliert werden, was eine bedarfsgerechte Produktion von radioaktiven SPIOs ermöglicht.

Die Stabilität der radioaktiven Markierung wurde mit unterschiedlichen Methoden überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass es nicht zu einem „Ausbluten“ der Markierung beim wiederholten Abtrennen von freiem Eisen durch Filterung oder Dialyse kam. Auch bei der Größenausschlusschromatographie zeigte sich eine strenge Co-Lokalisation der Radioaktivität und der SPIOs in allen Fraktionen. Der kontrollierte Verdau der SPIOs in Salzsäure zeigt, dass die Freisetzung von ^{59}Fe und ^{56}Fe einer ähnlichen Kinetik folgt. Im Transmissionselektronenmikroskop und im Magnetresonanztomographen konnte keine Veränderung der Größe, des Agglomerationsverhalten und der magnetischen Eigenschaften durch die radioaktive Markierung detektiert werden. Daraus lässt sich schließen, dass die von uns entwickelte Methode dazu geeignet ist, monodisperse SPIOs radioaktiv zu markieren. Die Stabilität des Labels erlaubt einen Einsatz dieser markierten Partikel *in vivo*, die dazu dient, wichtige pharmakokinetische Parameter, die die Voraussetzung für eine Medikamentenzulassung sind, zu ermitteln.

Die aus der Hochtemperatur gewonnenen SPIOs tragen auf ihrer Oberfläche Ölsäure, die sie vor Agglomeration schützt, sie aber auch lipophil macht. Vor einem Einsatz *in vivo* müssen die SPIOs deshalb wasserlöslich gemacht werden. In dieser Arbeit wurden als Oberflächenmodifikationen der Ligandenaustausch mit einer

phosphorylierten Polyethylenglykolkette, das Verpacken in ein amphiphiles Polymer und die Verkapselung in rekombinante Lipoproteine verwendet.

Die so verpackten SPIOs wurden dazu verwendet, Unterschiede in pharmakokinetischen Parametern wie Bluthalbwertszeit und Bioverteilung, die durch unterschiedliche Applikation, Größe und Verpackung der Partikel zustande kommen, zu ermitteln. Durch die Verwendung von fluoreszierenden Quantumdots bei gleichem Hüllmaterial konnte ermittelt werden, in welche Zellen der Leber die Nanopartikel aufgenommen werden. Diese Erkenntnisse wurden in einem Mausmodell genutzt, um einen effektiven Schutz vor experimenteller Autoimmun-Encephalomyelitis (EAE) durch den Transport spezifischer T-Zellen-aktivierender Peptide in die Endothelzellen der Leber zu etablieren (Herkelel *et al.*, Patent Nr. 11009032.1-2112).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit vom Zelltyp, der die SPIOs aufnimmt, auch die Metabolisierung und somit die Freisetzung des Eisens und die Inkorporation in neugebildete Erythrozyten unterschiedlich schnell und umfangreich verläuft. Durch eine transiente Depletion der Makrophagen mit clodronathaltigen Liposomen konnte gezeigt werden, dass die Kupffer Zellen eine zentrale Rolle im Abbau der SPIOs spielen, während die Endothelzellen in Lebersinusoiden nur bedingt zu einer Metabolisierung fähig sind. Mit Hilfe des Hamburger Biosuszeptometers konnte der Verlust des Superparamagnetismus beim Abbau der SPIOs erstmals *in vivo* am lebenden Tier verfolgt werden. Durch den Einsatz der radioaktiven Markierung war es möglich, diese Vorgänge zu quantifizieren und unter Verwendung eines [2+1]-Kompartiment-Modells die Ratenkonstanten mit hoher Genauigkeit zu ermitteln.

In einer weiteren *in vivo*-Anwendung wurden die radioaktiv markierten SPIOs in rekombinante Chylomikronen eingebettet und damit Veränderungen im Lipoproteinstoffwechsel durch Kälteaktivierung des braunen Fettgewebes quantifiziert (Bartelt *et al.*, *Nature Medicine* **2011**, *17*, 200).

Auf dem Weg hin zu spezifischen Kontrastmitteln wurde Transferrin an polymerumhüllte SPIOs gekoppelt. Nachdem die Stabilität der Kopplung gezeigt werden konnte, war es möglich mit Hilfe von ⁵⁹Fe die Funktionalität des Transferrins nach der Kopplung zu überprüfen und gleichzeitig die Hülle der SPIOs radioaktiv zu markieren.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es somit gelungen, monodisperse SPIOs radioaktiv zu markieren und sie *in vivo* zu charakterisieren.

4. Summary

Within the scope of the present thesis a method to label superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIOs) radioactively with ^{59}Fe in a postsynthetic manner was developed. It is an all-purpose approach that can be applied to all sizes of SPIOs which have been obtained by an organometallic high temperature synthesis. This kind of ferrite nanoparticles is characterized by a small size distribution and a high crystallinity which makes their magnetic properties superior to commercially available polydisperse SPIOs. This labeling method has some advantages. As radioactivity is introduced at room temperature after the particle has been synthesized, the risk for the experimenter can be reduced to a minimum because of the easy setup. Furthermore, the SPIOs can be characterized completely before the labeling and the quantity can be downscaled in a user-defined manner, making an on-demand production of radioactively labeled SPIOs possible.

Different aspects of the stability of the label were verified. It was shown that the label is not “washed out” of the nanoparticles when free iron is removed repeatedly by centrifugation units or dialysis. Additionally, the size-exclusion-chromatography shows a strict co-localization of radioactivity and SPIOs in all fractions. The controlled digestion of the SPIOs in hydrochloric acid suggests that the release of ^{56}Fe and ^{59}Fe follows similar kinetics. No differences in size and agglomeration behavior could be detected in the transmission electron microscope or in magnetic resonance imaging. This leads to the conclusion that the developed method can be used to radioactively label monodisperse SPIOs. The stability of the label allows an application *in vivo* to obtain important pharmacokinetic parameters which are a requirement for the administration of new pharmaceuticals.

The surface of SPIOs that have been synthesized by a high temperature method is covered in oleic acid which protects them from agglomeration while rendering them lipophilic. Therefore, the surface has to be altered to make the SPIOs water-soluble, before they can be applied *in vivo*. In the present thesis a ligand exchange against a phosphorylated polyethylene glycol chain, an encapsulation with an amphiphilic polymer and the embedding into the core of recombinant lipoproteins were employed as surface modifications.

These SPIOs were used to identify differences in blood half-life and biodistribution caused by different modes of application or size and surface modifications of the particle. By using fluorescent quantum dots it was possible to determine which cells in the liver take up the nanoparticles. These findings were used in a mouse model to establish an effective protection against experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by transporting a T-cell-activating peptide into endothelial cells of the liver (Herkel *et al.*, Patent Nr. 11009032.1-2112).

Furthermore, it could be shown that the metabolism of the SPIOs depends on the cell type that absorbs the nanoparticle and therefore the release of iron and the incorporation into newly formed erythrocytes proceeds at a different speed and to a different extent. Through transient depletion of the macrophages with clodronate-containing liposomes it could be verified that Kupffer cells play a central role in the processing while the sinus-lining endothelial cells are limited in their ability to metabolize SPIOs. The Hamburger Biosuszeptometer was used to monitor the loss of the superparamagnetism through metabolism *in vivo* in a living animal for the first time. Through the use of the radioactive label it was possible to quantify these processes and to calculate the rate constants through a [2+1]-compartment-model with high precision.

In addition the radioactively labeled SPIOs embedded in recombinant chylomicrones were used to quantify changes in lipoprotein pathways after cold activation of the brown adipose tissue (Bartelt *et al.*, *Nature Medicine* **2011**, *17*, 200).

On the way to specific contrast agents, transferrin was coupled to polymer-coated SPIOs. The stability of the label was ascertained. Through the use of ⁵⁹Fe it was possible to verify the functionality of the transferrin after the coupling and at the same time to radioactively label the shell of the SPIOs.

In conclusion a method to radioactively label monodisperse SPIOs was established and used to characterise these SPIOs *in vivo*.

5. Material und Methoden

5.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, ohne zusätzliche Aufreinigung in der höchsten erhältlichen Reinheit eingesetzt. Alle Chemikalien inklusive ihrer Sicherheitshinweise sind im Anhang aufgeführt.

5.2 Synthese der superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikel

Nur die Synthese der 6 nm großen SPIOs wurde im Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Die 4 nm,^{249,250} 10 nm²⁵¹ und 12 nm²⁵² großen Partikel wurden uns vom Institut für physikalische Chemie der Universität Hamburg von der Arbeitsgruppe Weller zur Verfügung gestellt.

Die Synthese der 6 nm großen Partikel erfolgte nach Hyeon *et al.*²⁵¹ 1.28 g (4.56 mmol) Ölsäure und 10 ml Dioctylether wurden unter Stickstoffatmosphäre auf 100 °C erhitzt. Unter starkem Rühren wurden 0,2 ml (1.52 mmol) Eisenpentacarbonyl injiziert und das Reaktionsgemisch 1 h lang bei ca. 300 °C refluxiert. Nachdem die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden 0,34 g Trimethylamin-*N*-oxid zugegeben und für 2 h auf 130 °C erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz langsam zum Reflux (ca. 300 °C) erhitzt und 1 h auf dieser Temperatur gehalten. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung auf zwei 50 mL-Falkons aufgeteilt und die SPIOs durch die Zugabe von 50 mL Ethanol gefällt und zentrifugiert (10 min, 2750 g). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut in Chloroform dispergiert. Anschließend wurden die Nanopartikel nochmals mit 30 mL Aceton gefällt und zentrifugiert (10 min, 2750 g). Dieser Vorgang wurde wiederholt, anschließend wurden die SPIOs in ca. 3 mL Hexan aufgenommen und gelagert.

5.3 Überführung der ölsäurestabilisierten SPIOs ins wässrige Medium

Die angeführten Arten die lipophilen SPIOs wasserlöslich zu machen, wurden sowohl für radioaktiv markierte als auch unmarkierte SPIOs verwendet.

5.3.1 Ligandenaustausch mit phosphorylierten Polyethylenglykolmonomethylethern

Der Ligand für den Austausch wurde uns von Dr. Tromsdorf aus der Arbeitsgruppe Weller im Institut für physikalische Chemie der Universität Hamburg zur Verfügung gestellt und eine adaptierte Austauschmethode aus der Literatur verwendet.³⁵ 150 mg des phosphorylierten Polyethylenglykolmonomethylethers wurden in destilliertem Wasser aufgenommen und der pH-Wert mit einer 2 M Natriumhydroxidlösung neutralisiert. Dann wurde das Volumen mit destilliertem Wasser auf 700 μ L aufgefüllt. 1,5 mg Trockenmasse an SPIOs (Kerngröße 4 nm, bzw. 10 nm) wurden in THF dispergiert und dann langsam zu der Ligandenlösung getropft. Das Gemisch wurde unter starkem Rühren über Nacht auf 60 °C erhitzt. Am nächsten Tag wurde nach dem Abkühlen das THF mittels eines Stickstoffstroms verdampft und die Probe sukzessiv durch einen 0,45 μ m und einen 0,22 μ m PTFE Spritzenfilter gefiltert. Freies Eisen und freier Ligand wurden durch einen Zentrifugationsfilter (5 kDa, 5000 g) entfernt und die SPIOs dann wieder in isotonischer Kochsalzlösung resuspendiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Um Aggregate abzutrennen, wurden die SPIOs mit einer Kerngröße von 4 nm durch einen Zentrifugationsfilter (300 kDa, 5000 g) gefiltert. Bei den SPIOs mit einer Kerngröße von 10 nm wurde stattdessen die Probe für 10 min bei 5200 g zentrifugiert und das Pellet verworfen.

5.3.2 Verkapselung in ein amphiphiles Polymer

Für die Verkapselung der SPIOs in das kommerziell erhältliche amphiphile Polymer Poly(Maleinsäureanhydrid-*alt*-1-octadecen) (PMAOD) (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) wurde eine literaturbekannte Vorschrift mit kleineren Modifikationen verwendet.¹⁷⁶ Zu 2 mg SPIO-Trockenmasse in 2 mL Chloroform wurden 2 mL einer PMAOD-Lösung gegeben ($c = 0,01\text{g/mL}$ in Chloroform) und mindestens eine Stunde, idealerweise über Nacht, bei RT gerührt. Am nächsten Tag wurde das Lösungsmittel mit einem Stickstoffstrom verdampft und durch 3 mL eines Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)–Borat–Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)–Puffers (TBE) ersetzt. Die Lösung wurde dann dreimal für 10 min sonifiziert, wobei man sie zwischen den Schritten abkühlen ließ. Danach wurde die Lösung in einem Schüttler für 10 min auf 60 °C erhitzt. Dann wurden durch dreimalige Zentrifugation (10 min, 2400 g, RT)

die Agglomerate abgetrennt. Das überschüssige Polymer wurde mittels Ultrazentrifugation (1 h, 50000 g, 4°C) entfernt. Anschließend wurde die Probe sukzessiv durch einen 0,45 µm, 0,2 µm und einen 0,1 µm PTFE Spritzenfilter gefiltert. Zur Entfernung von Resten freien Eisens wurde ein Zentrifugationsfilter (5 kDa, 5000 g) verwendet. Die SPIOs wurden dann im gewünschten hydrophilen Lösungsmittel resuspendiert. Zum Schluss wurde die Qualität der Partikel mit Größenausschlusschromatographie (SEC) überprüft.

Da diese Art der Verpackung, die am meisten genutzte in dieser Arbeit ist, wurden die radioaktiv markierten SPIOs genutzt, um den Verkapselungsvorgang zu quantifizieren (siehe Tabelle 5.1).

Verluste durch Überführung in andere Reaktionsgefäße	ca. 6 %
Verluste durch die Abtrennung der Agglomerate durch Zentrifugation	ca. 15 %
Verluste durch die Abtrennung von freiem Polymer und Eisen durch Ultrazentrifugation	ca. 16 %
Aktivität im fertig verpackten SPIO	ca. 64 %

Tabelle 5.1: Quantifizierung des Verkapselungsvorgangs

Diese Verpackung kann in gleicher Art und Weise für Quantumdots verwendet werden.

5.3.3 Einbetten von SPIOs in Lipidmizellen

5.3.3.1 Rekombinante triglyceridreiche Lipoproteine

Die Verpackung in rekombinante triglyceridreiche Lipoproteine (TRL) erfolgt nach einer in der Literatur beschriebenen Vorschrift.³⁶ Die dafür notwendigen Lipide wurde von der Arbeitsgruppe Heeren aus der TRL humaner Blutproben isoliert und uns zur Verfügung gestellt. Für das Einbetten wurden 10 mg des Lipidextrakts (80% Triglyceride, 10% Cholesterol und 10% Phospholipide) in Chloroform aufgenommen und 0,5 mg SPIOs (Trockenmasse) hinzugegeben. Um doppelmarkierte TRL zu erhalten, kann an dieser Stelle zusätzlich ³H-Triolein zugesetzt werden. Dann wird das Lösungsmittel mit einem Stickstoffstrom abgedampft. Anschließend wird 1 mL 60 °C warmer PBS zugegeben und die Probe dreimal 3,3 min lang sonifiziert. Man lässt die Lösung zwischen den einzelnen Schritten abkühlen. Danach wird die Lösung durch einen 0,45 µm PTFE Spritzenfilter gefiltert. Um Reste freien Eisens abzutrennen, wird die Probe über eine PD-10-Säule aufgereinigt.

In dieser Art und Weise können auch QDs verpackt werden.

5.3.3.2 Rekombinante high-density Lipoproteine

Die verwendeten Lipide wurden aus humaner HDL von der Arbeitsgruppe Heeren extrahiert und uns zur Verfügung gestellt. Die Verpackung erfolgte analog zur Herstellung der TRL. Es wurden 10 mg Peptid in 2 mL Chloroform aufgenommen und 0,4 mg SPIOs (Trockenmasse) zugesetzt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Stickstoffstrom abgedampft. Dann werden 4 mL 60 °C warmer PBS und nach dem Vortexen 10 µL einer Deoxycholsäure-Lösung (50 mg/mL in PBS) zugegeben und die Probe dreimal 4 min lang sonifiziert. Man lässt die Lösung zwischen den einzelnen Schritten abkühlen. Die Filterung erfolgt nacheinander durch einen 0,45 µm und 0,22 µm PTFE Spritzenfilter und vor der Reinigung über die PD-10-Säule wird die Lösung mit einem Zentrifugationsfilter (10 kDa, 2400 g, 4 °C) aufkonzentriert.

