

Superparamagnetische Ferrit-Nanopartikel als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie

Dissertation

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

dem Fachbereich Chemie

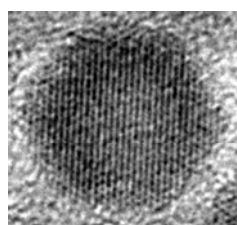
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Ulrich Ingmar Tromsdorf

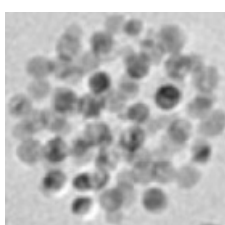
aus Hamburg

Nanopartikel
~5 nm



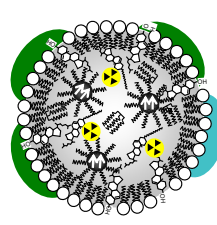
T_1

Mizellen
~100 nm



T_2

Nanosomen
~250 nm



T_2^*

Hamburg, 2009

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2006 bis Oktober 2009 im Institut für Physikalische Chemie der Universität Hamburg in der Gruppe von Prof. Dr. Horst Weller angefertigt. Teile der Arbeit entstanden in enger Kooperation mit dem Institut für Molekulare Zellbiologie von Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel an dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf sowie der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie von Prof. Dr. Gerhard Adam am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

1. Gutachter: Prof. Dr. Horst Weller
2. Gutachter: Prof. Dr. Stephan Förster

Disputation: 05.02.2010

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	1
2	<i>Theoretische Einführung</i>	4
2.1	Grundlagen des Magnetismus	4
2.1.1	Dia- und Paramagnetismus	4
2.1.2	Kollektiver Magnetismus	6
2.1.3	Antiferro- und Ferrimagnetismus	7
2.1.4	Magnetische Eigenschaften eines Ferromagneten	8
2.1.5	Magnetismus von Nanopartikeln	10
2.2	Magnetresonanztomographie	14
2.2.1	Grundlagen der Kern-Resonanz	14
2.2.2	Signal und Kontrast	17
2.2.3	Tomographische Bildgebung	20
2.2.4	Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie	22
3	<i>Experimenteller Teil</i>	27
3.1	Chemikalien	27
3.2	Synthese von Ferrit-Nanopartikeln	27
3.2.1	Synthese von Fe_3O_4 -Nanopartikeln	27
3.2.2	Synthese von MnFe_2O_4 -Nanopartikeln	28
3.2.3	Aufreinigung der Nanopartikel	28
3.3	Monophosphatierung Polyethylenglykol basierter Liganden	28
3.3.1	Veresterung von Polyethylenglykol-monomethylether	28
3.3.2	Veresterung von Polyethylenglykol-monoacrylat	28
3.3.3	Synthese von Polyethylenglykol-Liganden mit Carbonsäure-Ankergruppe	29
3.4	Ligandenaustauschreaktionen	29
3.4.1	Ligandenaustausch mit Phosphat-funktionalisiertem Polyethylenglykol	29
3.4.2	Ligandenaustausch mit Carboxylat-funktionalisiertem Polyethylenglykol	29
3.5	Zytotoxizitätsuntersuchungen	30
3.5.1	Untersuchungen an J774-Makrophagen mittels MTT	30
3.5.2	Berliner Blau-Zellfärbung an J774-Makrophagen	30

3.6	Charakterisierungsmethoden	32
3.6.1	Transmissionselektronenmikroskopie	32
3.6.2	Pulver-Röntgendiffraktometrie	32
3.6.3	Foner-Probenvibrationsmagnetometrie	32
3.6.4	Infrarot-Spektroskopie	33
3.6.5	Thermogravimetrie	33
3.6.6	Kernresonanz-Spektroskopie	33
3.6.7	Gel-Filtrations-Chromatographie	33
3.6.8	Dynamische Lichtstreuung	34
3.6.9	Atomabsorptionsspektroskopie	34
3.6.10	Kernresonanz-Relaxometrie	34
3.6.11	Magnetresonanztomographie	35
4	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	36
4.1	Synthese und Charakterisierung von Ferrit-Nanopartikeln	37
4.2	Oberflächenmodifizierung an Ferrit-Nanopartikeln	46
4.2.1	Synthese Polyethylenglykol-basierter Liganden	47
4.2.2	Ligandenaustausch ohne Aggregation der Partikel	51
4.3	Entwicklung positiver MR-Kontrastmittel unter	
	Verwendung nicht-aggregierter Eisenoxid-Nanopartikel	58
4.3.1	Stabilitätsuntersuchungen an PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikeln	59
4.3.2	Untersuchungen zur Kontrastgebung	64
4.3.3	Untersuchungen zur Toxizität	69
4.3.4	Aufnahme der Nanopartikel in Zellen	73
4.3.5	Funktionalisierung von Eisenoxid-Nanopartikeln zur Kopplung an Biomoleküle	75
4.4	Entwicklung negativer MR-Kontrastmittel	78
4.4.1	Oberflächeneffekte auf die transversalen Relaxivitäten	78
4.4.2	Synthese eines T ₂ -Kontrastmittels unter Verwendung von Triblockcopolymeren	83
4.4.3	Synthese eines Negativ-Kontrastmittels auf Basis biologischer Mizellen – Nanosomen	86
5	<i>Zusammenfassung</i>	94
6	<i>Summary</i>	96

7	<i>Literatur</i>	98
----------	-------------------------	-----------

8	<i>Anhang</i>	105
----------	----------------------	------------

8.1	Abkürzungsverzeichnis	105
8.2	Chemikalien	107
8.3	Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge	108
8.4	Danksagungen	114
8.5	Lebenslauf	116
8.6	Erklärung	118

1 Einleitung

Nanoskalige Systeme zeichnen sich durch besondere physikalische und chemische Eigenschaften aus. Sie sind dabei als Übergang vom atomaren bzw. molekularen Bereich zu dem ausgedehnten Festkörperstrukturen zu betrachten^[1].

Während für Festkörperstrukturen die Gesetze der klassischen Physik Gültigkeit besitzen, sind die Gesetze der Quantenmechanik für zahlreiche Eigenschaften der Nanostrukturen verantwortlich. Als eindrucksvollstes Beispiel ist hier der Größenquantisierungseffekt bei nanoskaligen Halbleiterstrukturen zu nennen, der deren optische Eigenschaften definiert und ihnen somit einzigartige Einsatzmöglichkeiten erschließt. Die besonderen Eigenschaften von Nanopartikeln rühren ferner daher, dass sie im Vergleich zu den entsprechenden Festkörperstrukturen eine sehr große Oberfläche relativ zum Volumen besitzen. So sinkt der Anteil der Oberflächenatome von etwa 80 % für ein 2 nm großes Teilchen auf nur noch 20 % für ein 10 nm großes Partikel^[2]. Auch der Magnetismus von Materialien ist im Nanometer-Bereich stark größenabhängig und zeigt durch den Superparamagnetismus eine Eigenschaft, die im Festkörper nicht beobachtet werden kann^[3].

Auf Grund der starken Größenabhängigkeit der physikalischen Eigenschaften der Nanopartikel war die Entwicklung von präzisen Synthesestrategien notwendig. Heute werden Nanopartikel nasschemisch durch Hochtemperatursynthesen in hochsiedenden unpolaren organischen Lösungsmitteln hergestellt. Dadurch ist die Herstellung größeneinheitlicher Proben in einem weiten Bereich mit definierter Morphologie möglich^[4]. Die Teilchen besitzen außerdem ein hohes Maß an Kristallinität und eine genau einstellbare chemische Zusammensetzung.

Die Verwendung maßgeschneiderter Nanopartikel mit genau kontrollierbaren Eigenschaften bietet zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten^[5]. Eine besonders viel versprechende Perspektive bietet der Einsatz von Nanomaterialien im Bereich der Lebenswissenschaften und der Biomedizin^[6, 7]. Tatsächlich bedient sich auch die Natur in ihrer Komplexität Strukturen im Nanometerbereich, um auf sub-zellulärer Ebene Funktionalität zu gewährleisten, was durch kleine Moleküle nicht möglich wäre^[8]. So besitzt beispielsweise der DNA-Doppelstrang einen Durchmesser von 2 nm. Einige Lipoproteine haben Durchmesser von etwa 20 nm. Die Natur nutzt also ebenfalls überall dort, wo spezifische Erkennungs- oder Vermittlungsprozesse stattfinden, nanoskalige Systeme.

Neben diesen günstigen Größeneigenschaften ergibt sich das große Potential anorganischer Nanopartikel für biomedizinische Anwendungen aus deren großer Oberfläche und der damit verbundenen Möglichkeit der passgenauen Funktionalisierung. So können die physikalischen Eigenschaften des Kernes über eine präzise Oberflächenmodifizierung mit den erforderlichen chemischen und biologischen Eigenschaften verknüpft werden.

Zentrales Ziel der Verwendung von anorganischen Nanopartikeln in der Biomedizin ist eine molekulare oder zelluläre Bildgebung^[9]. Dabei handelt es sich um die Charakterisierung und Darstellung biologischer Prozesse auf zellulärer und molekularer Ebene. Langfristig sollen frühe molekulare Abnormitäten erkannt werden. Die konventionelle Bildgebung basiert hingegen auf der Visualisierung der sich später aus diesen Abnormitäten entwickelnden Krankheiten^[10]. Auf diese Weise sollen beispielsweise Tumor-Erkrankungen oder atherosklerotische Plaques frühzeitig erkannt werden^[11-13].

Konkrete Anwendungen sind die Lebendzell-Mikroskopie mit fluoreszierenden Halbleiter-Nanopartikeln oder die Intravital-Mikroskopie mit im nahen Infrarot emittierenden Nanokristallen. Eine der wohl wichtigsten Anwendungen basiert auf dem Einsatz superparamagnetischer Metalloxid-Nanopartikel als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie (MRT), wobei die klinische Applikation bislang auf Eisenoxid beschränkt ist. Die MRT hat sich in den vergangenen Jahren zum wichtigsten nicht-invasiven Bildgebungsverfahren entwickelt und bietet den Vorteil, dass Gewebe in hoher Auflösung ohne die Verwendung schädlicher Röntgenstrahlung abgebildet werden können.

MR-Kontrastmittel werden entweder dazu eingesetzt, die longitudinale Relaxationszeit T_1 eines Gewebes zu verkürzen, was zu einem helleren Bild führt, oder die transversalen Relaxationszeiten T_2 und T_2^* zu reduzieren, wodurch das Bild im Bereich der Kontrastmittelakkumulation dunkel erscheint. T_1 -Kontrastmittel heißen auch positive Kontrastmittel, deren typische Vertreter paramagnetische Gadolinium-Komplexe sind. Die T_2/T_2^* -Kontrastmittel werden negative Kontrastmittel genannt und werden durch die erwähnten superparamagnetischen Eisenoxid-Partikel (SPIO) repräsentiert. Gegenwärtig werden anorganische Nanostrukturen zahlreicher Materialien sowohl für die T_1 - als auch für die T_2/T_2^* -gewichtete Bildgebung getestet. Neben magnetischen Nanopartikeln wurden auch paramagnetische Teilchen sowie Hybrid-Materialien verwendet, welche gleichzeitig eine optische Bildgebung oder Therapieansätze ermöglichen^[14-18].

In dieser Arbeit wird die Entwicklung von T_1 -, T_2 - und T_2^* -Kontrastmitteln auf Basis von Eisenoxid- und Manganferrit-Nanopartikeln aufgezeigt. Die Teilchen werden mittels

organometallischer Hochtemperatursynthese hergestellt und durch maßgeschneiderte Oberflächenmodifikationen im Hinblick auf Stabilität, Kontrastgebung, Toxizität und biologische Spezifität optimiert. Die Kontrastmittel sind dem heutigen klinischen Standard in diesen Kriterien überlegen und bieten langfristige Perspektiven für die Kontrastmittel-unterstützte MRT.

2 Theoretische Einführung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit zwei verschiedenen Ursprüngen von Magnetismus. Einerseits bewirken Bewegungen von Elektronen in Atomen oder auch ausgedehnten Festkörperstrukturen materialintrinsischen Magnetismus unterschiedlichster Form, welchem bei der Entwicklung neuartiger nanoskaliger Materialien entscheidende Bedeutung zukommt. Diese Effekte finden ihren Ursprung ausschließlich in der elektronischen Struktur von Atomen oder Festkörpern. Andererseits beinhaltet diese Arbeit die Verwendung und Manipulation von kernmagnetischen Effekten, welche insbesondere in der Kernmagnetischen Resonanz (NMR) zum Tragen kommen.

2.1 Grundlagen des Magnetismus

Jede Form des Magnetismus beruht auf der Bewegung von elektrischen Ladungen^[19]. Ladungsträger können Elektronen in den Orbitalen der Atome sein oder die positiv geladenen Atomkerne. Diese kernmagnetischen Effekte sind um Größenordnungen schwächer und werden daher bei der Behandlung des Magnetismus von Stoffen vernachlässigt. Die Bewegung der Ladung, die den Magnetismus von Stoffen verursacht, hat im Wesentlichen zwei Ursachen, nämlich den Spin der Elektronen und ihren Bahndrehimpuls. Durch diese Bewegung besitzt ein Elektron ein magnetisches Dipolmoment, welches die kleinste Einheit des Magnetismus ist und durch welches er überhaupt messbar wird.

2.1.1 Dia- und Paramagnetismus

Stoffe, deren Atome, Moleküle oder Ionen abgeschlossene Elektronenschalen besitzen, sind diamagnetisch, da sich die magnetischen Momente der einzelnen Elektronen gegenseitig kompensieren. Wird ein Diamagnet einem äußeren Magnetfeld H ausgesetzt, so werden, anschaulich betrachtet, in den Orbitalen seiner Atome Kreisströme induziert, deren magnetische Momente gemäß der Lenz'schen Regel dem äußeren Feld entgegengesetzt gerichtet sind. Die magnetische Suszeptibilität χ , welche die Effektivität einer magnetischen Induktion durch ein äußeres Feld darstellt, nimmt für einen Diamagneten entsprechend negative Werte an. Diamagnetismus wirkt also repulsiv. Allgemein ist die Suszeptibilität durch folgenden Differentialquotienten gegeben^[20]:

$$\chi = \frac{d\vec{M}}{d\vec{H}} \quad (\text{Gl. 2.1})$$

M ist dabei die Magnetisierung (Dipolmoment pro Volumen) und trägt dieselbe Einheit wie die magnetische Feldstärke.

Im Allgemeinen wird die magnetische Feldstärke H für Felder verwendet, welche aus so genannten freien Strömen resultieren, also beispielsweise einen makroskopisch messbaren Strom durch eine Spule. Die Magnetisierung hingegen bezieht sich auf den Magnetismus von Materialien und Stoffen. Dieser resultiert aus mikroskopischen Strömen, also Bahndrehimpuls und Spin der Elektronen. Diese Ströme werden auch Äquivalentströme genannt. Die Überlagerung beider Größen wird in der magnetischen Flussdichte B zusammengefasst:

$$\vec{B} = \mu_0 (\vec{H} + \vec{M}) \quad (\text{Gl. 2.2})$$

Besitzen Atome, Moleküle oder Ionen ungepaarte Elektronen, ist der Stoff paramagnetisch. Dadurch, dass sich die magnetischen Momente der einzelnen Elektronen nicht zu null kompensieren, ergeben sich atomare magnetische Momente, die von einem äußeren Magnetfeld feldverstärkend ausgerichtet werden können.

In Abwesenheit eines äußeren Magnetfeldes ist die Magnetisierung eines Paramagneten gleich null, da die stets vorhandene thermische Energie eine statistische Ausrichtung der magnetischen Momente bewirkt. Wird ein magnetisches Feld angelegt und in seiner Stärke langsam erhöht, so richten sich die Momente zunehmend aus, was in einem langsamen Anstieg der Magnetisierung und einer positiven Suszeptibilität resultiert. Der Verlauf einer solchen Magnetisierungskurve (M-H-Auftragung) ist also im Wesentlichen durch die Konkurrenz von thermischer und magnetostatischer Energie charakterisiert. Diese Konkurrenz wird in einfacher Form im Langevin-Modell berücksichtigt. Für die Magnetisierung gilt hier:

$$M = N\mu \cdot L(x) = M_s \cdot L(x) \quad (\text{Gl. 2.3})$$

In Gl. 2.3 ist N die Zahl der magnetischen Momente pro Volumen und μ das magnetische Moment. Das Produkt beider Größen wird als Sättigungsmagnetisierung bezeichnet. Ferner gilt:

$$L(x) = \coth x - x^{-1} \text{ und} \quad (\text{Gl. 2.4})$$

$$x = \frac{\mu H}{kT} \quad (\text{Gl. 2.5})$$

Der Quotient x gibt die eben beschriebene Konkurrenz aus der thermischen (kT) und magnetostatischen Energie wieder. Für große x (große Feldstärken) dominiert die

magnetostatische Energie. Folglich strebt $L(x)$ gegen eins und es resultiert Sättigungsmagnetisierung.

Das Langevin-Modell besitzt im atomaren Bereich die Einschränkung, dass quantenmechanische Effekte wie die Quantisierung des Gesamtdrehimpulses nicht berücksichtigt werden. Das Magnetisierungsverhalten superparamagnetischer Nanopartikel hingegen lässt sich durch diese Theorie zuverlässig beschreiben.

2.1.2 Kollektiver Magnetismus

Ein Charakteristikum des Paramagnetismus ist, dass die einzelnen atomaren magnetischen Momente als isolierte Zentren betrachtet werden und sich in ihrer Ausrichtung nicht gegenseitig beeinflussen. Es gibt aber kooperative Mechanismen, die dazu führen, dass die magnetischen Momente unter bestimmten Bedingungen richtenden Kräften ausgesetzt werden. Dadurch können in bestimmten Bereichen eines solchen Stoffes magnetische Ordnungen entstehen. Diese Ordnungen liegen beim Ferromagnetismus, Ferrimagnetismus und Antiferromagnetismus vor. Zusammenfassend werden diese Magnetismen als kollektiver Magnetismus bezeichnet.

Kollektiver Magnetismus tritt in diesen Stoffen aber nur unterhalb einer bestimmten Temperatur auf. Beim Ferromagneten ist dieses die Curie-Temperatur T_C . Unterhalb von T_C richten sich die magnetischen Momente in bestimmten Bereichen parallel aus. Oberhalb von T_C bricht die magnetische Ordnung infolge der hohen thermischen Energie vollständig zusammen und der Stoff wird zum Paramagneten. Für die Suszeptibilität gilt das Curie-Weiss-Gesetz:

$$\chi = \frac{C}{T - T_C} \quad (\text{Gl. 2.6})$$

C ist die Curie-Konstante. Oberhalb von T_C beschreibt die Suszeptibilität als Funktion der Temperatur eine Hyperbel. Bei der Curie-Temperatur ändern sich nicht nur die magnetischen Eigenschaften deutlich, sondern auch andere physikalische Größen wie die Wärmeleitfähigkeit.

Die parallele Ordnung der magnetischen Momente im Ferromagneten wird quantenmechanisch durch die Austauschwechselwirkung beschrieben. Zwei Elektronen können auf Grundlage des Pauli-Prinzips entweder eine parallele Ausrichtung (Triplett-Zustand) oder eine antiparallele Ausrichtung (Singulett-Zustand) einnehmen. Der

Energieunterschied zwischen Singulett- und Triplett-Zustand heißt Austauschenergie. Um die Austauschenergie zu berechnen, wird der Heisenberg-Operator verwendet:

$$H_{ex} = -2J_{ex} \mathbf{S}_i \cdot \mathbf{S}_j \quad (\text{Gl. 2.7})$$

In Gl. 2.7 sind $\mathbf{S}_i$ und $\mathbf{S}_j$ die Spinmatrizen der beiden Elektronen. J_{ex} ist das Austauschintegral der beiden Elektronen. Es kann sowohl ein positives als auch ein negatives Vorzeichen haben. Falls $J_{ex} < 0$ ist der Singulett-Zustand der energetisch niedrigere. Dieser Zustand wird als antiferromagnetische Kopplung bezeichnet. Ist hingegen $J_{ex} > 0$ ist der Triplett-Zustand energetisch begünstigt und es ergibt sich eine ferromagnetische Kopplung. Im Periodensystem der Elemente sind Eisen, Kobalt und Nickel die typischen ferromagnetischen Elemente mit positivem Austauschintegral. Hingegen sind Chrom und Mangan antiferromagnetische Elemente. Einen empirischen Zusammenhang zwischen dem Vorzeichen des Austauschintegrals und dem Quotienten aus Gitterkonstante und Radius der unvollständig besetzten d-Schale gibt die Bethe-Slater-Kurve wieder (Abb. 2.1). Sie sagt den Ferromagnetismus von Nickel, Eisen und Kobalt in der richtigen Reihenfolge ihrer Curie-Temperaturen voraus.

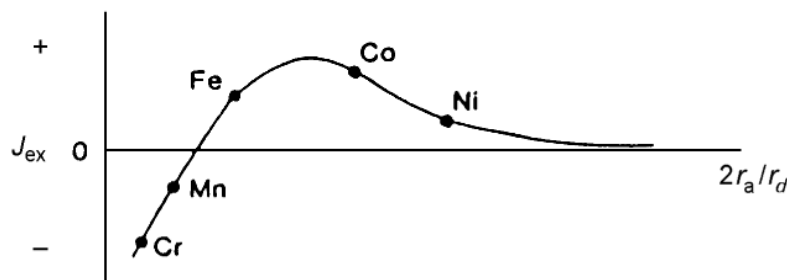


Abb. 2.1: Die Bethe-Slater Kurve. Positive Austauschintegrale führen zur ferromagnetischen, negative zur antiferromagnetischen Kopplung.

2.1.3 Antiferro- und Ferrimagnetismus

Ein Antiferromagnet weist ein negatives Austauschintegral auf. Bei hohen Temperaturen zeigt ein Antiferromagnet analog zum Ferromagneten paramagnetisches Verhalten. Der Übergang zwischen beiden Phasen ist hier durch die Néel-Temperatur T_N gegeben.

Strukturell kann ein Antiferromagnet betrachtet werden, als sei er aus zwei ferromagnetischen Untergittern aufgebaut. Die magnetischen Momente der beiden Gitter kompensieren sich dabei zu null. Aus diesem Grund besitzen Antiferromagneten bei niedrigen Temperaturen

sehr kleine positive Suszeptibilitäten, die allerdings mit steigender Temperatur zunehmen, da die thermische Energie die antiferromagnetische Ordnung stört.

Ferrimagneten haben ebenfalls ein negatives Austauschintegral. Somit sind auch sie aus zwei entgegengesetzt ausgerichteten ferromagnetischen Untergittern aufgebaut. Die magnetischen Momente der beiden Gitter kompensieren sich allerdings nicht zu null, d. h. sie sind von unterschiedlichem Betrag. Oberhalb der Curie-Temperatur zeigen auch Ferrimagneten Paramagnetismus. Unterhalb von T_C gleichen seine magnetischen Eigenschaften denen eines Ferromagneten.

Die bekanntesten ferrimagnetischen Materialien sind die Ferrite, die in kubische und hexagonale zu unterscheiden sind. Kubische Ferrite haben die allgemeine Zusammensetzung $MO \cdot Fe_2O_3$ (MFe_2O_4), wobei M ein divalentes Kation wie Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} oder Fe^{2+} ist. Der bekannteste Vertreter ist das Magnetit (Fe_3O_4). Abb. 2.2 zeigt zusammenfassend die schematische Ausrichtung der magnetischen Momente in Ferro-, Antiferro-, und Ferrimagneten.

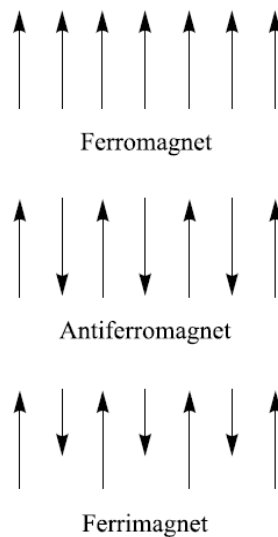


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der kollektiven Ausrichtung der magnetischen Momente im Ferro-, Antiferro- und Ferrimagneten.

2.1.4 Magnetische Eigenschaften eines Ferromagneten

Bisher wurde der Ferromagnetismus als ein kooperatives Phänomen beschrieben, das durch eine parallele Ausrichtung der atomaren magnetischen Momente in alle Raumrichtungen gekennzeichnet ist. Tatsächlich ist ein Ferromagnet jedoch aus einzelnen Bereichen, den Domänen aufgebaut. Diese werden auch als Weissche Bezirke bezeichnet. Innerhalb einer

Domäne richten sich die magnetischen Momente parallel aus, wohingegen die Ausrichtung der Domänen untereinander nicht parallel ist.

Der Grund für die Aufteilung eines Ferromagneten in einzelne Domänen ist eine Reduzierung der Gesamtenergie, die als Summe verschiedener Beiträge gegeben ist. Ein Beitrag besteht in der magnetostatischen Energie. Bestünde der Ferromagnet aus einer einzigen makroskopischen Domäne, enthielte das von ihr verursachte Magnetfeld eine sehr große magnetostatische Energie. Diese wird reduziert, indem der Stoff viele kleinere Domänen ausbildet. Mit zunehmender Zahl und abnehmender Größe der Domänen nimmt jedoch die Austauschenergie an den Grenzen der Domänen zu, da hier eine antiparallele Ausrichtung der magnetischen Momente erreicht werden muss. Diese ist wegen des positiven Austauschintegrals für Ferromagneten nicht begünstigt. Durch diese Konkurrenz bilden sich Domänen einer bestimmten Größe aus. Typische Größen von Domänen liegen im Bereich von 100 nm. Die Ein-Domänen-Größe von Magnetit beträgt 128 nm. An der Grenze zwischen den Domänen bilden sich Domänenwände einer bestimmten Dicke aus. Diese werden auch als Blochsche Wände bezeichnet.

Die Magnetisierungskurve eines Ferromagneten ist durch einen Hystereseverlauf gekennzeichnet. Wird ein Ferromagnet einem stärker werdenden äußeren Magnetfeld H ausgesetzt, so steigt die Magnetisierung zunächst entlang der Neukurve bis zur Sättigungsmagnetisierung an. Wird die Feldstärke anschließend bis auf null abgesenkt, so fällt auch die in der Probe induzierte Magnetisierung ab. Allerdings verbleibt auch in Abwesenheit eines äußeren Feldes eine Magnetisierung in der Probe, welche als Remanenzmagnetisierung M_r bezeichnet wird. Um den Stoff vollständig zu entmagnetisieren, ist die Koerzitivfeldstärke H_c erforderlich. Das magnetische Feld hat dabei ein entgegengesetztes Vorzeichen. Wird der Betrag des magnetischen Feldes in dieser Richtung weiter erhöht, so wird in umgekehrter Richtung die Sättigungsmagnetisierung erreicht. Diese Hystereseschleife kann beliebig durchlaufen werden (Abb. 2.3).

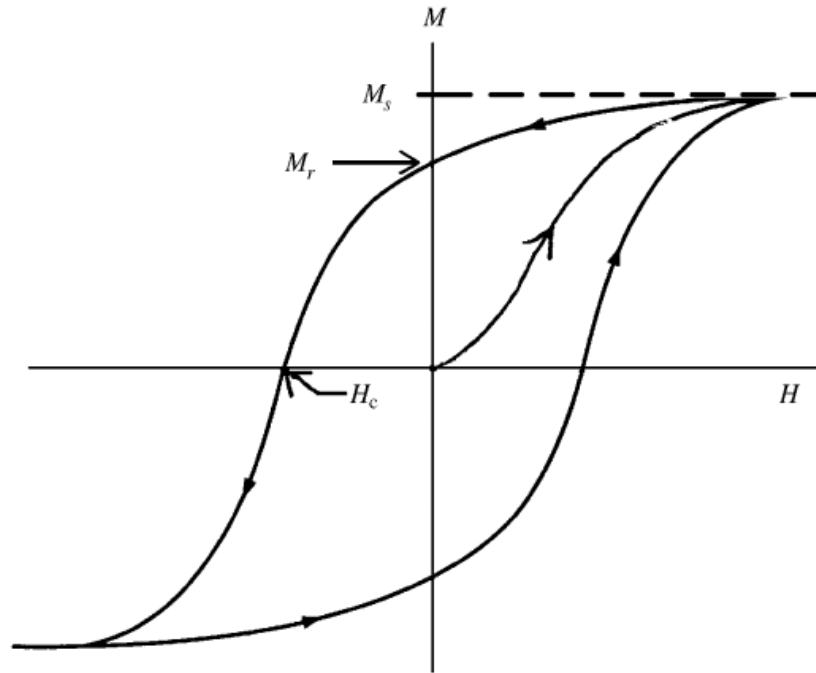


Abb. 2.3: Hysteresekurve eines Ferro- oder Ferrimagneten. Charakteristische Größen sind die Sättigungsmagnetisierung (M_s), die Remanenz (M_r) sowie die Koerzitivfeldstärke (H_c).

2.1.5 Magnetismus von Nanopartikeln

Wie bereits beschrieben, sind ferromagnetische Stoffe zur Minimierung der Gesamtenergie aus Domänen aufgebaut. Wird der Teilchendurchmesser d eines Ferromagneten reduziert, so besteht das Teilchen unterhalb einer bestimmten Größe nur noch aus einer Domäne. Die magnetostatische Energie ist proportional zu d^3 , während die mit der Bildung von Domänen verbundene Domänenwandenergie proportional zu d^2 ist. Da diese Oberflächenenergie mit abnehmender Teilchengröße sehr stark zunimmt, ist die Bildung von Domänen unterhalb der Ein-Domänen-Größe nicht mehr begünstigt^[21].

Die Koerzitivfeldstärke H_c ist, wie in 2.1.4 diskutiert, ein Maß dafür, wie ausgeprägt die Hysterese eines Ferromagneten ist. Da sie die Feldstärke darstellt, die nötig ist, um ein Material vollständig zu entmagnetisieren, gibt sie außerdem an, wie stabil die Ausrichtung der Magnetisierung in Abwesenheit eines äußeren Feldes ist. H_c zeigt eine starke Abhängigkeit von der Teilchengröße. Im Multi-Domänenbereich ist H_c zunächst relativ gering, steigt aber mit abnehmender Partikelgröße stark an. Entspricht der Partikeldurchmesser der Ein-Domänen-Größe, so erreicht H_c ein Maximum. Anschließend fällt die Koerzitivfeldstärke stark ab, bevor sie bei einer bestimmten Größe den Wert null erreicht. Unterhalb dieser Größe ist das Partikel superparamagnetisch (Abb. 2.4).

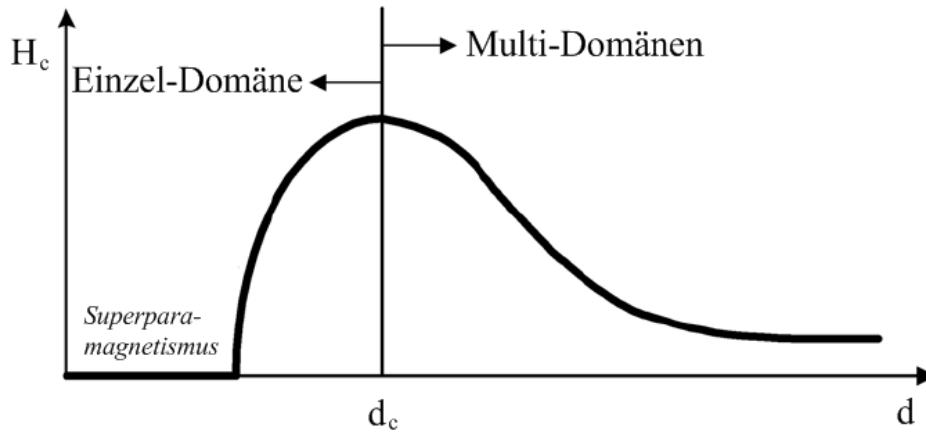


Abb. 2.4: Abhängigkeit der Koerzitivfeldstärke (H_C) vom Partikeldurchmesser.

Um diesen Verlauf der Koerzitivfeldstärke zu erklären, müssen zwei Prozesse betrachtet werden. Im Multi-Domänen-Bereich finden Änderungen in der Magnetisierung über die Bewegung der Domänenwände statt. Da dieser Prozess relativ wenig Energie benötigt, ist H_C hier vergleichsweise gering. An der Ein-Domänen-Grenze verlaufen Änderungen in der Magnetisierung über Rotation des magnetischen Gesamtmomentes der Domäne. Dieser Prozess ist mit einem höheren Energieaufwand verbunden. Die Rotation ist durch die magnetische Anisotropie charakterisiert.

Magnetische Anisotropie beschreibt allgemein das Phänomen, dass die Suszeptibilität eines Stoffes in unterschiedlichen Raumrichtungen verschiedene Werte annimmt. Die Magnetisierung des Stoffes bevorzugt also eine bestimmte räumliche Ausrichtung. Diese bevorzugte Ausrichtung wird als leichte Achse bezeichnet. Die wichtigste Art der magnetischen Anisotropie ist die magnetokristalline Anisotropie. Sie ist eine materialintrinsische Eigenschaft. Die Richtung der leichten Achse wird hier durch die Kristallstruktur bestimmt. Im Bereich von Nanopartikeln existieren weitere Arten der Anisotropie wie beispielsweise die Form-Anisotropie.

Um den Vektor der Magnetisierung aus der leichten Achse herauszudrehen, muss die Anisotropieenergie E_A aufgewendet werden (Abb. 2.5). Sie ist im Falle nur einer leichten Achse gegeben durch

$$E_A = KV \sin^2 \theta. \quad (\text{Gl. 2.8})$$

K ist die Anisotropiekonstante und V das Teilchenvolumen. θ ist der Winkel zwischen der Magnetisierung und der leichten Achse.

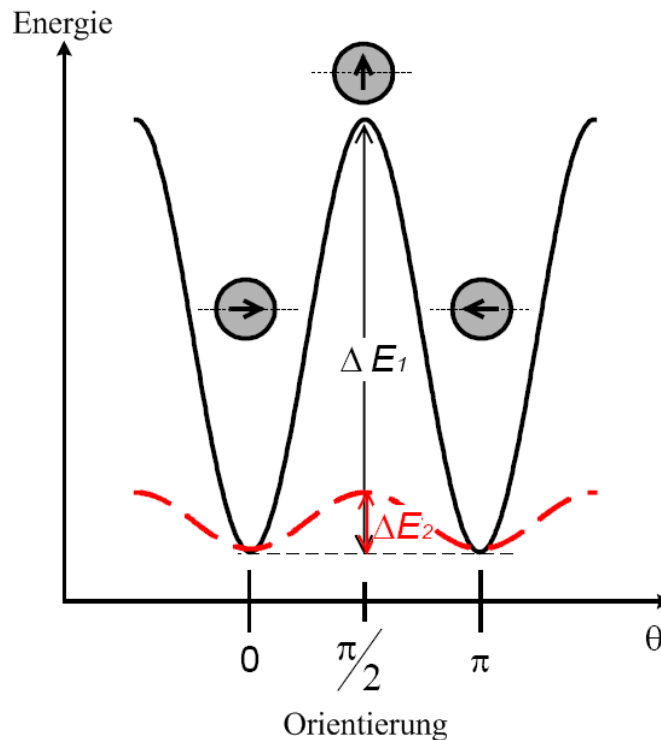


Abb. 2.5: Anisotropiebarrieren für Teilchen mit großer (ΔE_1) und kleiner (ΔE_2) magnetischer Anisotropie.

Die Koerzitivfeldstärke H_C ist am Wert der Ein-Domänen-Größe maximal, weil hier Änderungen der Magnetisierung ausschließlich durch Anisotropieeffekte gesteuert werden. Der Anisotropiebeitrag ist hier gleichzeitig maximal. Wird die Größe des Ein-Domänen-Teilchens weiter verringert, so nimmt auch die aufzubringende Anisotropieenergie gemäß Gl. 2.8 stark ab. Unterhalb einer bestimmten Größe d_{SP} ist die Anisotropieenergie so klein, dass die thermische Energie ausreicht, um die Richtung der Magnetisierung frei auszulenken. Das magnetische Gesamtmoment eines solchen Ein-Domänen-Teilchens fluktuiert also. Dadurch ist überhaupt keine stabile Magnetisierung mehr möglich und die Koerzitivfeldstärke hat den Wert null, d. h. es ist keine Hysterese mehr vorhanden. Diese Form des Magnetismus wird als Superparamagnetismus bezeichnet. Qualitativ gleicht die Magnetisierungskurve der eines Paramagneten, wodurch zu deren Beschreibung ebenfalls das Langevin-Modell herangezogen werden kann. Das Magnetisierungsverhalten eines Superparamagneten ist ebenfalls durch eine Konkurrenz von magnetostatischer Energie (μH) und thermischer Energie (kT) gekennzeichnet. Durch das im Vergleich zu einem isolierten paramagnetischen Atom sehr große magnetische Moment eines superparamagnetischen Partikels dominiert der Term der magnetostatischen Energie sehr schnell. Dadurch ist in einer Probe eines Superparamagneten schon bei sehr viel niedrigeren Feldstärken die Sättigungsmagnetisierung erreicht.

Bisher wurde ausführlich auf die Größenabhängigkeit der Koerzitivfeldstärke H_C und der Anisotropieenergie eingegangen und der Superparamagnetismus als ein Phänomen beschrieben, dass bei sehr kleinen Teilchen ferro- oder ferrimagnetischer Stoffe auftritt. Ein weiterer wichtiger Parameter, der sich im superparamagnetischen Bereich stark größenabhängig zeigt, ist die Sättigungsmagnetisierung M_S ^[22]. Im makroskopischen Festkörper ist die ferromagnetische Ordnung innerhalb der Domäne über alle Dimensionen gleichmäßig. Wird die Teilchengröße eines Ein-Domänen-Partikels reduziert, nimmt das Verhältnis der Oberfläche zum Volumen zu. Da an der Oberfläche die Austauschenergie geringer ist, bilden sich glasartige Spinstrukturen aus. Die ferromagnetische Ordnung ist hier gestört. Mit abnehmender Teilchengröße fällt dieser Effekt zunehmend ins Gewicht, was sich in einem Abfall der Sättigungsmagnetisierung M_S mit abnehmender Teilchengröße bemerkbar macht^[22]:

$$m_s = M_s [(r - d) / r]^3 \quad (\text{Gl. 2.9})$$

Hierbei ist M_s die Sättigungsmagnetisierung des Festkörpers, r der Teilchenradius und d die Schichtdicke. Diese Effekte wurden insbesondere für Fe_3O_4 -Nanopartikel in einem Größenbereich zwischen 4 und 12 nm gezeigt^[23]. So ist die Sättigungsmagnetisierung 12 nm großer Fe_3O_4 -Nanopartikel mit 101 emu/g viermal höher als für 4 nm große Fe_3O_4 -Nanoteilchen (25 emu/g).

2.2 Magnetresonanztomographie

2.2.1 Grundlagen der Kern-Resonanz

Die MRT beruht auf der kernmagnetischen Resonanz (NMR) von Protonen und deren Relaxationsprozessen in einem externen magnetischen Feld^[24, 25]. Wird ein Ensemble von Protonen einem homogenen externen magnetischen Feld B_0 ausgesetzt, kommt es zu einer Präzession der Spins um die Richtung des magnetischen Feldes (z-Richtung). Die Rotationsfrequenz dieser Präzession wird als Larmor-Frequenz ω_0 bezeichnet und ergibt sich zu

$$\omega_0 = \gamma \cdot B_0. \quad (\text{Gl. 2.10})$$

γ ist das gyromagnetische Verhältnis des Protons und beträgt $\gamma=42.6$ MHz/T. Da Protonen einen Spin von $1/2$ besitzen, ergeben sich grundsätzlich zwei mögliche Spinausrichtungen, welche durch die Spinquantenzahlen $+1/2$ und $-1/2$ gegeben sind. In einem externen Magnetfeld B_0 ist die energetische Entartung zwischen diesen beiden Zuständen aufgehoben, wobei die relativ zur Richtung des äußeren Feldes günstigere Orientierung energetisch herabgesetzt wird (α -Zustand) und die ungünstigere energetisch angehoben wird (β -Zustand). In der Konsequenz ergibt sich ein Boltzmann-verteilter Besetzungsunterschied von α - und β -Spins. Dieser Spinüberschuss an α -Spins lässt sich näherungsweise nach

$$\text{Spinüberschuss} \cong N \frac{\hbar \omega_0}{2kT} \quad (\text{Gl. 2.11})$$

abschätzen^[25]. Der Spinüberschuss bewirkt im thermischen Gleichgewicht eine kleine, aber messbare Magnetisierung M_0 entlang B_0 , welche proportional zu B_0 und zur Protonenspindichte ρ_0 ist:

$$M_0 = \frac{\rho_0 \gamma^2 \hbar^2}{4kT} B_0. \quad (\text{Gl. 2.12})$$

Die NMR beruht auf der Fähigkeit, die mit der Präzession einhergehende Magnetisierung M_0 zu detektieren. Dazu wird zwischen zwei verschiedenen Anteilen der Magnetisierung unterschieden, nämlich einem der ihre Änderung entlang B_0 beschreibt (longitudinal) und einem der den entsprechenden xy-Anteil (transversal) beinhaltet.