5.4 ⁵⁹Fe-markierte SPIOs

Bei allen Experimenten bei denen es zum Umgang mit radioaktivem Material kam, wurden die entsprechenden Strahlenschutzvorschriften befolgt. Vor Beginn der Versuche erfolgte eine Einweisung in den Strahlenschutz durch die Strahlenschutzbeauftragten PD. Dr. Dr. Nielsen und Prof. Dr. Heeren. Allen Versuchen wurde das „ALARA-Prinzip“ (as low as reasonably achievable) zu Grunde gelegt. Es bedeutet, dass mit so wenig Aktivität wie möglich, so kurz wie möglich und mit so viel Abstand wie möglich gearbeitet wird. Des Weiteren wurde bei der Arbeit mit radioaktiven Verbindungen ein Schutzkittel, eine Schutzbrille, sowie Handschuhe verwendet, außerdem so weit möglich ein Bleischutz genutzt. Der anfallende Müll wurde getrennt gesammelt und ordnungsgemäß entsorgt. Die individuelle Strahlenbelastung wurde mittels einer Dosimeterplakette gemessen.

5.4.1 Radioaktive Markierung von ölsäurestabilisierten SPIOs

Aliquots einer kommerziell erworbenen ⁵⁹FeCl₃ Lösung (Perkin-Elmer, Rodgau, Deutschland; 50 - 100 µCi / 2 - 10 µg Fe) in 0,5 M Salzsäure (HCl) wurden lyophilisiert, um Wasser und Reste der HCl zu entfernen. Dieser Schritt ist essentiell, da schon Spuren von Salzsäure den pH-Wert so weit absenken, dass die SPIOs zerstört werden. Dann wurden die ölsäurestabilisierten SPIOs in einem organischen Lösungsmittel (meistens Chloroform) zugegeben. Je nach gewünschter Menge lag die

Konzentration zwischen 2 und 5 mg SPIO-Trockenmasse pro mL. Das Verhältnis von ^{59}Fe / ^{56}Fe lag zwischen 0,0001 % und 0,5 %. Die Lösung wurde für mindestens 24 h bei RT gerührt, bevor die SPIOs für weitere Experimente verwendet wurden.

5.4.2 Kinetik des Einbaus in Anwesenheit verschiedener Zusätze

Zum $^{59}\text{FeCl}_3$ in 0,5 M HCl wurden die Zusätze im 10-fachen Überschuss gegeben. EDTA, Natriumoleat und Vitamin C wurden hierfür in Wasser aufgenommen, die Ölsäure in Ethanol. Die Lösung wurde 10 min gerührt. Nachdem die Flüssigkeit in der Lyophille entfernt worden war, wurden die SPIOs im entsprechenden Lösungsmittel (Chloroform, Hexan oder Toluol) (2 mg in 0,5 mL) zugegeben und bei RT gerührt. Nach 1 h, 3 h, 8 h und 24 h, so wie nach 3 d, 7 d, 14 d und 28 d wurden 30 μL Aliquots abgenommen. Diese Proben wurden mit dem entsprechenden Lösungsmittel auf 300 μL verdünnt. Danach wurden sie mit 500 μL destilliertem Wasser ausgeschüttelt. Um die Phasentrennung zu beschleunigen wurden die Proben zentrifugiert. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt und die Radioaktivität in den beiden Phasen nach jedem Ausschütteln gemessen.

5.4.3 Einfluss der zugesetzten Eisenmenge auf die Inkorporation

Vor der Behandlung in der Lyophille wurde in 4 Vials eine identische Menge an ^{59}Fe vorgelegt. In ein Vial wurde kein weiteres Eisen, in die anderen Vials wurde die 100-, 1000- bzw. 10000-fache Menge an ^{56}Fe in Form von $^{56}\text{FeCl}_3$ -Lösung zugegeben. Die Menge an zugesetztem Eisen entsprach damit 0,0004 %, 0,04 %, 0,4%, bzw. 4% der Eisenmenge der zugesetzten SPIOs. Nachdem die Flüssigkeit in der Lyophille entfernt wurde, wurden die SPIOs (2 mg) in 1 mL Chloroform zugegeben und bei RT gerührt. Nach 1 - 2 h, 4 h, 24 h und nach 8 d wurden aus jedem Vial 100 μL entnommen. Die SPIOs wurden durch die Zugabe von 1 mL Aceton gefällt und die Probe zentrifugiert. Die Radioaktivität in Pellet und Überstand wurde unabhängig voneinander gemessen.

5.4.4 Kontrollierter Verdau der SPIOs mit Salzsäure

Zu den polymerumhüllten SPIOs wurde so viel Salzsäure gegeben, dass die Endkonzentration 0,1 mol/L bzw. 0,17 mol/L in einem Endvolumen von 0,5 mL betrug.

Die Eppendorfggefäße wurden bei 37 °C inkubiert. Nach 1 h, 7,5 h, 24 h und 48 h wurden 50 µL Aliquots entnommen, auf 100 µL verdünnt und durch einen Zentrifugationsfilter (5 kDa, 5200 g, 15 min) gefiltert. Die ⁵⁹Fe-Menge in Filter und Filtrat wurde gemessen. Zusätzlich wurde die Eisenkonzentration im Filtrat mittels AAS bestimmt.

5.5 Kopplung von Biomolekülen an polymerumhüllte SPIOs

Alle Kopplungen wurden nach einem literaturbekanntem Protokoll durchgeführt,²⁴⁸ lediglich die Mengen an eingesetztem EDC und / oder Biomolekül (Tf, MBP) wurden variiert.

Die Lösung polymerumhüllter SPIOs wurde mit einem 5 kDa Zentrifugationsfilter aufkonzentriert und dann in so viel 50 mM Natriumboratpuffer (SBB) (pH 9) aufgenommen, dass eine 6 µM Lösung entstand. Dann wurde das gleiche Volumen einer EDC-Lösung (6 mM in SBB (pH 9)) zugegeben und die Lösung 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die gewünschte Menge an Protein ebenfalls im gleichen Volumen SBB gelöst wie die SPIOs, dazugefügt und der Ansatz für 2 h bei RT und weiter über Nacht bei 4 °C auf einem Schütteltisch inkubiert.

Das nicht gekoppelte Protein wurde mit einem Zentrifugationsfilter (100 kDa, 3400 g, 4°C) durch mehrfache Zentrifugation und Resuspension abgetrennt.

Die Versuche zur Kopplung mit Tf wurden in Zusammenarbeit mit Gabriella Gebel durchgeführt.

5.6 Charakterisierungsmethoden

5.6.1 Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung wurde an einem Malvern Zetasizer Nano S-90 bei einer Laser-Wellenlänge von 633 nm durchgeführt. Da es sich um wässrige Lösungen handelte, wurden Plastikküvetten mit einer optischen Weglänge von 1 cm verwendet. Der hydrodynamische Durchmesser wurde mittels der Autokorrelationsfunktion pro Messung über drei Zyklen je 30 s ermittelt.

5.6.2 Eisenbestimmung

5.6.2.1 Photometrische Bestimmung

200 µL einer Probe wurden mit 50 µL 5 M Salzsäure versetzt und 30 min bei 70 °C inkubiert. Dann wurden 50 µL dieser Probe mit 150 µL eines 2 M Acetatpuffers (pH = 4,8), der 10 % (w/V) Ascorbinsäure enthielt, versetzt, gefolgt von 100 µL einer Bathophenanthrolinlösung (50 mg in 50 mL destilliertem Wasser). Nach 15 min wurde die Absorption bei 540 nm gemessen.

5.6.2.2 Atomabsorptionsspektroskopie

Für die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) wurde ein Perkin-Elmer Graphitrohr AAS 4100 mit HGA 700 Heizeinheit verwendet. Da es sich bei den Proben um die Filtrate aus dem kontrollierten Verdau handelt, konnten diese direkt ohne Vorbehandlung verwendet werden.

5.6.3 Gelelektrophorese

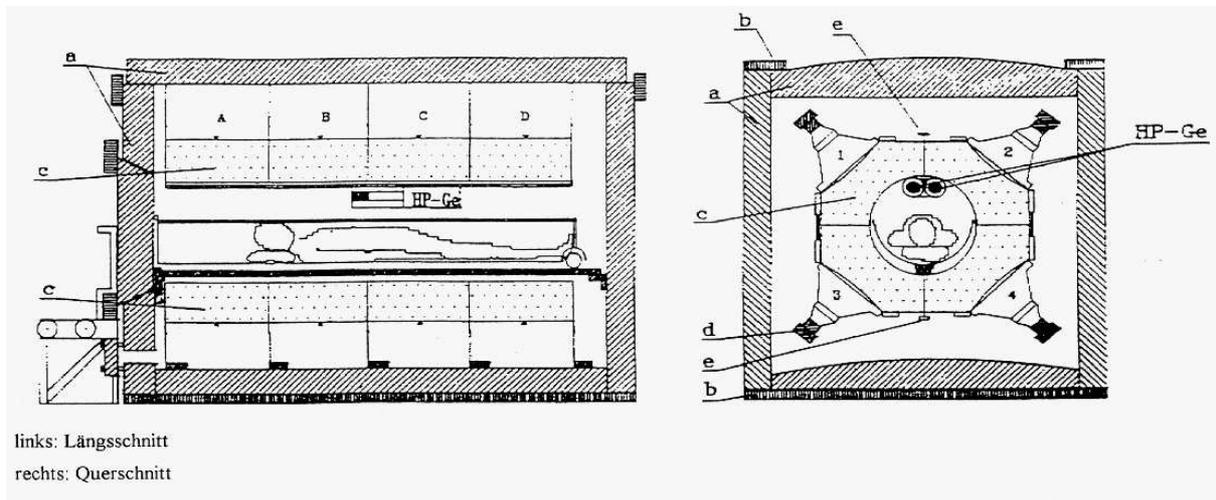
Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in einer horizontalen Elektrophorese-Apparatur mit 1- oder 2-%igen (w/V) Agarosegelen durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte für 45 min bis 60 min bei 100 V. Die SPIOs konnten auf Grund ihrer braunen Farbe ohne weitere Behandlung detektiert werden. Für die Proteindetektion wurde das Gel mit Commassie Blue 30 Minuten lang gefärbt und dann über Nacht der überschüssige Farbstoff entfernt.

5.6.4 Größenausschlusschromatographie

Für die Größenausschlusschromatographie (SEC) wurde eine Anlage (Pharmatia, Stockholm, Schweden) mit einer Superose-6 10/300 GL-Säule (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) verwendet. Die Flussgeschwindigkeit wurde auf 0,5 mL/min eingestellt. Die Fraktionen wurden alle zwei Minuten ab der 10. Minute gesammelt. Als Elutionspuffer wurde eine 10 mM TRIS, 150 mM Kochsalz und 10 mM EDTA-Lösung (pH = 8) verwendet.

5.6.5 Radioaktivitätsmessungen

^{59}Fe wurde im Hamburger Ganzkörperzähler (HAMCO) gemessen.²⁵³ Hierbei handelt es sich um einen Gesamtkörper-Radioaktivitätsdetektor mit flüssigem organischem Szintillator und quasi 4π -Messgeometrie (siehe Abbildung 5.1).



5.1: Hamburger Ganzkörperradioaktivitätszähler (HAMCO): oben: Schematischer Aufbau des HAMCO **a:** 15 cm Stahlplatten (Voratomzeitalter-Stahl), **b:** 5 cm Halterahmen (Voratomzeitalter-Stahl), **c:** Szintillatorflüssigkeit in Modultanks (je 170 l), **d:** Vorverstärker auf Photomultiplier-Basis, **e:** Lichtquellen, **A,B,C,D:** 50 cm ($2 \times 2\pi$) Modultanks, **1,2,3,4:** Du Mont-K 1328-Photomultiplier, **HP-Ge:** zwei GP-Ge-Detektoren (aktuell nicht mehr vorhanden), (Graphik adaptiert aus ²⁵³), **unten:** Foto des HAMCO mit ausgefahrener Liegefläche und einer darauf aufgebauten Brücke mit Messbox .

In 300 s Messzeit können 2,3 nCi ^{59}Fe mit $\pm 10\%$ Genauigkeit gemessen werden. Der Messbereich liegt zwischen 0,001 μCi und 10 μCi . Die Mäuse werden in einer Messbox oder einem Käfig in der Mitte der Trage fixiert und gemessen. Der Ganzkörperzähler ist relativ unempfindlich gegenüber kleinen Lageänderungen im

Zentrum (Bewegung der Mäuse), allerdings kann Abschirmung durch Gewebe eine gewisse Rolle spielen.

Organproben, die ^3H -Triolein enthielten wurden 1:10 in Solvable (PerkinElmer) für 1 h bei 60°C gelöst und die Radioaktivität 1:5 in UltimaGold (PerkinElmer) Szintillationsflüssigkeit bestimmt.

5.6.6 Magnetresonanztomographie

Die MRT-Messungen wurden an einem klinischen 3T Ganzkörper Magnetresonanztomographen (Philips Medical Systems, Hamburg, Deutschland) in der Gruppe von Prof. Adam in der Abteilung für Klinische und Interventionelle Radiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf von Dr. Raabe durchgeführt. Die Proben wurden in verschließbare 4 mL Kunststoffgefäße gefüllt und in einem Wasserbad bei 22 °C gemessen. Es wurde eine T_2^* -gewichtete Messung vorgenommen.

5.7 Mausmodelle und *in vivo*-Untersuchungen

Alle Tierversuche wurden mit Genehmigung des Tierschutzkomitees des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und der Behörde für Wissenschaft und Gesundheit, Stadt Hamburg durchgeführt (Tierversuchsnummer 34/10). Wenn nicht anders angegeben wurden männliche Wildtyp-Mäuse der Linien BALB/C oder FVB verwendet, die zwischen 8 und 12 Wochen alt waren und unter einem 12 h-Tag / Nacht-Zyklus gehalten wurden.

Falls lipidumhüllte SPIOs zum Einsatz kamen, wurden die Tiere vor Experimentbeginn 4h gefastet.

5.7.1 Bestimmung der Bluthalbwertszeit

200 μL der Probe wurden den Tieren, wenn nicht anders erwähnt, in die Schwanzvene appliziert, wofür ein aus einer 30 G-Kanüle gebauter Katheter verwendet wurde. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde den Tieren retrobulbär 50 - 80 μL Blut entnommen und die spezifische Aktivität der Probe bestimmt. Über das Gewicht der Maus kann

nach Gleichung 5.1²⁵⁴ das Blutvolumen berechnet werden und somit die Menge an im Blut zirkulierenden ⁵⁹Fe abgeschätzt werden.

$$V_{\text{Blut}}(\text{Maus}) = 0,072 \text{ mL/g} * m_{\text{Maus}}$$

$V_{\text{Blut}}(\text{Maus})$	=	Blutvolumen der Maus
m_{Maus}	=	Gewicht der Maus

Gleichung 5.1: Berechnung des Blutvolumens einer Maus aus ihrem Gewicht.

5.7.2 Bestimmung der Organverteilung

Den Tieren wurden 200 µL der Probe, wenn nicht anders erwähnt, in die Schwanzvene appliziert. 10 Minuten bis 2 h nach Injektion wurden die Mäuse im HAMCO gemessen. Die injizierte Dosis wurde ermittelt, indem die Menge, die sich nach Tötung der Mäuse im Schwanz fand, von den gemessenen Werten abgezogen wurde. Nach dem angegebenen Zeitintervall wurden die Tiere mit Ketamin / Rompun narkotisiert und mit PBS / Heparin oder wenn elektronenmikroskopische Aufnahmen der Organe gemacht werden sollten mit 4% PFA perfundiert und die Organe entnommen. Um die spezifischen Aktivitäten zwischen den Mäusen und verschiedenen Gruppen vergleichen zu können, wurden die Werte auf eine bestimmte injizierte Menge normiert.

5.7.3 Messung der Erythrozyteninkorporation

200 µL der Probe wurde den Tieren in die Schwanzvene injiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde den Tieren 20 - 50 µl Blut aus der Schwanzspitze entnommen und die spezifische Aktivität gemessen. Zusätzlich wurde die aktuelle Ganzkörper-⁵⁹Fe-Aktivität der gesamten Maus bestimmt. Über Gleichung 5.2 konnte daraus die Erythrozyteninkorporation berechnet werden.

$$\text{Erythrozyteninkorporation} = \frac{\text{⁵⁹Fe-Aktivität im Blut}}{\text{⁵⁹Fe-Ganzkörperretention}}$$

Gleichung 5.2: Berechnung der Erythrozyteninkorporation.

5.7.4 Ganzkörperretention

Die Tiere wurden zu verschiedenen Zeitpunkten lebend im HAMCO gemessen. Mit Hilfe der Formel 5.3 konnte die zeitkorrigierte Aktivität der Tiere berechnet und daraus die Ganzkörperretention (GKR) ermittelt werden.

$$A_0 = A(t)/\exp(-\ln(2)*t/T_{1/2})$$

A_0	=	Aktivität zum Zeitpunkt t_0
$A(t)$	=	Aktivität zum Zeitpunkt t
t	=	Zeit
$T_{1/2}$	=	Halbwertszeit

Gleichung 5.3: Radioaktives Zerfallsgesetz.

5.7.5 Suszeptibilitätsmessungen

Die Suszeptibilitätsmessungen wurden mit dem Hamburger Biosuszeptometer (BTi Ferritometer[®]) durchgeführt (siehe Abbildung 5.2).

Dieses Gerät wurde entwickelt, um die paramagnetische Suszeptibilität des Hämosiderin-Ferritin-Eisenkomplexes in der Leber von Patienten mit Eisenüberladung zu bestimmen. Die magnetische Suszeptibilität der Leber ist direkt proportional zur Lebereisenkonzentration.²⁵⁵

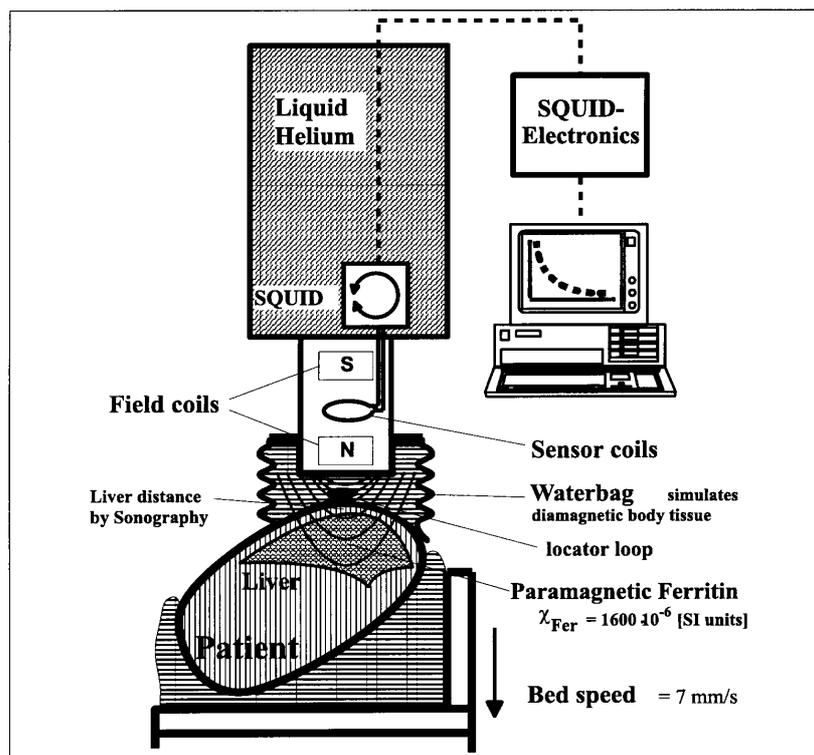


Abbildung 5.2: Schematischer Aufbau des Hamburger Biosuszeptometers (BTi Ferritometer[®]). (Graphik übernommen aus ²⁵⁶).

Da dieses Gerät für die menschliche Leber dimensioniert ist, wurde eine Glasapparatur entwickelt, mit der eine lebende Maus an der gewünschten Stelle fixiert werden kann. Die Materialien (Quarzglas, Aluminiumträger) wurden so gewählt, dass der magnetische Untergrund möglichst gering ist (siehe Abbildung 5.3).

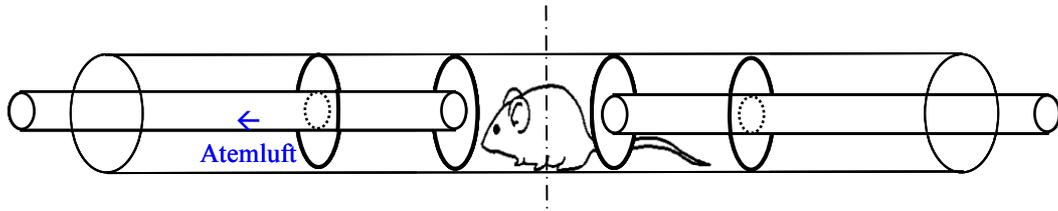


Abbildung 5.3: Schematische Zeichnung und Foto der Quarzröhre und Stempel zur Fixierung der Maus.

Mit Hilfe dieser Konstruktion wurde die Maus auf dem Tisch des Biosuszeptometers fixiert. Dieser wird in einem inhomogenen Magnetfeld ($B_{\max} \leq 0,03$ Tesla) während der Messung mit einer Geschwindigkeit von 7 mm/s abgesenkt. Dabei wird durch die SQUIDs die Änderung des magnetischen Flusses in Form der Spannungsänderung als Funktion des Abstandes gemessen. Die Maus wird vereinfacht als Zylinder ($r = 20$ mm, $l = 30 / 40$ mm je nach Gewicht der Maus) angenommen. Dadurch lässt sich das magnetische Flussintegral als Integral des Skalarprodukts aus dem magnetischen Feld des Suszeptometers und dem magnetischen Feld des Detektors über den dreidimensionalen Raum berechnen. Die Berechnungen wurden von Dr. Fischer durchgeführt. Nach Gleichung 5.4 kann aus der gemessenen Spannungsänderung die Suszeptibilität der Maus und damit auch der SPIOs *in vivo* berechnet werden.

$$\Delta\chi = \Delta V / \int \vec{B}_f \cdot \vec{B}_d dV$$

$\Delta\chi$	=	Suszeptibilitätsänderung gegen Wasser
ΔV	=	Spannungsänderung
$\int \vec{B}_f \cdot \vec{B}_d dV$	=	magnetisches Flussintegral

Gleichung 5.4: Formel zur Berechnung der Suszeptibilitätsänderung aus der Spannungsänderung.

Über die Dichte lässt sich die spezifische Volumenszeptibilität nach Gleichung 5.5 berechnen.

$$\zeta = \Delta\chi / \rho$$

ζ	=	spezifische Volumenszeptibilität
$\Delta\chi$	=	Suszeptibilitätsänderung
ρ	=	Dichte

Gleichung 5.5: Formel zur Berechnung der spezifischen Volumenszeptibilität.

Die Kontrollmessung eines mit wassergefüllten Ballons zeigte, dass unsere Berechnungen ein gutes Modell darstellen.

5.7.6 Statistik

Statistische Signifikanz zwischen den Mittelwerten der Gewebeproben und Organe verschiedener Mausgruppen wurde mit Hilfe des zweiseitigen, ungepaarten *Student's T-Test* überprüft. Zur Auswertung wurde ein Standard Tabellenkalkulations-programm Microsoft Excel (Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland) eingesetzt. Für das Erstellen der Graphen und die Berechnung der Fits wurde Graph Pad 5 (GraphPad Software, La Jolla, USA) verwendet.

6. Literatur

1. Feynman, R. P. There's plenty of room at the bottom. *Engineering and Science* **1960**, 23 (5), 22-36.
2. Riehemann, K.; Schneider, S. W.; Luger, T. A.; Godin, B.; Ferrari, M.; Fuchs, H. Nanomedicine--challenge and perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2009**, 48 (5), 872-897.
3. Assadi, M.; Afrasiabi, K.; Nabipour, I.; Seyedabadi, M. Nanotechnology and nuclear medicine; research and preclinical applications. *Hell. J. Nucl. Med.* **2011**, 14 (2), 149-159.
4. Weller, H. Colloidal Semiconductor Q-Particles: Chemistry in the Transition Region Between Solid State and Molecules. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, **2003**, pp 41-53.
5. Müller, A.; Quadbeck-Seeger, H.-J.; Diemann, E. *Facetten einer Wissenschaft*; Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA: Weinheim, 2004.
6. Gradishar, W. J. Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane. *Expert. Opin. Pharmacother.* **2006**, 7 (8), 1041-1053.
7. Sandhiya, S.; Dkhar, S. A.; Surendiran, A. Emerging trends of nanomedicine--an overview. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2009**, 23 (3), 263-269.
8. Greish, K.; Sawa, T.; Fang, J.; Akaike, T.; Maeda, H. SMA-doxorubicin, a new polymeric micellar drug for effective targeting to solid tumours. *J. Control Release* **2004**, 97 (2), 219-230.
9. Maeda, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv. Enzyme Regul.* **2001**, 41, 189-207.
10. O'Neal, D. P.; Hirsch, L. R.; Halas, N. J.; Payne, J. D.; West, J. L. Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer Lett.* **2004**, 209 (2), 171-176.
11. Giljohann, D. A.; Seferos, D. S.; Daniel, W. L.; Massich, M. D.; Patel, P. C.; Mirkin, C. A. Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2010**, 49 (19), 3280-3294.
12. Connor, E. E.; Mwamuka, J.; Gole, A.; Murphy, C. J.; Wyatt, M. D. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* **2005**, 1 (3), 325-327.
13. Sandhu, K. K.; McIntosh, C. M.; Simard, J. M.; Smith, S. W.; Rotello, V. M. Gold nanoparticle-mediated transfection of mammalian cells. *Bioconjug. Chem.* **2002**, 13 (1), 3-6.
14. Kim, C. K.; Ghosh, P.; Pagliuca, C.; Zhu, Z. J.; Menichetti, S.; Rotello, V. M. Entrapment of hydrophobic drugs in nanoparticle monolayers with efficient release into cancer cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (4), 1360-1361.
15. Medley, C. D.; Smith, J. E.; Tang, Z.; Wu, Y.; Bamrungsap, S.; Tan, W. Gold nanoparticle-based colorimetric assay for the direct detection of cancerous cells. *Anal. Chem.* **2008**, 80 (4), 1067-1072.

16. El-Sayed, I. H.; Huang, X.; El-Sayed, M. A. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer. *Nano. Lett.* **2005**, *5* (5), 829-834.
17. El-Sayed, I. H.; Huang, X.; El-Sayed, M. A. Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer Lett.* **2006**, *239* (1), 129-135.
18. Hirsch, L. R.; Stafford, R. J.; Bankson, J. A.; Sershen, S. R.; Rivera, B.; Price, R. E.; Hazle, J. D.; Halas, N. J.; West, J. L. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2003**, *100* (23), 13549-13554.
19. Loo, C.; Lowery, A.; Halas, N.; West, J.; Drezek, R. Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy. *Nano. Lett.* **2005**, *5* (4), 709-711.
20. Klostranec, J. M.; Chan, W. C. W. Quantum Dots in Biological and Biomedical Research. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1953-1964.
21. Rossetti, R.; Nakahara, S.; Brus, L. E. Quantum size effects in the redox potentials, resonance Raman spectra, and electronic spectra of CdS crystallites in aqueous solution. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 1086-1088.
22. Alivisatos, P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22* (1), 47-52.
23. Parak, W. J.; Gerion, D.; Pellegrino, T.; Zanchet, D.; Micheel, C.; Williams, S. C.; Boudreau, R.; Le Gros, M. A.; Larabell, C. A.; Alivisatos, A. P. Biological applications of colloidal nanocrystals. *Nanotechnology* **2003**, *14*, R15-R27.
24. Michalet, X.; Pinaud, F. F.; Bentolila, L. A.; Tsay, J. M.; Doose, S.; Li, J. J.; Sundaresan, G.; Wu, A. M.; Gambhir, S. S.; Weiss, S. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* **2005**, *307* (5709), 538-544.
25. Medintz, I. L.; Uyeda, H. T.; Goldman, E. R.; Mattoussi, H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat. Mater.* **2005**, *4* (6), 435-446.
26. Resch-Genger, U.; Grabolle, M.; Cavaliere-Jaricot, S.; Nitschke, R.; Nann, T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat. Methods* **2008**, *5* (9), 763-775.
27. Huber, D. L. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small* **2005**, *1* (5), 482-501.
28. Lu, A. H.; Salabas, E. L.; Schuth, F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2007**, *46* (8), 1222-1244.
29. Schladt, T. D.; Schneider, K.; Schild, H.; Tremel, W. Synthesis and bio-functionalization of magnetic nanoparticles for medical diagnosis and treatment. *Dalton Trans.* **2011**, *40* (24), 6315-6343.
30. Lodhia, J.; Mandarano, G.; Ferris, N.; Eu, P.; Cowell, S. Development and use of iron oxide nanoparticles (Part 1): Synthesis of iron oxide nanoparticles for MRI. *Biomed. Imaging Interv. J.* **2010**, *6* (2), e12.

31. LaMer, V. K.; Dinigar, R. H. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *Journal of the American Chemical Society* **1950**, 72 (11), 4847-4854.
32. Sugimoto, T. *Monodispersed Particles*; Elsevier: Amsterdam, New York, 2001.
33. Dilcher, L.; Venator, M.; Dilcher, S. *Handbuch der Kernspintomographie*; 2. ed.; Edwin Ferger Verlag: Bergisch Gladbach, 2002.
34. Lauterbur, P. C. Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance. *Nature* **1973**, 242, 190-191.
35. Tromsdorf, U. I.; Bruns, O. T.; Salmen, S. C.; Beisiegel, U.; Weller, H. A highly effective, nontoxic T1 MR contrast agent based on ultrasmall PEGylated iron oxide nanoparticles. *Nano. Lett.* **2009**, 9 (12), 4434-4440.
36. Bruns, O. T.; Ittrich, H.; Peldschus, K.; Kaul, M. G.; Tromsdorf, U. I.; Lauterwasser, J.; Nikolic, M. S.; Mollwitz, B.; Merkel, M.; Bigall, N. C.; Sapra, S.; Reimer, R.; Hohenberg, H.; Weller, H.; Eychmuller, A.; Adam, G.; Beisiegel, U.; Heeren, J. Real-time magnetic resonance imaging and quantification of lipoprotein metabolism in vivo using nanocrystals. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, 4 (3), 193-201.
37. Ferrucci, J. T.; Stark, D. D. Iron oxide-enhanced MR imaging of the liver and spleen: review of the first 5 years. *AJR Am. J. Roentgenol.* **1990**, 155 (5), 943-950.
38. Zhou, J.; Leuschner, C.; Kumar, C.; Hormes, J. F.; Soboyejo, W. O. Sub-cellular accumulation of magnetic nanoparticles in breast tumors and metastases. *Biomaterials* **2006**, 27 (9), 2001-2008.
39. Moore, A.; Marecos, E.; Bogdanov, A., Jr.; Weissleder, R. Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model. *Radiology* **2000**, 214 (2), 568-574.
40. Stark, D. D.; Weissleder, R.; Elizondo, G.; Hahn, P. F.; Saini, S.; Todd, L. E.; Wittenberg, J.; Ferrucci, J. T. Superparamagnetic iron oxide: clinical application as a contrast agent for MR imaging of the liver. *Radiology* **1988**, 168 (2), 297-301.
41. Nie, S.; Xing, Y.; Kim, G. J.; Simons, J. W. Nanotechnology applications in cancer. *Annu. Rev. Biomed. Eng* **2007**, 9, 257-288.
42. Chertok, B.; Moffat, B. A.; David, A. E.; Yu, F.; Bergemann, C.; Ross, B. D.; Yang, V. C. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials* **2008**, 29 (4), 487-496.
43. Enochs, W. S.; Harsh, G.; Hochberg, F.; Weissleder, R. Improved delineation of human brain tumors on MR images using a long-circulating, superparamagnetic iron oxide agent. *J. Magn Reson. Imaging* **1999**, 9 (2), 228-232.
44. Matsumura, Y.; Maeda, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* **1986**, 46 (12 Pt 1), 6387-6392.