Grundlage der Detektierbarkeit der Magnetisierung M_0 ist die Absorption von elektromagnetischer Radiofrequenzstrahlung, deren Wellenlänge die Larmor-Gleichung

erfüllt. In einem einfachen NMR-Experiment wird ein Radiofrequenzpuls über eine bestimmte Dauer auf die Probe eingestrahlt. Dieser Radiofrequenzpuls enthält die Larmorfrequenz der Protonen der Probe (im einfachsten Fall reinen Wassers). Durch die Absorption kommt es zu einem Übergang von Spins vom α - in den β -Zustand, bis gleich viele α - wie β -Spins vorhanden sind. Durch diese Gleichbesetzung der beiden Zustände verschwindet die Magnetisierung M_0 entlang B_0 (Abb. 2.6). Unmittelbar nach dem Puls beträgt die longitudinale Magnetisierung also $M_z=0$.

Das eingestrahlte Radiofrequenzfeld ist in der transversalen Ebene, also senkrecht zu B_0 , zirkular polarisiert. In einfacher Betrachtung rotiert der Vektor dieses Feldes (Feldstärke B_1) mit der Larmorfrequenz um die z-Achse. Da die Frequenz des eingestrahlten Feldes gleich der Larmorfrequenz ist, erfahren die Protonen-Spins für die Pulsdauer (hier $\gamma B_0/2\pi$) ein konstantes Feld B_1 . Dieses bewirkt ein Umklappen des Magnetisierungsvektors aus der z-Richtung in die xy-Ebene (Abb. 2.6). Die Richtung des Magnetisierungsvektors ändert sich bei diesem Übergang also um 90° ($\pi/2$), weshalb der hier diskutierte RF-Puls auch als 90° -Puls bezeichnet wird^[26].

Der 90° -Puls bewirkt außerdem, dass die Spins der Protonen unmittelbar nach seinem Abschalten in Phase um die z-Achse rotieren. Die Rotationsfrequenz entspricht dabei der Larmorfrequenz. Daher ist der Betrag des Vektors der transversalen Magnetisierung zu diesem Zeitpunkt maximal ($M_{xy}=M_0$). Um die transversale Magnetisierung zu detektieren, ist in y-Richtung eine Detektorspule positioniert, in welcher ein entsprechend der Rotationsfrequenz oszillierendes Signal induziert wird.

Im Anschluss an das hier beschriebene Resonanzexperiment finden zwei unabhängige Relaxationsmechanismen statt. Der erste Mechanismus, welcher als longitudinale oder Spin-Gitter-Relaxation bezeichnet wird, beschreibt die Rückkehr der longitudinalen Magnetisierung vom Wert $M_z=0$ bis zu ihrem Ursprungswert $M_z=M_0$:

$$M_z(t) = M_0(1 - e^{-t/T_1}) \quad (\text{Gl. 2.13})$$

T_1 ist die longitudinale Relaxationszeit. Die T_1 -Relaxation charakterisiert die Rückkehr zur Boltzmann-Verteilung im thermischen Gleichgewicht, welche mit einem Überschuss an α -Spins einhergeht. Die T_1 -Relaxation ist also mit einem Energietransfer an die Umgebung (das Gitter) verbunden. Der zweite Relaxationsmechanismus ist die transversale oder Spin-Spin-Relaxation und findet ohne Energietransfer statt. Sie beschreibt den kontinuierlich

fortschreitenden Phasenverlust der Spins, welcher sich in einer Abnahme der transversalen Magnetisierung zeigt.

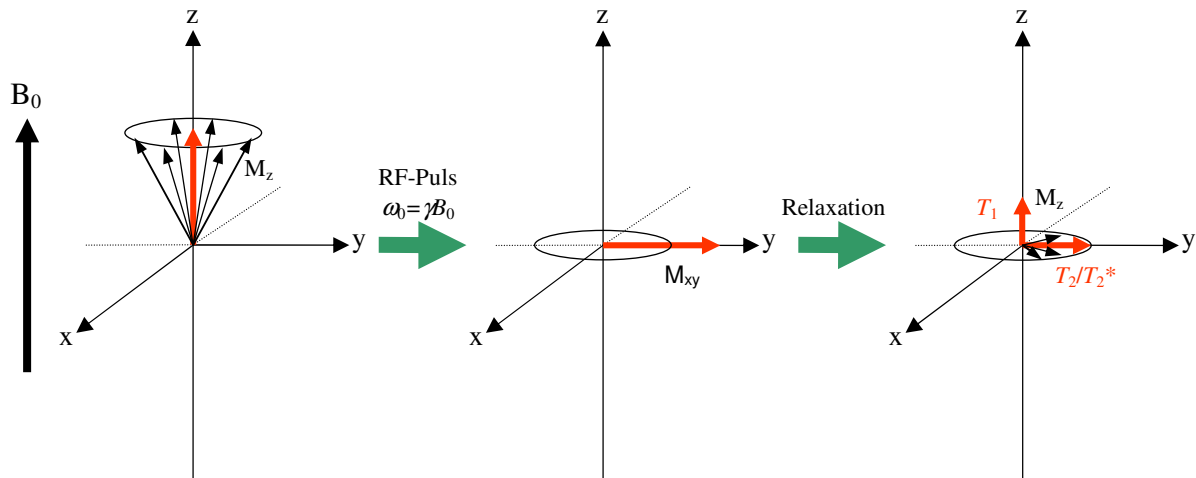


Abb. 2.6: Einfaches Kern-Resonanz-Experiment. Nach einem 90° -Anregungspuls, welcher die Larmorfrequenz beinhaltet, finden zwei unabhängige Relaxationsmechanismen statt. T_1 charakterisiert die longitudinale Relaxation, T_2 und T_2^* die transversale Relaxation.

Der Phasenverlust setzt sich aus zwei sich überlagernden Anteilen zusammen. Einerseits kommt es durch fluktuierende Inhomogenitäten in der mikroskopischen Umgebung der einzelnen Protonen zu spontan entstehenden Phasenunterschieden^[27]. Die Larmorfrequenz der Protonen ändert sich dabei nicht. Der hierdurch bewirkte Verlust der transversalen Magnetisierung wird durch die transversale Relaxationszeit T_2 beschrieben. Tatsächlich existieren aber auch stationäre örtliche Inhomogenitäten im Magnetfeld B_0 und im Gewebe des untersuchten Körpers. Diese bewirken, dass zusätzlich zum bereits erwähnten Phasenverlust einzelne Spinpakete unterschiedliche Larmorfrequenzen erfahren, anschaulich betrachtet, mit verschiedenen Geschwindigkeiten um die z-Achse rotieren^[27]. Diese zusätzlichen Inhomogenitäten bewirken einen beschleunigten Verlust der transversalen Magnetisierung, welcher häufig in einer separaten Zeitkonstante T_2' zusammengefasst wird. Sie werden häufig auch als Suszeptibilitätseffekte bezeichnet. Beide Prozesse sind vergleichend in Abb. 2.7 dargestellt.

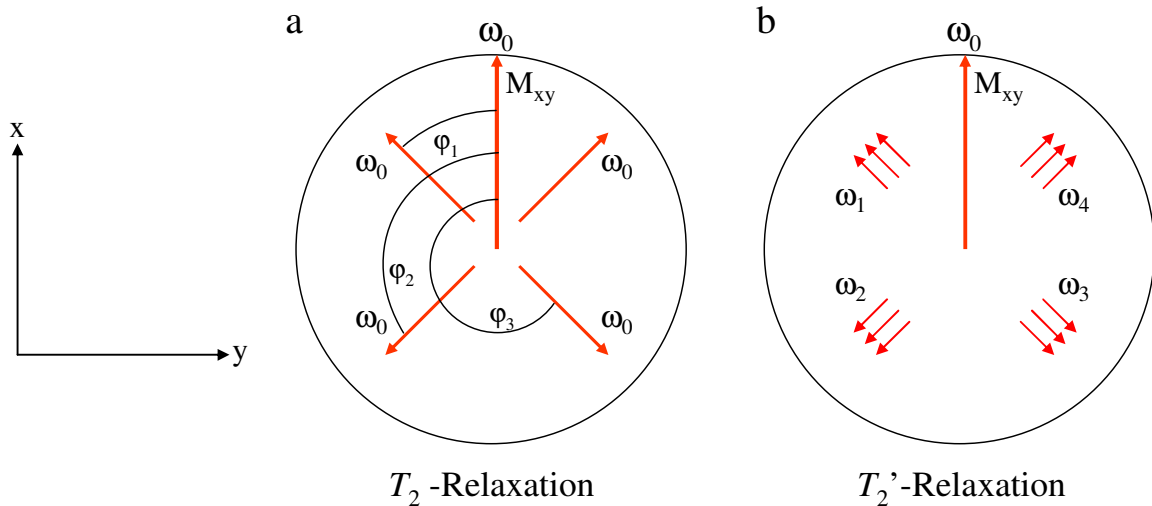


Abb. 2.7: a) Fluktuierende Inhomogenitäten führen zu spontanen Phasenunterschieden der Spins. Die Larmorfrequenz bleibt gleich. b) Stationäre Suszeptibilitätseffekte bewirken Unterschiede in den Larmorfrequenzen verschiedener Spinpakete^[27].

Der beobachtete Abfall der transversalen Magnetisierung, welcher sich in einem Signalverlust in der Detektorspule äußert, ist daher durch die Summe beider Beiträge gegeben und wird als freier Induktionsabfall (FID) bezeichnet. Es gilt:

$$M_{xy}(t) = M_0 e^{-t/T_2^*} \quad (\text{Gl. 2.14})$$

In Gl. 2.14 ist T_2^* die effektive transversale Relaxationszeit. Sie hängt mit den Zeitkonstanten T_2 und T_2' wie folgt zusammen:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_2'} \quad (\text{Gl. 2.15})$$

Ein entscheidender Unterschied zwischen T_2 und T_2' ist, dass der zusätzliche Signalverlust durch T_2' reversibel ist. Durch Verwendung geeigneter Puls-Sequenzen kann er ausgeglichen werden und der reine T_2 -Abfall und die T_2 -Relaxationszeit ermittelt werden. Wie bereits erwähnt, beruht letzterer auf fluktuierenden dynamischen Prozessen wie etwa der Diffusion und kann daher nicht eliminiert werden.

2.2.2 Signal und Kontrast

Das Signal ist in der MRT durch den Betrag der transversalen Magnetisierung gegeben. Es wird durch ihren Vektor oszillierend in der Detektorspule induziert. Grundsätzlich sind in der MR-Bildgebung Bereiche voneinander abgrenzbar, wenn sie unterschiedliche

Signalintensitäten besitzen. Dadurch zeigen sie verschiedene Helligkeiten. Um also z. B. zwei Gewebe A und B deutlich voneinander zu unterscheiden, muss die Differenz ihrer Signalintensitäten möglichst groß sein. Diese Differenz wird als Kontrast bezeichnet^[25]:

$$C_{AB} \equiv S_A - S_B \quad (\text{Gl. 2.16})$$

Das MR-Signal eines bestimmten Gewebes hängt hauptsächlich von drei intrinsischen Parametern ab, die bereits in 2.2.1 eingeführt wurden. Es sind die Relaxationszeiten T_1 und T_2 (T_2^*) sowie die Protonenspindichte ρ_0 . Letztere steht gemäß Gl. 2.12 in direkt proportionalem Verhältnis zur Magnetisierung M_0 . Unterschiedliche Bildgebungssequenzen können diese Parameter durch Wahl geeigneter Einstellungen unterschiedlich gewichten, um möglichst kontrastreiche Bilder zu erhalten.

Wie in 2.2.3 ausführlich dargestellt wird, ist für eine tomographische Bildgebung, d. h. die Erstellung orts aufgelöster Bilder, die Verwendung so genannter Gradientenfelder Voraussetzung. Dabei ändert sich das Magnetfeld bzw. die Larmorfrequenz entlang einer Ortskoordinate linear. Die Gradientenfelder bewirken eine Dephasierung der Protonenspins, in gleicher Weise wie sie bei den transversalen Relaxationsmechanismen in 2.2.1 beschrieben wurde. Um den Verlust der transversalen Magnetisierung zu kompensieren, müssen in der MRT Puls-Sequenzen eingesetzt werden, die zu einer partiellen Rephasierung der Spins führen. Die wichtigsten dazu eingesetzten Puls-Sequenzen sind die Gradientenecho- sowie die Spinecho-Sequenz. Sie unterscheiden sich im Wesentlichen im Einfluss der transversalen Relaxation. Während das Signal in der Gradientenecho-Sequenz von der Zeit T_2^* abhängt, ist das Spinecho in der Lage die stationären Inhomogenitäten (Signalverlust durch T_2') zu kompensieren, weshalb lediglich T_2 das Signal einer Spinecho-Sequenz beeinflusst. Das Signal zur Echozeit T_E im Gradientenecho errechnet sich zu^[25]:

$$S(T_E) = \rho_0 (1 - e^{-TR/T_1}) e^{-TE/T_2^*} \quad (\text{Gl. 2.17})$$

TR ist die Wiederholzeit, d. h. die Zeit, nach der die komplette Sequenz wiederholt wird. Die mehrfache Wiederholung einer Sequenz ist für die dreidimensionale räumliche Darstellung notwendig.

In der MRT werden grundsätzlich bipolare Gradienten verwendet. Dabei wird für eine bestimmte Zeit ein magnetischer Gradient in einer Richtung angelegt und dieser anschließend für einen anderen Zeitraum umgekehrt. In der typischen Gradientenechosequenz wird bereits während des 90° Anregungspulses ein solcher Gradient eingesetzt, um bestimmte Protonen im Körper selektiv anzuregen. Die dadurch entstandenen Phasenwinkel der angeregten Protonen

werden durch den umgekehrt gepolten Gradienten wieder zusammengeführt, so dass die Phasenkohärenz wiederhergestellt wird, was sich in einer Zunahme der M_{xy} -Magnetisierung äußert und schließlich in einem Maximum gipfelt. Der Auslesezeitraum, also die zur Bildkonstruktion nötige Signaldetektion, beinhaltet dieses Signalmaximum, welches als Echo bezeichnet wird. Entscheidend ist, dass das Gradientenecho in allen Bildgebungssequenzen immer enthalten ist und beim im Folgenden diskutierten Spinecho überkompensiert wird. Die Wirkung eines Gradienten ist der in 2.2.1 diskutierten Wirkung der in der Zeitkonstante T_2' zusammengefassten stationären Feldinhomogenitäten vergleichbar. Das ist der Grund für die Reversibilität des durch sie bewirkten Signalverlusts.

Für das Signal in einer Spinecho-Sequenz zeigt sich folgende Abhängigkeit von der Echozeit T_E ^[25]:

$$S(T_E) = \rho_0(1 - e^{-TR/T_1})e^{-TE/T_2} \quad (\text{Gl. 2.18})$$

Beim Spinecho erfolgt derselbe Einsatz von Gradientenfeldern wie beim Gradientenecho-Verfahren. Der für den Signalverlauf entscheidende Unterschied liegt im Einsatz der 180° Refokussierungspulse. Kurz nach der Schaltung der zur Ortsauflösung nötigen Gradienten wird von der Senderspule ein 180° -Puls in den untersuchten Bereich eingestrahlt (nach einer Zeit von $T_E/2$ nach dem 90° Anregungspuls). Dieser bewirkt eine Inversion der Phasenwinkel der mit unterschiedlichen Larmorfrequenzen rotierenden Spinpakete (T_2' -Anteil). Durch diesen Puls werden die durch die stationären Inhomogenitäten (B_0 und gewebeintrinsische) und Gradientenfelder bewirkten Unterschiede in den Larmor-Frequenzen kompensiert. Das gemäß des FID abgefallene Signal schwillt daraufhin bis zur Echozeit T_E wieder an und fällt nach dem Echo wieder ab. Dieser Prozess kann durch das Einstrahlen weiterer 180° -Pulse in einem Multispinecho-Verfahren beliebig oft wiederholt werden. Da das Spinecho in der Lage ist, die stationären (T_2'), nicht aber die z.B. durch Diffusion bewirkten fluktuierenden (T_2) Inhomogenitäten zu kompensieren, fällt die Einhüllende der Echos exponentiell mit der Zeitkonstante T_2 ab (Abb. 2.8).

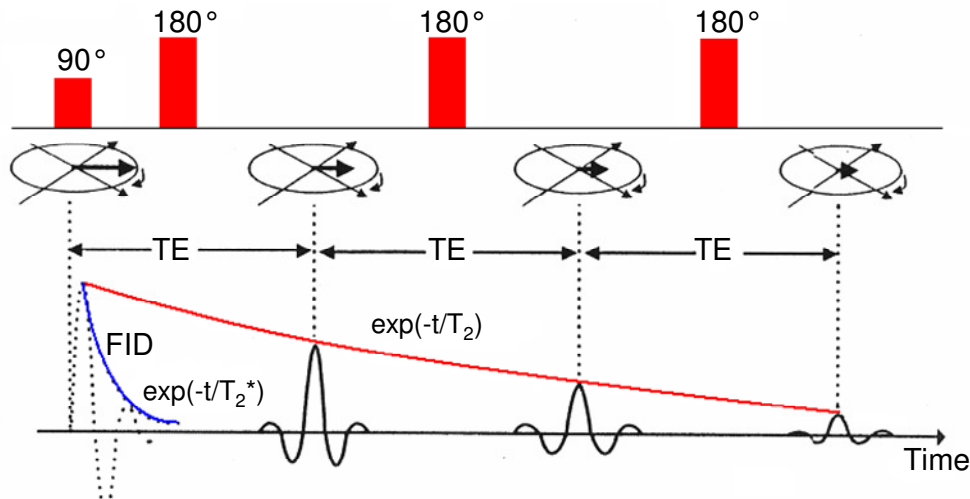


Abb. 2.8: Schematische Darstellung des klassischen Spinecho-Experiments zur Kompensation der stationären Feldinhomogenitäten. Das Spineecho refokussiert auch den durch die Gradientenbeschaltung bewirkten Signalverlust.

Der für die Bildkonstruktion verwendete Auslesevorgang erfolgt sowohl im Gradientenecho als auch im Spinecho üblicherweise zur Zeit des ersten Echos. Anschließend (nach der Zeit TR) wird die komplette Sequenz mit dem Einstrahlen des nächsten 90° Pulses mehrfach wiederholt. Für diesen 90° Puls steht aber nur der Teil der longitudinalen Magnetisierung M_z zur Verfügung, der durch die T_1 -Relaxation bereits wieder die Gleichgewichtslage erreicht hat. Dieser Sachverhalt wird in Gl. 2.17 und Gl. 2.18 durch die entsprechenden Faktoren $(1 - \exp(-TR/T_1))$ ausgedrückt. Dadurch führen große T_1 -Zeiten häufig zu einer langen Messdauer, weil hohe Wiederholzeiten TR gewählt werden müssen.

Die T_2 -gewichtete Bildgebung ist gegenüber der T_2^* -gewichteten weniger artefaktanfällig und liefert höhere Auflösungen. Dafür ist das Spinecho-Verfahren zeitlich aufwändiger. Außerdem werden kontrastverbessernde intrinsische Suszeptibilitätsunterschiede kompensiert.

Die genaue Natur der zur dreidimensionalen Ortsauflösung nötigen Gradientenfelder (Schichtselektion, Frequenzkodierung und Phasenkodierung) wird in 2.2.3 ausführlich beschrieben.

2.2.3 Tomographische Bildgebung

Bisher wurden die Grundlagen der Kern-Resonanz beschrieben und diskutiert, wie es zu einem messbaren Signal kommt. Um aber eine orts aufgelöste Bildgebung zu ermöglichen, müssen die NMR Signale der Protonen im Körper Ortskoordinaten zugeordnet werden. Der

Schlüsselschritt dazu ist, dass verschiedene Regionen im Körper unterschiedliche magnetische Feldstärken erfahren. Dadurch wird jeder dieser Regionen eine eigene Larmorfrequenz zugeordnet, was sie beispielsweise selektiv anregbar macht.

Die Ortsauflösung soll hier am Beispiel der Schichtselektion kurz dargestellt werden. Um eine Ortsabhängigkeit der Larmorfrequenz in z-Richtung zu erreichen, wird in dieser Richtung ein magnetischer Feldgradient G_z angelegt, der das statische Feld B_0 überlagert (Abb. 2.9). Dadurch gilt für die Larmorfrequenz:

$$\omega(z) = \gamma \cdot B(z) = \gamma \cdot (B_0 + G_z z) \quad (\text{Gl. 2.19})$$

Dieser Feldgradient wird durch eine zusätzliche Spule verursacht, welche das Magnetfeld in z linear ändert.

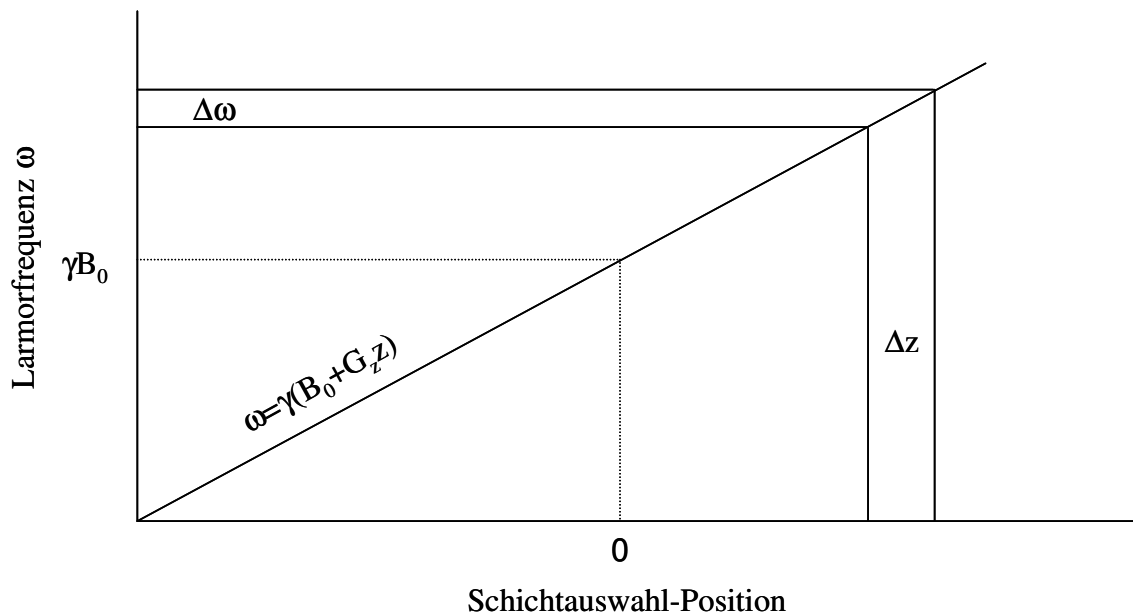


Abb. 2.9: Schematische Darstellung der selektiven Anregung von Protonen in der Schicht Δz durch Anlegen eines Magnetfeldgradienten G_z .

Jetzt wird ein Radiofrequenz-Puls eingestrahlt, der alle Protonen, die eine Larmorfrequenz im Intervall $\Delta\omega$ besitzen, anregt. Die Frequenzbreite $\Delta\omega$ korreliert dabei mit der Schichtdicke Δz , wie in Abb. 2.9 dargestellt. Da der Puls alle zu anderen Ortskoordinaten gehörigen Larmorfrequenzen nicht enthält, werden diese nicht angeregt und tragen somit zur Bildgebung nicht bei. Dieser Vorgang wird daher auch als Schichtselektion bezeichnet. Nach der Schichtselektion wird zur Auflösung der y-Koordinate ein Phasenkodiergradient angelegt. Die weiterhin notwendige Auflösung in x-Richtung erfolgt über den Frequenzkodiergradienten. Als Beispiel sind in Abb. 2.10 MR-Bilder einer Maus in sagittaler und transversaler

Schichtung dargestellt. In den Bildern sind einzelne Regionen bzw. Blutgefäße durch unterschiedliche Helligkeiten gut erkennbar. So zeichnen sich in b beispielsweise die große Hohlvene und weitere Gefäßstrukturen durch eine hohe Helligkeit aus, wohingegen der Magen durch eine geringe Signalintensität gekennzeichnet ist und somit dunkel erscheint.

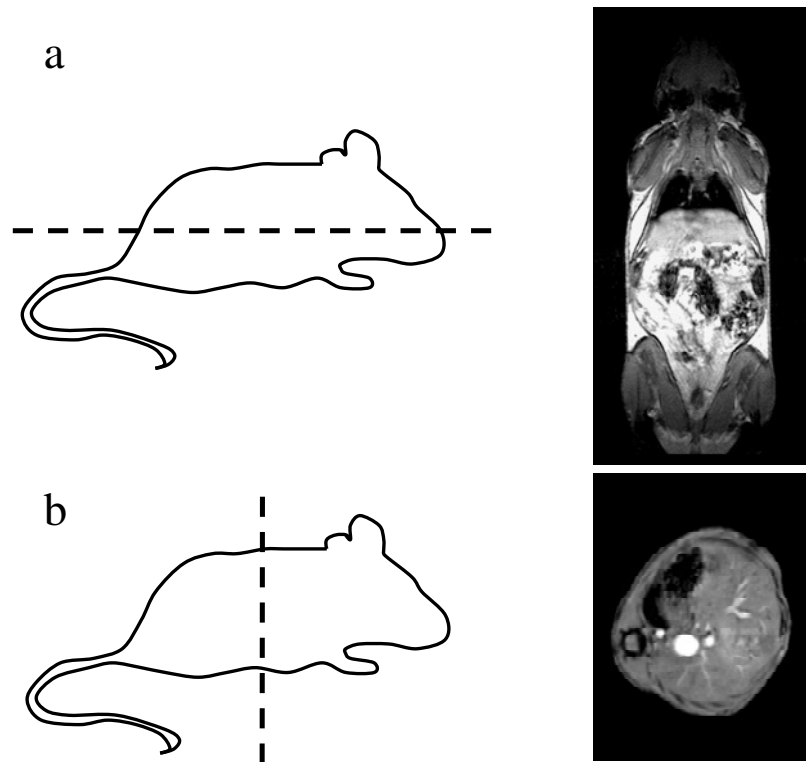


Abb. 2.10: Sagittales (a) bzw. transversales (b) MR-Bild einer Maus. Unterschiedliche Gewebe und Organe oder Blutgefäße sind durch unterschiedliche Signalintensitäten (Helligkeiten) deutlich voneinander unterscheidbar.

2.2.4 Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie

Das NMR Signal eines Gewebes und somit auch der Kontrast zwischen verschiedenen Regionen ist im Wesentlichen durch die intrinsischen Parameter Protonendichte und Relaxationszeit charakterisiert. Durch Bildgebungssequenzen können diese Parameter unterschiedlich gewichtet werden. In bestimmten Fällen ist trotzdem der Einsatz von Kontrastmitteln erforderlich, um bestimmte Regionen oder Gewebe deutlich voneinander abzugrenzen. Ein solches Kontrastmittel verändert das MR-Signal im Bereich seiner Akkumulation. Daher sollte das Ziel einer Kontrastmittelapplikation immer seine selektive Anreicherung im gewünschten Bereich sein, um dort das Signal zu verändern. Nur so ist eine Kontrastverbesserung zum umliegenden Gewebe möglich, dessen Signal unverändert bleibt.

Die Wirkung eines Kontrastmittels besteht allgemein in der Verkürzung der T_1 - oder T_2/T_2^* -Relaxationszeiten. Die zur Kontrastmittelapplikation verwendete Sequenz ist also entweder T_1 - oder T_2 -gewichtet. Grundsätzlich lassen sich Kontrastmittel in zwei Typen unterscheiden. Positive Kontrastmittel verkürzen die longitudinale Relaxationszeit T_1 . In den gängigen Bildgebungssequenzen führt das zu einer Signalzunahme. Dadurch erscheint das Bild in der betrachteten Region hell. Konventionelle T_1 -Kontrastmittel bestehen aus paramagnetischen Chelaten der Ionen Gadolinium(III) oder auch Mangan(II). Wichtig ist hier, dass die parallel zur T_1 -Verkürzung stattfindende T_2 -Verkürzung minimiert wird, da es sonst zur Signalauslöschung kommt. Negative Kontrastmittel bewirken eine drastische Verkürzung der transversalen Relaxationszeiten T_2 und T_2^* . Dieser Effekt überwiegt den trotzdem vorhandenen T_1 -Effekt deutlich. Diese T_2/T_2^* -Kontrastmittel führen zu einer signifikanten Signalreduktion im Bereich ihrer Akkumulation und erzeugen somit ein dunkles Bild. Negative Kontrastmittel bestehen aus superparamagnetischen Eisenoxid Partikeln (SPIO) und finden seit 20 Jahren klinische Anwendung. Es handelt sich dabei allerdings um Systeme, die durch breite Teilchengrößenverteilungen, hohe Tendenz zur Aggregatbildung und ein geringes Maß an biologischer Spezifität gekennzeichnet sind. Trotzdem lassen sie sich gemäß ihres hydrodynamischen Durchmessers in verschiedene Klassen unterteilen^[28].

Um die Effektivität eines Kontrastmittels quantitativ zu beschreiben, werden die Relaxivitäten wie folgt eingeführt:

$$\frac{1}{T_i} = \frac{1}{T_{i,0}} + r_i[CA] \equiv R_i = R_{i,0} + r_i[CA] \quad (\text{Gl. 2.20})$$

Dabei sind T_i die entsprechenden Relaxationszeiten, R_i die Relaxationsraten, $[CA]$ die Kontrastmittelkonzentration und r_i die Relaxivitäten. Letztere beschreiben die Verkürzung der Relaxationszeit pro Konzentrationseinheit und sind auf Grund des linearen Zusammenhanges konzentrationsunabhängige Werte. In der weiteren Diskussion werden daher nur noch die Relaxivitäten zur Beschreibung der Kontrastmittel verwendet.

Die Relaxivität eines Kontrastmittels setzt sich grundsätzlich aus zwei Beiträgen zusammen^[29, 30]. Die *inner-sphere* Relaxivität r_i^{IS} berücksichtigt Beiträge durch Wassermoleküle, die direkt an das Kontrastmittel gebunden sind. Sie ist ein wichtiger Beitrag bei der Behandlung von T_1 -Kontrastmitteln wie der paramagnetischen Gd-Komplexe. Die *outer-sphere* Relaxivität r_i^{OS} erfasst die Relaxation der Protonen von Wasser-Molekülen, die in der Umgebung diffundieren. Sie stellt den wichtigsten Beitrag bei der Behandlung von T_2 -Kontrastmitteln, wie etwa der oben beschriebenen SPIO, dar. Das große magnetische Moment

eines superparamagnetischen Nanopartikels ist dafür verantwortlich, dass der magnetische Wirkradius deutlich größer ist als bei einem einzelnen paramagnetischen Ion. Für ein superparamagnetisches Partikel hängt der *outer-sphere* Beitrag zur transversalen Relaxation von zahlreichen Parametern ab. Es gilt:

$$\frac{1}{T_2} = \frac{64\pi}{135} \left(\frac{\mu_0 \gamma}{4\pi} \cdot \mu_p N_g L(x) \right)^2 \cdot \frac{N_A}{R_H D} [CA] \quad (\text{Gl. 2.21})$$

N_g beschreibt die Zahl der Partikel in einem Aggregat, μ_p das magnetische Moment eines einzelnen Partikels, R_H den hydrodynamischen Radius und D den Diffusionskoeffizienten. $L(x)$ ist die Langevin-Funktion (vgl. 2.1.1) und gibt an, ob das System bis zur Sättigungsmagnetisierung magnetisiert ist, was für kleine Teilchen bei gängigen Feldstärken (1-2 T) nicht notwendigerweise der Fall ist. Gl. 2.21 zeigt, dass für die Konstruktion neuartiger Negativ-Kontrastmittel sowohl materialintrinsische Parameter wie die Zusammensetzung als auch Größe und Form präzise einstellbar sein müssen. Wie in 2.1.5 erläutert wurde, hängt die Sättigungsmagnetisierung M_s sehr stark von der Teilchengröße ab. Die r_2 -Relaxivität wiederum wird direkt über M_s bestimmt. Zusammensetzung, Form und Größe werden heute durch organometallische Hochtemperatursynthesen auch für Eisenoxid und andere Ferrite oder Metall-Nanopartikel zielgenau eingestellt. Ein weiterer Schlüsselaspekt ist die Aggregation der Partikel, welche idealerweise verhindert oder nach Möglichkeit ebenfalls kontrollierbar sein sollte. Dazu wurden verschiedene Strategien entwickelt, um hydrophobe, durch organometallische Hochtemperatursynthese hergestellte Nanopartikel in wässrige Lösung zu überführen. Eine vollständige Verhinderung der Aggregation ist insbesondere für die Entwicklung von positiven Kontrastmitteln notwendig, da die r_2 -Relaxivität hierfür begrenzt werden muss.

Die kontrollierte Aggregation von Partikeln etwa in Mizellen gilt als viel versprechender Ansatz bei der Entwicklung von negativen Kontrastmitteln^[31-35]. Der Relaxivitätskoeffizient r_2 steigt dabei stark an. Grundsätzlich stehen verschiedene Theorien zur Verfügung, welche die transversale Relaxation von Protonen in Anwesenheit magnetischer Partikel beschreiben. Diese sind schematisch in Abb. 2.11 dargestellt. Für relativ kleine Partikel gilt das Motional Averaging Regime (MAR), für das auch die in Gl. 2.21 angegebene Relaxationsformel gilt. Ein Größenanstieg bewirkt hier einen Anstieg in der transversalen Relaxivität, was durch die Diffusionskorrelationszeit $\tau = r^2/D$ ausgedrückt wird. Der Phasenverlust der Protonen wird in dieser Theorie durch irreversible Diffusionseffekte bewirkt. Der hierdurch bewirkte Signalverlust wird durch die Refokussierungspulse einer Spinecho-Sequenz nicht wieder

hergestellt. Dadurch sind die Relaxivitäten r_2 und r_2^* im MAR gleich. Bei weiterer Größenzunahme des magnetischen Partikels kommt es ab eines bestimmten Radius zu keiner weiteren Steigerung der Relaxivitäten r_2 und r_2^* . An diesem Punkt ist der Wirkradius des magnetischen Partikels so groß, dass Diffusion keinen Einfluss mehr auf den Signalverlust hat. Die Wassermoleküle werden hier als statisch betrachtet. In diesem Größenbereich wird die Protonenrelaxation durch das Static Dephasing Regime (SDR) beschrieben. Das Kontrastmittel verursacht im Bereich des SDR den maximalen T_2^* -Beitrag. Daher gibt das SDR eine Obergrenze für die transversale Relaxivität an, also die mit dem Partikel maximal erreichbare Effektivität des Kontrastmittels.

Bei weiterer Größenzunahme geht das System schließlich ins Echo-Limiting Regime (EL) über. In diesem Bereich nimmt die in Spinecho-Sequenzen eingehende Relaxivität r_2 ab, wohingegen die für den Signalverlauf einer Gradientenecho-Sequenz charakteristische Relaxivität r_2^* gleich maximal bleibt. Der Grund für die Abnahme der Relaxivität r_2 liegt in der Reversibilität des durch die stationären Inhomogenitäten verursachten Signalverlusts. Je kürzer in der Spinecho-Sequenz die Echozeiten T_E gewählt werden, desto größer wird der refokussierbare Anteil des Signals. Dadurch wird die Relaxationszeit T_2 größer.

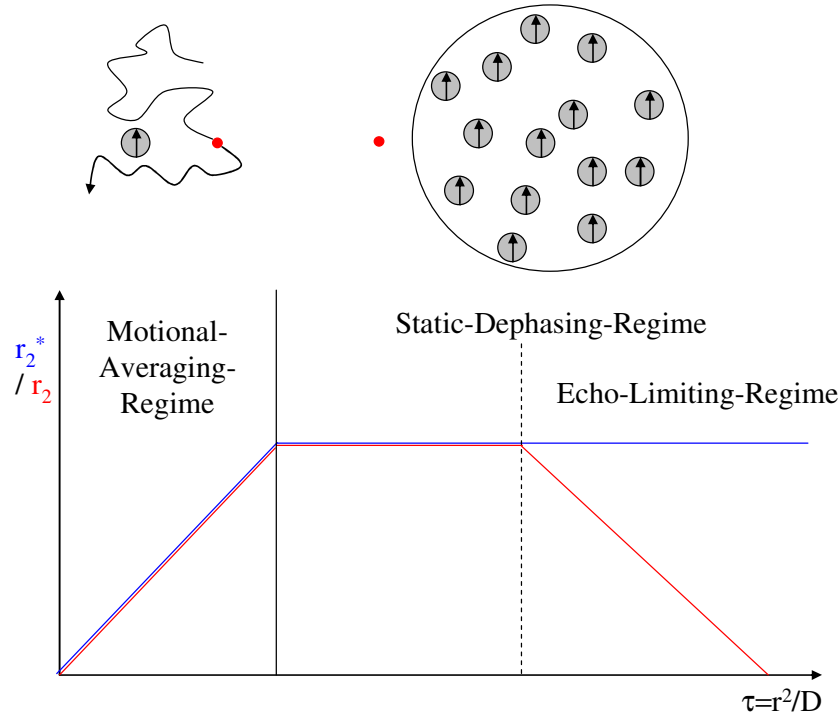


Abb. 2.11: Darstellung der verschiedenen theoretischen Bereiche zur Beschreibung der transversalen Relaxivitäten r_2 und r_2^* in Abhängigkeit von der Diffusionskorrelationszeit τ im MAR, SDR und EL.

In 2.2.2 wurde erläutert, dass in den typischen Bildgebungssequenzen das detektierbare Signal sowohl eine Funktion der longitudinalen Relaxation als auch der transversalen Relaxation ist. Daher müssen auch bei der Charakterisierung der Kontrastmittel immer beide Prozesse berücksichtigt werden. Für die Entwicklung eines positiven Kontrastmittels ist es neben einer möglichst hohen r_1 -Relaxivität wichtig, dass die r_2 -Relaxivität minimiert wird. Gemäß Gl. 2.21 wird das erreicht, indem Aggregation verhindert wird und das magnetische Moment pro Partikel μ_P nicht zu große Werte annimmt. Ein negatives Kontrastmittel, welches in Spinecho-Sequenzen eingesetzt werden soll, sollte im für das SDR gültigen Größenbereich liegen. Negative Kontrastmittel für Gradientenecho-Sequenzen sollten ebenfalls durch das SDR beschreibbar sein. In Kombination mit biologischer Spezifität ist es hier möglich, Stoffwechsel-Kinetiken zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auf Basis superparamagnetischer Nanopartikel optimierte Kontrastmittel für die T_1 -, T_2 - und T_2^* -gewichtete Bildgebung entwickelt und somit alle beschriebenen Aspekte beachtet und diskutiert.

3 Experimenteller Teil

3.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht ausdrücklich erwähnt, ohne zusätzliche Aufreinigung in der höchsten erhältlichen Reinheit eingesetzt. Im Anhang sind alle Chemikalien mit ihren Sicherheitshinweisen aufgeführt.

3.2 Synthese von Ferrit-Nanopartikeln

3.2.1 Synthese von Fe₃O₄-Nanopartikeln

Es wurden drei alternative Vorschriften verwendet, um die Größe der Nanopartikel zu variieren.

Nach Sun *et al.*^[36-38] wurden zur Synthese von 4 nm großen Nanopartikeln 700 mg (2 mmol) Eisen-trisacetylacetonat, 1.7 g (6.0 mmol) Ölsäure, 1.6 g (6.0 mmol) Oleylamin, 2.6 g (10 mmol) 1,2-Hexadekandiol und 20 ml Diphenylether unter einem N₂-Strom für 30 min auf 200 °C geheizt. Anschließend wurde unter N₂-Atmosphäre für weitere 30 min auf ~270 °C erhitzt. Dann wurde auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die Synthese von 6 nm großen Partikeln erfolgte in Dibenzylether. Dabei wurde für 2 h auf 200 °C und für 1 h auf ~300 °C erhitzt.

Die Darstellung von 10 nm großen Teilchen erfolgte nach Hyeon *et al.*^[39] Unter N₂-Atmosphäre wurden 1.28 g (4.56 mmol) Ölsäure und 10 ml Dioctylether auf 100 °C erhitzt. Anschließend wurden 0.2 ml (1.5 mmol) Eisenpentacarbonyl schnell in die Lösung injiziert und diese für 1 h bei 300 °C refluxiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 0.34 g (4.5 mmol) Trimethylamin-*N*-oxid zugesetzt und das Reaktionsgemisch für 1 h auf 130 °C geheizt. Dann wurde für 1 h bei ~300 °C refluxiert und auf Raumtemperatur abgekühlt.

Für die Synthese größerer Teilchen (20-30 nm) wurde die Synthese von Yu *et al.*^[40] verwendet. Dabei wurden 0.18 g (2.0 mmol) Eisen(III)oxyhydroxid mit 2.3 g (8.0 mmol) Ölsäure und 5.0 g 1-Octadecen versetzt und unter N₂-Atmosphäre für 1 h auf 320 °C erhitzt. Die Größenvariation erfolgte über das Verhältnis von Ölsäure zu Eisen(III)oxyhydroxid.

3.2.2 Synthese von MnFe_2O_4 Nanopartikeln

Nach Kang *et al.*^[41] wurden 170 mg (0.45 mmol) Decacarbonyl-dimangan und 2.3 ml (7.3 mmol) Ölsäure in 10 g Dioctylether gelöst und unter N_2 -Atmosphäre auf 130 °C erhitzt. Unter intensivem Rühren wurden 0.2 ml (1.5 mmol) Eisenpentacarbonyl schnell in die Lösung injiziert. Dann wurde für 1 h auf 300 °C erhitzt und zügig auf ~50 °C abgekühlt. Anschließend wurden 0.34 g (4.5 mmol) Trimethylamin-N-oxid zugegeben und das Reaktionsgemisch für 1 h auf 140 °C erhitzt. Dann wurde erneut 1 h bei ~300 °C refluxiert.