6. Literatur

45. Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Control Release* **2000**, *65* (1-2), 271-284.
46. Will, O.; Purkayastha, S.; Chan, C.; Athanasiou, T.; Darzi, A. W.; Gedroyc, W.; Tekkis, P. P. Diagnostic precision of nanoparticle-enhanced MRI for lymph-node metastases: a meta-analysis. *Lancet Oncol.* **2006**, *7* (1), 52-60.
47. Ruehm, S. G.; Corot, C.; Vogt, P.; Kolb, S.; Debatin, J. F. Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaque with ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in hyperlipidemic rabbits. *Circulation* **2001**, *103* (3), 415-422.
48. Hyafil, F.; Laissy, J. P.; Mazighi, M.; Tchetché, D.; Louedec, L.; Adle-Biassette, H.; Chillon, S.; Henin, D.; Jacob, M. P.; Letourneur, D.; Feldman, L. J. Ferumoxtran-10-enhanced MRI of the hypercholesterolemic rabbit aorta: relationship between signal loss and macrophage infiltration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2006**, *26* (1), 176-181.
49. Kooi, M. E.; Cappendijk, V. C.; Cleutjens, K. B.; Kessels, A. G.; Kitslaar, P. J.; Borgers, M.; Frederik, P. M.; Daemen, M. J.; van Engelshoven, J. M. Accumulation of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in human atherosclerotic plaques can be detected by in vivo magnetic resonance imaging. *Circulation* **2003**, *107* (19), 2453-2458.
50. Trivedi, R. A.; King-Im, J. M.; Graves, M. J.; Kirkpatrick, P. J.; Gillard, J. H. Noninvasive imaging of carotid plaque inflammation. *Neurology* **2004**, *63* (1), 187-188.
51. Hogemann, D.; Josephson, L.; Weissleder, R.; Basilion, J. P. Improvement of MRI probes to allow efficient detection of gene expression. *Bioconjug. Chem.* **2000**, *11* (6), 941-946.
52. Ichikawa, T.; Hogemann, D.; Saeki, Y.; Tyminski, E.; Terada, K.; Weissleder, R.; Chiocca, E. A.; Basilion, J. P. MRI of transgene expression: correlation to therapeutic gene expression. *Neoplasia*. **2002**, *4* (6), 523-530.
53. Kresse, M.; Wagner, S.; Pfefferer, D.; Lawaczek, R.; Elste, V.; Semmler, W. Targeting of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) particles to tumor cells in vivo by using transferrin receptor pathways. *Magn Reson. Med.* **1998**, *40* (2), 236-242.
54. Moore, A.; Basilion, J. P.; Chiocca, E. A.; Weissleder, R. Measuring transferrin receptor gene expression by NMR imaging. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1402* (3), 239-249.
55. Qian, Z. M.; Li, H.; Sun, H.; Ho, K. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54* (4), 561-587.
56. Sudimack, J.; Lee, R. J. Targeted drug delivery via the folate receptor. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *41* (2), 147-162.
57. Choi, H.; Choi, S. R.; Zhou, R.; Kung, H. F.; Chen, I. W. Iron oxide nanoparticles as magnetic resonance contrast agent for tumor imaging via folate receptor-targeted delivery. *Acad. Radiol.* **2004**, *11* (9), 996-1004.
58. Funovics, M. A.; Kapeller, B.; Hoeller, C.; Su, H. S.; Kunstfeld, R.; Puig, S.; Macfelda, K. MR imaging of the her2/neu and 9.2.27 tumor antigens using immunospecific contrast agents. *Magn Reson. Imaging* **2004**, *22* (6), 843-850.

59. 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.* **2003**, *49* (3), 403-408.
60. Power, S.; Slattery, M. M.; Lee, M. J. Nanotechnology and its relationship to interventional radiology. Part I: imaging. *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* **2011**, *34* (2), 221-226.
61. Jokerst, J. V.; Gambhir, S. S. Molecular imaging with theranostic nanoparticles. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (10), 1050-1060.
62. Thorek, D. L.; Chen, A. K.; Czupryna, J.; Tsourkas, A. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging. *Ann. Biomed. Eng.* **2006**, *34* (1), 23-38.
63. Sumer, B.; Gao, J. Theranostic nanomedicine for cancer. *Nanomedicine. (Lond)* **2008**, *3* (2), 137-140.
64. Wannemacher, M.; Debus, J.; Wenz, F. *Strahlentherapie*; Springer: Berlin, Heidelberg, 2006.
65. Hildebrandt, B.; Wust, P.; Ahlers, O.; Dieing, A.; Sreenivasa, G.; Kerner, T.; Felix, R.; Riess, H. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* **2002**, *43* (1), 33-56.
66. Hilger, I.; Hergt, R.; Kaiser, W. A. Use of magnetic nanoparticle heating in the treatment of breast cancer. *IEE. Proc. Nanobiotechnol.* **2005**, *152* (1), 33-39.
67. Johannsen, M.; Gneveckow, U.; Thiesen, B.; Taymoorian, K.; Cho, C. H.; Waldofner, N.; Scholz, R.; Jordan, A.; Loening, S. A.; Wust, P. Thermotherapy of prostate cancer using magnetic nanoparticles: feasibility, imaging, and three-dimensional temperature distribution. *Eur. Urol.* **2007**, *52* (6), 1653-1661.
68. Power, S.; Slattery, M. M.; Lee, M. J. Nanotechnology and its relationship to interventional radiology. Part II: Drug Delivery, Thermotherapy, and Vascular Intervention. *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* **2011**, *34* (4), 676-690.
69. Nobuto, H.; Sugita, T.; Kubo, T.; Shimose, S.; Yasunaga, Y.; Murakami, T.; Ochi, M. Evaluation of systemic chemotherapy with magnetic liposomal doxorubicin and a dipole external electromagnet. *Int. J. Cancer* **2004**, *109* (4), 627-635.
70. Lemke, A. J.; Senfft von Pilsach, M. I.; Lubbe, A.; Bergemann, C.; Riess, H.; Felix, R. MRI after magnetic drug targeting in patients with advanced solid malignant tumors. *Eur. Radiol.* **2004**, *14* (11), 1949-1955.
71. Luciani, A.; Wilhelm, C.; Bruneval, P.; Cunin, P.; Autret, G.; Rahmouni, A.; Clement, O.; Gazeau, F. Magnetic targeting of iron-oxide-labeled fluorescent hepatoma cells to the liver. *Eur. Radiol.* **2009**, *19* (5), 1087-1096.
72. de Hevesy, G. C. Marie Curie and her contemporaries. The Becquerel-Curie memorial lecture. *J. Nucl. Med.* **1984**, *25* (1), 116-131.
73. Anger, H. O. Use of a gamma-ray pinhole camera for in vivo studies. *Nature* **1952**, *170* (4318), 200-201.
74. Anger, H. O. Scintillation Camera. *Rev. Sci. Instrum.* **1958**, *29* (1), 27-33.

75. Dössel, O. *Bildgebende Verfahren in der Medizin*; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio, 2000.
76. Jaszczak, R. J.; Coleman, R. E. Single photon emission computed tomography (SPECT). Principles and instrumentation. *Invest Radiol.* **1985**, *20* (9), 897-910.
77. Coleman, R. E. Single photon emission computed tomography and positron emission tomography in cancer imaging. *Cancer* **1991**, *67* (4 Suppl), 1261-1270.
78. Phelps, M. E.; Hoffman, E. J.; Mullani, N. A.; Ter-Pogossian, M. M. Application of annihilation coincidence detection to transaxial reconstruction tomography. *J. Nucl. Med.* **1975**, *16* (3), 210-224.
79. Ter-Pogossian, M. M.; Phelps, M. E.; Hoffman, E. J.; Mullani, N. A. A positron-emission transaxial tomograph for nuclear imaging (PETT). *Radiology* **1975**, *114* (1), 89-98.
80. Stolz, W. *Radioaktivität*; 5 ed.; B.G.Teubner Verlag: Wiesbaden, 2005.
81. Sharkey, R. M.; Goldenberg, D. M. Perspectives on cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies. *J. Nucl. Med.* **2005**, *46 Suppl 1*, 115S-127S.
82. Hong, H.; Zhang, Y.; Sun, J.; Cai, W. Molecular imaging and therapy of cancer with radiolabeled nanoparticles. *Nano. Today* **2009**, *4* (5), 399-413.
83. DeNardo, S. J.; DeNardo, G. L.; Miers, L. A.; Natarajan, A.; Foreman, A. R.; Gruettner, C.; Adamson, G. N.; Ivkov, R. Development of tumor targeting bioprobes ((111)In-chimeric L6 monoclonal antibody nanoparticles) for alternating magnetic field cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11* (19 Pt 2), 7087s-7092s.
84. Jarrett, B. R.; Gustafsson, B.; Kukis, D. L.; Louie, A. Y. Synthesis of ⁶⁴Cu-labeled magnetic nanoparticles for multimodal imaging. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19* (7), 1496-1504.
85. Lee, H. Y.; Li, Z.; Chen, K.; Hsu, A. R.; Xu, C.; Xie, J.; Sun, S.; Chen, X. PET/MRI dual-modality tumor imaging using arginine-glycine-aspartic (RGD)-conjugated radiolabeled iron oxide nanoparticles. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49* (8), 1371-1379.
86. Choi, J. S.; Park, J. C.; Nah, H.; Woo, S.; Oh, J.; Kim, K. M.; Cheon, G. J.; Chang, Y.; Yoo, J.; Cheon, J. A hybrid nanoparticle probe for dual-modality positron emission tomography and magnetic resonance imaging. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2008**, *47* (33), 6259-6262.
87. Bogenrieder, T.; Herlyn, M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* **2003**, *22* (42), 6524-6536.
88. Devaraj, N. K.; Keliher, E. J.; Thurber, G. M.; Nahrendorf, M.; Weissleder, R. ¹⁸F labeled nanoparticles for in vivo PET-CT imaging. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20* (2), 397-401.
89. Hu, G.; Lijowski, M.; Zhang, H.; Partlow, K. C.; Caruthers, S. D.; Kiefer, G.; Gulyas, G.; Athey, P.; Scott, M. J.; Wickline, S. A.; Lanza, G. M. Imaging of Vx-2 rabbit tumors with alpha(nu)beta3-integrin-targeted ¹¹¹In nanoparticles. *Int. J. Cancer* **2007**, *120* (9), 1951-1957.

90. Tran, T. D.; Caruthers, S. D.; Hughes, M.; Marsh, J. N.; Cyrus, T.; Winter, P. M.; Neubauer, A. M.; Wickline, S. A.; Lanza, G. M. Clinical applications of perfluorocarbon nanoparticles for molecular imaging and targeted therapeutics. *Int. J. Nanomedicine*. **2007**, *2* (4), 515-526.
91. Wang, H.; Wang, J.; Deng, X.; Sun, H.; Shi, Z.; Gu, Z.; Liu, Y.; Zhao, Y. Biodistribution of carbon single-wall carbon nanotubes in mice. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2004**, *4* (8), 1019-1024.
92. Balasubramanian, K.; Burghard, M. Chemically functionalized carbon nanotubes. *Small* **2005**, *1* (2), 180-192.
93. Lacerda, L.; Bianco, A.; Prato, M.; Kostarelos, K. Carbon nanotubes as nanomedicines: from toxicology to pharmacology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58* (14), 1460-1470.
94. Liu, Z.; Cai, W.; He, L.; Nakayama, N.; Chen, K.; Sun, X.; Chen, X.; Dai, H. In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2* (1), 47-52.
95. McDevitt, M. R.; Chattopadhyay, D.; Jaggi, J. S.; Finn, R. D.; Zanzonico, P. B.; Villa, C.; Rey, D.; Mendenhall, J.; Batt, C. A.; Njardarson, J. T.; Scheinberg, D. A. PET imaging of soluble yttrium-86-labeled carbon nanotubes in mice. *PLoS. One*. **2007**, *2* (9), e907.
96. Liu, Z.; Chen, K.; Davis, C.; Sherlock, S.; Cao, Q.; Chen, X.; Dai, H. Drug delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment. *Cancer Res.* **2008**, *68* (16), 6652-6660.
97. Joshi, B. P.; Wang, T. D. Exogenous Molecular Probes for Targeted Imaging in Cancer: Focus on Multi-modal Imaging. *Cancers. (Basel)* **2010**, *2* (2), 1251-1287.
98. Cai, W.; Chen, K.; Li, Z. B.; Gambhir, S. S.; Chen, X. Dual-function probe for PET and near-infrared fluorescence imaging of tumor vasculature. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48* (11), 1862-1870.
99. Chen, K.; Li, Z. B.; Wang, H.; Cai, W.; Chen, X. Dual-modality optical and positron emission tomography imaging of vascular endothelial growth factor receptor on tumor vasculature using quantum dots. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, *35* (12), 2235-2244.
100. Cai, W.; Shin, D. W.; Chen, K.; Gheysens, O.; Cao, Q.; Wang, S. X.; Gambhir, S. S.; Chen, X. Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects. *Nano. Lett.* **2006**, *6* (4), 669-676.
101. Bentolila, L. A.; Ebenstein, Y.; Weiss, S. Quantum dots for in vivo small-animal imaging. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50* (4), 493-496.
102. Wu, Y.; Zhang, X.; Xiong, Z.; Cheng, Z.; Fisher, D. R.; Liu, S.; Gambhir, S. S.; Chen, X. microPET imaging of glioma integrin $\alpha_v\beta_3$ expression using (64)Cu-labeled tetrameric RGD peptide. *J. Nucl. Med.* **2005**, *46* (10), 1707-1718.
103. Gao, X.; Cui, Y.; Levenson, R. M.; Chung, L. W.; Nie, S. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22* (8), 969-976.
104. Cormode, D. P.; Skajaa, T.; van Schooneveld, M. M.; Koole, R.; Jarzyna, P.; Lobatto, M. E.; Calcagno, C.; Barazza, A.; Gordon, R. E.; Zanzonico, P.; Fisher, E. A.; Fayad, Z. A.; Mulder, W. J. Nanocrystal core high-density lipoproteins: a multimodality contrast agent platform. *Nano Lett.* **2008**, *8* (11), 3715-3723.

6. Literatur

105. Wickline, S. A.; Neubauer, A. M.; Winter, P. M.; Caruthers, S. D.; Lanza, G. M. Molecular imaging and therapy of atherosclerosis with targeted nanoparticles. *J. Magn Reson. Imaging* **2007**, *25* (4), 667-680.
106. Mulder, W. J.; Cormode, D. P.; Hak, S.; Lobatto, M. E.; Silvera, S.; Fayad, Z. A. Multimodality nanotracers for cardiovascular applications. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **2008**, *5 Suppl 2*, S103-S111.
107. Duconge, F.; Pons, T.; Pestourie, C.; Herin, L.; Theze, B.; Gombert, K.; Mahler, B.; Hinnen, F.; Kuhnast, B.; Dolle, F.; Dubertret, B.; Tavitian, B. Fluorine-18-labeled phospholipid quantum dot micelles for in vivo multimodal imaging from whole body to cellular scales. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19* (9), 1921-1926.
108. Kim, S.; Lim, Y. T.; Soltesz, E. G.; De Grand, A. M.; Lee, J.; Nakayama, A.; Parker, J. A.; Mihaljevic, T.; Laurence, R. G.; Dor, D. M.; Cohn, L. H.; Bawendi, M. G.; Frangioni, J. V. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22* (1), 93-97.
109. Inoue, Y.; Izawa, K.; Yoshikawa, K.; Yamada, H.; Tojo, A.; Ohtomo, K. In vivo fluorescence imaging of the reticuloendothelial system using quantum dots in combination with bioluminescent tumour monitoring. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2007**, *34* (12), 2048-2056.
110. Hamoudeh, M.; Kamleh, M. A.; Diab, R.; Fessi, H. Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (12), 1329-1346.
111. Boerman, O. C.; Laverman, P.; Oyen, W. J.; Corstens, F. H.; Storm, G. Radiolabeled liposomes for scintigraphic imaging. *Prog. Lipid Res.* **2000**, *39* (5), 461-475.
112. Ogihara-Umeda, I.; Sasaki, T.; Kojima, S.; Nishigori, H. Optimal radiolabeled liposomes for tumor imaging. *J. Nucl. Med.* **1996**, *37* (2), 326-332.
113. Phillips, W. T. Delivery of gamma-imaging agents by liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *37* (1-3), 13-32.
114. Dagar, S.; Krishnadas, A.; Rubinstein, I.; Blend, M. J.; Onyuksel, H. VIP grafted sterically stabilized liposomes for targeted imaging of breast cancer: in vivo studies. *J. Control Release* **2003**, *91* (1-2), 123-133.
115. Harrington, K. J.; Mohammadtaghi, S.; Uster, P. S.; Glass, D.; Peters, A. M.; Vile, R. G.; Stewart, J. S. Effective targeting of solid tumors in patients with locally advanced cancers by radiolabeled pegylated liposomes. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7* (2), 243-254.
116. Harrington, K. J.; Lewanski, C. R.; Stewart, J. S. Liposomes as vehicles for targeted therapy of cancer. Part 1: preclinical development. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)* **2000**, *12* (1), 2-15.
117. Urakami, T.; Akai, S.; Katayama, Y.; Harada, N.; Tsukada, H.; Oku, N. Novel amphiphilic probes for [18F]-radiolabeling preformed liposomes and determination of liposomal trafficking by positron emission tomography. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (26), 6454-6457.
118. Iancu, T. C. Ultrastructural aspects of iron storage, transport and metabolism. *J. Neural Transm.* **2011**, *118* (3), 329-335.

119. Oku, N. Delivery of contrast agents for positron emission tomography imaging by liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *37* (1-3), 53-61.
120. Marik, J.; Tartis, M. S.; Zhang, H.; Fung, J. Y.; Kheirilomoom, A.; Sutcliffe, J. L.; Ferrara, K. W. Long-circulating liposomes radiolabeled with [¹⁸F]fluorodipalmitin ([¹⁸F]FDP). *Nucl. Med. Biol.* **2007**, *34* (2), 165-171.
121. Seo, J. W.; Zhang, H.; Kukis, D. L.; Meares, C. F.; Ferrara, K. W. A novel method to label preformed liposomes with ⁶⁴Cu for positron emission tomography (PET) imaging. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19* (12), 2577-2584.
122. Elbayoumi, T. A.; Pabba, S.; Roby, A.; Torchilin, V. P. Antinucleosome antibody-modified liposomes and lipid-core micelles for tumor-targeted delivery of therapeutic and diagnostic agents. *J. Liposome Res.* **2007**, *17* (1), 1-14.
123. Elbayoumi, T. A.; Torchilin, V. P. Enhanced accumulation of long-circulating liposomes modified with the nucleosome-specific monoclonal antibody 2C5 in various tumours in mice: gamma-imaging studies. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2006**, *33* (10), 1196-1205.
124. Erdogan, S.; Roby, A.; Torchilin, V. P. Enhanced tumor visualization by gamma-scintigraphy with ¹¹¹In-labeled polychelating-polymer-containing immunoliposomes. *Mol. Pharm.* **2006**, *3* (5), 525-530.
125. Line, B. R.; Mitra, A.; Nan, A.; Ghandehari, H. Targeting tumor angiogenesis: comparison of peptide and polymer-peptide conjugates. *J. Nucl. Med.* **2005**, *46* (9), 1552-1560.
126. Almutairi, A.; Rossin, R.; Shokeen, M.; Hagooly, A.; Ananth, A.; Capoccia, B.; Guillaudeu, S.; Abendschein, D.; Anderson, C. J.; Welch, M. J.; Frechet, J. M. Biodegradable dendritic positron-emitting nanoprobe for the noninvasive imaging of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2009**, *106* (3), 685-690.
127. Emfietzoglou, D.; Kostarelos, K.; Sgouros, G. An analytic dosimetry study for the use of radionuclide-liposome conjugates in internal radiotherapy. *J. Nucl. Med.* **2001**, *42* (3), 499-504.
128. Seymour, L.; Eisenhauer, E. A review of dose-limiting events in phase I trials: antimetabolites show unpredictable relationships between dose and toxicity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2001**, *47* (1), 2-10.
129. Kostarelos, K.; Emfietzoglou, D. Tissue dosimetry of liposome-radionuclide complexes for internal radiotherapy: toward liposome-targeted therapeutic radiopharmaceuticals. *Anticancer Res.* **2000**, *20* (5A), 3339-3345.
130. Hallahan, D.; Geng, L.; Qu, S.; Scarfone, C.; Giorgio, T.; Donnelly, E.; Gao, X.; Clanton, J. Integrin-mediated targeting of drug delivery to irradiated tumor blood vessels. *Cancer Cell* **2003**, *3* (1), 63-74.
131. Chen, J.; Wu, H.; Han, D.; Xie, C. Using anti-VEGF McAb and magnetic nanoparticles as double-targeting vector for the radioimmunotherapy of liver cancer. *Cancer Lett.* **2006**, *231* (2), 169-175.
132. Mouglin-Degraef, M.; Bourdeau, C.; Jestin, E.; Sai-Maurel, C.; Bourgeois, M.; Saec, P. R.; Thedrez, P.; Gestin, J. F.; Barbet, J.; Faivre-Chauvet, A. Doubly radiolabeled liposomes for pretargeted radioimmunotherapy. *Int. J. Pharm.* **2007**, *344* (1-2), 110-117.

133. Emfietzoglou, D.; Kostarelou, K.; Papakostas, A.; Yang, W. H.; Ballangrud, A.; Song, H.; Sgouros, G. Liposome-mediated radiotherapeutics within avascular tumor spheroids: comparative dosimetry study for various radionuclides, liposome systems, and a targeting antibody. *J. Nucl. Med.* **2005**, *46* (1), 89-97.
134. Syme, A. M.; McQuarrie, S. A.; Middleton, J. W.; Fallone, B. G. Dosimetric model for intraperitoneal targeted liposomal radioimmunotherapy of ovarian cancer micrometastases. *Phys. Med. Biol.* **2003**, *48* (10), 1305-1320.
135. Burke, J. M.; Jurcic, J. G.; Scheinberg, D. A. Radioimmunotherapy for acute leukemia. *Cancer Control* **2002**, *9* (2), 106-113.
136. Stein, R.; Chen, S.; Haim, S.; Goldenberg, D. M. Advantage of yttrium-90-labeled over iodine-131-labeled monoclonal antibodies in the treatment of a human lung carcinoma xenograft. *Cancer* **1997**, *80* (12 Suppl), 2636-2641.
137. Li, L.; Wartchow, C. A.; Danthi, S. N.; Shen, Z.; Dechene, N.; Pease, J.; Choi, H. S.; Doede, T.; Chu, P.; Ning, S.; Lee, D. Y.; Bednarski, M. D.; Knox, S. J. A novel antiangiogenesis therapy using an integrin antagonist or anti-Flk-1 antibody coated 90Y-labeled nanoparticles. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2004**, *58* (4), 1215-1227.
138. Chang, Y. J.; Chang, C. H.; Chang, T. J.; Yu, C. Y.; Chen, L. C.; Jan, M. L.; Luo, T. Y.; Lee, T. W.; Ting, G. Biodistribution, pharmacokinetics and microSPECT/CT imaging of 188Re-bMEDA-liposome in a C26 murine colon carcinoma solid tumor animal model. *Anticancer Res.* **2007**, *27* (4B), 2217-2225.
139. Chen, L. C.; Chang, C. H.; Yu, C. Y.; Chang, Y. J.; Wu, Y. H.; Lee, W. C.; Yeh, C. H.; Lee, T. W.; Ting, G. Pharmacokinetics, micro-SPECT/CT imaging and therapeutic efficacy of (188)Re-DXR-liposome in C26 colon carcinoma ascites mice model. *Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35* (8), 883-893.
140. Ting, G.; Chang, C. H.; Wang, H. E.; Lee, T. W. Nanotargeted radionuclides for cancer nuclear imaging and internal radiotherapy. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, *2010*.
141. Hamoudeh, M.; Fessi, H.; Mehier, H.; Faraj, A. A.; Canet-Soulas, E. Dirhenium decacarbonyl-loaded PLLA nanoparticles: influence of neutron irradiation and preliminary in vivo administration by the TMT technique. *Int. J. Pharm.* **2008**, *348* (1-2), 125-136.
142. Chunfu, Z.; Jinqun, C.; Duanzhi, Y.; Yongxian, W.; Yanlin, F.; Jiaju, T. Preparation and radiolabeling of human serum albumin (HSA)-coated magnetite nanoparticles for magnetically targeted therapy. *Appl. Radiat. Isot.* **2004**, *61* (6), 1255-1259.
143. Hafeli, U. O. Magnetically modulated therapeutic systems. *Int. J. Pharm.* **2004**, *277* (1-2), 19-24.
144. Liang, S.; Wang, Y.; Yu, J.; Zhang, C.; Xia, J.; Yin, D. Surface modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles: as a new carrier for bio-magnetically targeted therapy. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *18* (12), 2297-2302.
145. Chow, T. H.; Lin, Y. Y.; Hwang, J. J.; Wang, H. E.; Tseng, Y. L.; Pang, V. F.; Wang, S. J.; Whang-Peng, J.; Ting, G. Diagnostic and therapeutic evaluation of 111In-vinorelbine-liposomes in a human colorectal carcinoma HT-29/luc-bearing animal model. *Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35* (5), 623-634.

146. Lin, Y. Y.; Li, J. J.; Chang, C. H.; Lu, Y. C.; Hwang, J. J.; Tseng, Y. L.; Lin, W. J.; Ting, G.; Wang, H. E. Evaluation of pharmacokinetics of ¹¹¹In-labeled VNB-PEGylated liposomes after intraperitoneal and intravenous administration in a tumor/ascites mouse model. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2009**, *24* (4), 453-460.
147. Chen, L. C.; Chang, C. H.; Yu, C. Y.; Chang, Y. J.; Hsu, W. C.; Ho, C. L.; Yeh, C. H.; Luo, T. Y.; Lee, T. W.; Ting, G. Biodistribution, pharmacokinetics and imaging of (188)Re-BMEDA-labeled pegylated liposomes after intraperitoneal injection in a C26 colon carcinoma ascites mouse model. *Nucl. Med. Biol.* **2007**, *34* (4), 415-423.
148. Chow, T. H.; Lin, Y. Y.; Hwang, J. J.; Wang, H. E.; Tseng, Y. L.; Wang, S. J.; Liu, R. S.; Lin, W. J.; Yang, C. S.; Ting, G. Improvement of biodistribution and therapeutic index via increase of polyethylene glycol on drug-carrying liposomes in an HT-29/luc xenografted mouse model. *Anticancer Res.* **2009**, *29* (6), 2111-2120.
149. Chang, M. Y.; Seideman, J.; Sofou, S. Enhanced loading efficiency and retention of ²²⁵Ac in rigid liposomes for potential targeted therapy of micrometastases. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19* (6), 1274-1282.
150. Sofou, S.; Thomas, J. L.; Lin, H. Y.; McDevitt, M. R.; Scheinberg, D. A.; Sgouros, G. Engineered liposomes for potential alpha-particle therapy of metastatic cancer. *J. Nucl. Med.* **2004**, *45* (2), 253-260.
151. Sofou, S.; Kappel, B. J.; Jaggi, J. S.; McDevitt, M. R.; Scheinberg, D. A.; Sgouros, G. Enhanced retention of the alpha-particle-emitting daughters of Actinium-225 by liposome carriers. *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18* (6), 2061-2067.
152. Henriksen, G.; Schoultz, B. W.; Michaelsen, T. E.; Bruland, O. S.; Larsen, R. H. Sterically stabilized liposomes as a carrier for alpha-emitting radium and actinium radionuclides. *Nucl. Med. Biol.* **2004**, *31* (4), 441-449.
153. Chang, C. H.; Stabin, M. G.; Chang, Y. J.; Chen, L. C.; Chen, M. H.; Chang, T. J.; Lee, T. W.; Ting, G. Comparative dosimetric evaluation of nanotargeted (188)Re-(DXR)-liposome for internal radiotherapy. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2008**, *23* (6), 749-758.
154. Chang, Y. J.; Chang, C. H.; Yu, C. Y.; Chang, T. J.; Chen, L. C.; Chen, M. H.; Lee, T. W.; Ting, G. Therapeutic efficacy and microSPECT/CT imaging of ¹⁸⁸Re-DXR-liposome in a C26 murine colon carcinoma solid tumor model. *Nucl. Med. Biol.* **2010**, *37* (1), 95-104.
155. Barth, R. F. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas. *J. Neurooncol.* **1998**, *36* (1), 91-102.
156. Liu, J.; Hajibeigi, A.; Ren, G.; Lin, M.; Siyambalapitiyage, W.; Liu, Z.; Simpson, E.; Parkey, R. W.; Sun, X.; Oz, O. K. Retention of the radiotracers ⁶⁴Cu-ATSM and ⁶⁴Cu-PTSM in human and murine tumors is influenced by MDR1 protein expression. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50* (8), 1332-1339.
157. Khan, M. K.; Minc, L. D.; Nigavekar, S. S.; Kariapper, M. S.; Nair, B. M.; Schipper, M.; Cook, A. C.; Lesniak, W. G.; Balogh, L. P. Fabrication of {¹⁹⁸Au⁰} radioactive composite nanodevices and their use for nanobrachytherapy. *Nanomedicine.* **2008**, *4* (1), 57-69.
158. Jain, T. K.; Reddy, M. K.; Morales, M. A.; Leslie-Pelecky, D. L.; Labhasetwar, V. Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Mol. Pharm.* **2008**, *2* (2), 316-327.

6. Literatur

159. Parmley, R. T.; Gilbert, C. S.; White, D. A.; Barton, J. C. Ultrastructural silver enhancement of Prussian blue-reactive iron in hematopoietic and intestinal cells. *J. Histochem. Cytochem.* **1988**, *36* (4), 433-440.
160. Liu, W.; Frank, J. A. Detection and quantification of magnetically labeled cells by cellular MRI. *Eur. J. Radiol.* **2009**, *70* (2), 258-264.
161. Ali, Z.; Abbasi, A. Z.; Zhang, F.; Arosio, P.; Lascialfari, A.; Casula, M. F.; Wenk, A.; Kreyling, W.; Plapper, R.; Seidel, M.; Niessner, R.; Knoll, J.; Seubert, A.; Parak, W. J. Multifunctional nanoparticles for dual imaging. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (8), 2877-2882.
162. Lipka, J.; Semmler-Behnke, M.; Sperling, R. A.; Wenk, A.; Takenaka, S.; Schleh, C.; Kissel, T.; Parak, W. J.; Kreyling, W. G. Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection. *Biomaterials* **2010**, *31* (25), 6574-6581.
163. Zhu, M. T.; Feng, W. Y.; Wang, Y.; Wang, B.; Wang, M.; Ouyang, H.; Zhao, Y. L.; Chai, Z. F. Particokinetics and extrapulmonary translocation of intratracheally instilled ferric oxide nanoparticles in rats and the potential health risk assessment. *Toxicol. Sci.* **2009**, *107* (2), 342-351.
164. Alexiou, C.; Jurgons, R.; Schmid, R. J.; Bergemann, C.; Henke, J.; Erhardt, W.; Huenges, E.; Parak, F. Magnetic drug targeting--biodistribution of the magnetic carrier and the chemotherapeutic agent mitoxantrone after locoregional cancer treatment. *J. Drug Target* **2003**, *11* (3), 139-149.
165. Weissleder, R.; Stark, D. D.; Engelstad, B. L.; Bacon, B. R.; Compton, C. C.; White, D. L.; Jacobs, P.; Lewis, J. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *AJR Am. J. Roentgenol.* **1989**, *152* (1), 167-173.
166. Majumdar, S.; Zoghbi, S. S.; Gore, J. C. Pharmacokinetics of superparamagnetic iron-oxide MR contrast agents in the rat. *Invest Radiol.* **1990**, *25* (7), 771-777.
167. Chouly, C.; Pouliquen, D.; Lucet, I.; Jeune, J. J.; Jallet, P. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J. Microencapsul.* **1996**, *13* (3), 245-255.
168. Pouliquen, D.; Perdrisot, R.; Ermias, A.; Akoka, S.; Jallet, P.; Le Jeune, J. J. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a liver MRI contrast agent: contribution of microencapsulation to improved biodistribution. *Magn Reson. Imaging* **1989**, *7* (6), 619-627.
169. Pouliquen, D.; Lucet, I.; Chouly, C.; Perdrisot, R.; Le Jeune, J. J.; Jallet, P. Liver-directed superparamagnetic iron oxide: quantitation of T2 relaxation effects. *Magn Reson. Imaging* **1993**, *11* (2), 219-228.
170. Pouliquen, D.; Le Jeune, J. J.; Perdrisot, R.; Ermias, A.; Jallet, P. Iron oxide nanoparticles for use as an MRI contrast agent: pharmacokinetics and metabolism. *Magn Reson. Imaging* **1991**, *9* (3), 275-283.
171. Skotland, T.; Sontum, P. C.; Oulie, I. In vitro stability analyses as a model for metabolism of ferromagnetic particles (Clariscan), a contrast agent for magnetic resonance imaging. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *28* (2), 323-329.