3.2.3 Aufreinigung der Nanopartikel

Die Nanopartikel wurden zunächst mit ~50 ml Fällungsmittel (Ethanol oder Aceton) versetzt und zentrifugiert (10 min, 3260g). Der Überstand wurde verworfen und der Rückstand in 5 ml Lösungsmittel (Hexan oder Chloroform) dispergiert. Dann wurden erneut ~30 ml Fällungsmittel zugegeben und zentrifugiert (10 min, 3260g). Der schwarze Niederschlag wurde in 5 ml Hexan oder Chloroform gelöst, durch einen 0.2 µm PTFE Spritzenfilter filtriert und dann als kolloidale Lösung gelagert.

3.3 Synthese der Polyethylenglykol-Liganden

3.3.1 Veresterung von Polyethylenglykol-monomethylether mit POCl_3

Zur Phosphatesterbildung wurden 5 mmol des entsprechenden Polymers im Vakuum bei 80 °C 1 h gerührt um Spuren von Wasser zu entfernen. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 15 ml Tetrahydrofuran zugegeben und die Lösung mit einem Eisbad gekühlt. Unter intensivem Rühren wurden 0.6 ml POCl_3 zugegeben, wobei darauf zu achten war, dass die Temperatur nicht über 5 °C stieg. Die klare Lösung wurde anschließend 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Wasser beendet und das Rohprodukt dreimal mit je 15 ml Chloroform extrahiert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt im Vakuum getrocknet.

3.3.2 Veresterung von Polyethylenglykol-monoacrylat mit POCl_3

Die Veresterung erfolgte analog der in 3.3.1 beschriebenen. Allerdings wurden dem Reaktionsgemisch vor der Phosphorylierung 0.9 ml Triethylamin zugesetzt, um eine Spaltung des Acrylsäureesters zu verhindern.

3.3.3 Synthese von Polyethylenglykol-Liganden mit Carbonsäure-Ankergruppe

Zur Micheal-Addition wurden 2.5 mmol Polyethylenglykol-monoacrylat mit 2.5 mmol 3-Merkaptopropionsäure oder 2-Merkaptobernsteinsäure und 7.5 mmol N-Ethyl-diisopropylamin versetzt. Anschließend wurde das Gemisch ~5 ml in einer Lösung aus Methanol und Chloroform (80:20, V/V) für ~24 h auf 40 °C erhitzt. Das Rohprodukt wurde durch Zugabe von Diethylether gefällt und im Vakuum getrocknet.

3.4 Ligandenaustausch-Reaktionen

3.4.1 Ligandenaustausch mit Phosphat-funktionalisiertem Polyethylenglykol

10 mg der entsprechenden Nanopartikel wurden in 0.3 ml Tetrahydrofuran dispergiert. Parallel dazu wurden 50 µl des Polymers in 1 ml einer 0.05 M Kaliumhydroxidlösung gelöst. Beide Ansätze wurden vereinigt und für ~12 h auf 60 °C erhitzt. Das Tetrahydrofuran wurde nach dem Abkühlen im N₂-Strom verdampft und die so erhaltene wässrige Lösung durch einen 0.2 µm PTFE Spritzenfilter filtriert. Zur weiteren Aufreinigung und um das überschüssige Polymer zu entfernen, wurde die Probe dreimal mittels eines Vivaspin 10000 MWCO Zentrifugenfilters bei 4000g aufkonzentriert und verdünnt.

3.4.2 Ligandenaustausch mit Carboxylat-funktionalisiertem Polyethylenglykol

10 mg der Nanopartikel wurden in 0.2 ml Dichlorbenzol gelöst. 100 mg des Liganden wurden in 0.2 ml Dimethylsulfoxid gelöst. Die beiden Lösungen wurden vereinigt und unter Rühren für ~24 h auf 100 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Teilchen durch Zugabe von 0.3 ml Ethanol, 0.05 ml Chloroform und ~1 ml n-Hexan gefällt und zentrifugiert (10 Minuten, 4000g). Anschließend wurden die Teilchen in ~1 ml Wasser gelöst. Die weitere Aufreinigung wurde wie in 3.4.1 beschrieben durchgeführt.

3.5 Zytotoxizitäts-Untersuchungen

Um die Zytotoxizität von Nanopartikeln zu untersuchen, wurden verschiedene Zelllinien verwendet, um die typischen Aufnahmewege anorganischer Nanopartikel zu erfassen. In dieser Arbeit wurden A549 Lungenkrebszellen, humane Fibroblasten, CaCo-2 Darmzellen sowie murine J774 Makrophagen verwendet. Als etablierte Zelltests wurden MTT-, Wst-8-, LDH- und ROS-Tests durchgeführt. Die Wst-8-, LDH-, und ROS-Tests wurden im Zentrum für Angewandte Nanotechnologie (CAN) durchgeführt und werden hier nicht näher beschrieben. Der MTT-Test sowie die Zellfärbung wurden am Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf in der Gruppe von Prof. Dr. Ulrike Beisiegel (Institut für Molekulare Zellbiologie) durchgeführt.

3.5.1 Untersuchungen an J774-Makrophagen mittels MTT

Murine Makrophagen (J774) wurden im 96 Well-Mikrotiterplatten-Maßstab in einer Konzentration von 10^4 Zellen pro Well in RPMI 1640 + Glutamax mit 10 % FCS, 25 mM Hepes und 0.5 % Penicillin-Streptomycin kultiviert. Die Eisenoxid-Nanopartikel wurden aus konzentrierter wässriger Lösung so zugegeben, dass die Eisenkonzentration in den Wells 200 µg/ml, 20 µg/ml, 2 µg/ml oder 0,2 µg/ml betrug. Die Inkubationszeit der Ansätze betrug 24 h. Das Inkubationsmedium wurde dann entfernt und durch neues ersetzt, welches 0.5 mg/ml MTT enthielt. Die Zellen wurden weitere 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium erneut entfernt und die Zellen mit DMSO lysiert. Die Absorption wurde bei 540 und 620 nm gemessen.

3.5.2 Berliner Blau-Zellfärbung an J774-Makrophagen

Die Makrophagen wurden mit einer Dichte von 50000 Zellen pro Well im 24-Well-Platten-Ansatz in RPMI 1640 + Glutamax mit 10 % FCS, 25 mM Hepes und 0.5 % Penicillin-Streptomycin auf Deckgläschen aus Glas kultiviert. Um die Konzentrationsabhängigkeit der unspezifischen Aufnahme von Eisenoxid-Nanopartikeln zu untersuchen, wurden die Teilchen aus konzentrierter Lösung so zugegeben, dass drei verschiedene Inkubationskonzentrationen erreicht wurden (200 µg/ml, 20 µg/ml und 2 µg/ml). Die Zellen wurden 24 h mit den Nanopartikeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Zur intrazellulären Eisenfärbung wurden die Zellen bei 37 °C mit 2 ml einer Lösung aus gleichen

3 Experimenteller Teil

Volumenanteilen von 2 % Salzsäure und 2 % Kalium-hexacyanoferrat(II)-trihydrat-Lösung versetzt und 30 min inkubiert. Abschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen.

3.6 Charakterisierungsmethoden

3.6.1 Transmissionselektronenmikroskopie (high resolution transmission electron microscopy (HRTEM))

Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Philips CM-300 UT Mikroskop bei 300 kV und alternativ an einem Jeol JEM-1011 bei 100 kV vorgenommen.

Zur Messung wurde eine verdünnte Dispersion der Nanopartikel in ca. 0.5 ml Lösungsmittel hergestellt. Von dieser Dispersion wurden 10 µl auf einen mit amorphem Kohlenstoff beschichteten Kupfer-Träger aufgetragen und das Lösungsmittel abgezogen. Der Träger wurde anschließend mindestens 24 h an der Luft getrocknet.

3.6.2 Pulver-Röntgendiffraktometrie (powder X-ray diffraction (XRD))

Die Pulver-Röntgendiffraktometrie wurde an einem Philips X'Pert-Diffraktometer mit Bragg-Brentano-Geometrie gemessen. Dabei wurde Kupfer-K_α-Strahlung (Wellenlänge λ=0.154 nm) verwendet. Da Proben aus kristallinen Nanopartikeln eine größenabhängige Linienverbreiterung der Reflexe im Diffraktogramm bewirken, wurde zur Größenbestimmung die Debye-Scherrer-Gleichung herangezogen. Für die Linienbreite in Höhe der halben Maximalintensität gilt^[42]:

$$H_B = \frac{K \cdot \lambda \cdot 57.3}{D \cdot \cos \theta} \quad (\text{Gl. 3.1})$$

In Gl. 3.1 ist H_B die Reflex-Halbwertsbreite, K der Formfaktor (K≈0.89 für sphärische Teilchen) und D der Durchmesser der kristallinen Domänen oder der Teilchen, falls diese einkristallin sind.

Die Proben wurden vorbereitet, indem einige Tropfen einer konzentrierten Dispersion der Nanopartikel auf einen Silizium-Träger aufgetragen wurden.

3.6.3 Foner-Probenvibrationsmagnetometrie

Die Magnetometermessungen wurden auf einem Probenvibrationsmagnetometer (Princeton, Model 155, Magnet: Bruker B-E 25C 8u) durchgeführt. Für eine typische Messung wurden 15-20 mg der Nanopartikel eingewogen. Die magnetische Feldstärke wurde zwischen 0 und 1 T variiert.

3.6.4 Infrarot-Spektroskopie (IR)

Zur Untersuchung der Oberflächenbeschichtung der Nanopartikel wurde ein Bruker Equinox 55 FT-IR-Spektrometer verwendet. Dazu wurde eine ATR (attenuated total reflectance) Einheit verwendet. Die kolloidale Lösung wurde auf die Diamantzelle getropft und eingetrocknet.

3.6.5 Thermogravimetrie (TG)

Die Thermogravimetriemessungen wurden auf einem Netzsch TG 209 F1 durchgeführt. Dabei wurden 5 mg Trockenmasse der zu untersuchenden Probe in einem Al_2O_3 -Tiegel eingetrocknet. Die Probe wurde mit einer Heizrate von 10 K/min bis auf 900 °C aufgeheizt und der Massenverlust detektiert. Bei 900 °C wurde die Temperatur zunächst 30 min unter N_2 -Strom (20 ml/min) und dann unter N_2/O_2 -Strom (20 ml/min) 15 min gehalten.

3.6.6 Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)

Die ^1H -NMR Spektren wurden mit einem Bruker AMX400 Spektrometer bei einer Frequenz von 400 MHz aufgenommen. Alternativ wurde auf einem Bruker DRX500 Avance Spektrometer bei 500 MHz gemessen. Die Vorbereitung der Proben erfolgte, indem ~10 mg Substanz in 0.7 ml deuteriertem Lösungsmittel (Chloroform- d_1 oder DMSO- d_6) gelöst wurden. Zur Auswertung der Spektren wurde das Programm MestRe-C (4.7.0.0) verwendet.

3.6.7 Gel-Filtrations-Chromatographie (GFC)

Die Gel-Filtrations-Chromatographie wurde auf einer Superose-6 10/300 GL Säule (Amershan Bioscience) bei einem Fluss von 0.5 ml/min durchgeführt.

Zur Eisenbestimmung^[43] in den Fraktionen wurden 200 μl jeder Fraktion mit 50 μl 5 M Salzsäure versetzt und bei 70 °C 30 min inkubiert. Anschließend wurden von jeder so behandelten Fraktion 50 μl entnommen und mit 150 μl einer 2 M Acetat-Pufferlösung (pH=4.8), die 10 % Ascorbinsäure enthielt, versetzt. Dann wurden 100 μl einer Bathophenanthrolin-Lösung (1 mg/ml) zugesetzt. Nach 15 min Inkubation wurde bei 540 nm die Absorption gemessen.

3.6.8 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die dynamische Lichtstreuung wurde an einem Malvern Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 bei einer Laser-Wellenlänge von 633 nm durchgeführt. Dispersionen in organischen Lösungsmitteln wurden in Quarzglasküvetten, wässrige Lösungen in Plastikkuvetten bei einer optischen Weglänge von 1 cm vermessen. Zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers wurde die Autokorrelationsfunktion pro Messung über drei Zyklen je 30 s aufgenommen und aus drei Messungen der Mittelwert gebildet. Die Proben wurden vor der Messung durch einen 0.2 µm PTFE-Spritzenfilter filtriert.

3.6.9 Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)

Die Atomabsorptionsspektroskopie wurde mit einem Perkin-Elmer Graphitrohr AAS 4100 mit HGA 700 Heizeinheit am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in der Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie II durchgeführt. Die anorganischen Nanopartikel wurden dazu in einem Gemisch aus Salpetersäure 65 % (w/V) und Wasserstoffperoxid 30 % (w/V) nassverascht.

3.6.10 Kernresonanz-Relaxometrie

Zur Bestimmung von T_1 - und T_2 -Relaxationszeiten wurde ein minispec mq-60 NMR Analyzer von Bruker bei einer magnetischen Flussdichte von 1.41 T verwendet.

Die Messung der T_1 -Relaxationszeit erfolgte über eine Inversion-Recovery-Sequenz bei 20 nicht-äquidistanten Verzögerungszeiten T_I zwischen dem Inversionspuls (180°) und dem 90° -Detektionspuls (üblicherweise $T_I=5-400$ ms). Die erhaltenen Datenpunkte wurden mit der Gleichung $M(T_I)=M_0(1-\exp(-T_I/T_1))$ gefittet. Dabei ist $M(T_I)$ die Signalintensität zur Zeit T_I , M_0 die Gleichgewichtssignalintensität vor dem Inversionspuls und T_1 die longitudinale Relaxationszeit.

T_2 wurde mittels einer Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) Spin-Echo-Sequenz gemessen. Dabei wurden 200 äquidistante Datenpunkte ($t=nT_E=2n\tau$) als vielfaches der Echozeit T_E aufgenommen. τ ist das Zeitintervall zwischen dem 90° -Anregungspuls und dem ersten 180° -Refokussierungspuls. Die erhaltenen Datenpunkte wurden als monoexponentieller Abfall über die Gleichung $M(t=nT_E)=M_0 \exp(-t/T_2)$ gefittet, wobei $M(t=nT_E)$ die Signalintensität zur Zeit t und T_2 die transversale Relaxationszeit ist.

3.6.11 Magnetresonanztomographie (MRT)

Alle dynamischen und statischen MRT-Untersuchungen wurden an einem klinischen 3T Ganzkörper Magnetresonanztomographen (Philips Medical Systems) in der Gruppe von Prof. Dr. Gerhard Adam in der Abteilung für Klinische und Interventionelle Radiologie, Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf, durchgeführt. Die dynamischen Messungen der Leber wurden mittels Gradientenecho-Sequenz bei einer Voxel Auflösung von $0.28 \times 0.33 \times 2 \text{ mm}^3$ durchgeführt. Die zeitliche Auflösung betrug 5.5 s bei einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von ~ 40 . Es wurde eine T_2^* -gewichtete Bildgebung vorgenommen, d.h. es wurde davon ausgegangen, dass die zeitliche Änderung im Signal $S(t)$ hauptsächlich durch die T_2^* -Relaxation verursacht wird ($r_2^* = 800 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, $r_1 = 2.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, bei 37°C). Die Änderung der Relaxationsrate R_2^* konnte nach $\Delta R_2^* = -\ln(S(t)/S_0)/TE$ berechnet werden und korreliert linear mit der Kontrastmittelkonzentration (Nanosomen) $\Delta C = \Delta R_2^*/r_2^*$ falls r_2^* sich während der Messung nicht ändert.

4 Ergebnisse und Diskussion

Die Magnetresonanztomographie (MRT) beruht auf der kernmagnetischen Resonanz von Protonen, aus denen der menschliche Körper zu 63 % seiner Atome besteht^[25]. Für die MRT ist der Einsatz von Kontrastmitteln daher nicht in jedem Fall erforderlich. Auch wurden in den vergangenen Jahren große Fortschritte in der technischen Weiterentwicklung von Tomographen gemacht. Trotzdem ist die Applikation von Kontrastmitteln unerlässlich, wenn der untersuchte Bereich im Körper trotz optimierter Geräte und Pulssequenzen nicht klar dargestellt werden kann. Heutige klinische MR-Kontrastmittel lassen sich in zwei Klassen unterteilen. Die aus paramagnetischen Gadolinium-Komplexen bestehenden positiven Kontrastmittel führen zu einer Verkürzung der T_1 -Relaxationszeiten^[29, 30], während die aus superparamagnetischen Eisenoxid-Partikeln (sogenannte SPIO) bestehenden negativen Kontrastmittel zu einer drastischen Verkürzung der T_2 - und T_2^* -Relaxation führen^[28, 44-46].

In dieser Arbeit wurden sowohl positive als auch negative Kontrastmittel auf der Grundlage von superparamagnetischen Ferrit-Nanopartikeln, insbesondere Magnetit (Fe_3O_4) und Manganferrit (MnFe_2O_4) entwickelt. Diese Entwicklung begann mit der Synthese der anorganischen Nanopartikel. Die Größe und Zusammensetzung der Teilchen hat entscheidenden Einfluss auf die magnetischen und damit auch auf die kontrastgebenden Eigenschaften^[47, 48]. Neben dieser Einstellung der physikalischen Eigenschaften des anorganischen Kernes war die Modifizierung der Oberfläche ein wesentlicher Bestandteil der Arbeit. Diese Modifizierung umfasste das Binden von bestimmten Liganden mit dem Ziel, Aggregationseffekte sowie chemische und biologische Eigenschaften steuern zu können, was mit den heutigen klinisch angewandten Kontrastmitteln nur sehr begrenzt möglich ist. Dazu gehört die Stabilität der Partikel unter physiologischen Bedingungen, welche durch charakteristische pH-Werte, ionische Stärken und das Vorhandensein von zahlreichen Proteinen im Blutplasma gekennzeichnet sind. Für diesen Zweck wurden die Teilchen mit Polyethylenglykol (PEG) umhüllt. Der dritte Aspekt der Entwicklung neuartiger Kontrastmittel ist einerseits durch das Ziel der Kopplung von Biomolekülen zur molekularen und zellulären Bildgebung zu beschreiben. Andererseits ist ein Ziel der Entwicklung, Stoffwechselvorgänge direkt über dynamische MR-Messungen zu verfolgen, d. h. die Änderung des MR-Signals in der untersuchten Region mit der Akkumulation des Kontrastmittels und dem metabolischen Vorgang zu korrelieren. Die in dieser Arbeit beschriebene Entwicklung und Charakterisierung der Kontrastmittel wird sich allen diesen Aspekten widmen.

4.1 Synthese und Charakterisierung von Ferrit-Nanopartikeln

Heutige klinische auf Eisenoxid basierende Kontrastmittel werden in wässriger Lösung bei Raumtemperatur hergestellt. Sie sind durch eine breite Teilchengrößenverteilung, erhebliche Neigung zur Aggregation sowie ein geringes Maß an Kristallinität gekennzeichnet^[28, 46]. Ihre magnetischen und kontrastgebenden Eigenschaften sind daher nur schlecht einstellbar. Daher werden Nanopartikel nasschemisch heute durch organometallische Hochtemperatursynthesen hergestellt^[34, 37, 49, 50]. Größe, Form, Zusammensetzung, Kristallinität und Aggregationsverhalten sind dadurch deutlich besser kontrollierbar^[51-57]. Entscheidende Bedeutung kommt den Stabilisatoren zu. Stabilisatoren sind Moleküle, die über eine bestimmte funktionelle Gruppe auf der Oberfläche binden und somit ein weiteres Wachsen der Nanokristalle verhindern. Sie verhindern außerdem die Aggregation der Nanoteilchen, da sie lange organische Ketten aufweisen, die das Nanopartikel sterisch abschirmen (Abb. 4.1). Die Stabilisatoren bestimmen auch die Löslichkeit der Nanopartikel. Bei den in dieser Arbeit hergestellten Ferrit-Nanopartikeln wurde Ölsäure als Stabilisator eingesetzt, welche durch ihre Carboxylgruppe auf der Teilchenoberfläche bindet und mit ihrer langen Alkylgruppe für eine sterische Stabilisierung sowie eine Löslichkeit in unpolaren Lösungsmitteln wie Chloroform oder Hexan sorgt.

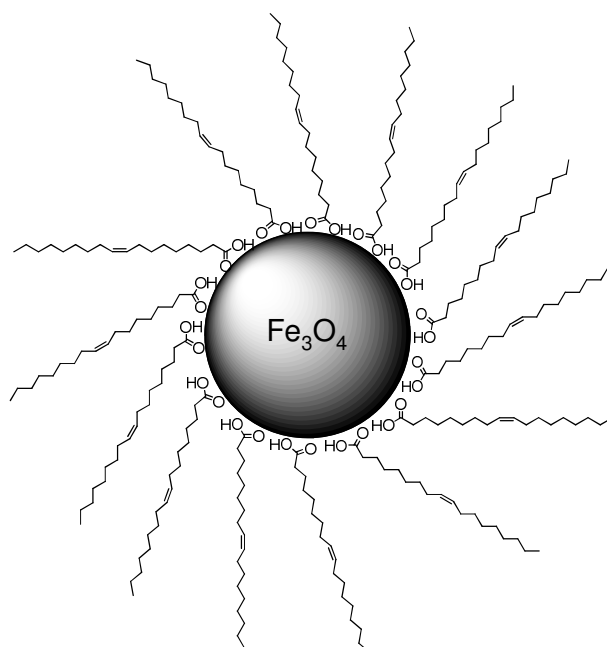


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Ölsäure-stabilisierten Fe_3O_4 -Nanopartikel.

Typischerweise wird durch die organometallische Hochtemperatursynthese ein Teilchengrößenbereich von 4 bis etwa 30 nm abgedeckt, wobei verschiedene Synthesen

veröffentlicht wurden^[49, 58, 59]. Eine gängige Methode besteht in der Thermolyse von Eisenpentacarbonyl in Dioctylether^[39]. Abb. 4.2 zeigt als Ergebnis der Synthese 10 nm großer Magnetitpartikel TEM-Aufnahmen sowohl in der Übersicht als auch in der Hochauflösung. Die Übersichtsaufnahme belegt eine sehr enge Teilchengrößenverteilung (Standardabweichung ≈ 5 -10 %). Die Hochauflösung (Abb. 4.2) zeigt die Einkristallinität der Partikel.

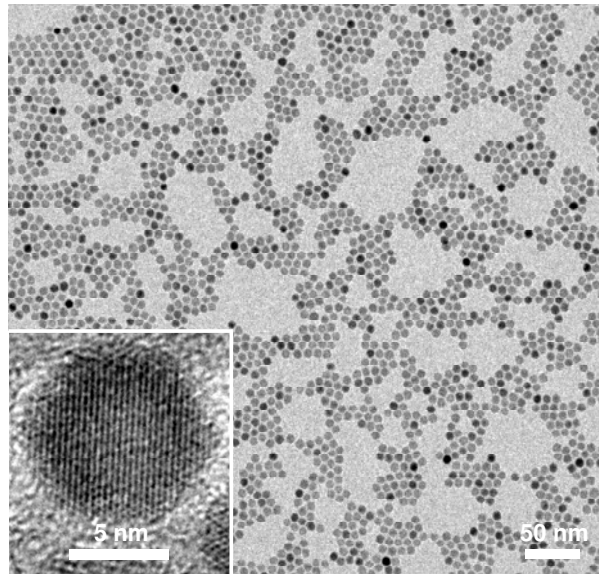


Abb. 4.2: TEM-Aufnahmen unterschiedlicher Vergrößerung einer Probe monodisperser 10 nm großer Fe_3O_4 -Nanokristalle. Die Hochauflösung zeigt die Einkristallinität des Teilchens.

Das Röntgendiffraktogramm der Probe belegt deren Kristallinität. So sind die Reflexe der kubischen Spinell-Kristallstruktur des Magnetit (Fe_3O_4) zuzuordnen (Abb. 4.3). Die ermittelte Teilchengröße nach Debye-Scherrer aus der Halbwertsbreite der Reflexe stimmt ferner gut mit der aus den TEM-Aufnahmen ermittelten überein. Die gute Größenübereinstimmung von TEM und XRD belegt die Einkristallinität der Partikel.

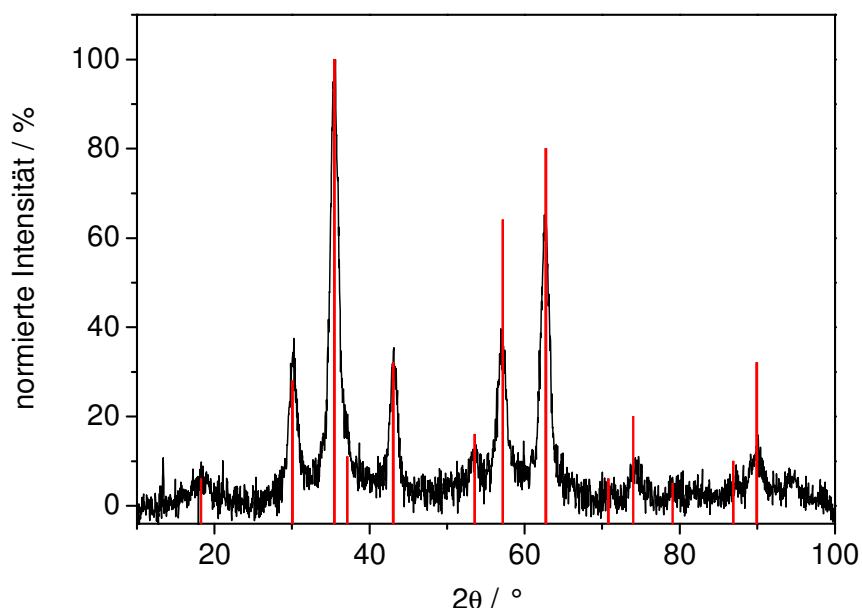


Abb. 4.3: Röntgendiffraktogramm einer Probe 10 nm großer Fe_3O_4 -Nanopartikel. Zum Vergleich sind die Reflexe des Magnetit-Festkörpers gezeigt (rot).

Teilchen geringerer Größe konnten auf ähnliche Weise durch Thermolyse von Eisen-trisacetylacetonat mit dem Reduktionsmittel 1,2-Hexadekandiol in den Lösungsmitteln Diphenylether oder Dibenzylether hergestellt werden^[36, 37, 55]. So wurden beispielsweise monodisperse Proben von 6 nm großen Magnetit-Teilchen erhalten (Abb. 4.4 a). Die Synthese größerer Teilchen (20 nm) erfolgte durch Thermolyse von Eisen-oleat-Komplexen in 1-Octadecen^[40, 60]. Auch hier konnten größeneinheitliche Proben synthetisiert werden (Abb. 4.4 b).

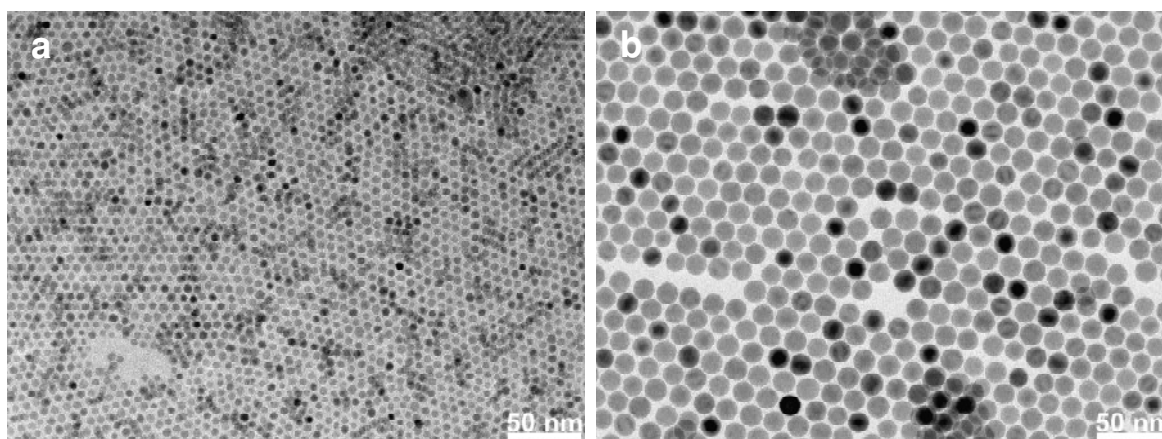


Abb. 4.4: Übersichtsaufnahmen monodisperser Proben von 6 nm (a) und 20 nm (b) großen Magnetit-Nanopartikeln.

Grundsätzlich wird davon ausgegangen, dass alle hier beschriebenen Synthesen über die Eisen-Oleat-Zwischenstufen verlaufen^[61-63]. Dabei handelt es sich um typische Aufheizsynthesen, in denen der Metallkomplex, der Stabilisator und das Lösungsmittel vorgelegt werden und das Gemisch bis zur erforderlichen Temperatur aufgeheizt wird. Die nasschemische Synthese von Metalloxid-Nanopartikeln wird, wie auch bei Halbleiter- und Metall-Nanoteilchen nach LaMer^[64] in eine Nukleations- und eine Wachstumsphase unterteilt^[58, 62, 65, 66]. Um die Größeneinheitlichkeit der Proben zu gewährleisten, wird die ab einer Temperatur von ~200 °C stattfindende Nukleation möglichst kurz gehalten^[50].

Auf ähnliche Weise wurden andere Spinell-Ferrite ($M_xFe_{3-x}O_4$, $x=0-1$) wie Manganferrit mit unterschiedlichem Dotierungsgrad hergestellt^[41]. Der Mangan-Anteil wurde durch EDX-Messungen bestimmt. Auch hier konnte die Größe über einen Bereich von 3-18 nm variiert werden (Abb. 4.5). Der höchste Anteil an Mangan wurde bei Verwendung des $Mn_2(CO)_{10}$ Komplexes erhalten. Synthesen die neben Eisen-trisacetylacetonat Mangan-bisacetylacetonat ($Mn(acac)_2$) verwenden, ergaben wegen der schlechten Löslichkeit von $Mn(acac)_2$ nur einen geringen Dotierungsgrad^[52].

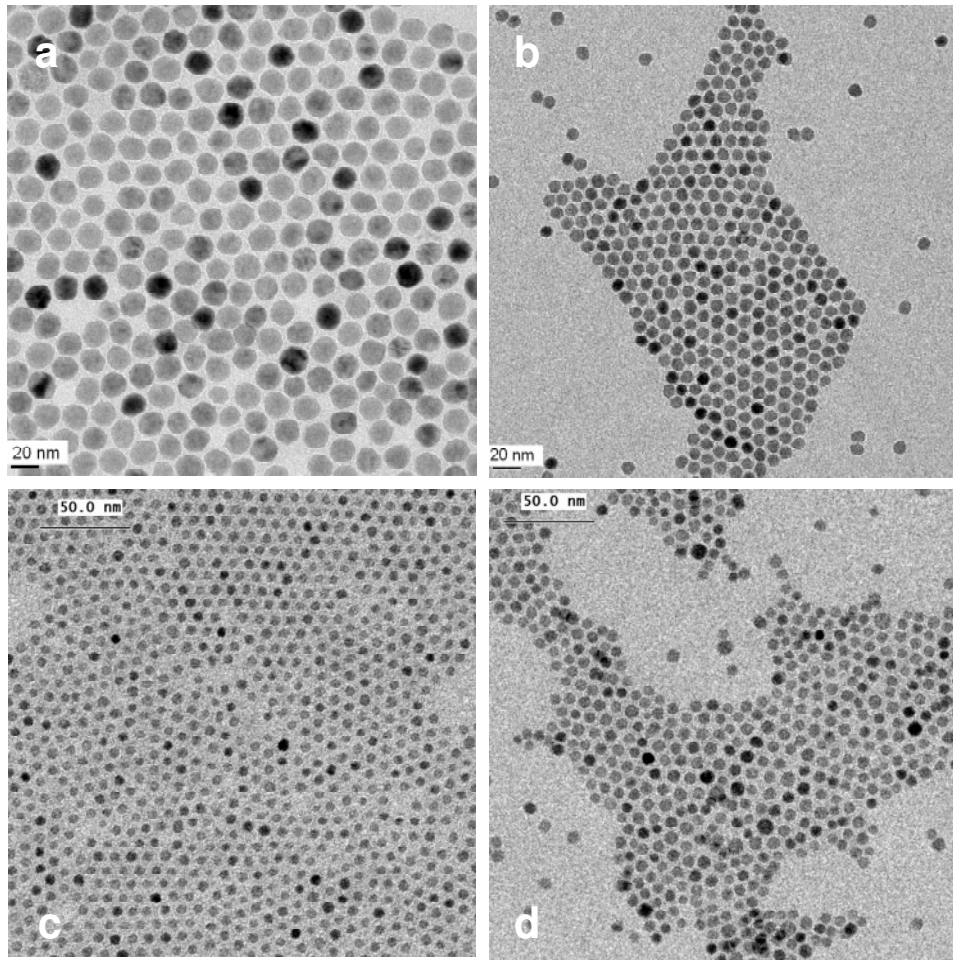


Abb. 4.5: TEM-Aufnahmen von MnFe_2O_4 -Nanopartikeln einer Größe von 18 nm (a) und 9 nm (b) sowie Mangan dotierter Fe_3O_4 -Nanopartikel (6 nm (c) und 7.5 nm (d)).

Untersuchungen zum Magnetismus wurden mit einem Probenvibrationsmagnetometer an pulverförmigen Proben durchgeführt. Die hergestellten Eisenoxid-Nanopartikel weisen superparamagnetisches Verhalten auf. Ihre Magnetisierungskurven zeichnen sich daher durch das Fehlen einer Hysterese aus und unterscheiden sich in Abhängigkeit von der Teilchengröße sehr stark (Abb. 4.6). So ist deutlich erkennbar, dass die Magnetisierungskurve 8 nm großer Fe_3O_4 -Nanopartikel bereits bei etwa 5000 Oe (entspricht 0.5 T) in den Sättigungsbereich übergeht. Die Magnetisierungskurve der 4 nm großen Magnetit-Partikel hingegen ähnelt in ihrem Verlauf deutlich eher der Magnetisierungskurve eines Paramagneten. Die Sättigungsmagnetisierung der Probe 4 nm großer Partikel ist außerdem um einen Faktor drei geringer. Die ermittelten Werte stimmen gut mit anderen Untersuchungen überein^[22, 23].

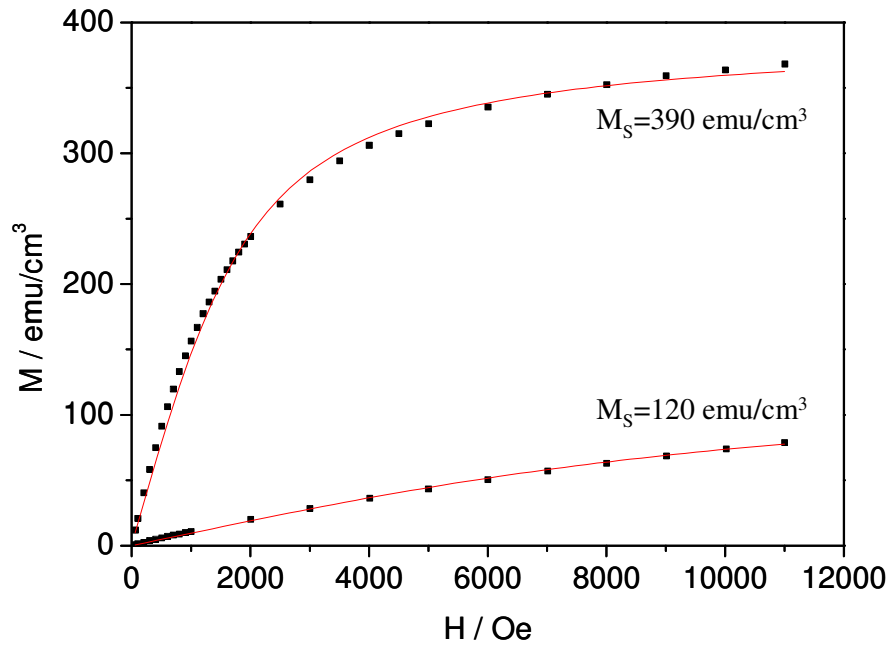


Abb. 4.6: Magnetisierungskurven superparamagnetischer Fe_3O_4 -Nanopartikel unterschiedlicher Größe. Die Sättigungsmagnetisierung M_S 8 nm großer Teilchen (390 emu/cm^3) ist ca. 3 mal höher als die von 4 nm großen Partikeln (120 emu/cm^3).

Die Magnetisierungskurven der superparamagnetischen Partikel genügen ferner dem Langevin-Verhalten, wie durch die Fits der Datenpunkte deutlich wird. Daraus folgt, dass Anisotropieeffekte nur geringen Einfluss auf das Magnetisierungsverhalten der Partikel haben. Das superparamagnetische Verhalten der Nanopartikel konnte durch Mößbauer-Spektroskopie bestätigt werden.

Die Nanopartikel wurden nach der Synthese routinemäßig für die weitere Verwendung gewaschen. Dabei wurden sie aus der Dispersion durch Zugabe eines Fällungsmittels (z.B. Ethanol) sedimentiert. Der Überstand wurde durch Zentrifugation abgetrennt und die Teilchen redispersiert. Auf diese Weise wurden die im Überschuss zugesetzten organischen Bestandteile entfernt. Um trotzdem den prozentualen Anteil der Stabilisatoren auf der Teilchenoberfläche zu bestimmen und Erkenntnisse über die Bindungsstärke der Stabilisatoren zu gewinnen, wurden Thermogravimetriemessungen durchgeführt und untersucht, wie groß der pro Waschgang von der Teilchenoberfläche entfernte Anteil ist (Abb. 4.7).

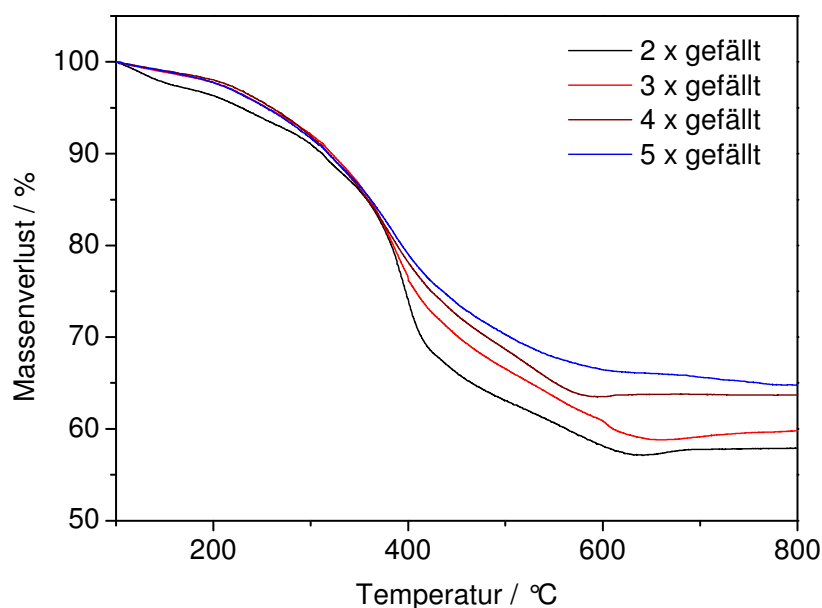


Abb. 4.7: Thermogravimetrie-Kurven von 4 nm großen Fe_3O_4 -Nanopartikeln. Mit zunehmender Waschkhäufigkeit sinkt der Anteil an Stabilisatoren auf der Teilchenoberfläche.

Die TG-Kurven zeigen, dass nach einer üblichen Aufreinigung von zwei Waschgängen ~40 % organische verdampfbare Verbindungen vorhanden sind. Bei diesen dürfte es sich um Stabilisatoren (Ölsäure) auf der Teilchenoberfläche handeln. Die TG-Kurven zeigen ferner einen kontinuierlichen Massenverlust bis etwa 600 °C, welcher durch Zersetzungsreaktionen erklärbar ist. Eine plötzlich stattfindende Desorption der Ölsäure ist nicht zu beobachten. Jeder weitere Waschgang bewirkt einen zusätzlichen Massenverlust von ~2-3 %.

Um die Bindung der Ölsäure an die Teilchen genauer zu untersuchen und um in Lösung stattfindende dynamische Gleichgewichte zu erkennen, wurde die Synthese unter Einsatz von ^{14}C -radiomarkierter Ölsäure durchgeführt. Die Arbeiten wurden am Institut für Molekulare Zellbiologie von Prof. Dr. Ulrike Beisiegel am Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf in enger Kooperation mit PD Dr. Jörg Heeren durchgeführt. ^{14}C ist ein β -Strahler mit einer Halbwertszeit von 5730 Jahren. Die Standard-Synthese 4 nm großer Fe_3O_4 -Nanopartikel wurde dazu in einem zehnfach verkleinerten Ansatz durchgeführt. In der Synthese wurde ein Aktivität von $6 \cdot 10^8$ cpm bezogen auf 0.6 mmol Ölsäure eingesetzt. Die Teilchen wurden anschließend zweimal gewaschen und dann in 6 ml Hexan gelagert.

Ausgehend von dieser Lösung wurden Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt. Zunächst wurde analog zur thermogravimetrischen Analyse der Einfluss des Waschens auf die Nanopartikel untersucht. Dabei wurde die Aktivität nach jedem weiteren Waschschrift im Überstand und in der Dispersion gemessen. Die Detektion von β -Strahlung erfolgt unter

Einsatz von Szintillations-Lösungen. Diese Lösungen enthalten einen Farbstoff und weitere Additive. Trifft ein β -Elektron auf ein Farbstoffmolekül, so kommt es zur Emission eines γ -Quants. Die γ -Quanten werden über einen Lichtleiter und einen Photomultiplier kollektiert. Dadurch dienen sie der Quantifizierung der β -Strahlung. Abb. 4.8 a zeigt die erhaltenen Aktivitäten in Überstand und Lösung nach den Waschschritten 3-6.