172. Bourrinet, P.; Bengele, H. H.; Bonnemain, B.; Dencausse, A.; Idee, J. M.; Jacobs, P. M.; Lewis, J. M. Preclinical safety and pharmacokinetic profile of ferumoxtran-10, an ultrasmall superparamagnetic iron oxide magnetic resonance contrast agent. *Invest Radiol.* **2006**, *41* (3), 313-324.
173. Okon, E.; Pouliquen, D.; Okon, P.; Kovaleva, Z. V.; Stepanova, T. P.; Lavit, S. G.; Kudryavtsev, B. N.; Jallet, P. Biodegradation of magnetite dextran nanoparticles in the rat. A histologic and biophysical study. *Lab Invest* **1994**, *71* (6), 895-903.
174. Kennel, S. J.; Woodward, J. D.; Rondinone, A. J.; Wall, J.; Huang, Y.; Mirzadeh, S. The fate of MAb-targeted Cd(125m)Te/ZnS nanoparticles in vivo. *Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35* (4), 501-514.
175. Pellegrino, T.; Manna, L.; Kudera, S.; Liedl, T.; Koktysh, D.; Rogach, A. L.; Keller, S.; Rüdler, J.; Natile, G.; Parak, W. J. Hydrophobic Nanocrystals Coated with an Amphiphilic Polymer Shell: A General Route to Water Soluble Nanocrystals. *Nano Letters* **2004**, *4* (4), 703-707.
176. Shtykova, E. V.; Huang, X.; Gao, X.; Dyke, J. C.; Schmucker, A. L.; Dragnea, B.; Remmes, N.; Baxter, D. V.; Stein, B.; Konarev, P. V.; Svergun, D. I.; Bronstein, L. M. Hydrophilic Monodisperse Magnetic Nanoparticles Protected by an Amphiphilic Alternating Copolymer. *J. Phys. Chem. C. Nanomater. Interfaces.* **2008**, *112* (43), 16809-16817.
177. Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemie*; VCH: Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, 1994.
178. Bartelt, A.; Bruns, O. T.; Reimer, R.; Hohenberg, H.; Ittrich, H.; Peldschus, K.; Kaul, M. G.; Tromsdorf, U. I.; Weller, H.; Waurisch, C.; Eychmuller, A.; Gordts, P. L.; Rinninger, F.; Bruegelmann, K.; Freund, B.; Nielsen, P.; Merkel, M.; Heeren, J. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat. Med.* **2011**, *17* (2), 200-205.
179. Brown, M. S.; Goldstein, J. L. *Harrison's Principle of Internal Medicine*; 11 ed.; McGraw-Hill: 1987.pp. 1651.
180. Hagens, W. I.; Oomen, A. G.; de Jong, W. H.; Cassee, F. R.; Sips, A. J. What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2007**, *49* (3), 217-229.
181. Douma, K.; Prinzen, L.; Slaaf, D. W.; Reutelingsperger, C. P.; Biessen, E. A.; Hackeng, T. M.; Post, M. J.; van Zandvoort, M. A. Nanoparticles for optical molecular imaging of atherosclerosis. *Small* **2009**, *5* (5), 544-557.
182. Naghavi, M.; Libby, P.; Falk, E.; Casscells, S. W.; Litovsky, S.; Rumberger, J.; Badimon, J. J.; Stefanadis, C.; Moreno, P.; Pasterkamp, G.; Fayad, Z.; Stone, P. H.; Waxman, S.; Raggi, P.; Madjid, M.; Zarrabi, A.; Burke, A.; Yuan, C.; Fitzgerald, P. J.; Siscovick, D. S.; de Korte, C. L.; Aikawa, M.; Airaksinen, K. E.; Assmann, G.; Becker, C. R.; Chesebro, J. H.; Farb, A.; Galis, Z. S.; Jackson, C.; Jang, I. K.; Koenig, W.; Lodder, R. A.; March, K.; Demirovic, J.; Navab, M.; Priori, S. G.; Reikhter, M. D.; Bahr, R.; Grundy, S. M.; Mehran, R.; Colombo, A.; Boerwinkle, E.; Ballantyne, C.; Insull, W., Jr.; Schwartz, R. S.; Vogel, R.; Serruys, P. W.; Hansson, G. K.; Faxon, D. P.; Kaul, S.; Drexler, H.; Greenland, P.; Muller, J. E.; Virmani, R.; Ridker, P. M.; Zipes, D. P.; Shah, P. K.; Willerson, J. T. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation* **2003**, *108* (15), 1772-1778.
183. de Villiers, W. J.; Smart, E. J. Macrophage scavenger receptors and foam cell formation. *J. Leukoc. Biol.* **1999**, *66* (5), 740-746.

6. Literatur

184. Linton, M. F.; Fazio, S. Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **2003**, *27 Suppl 3*, S35-S40.
185. Steinberg, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (34), 20963-20966.
186. Cushing, S. D.; Berliner, J. A.; Valente, A. J.; Territo, M. C.; Navab, M.; Parhami, F.; Gerrity, R.; Schwartz, C. J.; Fogelman, A. M. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1990**, *87* (13), 5134-5138.
187. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340* (2), 115-126.
188. Falk, E.; Shah, P. K.; Fuster, V. Coronary plaque disruption. *Circulation* **1995**, *92* (3), 657-671.
189. Skajaa, T.; Cormode, D. P.; Falk, E.; Mulder, W. J.; Fisher, E. A.; Fayad, Z. A. High-density lipoprotein-based contrast agents for multimodal imaging of atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, *30* (2), 169-176.
190. Frias, J. C.; Williams, K. J.; Fisher, E. A.; Fayad, Z. A. Recombinant HDL-like nanoparticles: a specific contrast agent for MRI of atherosclerotic plaques. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (50), 16316-16317.
191. Golander, C. G.; Pitt, W. G. Characterization of hydrophobicity gradients prepared by means of radio frequency plasma discharge. *Biomaterials* **1990**, *11* (1), 32-35.
192. Bentzen, E. L.; Tomlinson, I. D.; Mason, J.; Gresch, P.; Warnement, M. R.; Wright, D.; Sanders-Bush, E.; Blakely, R.; Rosenthal, S. J. Surface modification to reduce nonspecific binding of quantum dots in live cell assays. *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16* (6), 1488-1494.
193. 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* **1990**, *175* (2), 489-493.
194. Lopes, T. J.; Luganskaja, T.; Vujic, S. M.; Hentze, M. W.; Muckenthaler, M. U.; Schumann, K.; Reich, J. G. Systems analysis of iron metabolism: the network of iron pools and fluxes. *BMC. Syst. Biol.* **2010**, *4*, 112.
195. Dancygier, H. Microscopic Anatomy. In *Clinical Hepatology: Principles and Practice of Hepatobiliary Diseases, Volume 1*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 2010.
196. Smedsrod, B.; Melkko, J.; Araki, N.; Sano, H.; Horiuchi, S. Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal Kupffer and endothelial cells. *Biochem. J.* **1997**, *322* (Pt 2), 567-573.
197. Smedsrod, B.; Le, C. D.; Ikejima, K.; Jaeschke, H.; Kawada, N.; Naito, M.; Knolle, P.; Nagy, L.; Senoo, H.; Vidal-Vanaclocha, F.; Yamaguchi, N. Hepatic sinusoidal cells in health and disease: update from the 14th International Symposium. *Liver Int.* **2009**, *29* (4), 490-501.
198. Dupas, B.; Berreur, M.; Rohanizadeh, R.; Bonnemain, B.; Meflah, K.; Pradal, G. Electron microscopy study of intrahepatic ultrasmall superparamagnetic iron oxide kinetics in the rat. Relation with magnetic resonance imaging. *Biol. Cell* **1999**, *91* (3), 195-208.

199. Claassen, I.; Van, R. N.; Claassen, E. A new method for removal of mononuclear phagocytes from heterogeneous cell populations in vitro, using the liposome-mediated macrophage 'suicide' technique. *J. Immunol. Methods* **1990**, *134* (2), 153-161.
200. von Herrath, M. G.; Harrison, L. C. Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3* (3), 223-232.
201. Fontenot, J. D.; Gavin, M. A.; Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **2003**, *4* (4), 330-336.
202. Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* **2005**, *6* (4), 345-352.
203. Wan, Y. Y.; Flavell, R. A. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunol. Rev.* **2006**, *212*, 114-130.
204. Shevach, E. M. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity.* **2009**, *30* (5), 636-645.
205. von Boehmer, H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.* **2005**, *6* (4), 338-344.
206. Luth, S.; Huber, S.; Schramm, C.; Buch, T.; Zander, S.; Stadelmann, C.; Bruck, W.; Wraith, D. C.; Herkel, J.; Lohse, A. W. Ectopic expression of neural autoantigen in mouse liver suppresses experimental autoimmune neuroinflammation by inducing antigen-specific Tregs. *J. Clin. Invest* **2008**, *118* (10), 3403-3410.
207. Garrick, M. D.; Garrick, L. M. Cellular iron transport. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1790* (5), 309-325.
208. Andrews, N. C. Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood* **2008**, *112* (2), 219-230.
209. Demarmels Biasiutti, F. **Die Regulation des Eisenstoffwechsels: Neue Erkenntnisse.** *Schweiz Med Forum* **2009**, *9* (36), 630-632.
210. Miller-Keane; T.O'Toole *Miller-Keane Encyclopedia and Dictionary of Medicine, Nursing, and Allied Health*, Seventh Edition ed.; Elsevier Health Sciences: 2003.
211. Weissleder, R.; Stark, D. D.; Rummeny, E. J.; Compton, C. C.; Ferrucci, J. T. Splenic lymphoma: ferrite-enhanced MR imaging in rats. *Radiology* **1988**, *166* (2), 423-430.
212. Saini, S.; Stark, D. D.; Hahn, P. F.; Wittenberg, J.; Brady, T. J.; Ferrucci, J. T., Jr. Ferrite particles: a superparamagnetic MR contrast agent for the reticuloendothelial system. *Radiology* **1987**, *162* (1 Pt 1), 211-216.
213. Wisse, E.; Doucet, D.; Van Bossuyt, H. *Cells of the Hepatic Sinusoid*; Kupffer Cell Foundation: Netherlands, 1991; Vol. 3.
214. Lee, P. W.; Hsu, S. H.; Wang, J. J.; Tsai, J. S.; Lin, K. J.; Wey, S. P.; Chen, F. R.; Lai, C. H.; Yen, T. C.; Sung, H. W. The characteristics, biodistribution, magnetic resonance imaging and biodegradability of superparamagnetic core-shell nanoparticles. *Biomaterials* **2010**, *31* (6), 1316-1324.

6. Literatur

215. Kidane, T. Z.; Sauble, E.; Linder, M. C. Release of iron from ferritin requires lysosomal activity. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **2006**, *291* (3), C445-C455.
216. Levy, M.; Luciani, N.; Alloeyau, D.; Elgrabli, D.; Deveaux, V.; Pechoux, C.; Chat, S.; Wang, G.; Vats, N.; Gendron, F.; Factor, C.; Lotersztajn, S.; Luciani, A.; Wilhelm, C.; Gazeau, F. Long term in vivo biotransformation of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* **2011**, *32* (16), 3988-3999.
217. Dullmann, J.; Wulfhekel, U.; Hausmann, K. Differences between Kupffer cells and endothelial cells of human liver in iron storage and release under normal conditions, after i.v. iron administration and in iron overload. In *Kupffer Cells and other Sinusoidal Cells*, Wisse E., Knook, D. L., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1977; pp 233-244.
218. Hausmann, K. [Disturbancies of iron utilization: chronic anaemia, sideroblastic anaemia, and residual endothelial siderosis (author's transl)]. *Haematol. Blood Transfus.* **1978**, *21*, 145-161.
219. Tromsdorf, U. I.; Bigall, N. C.; Kaul, M. G.; Bruns, O. T.; Nikolic, M. S.; Mollwitz, B.; Sperling, R. A.; Reimer, R.; Hohenberg, H.; Parak, W. J.; Forster, S.; Beisiegel, U.; Adam, G.; Weller, H. Size and surface effects on the MRI relaxivity of manganese ferrite nanoparticle contrast agents. *Nano. Lett.* **2007**, *7* (8), 2422-2427.
220. Levy, M.; Wilhelm, C.; Luciani, N.; Deveaux, V.; Gendron, F.; Luciani, A.; Devaud, M.; Gazeau, F. Nanomagnetism reveals the intracellular clustering of iron oxide nanoparticles in the organism. *Nanoscale*. **2011**, *3* (10), 4402-4410.
221. Heinrich, H. C.; Gabbe, E. Physical half-life of radiochemically pure (greater than 99.9999 percent) ⁵⁹Fe and its metabolic turnover rate in man. *Experientia* **1970**, *26* (5), 467-468.
222. Choi, H. S.; Liu, W.; Misra, P.; Tanaka, E.; Zimmer, J. P.; Ity, I. B.; Bawendi, M. G.; Frangioni, J. V. Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25* (10), 1165-1170.
223. Sibille, J. C.; Kondo, H.; Aisen, P. Interactions between isolated hepatocytes and Kupffer cells in iron metabolism: a possible role for ferritin as an iron carrier protein. *Hepatology* **1988**, *8* (2), 296-301.
224. Mack, U.; Powell, L. W.; Halliday, J. W. Detection and isolation of a hepatic membrane receptor for ferritin. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258* (8), 4672-4675.
225. Adams, P. C.; Powell, L. W.; Halliday, J. W. Isolation of a human hepatic ferritin receptor. *Hepatology* **1988**, *8* (4), 719-721.
226. Cypess, A. M.; Lehman, S.; Williams, G.; Tal, I.; Rodman, D.; Goldfine, A. B.; Kuo, F. C.; Palmer, E. L.; Tseng, Y. H.; Doria, A.; Kolodny, G. M.; Kahn, C. R. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360* (15), 1509-1517.
227. Virtanen, K. A.; Lidell, M. E.; Orava, J.; Heglind, M.; Westergren, R.; Niemi, T.; Taittonen, M.; Laine, J.; Savisto, N. J.; Enerback, S.; Nuutila, P. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360* (15), 1518-1525.
228. van Marken Lichtenbelt, W. D.; Vanhommerig, J. W.; Smulders, N. M.; Drossaerts, J. M.; Kemerink, G. J.; Bouvy, N. D.; Schrauwen, P.; Teule, G. J. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360* (15), 1500-1508.

229. Williams, K. J. Molecular processes that handle -- and mishandle -- dietary lipids. *J. Clin. Invest* **2008**, *118* (10), 3247-3259.
230. Hokanson, J. E.; Austin, M. A. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J. Cardiovasc. Risk* **1996**, *3* (2), 213-219.
231. Austin, M. A.; McKnight, B.; Edwards, K. L.; Bradley, C. M.; McNeely, M. J.; Psaty, B. M.; Brunzell, J. D.; Motulsky, A. G. Cardiovascular disease mortality in familial forms of hypertriglyceridemia: A 20-year prospective study. *Circulation* **2000**, *101* (24), 2777-2782.
232. Cullen, P. Evidence that triglycerides are an independent coronary heart disease risk factor. *Am. J. Cardiol.* **2000**, *86* (9), 943-949.
233. Daniels, T. R.; Delgado, T.; Rodriguez, J. A.; Helguera, G.; Penichet, M. L. The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clin. Immunol.* **2006**, *121* (2), 144-158.
234. Omary, M. B.; Trowbridge, I. S.; Minowada, J. Human cell-surface glycoprotein with unusual properties. *Nature* **1980**, *286* (5776), 888-891.
235. Shindelman, J. E.; Ortmeier, A. E.; Sussman, H. H. Demonstration of the transferrin receptor in human breast cancer tissue. Potential marker for identifying dividing cells. *Int. J. Cancer* **1981**, *27* (3), 329-334.
236. Sutherland, R.; Delia, D.; Schneider, C.; Newman, R.; Kemshead, J.; Greaves, M. Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells is proliferation-associated receptor for transferrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1981**, *78* (7), 4515-4519.
237. Gatter, K. C.; Brown, G.; Trowbridge, I. S.; Woolston, R. E.; Mason, D. Y. Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance. *J. Clin. Pathol.* **1983**, *36* (5), 539-545.
238. Taetle, R. The role of transferrin receptors in hemopoietic cell growth. *Exp. Hematol.* **1990**, *18* (4), 360-365.
239. Jefferies, W. A.; Brandon, M. R.; Williams, A. F.; Hunt, S. V. Analysis of lymphopoietic stem cells with a monoclonal antibody to the rat transferrin receptor. *Immunology* **1985**, *54* (2), 333-341.
240. Prutki, M.; Poljak-Blazi, M.; Jakopovic, M.; Tomas, D.; Stipancic, I.; Zarkovic, N. Altered iron metabolism, transferrin receptor 1 and ferritin in patients with colon cancer. *Cancer Lett.* **2006**, *238* (2), 188-196.
241. Raaf, H. N.; Jacobsen, D. W.; Savon, S.; Green, R. Serum transferrin receptor level is not altered in invasive adenocarcinoma of the breast. *Am. J. Clin. Pathol.* **1993**, *99* (3), 232-237.
242. Recht, L. D.; Griffin, T. W.; Raso, V.; Salimi, A. R. Potent cytotoxicity of an antihuman transferrin receptor-ricin A-chain immunotoxin on human glioma cells in vitro. *Cancer Res.* **1990**, *50* (20), 6696-6700.