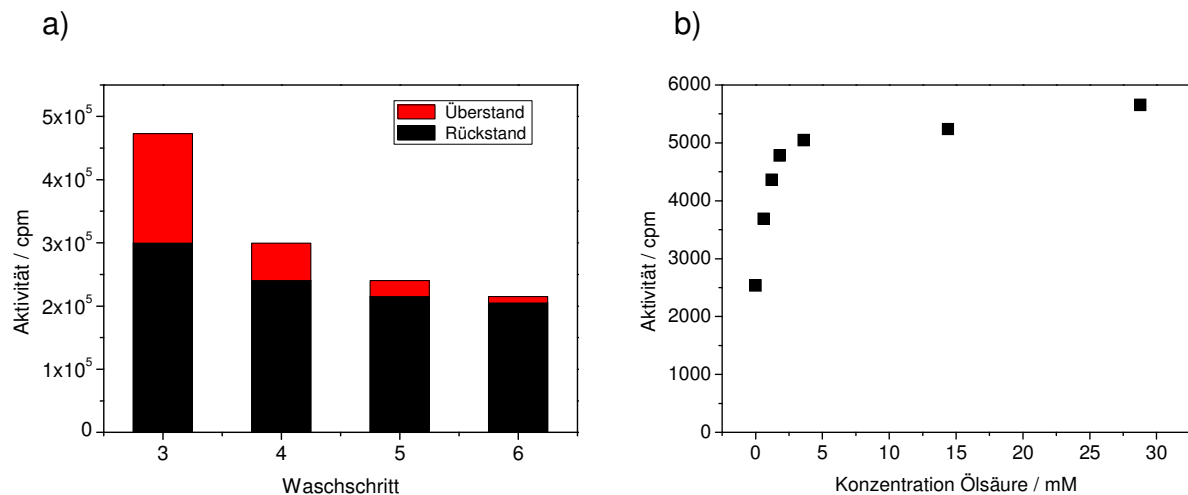


Abb. 4.8: Stabilitätsuntersuchungen an ^{14}C markierten Fe_3O_4 -Nanopartikeln. (a) Einfluss des Waschens auf die verbleibende Aktivität. (b) Verdrängungsexperiment mit Ölsäure verschiedener Überschüsse bei Raumtemperatur für 24 h.

Es ist erkennbar, dass der durch Fällung entfernbare Anteil an Ölsäure von Waschschrift zu Waschschrift sinkt. Nach dem 6. Schritt verbleibt etwa 95 % der Ölsäure auf der Teilchenoberfläche. Dieses Ergebnis bestätigt das der TG-Messungen.

In einem weiteren Experiment (Abb. 4.8 b) wurde geprüft, inwieweit sich die gebundene radioaktive Ölsäure durch nicht-aktive verdrängen lässt. Dazu wurden in Dreifach-Bestimmungen unterschiedliche Überschüsse an Ölsäure zugegeben und die in Chloroform gelösten Teilchen bei Raumtemperatur für 24 h gerührt. Die Aktivität wurde im Überstand gemessen. Es ergab sich eine deutliche Abhängigkeit der Menge der verdrängten Ölsäure von der zugesetzten. Es ist also ein dynamisches Gleichgewicht vorhanden und offensichtlich möglich, die gebundene aktive Ölsäure vollständig gegen nicht-aktive auszutauschen (der Wert von 5500 cpm entspricht der eingesetzten Aktivität). Für die in 4.2 beschriebenen Ligandenaustauschreaktionen ergeben sich daraus zwei Konsequenzen. Unter Einsatz eines großen Überschusses des neuen Liganden ist es möglich, die gebundenen Stabilisatoren vollständig zu verdrängen. Darüber hinaus muss der einzuführende Ligand über feste

Ankergruppen verfügen, so dass die Teilchenoberfläche auch beim Entfernen des Überschusses bei der Aufreinigung dicht belegt bleibt, um eine Aggregation zu verhindern.

Anorganische Ferrit-Nanopartikel wurden durch organometallische Hochtemperatursynthese in einem Größenbereich von 3-30 nm hergestellt. Dabei wurden sehr enge Teilchengrößenverteilungen erreicht (s.d.<10 %). Die Zusammensetzung der Teilchen konnte durch Wahl geeigneter Metall-Komplexe zwischen Magnetit (Fe_3O_4) und Manganferrit (MnFe_2O_4) variiert werden. Magnetometermessungen demonstrierten den Superparamagnetismus der Proben, wobei der Verlauf der Kurven sowie die Sättigungsmagnetisierung stark größenabhängig sind. Durch die synthesebedingte Größenkontrolle lassen sich die magnetischen Eigenschaften somit den Anforderungen entsprechend einstellen. Untersuchungen der Teilchenoberfläche ergaben, dass die gebundene Ölsäure in Gleichgewichtsreaktionen unter milden Bedingungen vollständig ausgetauscht werden kann. Durch wiederholtes Fällern der Partikel verbleibt hingegen ein Anteil von etwa 30 % organischer Verbindungen auf der Teilchenoberfläche.

4.2 Oberflächenmodifizierung an Ferrit-Nanopartikeln

Die organometallische Hochtemperatursynthese erlaubt die gezielte Synthese von Ferrit-Nanopartikeln unterschiedlicher Größe und Form mit hoher Kritallinität. Durch diese Flexibilität sind beispielsweise die magnetischen Eigenschaften gezielt einstellbar. Ein entscheidender Nachteil gegenüber wasserbasierten Synthesen ist jedoch, dass die Partikel durch den Einsatz von Stabilisatoren mit langen unpolaren Alkylketten nur in unpolaren organischen Lösungsmitteln wie Hexan oder Chloroform löslich sind. Um sie für den Einsatz in der Biomedizin wie etwa nur Kontrastverbesserung in der MRT nutzbar zu machen, müssen Oberflächenmodifizierungen durchgeführt werden. Erst die Oberflächenmodifizierung der Partikel ermöglicht einen Transfer ins wässrige Medium. Zur Oberflächenmodifizierung sind im Wesentlichen drei Strategien entwickelt worden^[32, 67], die im Rahmen dieser Arbeit angewendet und im Hinblick auf ihren Einfluss auf die einzelnen MR-Relaxationsprozesse verglichen wurden. Abb. 4.9 zeigt diese Strategien^[68].

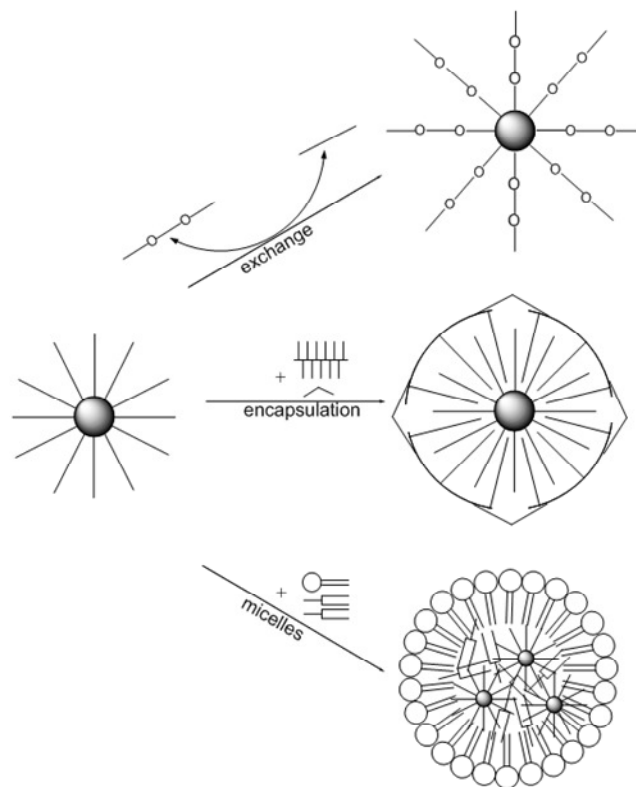


Abb. 4.9: Schematische Darstellung der verschiedenen Oberflächenmodifikationen an Nanopartikeln. Ligandenaustausch (oben), Einkapselung in Mizellen von einzelnen (Mitte) und mehreren (unten) Partikeln^[68].

Der erste Weg besteht in einem Austausch der hydrophoben Stabilisatormoleküle gegen Moleküle, die dem Partikel z.B. wegen ihrer Ladung oder Polarität Wasserlöslichkeit verleihen^[69]. Wichtig ist, dass auch diese Moleküle über funktionelle Gruppen verfügen, die fest an die Teilchenoberflächen von Metalloxiden binden. Beispiele für solche Gruppen sind Carbonsäuren^[70-72], Dopamine^[73, 74], Amine^[75], Phosphanoxide^[76, 77] und Phosphonate^[78].

Die zweite Strategie besteht in der Einkapselung der Nanopartikel z. B. unter Verwendung von Amphiphilen^[79, 80]. Der hydrophobe Teil des Amphiphils tritt dabei mit den unpolaren Ketten der Stabilisatoren in Wechselwirkung, der hydrophile Teil zeigt nach außen und bewirkt eine Wasserlöslichkeit^[67]. Es können einzelne^[81] oder auch viele Partikel in einer solchen mizellaren Struktur eingebettet werden^[31, 32, 82]. Das Amphiphil kann ein synthetisches Blockcopolymer oder auch ein biologischer Mizellenbildner sein. Die ursprünglichen Stabilisatoren bleiben bei dieser Methode erhalten. Generell wird bei synthetischen Liganden häufig versucht, eine dichte und stabile Hülle aus Polyethylenglykol (PEG) um die Teilchen zu bilden. PEG ist biokompatibel und bewirkt hohe Stabilität^[83-87].

In diesem Kapitel werden die hier skizzierten Strategien eingesetzt, um Eisenoxid-basierte Kontrastmittel herzustellen. Generell werden durch Ligandenaustausch-Reaktionen kleine wasserlösliche Teilchen hergestellt, welche für die T₁-gewichtete Bildgebung geeignet sind. Die anderen Oberflächenmodifikationen werden verwendet, um negative Kontrastmittel für die T₂- und T₂*- gewichtete Bildgebung zu entwickeln.

4.2.1 Synthese Polyethylenglykol-basierter Liganden

Um Eisenoxid-Nanopartikel mittels Ligandenaustausch in wässrige Lösung zu transferrieren, wurden Liganden nach folgenden Anforderungen getestet. Einerseits sollten die Moleküle robuste Ankergruppen zur Bindung auf der Teilchenoberfläche aufweisen. So sollte eine Aggregation der Teilchen verhindert werden. Der PEG-Teil sollte eine hohe Stabilität unter physiologischen Bedingungen bewirken und eine Adsorption von Proteinen aus dem Blutplasma verhindern oder wenigstens reduzieren. Außerdem sollte das PEG verhindern, dass die Teilchen eine unspezifische Phagozytose durch Zellen des Retikulo-Endothelialen Systems (RES) erfahren und somit nur sehr geringe Bluthalbwertszeiten besitzen. Abb. 4.10 zeigt zur Übersicht die zum Ligandenaustausch verwendeten Polymere zur Darstellung homogen dispergierter Teilchen.

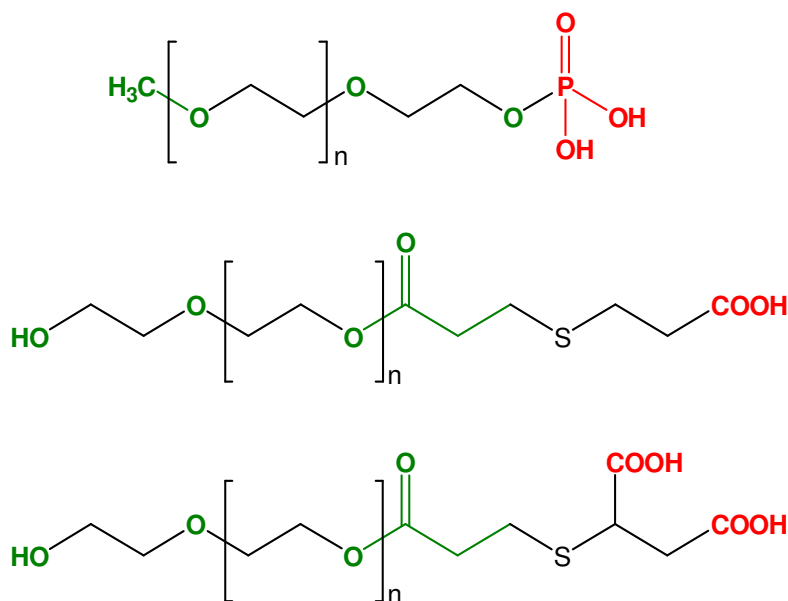


Abb. 4.10: Strukturformeln der zum Ligandenaustausch verwendeten PEG basierten Liganden. Die Ankergruppen zur Bindung auf der Teilchenoberfläche sind rot dargestellt. Dabei wurden Phosphorsäuregruppen und Carbonsäuregruppen verwendet. Die PEG-Kette bewirkt eine hohe Wasserlöslichkeit und hohe Stabilität unter physiologischen Bedingungen.

Die Synthese der Phosphorsäure-funktionalisierten PEG erfolgte durch Umsetzung von Polyethylenglykol-monomethylether mit Phosphorylchlorid. Um sicherzustellen, dass es zur Bildung eines Monoesters kommt, wurde ein Überschuss an Phosphorylchlorid eingesetzt^[88, 89]. Die verbleibenden zwei P-Cl-Bindungen wurden dann durch Zugabe von Wasser hydrolysiert (Abb. 4.11).

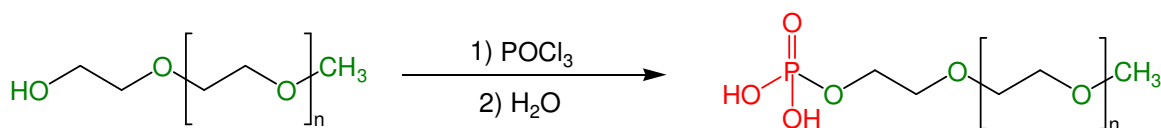


Abb. 4.11: Reaktionsschema zur Phosphorylierung von PEG. Zur Bildung des Monoesters wird ein Überschuss an POCl_3 eingesetzt.

Zur Charakterisierung des Polymers wurden ^{31}P -NMR-Spektren aufgenommen (Abb. 4.12). In Abhängigkeit von der Länge des verwendeten PEG-Moleküls gibt es kleine Unterschiede zwischen den Spektren. Das Spektrum eines phosphorylierten PEG-2000-Moleküls weist nur ein einziges charakteristisches Signal bei 1.27 ppm auf. Dieses Signal ist mit der Bildung nur eines Produktes, nämlich des Monoesters zu begründen.

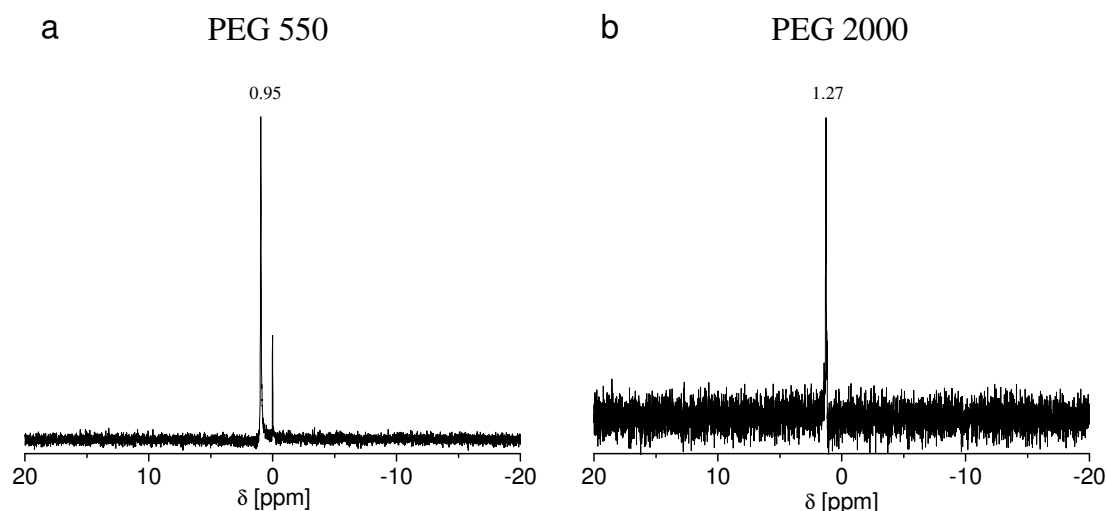


Abb. 4.12: ^{31}P -NMR-Spektren phosphatfunktionalisierter PEG-Moleküle unterschiedlicher Molmasse.

Das ^{31}P -NMR Spektrum eines phosphorylierten PEG-Moleküls geringerer Molmasse (PEG-350 und PEG-550) weist neben dem Hauptsignal bei 0.95 ppm noch ein zweites Signal von deutlich kleinerer Intensität auf. Offensichtlich führt die Phosphorylierung hier, trotz des Einsatzes eines Überschusses an Phosphorylchlorid, zur Bildung eines kleinen Anteils an Biester. Der Biester hat entsprechend eine etwas geringere chemische Verschiebung.

Die Synthese der Carbonsäure-funktionalisierten PEG-Liganden erfolgte unter Verwendung von Polyethylenglykol-monoacrylaten durch Umsetzung mit 3-Merkaptopropionsäure (MPA) zur Einführung einer Carboxylat-Ankergruppe oder mit 2-Merkaptobernsteinsäure (MSA) zur Einführung von zwei Carboxylat-Gruppen. Mechanistisch verläuft die Reaktion unter Basenkatalyse über eine Michael-Addition unter milden Reaktionsbedingungen (40 °C, 24-48 h) (Abb. 4.13).

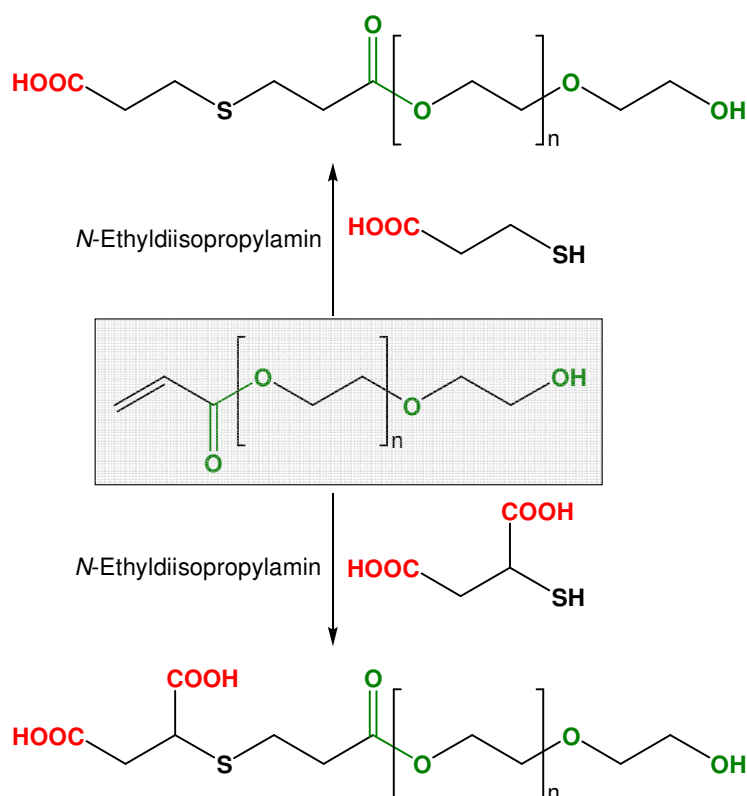


Abb. 4.13: Reaktionsschema zur Synthese der Carbonsäure-funktionalisierten PEG-Moleküle aus den PEG-Monoacrylaten.

Dabei kann die Reaktion sowohl $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch als auch IR-spektroskopisch verfolgt werden. Die Vollständigkeit der Reaktion ist im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum am Verschwinden der Acrylprotonen erkennbar (Abb. 4.14). Hier wurde beispielhaft ein PEG-1000-Acrylat mit Merkaptobernsteinsäure zur Reaktion gebracht. Für PEG-Moleküle größerer Molmasse ($M(\text{PEG}) > 2000 \text{ g/mol}$) müssen höhere Reaktionstemperaturen gewählt werden, um in gleicher Zeit quantitative Umsetzungen zu erreichen.

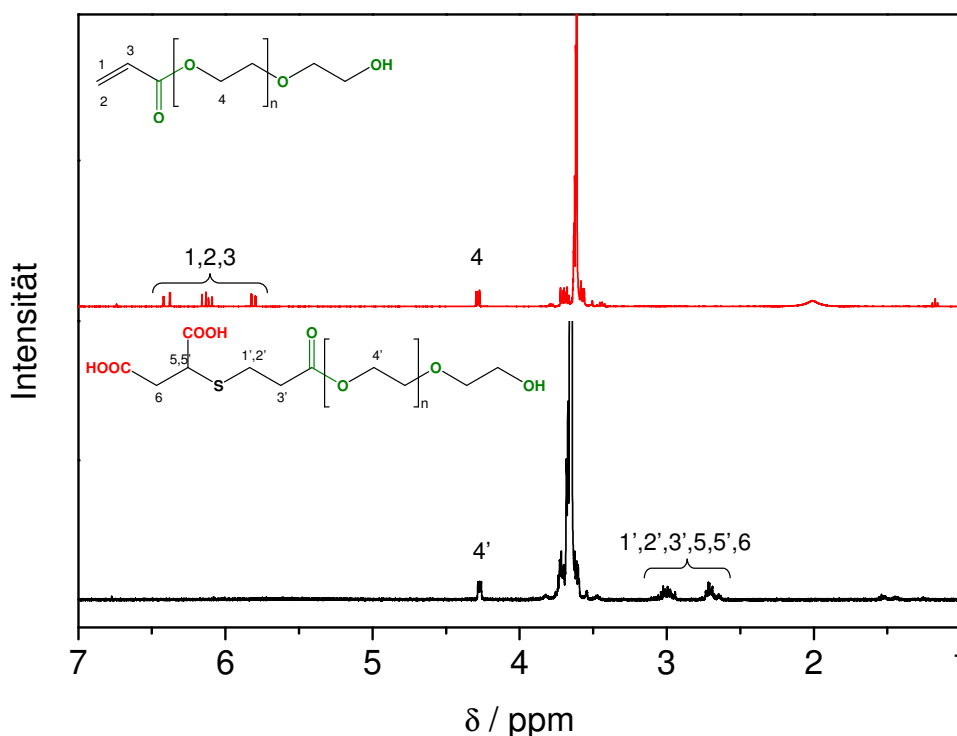


Abb. 4.14: ^1H -NMR-Spektren des PEG-1000-Acrylats vor der Reaktion (rot) sowie des resultierenden PEG-1000-MSA-Polymers nach der Michael-Addition (schwarz).

Die Signale der entstehenden Alkylprotonen sind nach der Addition zusammen mit den Alkyl-Protonen der MSA-Funktion (5, 5', 6) bei 2.6 bis 3.2 ppm lokalisiert. Die IR-spektroskopische Charakterisierung basiert auf der Verfolgung der symmetrischen Acrylat-Streckschwingung und bestätigt die Resultate der NMR-Spektroskopie.

4.2.2 Ligandenaustauschreaktionen ohne Aggregation der Partikel

Die in 4.2.1 hergestellten Liganden sollten im Folgenden mit Eisenoxid-Nanopartikeln umgesetzt werden und dabei Ligandenaustauschreaktionen eingehen, um den Partikeln Wasserlöslichkeit zu verleihen. Ziel war es hier, eine möglichst dichte Hülle an PEG-Molekülen um das Partikel zu erzeugen. Bedingung dafür ist, dass die eingesetzten Ankergruppen fest an die Partikeloberfläche binden und die Liganden nicht in möglichen Gleichgewichtsreaktionen in das wässrige Lösungsmedium übergehen. Eine dichte Hülle an PEG-Molekülen verhindert die Aggregation der Partikel und verleiht ihnen extrem hohe Stabilität unter physiologischen Bedingungen. Dazu zählen die Stabilität unter bestimmten pH-Bedingungen und Salzkonzentrationen sowie die Resistenz gegen eine unspezifische Adsorption von Serum-Proteinen und Phagozytose. Im Rahmen der in dieser Arbeit verwendeten Polymere wurden bezüglich dieser Kriterien große Unterschiede festgestellt.

Abb. 4.15 zeigt TEM-Übersichtsaufnahmen 4 nm großer Fe_3O_4 -Nanopartikel vor (a) und nach dem Ligandenaustausch mit PEG-Phosphat unterschiedlicher Molmasse (b, c). In (d) sind außerdem die mittels dynamischer Lichtstreuung gemessenen hydrodynamischen Durchmesser der Partikel dargestellt. Der Ligandenaustausch erfolgte in einer Lösung aus Tetrahydrofuran und Wasser bei 60 °C mit großem Polymer-Überschuss. Es ist deutlich erkennbar, dass die Teilchen vor dem Ligandenaustausch in Chloroform einen Durchmesser von ~7 nm aufweisen. Dieser Durchmesser erscheint realistisch, wenn man ihn als die Summe des Kern-Durchmessers (4 nm) und der Ölsäure-Stabilisatorhülle (~1.5 nm) versteht. In der dazu gehörigen TEM-Aufnahme (a) ist erkennbar, dass die Teilchen ohne Aggregation gleichmäßig auf dem TEM-Probenträger verteilt sind. Nach erfolgtem Ligandenaustausch mit PEG-Phosphat wurden in wässriger Lösung hydrodynamische Durchmesser von 8-10 nm gemessen, wobei es nicht möglich war, zwischen verschiedenen PEG-Kettenlängen zu unterscheiden (d). Die TEM-Aufnahmen (b) und (c) zeigen deutlich, dass die Teilchen aber auch hier nach dem Verdampfen des Wassers auf dem TEM-Probenträger gleichmäßig verteilt sind. Außerdem ist ersichtlich, dass die Abstände zwischen den Teilchen mit zunehmender PEG-Kettenlänge größer werden. Durch Korrelation beider Methoden konnte also festgestellt werden, dass mit PEG-Phosphat ein Ligandenaustausch unter vollständiger Verhinderung von Aggregation durchgeführt werden konnte. Als Grund hierfür kann die hohe Affinität der Phosphat-Gruppe zum Eisenoxid und die daraus resultierende hohe Oberflächendichte der Polymermoleküle angesehen werden. Außerdem erscheint ein hydrodynamischer Durchmesser von ~10 nm sinnvoll, wenn von einer Addition des Kerndurchmessers (4 nm) sowie dem geschätzten Durchmesser eines PEG-2000-Moleküls in Lösung (~2.8 nm) ausgegangen wird^[90].

Der Einsatz von kürzeren PEG-Ketten (350 g/mol) führte zu partieller Aggregation. Es ist also eine Mindestlänge von ~500 g/mol erforderlich, um homogendispersierte Teilchen zu erzeugen.

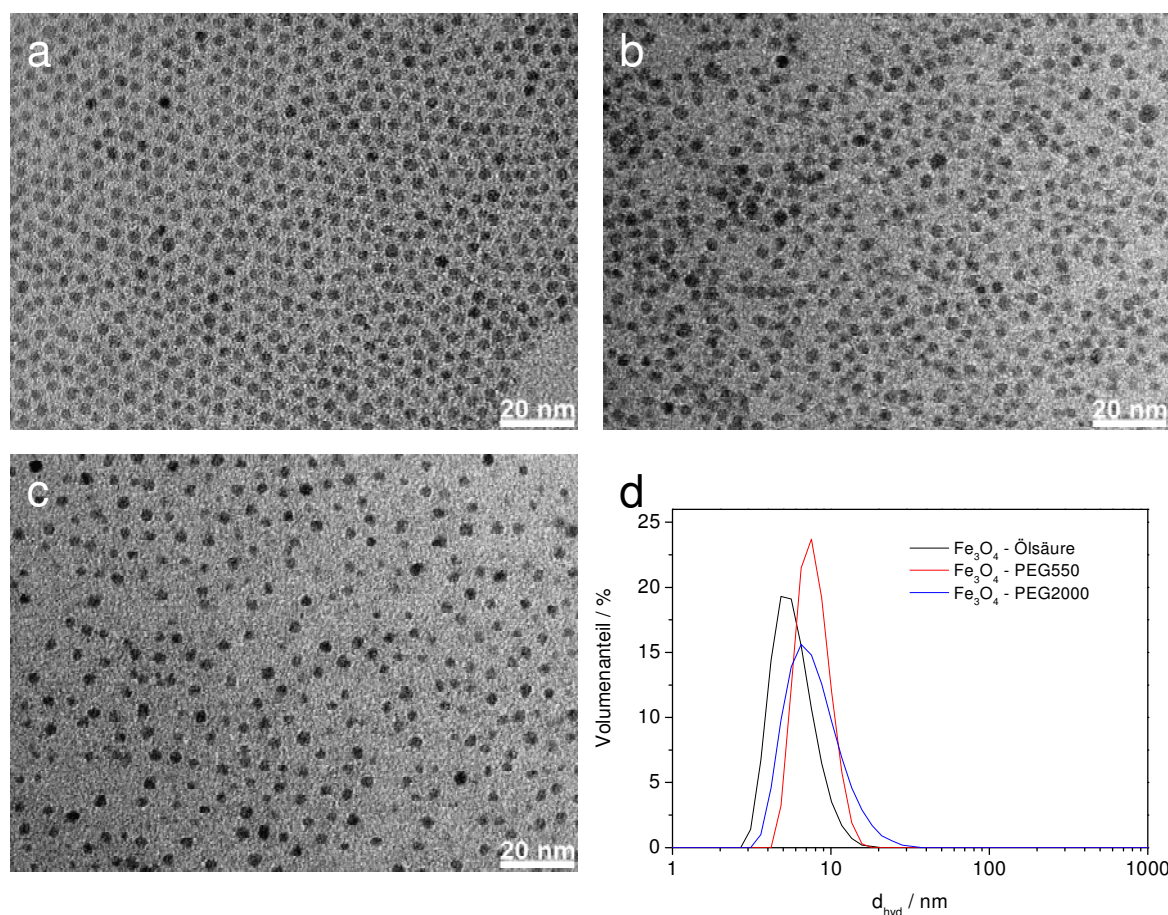


Abb. 4.15: TEM-Übersichtsaufnahmen monodisperser 4 nm großer Magnetit-Nanopartikel vor (a) und nach dem Ligandenaustausch mit PEG-550-Phosphat (b) und PEG-2000-Phosphat (c). Die entsprechenden hydrodynamischen Durchmesser der Ölsäure-stabilisierten Teilchen in Chloroform sowie der PEG-stabilisierten Partikel in Wasser zeigt (d).

Um die Oberflächenbeschaffenheit der Teilchen nach dem Ligandenaustausch genauer zu charakterisieren, wurden IR-Spektren der Teilchen vor und nach dem Ligandenaustausch aufgenommen. Diese sind in Abb. 4.16 dargestellt. Vor der Aufnahme der Spektren wurden die Proben durch Ultrafiltration aufgereinigt, um freie Liganden zu entfernen. Das IR-Spektrum der hydrophoben Nanopartikel weist neben den typischen Alkylgruppen-Schwingungen der Ölsäure bei $\sim 2800 \text{ cm}^{-1}$ eine intensive Bande bei 1421 cm^{-1} auf. Sie ist vermutlich der Carboxylgruppe der Ölsäure zuzuordnen und nach dem Ligandenaustausch nicht mehr vorhanden. Darüber hinaus gleicht das IR-Spektrum nach dem Ligandenaustausch dem des reinen PEG-Moleküls. Es ist daher davon auszugehen, dass der Ligandenaustausch nahezu quantitativ verlaufen ist.

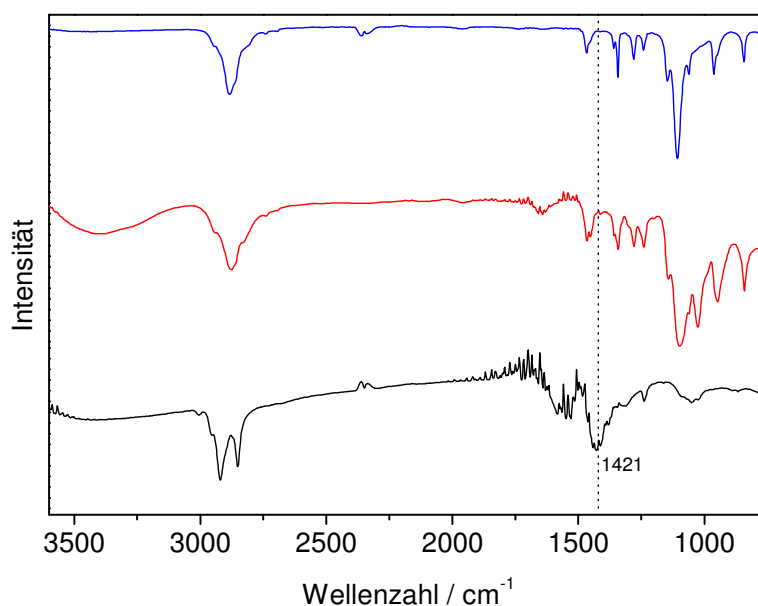


Abb. 4.16: IR-Spektren der Fe_3O_4 Nanopartikel vor (schwarz) und nach dem Ligandenaustausch (blau). Zum Vergleich ist das IR-Spektrum des PEG-2000-Phosphat Polymer gezeigt (rot).

Die hier beschriebenen in wässriger Lösung homogen dispergierten Nanopartikel wurden erhalten, sofern große Überschüsse der PEG-Liganden im Verhältnis zur auf der Oberfläche gebundenen Ölsäure eingesetzt wurden. Wurde der PEG-Anteil in den Ligandenaustauschreaktionen allerdings schrittweise reduziert, so konnten zunächst wurmartige und später auch mizellare Strukturen dargestellt werden. Abb. 4.17 zeigt TEM-Übersichtsaufnahmen der 4 nm großen Magnetit-Nanokristalle mit PEG-2000-Phosphat-Liganden in Abhängigkeit vom Verhältnis des eingesetzten Liganden zum Nanopartikel.

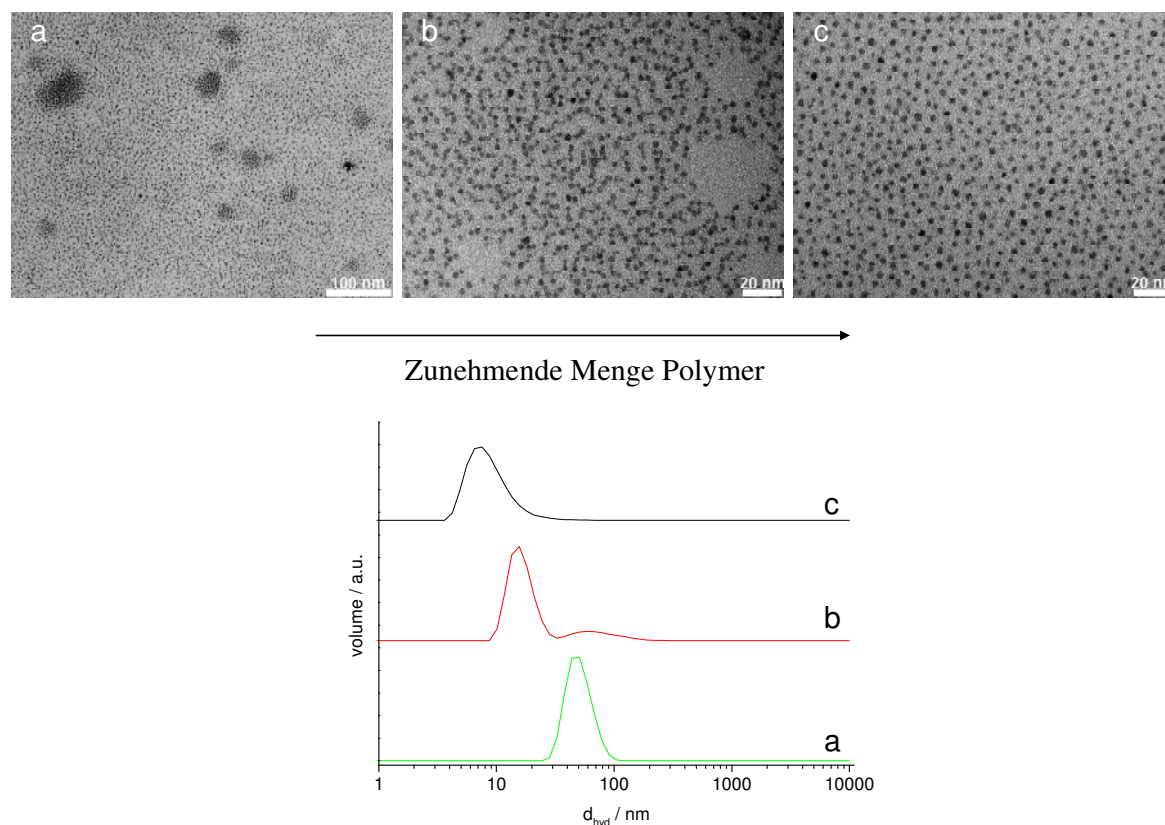


Abb. 4.17: Einfluss des Verhältnisses der eingesetzten Menge an PEG-2000-Phosphat zur Menge an Eisenoxid-Nanopartikeln. Mit abnehmender Menge an Polymer kommt es zunächst zur Bildung von Nanopartikel-Ketten (b). Bei weiterer Reduktion bilden sich große Mizellare Aggregate aus (a). Dieser Trend korreliert mit den mittels DLS bestimmten hydrodynamischen Durchmessern.

Der Trend einer zunehmenden Neigung zur Aggregat-Bildung spiegelt sich auch in den mittels DLS gemessenen hydrodynamischen Durchmessern wieder. Ähnliche Resultate wurden für PEGylierte CdSe/CdS Kern/Schale-Nanopartikel erhalten^[91].

Auch die in 4.2.2 beschriebenen Carbonsäure-funktionalisierten PEG-Moleküle wurden in Ligandenaustauschreaktionen eingesetzt, um homogen dispergierte Teilchen ohne Aggregation zu erhalten. Abb. 4.18 zeigt repräsentative TEM-Übersichtsaufnahmen von Proben aus 4 nm großen Fe_3O_4 -Nanopartikeln mit PEG-1000-MSA- und PEG-1000-MPA-Liganden.

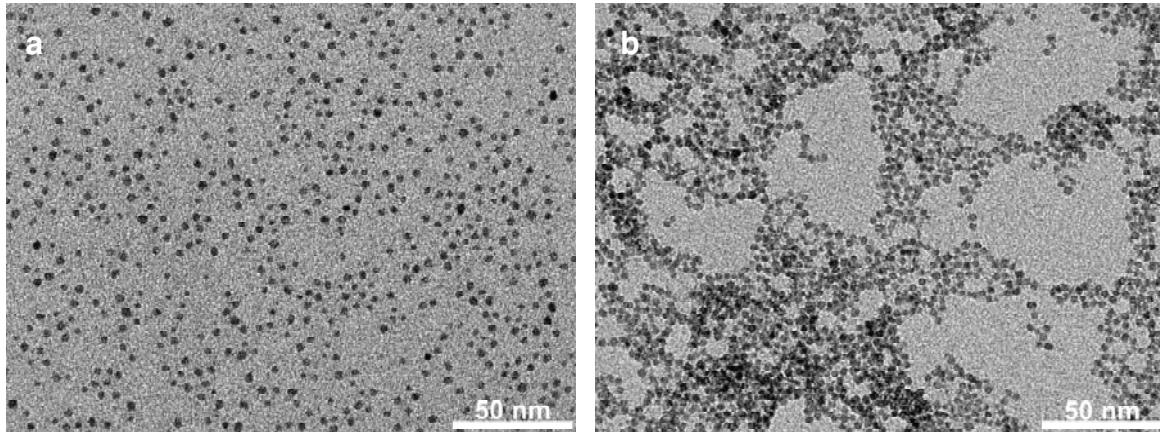


Abb. 4.18: 4 nm große Fe_3O_4 -Nanopartikel, die mit PEG-1000-MSA (zwei Carboxylgruppen, (a)) und PEG-1000-MPA (eine Carboxylgruppe, (b)) beschichtet sind.

Es ist deutlich erkennbar, dass die PEG-1000-MSA umhüllten Teilchen gleichmäßig auf dem Probenträger verteilt sind, wohingegen die PEG-1000-MPA beschichteten eine erhebliche Neigung zur Aggregation und Kettenbildung zeigen. Dieser Trend wird durch die Messungen der hydrodynamischen Durchmesser bestätigt (Abb. 4.19).

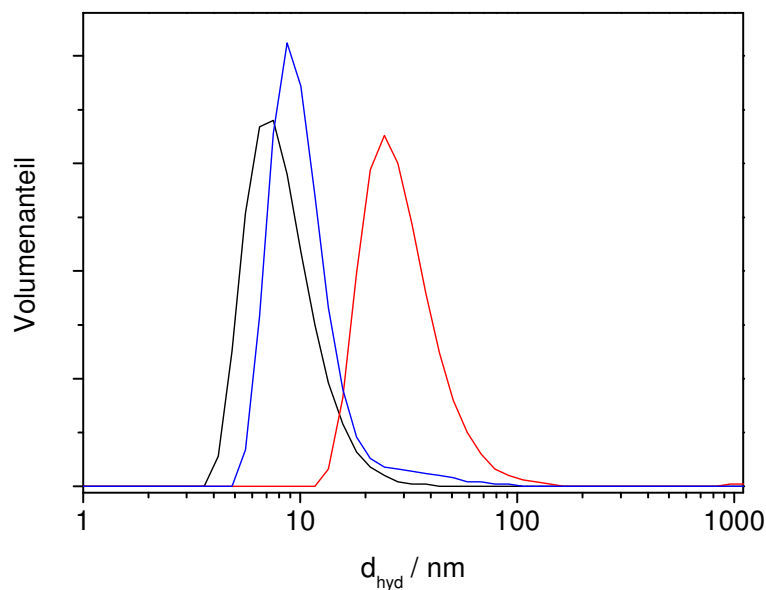


Abb. 4.19: Hydrodynamische Durchmesser 4 nm großer Fe_3O_4 -Nanopartikel vor dem Ligandenaustausch in Chloroform (schwarz) und nach dem Ligandenaustausch mit PEG-1000-MSA (blau) und PEG-1000-MPA (rot).

Es sind deutliche Unterschiede in den hydrodynamischen Durchmessern zwischen beiden Proben zu erkennen. Während der hydrodynamische Durchmesser der Teilchen bei Verwendung von PEG-1000-MSA mit ~10 nm nur geringfügig gegenüber den hydrophoben

Teilchen in Chloroform angestiegen ist, führt der Ligandenaustausch mit PEG-1000-MPA zu erheblich größeren hydrodynamischen Durchmessern (~ 30 nm). Der Grund hierfür ist in der deutlich unterschiedlich dicht belegten Oberfläche der Nanopartikel zu sehen. PEG-1000-MSA verfügt über zwei chelatisierende Carboxylgruppen, die deutlich fester an die Teilchenoberfläche binden als die Verwendung einer Carboxylgruppe im PEG 1100-MPA. Ähnliche Resultate wurden auch für Polyethylenglykol-polyethylenimin-copolymere erhalten, die über bis zu sieben Amingruppen verfügen, um auf der Teilchenoberfläche zu binden. Auch hier gelang es nicht, Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von weniger als 30 nm zu synthetisieren.

Es wurde gezeigt, dass durch Ligandenaustausch kleine homogendispersierte Eisenoxid-Nanopartikel in wässriger Lösung erhalten werden können. Diese verfügen über dünne, wasserdurchlässige PEG-Hüllen. Allerdings sind nur solche PEG-basierte Liganden geeignet, die robuste Ankergruppen besitzen. Durch Einsatz der PEG-Phosphate einer minimalen PEG-Molmasse von ~ 500 g/mol gelang es, Aggregation vollständig zu verhindern und eine enge Teilchengrößenverteilung zu erzeugen. Die Bindungsaffinität weniger starker Ankergruppen wie Carboxylate kann durch Chelatisierung verstärkt werden. Der Einsatz von PEG-MSA-Polymeren mit zwei Carboxyl-Gruppen erfordert eine minimale PEG-Molmasse von ~ 1000 g/mol, um Aggregation vollständig zu verhindern. Für die in den nächsten Abschnitten beschriebene systematische Entwicklung von positiven und negativen Kontrastmitteln werden verschiedene Strategien verwendet. Die hier dargestellten homogendispersierten Partikel werden auf ihre Eignung als T_1 -Kontrastmittel untersucht. Sowohl zur Entwicklung von T_2 - als auch von T_2^* -Kontrastmitteln wird eine kontrollierte Aggregation der Teilchen in Mizellen ohne Ligandenaustausch verfolgt.

4.3 Entwicklung positiver MR-Kontrastmittel unter Verwendung nicht-aggregierter Eisenoxid-Nanopartikel

In 2.2.4 wurde ausgeführt, dass positive Kontrastmittel eingesetzt werden, um die intrinsische longitudinale Relaxationszeit T_1 eines Gewebes oder des Blutes zu reduzieren und somit einen verbesserten Kontrast zu den umliegenden Geweben zu ermöglichen. Grundsätzlich sind positive Kontrastmittel gegenüber den negativen weniger artefaktbehaftet und ermöglichen somit eine höhere Auflösung^[92-94]. Da die longitudinalen Relaxivitäten aber gering im Vergleich zu den transversalen Relaxivitäten typischer Negativ-Kontrastmittel sind, müssen, um eine hinreichende Signalveränderung im zu untersuchenden Bereich zu erzielen, größere Injektionsdosen eingesetzt werden. Neben den bereits erwähnten konventionellen Gadolinium-Komplexen sind in den vergangenen Jahren auch Kontrastmittel auf Basis paramagnetischer Nanopartikel entwickelt worden. So wurden beispielsweise $Gd(PO_4)$ -Nanopartikel untersucht, welche sich insbesondere durch ein geringes r_2/r_1 -Verhältnis auszeichnen^[95]. Gadolinium-basierte Kontrastmittel haben sich unter toxikologischen Gesichtspunkten allerdings als kritisch herausgestellt und können Patienten mit eingeschränkter Nieren-Funktion nicht mehr verabreicht werden^[96, 97]. Es werden daher gegenwärtig zahlreiche weitere Materialien getestet^[98]. So wurden unter anderem antiferromagnetische MnO-Nanopartikel unterschiedlicher Größe getestet und gezeigt, dass die r_1 -Relaxivität stark vom Oberflächenanteil abhängt und somit für kleinere Partikel größer ist^[99]. Insgesamt sind die MnO-basierten T_1 -Kontrastmittel aber durch geringe Relaxivitäten gekennzeichnet. Auch Eisenoxid-Nanopartikel sehr kleiner Größe, sogenannte USPIO, werden für die T_1 -gewichtete Bildgebung verwendet und durch weitere Arbeiten optimiert^[93]. Sie stellen wegen ihrer hohen Biokompatibilität eine wichtige Alternative zu den Gd-basierten T_1 -Kontrastmitteln dar^[100]. Sie besitzen eine Hülle aus Citrat und sind daher unter Stabilitätkriterien nur sehr limitiert einsetzbar. Generell ist Eisenoxid für die T_1 -gewichtete Bildgebung nur unter bestimmten Voraussetzungen geeignet. In Abb. 4.20 ist schematisch das Anwendungsspektrum heutiger klinischer Eisenoxid-Kontrastmittel dargestellt.

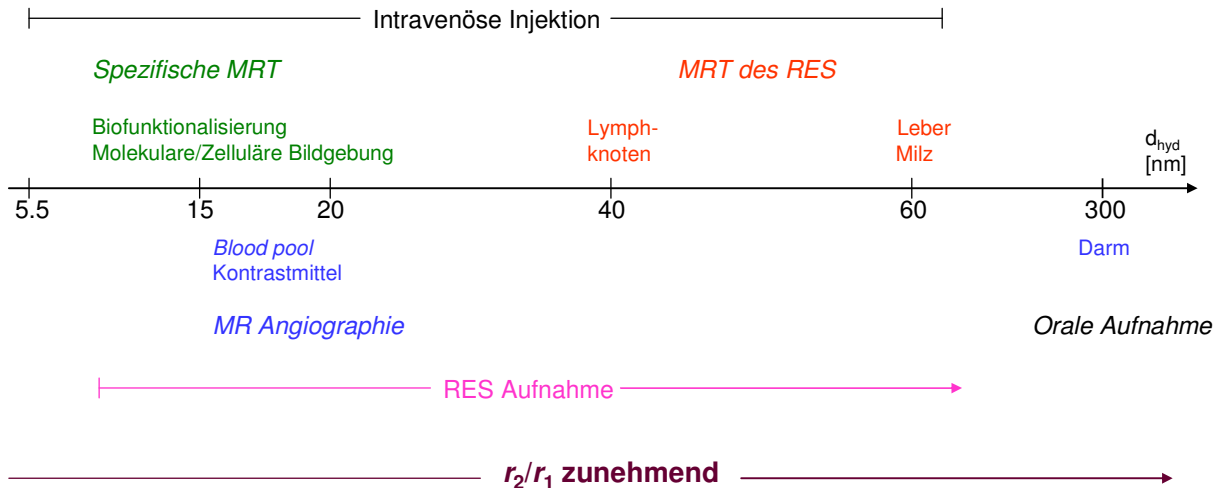


Abb. 4.20: Klassifizierung der Eisenoxid-MR-Kontrastmittel nach deren hydrodynamischen Durchmesser. Je größer die Teilchen sind, desto höher ist deren r_2/r_1 -Verhältnis und desto besser die Eignung als negatives Kontrastmittel.

Da mit ansteigendem hydrodynamischem Durchmesser infolge der zunehmenden Neigung zur Aggregation das r_2/r_1 -Verhältnis größer wird, sind nur kleine Partikel prädestiniert. Die typischen klinischen Vertreter zur MRT des Retikuloendothelialen Systems (RES) weisen große Aggregate und hydrodynamische Durchmesser auf und sind daher die typischen Vertreter negativer Kontrastmittel. Das RES ist ein Teil des Immunsystems und dient der Abwehr und Beseitigung von Fremdpartikeln und Krankheitserregern^[101]. Generell besitzen Eisenoxid-Nanopartikel hohe r_1 -Relaxivitäten. Die Einschränkung ihrer Anwendung liegt eher in der zu hohen r_2 -Relaxivität. Diese wird nach Gl. 2.21 begrenzt, indem Aggregation verhindert wird und die Sättigungsmagnetisierung sowie der Langevin-Term $L(x)$ minimiert werden. Die in 4.2 beschriebenen 4 nm großen Fe_3O_4 -Nanopartikel erfüllen diese Bedingungen und werden im Folgenden für die T_1 -gewichtete Bildgebung verwendet.

4.3.1 Stabilitätsuntersuchungen an PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikeln

Der Grund für den Einsatz von Polyethylenglykol als Ligand für die superparamagnetischen Nanopartikel ist nicht nur die Biokompatibilität dieses Moleküls sondern hauptsächlich die erwartete kolloidale Stabilität der Teilchen unter physiologischen Bedingungen. Die Teilchen müssen über einen gewissen pH-Bereich, insbesondere zwischen pH=5 und pH=9 stabil sein. Darüber hinaus darf die im Blutserum gegebene ionische Stärke (ca. 150 mM NaCl) zu keiner Aggregation der Teilchen führen. Der schwierigste Aspekt im Hinblick auf Stabilität liegt jedoch in der unspezifischen Adsorption von Proteinen aus dem Blutplasma, welche eine

unkontrollierte Phagozytose des Kontrastmittels durch Makrophagen des Retikulo Endothelialen Systems (RES) zur Folge haben könnte und außerdem eine adsorptionsinduzierte Aggregation der Teilchen bewirken kann.

Alle Stabilitätsuntersuchungen fanden bei physiologischer Temperatur (37 °C) statt. Um die Parameter pH und ionische Stärke zu untersuchen, wurden die Partikel in Puffer-Lösungen über bestimmte Zeiträume inkubiert und der hydrodynamische Durchmesser der Partikel mittels DLS gemessen, um eine mögliche Aggregation festzustellen. Abb. 4.21 zeigt die Inkubation 4 nm großer Fe_3O_4 -Nanopartikel (PEG-1100-Phosphat) in Tris-NaCl-Puffer (pH=7.4, 150 mM NaCl) über 24 h. Der hydrodynamische Durchmesser der Partikel verbleibt bei ~8 nm.

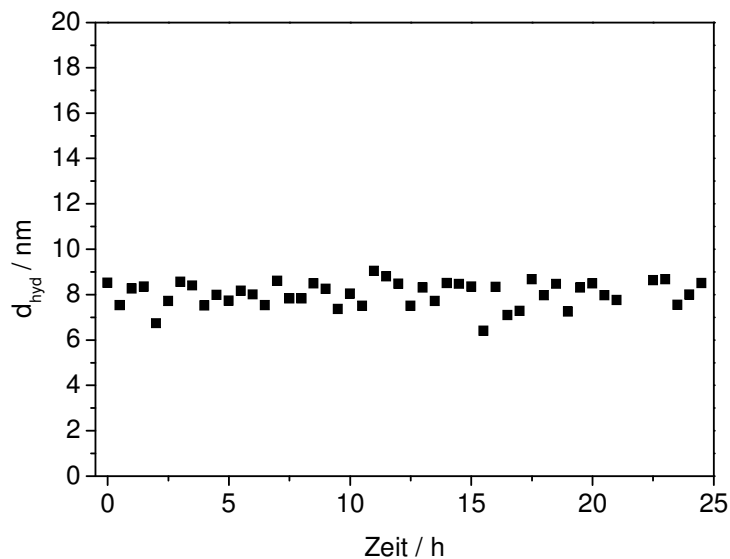


Abb. 4.21: Zeitlicher Verlauf des hydrodynamischen Durchmessers in 0.1 M Tris-HCl Puffer (150 mM NaCl) bei einer Inkubationstemperatur von 37°C.

Allgemein wurde beobachtet, dass Eisenoxid-Nanopartikel mit Phosphat-PEG-Liganden sowohl über einen breiten pH-Bereich, als auch bei ionischen Stärken von bis zu 2 M NaCl stabil sind. Bei 4 M NaCl ist nach Stunden eine vollständige Aggregation zu beobachten. Dieses Ergebnis wurde durch andere Untersuchungen mit optimierten PEGylierten Eisenoxid-Systemen bestätigt^[102]. Da unter physiologischen Bedingungen von einer ionischen Stärke von etwa 0.15 M NaCl auszugehen ist, ist für biomedizinische Anwendungen eine hinreichend hohe Stabilität gegeben.

Wichtiger als die bislang diskutierten Parameter pH und ionische Stärke hingegen ist die Stabilitätsuntersuchung in Gegenwart von Proteinen aus dem Blutserum. Die Partikel wurden dazu in Fötalem Kälber Serum (FCS) über einen Zeitraum von 2 h bei 37 °C inkubiert. Auch

hier wurde die Änderung des hydrodynamischen Durchmessers der Partikel untersucht, weil eine Adsorption von Serum-Proteinen auf den Teilchenoberfläche zu einer entsprechenden Vergrößerung im Teilchendurchmesser führen oder sogar eine Aggregation induzieren kann. Verwendet wurde hier aber die Größenausschluss-Chromatographie (GFC), da die Messung der dynamischen Lichtstreuung wegen des intensiven Streuverhaltens der Plasmaproteine nicht möglich ist. Für die Entwicklung eines T₁-Kontrastmittels ist diese Untersuchung sehr wichtig, da bereits kleinste Aggregat-Mengen die transversale Relaxationszeit verkürzen, was den Einsatz als T₁-Kontrastmittel unmöglich macht. Abb. 4.22 zeigt die erhaltenen GFC-Kurven für 4 nm große Eisenoxid-Nanopartikel mit PEG-Phosphaten unterschiedlicher Kettenlänge. Die Proben wurden in Tris-NaCl-Puffer sowie FCS inkubiert und anschließend säulenchromatographisch aufgetrennt. Der Eisennachweis in den Fraktionen erfolgte photometrisch mit Bathophenanthrolin. Aus Abb. 4.22 (a) geht hervor, dass der hydrodynamische Durchmesser von PEG-1000-umhüllten Teilchen in Serum zunimmt im Vergleich zu einer entsprechenden Probe, die unter identischen Bedingungen in einer Tris/NaCl-Pufferlösung inkubiert wurde. Dieser Anstieg ist auf die Adsorption von Proteinen auf der Teilchenoberfläche zurückzuführen. Abb. 4.22 (b) zeigt darüber hinaus, dass in Abhängigkeit vom verwendeten PEG deutliche Unterschiede im Ausmaß dieses Anstiegs zu erkennen sind.

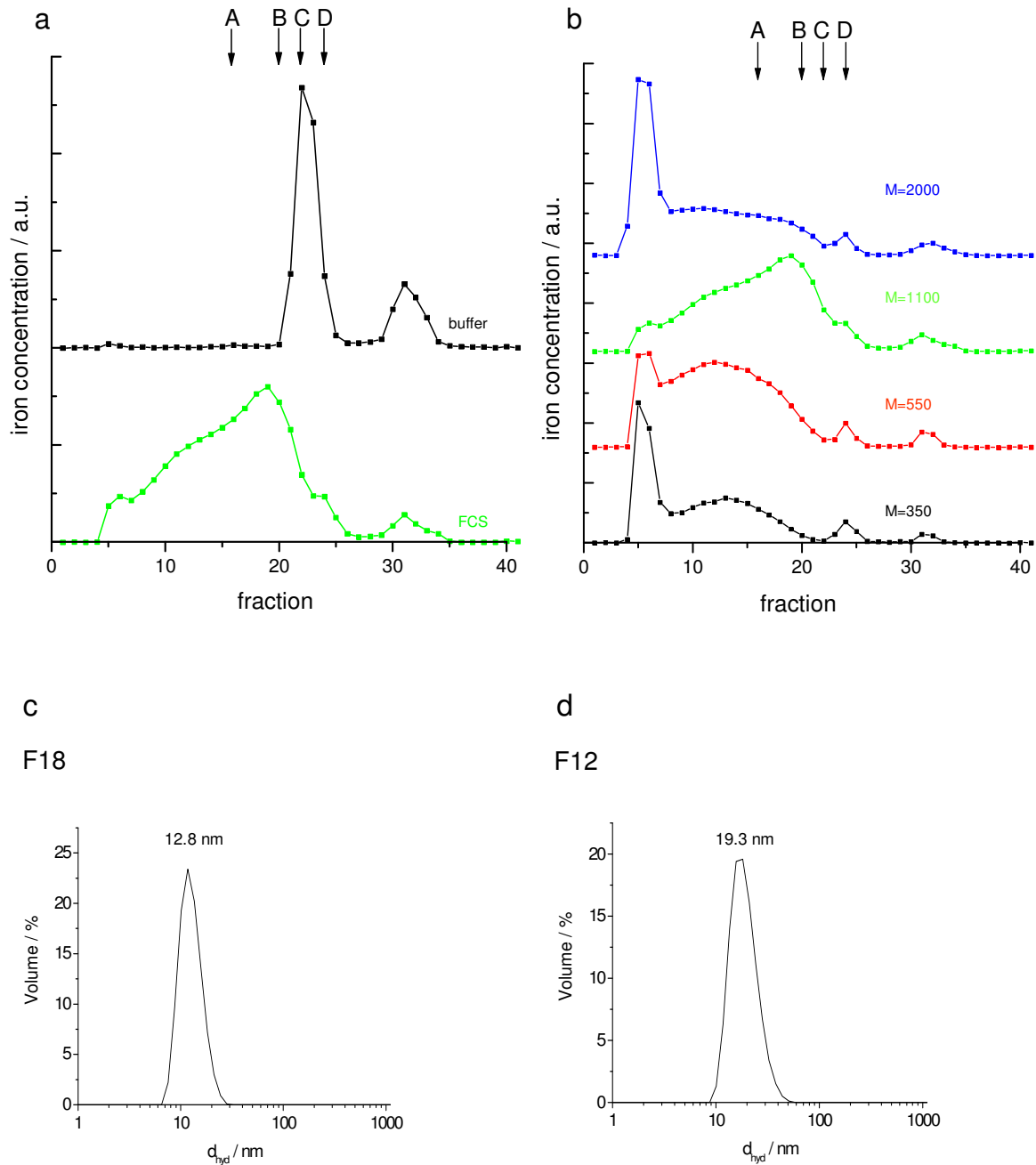


Abb. 4.22: GFC von PEG-beschichteten Fe_3O_4 -Nanopartikeln: a) GFC-Kurven von PEG-1100-umhüllten Nanopartikeln in Tris/NaCl-Puffer(schwarz) und Serum (grün) (2h, 37 °C). b) Stabilitätsvergleich verschiedener PEG-Kettenlängen unter gleichen Bedingungen (2h, 37 °C). MW-Standards A (Thyroglobulin, 669 kDa), B (Apoferritin, 443 kDa), C (Amylase, 200 kDa), D (Albumin, 66 kDa) sind durch Pfeile gekennzeichnet. DLS Messungen der GFC-Fractionen F18 (c) und F12 (d) bestätigen eine leichte Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers.

Die größten Durchmesser wurden für die PEG-350- und PEG-2000-umhüllten Teilchen bestimmt. Ein erheblicher Anteil der eingesetzten Teilchen findet sich hier in den Fraktionen

F5 und F6, die dem Ausschlussvolumen der Säule zuzuordnen sind. Bei diesen Proben ist es sogar zur einer Protein-induzierten Aggregation gekommen. Das PEG-550-Polymer zeigt eine höhere Stabilität, aber auch hier ist noch ein Anteil im Ausschlussvolumen der Säule zu finden. Die höchste Stabilität wurde für die PEG-1100-umhüllten Partikel festgestellt, die nur einen geringen Anstieg im hydrodynamischen Durchmesser aufweisen und somit die höchste Resistenz gegen die Adsorption von Serum-Proteinen zeigen. Es ist auf Grundlage dieser Untersuchungen bislang möglich, die Adsorption einzuschränken aber nicht vollständig zu verhindern. Bislang existieren nur wenige weitere systematische Untersuchungen zur unspezifischen Adsorption von Serum-Proteinen an Nanopartikel. So gelang es lediglich im Falle von CdSe/ZnS-Nanokristallen durch Thiol-funktionalisierte PEG-Moleküle oder durch das Zwitterion Cystein, eine Adsorption zu verhindern^[103].

Da auch das PEG-1000-MSA zu homogendispersierten Teilchen führte, wurde dieses Polymer verwendet, um bei gleicher PEG-Kettenlänge das Adsorptionsverhalten bei zwei chelatisierenden Carboxyl-Ankergruppen zu untersuchen. Abb. 4.23 zeigt die Ergebnisse dieses Experiments. Auch hier wurde unter identischen Bedingungen in Tris/NaCl-Puffer inkubiert. Zum Vergleich ist das PEG-1000-Phosphat-System dargestellt.

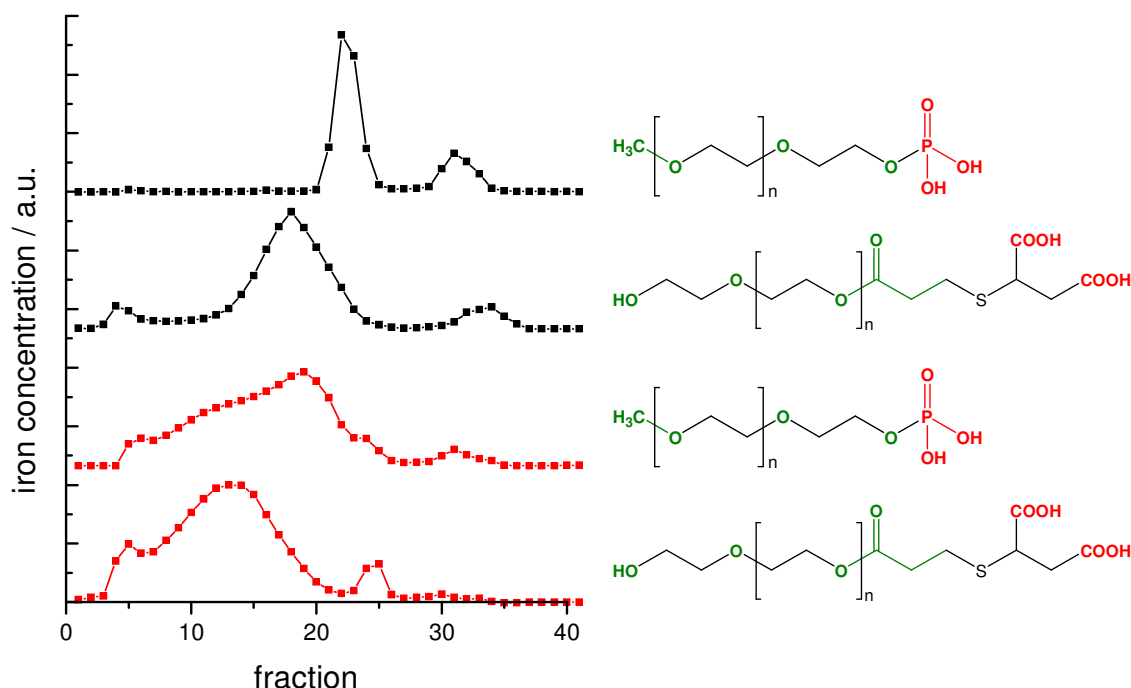


Abb. 4.23: Vergleich der GFC-Profile verschiedener Polymere gleicher Kettenlänge (PEG-1000), aber unterschiedlicher Ankergruppen. Inkubiert wurde für 2 h bei 37 °C in Tris/NaCl-Puffer (schwarz) und FCS (rot).

Wie aus Abb. 4.23 hervorgeht, weisen diese Teilchen bereits in der Puffer-Inkubation einen größeren hydrodynamischen Durchmesser sowie eine breitere Teilchengrößenverteilung auf. Dieses Ergebnis deckt sich mit den DLS-Messungen, in denen ein hydrodynamischer Durchmesser von ~12 nm bestimmt wurde. In Gegenwart von Plasma-Proteinen kommt es auch bei diesem Polymer zur Adsorption, wobei der hydrodynamische Durchmesser größer ist als bei vergleichbarer Inkubation mit dem Phosphat-Polymer gleicher Molmasse. Die Phosphat-Ankergruppe bindet offensichtlich sehr stark an die Teilchenoberfläche, wodurch eine dichte Belegung durch PEG-Moleküle bewirkt wird. Wie bereits diskutiert wurde, führt der Einsatz zweier chelatisierender Carboxyl-Funktionen zu weniger Aggregation während des Ligandenaustauschs als bei Polymeren mit nur einer Carboxyl-Funktion. Die Oberflächendichte ermöglicht aber trotzdem eine Protein-Adsorption. Da die PEG-Ketten in Wasser quellen, ist außerdem erkennbar, dass ein PEG-Molekül mit einer Molmasse von ~1000 g/mol (entspricht etwa 20 Ethylenoxid-Einheiten) zu einer optimalen Stabilität der Partikel führt. Es ist davon auszugehen, dass hier der Raum jenseits der Teilchenoberfläche minimiert wird, wodurch die Proteine sterisch an einer Adsorption gehindert werden. Eingehende Untersuchungen belegen, dass die Oberflächendichte und die damit verbundene Konformation von PEG-Molekülen entscheidenden Einfluss auf die Oberflächenadsorption von Plasma-Proteinen wie Albumin haben^[104]. Röcker *et al.* beobachteten die Bildung von 3.3 nm dicken Albumin-Monolagen um negativ geladene FePt- und CdSe/ZnS-Nanopartikel^[105].

4.3.2 Untersuchungen zur Kontrastgebung

Zur Untersuchung der kontrastgebenden Eigenschaften für die T_1 -gewichtete Bildgebung müssen verschiedene Parameter getestet werden. Einerseits muss die Relaxivität r_1 maximiert werden, um die Sensitivität des Kontrastmittels zu erhöhen und um die Injektionsdosen möglichst gering zu halten. Die andere Aufgabe besteht in der Minimierung des Verhältnisses der transversalen Relaxivität r_2 zur longitudinalen Relaxivität r_1 , damit das Kontrastmittel überhaupt für die positive MR-Bildgebung eingesetzt werden kann. Insofern ist auch der Einfluss von Parametern, die zu einer Erhöhung von r_2 führen, zu untersuchen. Alle hier durchgeführten Untersuchungen wurden mit einem minispec mq-60 NMR Relaxometer bei 1.41 T durchgeführt. Die Messung der T_1 -Relaxationszeiten erfolgte mit einer Inversion-Recovery-Sequenz unter Verwendung von 20 Inversionszeiten. Die in Abb. 4.24 a gezeigte Kurve beschreibt die zeitabhängige Rückkehr der longitudinalen Magnetisierung M_z vom Wert $-M_{z,0}$ unmittelbar nach dem 180° -Inversionspuls zur thermischen Gleichgewichtslage.

T_2 wurde durch eine Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)-Spinecho-Sequenz bestimmt. In Abb. 4.24 b ist der ermittelte Verlust der transversalen Magnetisierung M_{xy} in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

Zur Bestimmung der Relaxivitäten r_1 und r_2 wurden die inversen Relaxationszeiten der Konzentrationsreihe einer wässrigen Nanopartikel-Dispersion gegen die analytische Eisen-Konzentration aufgetragen. Die Steigung der ermittelten Ausgleichsgerade entspricht der konzentrationsunabhängigen Relaxivität.

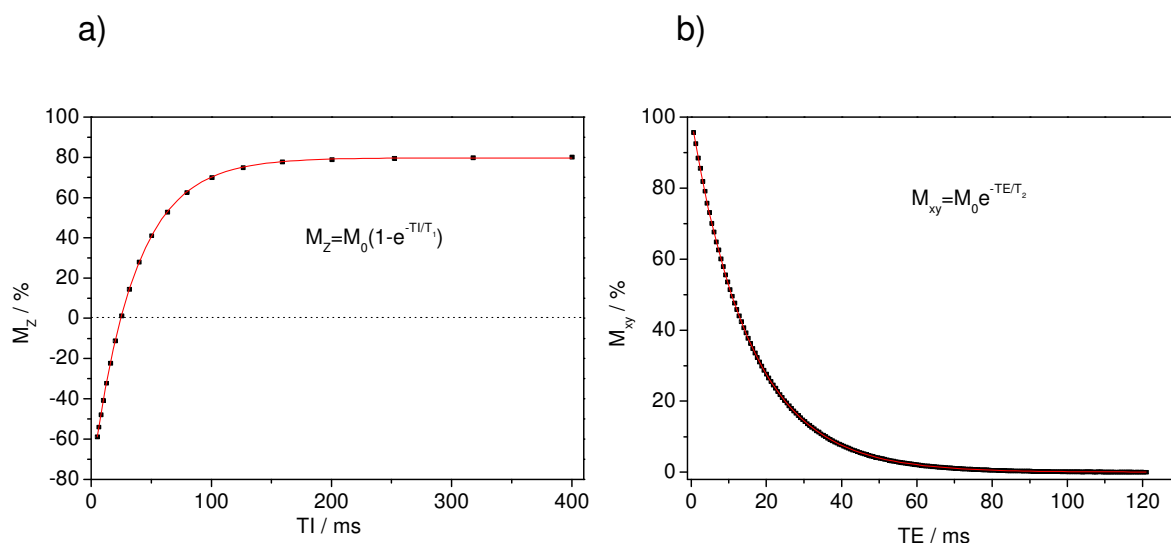


Abb. 4.24: Verlauf der z -Magnetisierung in Abhängigkeit von der Inversionszeit TI in der Inversion Recovery-Sequenz zur Bestimmung von T_1 (a). Verlauf der xy -Magnetisierung als Funktion der Echozeit TE im Spinecho-Experiment zur Messung von T_2 (b).

Wie in 2.2.4 erläutert wurde, ist die Gesamtelaxivität r_1 immer als Summe eines *inner-sphere* und eines *outer-sphere* Beitrages gegeben. Der *inner-sphere* Beitrag, welcher die direkte Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen den Protonen und dem magnetischen Dipol des Kontrastmittels beinhaltet, ist für ein T_1 -Kontrastmittel ein sehr wichtiger Beitrag. Er beschreibt die Relaxation aller Protonen, die direkt an das Kontrastmittel gebunden sind. Die Sättigungsmagnetisierung der Partikel trägt ebenfalls zur T_1 -Relaxation bei. Dieser Einfluss ist im Vergleich zur T_2 -Relaxation aber geringer. Daher sollten Nanopartikel, wie die in 4.2.2 beschriebenen Fe_3O_4 -Nanoteilchen mit dünnen wasserdurchlässigen Hüllen und großer Oberfläche für diese Anwendung besonders geeignet sein. Um das r_2/r_1 -Verhältnis zu minimieren, muss die r_2 -Relaxivität gleichzeitig minimiert werden. Die r_2 -Relaxivität wird maßgeblich durch den *outer-sphere*-Beitrag bestimmt. Dieser zeigt eine starke Abhängigkeit vom magnetischen Moment eines Partikels, von der Zahl der Partikel in einem möglichen

Aggregat sowie vom Grad der magnetischen Sättigung (Gl. 2.21). Da sich die PEG-Phosphate als besonders geeignet herausgestellt haben und unter physiologischen Bedingungen aggregationsstabile homogendispersierte kolloidale Systeme darstellen, wurden für die üblichen PEG-Kettenlängen (PEG-350 bis PEG-2000) die Relaxivitäten r_1 und r_2 bei einer klinisch relevanten Feldstärke von 1.41 T (60 MHz) bestimmt (Abb. 4.25).

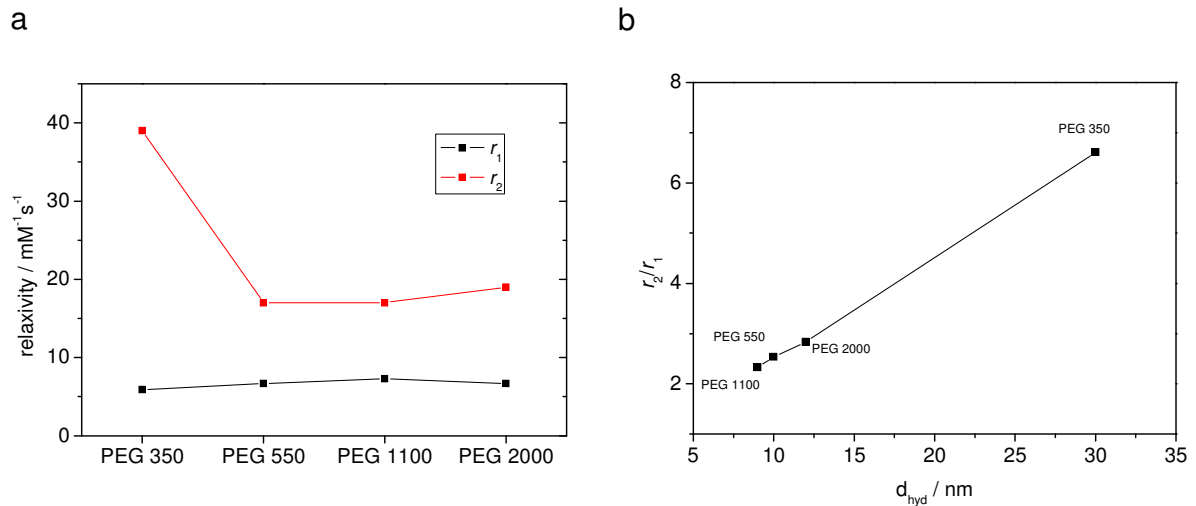


Abb. 4.25: a) Longitudinale und transversale Relaxivität der mit PEG-Molekülen unterschiedlicher Kettenlänge beschichteten Nanopartikel. b) Das r_2/r_1 -Verhältnis korreliert direkt mit dem hydrodynamischen Durchmesser der Partikel.

Es ist deutlich erkennbar, dass die r_1 -Relaxivitäten in einem Bereich von $5.9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ für das PEG-350-Molekül bis zu einem Wert von $7.3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ für das PEG-1100 ansteigen. Für die PEG-2000-beschichteten Teilchen ist die Relaxivität wieder geringer. Die r_2 -Relaxivitäten zeigen einen umgekehrten Trend ($r_2=39 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ für PEG-350 und $17 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ für PEG-1100). In Abb. 4.25 b sind die für die jeweiligen Proben bestimmten r_2/r_1 -Verhältnisse gegen den mittels DLS bestimmten hydrodynamischen Durchmesser aufgetragen. Es ist deutlich erkennbar, dass das r_2/r_1 -Verhältnis mit dem hydrodynamischen Durchmesser, also der Neigung zur Aggregation korreliert. Die Verwendung des PEG-1100-Polymers führt zum niedrigsten hydrodynamischen Durchmesser bei einem r_2/r_1 -Verhältnis von 2.4. Dieses Ergebnis zeigt, dass diese Probe eine maximale Sensitivität (hohen r_1 -Koeffizienten) und gleichzeitig einen niedrigen r_2/r_1 -Wert aufweist, was sie für den Einsatz in der positiven MR-Bildgebung (etwa in der MR-Angiographie) bei einer klinisch relevanten Feldstärke prädestiniert.

Zum Vergleich wurden als Standards typische klinisch eingesetzte Kontrastmittel unter identischen Bedingungen vermessen (Abb. 4.26).

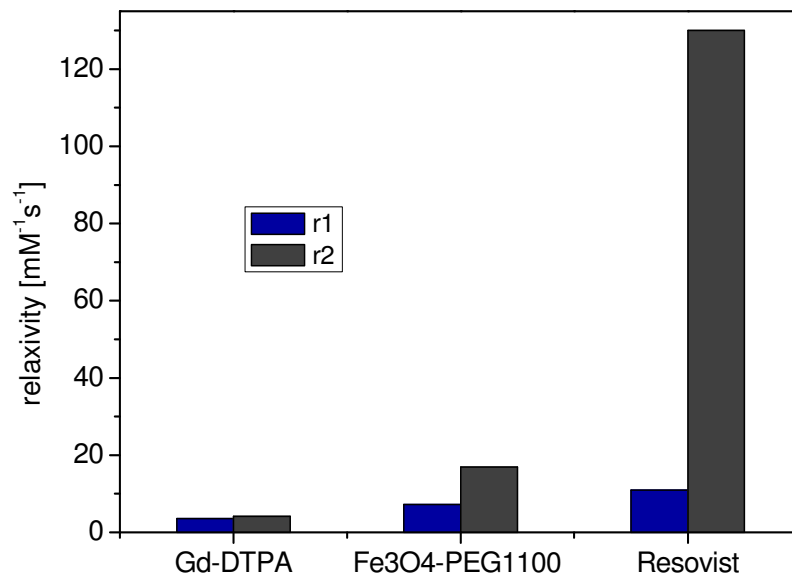


Abb. 4.26: Longitudinale und transversale Relaxivitäten der PEG-1100-beschichteten 4 nm großen Fe_3O_4 -Nanopartikel im Vergleich zu denen von Magnevist® (Gd-DTPA) und Resovist®.

Einerseits wurde Magnevist® als ein typisches Gd-basiertes T_1 -Kontrastmittel vermessen (Gd-DTPA). Dabei ergab sich eine r_1 -Relaxivität von $3.6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, die etwa einen Faktor zwei unter dem optimierten Eisenoxid-System liegt. Das r_2/r_1 -Verhältnis liegt mit 1.2 in einem für paramagnetische Komplexe typischen Bereich. Außerdem wurden die Relaxivitäten des typischen T_2 -Kontrastmittels Resovist® vermessen. Dieses besteht aus Dextran-umhüllten Eisenoxid-Aggregaten und weist einen hydrodynamischen Durchmesser von $\sim 60 \text{ nm}$ auf. Es ergab sich für r_1 ein Wert von $11 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, während r_2 $130 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ betrug. Während r_1 also vergleichbar hoch ist, konnte beim optimierten PEG-1100-Eisenoxidsystem die transversale Relaxivität deutlich limitiert werden. Gleichzeitig stellt es bezogen auf die analytische ionale Konzentration ein effektiveres positives Kontrastmittel als Magnevist® dar. Auch Taupitz *et al.* entwickelten ein positives Kontrastmittel auf Basis sehr kleiner Eisenoxid-Partikel (hydrodynamischer Durchmesser $\sim 7 \text{ nm}$)^[106]. Das bestimmte r_2/r_1 -Verhältnis beträgt ebenfalls 2.4 bei 1.41 T ^[107]. Die Teilchen besitzen allerdings eine Hülle aus Citrat, wodurch die biologische Stabilität der Teilchen geringer sein sollte.

Da das PEG-1100-Phosphat-Polymer im Falle der 4 nm großen Fe_3O_4 -Nanopartikel die günstigsten relaxometrischen Eigenschaften bewirkte, wurde dieses Polymer verwendet, um

6 nm große Fe_3O_4 -Partikel zu beschichten und somit den Einfluss der Kerngröße auf die Relaxivitäten zu untersuchen. Auch bei den PEGylierten 6 nm großen Teilchen wurde ein hydrodynamischer Durchmesser von ~ 10 nm gemessen.

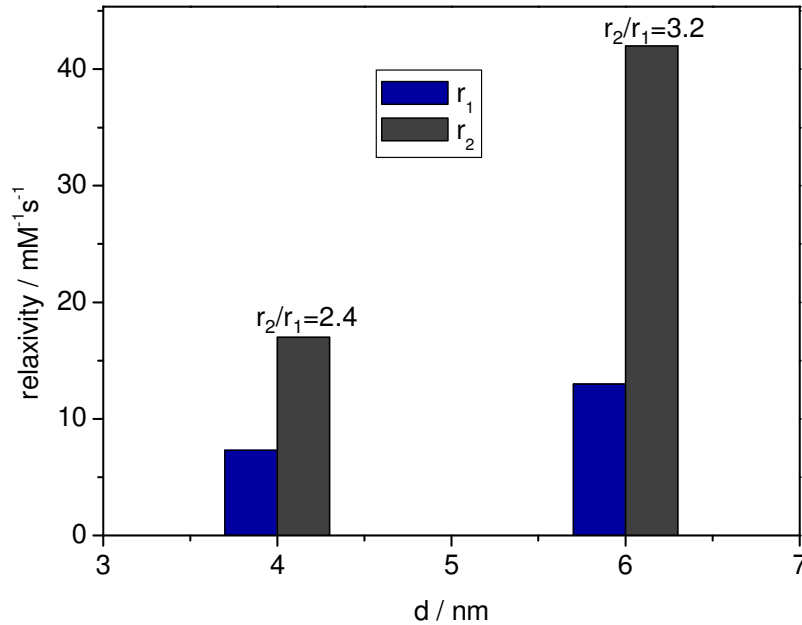


Abb. 4.27: Vergleich der r_1 - und r_2 -Relaxivitäten für 4 und 6 nm große Fe_3O_4 -Nanokristalle. Sowohl die Relaxivitäten als auch das r_2/r_1 -Verhältnis steigen mit zunehmender Teilchengröße.