6. Literatur

243. Barankiewicz, J.; Cohen, A. Impairment of nucleotide metabolism by iron-chelating deferoxamine. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, 36 (14), 2343-2347.
244. Hoyes, K. P.; Hider, R. C.; Porter, J. B. Cell cycle synchronization and growth inhibition by 3-hydroxypyridin-4-one iron chelators in leukemia cell lines. *Cancer Res.* **1992**, 52 (17), 4591-4599.
245. Hogemann-Savellano, D.; Bos, E.; Blondet, C.; Sato, F.; Abe, T.; Josephson, L.; Weissleder, R.; Gaudet, J.; Sgroi, D.; Peters, P. J.; Basilion, J. P. The transferrin receptor: a potential molecular imaging marker for human cancer. *Neoplasia.* **2003**, 5 (6), 495-506.
246. Zhang, C. Y.; Lu, J.; Tsourkas, A. Iron chelator-based amplification strategy for improved targeting of transferrin receptor with SPIO. *Cancer Biol. Ther.* **2008**, 7 (6), 889-895.
247. Weissleder, R.; Moore, A.; Mahmood, U.; Bhorade, R.; Benveniste, H.; Chiocca, E. A.; Basilion, J. P. In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression. *Nat. Med.* **2000**, 6 (3), 351-355.
248. Sperling, R. A.; Pellegrino, T.; Li, J. K.; Chang, W. H.; Parak, W. J. Electrophoretic Separation of Nanoparticles with a Discrete Number of Functional Groups. *Advanced Functional Materials* **2006**, 16 (7), 943-946.
249. Sun, S.; Zeng, H.; Robinson, D. B.; Raoux, S.; Rice, P. M.; Wang, S. X.; Li, G. Monodisperse MFe₂O₄ (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (1), 273-279.
250. Sun, S.; Zeng, H. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124 (28), 8204-8205.
251. Hyeon, T.; Lee, S. S.; Park, J.; Chung, Y.; Na, H. B. Synthesis of highly crystalline and monodisperse maghemite nanocrystallites without a size-selection process. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123 (51), 12798-12801.
252. Yu, W. W.; Falkner, J. C.; Yavuz, C. T.; Colvin, V. L. Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts. *Chem. Commun. (Camb.)* **2004**, (20), 2306-2307.
253. Braunsfurth, J. S.; Gabbe, E. E.; Heinrich, H. C. Performance parameters of the Hamburg 4 pi whole body radioactivity detector. *Phys. Med. Biol.* **1977**, 22 (1), 1-17.
254. Diehl, K. H.; Hull, R.; Morton, D.; Pfister, R.; Rabemampianina, Y.; Smith, D.; Vidal, J. M.; van, d., V A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J. Appl. Toxicol.* **2001**, 21 (1), 15-23.
255. Fischer, R.; Piga, A.; Harmatz, P.; Nielsen, P. Monitoring long-term efficacy of iron chelation treatment with biomagnetic liver susceptometry. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, 1054, 350-357.
256. Fischer, R. Liver Iron Susceptometry. In *Magnetism in Medicine - A Handbook*, 1 ed.; Andrä, W., Nowak, H., Eds.; Wiley-VCH: Berlin, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, 1998; pp 286-301.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AAS	AtomAbsorptionsSpektroskopie
Ak	Antikörper
AuNP	Goldnanopartikel
AUC	Area Under the Curve (Fläche unter der Kurve)
BAT	Brown Adipose Tissue (braunes Fettgewebe)
BSA	bovines Serum Albumin
c_0	Anfangskonzentration
CT	Röntgen-ComputerTomographie
Dcytb	Ferrereduktase Duodenal Cytochrom B
DLS	Dynamic Light Scattering
DMT1	Divalenter-Metall-Transporter 1
EAE	Experimentelle Autoimmun-Encephalomyelitis
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)Carbodiimid
EDTA	EthylenDiaminTetraAcetat
EI	ErythrozythenInkorporation
EpiWAT	Epididymale White Adipose Tissue (epididymales weißes Fettgewebe)
EPR	Enhanced Permeability and Retention (verstärkte Permeabilität und Retention)
FDA	Food and Drug Administration (Nahrungs- und Arzneimittel-Zulassung)
Gd-DPTA-DMPE	Gadolinium-1,2-dimyristol-sn-glycero-3-phosphoethanol-amin-diethylentriaminpentaessigsäure
GKR	GanzKörperRetention
H	magnetische Feldstärke
H_c	Koerzitivfeldstärke
HAMCO	Hamburger Ganzkörperzähler
HCP1	Haem Carrier Protein 1 (Hämtransporter 1)
HDL	High Density Lipoprotein (Lipoproteine hoher Dichte)
HZB	Helmholtz-Zentrum Berlin

iBAT	interskalpuläres braunes Fettgewebe
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
IDL	Intermediate Density-Lipoprotein (Lipoprotein mittlerer Dichte)
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KZ	Kupffer Zellen
LDL	Low Density-Lipoprotein (Lipoprotein geringer Dichte)
LPL	LipoProteinLipase
LRP1	Low Density-Lipoprotein Receptor-related Protein 1
LSEC	Liver Sinusoidal Endothelial Cell (Endothelzellen des Lebersinusoids)
M	Magnetisierung
M _r	Remaneszenzmagnetisierung
MBP	Myelin Basic Protein
MDT	Magen-Darm-Trakt
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MW	Molecular Weight (Molekulargewicht)
OPR	OberflächenPlasmonenResonanz
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PEG	PolyEthylenGlykol
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PMAOD	Poly(MaleinsäureAnhydrid- <i>alt</i> -1-OctaDecen)
QD	QuantumDot
RES	ReticuloEndotheliales System
RT	RaumTemperatur
SBB	Sodium Borate Buffer (Natriumborat-Puffer)
SEC	Size-Exclusion-Chromatography (Größenausschlusschromatographie)
SPECT	Single Photon Emission Spectroscopy (Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie)
SPIO	SuperParamagnetic Iron Oxide nanoparticle (superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel)

SQUID	Superconducting QUantum Interference Device (supraleitende Quantuminterferenzeinheit)
SubWAT	Subcutaneous White Adipose Tissue (subkutanes weißes Fettgewebe)
$T_{1/2}$	Halbwertszeit
T_1	longitudinale Relaxationszeit
T_2	transversale Relaxationszeit
T_2^*	effektive transversale Relaxationszeit
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TEM	TransmissionsElektronenMikroskop
Tf	Transferrin
TfR	Transferrin-Rezeptor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRL	TriglyceridReiche Lipoproteine
VLDL	Very Low Density-Lipoproteine (Lipoproteine sehr geringer Dichte)
ω_0	Lamorfrequenz

7.2 Chemikalien

Chemikalien	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Aceton	F, Xi	11-36-66-67	9-16-26
Albumin Fraktion V	-	-	-
Ascorbinsäure	-	-	-
Bathophenanthrolin	-	-	-
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Diocylether			24/25
Eisenpentacarbonyl	T+, F	11-24-26/28	9-16-29-36/37/39-45
Ethanol	F	11	7-16
Glutaraldehyd	T, N	22-23-34-42/43-50	26-36/37/39-45-61
Heparin	-	-	-
n-Hexan	F, Xn, N	11-38-48/20-51/53-62-65-67	9-16-29-33-36/37-61-62
Methanol	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
Natriumacetat	-	-	-
Ölsäure	Xi	36/37/38	26-37/39
Paraformaldehyd	Xn	20/22-36/37/38-40-43	22-26-36/37
Salpetersäure 65%	C	35	23.2-26-36/37/39-45
Salzsäure 5 mol/l	Xi	36/37/38	26
Tetrahydrofuran	F, Xi	11-19-36/37	16-29-33
Trimethylamin-N-oxid	Xi	36/37/38	-
Tris(Hydroxymethyl)aminomethan	-	-	-
Toluol	F, Xn	11-38-48/20-63-65-67	36/37-46-62

7.3 Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge

7.3.1 Gefahrensymbole

E explosionsgefährlich
F+ hochentzündlich
F leichtentzündlich
O brandfördernd
T+ sehr giftig
T giftig
Xn gesundheitsschädlich
Xi reizend
C ätzend
N umweltgefährlich

7.3.2 Hinweise auf besondere Gefahren (R-Sätze)

R 1 In trockenem Zustand explosionsgefährlich.
R 2 Durch Schlag, Reibung, Feuer oder andere Zündquellen explosionsgefährlich.
R 3 Durch Schlag, Reibung, Feuer oder andere Zündquellen besonders explosionsgefährlich.
R 4 Bildet hochempfindliche explosionsgefährliche Metallverbindungen.
R 5 Erwärmung kann Explosion verursachen.
R 6 Mit und ohne Luft explosionsfähig.
R 7 Kann Brand verursachen.
R 8 Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen.
R 9 Explosionsgefahr bei Mischung mit brennbaren Stoffen.
R 10 Entzündlich.
R 11 Leichtentzündlich.
R 12 Hochentzündlich.
R 14 Reagiert heftig mit Wasser.
R 15 Reagiert mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase.
R 16 Explosionsgefährlich in Mischung mit brandfördernden Stoffen.
R 17 Selbstentzündlich an der Luft.
R 18 Bei Gebrauch Bildung explosiver/leicht entzündlicher Dampf-Luftgemische möglich.
R 19 Kann explosionsfähige Peroxide bilden.
R 20 Gesundheitsschädlich beim Einatmen.
R 21 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
R 22 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
R 23 Giftig beim Einatmen.
R 24 Giftig bei Hautkontakt.
R 25 Giftig bei Verschlucken.
R 26 Sehr giftig beim Einatmen.
R 27 Sehr giftig bei Berührung mit der Haut.
R 28 Sehr giftig beim Verschlucken.
R 29 Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase.
R 30 Kann bei Verwendung leicht entzündbar werden.
R 31 Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase.
R 32 Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
R 33 Gefahr kumulativer Wirkungen.
R 34 Verursacht Verätzungen.
R 35 Verursacht schwere Verätzungen.
R 36 Reizt die Augen.
R 37 Reizt die Atmungsorgane.
R 38 Reizt die Haut.

- R 39 Ernste Gefahr irreversiblen Schadens.
- R 40 Verdacht auf krebserzeugende Wirkung.
- R 41 Gefahr ernster Augenschäden.
- R 42 Sensibilisierung durch Einatmen möglich.
- R 43 Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich.
- R 44 Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluss.
- R 45 Kann Krebs erzeugen.
- R 46 Kann vererbare Schäden verursachen.
- R 48 Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition.
- R 49 Kann Krebs erzeugen beim Einatmen.
- R 50 Sehr giftig für Wasserorganismen.
- R 51 Giftig für Wasserorganismen.
- R 52 Schädlich für Wasserorganismen.
- R 53 Kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.
- R 54 Giftig für Pflanzen.
- R 55 Giftig für Tiere.
- R 56 Giftig für Bodenorganismen.
- R 57 Giftig für Bienen.
- R 58 Kann längerfristig schädliche Wirkungen auf die Umwelt haben.
- R 59 Gefährlich für die Ozonschicht.
- R 60 Kann die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen.
- R 61 Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
- R 62 Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen.
- R 63 Kann das Kind im Mutterleib möglicherweise schädigen.
- R 64 Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.
- R 65 Gesundheitsschädlich: Kann beim Verschlucken Lungenschäden verursachen.
- R 66 Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen.
- R 67 Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
- R 68 Irreversibler Schaden möglich.

7.3.3 Kombination der R-Sätze

- R 14/15 Reagiert heftig mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase.
- R 15/29 Reagiert mit Wasser unter Bildung giftiger und hochentzündlicher Gase.
- R 20/21 Gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R 20/21/22 Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut. R 20/22 Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken.
- R 21/22 Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.
- R 23/24 Giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R 23/24/25 Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
- R 23/25 Giftig beim Einatmen und Verschlucken.
- R 24/25 Giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.
- R 26/27 Sehr giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R 26/27/28 Sehr giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
- R 26/28 Sehr giftig beim Einatmen und Verschlucken.
- R 27/28 Sehr giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.
- R 36/37 Reizt die Augen und die Atmungsorgane.
- R 36/37/38 Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut.
- R 36/38 Reizt die Augen und die Haut.
- R 37/38 Reizt die Atmungsorgane und die Haut.
- R 39/23 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen.
- R 39/23/24 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R 39/23/24/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
- R 39/23/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken.
- R 39/24 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut.
- R 39/24/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch

Verschlucken.

R 39/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Verschlucken.

R 39/26 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen.

R 39/26/27 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut.

R 39/26/27/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

R 39/26/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken.

R 39/27 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut.

R 39/27/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

R 39/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Verschlucken.

R 42/43 Sensibilisierung durch Einatmen und Hautkontakt möglich.

R 48/20 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen.

R 48/20/21 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Berührung mit der Haut.

R 48/20/21/22 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

R 48/20/22 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken.

R 48/21 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut.

R 48/21/22 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

R 48/22 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Verschlucken.

R 48/23 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen.

R 48/23/24 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Berührung mit der Haut.

R 48/23/24/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

R 48/23/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken.

R 48/24 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut.

R 48/24/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

R 48/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Verschlucken.

R 50/53 Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.

R 51/53 Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.

R 52/53 Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.

R 68/20 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen.

R 68/20/21 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut.

R 68/20/21/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

R 68/20/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken.

R 68/21 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut.

R 68/21/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

R 68/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Verschlucken.

7.3.4 Sicherheitsratschläge

- S 1** Unter Verschluss aufbewahren.
- S 2** Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
- S 3** Kühl aufbewahren.
- S 4** Von Wohnplätzen fernhalten.
- S 5** Unter ... aufbewahren (geeignete Flüssigkeit vom Hersteller anzugeben).
- S 5.1** Unter Wasser aufbewahren.
- S 5.2** Unter Petroleum aufbewahren.
- S 5.3** Unter Paraffinöl aufbewahren.
- S 6** Unter ... aufbewahren (inertes Gas vom Hersteller anzugeben).
- S 6.1** Unter Stickstoff aufbewahren.
- S 6.2** Unter Argon aufbewahren.
- S 6.3** Unter Schutzgas aufbewahren.
- S 7** Behälter dicht verschlossen halten.
- S 8** Behälter trocken halten.
- S 9** Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren.
- S 12** Behälter nicht gasdicht verschließen.
- S 13** Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten.
- S 14** Von ... fernhalten (inkompatible Substanzen vom Hersteller anzugeben).
- S 14.1** Von Reduktionsmitteln, Schwermetallverbindungen, Säuren und Alkalien fernhalten.
- S 14.10** Von Säuren, Reduktionsmitteln und brennbaren Materialien fernhalten.
- S 14.11** Von brennbaren Stoffen fernhalten.
- S 14.12** Von Alkalien und basischen Substanzen fernhalten.
- S 14.2** Von oxidierenden und sauren Stoffen sowie von Schwermetallverbindungen fernhalten.
- S 14.3** Von Eisen fernhalten.
- S 14.4** Von Wasser und Laugen fernhalten.
- S 14.5** Von Säuren fernhalten.
- S 14.6** Von Laugen fernhalten.
- S 14.7** Von Metallen fernhalten.
- S 14.8** Von oxidierenden und sauren Stoffen fernhalten.
- S 14.9** Von brennbaren organischen Substanzen fernhalten.
- S 15** Vor Hitze schützen.
- S 16** Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen.
- S 17** Von brennbaren Stoffen fernhalten.
- S 18** Behälter mit Vorsicht öffnen und handhaben.
- S 20** Bei der Arbeit nicht essen und trinken.
- S 21** Bei der Arbeit nicht rauchen.
- S 22** Staub nicht einatmen.
- S 23** Gas/Rauch/Dampf/Aerosol nicht einatmen (Bezeichnung ist vom Hersteller anzugeben).
- S 23.1** Gas nicht einatmen.
- S 23.2** Dampf nicht einatmen.
- S 23.3** Aerosol nicht einatmen.
- S 23.4** Rauch nicht einatmen.
- S 23.5** Dampf/Aerosol nicht einatmen.
- S 24** Berührung mit der Haut vermeiden.
- S 25** Berührung mit den Augen vermeiden.
- S 26** Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
- S 27** Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen.
- S 28** Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel ... (vom Hersteller anzugeben).
- S 28.1** Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser.
- S 28.2** Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und Seife.
- S 28.3** Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und Seife, möglichst auch mit Polyethylenglycol 400.
- S 28.4** Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglykol 300 und Ethanol (2:1) und anschließend mit viel Wasser und Seife.
- S 28.5** Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglykol 400.
- S 28.6** Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglykol 400 und anschließend Reinigung mit viel Wasser.
- S 28.7** Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und saurer Seife.