Wie aus Abb. 4.27 hervorgeht, nehmen mit steigendem Teilchendurchmesser bei vergleichbarem hydrodynamischem Durchmesser sowohl r_1 als auch r_2 zu. Für 6 nm große Magnetitpartikel ergab sich r_1 zu $13 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ und r_2 zu $42 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Dadurch erhöht sich auch das r_2/r_1 -Verhältnis auf einen Wert von 3.2. Es kann demnach geschlussfolgert werden, dass die Kristallgröße auf ~ 5 nm begrenzt werden muss, um das System für die T_1 -gewichtete Bildgebung einzusetzen. In diesem Fall liegt der Grund aber nicht in der durch Aggregation bewirkten Abnahme der Oberfläche, sondern im Anstieg der Sättigungsmagnetisierung bei Größenzunahme, welche direkt proportional zur Relaxationsrate R_2 ist.

Um zu untersuchen, ob die Teilchen unter physiologischen Bedingungen ihre relaxometrischen Eigenschaften behalten, wurden die Relaxationszeiten in Serum über einen Zeitraum von 24 h bei 37°C gemessen. Es zeigte sich, dass die in 4.3.1 beschriebene Adsorption von Serum-Proteinen keinen messbaren Einfluss auf die Relaxationszeiten T_1 und T_2 hat. Auch wenn es dadurch zu einer leichten Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers kommt, behalten die Partikel ihre kontrastgebenden Eigenschaften vollständig bei.

4.3.3 Untersuchungen zur Toxizität

Bisher wurden im Rahmen der systematischen Entwicklung eines positiven MR-Kontrastmittels kleine PEGylierte Eisenoxid-Nanopartikel im Hinblick auf Stabilität und Kontrastgebung untersucht. Im Folgenden sollen die biologischen Eigenschaften dieser Kontrastmittel erforscht werden. Dabei geht es einerseits um eine mögliche akute Toxizität der Teilchen und andererseits um die quantitative Aufnahme der Nanopartikel durch bestimmte Zellen, insbesondere der phagozytisch aktiven Makrophagen in Leber, Milz und Knochenmark. Für die Toxizitätsuntersuchungen wurden ebenfalls diese Zellen verwendet. Die Untersuchungen wurden am Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf im Institut für Molekulare Zellbiologie von Prof. Dr. Ulrike Beisiegel in Kooperation mit Dr. Oliver Bruns durchgeführt. Außerdem wurden humane Zellen aus Lunge (A549), Darm (CaCo-2) und Haut (Fibroblasten) ausgewählt, um die typischen Aufnahmewege abzudecken. Diese Tests wurden im Centrum für Angewandte Nanotechnologie unter der Leitung von Dr. Tatjana Achenbach und Dr. Andrea Salcher durchgeführt.

Abb. 4.28 zeigt das Ergebnis eines MTT-Zellviabilitätstests für murine Makrophagen der Tumorzelllinie J774, welche 24 h lang mit den PEG-beschichteten Fe_3O_4 -Nanopartikeln inkubiert wurden. Makrophagen sind ein biologisch relevantes System, da sie als Teil des RES anorganische Partikel aus dem Blut durch Phagozytose aufnehmen, sofern diese nicht klein genug für eine renale Ausscheidung sind^[108] oder eine biologische Spezifität anderer Art besitzen.

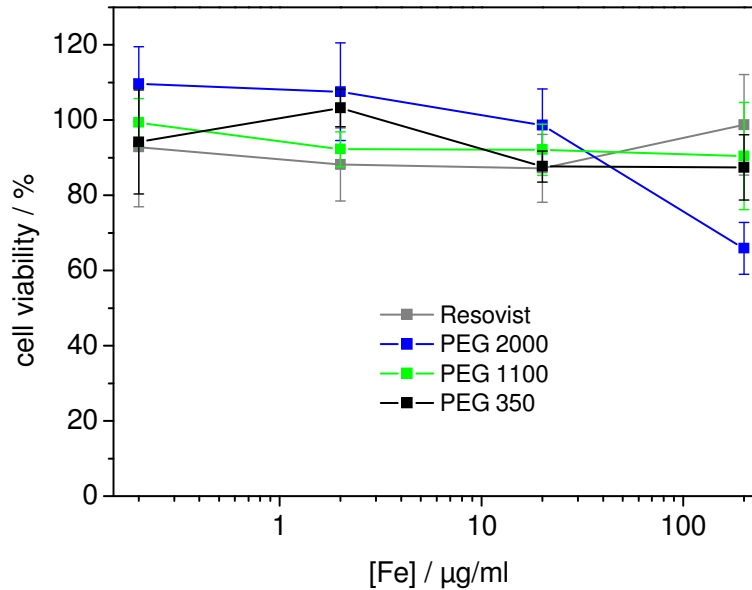


Abb. 4.28: MTT-Toxizitätstest für murine J774-Makrophagen mit PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikeln (Inkubationszeit: 24 h). Bei einer biologisch relevanten Konzentration von 200 µg Fe/ml ist nur für die PEG-2000-umhüllten Teilchen eine reduzierte Zellviabilität zu beobachten.

Als Referenz wurde auch in diesem Test das klinisch zugelassene Resovist® verwendet. Die angegebenen Viabilitäten wurden durch Achtfach-Bestimmungen ermittelt. Wie in Abb. 4.28 dargestellt, zeigen die Proben mit Ausnahme der PEG-2000-umhüllten Nanopartikel über den gesamten Konzentrationsbereich keine reduzierte Zellviabilität und liegen somit im Bereich von Resovist®. Bei einer Eisenkonzentration von 200 µg/ml ist die Zellviabilität der PEG-2000-beschichteten Teilchen signifikant geringer. Diese Konzentration ist als biologisch relevant angenommen worden, wobei typische Injektionsdosen für ein *in vivo* Mausexperiment zu Grunde gelegt wurden (0.2 ml Injektionsvolumen, 2 mg Fe/ml Injektionskonzentration, 2 ml Gesamtblutvolumen). Die reduzierte Zellviabilität ist möglicherweise auf die weniger dicht belegte Teilchenoberfläche zurückzuführen. Andere Untersuchungen belegen, dass die Zelltoxizität von Fe₃O₄-Nanopartikeln stark von der Oberflächenbeschaffenheit der Teilchen abhängt^[109]. So bewirken unbeschichtete Eisenoxid-Partikel eine erhebliche Reduktion der Zellviabilität^[110].

Die Untersuchungen der anderen Zellsysteme wurden in Kooperation mit dem Centrum für Angewandte Nanotechnologie (CAN) durchgeführt. Auch hier wurden Standard-Zelltests verwendet. So wurde die akute Toxizität für diese Zelllinien sowohl über Wst-8 als auch über das dazu komplementäre LDH-Verfahren untersucht. Der WST-8-Zelltest basiert auf der

Fähigkeit physiologisch aktiver Zellen, das Tetrazolium-Salz WST-8 zu reduzieren. Gebildet wird dabei der Farbstoff Formazan. Dieser Vorgang wird durch die mitochondriale Dehydrogenase, ein Enzym, katalysiert. Da nur physiologisch aktive Mitochondrien dieses Enzym enthalten, ist die Menge an gebildetem Formazan proportional zur Zahl lebender Zellen, welcher als Zellvitalität ausgedrückt wird. Messbar wird das Formazan direkt in den Zellen. Der Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Zelltest beruht ebenfalls auf der Detektion von Formazan. Allerdings findet die Messung hier im Überstand statt. Im Falle von Cytotoxizität kann die Zellmembran lysiert werden, wodurch das Enzym LDH aus dem Zellinneren freigesetzt werden kann. Anschließend kann es die Bildung von Formazan katalysieren.

Abb. 4.29 zeigt exemplarisch das Ergebnis der Wst-8- und LDH-Zelltests für PEG-1100-Phosphat-beschichtete 4 nm große Fe_3O_4 -Nanoteilchen für A549-Zellen.

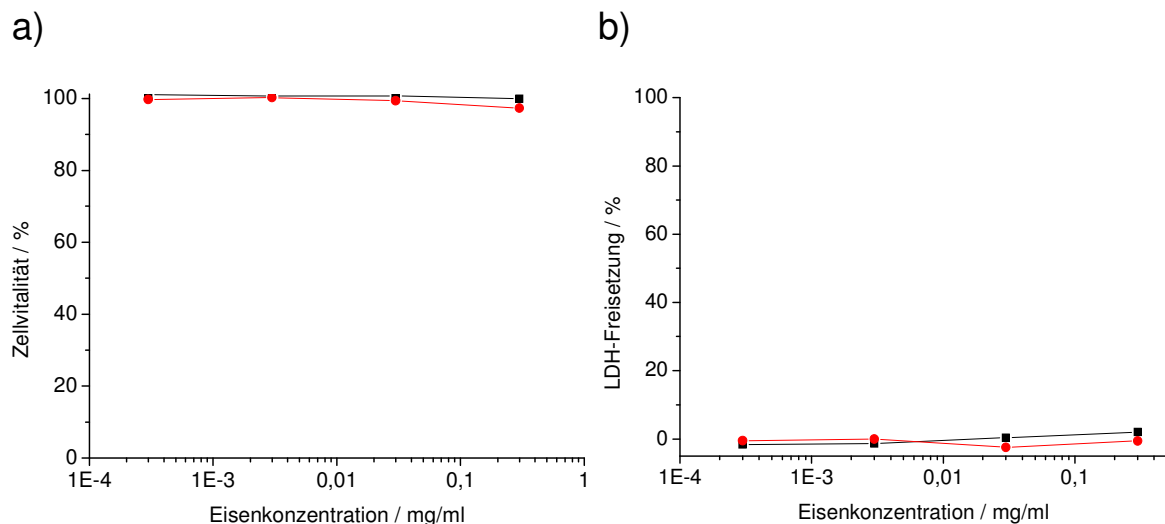


Abb. 4.29: a) Der Wst-8-Zelltest PEG-1100-Phosphat-umhüllter Fe_3O_4 -Nanopartikel (Zelllinie A 549) zeigt auch in der höchsten Inkubationskonzentration keine reduzierte Zellvitalität. b) Das LDH-Verfahren bestätigt den intakten Zellstoffwechsel, da kein LDH in den Überstand freigesetzt wird.

Abb. 4.29 a zeigt, dass auch bei Inkubationskonzentrationen von 200 μg Fe/ml eine Zellvitalität von 100 % bestehen bleibt, also keine akute Toxizität besteht. Die in Abb. 4.29 b dargestellte Lactat-Freisetzung bestätigt die intakte Funktionsweise der Zellen. Vergleichbare Ergebnisse wurden für die Zelllinien CaCo-2 sowie die humanen Fibroblasten erhalten.

Die bisher diskutierten Tests indizieren einen apoptotischen oder nekrotischen Zelltod. Als ein erstes Anzeichen für Toxizität kann die Bildung der *Reaktiven Sauerstoff Spezies* (ROS) angesehen werden. ROS wird im Cytoplasma und in Zellorganellen wie den Mitochondrien

gebildet. Es handelt sich dabei um oxidativen Stress der Zelle, welcher reversibel ist. ROS führt somit nicht zwangsläufig zum Zelltod und kann vollständig wieder abgebaut werden. Abb. 4.30 zeigt einen Inkubationsversuch von A 549-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der PEG-1100-Phosphat-beschichteten Fe_3O_4 -Nanopartikel. Als Referenz wurde Eisen(III)chlorid gemessen, welches in den bereits diskutierten Tests zu keiner reduzierten Zellvitalität führte und ungiftig ist.

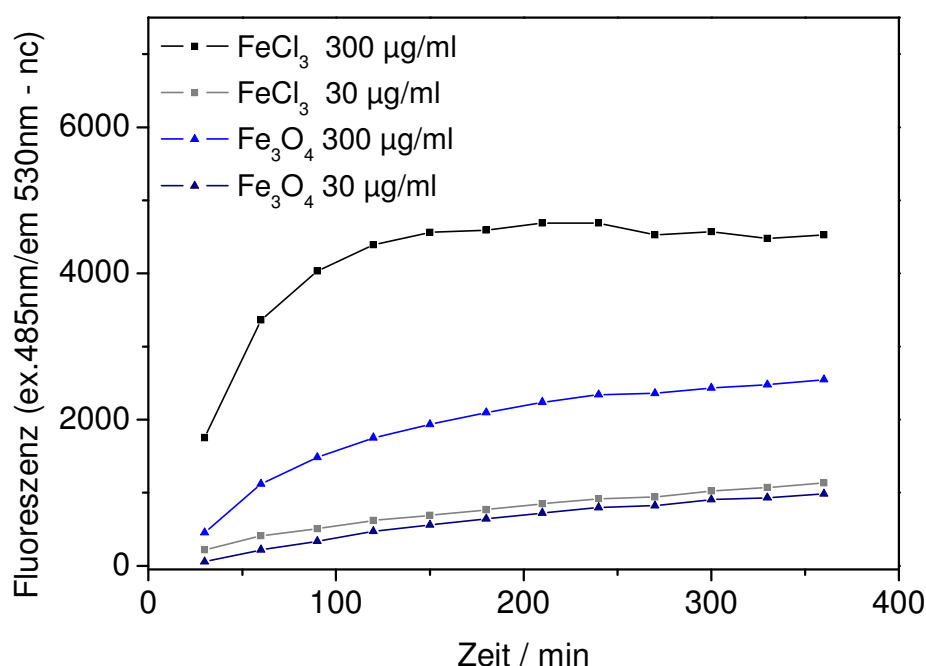


Abb. 4.30: ROS-Produktion von A 549-Zellen für PEGylierte Fe_3O_4 -Nanopartikel und Eisen(III)chlorid bei verschiedenen Inkubationskonzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit.

Zunächst zeigt sich erwartungsgemäß eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit der produzierten ROS-Menge sowohl für die Eisen(III)chlorid-Referenz als auch für die Nanopartikel. Andererseits nimmt der Stress der Zellen erst im Konzentrationsbereich zwischen 30 µg Fe/ml und 300 µg Fe/ml drastisch zu, wobei die PEGylierten Fe_3O_4 -Nanopartikel eine deutlich schwächere Stressantwort auslösen als Eisen(III)chlorid.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der verwendete Ligand einen entscheidenden Einfluss auf die Toxizität der Nanopartikel hat. Das PEG-1100-Phosphat-System, welches bereits im Hinblick auf Stabilität und Relaxivität die für die T₁-gewichtete Bildgebung günstigsten Ergebnisse lieferte, zeigte für keine der untersuchten Zelllinien im Tagesbereich eine Toxizität und löst auch in hohen Konzentrationen nur geringe oxidative Stressantworten aus.

4.3.4 Aufnahme der Nanopartikel in Zellen

Neben den bereits beschriebenen Untersuchungen zur Toxizität der PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikel ist die Untersuchung der Phagozytose durch Makrophagen im *in vitro* Zelltest wichtig, da hierüber Rückschlüsse auf die Bluthalbwertszeiten des Kontrastmittels gezogen werden können. Auch die Zellaufnahme sollte dabei mit den Eigenschaften der Liganden wie beispielsweise der PEG-Kettenlänge verknüpft sein. Außerdem sollte untersucht werden, inwiefern die im MTT-Zelltest beobachtete Toxizität mit dem Ausmaß der Phagozytose korreliert. Es wurden auch hier murine Makrophagen der Linie J774 verwendet und diese mit den PEGylierten Eisenoxid-Nanopartikeln in verschiedenen Konzentrationen über einen Zeitraum von 24 h inkubiert. Um das Eisen intrazellulär nachzuweisen, wurde eine Zellfärbung mit Berliner Blau durchgeführt. Abb. 4.31 zeigt Mikroskopie-Aufnahmen der Zellen, welche mit Nanopartikel unterschiedlicher PEG-Kettenlängen sowie dem klinischen Standard Resovist® inkubiert wurden.

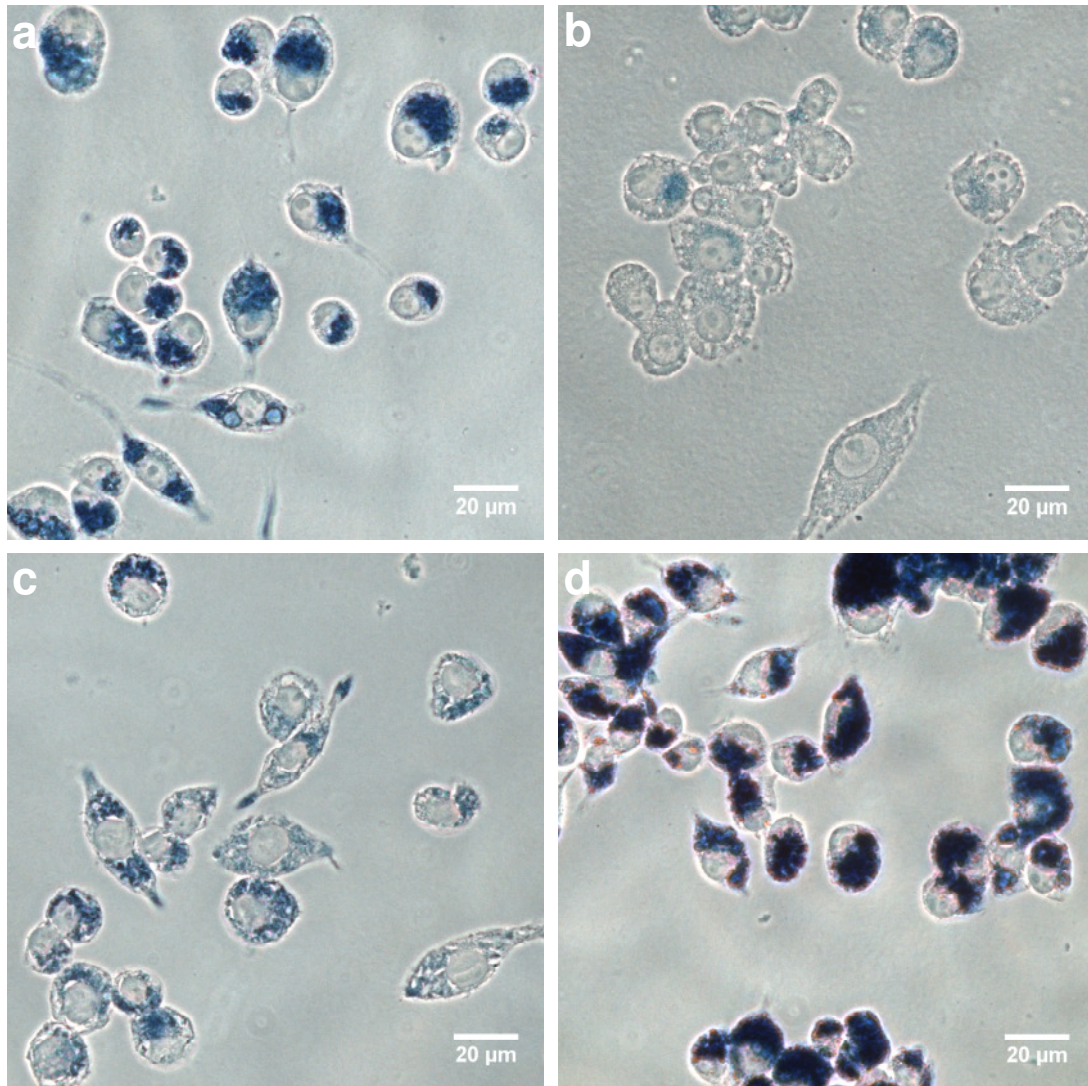


Abb. 4.31: Berliner Blau-Zellfärbung der J774-Makrophagen bei einer Eisenkonzentration von 200 µg Fe/ml nach 24 h Inkubation. Beschichtet wurden die Nanopartikel mit PEG-350 (a), PEG-1100 (b) und PEG-2000 (c). Als Referenz wurde der klinische Standard Resovist® verwendet. Unterschiedliche Mengen der Eisenaufnahme sind deutlich erkennbar.

Es ist deutlich erkennbar, dass alle hier eingesetzten PEG-Moleküle im Vergleich zum klinisch applizierten Resovist® zu einer deutlichen Reduktion der unspezifischen Partikel-Aufnahme führen. Außerdem wurden in Abhängigkeit von der Kettenlänge deutliche Unterschiede in der Aufnahme festgestellt. Die PEG-1100-beschichteten Partikel zeigten das geringste Ausmaß an Phagozytose. Kürzere (PEG-350) und längere (PEG-2000) Ketten bewirkten eine höhere Aufnahme. Diese Beobachtungen stimmen mit dem beobachteten Trend der Stabilitäten (Kap. 4.3.1) überein. Die beobachtete Toxizität der PEG-2000-

umhüllten Teilchen ist vermutlich auf die im Vergleich zu den kürzeren PEG-Ketten weniger dicht belegte Oberfläche zurückzuführen.

Auf Grundlage der in diesem Kapitel gezeigten Ergebnisse gelang die Entwicklung eines positiven MR-Kontrastmittels auf der Basis von nicht-toxischem Eisenoxid. Diese Ergebnisse wurden publiziert^[111]. Neben der stabilen Phosphat-Ankergruppe erwies sich eine PEG-Kettenlänge von ~1000 g/mol als besonders günstig. Die so dargestellten Teilchen repräsentieren ein optimiertes System, welches hohe Stabilität, günstige relaxometrische Eigenschaften sowie niedrige Toxizität und unspezifische Phagozytose vereinigt.

4.3.5 Funktionalisierung von Eisenoxid-Nanopartikeln zur Kopplung an Biomoleküle

Bisher wurden PEGylierte Eisenoxid-Nanopartikel als neuartige T₁-Kontrastmittel vorgestellt. Um ihr Anwendungsspektrum aber nicht auf die Angiographie zu beschränken, müssen die PEG-Liganden an ihrem zum Lösungsmittel weisenden Ende über funktionelle Gruppen verfügen, die eine Kopplung an Biomoleküle erlauben. In einem ersten Schritt wurden dazu Polyethylenglykol-monoacrylate am OH-terminalen Ende phosphoryliert, um die robuste Phosphat-Ankergruppe einzuführen. Die Phosphorylierung mit POCl₃ musste in diesem Fall in Gegenwart stöchiometrischer Mengen Triethylamin durchgeführt werden, um säurekatalysierte Umlagerungsreaktionen am Acrylterminus zu verhindern. Ansonsten verläuft die Reaktion analog der in 4.2.1 beschriebenen PEG-Phosphorylierungen. Mittels ¹H-NMR-Spektroskopie wurde nach der Reaktion die Intaktheit der Acrylat-Funktion nachgewiesen. Diese bifunktionellen Liganden konnten nun in Ligandenaustauschreaktion auf die Oberfläche von Eisenoxid-Nanopartikeln gebunden werden. Das Polymer bindet über die Phosphat-Gruppe auf der Teilchenoberfläche. Die Acrylat-Gruppe steht als reaktive Einheit für weitere Reaktionen zur Verfügung. Über DLS konnte auch hier nachgewiesen werden, dass es sich in Lösung um nicht-aggregierte Partikel handelt. Die Acrylat funktionalisierten Teilchen können nun in Michael-Additionsreaktionen z.B. mit 3-Merkaptopropionsäure umgesetzt werden, um eine biofunktionalisierbare Carboxylgruppe einzuführen. Alternativ kann die Acrylat-Funktion auch mit anderen Thiolen umgesetzt werden (Abb. 4.32).

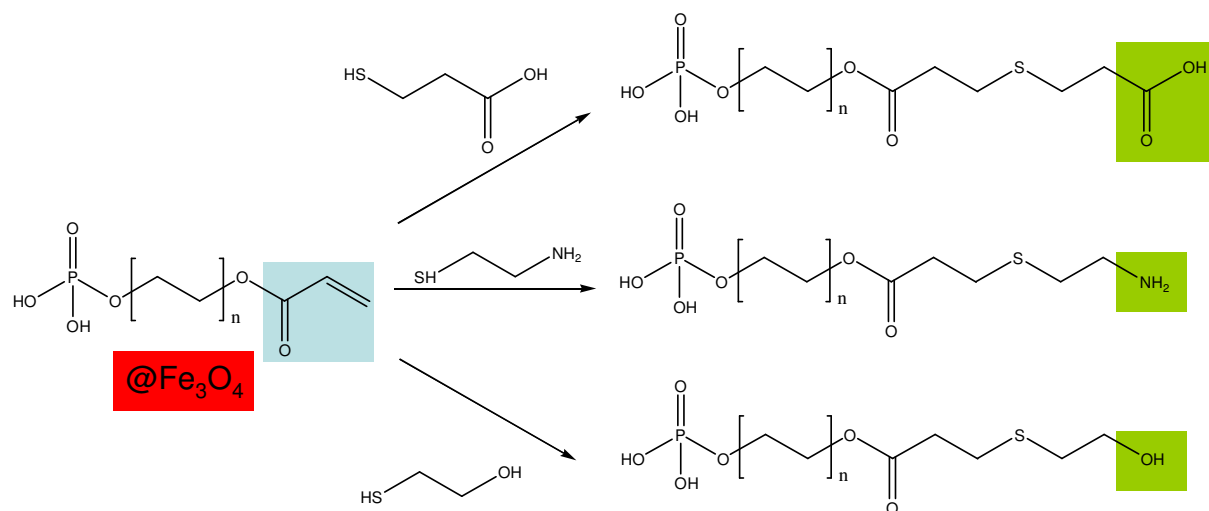


Abb. 4.32: Strategien zur Funktionalisierung von Fe_3O_4 -Nanopartikeln. Der Acrylat-Terminus kann in Michael-Additionen weiter umgesetzt werden.

Der Nachweis der Umsetzung erfolgt IR-spektroskopisch über die Verfolgung der symmetrischen Acrylat-Streckschwingung bei 812 cm^{-1} (Abb. 4.33). Nach quantitativer Umsetzung ist die Bande nicht mehr vorhanden. Überschüssiges Polymer wurde vor der Reaktion durch mehrmaliges Waschen der Teilchen entfernt.

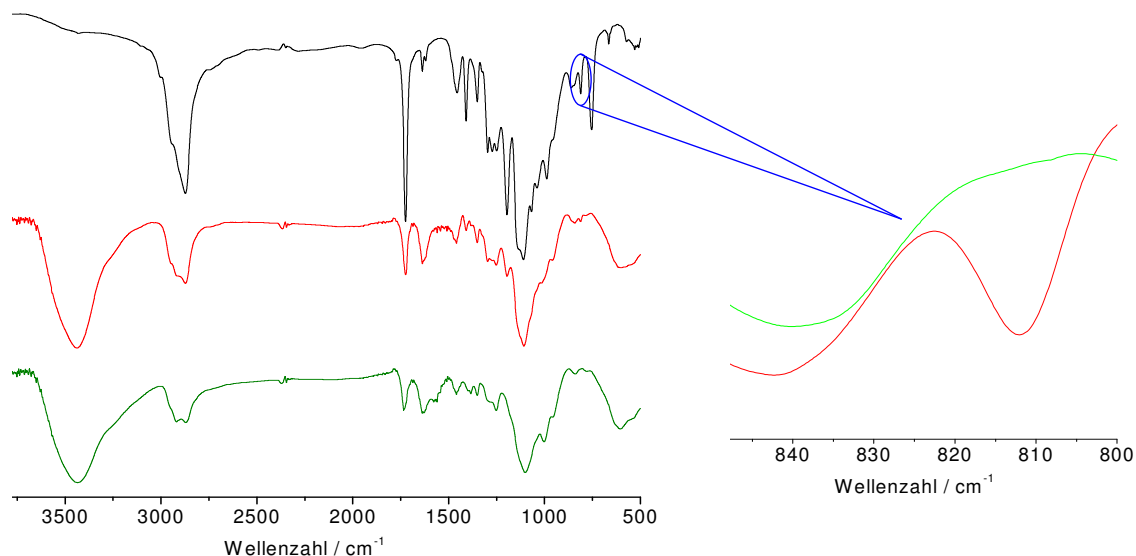


Abb. 4.33: IR-Spektren des Phosphat-PEG-1000-Acrylats vor (schwarz) und nach (rot) dem Ligandenaustausch an 4 nm großen Fe₃O₄-Nanopartikeln. Nach erfolgter Michael-Addition mit 3-Merkaptopropionsäure (MPA) ist keine symmetrische Acrylat-Schwingung mehr erkennbar (grün).

Die in diesem Kapitel beschriebene Funktionalisierung der Acrylat-Funktion nach dem Ligandenaustausch resultiert in keiner Aggregation der Teilchen, wie durch Lichtstreuung nachgewiesen werden konnte. Wird der Ligand mit Carboxylat-Funktion vollständig synthetisiert und erst dann zum Ligandenaustausch eingesetzt, entstehen wasserunlösliche Aggregate. In diesem Fall kann auch die Carboxylgruppe auf einer nicht abgeschirmten Teilchenoberfläche binden und somit individuelle Teilchen verbrücken, was zu großen Aggregaten führt. Die hier verwendete Variante sieht hingegen zunächst eine dichte Belegung der Teilchenoberfläche durch Phosphat-Ankergruppen vor.

4.4 Entwicklung negativer MR-Kontrastmittel

Dieser Teil der Arbeit befasst sich mit der systematischen Entwicklung negativer Kontrastmittel und ihrer Anwendung in der dynamischen Verfolgung des Lipoproteinstoffwechsels mittels MRT. Die Untersuchungen erstreckten sich sowohl auf T₂-gewichtete Spinecho-Sequenzen als auch auf T₂*-gewichtete Gradientenecho-Sequenzen. Die wesentlichen Ergebnisse dieses Abschnitts wurden bereits publiziert^[68, 112]. Die Arbeiten entstanden in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Molekulare Zellbiologie von Prof. Dr. Ulrike Beisiegel sowie der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie von Prof. Dr. Gerhard Adam am Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf.

4.4.1 Oberflächeneffekte auf die transversalen Relaxivitäten

Die Entwicklung von sensitiven negativen Kontrastmitteln stellt noch immer eine große Herausforderung dar. Die klinisch applizierten Vertreter bestehen aus polydispersen und aggregierten Eisenoxid-Partikeln (SPIO). Durch zahlreiche Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass die transversale Relaxivität, welche die Sensitivität des Kontrastmittels bestimmt, maßgeblich durch Teilchengröße, Oberflächenbeschaffenheit und Aggregation beeinflusst wird^[47, 113-115]. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst versucht, die verschiedenen Parameter und ihren Einfluss auf die transversalen Relaxivitäten r_2 und r_2^* zu untersuchen und voneinander abzugrenzen. Dazu wurden monodisperse Proben von MnFe₂O₄-Nanopartikeln in einem Größenbereich von 3-18 nm durch organometallische Hochtemperatursynthese^[37, 41] hergestellt und den in 4.2 dargestellten Oberflächenmodifikationen unterzogen. Anschließend wurden die transversalen Relaxivitäten r_2 und r_2^* bestimmt und verglichen. Die Untersuchung wurde mit MnFe₂O₄-Nanopartikeln durchgeführt, da Mn²⁺ mit einem magnetischen Moment von 5 μ_B eine höhere Sättigungsmagnetisierung von MnFe₂O₄ im Vergleich zu Magnetit (Fe₃O₄) bewirkt.

Zur Oberflächenmodifikation wurde zunächst ein Ligandenaustausch mit einem Poly(ethylenimin)-poly(ethylenglykol)-Copolymer durchgeführt. Dieses Polymer besitzt das Poly(ethylenimin) als Grundgerüst (400 g/mol) an welches zwei PEG-Ketten (5000 g/mol) gekoppelt sind^[75]. Der zweite Ansatz bestand in der Einkapselung einzelner Nanopartikel in einem amphiphilen Polymer (Poly(maleinsäureanhydrid-alt-1-tetradecen)) welches durch Bis(6-aminohexyl)amin quervernetzt wurde^[67]. Auch die dritte Variante des Phasentransfers bestand in der Einbettung der hydrophoben Nanopartikel. Allerdings wurden hier biologische

Lipide als Mizellenbildner verwendet. Die Lipide wurden aus humanen Lipoproteinen extrahiert und werden im Folgenden als SPIO-Nanosomen bezeichnet. Es entstanden Nanosomen mit einem hydrodynamischen Durchmesser von ~250 nm (DLS). Die Beladung der SPIO-Nanosomen mit Nanopartikeln konnte in einem gewissen Bereich gesteuert werden. Hingegen wurden über die ersten beiden Methoden einzelne homogen dispergierte Teilchen erhalten, was mittels DLS und GFC überprüft wurde. Exemplarisch sind in Abb. 4.34 dazu TEM-Aufnahmen der einzeln verkapselten Teilchen (a) und der SPIO-Nanosomen (b) gezeigt. Die Aufnahmen der SPIO-Nanosomen entstanden im Heinrich-Pette Institut unter der Leitung von Dr. Heinrich Hohenberg.

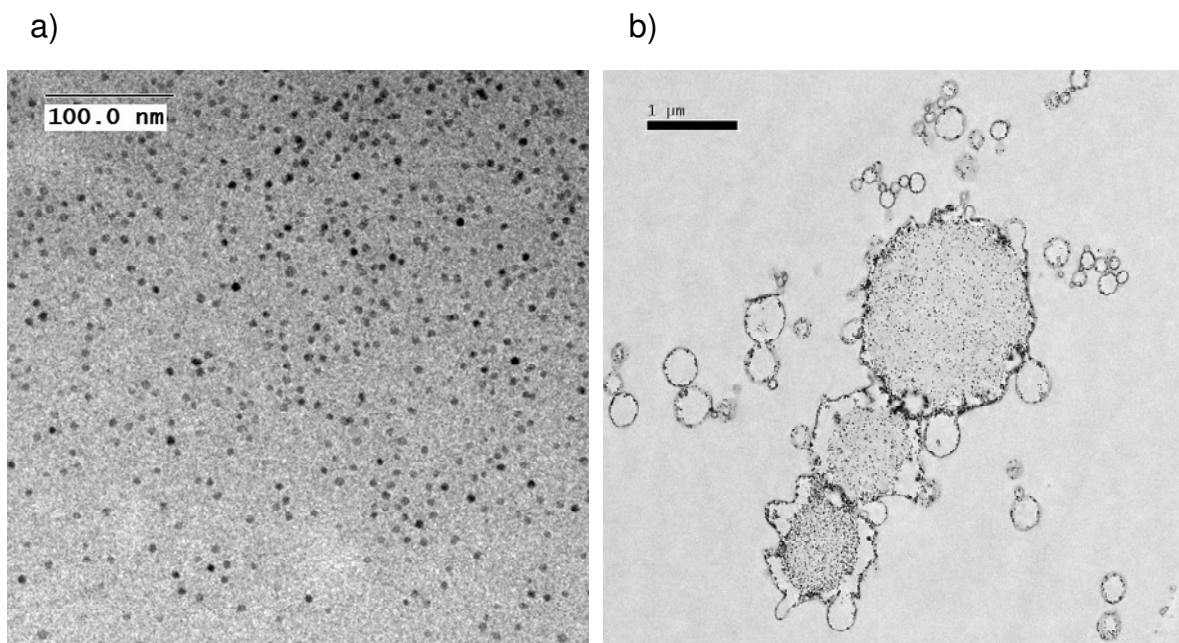


Abb. 4.34: TEM-Aufnahmen von nicht aggregierten MnFe_2O_4 -Nanopartikeln in amphiphiler Polymerhülle (a). SPIO-Nanosomen mit physiologischer Lipidkomposition (b).

Nach der Einkapselung im amphiphilen Polymer sind die Teilchen auf dem TEM-Probenträger zufällig verteilt und zeigen keine Aggregation. Die TEM-Aufnahme der SPIO-Nanosomen bestätigt die Einbettung der hydrophoben Nanopartikel im Lipid-Kern der Mizelle. Ferner bestätigt Abb. 4.35, dass die Teilchen im Lipid-Kern in Abwesenheit eines externen magnetischen Feldes nicht aggregiert, sondern dispergiert vorliegen.

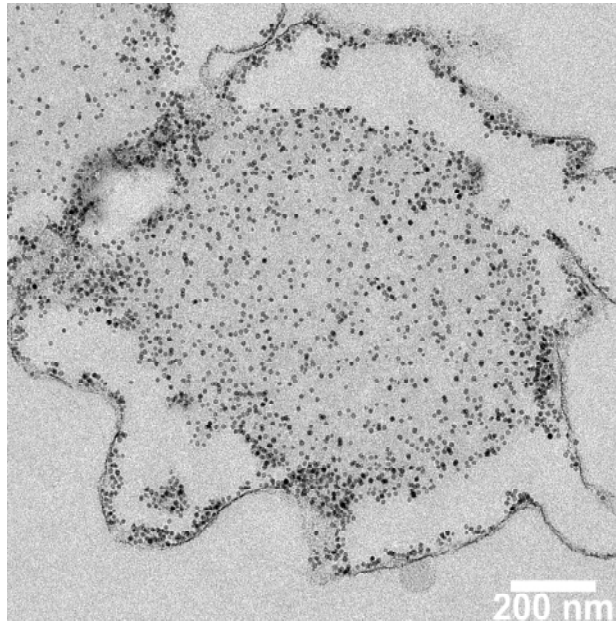


Abb. 4.35: Die TEM-Aufnahme der Nanosomen bestätigt, dass die Teilchen im Lipid-Kern nicht aggregiert sind.

Die Untersuchung der magnetischen Eigenschaften zeigt, dass die hier angewandten postpräparativen Oberflächenmodifikationen keinen Einfluss auf den Magnetismus der Partikel, insbesondere deren Suszeptibilitäten haben. Exemplarisch sind in Abb. 4.36 die reduzierten Magnetisierungskurven 6 nm großer Magnetit-Nanopartikel vor und nach der Einbringung in den Lipid-Kern der Nanosomen gezeigt.

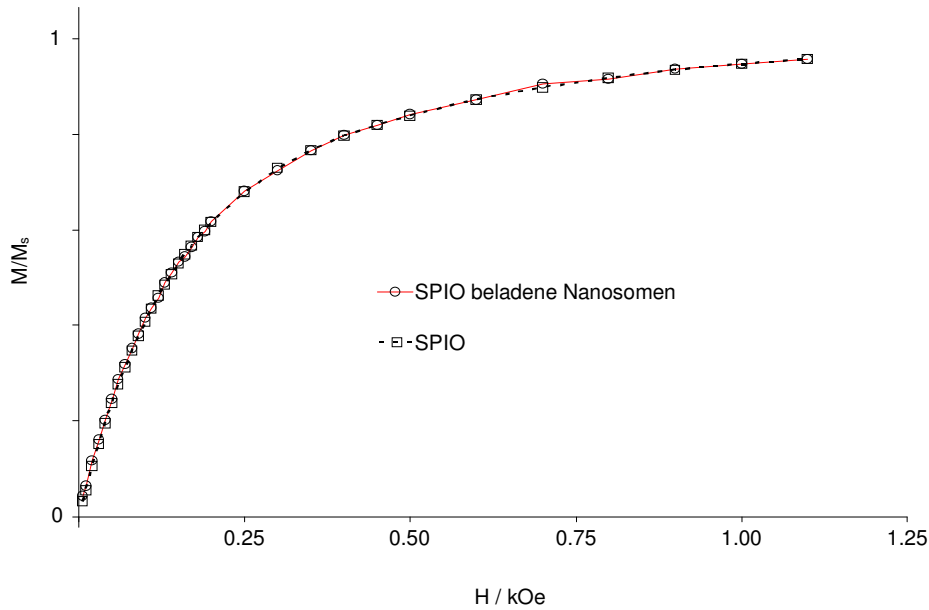


Abb. 4.36: Reduzierte Magnetisierungskurven superparamagnetischer Fe_3O_4 -Nanopartikel vor und nach dem Einbringen in die Nanosomen. Durch die Einbettung kommt es zu keiner Veränderung der Suszeptibilitäten. Beide Proben zeigen superparamagnetisches Verhalten.

Es ist deutlich erkennbar, dass beide Proben superparamagnetisch auf ein äußeres Magnetfeld reagieren. Da aber beide Kurven identisch verlaufen, ist davon auszugehen, dass sich die magnetischen Eigenschaften der Probe durch den Phasentransfer nicht ändern. Auch die absoluten Sättigungsmagnetisierungen M_s sind im Rahmen der analytischen Genauigkeit der Eisenbestimmung gleich. Gegen eine Änderung der magnetischen Eigenschaften spricht auch, dass die Teilchen in den Nanosomen, wie bereits diskutiert, nicht aggregiert vorliegen. Andere Arbeiten zeigen eine deutliche Abhängigkeit der Suszeptibilitäten von einer Aggregation der Partikel in Mizellen^[82].

Die Untersuchung der kontrastgebenden Eigenschaften erfolgte an einem klinischen Ganzkörper-Magnetresonanztomographen bei einer Feldstärke von 3 T und Raumtemperatur in der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Gerhard Adam. Zur Messung der Relaxationszeiten T_2 und T_2^* wurden typische Multi-Spinecho bzw. Multi-Gradientenecho-Sequenzen verwendet. Die resultierenden Relaxivitäten wurden auch hier mit Resovist® verglichen. Es wurden $MnFe_2O_4$ -Nanopartikel im Größenbereich von 3-18 nm verwendet und den drei beschriebenen Oberflächenmodifikationen unterzogen. Abb. 4.37 a zeigt die Relaxivitäten dieser Proben als Funktion des Teilchendurchmessers.