- S 29** Nicht in die Kanalisation gelangen lassen.
- S 30** Niemals Wasser hinzugießen.
- S 33** Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen.
- S 35** Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden.
- S 36** Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.
- S 37** Geeignete Schutzhandschuhe tragen.
- S 38** Bei unzureichender Belüftung Atemschutzgerät anlegen.
- S 39** Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- S 40** Fußboden und verunreinigte Gegenstände mit ... reinigen (vom Hersteller anzugeben).
- S 40.1** Fußboden und verunreinigte Gegenstände mit viel Wasser reinigen.
- S 41** Explosions- und Brandgase nicht einatmen.
- S 42** Beim Räuchern/Versprühen geeignetes Atemschutzgerät anlegen (Bezeichnung vom Hersteller anzugeben).
- S 43** Bei einem Feuer ... verwenden (die genaue Art der Brandbekämpfungsausrüstung angeben)
Unter keinen Umständen Wasser verwenden.
- S 43.1** Zum Löschen Wasser verwenden.
- S 43.2** Zum Löschen Wasser oder Pulverlöschmittel verwenden.
- S 43.3** Zum Löschen Pulverlöschmittel verwenden - kein Wasser verwenden.
- S 43.4** Zum Löschen Kohlendioxid - kein Wasser verwenden.
- S 43.6** Zum Löschen Sand - kein Wasser verwenden.
- S 43.7** Zum Löschen Metallbrandpulver - kein Wasser verwenden.
- S 43.8** Zum Löschen Sand, Kohlendioxid oder Pulverlöschmittel verwenden - kein Wasser verwenden.
- S 45** Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).
- S 46** Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen. **S 47**
Bei einer Temperatur von maximal ... °C aufbewahren (vom Hersteller anzugeben). **S 47.1**
Nicht bei Temperaturen über 25°C aufbewahren.
- S 48** Feucht halten mit ... (vom Hersteller anzugeben).
- S 48.1** Feucht halten mit Wasser.
- S 49** Nur im Originalbehälter aufbewahren.
- S 50** Nicht mischen mit ... (vom Hersteller anzugeben).
- S 50.1** Nicht mischen mit Säuren.
- S 50.2** Nicht mischen mit Laugen.
- S 50.3** Nicht mischen mit starken Säuren, starken Basen, Buntmetallen und deren Salzen.
- S 51** Nur in gut gelüfteten Bereichen verwenden.
- S 52** Nicht großflächig für Wohn- und Aufenthaltsräume zu verwenden.
- S 53** Exposition vermeiden - vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
- S 56** Dieses Produkt und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.
- S 57** Zur Vermeidung einer Kontamination der Umwelt geeigneten Behälter verwenden.
- S 59** Informationen zur Wiederverwendung/Wiederverwertung beim Hersteller/Lieferanten erfragen.
- S 60** Dieser Stoff und / oder sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen.
- S 61** Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.
- S 62** Bei Verschlucken kein Erbrechen herbeiführen. Sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder dieses Etikett vorzeigen.
- S 63** Bei Unfall durch Einatmen: Verunfallten an die frische Luft bringen und ruhigstellen.
- S 64** Bei Verschlucken Mund mit Wasser ausspülen (nur wenn Verunfallter bei Bewusstsein ist).

7.3.5 Kombination der S-Sätze

- S 1/2** Unter Verschluss aufbewahren.
- S 3/7** Behälter dicht geschlossen halten und an einem kühlen Ort aufbewahren.
- S 3/9/14** An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von ... aufbewahren (inkompatible Substanzen sind vom Hersteller anzugeben).
- S 3/9/14.1** An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Reduktionsmitteln, Schwermetallverbindungen, Säuren und Alkalien aufbewahren.

- S 3/9/14.1/49** Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Reduktionsmitteln, Schwermetallverbindungen, Säuren und Alkalien aufbewahren.
- S 3/9/14.2** An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von oxidierenden und sauren Stoffen sowie von Schwermetallverbindungen aufbewahren.
- S 3/9/14.2/49** Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von oxidierenden und sauren Stoffen sowie Schwermetallverbindungen aufbewahren.
- S 3/9/14.3** An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Eisen aufbewahren.
- S 3/9/14.3/49** Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Eisen aufbewahren
- S 3/9/14.4** An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Wasser und Laugen aufbewahren.
- S 3/9/14.4/49** Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Wasser und Laugen aufbewahren.
- S 3/9/14.5** An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Säuren aufbewahren.
- S 3/9/14.5/49** Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Säuren aufbewahren.
- S 3/9/14.6** An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Laugen aufbewahren.
- S 3/9/14.6/49** Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Laugen aufbewahren.
- S 3/9/14.7** An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Metallen aufbewahren.
- S 3/9/14.7/49** Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Metallen aufbewahren.
- S 3/9/14.8** An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von oxidierenden und sauren Stoffen aufbewahren.
- S 3/9/14.8/49** Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von oxidierenden und sauren Stoffen aufbewahren.
- S 3/9/14/49** Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von ° ... aufbewahren (inkompatible Substanzen sind vom Hersteller anzugeben).
- S 3/9/49** Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort aufbewahren.
- S 3/14** An einem kühlen, von ... entfernten Ort aufbewahren (inkompatible Substanzen sind vom Hersteller anzugeben).
- S 3/14.1** An einem kühlen, von Reduktionsmitteln, Schwermetallverbindungen, Säuren und Alkalien entfernten Ort aufbewahren.
- S 3/14.2** An einem kühlen, von oxidierenden und sauren Stoffen sowie von Schwermetallverbindungen entfernten Ort aufbewahren.
- S 3/14.3** An einem kühlen, von Eisen entfernten Ort aufbewahren.
- S 3/14.4** An einem kühlen, von Wasser und Laugen entfernten Ort aufbewahren.
- S 3/14.5** An einem kühlen, von Säuren entfernten Ort aufbewahren.
- S 3/14.6** An einem kühlen, von Laugen entfernten Ort aufbewahren.
- S 3/14.7** An einem kühlen, von Metallen entfernten Ort aufbewahren.
- S 3/14.8** An einem kühlen, von oxidierenden und sauren Stoffen entfernten Ort aufbewahren. **S 7/8** Behälter trocken und dicht geschlossen halten.
- S 7/9** Behälter dicht geschlossen an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren.
- S 7/47** Behälter dicht geschlossen und nicht bei Temperaturen über ... °C aufbewahren (vom Hersteller anzugeben).
- S 20/21** Bei der Arbeit nicht essen, trinken, rauchen.
- S 24/25** Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden.
- S 27/28** Bei Berührung mit der Haut beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen und Haut sofort abwaschen mit viel (vom Hersteller anzugeben).
- S 29/35** Nicht in die Kanalisation gelangen lassen; Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden.
- S 29/56** Nicht in die Kanalisation gelangen lassen und diesen Stoff und seinen Behälter der Problematikentsorgung zuführen.
- S 36/37** Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.
- S 36/37/39** Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- S 36/39** Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- S 37/39** Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- S 47/49** Nur im Originalbehälter bei einer Temperatur von nicht über ... °C aufbewahren (vom Hersteller anzugeben).

7.4 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei PD Dr. Dr. **Peter Nielsen** für die Aufnahme in den Arbeitskreis und die gute Betreuung und Unterstützung während meiner gesamten Arbeit bedanken.

Prof. Dr. **Horst Weller** danke ich für die Übernahme der Aufgabe des Zweitgutachters und die konstruktiven Diskussionen in der Entwicklung dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Dr. **Ulrike Beisiegel** und Prof. Dr. **Andreas Guse** für die kleinen Hilfestellungen, die das Gelingen dieser Arbeit möglich gemacht haben.

Mein Dank gilt ebenfalls Dr. **Harald Ittrich** und Dr. **Heinrich Hohenberg** für die Kooperation.

Auch bei PD Dr. **Johannes Herkel** und Dr. **Antonella Carambia** möchte ich mich für die Zusammenarbeit in diesem interessanten Projekt bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei **allen** Mitarbeitern des IBM Z bedanken, insbesondere bei Prof. Dr. **Jörg Heeren** für die vielen fruchtbaren Diskussionen und bei Dr. **Oliver Bruns** für die großartige Unterstützung und die vielen Ratschläge. Bei **Sandra Ehret, Dorte Wendt** und **Angelika Schmidt** aber auch allen anderen TAs für ihre Hilfsbereitschaft und die nette Atmosphäre. **Christine Runge** und **Dieter Münch-Harrach** dafür, dass man sich immer auf sie verlassen kann. Meiner Praktikantin / Bachelorette und Masterstudentin **Gabriella Gèbel** für ihre Hilfe. **Rosemarie Kongi** und **Ursula Lorenz** für die nette Atmosphäre in der Eisenambulanz und Dr. **Roland Fischer** für die unermüdliche Unterstützung und Hilfe in physikalischen Fragen und der Messung mit dem Biosuszeptometer. Meinen Mitdoktoranden **Alexander Bartelt, Artur Giemsa, Denise Bargheer, Leah Eissing, Karoline Brügelmann** und **Brigitte Müller** für die ganzen Kleinigkeiten im Laboralltag und **Eva Richter** für die gemeinsame Eingewöhnungsphase.

Auch Dr. **Markus Heine** gilt mein Dank für die unermüdliche Unterstützung bei den Tierversuchen und die vielen fruchtbaren Diskussionen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. **Ullrich Tromsdorf** und **Sunhild Salmen** für das zur Verfügung stellen der Nanopartikel und des Liganden bedanken.

Ein Dankeschön ist auch an Dr. **Caroline Jung** und Dr. **Nina Raabe** gerichtet für die gute Zusammenarbeit und nicht zuletzt an **Hendrik Herrmann** für die vielen elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Ebenso geht mein Dank an das **BMBF** für die Bereitstellung von Personal- und Reisemitteln.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei meiner Familie für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung bedanken. Insbesondere gelten mein Dank und meine Bewunderung meinem Freund Lutz für seine bedingungslose Unterstützung, die er mir immer mit einem Lächeln auf den Lippen entgegengebracht hat.

Wie sagt man so schön in Bayern: Euch allen ein herzliches „Vergelt's Gott“!

7.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Barbara Freund
Adresse: Mendelssohnstr. 10
22761 Hamburg
Geburtsdatum: 28.03.1983 in München
Telefon: 01733807522
E-Mail: b.freund@uke.uni-hamburg.de
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Religion: römisch-katholisch



Ausbildung

09.1989-08.1993 Grundschule Feldkirchen-Westerham
09.1993-06.2002 Gymnasium Bad Aibling
Abschluss: Abitur
10.2002-09.2004 Grundstudium der Chemie an der Universität Regensburg
Abschluss: Vordiplom
09.2004-12.2006 Hauptstudium der Chemie an der Universität Regensburg
01.2007-09.2007 Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg in der Gruppe von Prof. Dr. König und am Institut für Medicinal Chemistry an der University of Kansas in der Gruppe von Prof. Paul Hanson zum Thema „New forskolin derivatives from copper-catalyzed azide-acetylene cycloadditions“
28.09.2007 Abschluss: Diplom
11.2007-02.2009 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für pharmazeutische Chemie an der Universität Hamburg
03.2009-03.2012 Promotion im Institut für Biochemie und molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in der Gruppe von PD. Dr. Dr. Nielsen zum Thema „Synthese und *in vivo* Charakterisierung von ⁵⁹Fe-markierten monodispersen superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln“

Auszeichnungen

- 2002 Karl-von-Frisch-Abiturientenpreis
- 2011 Student Travel Stipend Award, World Molecular Imaging Congress, San Diego

Publikationen in Fachzeitschriften

A. Bartelt, O. T. Bruns, R. Reimer, H. Hohenberg, H. Ittrich, K. Peldschus, M. G. Kaul, U. I. Tromsdorf, H. Weller, C. Waurisch, A. Eychmüller, P. L. S. M. Gordts, F. Rinninger, K. Bruegelmann, **B. Freund**, P. Nielsen, M. Merkel, J. Heeren, Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance, *Nature Medicine* **2011**, *17*, 200–205

M. Heine, P. Nollau, C. Masslo, P. Nielsen, **B. Freund**, O. T. Bruns, R. Reimer, H. Hohenberg, K. Peldschus, H. Ittrich, U. Schumacher, Investigations on the Usefulness of CEACAMs as Potential Imaging Targets for Molecular Imaging Purposes, *PLoS ONE* **2011**, *6*, E28030

M. Heine, **B. Freund**, P. Nielsen, C. Jung, R. Reimer, H. Hohenberg, U. Zangemeister-Wittke, H.-J. Wester, G. H. Lüers, U. Schumacher, High interstitial fluid pressure prevents tumour penetration of diagnostic monoclonal antibodies applied for molecular imaging purposes, *Manuskript eingereicht bei PLoS ONE*

B. Freund, U. I. Tromsdorf, O. T. Bruns, M. Heine, A. Giemsa, N. Raabe, H. Ittrich, J. Heeren, R. Reimer, H. Hohenberg, U. Schumacher, H. Weller, P. Nielsen, Synthesis and *in vivo* characterization of ⁵⁹Fe-labeled monodisperse superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIOs), *Manuskript in Vorbereitung*

N. Raabe, E. Forberich, **B. Freund**, O. T. Bruns, M. G. Kaul, M. Heine, U. I. Tromsdorf, L. Herich, P. Nielsen, R. Reimer, U. Schumacher, G. Adam, H. Ittrich, The effect of protein binding to USPIO on r1, r2 and r2* *in vitro* at 3T MRI with regard to *in vivo* organ uptake- comparison of the self-synthesized USPIO MDNP6nm and Sinerem[®], *Manuskript in Vorbereitung*

N. Raabe, E. Forberich, **B. Freund**, O. T. Bruns, M. G. Kaul, M. Heine, U. I. Tromsdorf, L. Herich, P. Nielsen, R. Reimer, U. Schumacher, G. Adam, H. Ittrich, *In vivo* quantification of $\Delta R2^*$ and determination of r2* of a highly monodisperse USPIO via ⁵⁹Fe iron core-labeling at 3T MRI, *Manuskript in Vorbereitung*

Vorträge auf Kongressen

Synthesis and characterization of ^{59}Fe -labeled nanoparticles for tumour targeting, 29. Januar 2010, GKSS Workshop, Geesthacht

Iron Oxide Nanoparticle T1 MR Contrast Agents and Their Application *In Vivo*, 30. November 2010, MRS Fall Meeting, Boston

Eigene Poster auf internationalen Kongressen:

^{59}Fe -labeled nanoparticles - a possibility to monitor and quantify the cellular uptake and the biological response *in vivo* and *in vitro*, 26. - 28. Mai 2010, 1st International Symposium for PhD Students on Protein Trafficking in Health and Disease, Hamburg

Synthesis, physicochemical and toxicological characterization of ^{59}Fe -labeled nanoparticles for targeting arteriosclerotic lesions, 20. – 23. Juni 2010, 78th European Arteriosclerosis Society congress, Hamburg

Fate of monodisperse superparamagnetic iron based nanoparticles *in vivo*, 2011 World Molecular Imaging Congress, 7. – 10. September 2011, San Diego

Patente

J. Herkel, A. Carambia, **B. Freund**, J.Heeren, P. Nielsen, O.T. Bruns, A. Lohse, S. Lüth, H. Weller, S. Salmen, Nanoparticle compositions for generation of regulatory T cells and treatment of autoimmune disease an other chronic inflammatory conditions, Patent Nr. 11009032.1-2112, Europäisches Patentamt

7.6 Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel als solche gekennzeichnet habe. Diese Arbeit ist zuvor in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt worden.

Hamburg, den