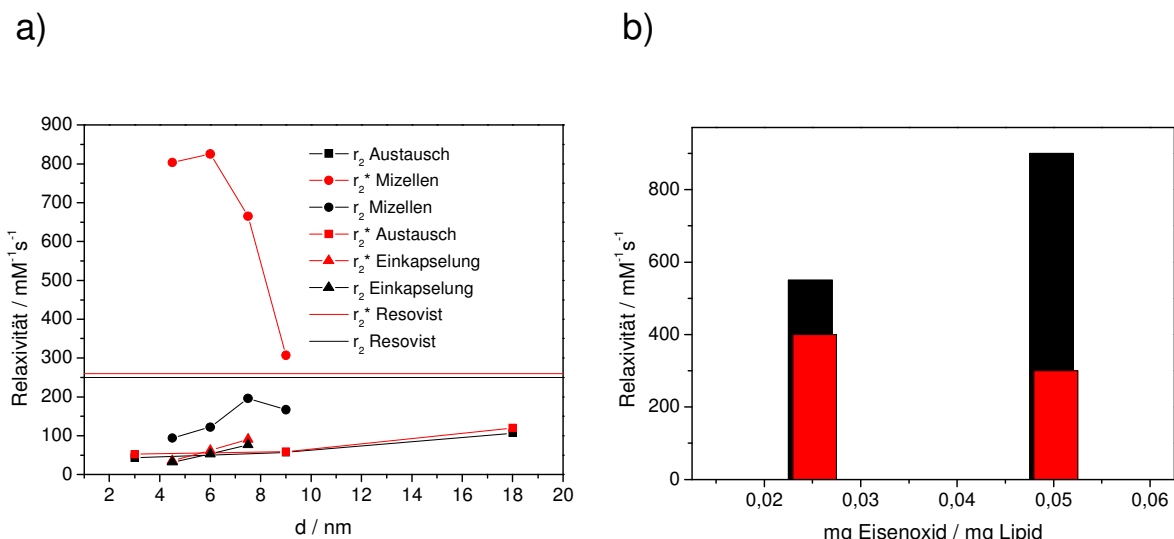


Abb. 4.37: r_2 - und r_2^* -Relaxivitäten der drei Oberflächenmodifikationen der MnFe_2O_4 -Nanopartikel (a). Einfluss der Mizellen-Beladung auf die Relaxivitäten für 6 nm große Fe_3O_4 -Nanopartikel (b).

Für die polymerumhüllten Proben ist ersichtlich, dass die transversalen Relaxivitäten r_2 und r_2^* mit steigender Teilchengröße zunehmen. Für eine betrachtete Probe sind die Werte für r_2 und r_2^* außerdem gleich. Für die großen mizellaren Nanosomen sind die Relaxivitäten deutlich höher. Außerdem unterscheiden sich hier die Werte für r_2 und r_2^* um bis zu eine Größenordnung. Der starke Abfall in r_2^* für die 9 nm großen Partikel entspricht nicht den Erwartungen und ist wahrscheinlich auf eine niedrigere Beladung der Mizellen zurückzuführen. Um den Einfluss der Beladung genauer zu überprüfen, wurde ein Kontrollexperiment mit 6 nm großen Fe_3O_4 -Nanopartikeln durchgeführt. Abb. 4.37 b zeigt, dass sich r_2 und r_2^* deutlich verändern, wenn in der Nanosomen-Präparation der Anteil an Nanopartikeln von 0.025 auf 0.05 mg Fe_3O_4 pro 1 mg Lipid erhöht wird. Mit zunehmender Beladung steigt r_2^* deutlich an, wohingegen r_2 leicht abnimmt. Daher kann der Schluss gezogen werden, dass die sehr hohen Relaxivitäten vor allem durch die hohe Partikeldichte im Inneren der Nanosomen verursacht werden. Teilchengrößeneffekte sind dagegen nicht so entscheidend. Das starke äußere Magnetfeld kann zudem eine Aggregation von Partikeln innerhalb der Nanosomen bewirken und somit zu starken Magnetfeldgradienten in der Umgebung der Nanosomen führen.

Es ist unter Zugrundelegung der in 2.2.4 eingeführten Theorien zur Kontrastverstärkung (*Motional Averaging Regime* (MAR), *Static Dephasing Regime* (SDR) und *Echo-Limiting* (EL)) davon auszugehen, dass die polymerumhüllten homogendispersierten Teilchen die

Bedingungen des MAR erfüllen^[116, 117]. r_2 und r_2^* sind gleich und steigen mit zunehmender Teilchengröße an. Der transversale Signalverlust wird hier durch Diffusion bewirkt und ist irreversibel. Der hydrodynamische Durchmesser der polymerumhüllten Teilchen ist zudem kleiner als der von Resovist ($d_{\text{hyd}} \sim 60$ nm), welches ebenfalls den Bedingungen des MAR genügt ($r_2=r_2^*$). Die großen Nanosomen befinden sich im Bereich des EL, da hier große Unterschiede zwischen r_2 und r_2^* zu beobachten sind. r_2^* ist also für das betrachtete System maximal groß. Mit zunehmender Beladung der Nanosomen steigt r_2^* , wie durch die SDR Theorie vorhergesagt, da r_2^* proportional zur Magnetisierung der Nanosomen, der so genannten lokalen magnetischen Dosis (LMD) ist^[118]. r_2 ist in Folge der echobedingten Refokussierung deutlich geringer als r_2^* .

Es wird festgestellt, dass zur Konstruktion eines negativen Kontrastmittels eine Aggregation von Partikeln beispielsweise in Mizellen zu hohen transversalen Relaxivitäten führt. Die hier verwendeten SPIO-Nanosomen zeigen extrem hohe r_2^* -Werte und sind somit das ideale Kontrastmittel für T_2^* -gewichtete Gradientenecho-Sequenzen. Ihre r_2^* -Relaxivität ist um einen Faktor drei höher als die des klinischen Standards Resovist und ist die höchste bislang publizierte r_2^* -Relaxivität bezogen auf die analytische Eisen-Konzentration. Da die Nanosomen aber auf Grund ihrer Größe geringere r_2 -Relaxivitäten besitzen, ist es zur Entwicklung eines T_2 -Kontrastmittels für Spinecho-Sequenzen sinnvoll, kleinere Mizellen mit optimierter Größe und somit maximaler r_2 Relaxivität zu verwenden. Die Entwicklung eines solchen Kontrastmittels wird im folgenden Kapitel beschrieben. Die hier verwendeten Nanosomen eignen sich dagegen hervorragend, um Stoffwechselvorgänge dynamisch zu verfolgen und zu quantifizieren. Dazu werden sie in 4.4.3 biofunktionalisiert.

4.4.2 Synthese eines T_2 -Kontrastmittels unter Verwendung von Triblockcopolymeren

Der Verlauf der transversalen Relaxivitäten r_2 und r_2^* in Abhängigkeit von der Größe einer magnetischen Sphäre wie einer Mizelle oder einer Zelle zeigt deutlich unterschiedliche Verläufe. r_2 steigt im Bereich des MAR zunächst an, durchläuft ein Maximum und fällt dann echozeitabhängig wieder ab. Um ein T_2 -Kontrastmittel maximaler Sensitivität herzustellen, sollten Mizellen hergestellt werden, deren Größe im Bereich dieser durch das SDR gegebenen maximalen Relaxivität liegen.

Es wurden dazu 10 nm große Fe_3O_4 -Nanopartikel hergestellt und in den hydrophoben Kern von Mizellen variabler Größe verpackt. Als Mizellenbildner wurden

Polyethylenglykol-polycaprolacton-polyethylenimin (PEG-PCL-PEI)-Triblockcopolymere verwendet (Abb. 4.38). Es ähnelt den in 4.4.1 verwendeten PEG-PEI-Copolymeren, die beiden Teile sind hier aber durch einen hydrophoben PCL-Block verbunden.

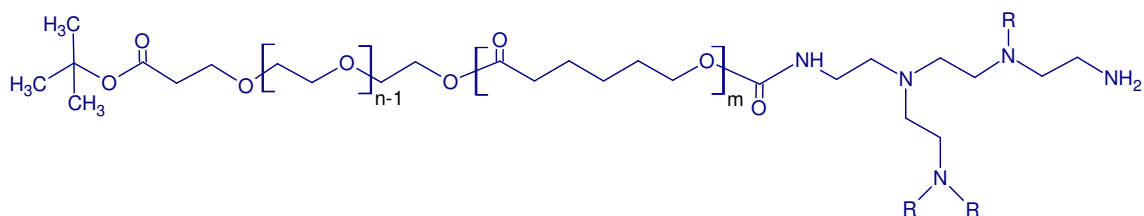


Abb. 4.38: Allgemeine Strukturformel der PEG-PCL-PEI-Triblockcopolymere.

Wie durch Pösel *et al.* gezeigt wurde, zeichnet sich dieses Polymer dadurch aus, dass die Mizellengröße über einen großen Bereich durch Veränderung der Präparationsparameter variiert werden kann^[119]. Durch Verwendung der 10 nm großen Fe_3O_4 -Nanopartikel war es so möglich, Mizellen in einem hydrodynamischen Größenbereich zwischen 80 und 180 nm herzustellen (Abb. 4.39).

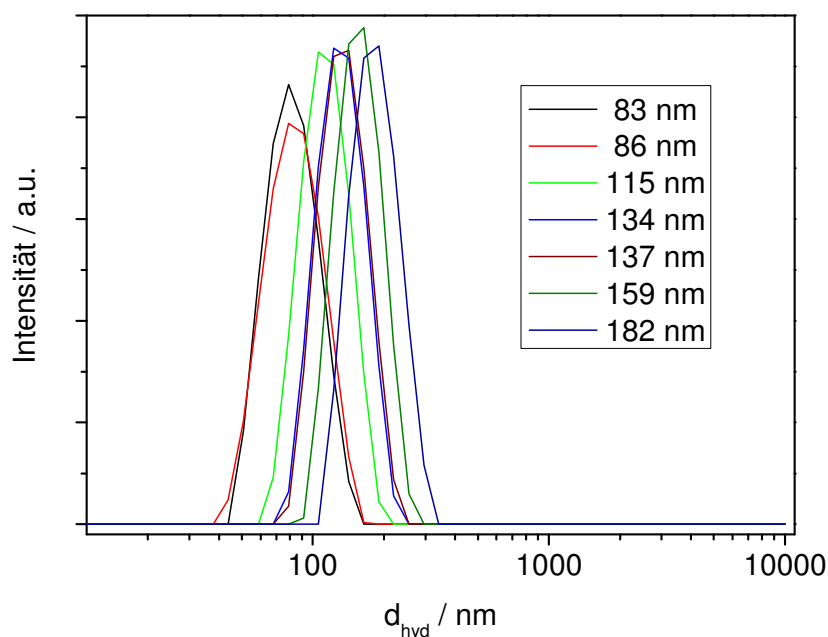


Abb. 4.39: Hydrodynamische Durchmesser der PEG-PCL-PEI-Triblockcopolymer-Mizellen. Es wurden bei Verwendung von 10 nm großen Fe_3O_4 -Nanopartikeln Mizellen in einem Größenbereich von 80 bis 180 nm hergestellt.

Die sieben erhaltenen Proben zeichnen sich durch identische Partikel- und Oberflächeneigenschaften aus. Sie wurden im Folgenden hinsichtlich ihrer transversalen Relaxivität r_2 bei einer Feldstärke von 1.41 T untersucht. Außerdem wurde in der zur

Messung der Relaxationszeit verwendeten Spinecho-Sequenz die Echozeit variiert, um etwaige Abhängigkeiten im Bereich des EL zu detektieren. In Abb. 4.40 ist der Verlauf von r_2 gegen den hydrodynamischen Durchmesser für verschiedene Echozeiten aufgetragen.

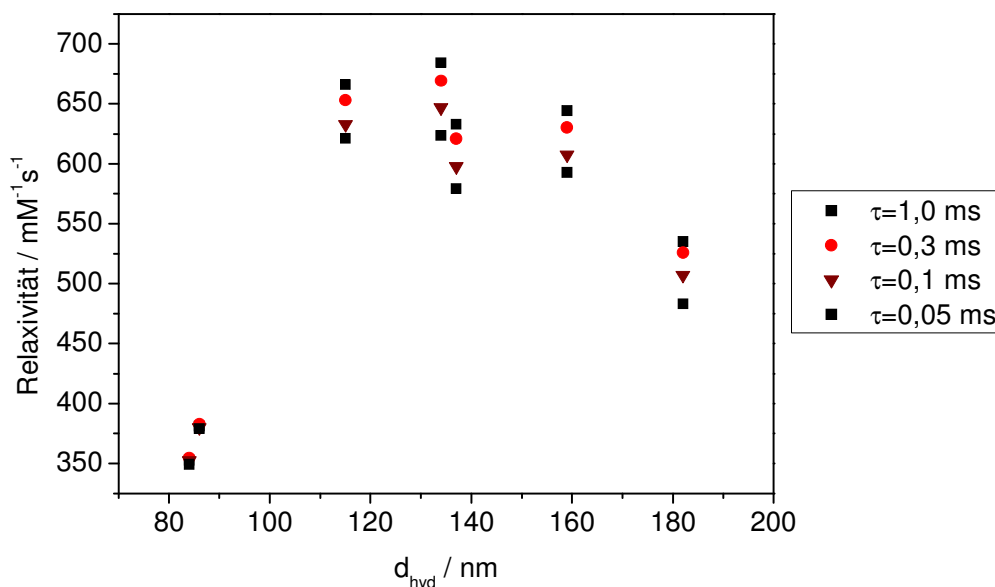


Abb. 4.40: Verlauf der transversalen Relaxivität r_2 als Funktion des hydrodynamischen Durchmessers der PEG-PCL-PEI-Mizellen für verschiedene Echozeiten ($T_E = 2\tau$) bei 1.41 T.

Es zeigt sich für die kleineren Mizellen (84 und 86 nm) ein Anstieg von r_2 . Bei ~ 100 nm ist ein Plateau erreicht. Anschließend findet ab etwa 140 nm Durchmesser ein Abfall der r_2 -Relaxivitäten statt. Die in Abb. 4.40 gezeigten Werte beschreiben also genau den erwarteten Verlauf und wurden in ähnlicher Weise für eine induzierte Aggregation in Lösung beobachtet^[120]. Auch Monte Carlo Simulationen ergaben diesen Verlauf, auch wenn das Relaxivitätsmaximum bei einer Clustergröße von ~ 50 nm errechnet wurde^[121]. Das durch das SDR beschriebene Plateau liegt also bei hydrodynamischen Durchmessern von ca. 100 bis 160 nm. Mizellen dieser Größe zeigen maximale r_2 -Relaxivitäten von $\sim 650 \text{ mM}^{-1} \text{s}^{-1}$. Dieser Wert beträgt etwa das Fünffache der Relaxivität des klinischen Standards Resovist® und stellt die maximal erreichbare Sensitivität für T_2 -gewichtete Spinecho-Sequenzen bei 1.41 T dar. Gleichzeitig liegt r_2 deutlich über dem eines optimierten MnFe_2O_4 -Systems^[114] und ist vergleichbar hoch wie für 7 nm große FeCo-Nanopartikel extrem hoher Sättigungsmagnetisierung^[122].

Eine weitere Bestätigung für die Gültigkeit der Theorien zeigt die Echozeitabhängigkeit der transversalen Relaxivität. Während für die durch das MAR beschriebenen Proben keine Unterschiede in den Relaxivitäten für verschiedene Echozeiten erkennbar sind, ergibt sich für

die größeren Mizellen eine deutliche Echozeitabhängigkeit. Mit zunehmender Verkürzung der Echozeit sinkt die Relaxivität ab, da die 180°-Pulse einen größeren Anteil der Spins rephasieren, wodurch die Echoamplituden höher werden.

4.4.3 Synthese eines Negativ-Kontrastmittels auf Basis biologischer Mizellen – Nanosomen

Beim Vergleich der verschiedenen Oberflächenmodifikationen hinsichtlich der transversalen Relaxivitäten in 4.4.1 wurde festgestellt, dass große Lipid-Mizellen durch das EL beschrieben werden und über sehr hohe r_2^* -Relaxivitäten verfügen. Dadurch sind diese Nanosomen hervorragend für die T_2^* -gewichtete Bildgebung geeignet. Daraufhin wurde dieses System dazu ausgewählt, den Lipoprotein-Stoffwechsel mittels MRT nicht-invasiv dynamisch zu verfolgen. Diese Untersuchung wurde durch Dr. Oliver Bruns aus der Gruppe von Prof. Dr. Ulrike Beisiegel (Institut für Molekulare Zellbiologie) geleitet und entstand in Zusammenarbeit mit der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie von Prof. Dr. Gerhard Adam und dem Heinrich-Pette-Institut von Dr. Heinrich Hohenberg.

Lipoproteine sind Mizellen, welche für den Transport von Lipiden und anderen hydrophoben Substanzen wie Vitaminen im Blut verantwortlich sind. Sie sind mit bestimmten Proteinen, den so genannten Apolipoproteinen assoziiert. Diese bedingen die strukturelle Integrität der Lipoproteine und dienen als Liganden für die Lipoproteinrezeptoren, wodurch die Bluthalbwertszeit der Lipoproteine maßgeblich beeinflusst wird. Die Lipoproteine lassen sich nach Größe und Dichte in die *High Density Lipoproteine* (HDL), *Low Density Lipoproteine* (LDL) sowie die *Triglyceridreichen Lipoproteine* (TRL), zu welchen die *Very low density Lipoproteine* (VLDL) und die *Chylomikronen* (CM) gehören, unterscheiden. Zur Visualisierung des Lipoprotein-Stoffwechsels mittels MRT wurden bislang LDL- und HDL-ähnliche Mizellen entwickelt und mit Gd-Chelaten zur positiven MR-Bildgebung markiert^[123-127]. Aufgrund der Toxizität und der geringen Relaxivität von Gd-Kontrastmitteln, sollten Eisenoxid-basierte Kontrastmittel auch hier geeigneter sein, um weitergehende Untersuchungen durchzuführen.

Während LDL und HDL Bluthalbwertszeiten von Stunden oder Tagen haben, zeigen die postprandialen TRL Halbwertszeiten von wenigen Minuten. Um die mit der Lipolyse der postprandialen TRL verbundenen Stoffwechselvorgänge dynamisch zu verfolgen, wurde hier ein Modell für TRL entwickelt und eingesetzt, dass den in 4.4.1 diskutierten Nanosomen entspricht und ihre relaxometrischen Eigenschaften besitzt, zur spezifischen Bildgebung aber

weiter funktionalisiert wurde. Die für diese Untersuchungen verwendeten Nanosomen sind schematisch in Abb. 4.41 dargestellt.

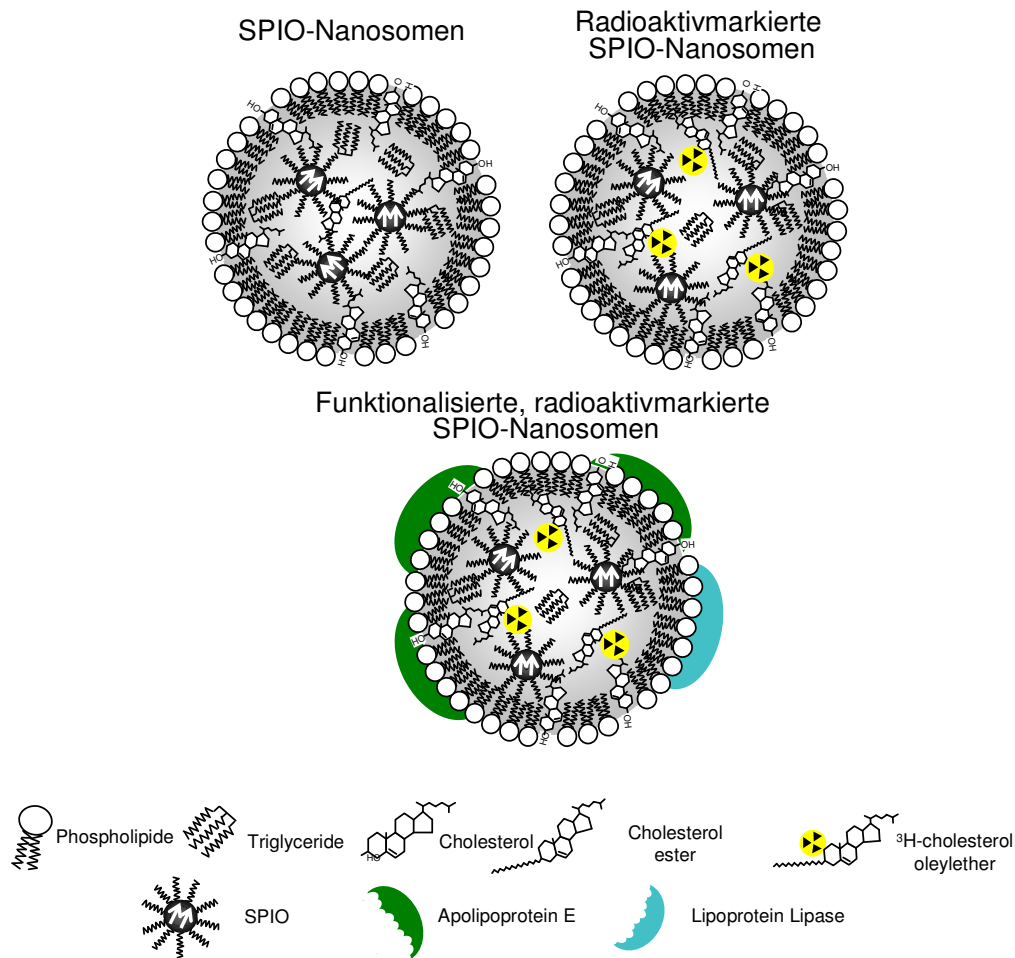


Abb. 4.41: Schematische Darstellung der Nanosomen und ihrer Funktionalisierung mit Apolipoprotein E und Apolipoprotein Lipase. Die zur Bildung der Nanosomen verwendeten Lipide wurden aus humanen Lipoproteinen extrahiert.

Die Nanosomen, deren hydrophober Kern die superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikel enthält, wurden aus biologischen Lipiden gebildet. Diese wurden aus humanen Lipoproteinen extrahiert. Die Nanosomen weisen also eine physiologische Lipid-Zusammensetzung auf. Für die weiter unten beschriebenen Quantifizierungsexperimente wurden die Nanosomen zusätzlich mit ^3H -cholesteryl-oleyl-ether radioaktiv markiert. Um dem Lipoprotein möglichst nahe zu kommen, wurden die Nanosomen mit den entsprechenden Liganden für die Lipoproteinrezeptoren assoziiert. Die dafür verwendeten Proteine waren das Apolipoprotein E (Apo E) sowie die Lipoprotein Lipase (LpL).

Im Folgenden sollte nachgewiesen werden, dass die Funktionalisierung der Nanosomen mit Apo E und LpL eine spezifische Erkennung durch die hepatischen Lipoproteinrezeptoren muriner Leberzellen (primäre Hepatocyten) ermöglicht. Außerdem wurden Inhibitionsexperimente durchgeführt, um zu verifizieren, dass die funktionalen Eigenschaften der Nanosomen durch deren Beladung mit Nanopartikeln nicht verändert oder beeinträchtigt werden. Zunächst wurden dazu die radioaktiv markierten SPIO-Nanosomen für 60 min mit den Zellen inkubiert. Anschließend wurden die Nanosomen, welche mit Apo E und solche, die mit Apo E und LpL funktionalisiert waren, mit den Zellen unter identischen Bedingungen inkubiert. Dabei wurde festgestellt, dass sie mit Apo E-funktionalisierten Nanosomen eine 1.4-fach erhöhte Aufnahme und die mit Apo E und LpL sogar eine 1.7-fach erhöhte Nanosomen Internalisierung bewirken (Abb. 4.42 a).

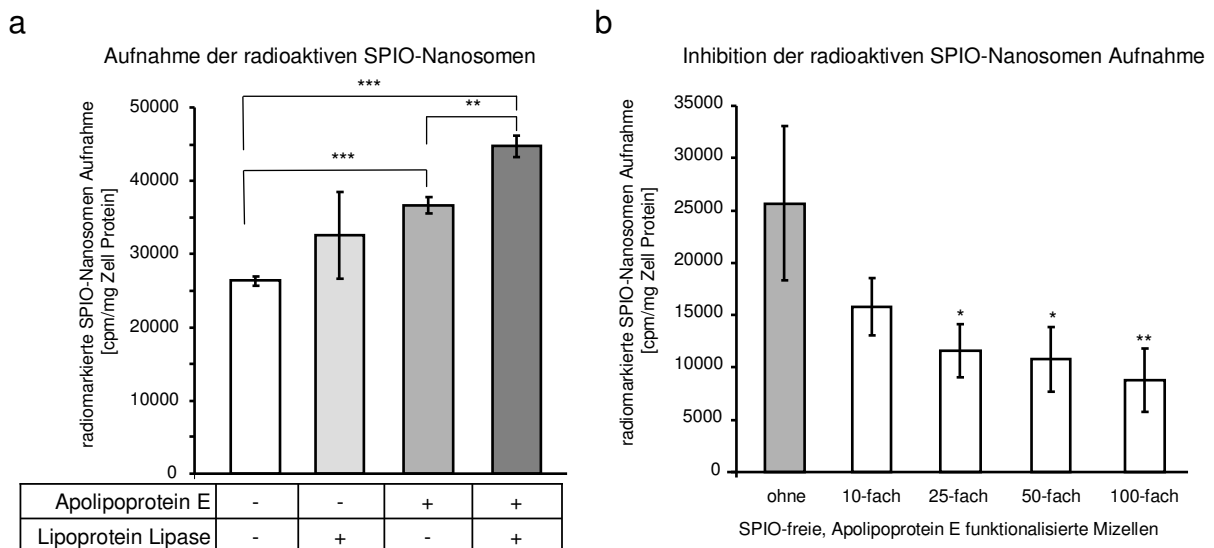


Abb. 4.42: Spezifische Aufnahme in Hepatozyten (a) und Inhibition (b) von ^3H -Cholesteryloleylether radiomarkierten SPIO Nanosomen.

Die rezeptorinduzierte Endozytose der funktionalisierten Nanosomen im Vergleich zu den nicht-funktionalisierten konnte also durch diese Steigerung nachgewiesen werden. Im Inhibitionsexperiment (Abb. 4.42 b) konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme der radioaktiv markierten SPIO-Nanosomen (Apo E funktionalisiert) durch die Zugabe von SPIO-freien Apo E-funktionalisierten Nanosomen in Abhängigkeit von der Dosis reduziert wird. Daher ist davon auszugehen, dass die Einbettung von superparamagnetischen Nanopartikeln auch die biologische Funktion der Mizellen nicht verändert.

Zur dynamischen Verfolgung des Lipoprotein-Stoffwechsels wurden die SPIO-Nanosomen intravenös in Wildtyp-Mäuse injiziert. In den T_2^* -gewichteten Bildern der Leber, welche

hauptverantwortlich für Verstoffwechselung der TRL ist, zeigt sich anschließend ein starker Signallabfall (Abb. 4.43 a). Um die Zell-Aufnahme der Nanosomen genauer zu verfolgen, wurde die Leber *ex vivo* untersucht und Cryo-Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mittels TEM untersucht (Abb. 4.43 b).

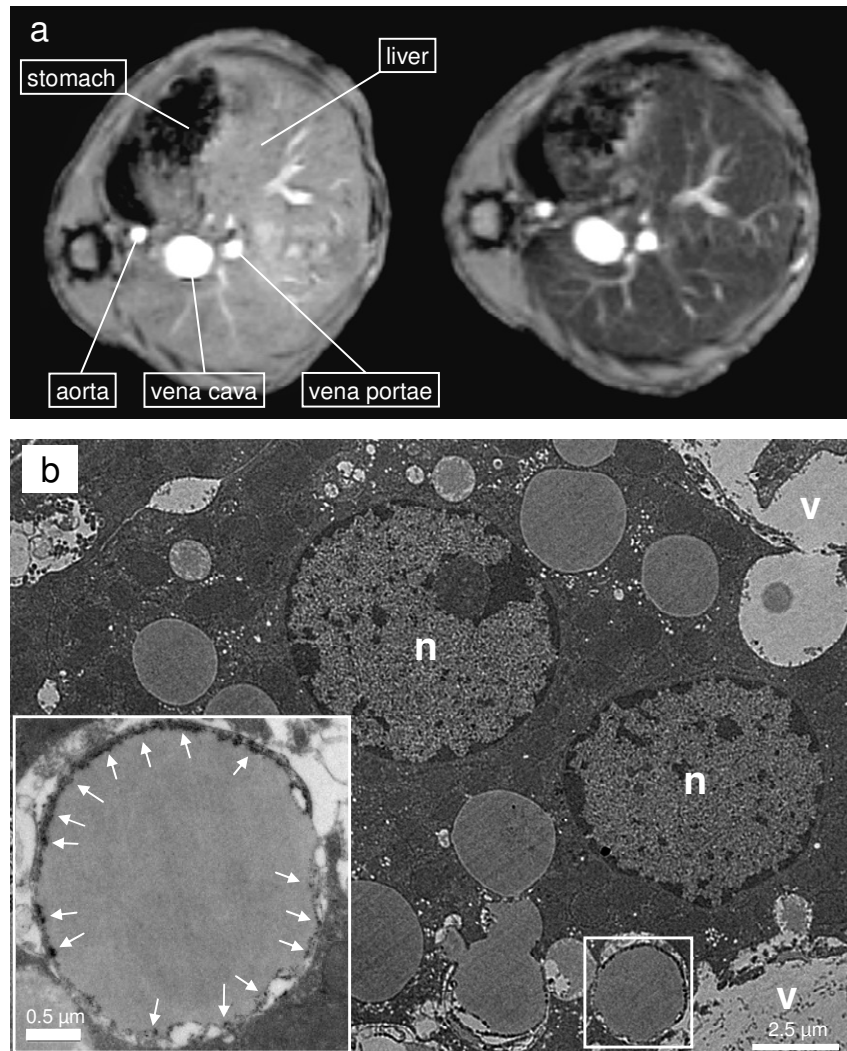


Abb. 4.43: T_2^* -gewichtetes Bild der Leber vor und 60 min nach der intravenösen Injektion der SPIO-Nanosomen (a). TEM-Aufnahme eines Hepatozyten, in dessen Lipid droplets sich die Nanopartikel befinden (n: Zellkerne, v: intrahepatische Blutgefäße).

In der TEM-Aufnahme ist erkennbar, dass sich Eisenoxid-Nanopartikel in den Hepatozyten in der Peripherie der sogenannten Lipid droplets befinden. Die SPIO-Nanosomen werden in der Leber also genau wie die TRL hauptsächlich von den Hepatozyten aufgenommen und nicht von den phagozytisch aktiven Kupffer-Zellen. Diese Makrophagen nehmen hingegen die klinisch verabreichten Kontrastmittel wie Resovist® auf. Möglicherweise wird der hydrophobe Kern der TRL dem Lipid-Speicher zugeführt.

Um die Organverteilung der SPIO-Nanosomen *in vivo* quantitativ abzuschätzen und die daraus resultierende Eisenkonzentration in der Leber zu berechnen, wurden die radioaktiv markierten SPIO-Nanosomen den Wildtyp Mäuse intravenös injiziert. Die hier gewählte ^3H -Markierung wird intrazellulär gespeichert und nicht wieder freigegeben, so dass die messbare Aktivität tatsächlich mit der SPIO-Konzentration in der Leber korreliert. Abb. 4.44 a zeigt, dass 20 min nach der Injektion etwa 50 % der injizierten Dosis in die Leber aufgenommen wurden. Andere Organe wie Fettgewebe (6.7 %), Milz (2.4 %), Muskeln (1.8 %), Herz (0.9 %) und Nieren (0.4 %) zeigten nur geringe Aktivitäten.

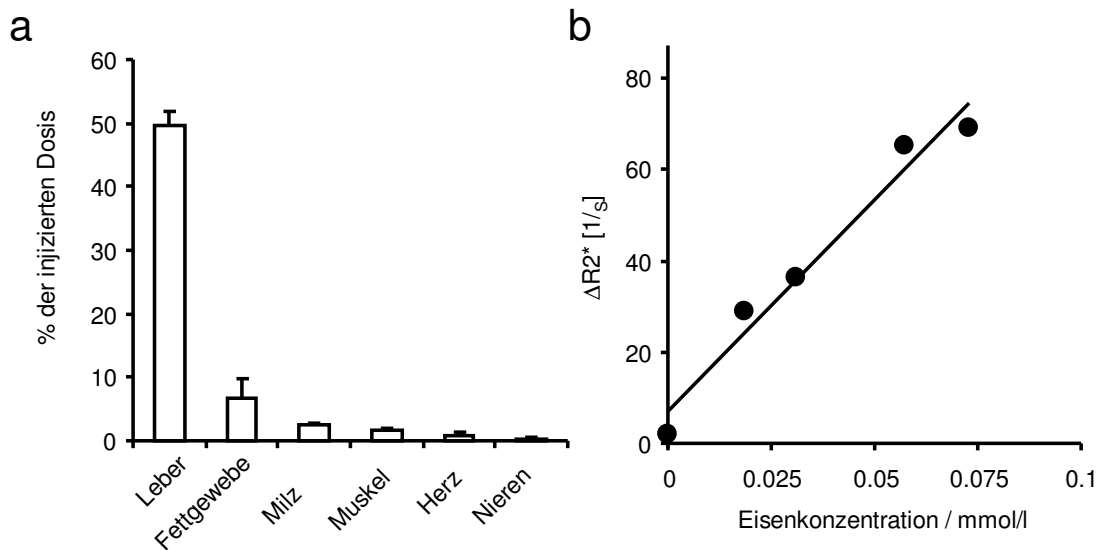


Abb. 4.44: Organverteilung der radioaktiv markierten SPIO-Nanosomen 20 min nach der intravenösen Injektion (a). Zur Bestimmung der Relaxivität r_2^* *in vivo* wurde die Änderung der Relaxationsrate ΔR_2^* vor und 20 min nach der Injektion ansteigender Dosen gemessen.

Die Relaxivität wurde in 2.2.4 als Maß für die Änderung der Relaxationsrate (hier: ΔR_2^*) in Abhängigkeit von der Konzentration des Kontrastmittels (der analytischen Eisenkonzentration) eingeführt. Um die Relaxivität r_2^* *in vivo* zu bestimmen, wurde die Änderung der Relaxationsrate ΔR_2^* vor und 20 min nach der Injektion mit der SPIO-bezogenen Eisenkonzentration korreliert. Eine direkte Messung der Eisenkonzentration in der Leber ist wegen des hohen biologischen Hintergrundes nicht möglich. Die hepatische SPIO-Konzentration wurde daher über die Bestimmung der Eisenkonzentration der Nanosomen und der Organverteilung abgeschätzt. Daher wurden verschiedene Nanosomen-Konzentrationen injiziert und die jeweils gemessene Änderung ΔR_2^* gegen die so ermittelte Konzentration aufgetragen (Abb. 4.44 b). Es wurde eine lineare Abhängigkeit beobachtet, welche es ermöglichte, die Relaxivität der SPIO-Nanosomen in der Leber zu $\sim 850 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$

abzuschätzen (Feldstärke 3 T). Die *in vitro* Relaxometrie derselben Probe ergab für die longitudinale Relaxivität einen Wert von $r_1=2.5\pm0.3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Für die transversalen Relaxivitäten wurden Werte von $r_2=410\pm46 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $r_2^*=800\pm64 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ gemessen. Wie schon in der genauen relaxometrischen Analyse der Nanosomen in 4.4.1 diskutiert, zeigt der große Unterschied zwischen r_2 und r_2^* , dass die effektive transversale Relaxivität r_2^* maximiert ist und durch das *Static Dephasing Regime* (SDR) beschrieben wird. Darüber hinaus zeigt der Vergleich der *in vitro* Relaxivität ($r_2^*=800 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) mit der *in vivo* bestimmten ($r_2^*\sim850 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) eine sehr gute Übereinstimmung. Da die r_2^* -Relaxivität bereits vor der Injektion maximal ist, ändert sie sich durch physiologische Prozesse wie die Kompartimentibilisierung der Nanosomen in Zellen nicht und erlaubt daher im Gegensatz zu anderen Eisenoxid-basierten Kontrastmitteln die Quantifizierung und dynamische Verfolgung der den TRL zugrunde liegenden Stoffwechselprozesse. Außerdem zeigt der Vergleich mit anderen Arbeiten, dass die Relaxivitäten deutlich höher als alle klinisch applizierten Kontrastmittel sind und auch über denen liegen, die kürzlich für optimierte MnFe_2O_4 -Nanopartikel zur molekularen Bildgebung^[114] oder für Eisenoxid-Mikropartikel berichtet worden sind^[128].

Um die Kinetik des TRL-Stoffwechsels in der lebenden Maus zu quantifizieren, wurden dynamische MR-Messungen durchgeführt. Dazu wurden T_2^* -gewichtete Bilder von Leber, Magen und wichtigen Blutgefäßen (Aorta, große Hohlvene) alle 5.5 s aufgenommen (Abb. 4.45 a). Die Plasmakonzentration der TRL nach der Injektion (100 mg/dl) entspricht der typischen Triglycerid-Konzentration nach der Einnahme einer Mahlzeit. Unmittelbar nach der Injektion kam es durch das Kontrastmittel zu einem starken Signalabfall in der vena cava (5.5 s, dargestellt durch Pfeile). Anschließend wurden die Hauptblutgefäße der Leber schwarz (11 s), gefolgt von einem kontinuierlichen Signalabfall in der Leber (16.5 s). Nach 38.5 s stieg das MR-Signal in den Blutgefäßen wieder an, wobei die Leber schwarz blieb. Dieser Prozess charakterisiert die Aufnahme der SPIO-Nanosomen aus dem Blut in die Leber. Diese nicht-invasive Verfolgung der hepatischen Lipoprotein-Aufnahme wurde für vier individuelle Wildtyp-Mäuse durchgeführt (Abb. 4.45 b) und zeigt eine hohe Reproduzierbarkeit. Die Aufnahme erfolgt sehr schnell (80 % in den ersten zwei Minuten) und folgt einer biexponentiellen Kinetik, wie auch für radioaktiv markierte Lipoproteine gezeigt wurde^[129]. Durch die Nicht-Invasivität der Methode konnten in dieser Untersuchung 150 Datenpunkte innerhalb von 15 Minuten mit einem Tier gewonnen werden. Konventionelle, auf dem Einsatz von Radioisotopen basierte Studien hätten für jeden Punkt eine Maus benötigt.

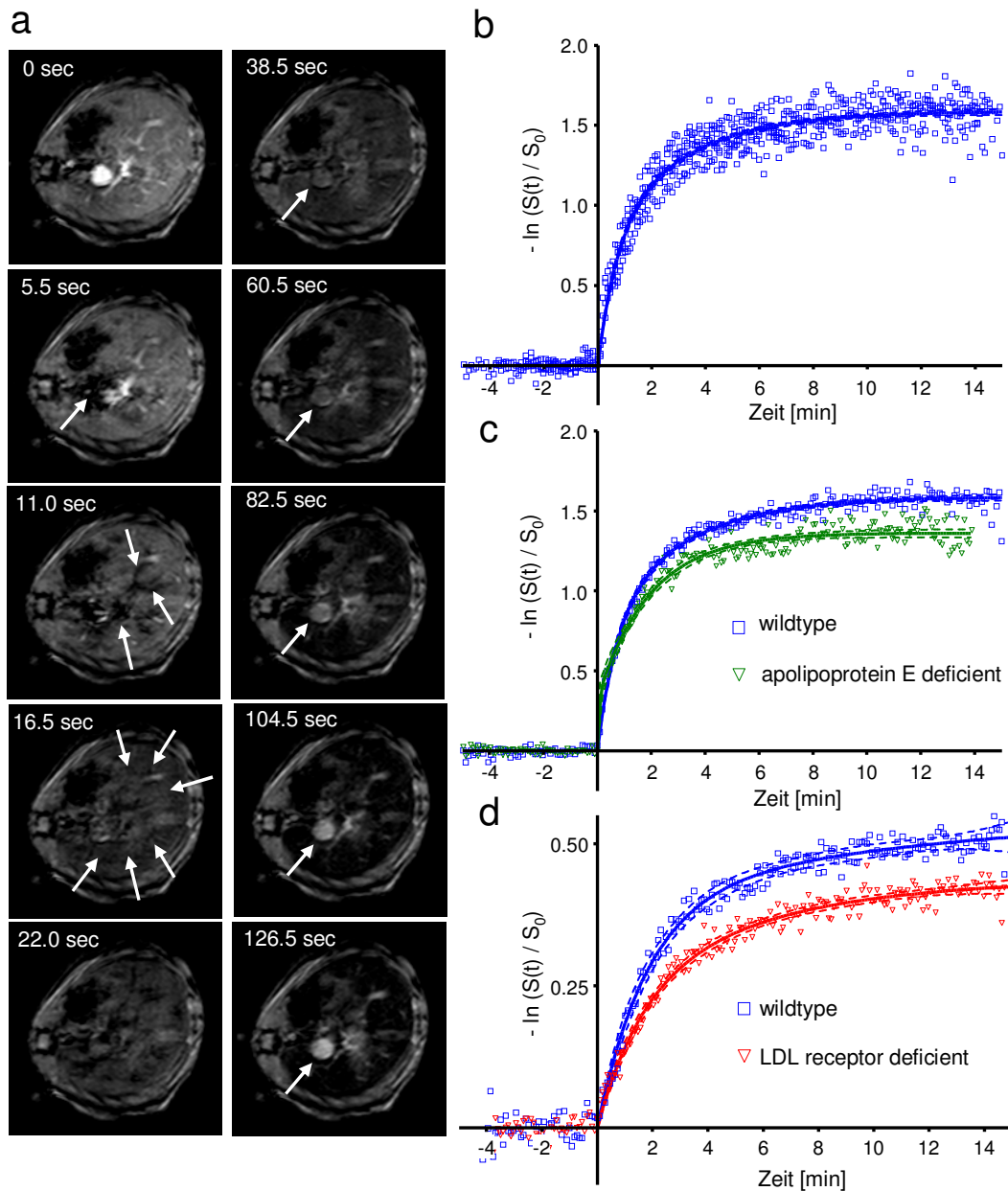


Abb. 4.45: Quantitative MR-Echtzeit-Verfolgung (T_2^* -gewichtet). Die SPIO-Nanosomen reduzieren zunächst das Signal im Blut und später in der Leber (16.5 s) (a). Kinetik der hepatischen SPIO-Nanosomen-Aufnahme für Wildtyp-Mäuse ($n=4$) (b). Vergleich der mittleren Werte für Wildtyp-Mäuse mit Apo E-defizienten Mäusen (c) und LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen (d).

Es wurde außerdem getestet, inwiefern quantitative Unterschiede in der hepatischen Aufnahme der SPIO-Nanosomen detektierbar sind. Dazu wurden die Kinetiken für Wildtyp-Mäuse, Apo E-defiziente Mäuse sowie LDL-Rezeptor-defiziente Mäuse verglichen. Durch das Fehlen des LDL-Rezeptors oder dessen Ligand Apo E zeigen defiziente Mäuse eine reduzierte hepatische Aufnahme von TRL gegenüber Wildtyp-Mäusen. Der Vergleich der

SPIO-Nanosomen Aufnahme zeigt tatsächlich eine reduzierte Verstoffwechselung für die defizienten Mäuse (Abb. 4.45 c,d). Daher ist davon auszugehen, dass die SPIO-Nanosomen Apo E-abhängig aufgenommen werden.

Es wurde hier ein Kontrastmittel zur Visualisierung und Quantifizierung der hepatischen Aufnahme von Lipoproteinen in Echtzeit entwickelt. Die relaxometrischen Eigenschaften wurden im Hinblick auf die T_2^* -gewichtete Bildgebung optimiert und erlauben erstmals eine direkte Korrelation des räumlichen MR-Signals mit einem Stoffwechselprozess. Zur Konstruktion der SPIO-Nanosomen sind keine aufwendigen Oberflächenmodifizierungen der Nanopartikel nötig, weshalb ihre magnetischen Eigenschaften vollständig erhalten bleiben. Da die Nanosomen ein Modell der TRL darstellen, ist es entscheidend, dass die Nanopartikel in den hydrophoben Kern der Mizelle eingebracht werden und daher die biologisch relevante Nanosomen-Oberfläche unverändert bleibt. Die hohe räumliche und zeitliche Auflösung der MRT wurde durch keine andere Technik zur Untersuchung des Lipoprotein-Stoffwechsels erreicht. Die maximale effektive transversale Relaxivität r_2^* der SPIO-Nanosomen verleiht dem Kontrastmittel optimale Sensitivität im MRT. Gleichzeitig ermöglicht die hohe Elektronendichte der superparamagnetischen Nanopartikel die Verfolgung der zellulären Prozessierung der SPIO-Nanosomen mittels Elektronenmikroskopie.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden neuartige Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie auf Basis von Ferrit-Nanopartikeln entwickelt. Die Nanopartikel wurden durch nasschemische organometallische Hochtemperatursynthesen mit enger Größenverteilung hergestellt. Die Größe konnte über einen weiten Bereich von 3 bis 30 nm variiert werden. Durch Wahl der Reaktionsbedingungen war es außerdem möglich, die chemische Zusammensetzung der Teilchen zwischen reinem Magnetit (Fe_3O_4) und Manganferrit (MnFe_2O_4) zu steuern.

Die Teilchen wurden nach verschiedenen Strategien in wässrige Lösung transferiert. Ein Ligandenaustausch des aus der Synthese stammenden Stabilisators Ölsäure gegen Polyethylenglykol (PEG)-basierte Liganden bewirkte homogen dispergierte Teilchen mit dichter PEG-Hülle. Zur Bindung auf der Teilchenoberfläche erwies sich dabei eine Phosphat-Ankergruppe als besonders stabil. Zur Entwicklung eines T_1 -Kontrastmittels zeigte sich ein System aus 4 nm großen Fe_3O_4 -Nanopartikeln als besonders geeignet. Der Einfluss der PEG-Kettenlänge wurde systematisch untersucht. Eine Molmasse von 1100 g/mol führte zu Teilchen, die eine extrem hohe Stabilität gegen die Adsorption von Serum-Proteinen zeigen. Dieses System hatte außerdem eine longitudinale Relaxivität von $r_1=7.3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ und ein Relaxivitätsverhältnis r_2/r_1 von 2.4. Sein r_1 -Koeffizient ist damit um einen Faktor zwei höher als der Gadolinium-basierte klinische Standard Magnevist (Gd-DTPA). Der r_2 -Koeffizient des Kontrastmittels hingegen ist deutlich geringer als der des typischen T_2 -Kontrastmittels Resovist ($r_2=130 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$). Diese Tatsache ist der Beleg dafür, dass eine Aggregation der Partikel vollständig verhindert werden konnte. Das Kontrastmittel behält seine relaxometrischen Eigenschaften unter physiologischen Bedingungen. Das PEG-1100-System zeigte außerdem im Tagesbereich in biologisch relevanter Konzentration keine akute Zytotoxizität und ein sehr geringes Maß an unspezifischer Phagozytose durch murine Makrophagen. Es ist daher ein optimiertes positives MR-Kontrastmittel, welches hohe Stabilität, extrem günstige relaxometrische Eigenschaften sowie geringe Zytotoxizität und niedrige Phagotytoseraten vereinigt (Tromsdorf *et al.*, *Nano Letters* **2009**, 9, 4344).

Neben dem Ligandenaustausch wurde die Verkapselung der Nanopartikel in Mizellen unter Verwendung von biologischen oder synthetischen Polymeren angewandt, um einen Phasentransfer in wässrige Lösung zu ermöglichen. Durch diese Oberflächenmodifizierungen gelang es, negative Kontrastmittel sowohl für die T_2 -gewichtete Spinecho- als auch für die T_2^* -gewichtete Gradientenecho-MR-Bildgebung zu synthetisieren. Zunächst ergab eine

systematische Untersuchung der verschiedenen Oberflächenmodifizierungen im Hinblick auf deren Einfluss auf die Relaxivitäten r_2 und r_2^* , dass eine kontrollierte Kompartimentibilisierung der Nanoteilchen in Mizellen sowohl r_2 als auch r_2^* erhöht (Tromsdorf *et al.*, *Nano Letters* **2007**, 7, 2422). Große Lipid-Mizellen, sogenannte Nanosomen, besitzen maximale r_2^* -Relaxivitäten und stellen ein Modell für Triglyceridreiche Lipoproteine (TRL) dar. Sie ermöglichten erstmals die quantitative MR-Echtzeit-Verfolgung eines Stoffwechselprozesses. Ihre r_2^* -Relaxivität beträgt $\sim 850 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und ist ca. dreimal höher als die des klinischen Eisenoxid-Standards Resovist. Es konnte weiter gezeigt werden, dass die r_2^* -Relaxivität sich während der Aufnahme in hepatische Zellen in der Leber nicht ändert. Das T_2^* -Kontrastmittel erlaubte daher die Detektion quantitativer Unterschiede in der hepatischen Aufnahme der Nanosomen für unterschiedliche Maus-Modelle (Bruns *et al.*, *Nature Nanotechnology* **2009**, 4, 193.).

Die Verwendung von Mizellen-bildenden synthetischen Triblockcopolymeren ermöglichte die Bestimmung der Mizellengröße maximaler r_2 -Relaxivität für T_2 -gewichtete Spinecho-Sequenzen. Die erreichten Relaxivitäten ($\sim 650 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei 1.41 T) sind die höchsten bisher berichteten für Eisenoxid und vergleichbar denen optimierter FeCo-Nanopartikel extrem hoher Sättigungsmagnetisierung (Tromsdorf *et al.*, Manuskript in Vorbereitung).

Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, sensitive und optimierte MR-Kontrastmittel für die T_1 -, T_2 - und T_2^* gewichtete Bildgebung zu entwickeln.

6 Summary

The scope of this thesis was the development of sophisticated contrast agents for Magnetic Resonance Imaging (MRI) based on ferrite nanoparticles. The nanoparticles were synthesized via organometallic high temperature syntheses and appeared with narrow size distribution. By carefully choosing the reaction conditions it was possible to vary the crystal size between 3 and 30 nm and, moreover, to precisely tune the chemical composition between magnetite (Fe_3O_4) and manganese ferrite (MnFe_2O_4).

The particles were transferred to aqueous environment using three different strategies. First, a ligand exchange of the native capping agent oleic acid against poly(ethylene glycol) (PEG) based ligands led to the formation of homogeneously dispersed particles with a dense coating. It turned out that a phosphate anchor group provides a stable binding to the particle surface. Therefore, a T_1 contrast agent consisting of a 4 nm iron oxide core and an optimal PEG chain length of 1000 g/mol was designed. The use of this polymer together with the phosphate group provided high stability against the adsorption of plasma proteins and a r_1 relaxivity of $7.3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ which is two times higher compared to that of Magnevist, a typical clinically applied T_1 agent. The relaxivity ratio r_2/r_1 was 2.4 and the lowest one so far for PEGylated iron oxide particles. In addition, this novel contrast agent did not show any toxic effect after 24 h of incubation with relevant cells and at biologically reasonable concentrations together with very low levels of unspecific uptake into murine macrophages (Tromsdorf *et al.*, *Nano Letters* **2009**, 9, 4434).

Besides ligand exchange reactions, encapsulations of nanoparticles within micelles formed by synthetic or biological polymers were performed in order to transfer the particles to aqueous solution. Therefore, it was possible to develop a T_2 contrast agent for spin echo sequences as well as a T_2^* contrast agent for gradient echo sequences. A comprehensive comparison concerning the various surface modifications in terms of negative contrast enhancement confirmed that a controlled compartmentalisation of particles within micelles dramatically increases both r_2 and r_2^* (Tromsdorf *et al.*, *Nano Letters* **2007**, 7, 2422). Large lipid micelles, referred to as nanosomes, which act as a model for triglyceride rich lipoproteins (TRL) exhibited maximized r_2^* relaxivities and allowed, for the first time, quantitative MR imaging of a metabolic process, namely the metabolism of TRL in this case. The r_2^* relaxivity of the nanosomes is more than three times higher than that of Resovist, a clinical negative contrast agent. Moreover, it was possible to demonstrate that during the process of nanosome uptake

into hepatic cells in the liver the r_2^* relaxivity coefficient did not change. As a result, the as prepared T_2^* contrast agent allowed distinction between different levels of TRL uptake into the liver via MRI (Bruns *et al.*, *Nature Nanotechnology* **2009**, 4, 193).

The use of micelle forming tailored triblock-copolymers enabled us to determine the size of maximal relaxivity for T_2 weighted spin echo imaging. The obtained r_2 relaxivities of these particle loaded micelles are the highest ever reported ones for iron oxide based negative contrast agents and are comparable to optimized FeCo alloy nanoparticles of extremely high saturation magnetization (Tromsdorf *et al.*, manuscript in preparation) .

In conclusion, it was possible to develop highly sensitive and optimized MR contrast agents for T_1 , T_2 as well as T_2^* weighted imaging.

7 Literatur

- [1] H. Weller, *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1993**, 32, 41.
- [2] K. Winnacker, L. Küchler, *Chemische Technik: Prozesse und Produkte, Vol. 2: Neue Technologien*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [3] G. Schmid, *Nanoparticles: From Theory to Application*, 1 ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [4] Y. W. Jun, J. S. Choi, J. Cheon, *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, 45, 3414.
- [5] H. Zeng, S. H. Sun, *Advanced Functional Materials* **2008**, 18, 391.
- [6] P. Alivisatos, *Nature Biotechnology* **2004**, 22, 47.
- [7] J. M. Klostranec, W. C. W. Chan, *Advanced Materials* **2006**, 18, 1953.
- [8] S. Mann, *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, 47, 5306.
- [9] H. R. Herschman, *Science* **2003**, 302, 605.
- [10] R. Weissleder, U. Mahmood, *Radiology* **2001**, 219, 316.
- [11] X. H. Gao, Y. Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. K. Chung, S. M. Nie, *Nature Biotechnology* **2004**, 22, 969.
- [12] D. P. Cormode, T. Skajaa, M. M. van Schooneveld, R. Koole, P. Jarzyna, M. E. Lobatto, C. Calcagno, A. Barazza, R. E. Gordon, P. Zanzonico, E. A. Fisher, Z. A. Fayad, W. J. M. Mulder, *Nano Letters* **2008**, 8, 3715.
- [13] W. J. M. Mulder, G. J. Strijkers, K. C. Briley-Saboe, J. C. Frias, J. G. S. Aguinaldo, E. Vucic, V. Amirbekian, C. Tang, P. T. K. Chin, K. Nicolay, Z. A. Fayad, *Magnetic Resonance in Medicine* **2007**, 58, 1164.
- [14] D. Gerion, J. Herberg, R. Bok, E. Gjersing, E. Ramon, R. Maxwell, J. Kurhanewicz, T. F. Budinger, J. W. Gray, M. A. Shuman, F. F. Chen, *Journal of Physical Chemistry C* **2007**, 111, 12542.
- [15] M. Norek, E. Kampert, U. Zeitler, J. A. Peters, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130, 5335.
- [16] C. Richard, B. T. Doan, J. C. Beloeil, M. Bessodes, E. Toth, D. Scherman, *Nano Letters* **2008**, 8, 232.
- [17] L. Prinzen, R. J. J. H. M. Miserus, A. Dirksen, T. M. Hackeng, N. Deckers, N. J. Bitsch, R. T. A. Megens, K. Douma, J. W. Heemskerk, M. E. Kooi, P. M. Frederik, D. W. Slaaf, M. A. M. J. van Zandvoort, C. P. M. Reutelingsperger, *Nano Letters* **2007**, 7, 93.

- [18] J. Lee, J. Yang, H. Ko, S. J. Oh, J. Kang, J. H. Son, K. Lee, S. W. Lee, H. G. Yoon, J. S. Suh, Y. M. Huh, S. Haam, *Advanced Functional Materials* **2008**, 18, 258.
- [19] C. M. Sorensen, in *Nanoscale Materials in Chemistry* (Ed.: K. J. Klabunde), John Wiley & Sons, Inc., New York, **2001**.
- [20] H. Lueken, *Magnetochemie: Eine Einführung in Theorie und Anwendung*, Teubner-Studienbücher: Chemie, Stuttgart, **1999**.
- [21] D. L. LesliePelecky, R. D. Rieke, *Chemistry of Materials* **1996**, 8, 1770.
- [22] Y. W. Jun, J. W. Seo, A. Cheon, *Accounts of Chemical Research* **2008**, 41, 179.
- [23] Y. W. Jun, Y. M. Huh, J. S. Choi, J. H. Lee, H. T. Song, S. Kim, S. Yoon, K. S. Kim, J. S. Shin, J. S. Suh, J. Cheon, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 5732.
- [24] M. Reiser, W. Semmler, *Magnetresonanztomographie*, Springer-Verlag, Berlin, **2002**.
- [25] E. M. Haacke, R. W. Brown, M. R. Thompson, R. Venkatesan, *Magnetic Resonance Imaging - Physical Principles and Sequence Design*, John Wiley & Sons, New York, **1999**.
- [26] P. W. Atkins, J. de Paula, *Physikalische Chemie*, 4 ed., WILEY-VCH, Weinheim, **2006**.
- [27] L. Dilcher, M. Venator, S. Dilcher, *Handbuch der Kernspintomographie*, 2 ed., Edwin Ferger Verlag, Bergisch Gladbach, **2002**.
- [28] Y. X. J. Wang, S. M. Hussain, G. P. Krestin, *European Radiology* **2001**, 11, 2319.
- [29] E. Toth, L. Helm, A. E. Merbach, *Contrast Agents I* **2002**, 221, 61.
- [30] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry, R. B. Lauffer, *Chemical Reviews* **1999**, 99, 2293.
- [31] H. Ai, C. Flask, B. Weinberg, X. Shuai, M. D. Pagel, D. Farrell, J. Duerk, J. M. Gao, *Advanced Materials* **2005**, 17, 1949.
- [32] J. F. Berret, N. Schonbeck, F. Gazeau, D. El Kharrat, O. Sandre, A. Vacher, M. Airiau, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, 1755.
- [33] N. Nasongkla, E. Bey, J. M. Ren, H. Ai, C. Khemtong, J. S. Guthi, S. F. Chin, A. D. Sherry, D. A. Boothman, J. M. Gao, *Nano Letters* **2006**, 6, 2427.
- [34] U. Jeong, X. W. Teng, Y. Wang, H. Yang, Y. N. Xia, *Advanced Materials* **2007**, 19, 33.
- [35] J. Kim, J. E. Lee, S. H. Lee, J. H. Yu, J. H. Lee, T. G. Park, T. Hyeon, *Advanced Materials* **2008**, 20, 478.
- [36] S. H. Sun, H. Zeng, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, 8204.

- [37] S. H. Sun, D. B. Robinson, S. Raoux, P. M. Rice, S. X. Wang, G. Li, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 273.
- [38] J. Xie, S. Peng, N. Brower, N. Pourmand, S. X. Wang, S. H. Sun, *Pure and Applied Chemistry* **2006**, 78, 1003.
- [39] T. Hyeon, S. S. Lee, J. Park, Y. Chung, H. Bin Na, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123, 12798.
- [40] W. W. Yu, J. C. Falkner, C. T. Yavuz, V. L. Colvin, *Chemical Communications* **2004**, 2306.
- [41] E. Kang, J. Park, Y. Hwang, M. Kang, J. G. Park, T. Hyeon, *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, 108, 13932.
- [42] H. Krischner, B. Koppelhuber-Britschnau, *Röntgenstrukturanalyse und Rietfeldmethode*, 5 ed., Vieweg, Braunschweig, **1994**.
- [43] A. Huberman, C. Perez, *Analytical Biochemistry* **2002**, 307, 375.
- [44] J. W. M. Bulte, D. L. Kraitichman, *Nmr in Biomedicine* **2004**, 17, 484.
- [45] A. Bjornerud, L. Johansson, *Nmr in Biomedicine* **2004**, 17, 465.
- [46] J. W. M. Bulte, R. A. Brooks, B. M. Moskowitz, L. H. Bryant, J. A. Frank, *Magnetic Resonance in Medicine* **1999**, 42, 379.
- [47] H. W. Duan, M. Kuang, X. X. Wang, Y. A. Wang, H. Mao, S. M. Nie, *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, 112, 8127.
- [48] C. Liu, Z. J. Zhang, *Chemistry of Materials* **2001**, 13, 2092.
- [49] N. R. Jana, Y. F. Chen, X. G. Peng, *Chemistry of Materials* **2004**, 16, 3931.
- [50] C. D. Donega, P. Liljeroth, D. Vanmaekelbergh, *Small* **2005**, 1, 1152.
- [51] O. Song, Z. J. Zhang, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 6164.
- [52] Q. Song, Y. Ding, Z. L. Wang, Z. J. Zhang, *Chemistry of Materials* **2007**, 19, 4633.
- [53] C. R. Vestal, Q. Song, Z. J. Zhang, *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, 108, 18222.
- [54] S. Peng, C. Wang, J. Xie, S. H. Sun, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, 10676.
- [55] Q. Song, Z. J. Zhang, *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110, 11205.
- [56] H. T. Yang, F. Ito, D. Hasegawa, T. Ogawa, M. Takahashi, *Journal of Applied Physics* **2007**, 101.
- [57] M. Yin, S. O'Brien, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 10180.
- [58] J. Park, K. J. An, Y. S. Hwang, J. G. Park, H. J. Noh, J. Y. Kim, J. H. Park, N. M. Hwang, T. Hyeon, *Nature Materials* **2004**, 3, 891.

- [59] A. Shavel, B. Rodriguez-Gonzalez, M. Spasova, M. Farle, L. M. Liz-Marzan, *Advanced Functional Materials* **2007**, 17, 3870.
- [60] C. R. Lin, R. K. Chiang, J. S. Wang, T. W. Sung, *Journal of Applied Physics* **2006**, 99.
- [61] L. M. Bronstein, X. L. Huang, J. Retrum, A. Schmucker, M. Pink, B. D. Stein, B. Dragnea, *Chemistry of Materials* **2007**, 19, 3624.
- [62] J. Park, J. Joo, S. G. Kwon, Y. Jang, T. Hyeon, *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, 46, 4630.
- [63] S. G. Kwon, Y. Piao, J. Park, S. Angappane, Y. Jo, N. M. Hwang, J. G. Park, T. Hyeon, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, 12571.
- [64] V. K. Lamer, R. H. Dinegar, *Journal of the American Chemical Society* **1950**, 72, 4847.
- [65] E. V. Shevchenko, D. V. Talapin, H. Schnablegger, A. Kornowski, O. Festin, P. Svedlindh, M. Haase, H. Weller, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 9090.
- [66] C. Burda, X. B. Chen, R. Narayanan, M. A. El-Sayed, *Chemical Reviews* **2005**, 105, 1025.
- [67] T. Pellegrino, L. Manna, S. Kudera, T. Liedl, D. Koktysh, A. L. Rogach, S. Keller, J. Radler, G. Natile, W. J. Parak, *Nano Letters* **2004**, 4, 703.
- [68] U. I. Tromsdorf, N. C. Bigall, M. G. Kaul, O. T. Bruns, M. S. Nikolic, B. Mollwitz, R. A. Sperling, R. Reimer, H. Hohenberg, W. J. Parak, S. Forster, U. Beisiegel, G. Adam, H. Weller, *Nano Letters* **2007**, 7, 2422.
- [69] T. R. Zhang, J. P. Ge, Y. P. Hu, Y. D. Yin, *Nano Letters* **2007**, 7, 3203.
- [70] H. T. Song, J. S. Choi, Y. M. Huh, S. Kim, Y. W. Jun, J. S. Suh, J. Cheon, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 9992.
- [71] M. Lattuada, T. A. Hatton, *Langmuir* **2007**, 23, 2158.
- [72] S. R. Wan, J. S. Huang, M. Guo, H. K. Zhang, Y. J. Cao, H. S. Yan, K. L. Liu, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2007**, 80A, 946.
- [73] C. J. Xu, K. M. Xu, H. W. Gu, R. K. Zheng, H. Liu, X. X. Zhang, Z. H. Guo, B. Xu, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 9938.
- [74] J. Xie, C. J. Xu, Z. H. Xu, Y. L. Hou, K. L. L. Young, S. X. Wang, N. Pourmand, S. H. Sun, *Chemistry of Materials* **2007**, 19, 1202.
- [75] M. S. Nikolic, M. Krack, V. Aleksandrovic, A. Kornowski, S. Forster, H. Weller, *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, 45, 6577.
- [76] S. W. Kim, S. Kim, J. B. Tracy, A. Jasanoff, M. G. Bawendi, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 4556.

- [77] H. Bin Na, I. S. Lee, H. Seo, Y. Il Park, J. H. Lee, S. W. Kim, T. Hyeon, *Chemical Communications* **2007**, 5167.
- [78] Y. Lalatonne, C. Paris, J. M. Serfaty, P. Weinmann, M. Lecouvey, L. Motte, *Chemical Communications* **2008**, 2553.
- [79] C. A. J. Lin, R. A. Sperling, J. K. Li, T. Y. Yang, P. Y. Li, M. Zanella, W. H. Chang, W. G. J. Parak, *Small* **2008**, 4, 334.
- [80] G. B. Sukhorukov, A. L. Rogach, M. Garstka, S. Springer, W. J. Parak, A. Munoz-Javier, O. Kreft, A. G. Skirtach, A. S. Sussha, Y. Ramaye, R. Palankar, M. Winterhalter, *Small* **2007**, 3, 944.
- [81] W. W. Yu, E. Chang, C. M. Sayes, R. Drezek, V. L. Colvin, *Nanotechnology* **2006**, 17, 4483.
- [82] B. S. Kim, J. M. Qiu, J. P. Wang, T. A. Taton, *Nano Letters* **2005**, 5, 1987.
- [83] H. Lee, E. Lee, D. K. Kim, N. K. Jang, Y. Y. Jeong, S. Jon, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, 7383.
- [84] A. F. Thunemann, D. Schutt, L. Kaufner, U. Pison, H. Mohwald, *Langmuir* **2006**, 22, 2351.
- [85] W. Liu, M. Howarth, A. B. Greytak, Y. Zheng, D. G. Nocera, A. Y. Ting, M. G. Bawendi, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130, 1274.
- [86] J. Yang, T. I. Lee, J. Lee, E. K. Lim, W. Hyung, C. H. Lee, Y. J. Song, J. S. Suh, H. G. Yoon, Y. M. Huh, S. Haam, *Chemistry of Materials* **2007**, 19, 3870.
- [87] J. Xie, C. Xu, N. Kohler, Y. Hou, S. Sun, *Advanced Materials* **2007**, 19, 3163.
- [88] M. A. White, J. A. Johnson, J. T. Koberstein, N. J. Turro, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, 4504.
- [89] R. Matsuno, K. Yamamoto, H. Otsuka, A. Takahara, *Macromolecules* **2004**, 37, 2203.
- [90] R. A. Sperling, T. Liedl, S. Duhr, S. Kuder, M. Zanella, C. A. J. Lin, W. H. Chang, D. Braun, W. J. Parak, *Journal of Physical Chemistry C* **2007**, 111, 11552.
- [91] M. S. Nikolic, C. Olsson, A. Salcher, A. Kornowski, A. Rank, R. Schubert, A. Fromsdorf, H. Weller, S. Forster, *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, 48, 2752.
- [92] H. B. Na, I. C. Song, T. Hyeon, *Advanced Materials* **2009**, 21, 2133.
- [93] E. Taboada, E. Rodriguez, A. Roig, J. Oro, A. Roch, R. N. Muller, *Langmuir* **2007**, 23, 4583.
- [94] M. Stuber, W. D. Gilson, M. Schar, D. A. Kedziorek, L. V. Hofmann, S. Shah, E. J. Vonken, J. W. M. Bulte, D. L. Kraitchman, *Magnetic Resonance in Medicine* **2007**, 58, 1072.

- [95] H. Hifumi, S. Yamaoka, A. Tanimoto, D. Citterio, K. Suzuki, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, 15090.
- [96] C. Rydahl, H. S. Thomsen, P. Marckmann, *Investigative Radiology* **2008**, 43, 141.
- [97] J. G. Penfield, R. F. Reilly, *Nature Clinical Practice Nephrology* **2007**, 3, 654.
- [98] H. B. Na, T. Hyeon, *Journal of Materials Chemistry* **2009**, 19, 6267.
- [99] H. B. Na, J. H. Lee, K. J. An, Y. I. Park, M. Park, I. S. Lee, D. H. Nam, S. T. Kim, S. H. Kim, S. W. Kim, K. H. Lim, K. S. Kim, S. O. Kim, T. Hyeon, *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, 46, 5397.
- [100] E. A. Neuwelt, B. E. Hamilton, C. G. Varallyay, W. R. Rooney, R. D. Edelman, P. M. Jacobs, S. G. Watnick, *Kidney International* **2009**, 75, 465.
- [101] J. Koolman, K.-H. Röhm, J. Wirth, *Taschenatlas der Biochemie*, 3 ed., Thieme-Verlag, Stuttgart, **2003**.
- [102] H. Wu, H. Zhu, J. Zhuang, S. Yang, C. Liu, Y. C. Cao, *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, 47, 3730.
- [103] W. H. Liu, H. S. Choi, J. P. Zimmer, E. Tanaka, J. V. Frangioni, M. Bawendi, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, 14530.
- [104] W. Norde, D. Gage, *Langmuir* **2004**, 20, 4162.
- [105] C. Röcker, M. Pötzl, F. Zhang, W. J. Parak, G. U. Nienhaus, *Nature Nanotechnology* **2009**, 4, 577.
- [106] S. Wagner, J. Schnorr, H. Pilgrim, B. Hamm, M. Taupitz, *Investigative Radiology* **2002**, 37, 167.
- [107] M. Taupitz, S. Wagner, J. Schnorr, *Investigative Radiology* **2004**, 39, 625.
- [108] H. S. Choi, W. Liu, P. Misra, E. Tanaka, J. P. Zimmer, B. I. Ipe, M. G. Bawendi, J. V. Frangioni, *Nature Biotechnology* **2007**, 25, 1165.
- [109] A. K. Gupta, S. Wells, *Ieee Transactions on Nanobioscience* **2004**, 3, 66.
- [110] N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek, *Small* **2008**, 4, 26.
- [111] U. I. Tromsdorf, O. T. Bruns, S. C. Salmen, U. Beisiegel, H. Weller, *Nano Letters* **2009**, 9, 4434.
- [112] O. T. Bruns, H. Ittrich, K. Peldschus, M. G. Kaul, U. I. Tromsdorf, J. Lauterwasser, M. S. Nikolic, B. Mollwitz, M. Merckel, N. C. Bigall, S. Sapra, R. Reimer, H. Hohenberg, H. Weller, A. Eychmüller, G. Adam, U. Beisiegel, J. Heeren, *Nature Nanotechnology* **2009**, 4, 193.
- [113] J. M. Perez, L. Josephson, T. O'Loughlin, D. Hogemann, R. Weissleder, *Nature Biotechnology* **2002**, 20, 816.

- [114] J. H. Lee, Y. M. Huh, Y. Jun, J. Seo, J. Jang, H. T. Song, S. Kim, E. J. Cho, H. G. Yoon, J. S. Suh, J. Cheon, *Nature Medicine* **2007**, 13, 95.
- [115] J. T. Jang, H. Nah, J. H. Lee, S. H. Moon, M. G. Kim, J. Cheon, *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, 48, 1234.
- [116] R. A. Brooks, *Magnetic Resonance in Medicine* **2002**, 47, 388.
- [117] P. Gillis, F. Moiny, R. A. Brooks, *Magnetic Resonance in Medicine* **2002**, 47, 257.
- [118] C. V. Bowen, X. W. Zhang, G. Saab, P. J. Gareau, B. K. Rutt, *Magnetic Resonance in Medicine* **2002**, 48, 52.
- [119] E. Pösel, S. Fischer, S. Foerster, H. Weller, *Langmuir* **2009**, 25.
- [120] A. Roch, Y. Gossuin, R. N. Muller, P. Gillis, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005**, 293, 532.
- [121] Y. Matsumoto, A. Jasanoff, *Magnetic Resonance Imaging* **2008**, 26, 994.
- [122] W. S. Seo, J. H. Lee, X. M. Sun, Y. Suzuki, D. Mann, Z. Liu, M. Terashima, P. C. Yang, M. V. McConnell, D. G. Nishimura, H. J. Dai, *Nature Materials* **2006**, 5, 971.
- [123] J. C. Frias, Y. Q. Ma, K. J. Williams, Z. A. Fayad, E. A. Fisher, *Nano Letters* **2006**, 6, 2220.
- [124] D. R. Cormode, K. C. Briley-Saebo, W. J. M. Mulder, J. G. S. Aguinaldo, A. Barazza, Y. Q. Ma, E. A. Fisher, Z. A. Fayad, *Small* **2008**, 4, 1437.
- [125] J. C. Frias, K. J. Williams, E. A. Fisher, Z. A. Fayad, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 16316.
- [126] I. R. Corbin, H. Li, J. Chen, S. Lund-Katz, R. Zhou, J. D. Glickson, G. Zheng, *Neoplasia* **2006**, 8, 488.
- [127] J. D. Glickson, S. Lund-Katz, R. Zhou, H. Choi, I. W. Chen, H. Li, I. Corbin, A. V. Popov, W. G. Cao, L. P. Song, C. Z. Qi, D. Marotta, D. S. Nelson, J. Chen, B. Chance, G. Zheng, *Molecular Imaging* **2008**, 7, 101.
- [128] M. A. McAteer, N. R. Sibson, C. von zur Muhlen, J. E. Schneider, A. S. Lowe, N. Warrick, K. M. Channon, D. C. Anthony, R. P. Choudhury, *Nature Medicine* **2007**, 13, 1253.
- [129] M. Merkel, Y. Kako, H. Radner, I. S. Cho, R. Ramasamy, J. D. Brunzell, I. J. Goldberg, J. L. Breslow, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, 95, 13841.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
Abb.	Abbildung
B	Magnetische Flussdichte
DLS	Dynamische Lichtstreuung
emu	electromagnetic unit
EL	Echo-Limiting
Gl.	Gleichung
H	Magnetische Feldstärke
HDL	High density Lipoprotein
LpL	Lipoprotein Lipase
M	Magnetisierung
MAR	Motional Averaging Regime
MRT	Magnetresonanztomographie
M _s	Sättigungsmagnetisierung
M _{xy}	Transversale Magnetisierung
M _z	Longitudinale Magnetisierung
NMR	Nuclear magnetic resonance
Oe	Oersted
PEG	Polyethylenglykol
SDR	Static Dephasing Regime
SPIO	Superparamagnetic iron oxide
T _C	Curie-Temperatur
T _E	Echozeit

TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TR	Wiederholzeit
TRL	Triglyceridreiches Lipoprotein
T ₁	Longitudinale Relaxationszeit
T ₂	Transversale Relaxationszeit
T ₂ *	Effektive transversale Relaxationszeit
USPIO	Ultrasmall superparamagnetic iron oxide
XRD	Röntgendiffraktometrie

8.2 Chemikalien

Chemikalien	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Aceton	F, Xi	11-36-66-67	9-16-26
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Dibenzylether	Xi	36/37/38	24/25
Dichlormethan	Xn	40	23-24/25-36/37
Diocylether			24/25
Diphenylether	N	51/53	61
Eisenpentacarbonyl	T+, F	11-24-26/28	9-16-29-36/37/39-45
Eisen-trisacetylacetonat	Xn	22-36/37/38	26-37/39
Ethanol	F	11	7-16
1,2-Hexadekandiol			22-24/25
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
1-Octadecen			62
Oleylamin	C, Xn	22-34	24/25-26
Ölsäure	Xi	36/37/38	26-37/39
Phosphorylchlorid	T+, C	14-22-26-35-48/23	1/2-7/8-26-36/37/39-45
Tetrahydrofuran	F, Xi	11-19-36/37	16-29-33
Triethylamin	F, C	11-20/21/22-35	1/2-3-16-26-29-36/37/39-45
Trimethylamin- <i>N</i> -oxid	Xi	36/37/38	

8.3 Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge

8.3.1 Gefahrensymbole

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

8.3.2 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.

8.3.3 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.

8.3.4 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 angeben).
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 angeben). S 47.1 Nicht bei Temperaturen über 25°C aufbewahren.
S 48	Feucht halten mit ... (vom Hersteller angeben).
S 48.1	Feucht halten mit Wasser.
S 49	Nur im Originalbehälter aufbewahren.
S 50	Nicht mischen mit ... (vom Hersteller angeben).
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).

8.3.5 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 Problemabfallentsorgung 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).

8.4 Danksagungen

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Horst Weller für die Aufnahme in den Arbeitskreis, die gute Betreuung während der Doktorarbeit sowie die große Freiheit für das Einbringen eigener Ideen in das Forschungsthema.

Herrn Prof. Dr. Stephan Förster danke ich für die Übernahme der Aufgabe des Zweitgutachters.

Frau Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel und PD Dr. Jörg Heeren danke ich für die gemeinsamen Projekte sowie die Bereitstellung zahlreicher Gerätschaften und Materialien in ihrer Arbeitsgruppe.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Adam und Dr. Heinrich Hohenberg danke ich für die Kooperation.

Die Anfertigung meiner Doktorarbeit wäre ohne folgende Personen nicht möglich gewesen und ihnen gilt mein besonderer Dank:

Dr. Oliver Bruns für die freundschaftliche und erfolgreiche Kooperation.

Michael Kaul für die Zusammenarbeit und den gegenseitigen fachlichen Austausch sowie die Messungen am MRT.

Elmar Pösel für die Kooperation bezüglich der Triblockcopolymere.

Dr. Tobias Vossmeier für viele fruchtbare Diskussionen und Anregungen zu meinem Thema.

Andreas Kornowski, Almut Barck und Sylvia Bartholdi-Nawrath für die Messungen am TEM und XRD.

Meinen Forschungs- und Schwerpunktpraktikanten (Robert, Reentje, Emine, Kathrin, Sunhild, Christoph) für ihre Hilfe.

Dr. Tatjana Achenbach und Dr. Andrea Salcher für die Durchführung der Tox-Tests im CAN.

Dem AK Weller danke ich für die gute Atmosphäre und viele heitere Stunden außerhalb der täglichen Arbeit. Meiner Kollegin und Kommilitonin Andjana Panicker danke ich für die freundschaftliche Atmosphäre in unserem gemeinsamen Büro.

Ich danke meiner Freundin Sabine und meinen Eltern für die große Unterstützung und das Vertrauen in meine Fähigkeiten.

8.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ulrich Ingmar Tromsdorf
Adresse: Suhrenkamp 20
22335 Hamburg
Geburtsdatum: 04.05.1981 in Hamburg
Telefon: 040/48400655
E-Mail: ulrich.tromsdorf@chemie.uni-hamburg.de
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Religion: evangelisch-lutherisch

Ausbildung

08.1987-07.1991 Grundschule Müssenredder
08.1991-07.2000 Gymnasium Harksheider Straße
Abschluss: Abitur
09.2000-07.2001 Zivildienst in der häuslichen Alten- und Krankenpflege in Hamburg
10.2001-07.2003 Grundstudium der Chemie an der Universität Hamburg
Abschluss: Vordiplom
08.2003-02.2006 Hauptstudium der Chemie an der Universität Hamburg
03.2006-09.2006 Diplomarbeit am Institut für Physikalische Chemie der Universität
Hamburg in der Gruppe von Prof. Dr. Weller zum Thema
„Untersuchungen an superparamagnetischen Manganferrit-
Nanopartikeln im Hinblick auf ihre Eignung als Kontrastmittel in der
Magnetresonanztomographie“
20.09.2006 Abschluss: Diplom
10.2006-09.2009 Promotion im Institut für Physikalische Chemie der Universität
Hamburg in der Gruppe von Prof. Dr. Weller zum Thema
„Superparamagnetische Ferrit-Nanopartikel als Kontrastmittel für die
Magnetresonanztomographie“

Ehrungen und Preise

07.2007 Auszeichnung des Diploms als bestes Diplom des Departments Chemie
im Jahr 2006 durch den Freundes- und Förderverein Chemie der
Universität Hamburg

Publikationen in Fachzeitschriften und Jahresberichten

U.I. Tromsdorf, N.C. Bigall, M.G. Kaul, O.T. Bruns, M.S. Nikolic, B. Mollwitz, R.A. Sperling, R. Reimer, H. Hohenberg, W.J. Parak, S. Förster, U. Beisiegel, G. Adam, H. Weller *Nano Letters* **2007**, 7, 2422-2427.

S. Fischer, A. Frömsdorf, S.S. Funari, **U. Tromsdorf**, H. Weller, S. Förster *HASYLAB Annual Report I* **2007**, 583.

S. Fischer, A. Frömsdorf, S.S. Funari, **U. Tromsdorf**, H. Weller, S. Förster *HASYLAB Annual Report I* **2007**, 769.

O.T. Bruns, H. Ittrich, K. Peldschus, M.G. Kaul, **U.I. Tromsdorf**, J. Lauterwasser, M.S. Nikolic, B. Mollwitz, M. Merkel, N.C. Bigall, S. Sapra, R. Reimer, H. Hohenberg, H. Weller, A. Eychmüller, G. Adam, U. Beisiegel, J. Heeren *Nature Nanotechnology* **2009**, 4, 193-201.

U.I. Tromsdorf, O.T. Bruns, S.C. Salmen, U. Beisiegel, H. Weller *Nano Letters* **2009**, 9, 4434-4440.

U.I. Tromsdorf, E.Pösel, C. Hahn, H. Weller, *An optimized iron oxide based negative MR contrast agent for T₂ weighting spin echo imaging*, Manuskript in Vorbereitung.

Buchbeiträge

G. Krylova, M.I. Bodnarchuk, **U.I. Tromsdorf**, E.V. Shevchenko, D.V. Talapin, H. Weller *Synthesis, properties and applications of magnetic nanoparticles* (in: *Nanoparticles – From Theory to Application*, Editor: G. Schmid, 2. ed., **2009**).

Vorträge auf Kongressen

MnFe₂O₄ nanocrystals for MRI: The influence of particle size and coating on contrast enhancement, 15. Mai 2007, 27. Blankenese Konferenz, Hamburg

Superparamagnetic Ferrite nanoparticles: Potential applications for T₁ and T₂ weighted imaging, 2. Mai 2008, Bunsentagung 2008, Saarbrücken

Superparamagnetic Nanoparticles for MRI: Optimized Contrast Agents for T₁ and T₂ weighted imaging, 29. Januar 2010, GKSS Workshop, Geesthacht

Patente

U.I. Tromsdorf, O.T. Bruns, H. Weller, *Metal Oxide Particles Coated with Polyethylene Glycol And Their Synthesis*, submitted to the UK Intellectual Property Office, 0913803.3

8.6 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 22.12.2009

Ulrich Tromsdorf